



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE AMINOAZÚCARES, AMINOGLUCÓSIDOS Y POLIAMINAS
BIOLÓGICAS CON ÁCIDOS FORMIL FENILBORÓNICOS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. NINI JOHANNA GUTIÉRREZ MORENO

TUTOR: Dr. ANATOLY K. YATSIMIRSKY

FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE AMINOAZÚCARES, AMINOGLUCÓSIDOS Y
POLIAMINAS BIOLÓGICAS CON ÁCIDOS FORMIL FENILBORÓNICOS**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. NINI JOHANNA GUTIÉRREZ MORENO



TUTOR: Dr. ANATOLY K. YATSIMIRSKY

AÑO: 2016

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. José Norberto Farfán García	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. José Federico del Río Portilla	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Herbert Höpfl Bachner	UAEM, Morelos
Vocal	Dr. Julio César Aguilar Cordero	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. José Ivan Castillo Pérez	Instituto de Química, UNAM

TUTOR

Dr. Anatoly K. Yatsimirsky

Facultad de Química, UNAM

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 213 de la Coordinación de Posgrados de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, No. de registro 212848)

PUBLICACIÓN Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Parte del presente trabajo de tesis fue publicado y presentado en:

Gutiérrez-Moreno, N. J.; Medrano, F.; Yatsimirsky, A. K. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (34), 6960–6972 “*Schiff base formation and recognition of amino sugars, aminoglycosides and biological polyamines by 2-formyl phenylboronic acid in aqueous solution.*”



V Encuentro o de Química Inorgánica EQI

Guadalajara, Jalisco del 20 de junio al 2 de julio de 2011

“*Reconocimiento molecular de polioles con receptores derivados de arilboronatos*”

QuimiUNAM 2011

México D.F., 16-18 de noviembre de 2011

“*Colorimetric and spectrophotometric detection of aminosugars and aminoglycosides with boronic acid derivatives*”

QuimiUNAM 2012

México D.F., 14-16 de noviembre de 2012

“*Molecular recognition of amino sugars, aminoglycosides and biological polyamines by 2-formyl phenylboronic acid in aqueous solution.*”

Challenges in Organic Chemistry and Chemical Biology (ISACS7)

Edimburgo, (R.U.), 12 – 15 Junio 2012

“*Schiff base formation and recognition of aminoglycosides by 2-formyl phenylboronic acid in aqueous solution.*”

“Tres seres me ha prestado la Diosa Vida en mi caminar, los que dieron luz a mis ojos y el que llegó a guiarla con gran ímpetu. Dedico este trabajo a mis padres y a mi amado Samuel”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Anatoli Yatsimirsky por su excelente labor como asesor, por su confianza, apoyo y comprensión. Porque además de las enseñanzas académicas, me dio grandes lecciones de calidad humana.

Agradezco al CONACyT, por la beca otorgada que permitió la realización del presente trabajo.

Al Posgrado en Ciencias Químicas, por el apoyo burocrático y el presupuesto otorgado para presentar éste trabajo en el Congreso ISACS7 en Edimburgo, Escocia, Reino Unido, en junio de 2011.

A los integrantes del comité tutorial, Dr. Jesús Valdés Martínez y Dr. Herbert Höpfl Bachner, por sus recomendaciones, sugerencias e incondicional ayuda para mejorar cada semestre la ruta del proyecto de investigación.

A los miembros del jurado, Dr. José Norberto Farfán García, Dr. José Federico del Río Portilla, Dr. Herbert Höpfl Bachner, y al Dr. José Iván Castillo Pérez, por su invaluable labor con sus comentarios y correcciones y al Dr. Julio César Aguilar Cordero por su exhaustiva revisión y corrección, para tener una mejor versión del presente trabajo.

Al Dr. Felipe Medrano Valenzuela, por su gran ayuda en el cálculo y análisis de las estructuras teóricas.

A la Dra. Rosa Santillán Baca, del Departamento de Química del CINVESTAV, y la M. en C. Maria Eugenia Ochoa Becerra, por su colaboración en la obtención de los espectros de RMN de ^{11}B .

A la Dra. Gómez-Tagle por sus invaluable enseñanzas, que ayudaron a potenciar mi autoestima y fortalecer mi carácter.

A la Facultad de Química y la unidad de servicios analíticos para la investigación (USAI), de la UNAM. En especial, a las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear: M. en C. Rosa Izel Díaz de Vivar y Nuria Estudiante Esturiao, por su interés y apoyo para obtener los espectros de RMN ^{11}B .

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio 213 de Química Inorgánica, Irma, Alejandro, Raúl, David, Adriana, Carol, por su apoyo y por mantener un agradable ambiente de trabajo. También a la siguiente generación Mayté y Mariel, por su amabilidad y apoyo.

Agradezco a mi familia, por su respaldo y a mis amigos Germán Álvarez, Hamilton Hernández, Yenny Ávila y Aleen Erazo, por su voz de aliento, su confianza y apoyo incondicional.

Agradezco de forma muy especial a mi compañero de crianza de nuestro tesoro, Mario Alberto Silva por su devota presencia y su autenticidad.

Contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. Fundamentos y Antecedentes. Química Supramolecular	8
2.1. Reconocimiento Molecular	8
2.1.1. Tipos de fuerzas en química supramolecular	10
2.1.2. Asociación covalente reversible	13
2.1.3. Enlaces de hidrógeno mediados por agua	14
2.1.4. Polioles y poliaminas y su importancia en la detección.....	16
2.2. Importancia en la detección y aplicaciones en el monitoreo de su unión con el ARN.....	27
2.2.1. Estrategias para la formación de derivados, monitoreo y detección.....	28
2.3. Ácidos borónicos.....	31
2.3.1. Generalidades de los ácidos borónicos.....	31
2.3.2. Propiedades físicas y manipulación.....	33
2.3.3. Estructura y Enlace de los Ácidos Borónicos	33
2.4. Reconocimiento molecular utilizando ácidos borónicos	36
2.4.1. Interacción de Ácido arilborónico–Diol.....	37
2.4.2. Interacción N→B.....	41
2.5. Formación de Iminas – interacción excepcional	47
2.5.1. Función en síntesis orgánica.....	47
2.5.2. Función en Química combinatoria:	49
2.5.3. Función como cromóforo:.....	50
2.5.4. Equilibrio de Bases de Schiff en medio acuoso.....	53

<i>Hipótesis</i>	57
<i>Justificación</i>	57
<i>Objetivos</i>	57
3. Resultados y discusión de la caracterización y pruebas preliminares de ácido fenilborónico (PBA) e isómeros del ácido formil fenilborónico (fPBA) con polioles. ..	59
3.1. Caracterización espectroscópica y potenciométrica del PBA y de los isómeros de fPBA.....	59
3.1.1. Determinación de pK_a	59
3.1.2. Caracterización por RMN 1H	62
3.1.3. Caracterización por RMN ^{11}B	65
3.2. Asociación con azúcares.....	67
3.2.1. Método por desplazamiento de indicador (IDA).....	68
3.2.2. Método Directo.....	80
3.3. Conclusión.....	85
4. Resultados y discusión de la asociación de los isómeros del fPBA con aminas, aminoazúcares y aminoglucósidos	86
4.1. Caracterización por espectroscopía UV-Vis	87
4.1.1. Aminoazúcares.....	87
4.1.2. Aminoglucósidos	91
4.1.3. Monoaminas.....	92
4.2. Caracterización por espectroscopía RMN 1H	92
4.3. Estudio de la asociación de los ácidos fPBA con aminoazúcares, aminoglucósidos y aminas.....	97
4.3.1. Determinación de las constantes de asociación por espectroscopía UV-Vis y RMN 1H	97
4.4. Estudio de la selectividad del 2fPBA.....	102

4.4.1.	Equilibrios de la estructura de la imina.....	105
4.5.	Perfiles de interacción a pH variable con 2fPBA	108
4.5.1.	Monoaminas.....	108
4.5.2.	Discusión de la asociación 2fPBA-SPMN.....	113
4.5.3.	Coordenadas de Brönsted.....	115
4.6.	Estudios teóricos.....	117
4.6.1.	D-glucosamina.....	117
4.6.2.	knmyA.....	118
4.6.3.	Espermina	121
4.7.	Conclusión	123
5.	Resultados y discusión de la asociación de los heterociclos análogos del ácido fPBA con aminoazúcares, aminoglucósidos y aminas.	125
5.1.	Introducción	125
5.2.	Caracterización por espectroscopía UV-Vis	126
5.3.	Análisis de la asociación de los compuestos heterocíclicos con 2MEA, GluNH ₂ , knmyA y nmcyB.....	127
5.3.1.	Discusión de los resultados preliminares con ácidos borónicos heterocíclicos.....	131
6.	Conclusiones	133
	Parte experimental.....	136
	Reactivos	136
	Receptores.....	136
	Disolventes	139
	Condiciones generales de Instrumentos y Equipos.....	139
	Potenciometría.....	139

UV-Vis	139
RMN	139
Cálculos teóricos.....	140
Software.....	140
Procedimientos.....	140
Síntesis de receptores derivados de 2fPBA.....	140
Determinación de pK_a	140
Titulaciones in situ UV-Vis.....	141
Titulaciones espectrofotométricas UV-Vis con los ácidos PBA y fPBA.....	142
Titulaciones in situ RMN ^1H y ^{11}B	144
Referencias	146
APÉNDICES.....	166
ARTÍCULO	177

LISTA DE ABREVIATURAS

Lista de Abreviaturas

ϵ	Coefficiente de absortividad molar
μL	Microlitros (10^{-6} L)
μM	Micromol, micromolar (10^{-6} M)
2fPBA	Ácido 2-formil fenilborónico
2MEA	2-metoxi etil amina
3fPBA	Ácido 3-formil fenilborónico
4fPBA	Ácido 4-formil fenilborónico
ARS	Sulfonato de rojo de alizarina (alizarin red sulfonate)
CHES	Ácido 2-(ciclohexilamino)etano sulfónico
CTA	Ácido cromotrópico
DFT	Teoría de funciones de la densidad (por sus siglas en inglés)
FBA	Ácido furanilborónico
fPBA	Ácido formil fenilborónico
GluNH₂	D-Glucosamina
Gly	Glicina
Gly-Gly	Glicilglicina
HF	Funcional Hartree-Fock
IDA	Método de desplazamiento de indicador (por sus siglas en inglés)
knmyA	Kanamycina A
knmyB	Kanamycina B
M06	funcionales de la densidad de la familia Minnesota
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etano sulfónico
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)propano sulfónico
n-BuNH₂	n-Butilamina
nm	Nanómetro (1 nm = 10^{-9} m)
nmyc	Neomycina

PBA	Ácido fenilborónico
PCV	Violeta de pirocatecol
RMN ¹¹B	Resonancia magnética nuclear de boro
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
SPDNA	Espermidina
SPMN	Espermina
TBA	Ácido tiofenborónico
TFEA	tri-Fluoroetil amina
TMS	tri-Metilsulfóxido
U.A.	Unidades arbitrarias
UV-Vis	Espectrofotometría de ultravioleta visible
λ	Longitud de onda

Resumen

En esta tesis que lleva como título “*Reconocimiento molecular de aminoazúcares, aminoglucósidos y poliaminas biológicas con ácidos formil fenilborónicos*” se abordan varios aspectos sobre el modo de interacción en medio acuoso de los ácidos formil fenilborónicos (fPBA) con moléculas que contengan a la vez polioles y grupos amino en su estructura.

La investigación se dirige hacia el estudio de la interacción de los ácidos 2-, 3-, 4-formil fenilborónicos (fPBA) con azúcares, aminoazúcares, aminoglucósidos, aminas y poliaminas, por medio de titulaciones observadas y analizadas por medio de las técnicas de UV-Vis, o RMN de ^1H o de ^{11}B a pH variable en medio acuoso. El estudio del ácido 2-formil fenilborónico (2fPBA) precisó un enfoque más detallado, debido a la excepcional interacción observada y resultados singulares frente a sus isómeros. La posibilidad de que el 2fPBA forme una estructura semejante al benzoboroxol por la ciclación intramolecular al transformarse en su base conjugada, así como la gran respuesta óptica luego de la asociación con las poliaminas, son dos de las principales características que lo destacan por encima de los isómeros 3- y 4fPBA.

En la primera parte, se realiza la caracterización de las interacciones del ácido fenilborónico (PBA) y de los tres isómeros del fPBA con glucosa, fructosa y sorbitol en medios acuosos a pH 7.0. Por medio de las isotermas de titulaciones registradas por UV-Vis se calcularon las constantes de asociación de los isómeros y el PBA con resultados comparables de K_{obs} utilizando los métodos de desplazamiento de indicador (IDA) con la sulfona de rojo de alizarina (ARS, por sus siglas en inglés) y titulaciones directas. En segundo lugar, se estudió la respuesta fluorogénica con los indicadores violeta de pirocatecol (PCV) y ácido cromotrópico (CTA). Durante la ejecución de la tesis se encontraba en la literatura el estudio de la sustitución del anillo de PBA, con derivados de grupos metilhidroxilo en posición *orto*- al grupo borónico (benzoboroxol), los cuales, podían llegar a aumentar hasta dos veces los valores de la constante de asociación con los polioles.¹ Las técnicas de RMN de ^1H y de ^{11}B aportaron datos determinantes para demostrar la ciclación en medio acuoso alcalino que indicaba la transformación del 2fPBA en el benzoboroxol, estructura que no había sido publicada bajo estas condiciones sino hasta el presente trabajo.

La segunda parte de la tesis contiene el eje principal de la investigación sobre el modo de asociación del 2fPBA con aminoazúcares, aminoglucósidos, monoaminas y poliaminas biológicas. La diferencia de la afinidad entre los isómeros hacia los analitos queda en evidencia al comparar los valores de las

constantes de equilibrio para la formación de la imina (K_{im}) obtenidas para el 2fPBA frente al 3 y 4fPBA. La K_{im} entre el 2fPBA y las monoaminas, incluidos los aminoazúcares registraron valores que superan hasta en dos órdenes de magnitud los obtenidos con los otros dos isómeros 3 y 4fPBA. Incluso la afinidad del 2fPBA hacia los aminoazúcares y poliaminas fue mayor, con valores para las constantes de formación un orden de magnitud mayores a las observadas para las monoaminas.

Estudios específicos hechos mediante UV-Vis y RMN de ^{11}B sirvieron para elucidar la estructura de la imina demostraron que, aunque la especie formada es neutra se encuentra en forma de zwitterion, formada por el grupo boronato aniónico y la imina protonada, lo cual puede explicar la especial estabilidad de las iminas formadas entre el 2fPBA con las monoaminas asociada a la estabilización electrostática de la especie zwitterion. Siguiendo el mismo análisis, se postula que el ion boronato del 2fPBA, a través de interacciones de par iónico, logra estabilizar a los grupos amino de las poliaminas en valores de pH en los cuales dichos grupos se encuentren protonados, dando como resultado una gran respuesta óptica que permite detectar los aminoglucósidos y poliaminas en concentraciones del orden micromolar (μM) en soluciones acuosas neutras.

Finalmente, teniendo en cuenta que los ácidos borónicos son reconocidos por ser agentes inhibidores útiles de las β -lactamasas, y que algunos derivados heterocíclicos son utilizados como “antirresistentes”, se incluyó en el estudio el análisis cualitativo por UV-Vis de la asociación de derivados del formil-tiofeno y furano con y sin la función ácido borónico, además el ácido 2-formil-5-metoxi-fenilborónico (5M2fPBA) con analitos representantes de los grupos estudiados: una monoamina (2MEA), un aminoazúcar (GluNH_2) y dos aminoglucósidos (knmyA y nmyc). Los resultados con los derivados heterocíclicos, aunque fueron modestos con respecto al 2fPBA arrojaron que la función borónica sí influye y mejora la estabilidad del equilibrio hacia la formación de las iminas. La formación de las bases de Schiff, para fines prácticos fue imperceptible con el formil-tiofeno, mientras que con los ácidos 2-formil-3-tionilborónico (2f3TBA) y 3-formil-2-furanilborónico (3f2FBA) fueron suficientes 10–15 μM de knmyA para observar la asociación con una K_{obs} sólo un orden de magnitud menor al observado con el 2fPBA en los mismos valores de pH.

Abstract

In this thesis entitled “*Molecular recognition of aminosugars, aminoglycosides and biological polyamines with formyl phenylboronic acids*” different aspects about the binding interaction in aqueous media of formyl phenylboronic acids (fPBA’s) with molecules with both amino and polyols groups were investigated.

Interactions of 2-, 3- and 4-fPBA with sugars, aminosugars, aminoglycosides, amines and polyamines by means of UV-Vis, ^1H and ^{11}B NMR titrations in water at variable pH are the key aspects of this research. The study about the 2-formyl phenylboronic acid (2fPBA) was deeper because of the exceptional and unexpected results in the binding process. The highlighted aspects among the other two isomers are the ability of the acid to transform into its conjugate base through the intramolecular cyclization affording the respective benzoboroxole and the large absorption change after polyamine association.

In the first part of the thesis the characterization of the interaction between the phenylboronic acid (PBA) and the three isomers of fPBA with glucose, fructose and sorbitol has been followed in aqueous media at pH 7.0. Through isothermal titrations, record with UV-Vis, binding constants of each isomer and the PBA were determined, with comparable results between the ones calculated from IDA experiments with Alizarin Red Sulphona (ARS) and direct titrations. Besides, the fluorogenic response was measured with Pyrocatechol Violet (PCV) and Chromotropic Acid (CTA) indicators. During the implementation of this thesis, there were reports in the literature, that derivatives bearing a methylhydroxyl-group in *ortho*-position to the boron (benzoboroxole) exhibit in most cases a two-fold higher association constant with polyols. To gain a deeper understanding, ^1H and ^{11}B NMR spectroscopy with the 2fPBA was performed and provide decisive information to confirm the transformation of 2fPBA into the benzoboroxole, which had not been reported under those conditions until the current study.ⁱ

The second part of the thesis presents the key elements of the study about the binding mode of 2fPBA with aminosugars, aminoglycosides, mono- and biological polyamines. Differences in affinity observed among the isomers and the 2fPBA is evident when the equilibrium constant values for the imine formation (K_{im}) are compared. The K_{im} between 2fPBA and simple monoamines including amino sugars were *c.a.* two orders of magnitude larger than those with

other isomers. Still one order of magnitude larger K_{im} values were observed for 2fPBA with aminoglycosides and polyamines. The investigations by UV-Vis and ^{11}B NMR to elucidate the imine structure showed that the imine formed is formally neutral, but in fact it is a zwitterion species containing a boronate anionic and an imine protonated groups, a fact that could explain the enhanced stability of imines with monoamines attributed to the electrostatic stabilization provided by the zwitterionic structure. In line with this explanation, the boronate ion in 2fPBA increased the stability of imines through ion pairing interactions with the ammonium groups not involved in the Schiff base formation of polyamines at certain pH values. The large optical signal allows detecting the aminoglycosides and polyamines in a μM concentration range in neutral aqueous solutions.

Finally, since boronic acids could inhibit β -lactamase and some of its heterocyclic derivatives serve as “antiresistants”, we decided to include the heterocycles formyl-thiophene and formyl-furane with and without the boronic acid group. Besides the 2-formyl-5-methoxyphenyl boronic acid (5M2fPBA) to the qualitative analysis of binding by UV-Vis with selected analites: a monoamine (2MEA), an aminosugar (D-GluNH₂) and two aminoglycosides (knmyA and nmyc). Although the results with the heterocycle systems were low in comparison with the ones obtained for 2fPBA, they also showed the enhanced stability of the boronic group to the imine formation. To a practical level, Schiff base formation with formyl-thiophene was negligible, whereas with 2-formyl-3-thiopheneboronic (2f3TBA) and 3-formyl-2-furanylboronic (3f2FBA) acids showed that 10–15 μM of knmyA was enough to obtain a K_{obs} one order of magnitude smaller than the one for the binding with 2fPBA under the same pH conditions.

1. INTRODUCCIÓN

En el grupo de investigación en el que se realizó la presente Tesis Doctoral, se han hecho trabajos en la detección de cationes, aniones, especies neutras y de importancia biológica, por medio de la síntesis de receptores complejos. Sin embargo, la línea más reciente es explorar una pieza clave en el reconocimiento molecular, como son los ácidos fenilborónicos (fPBA), capaces de originar grandes diferencias espectroscópicas en presencia de determinadas especies, dada su posibilidad de unirse a varios tipos de dioles y aniones. Lo cual le da a los ácidos y ésteres borónicos una trayectoria enriquecida en química supramolecular.²

En particular, los ácidos formil-fenilborónicos tienen aplicaciones novedosas, ya sea como elementos de construcción bifuncionales en la fabricación de estructuras supramoleculares macrocíclicas de auto-ensamblaje, jaulas y estructuras poliméricas, o por medio de su capacidad de formar ésteres iminoboronatos con cualidades reversibles.³ Desde la propuesta del receptor que introdujo Wulff, con el cual demostró que si el receptor cuenta con una interacción entre el ácido borónico y un grupo amina próximo, se puede reducir el pK_a del ácido borónico. Este arreglo permite que la asociación entre los ácidos borónicos con sistemas 1,2-dioles se verifique en valores de pH neutros. Tales resultados dieron origen a que las posibilidades de aplicaciones biológicas crecieran de forma excepcional.⁴

En el área de reconocimiento molecular, el isómero 2fPBA ha mostrado ser una pieza importante en reacciones de síntesis asimétrica⁵ para la determinación de ‘exceso enantiomérico’ de aminas⁶ y dioles quirales⁷ con protocolos de derivatización sencillos. Sin embargo, tales reacciones son efectuadas en medios de baja polaridad, generalmente cloroformo, con el fin de desplazar el equilibrio de la formación de la imina y el éster boronato a los productos respectivos.

Por otra parte algunos analitos que presentan dificultades en su análisis, ya que carecen de grupos cromóforos en su estructura, son los aminoazúcares y aminoglucósidos; los primeros son usados como biomarcadores⁸ y a los segundos se les conoce por su actividad antibiótica⁹. La similitud en los grupos funcionales que los componen llega a ser un problema analítico para la detección e identificación de los mismos. Las técnicas de análisis utilizadas principalmente requiere de técnicas cromatográficas combinada con tratamientos de

derivatización en precolumna o post-columna; inmunoensayos o técnicas microbiológicas, las cuales en mayor o menor medida pueden ser costosas, requerir procesos prolongados de preparación de la muestra y ensayo o son confiables sólo de forma semi-cuantitativa, y en el caso de los aminoglucósidos, la presencia de varios grupos amino, son múltiples los posibles derivados, afectando así la reproducibilidad analítica.^{10,11}

Ante la posibilidad de asociarse en forma rápida y reversible que ofrecen los isómeros del ácido fPBA, al contener la función aldehído y el grupo borónico, y la necesidad de contar con métodos analíticos más rápidos y confiables en el análisis de compuestos con funciones 1,2-diol. Adicionalmente, si se tiene en cuenta que el 2fPBA se ha destacado como pieza fundamental en el desarrollo de tectones con el diseño iminoboronato, los cuales son utilizados en la creación de nuevas arquitecturas a través del autoensamble y combinación con las aminas y dioles apropiados.¹² En la presente Tesis Doctoral se buscó aprovechar la presencia de grupos 1,2-dioles y grupo amina en los aminoazúcares y los aminoglucósidos, para obtener una asociación similar a la observada en catecolaminas por grupos borónicos en aldehídos cumarínicos,¹³ de tal forma que al interaccionar con el isómero adecuado la formación de la imina y la formación de ésteres boronato tuviera lugar simultáneamente.

No obstante, durante el desarrollo del estudio planteado no se encontraron evidencias que sustentaran tal comportamiento. En su lugar se observó una extraordinaria mejora en la estabilidad de las iminas formadas con el 2fPBA. Se decidió entonces incorporar además analitos que sólo contaran con la función amina –monoaminas y poliaminas– en su estructura y de forma progresiva en el presente estudio será notable como el 2fPBA se comporta como un receptor altamente selectivo hacia aminoglucósidos, siendo posible detectarlos espectrofotométricamente en órdenes de concentración micromolar (μM), aún en presencia de azúcares, aminoazúcares y monoaminas biológicas. Se debe resaltar que el agua es parte integral del mecanismo de la disociación de un protón a partir del PBA, un protón hidratado es liberado cuando el ácido fenilborónico reacciona con el agua,¹⁴ y que todos los experimentos aquí presentados son en medio acuoso.

Para tratar de interpretar de forma más precisa los resultados experimentales observados se realizaron cálculos teóricos. Las reacciones para la formación de iminas en donde se requiere alta selectividad tienen un amplio camino en el área de la síntesis orgánica y separaciones

analíticas, además de las ventajas que presenta en la mayoría de los casos por su baja solubilidad en agua, lo que permite una mejor separación.¹⁵

Finalmente se llevó a cabo un intento de mejorar la calidad en la respuesta analítica, buscando encontrar otra tendencia en la selectividad distinta a la encontrada con el 2fPBA. Por este motivo se decidió probar ácidos formil-borónicos con heterociclos furano y tiofeno, los cuales son compuestos reconocidos por tener propiedades ópticas deseables como son mejor emisión en términos de longitud de onda, rendimiento cuántico y sensibilidad a la polaridad del microambiente.¹⁶ Los resultados aportados con las pruebas preliminares que aquí se presentan son importantes por una parte tratar de ampliar el conocimiento sobre la capacidad que tienen los derivados de los compuestos de ácidos borónicos de interaccionar de forma no covalente con los analitos estudiados. Lo anterior con el fin de proponer moléculas sencillas, para la detección selectiva de biomoléculas y especies para las que no existen en la actualidad quimiosensores específicos, y por otra parte la posibilidad que ofrecen los derivados de heterociclos con tiofeno, que son reconocidos por su capacidad inhibitoria directamente en enzimas β -lactámicas.

2. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

Con frecuencia se han requerido características innovadoras en el diseño de las estructuras para obtener un resultado deseado, con logros inteligentes y prácticos tanto en el diseño como en la síntesis de forma individual. En los recientes 50 años, la química vio emerger la más reciente de sus ramas, basada en las ya conocidas, pero poco atendidas fuerzas intermoleculares. La dominación de estructuras obtenidas y estudiadas por sus uniones covalentes hizo que fuera un área con poco progreso. Sólo hasta en 1960, C. Pedersen, con el avance de los éteres corona, logró atraer la atención hacia la exploración de nuevas estructuras químicas con propiedades diferentes y complementarias, causando la explosión de nuevos estudios.

Tal como vemos, hay un campo de química molecular, basado en los enlaces covalentes y hay un campo de química supramolecular, que dio paso a que investigaciones como, por ejemplo, las de D.J. Cram, resulten en alguna de sus tres principales variantes el reconocimiento molecular, la ingeniería de cristales y el autoensamblaje. Así, se puede decir que la química supramolecular hace referencia a la organización de entidades de alta complejidad a través de la asociación entre dos o más especies químicas, unidas por fuerzas intermoleculares.¹⁷ La promesa de dispositivos moleculares “útiles” permanece como estímulo para aumentar el interés en el área ya sea por medio de la complementariedad, reconocimiento molecular, auto-ensamblaje, preorganización e incluso la auto-replicación.

2.1. Reconocimiento Molecular

Desde un cambio de color en un frasco hasta los más sofisticados mecanismos biológicos, cada evento que sucede a nuestro alrededor es el resultado de reacciones químicas e interacciones fisicoquímicas sucediendo en variadas combinaciones.¹⁸

Los procesos de reconocimiento molecular, que comúnmente se interpretan como una interacción reversible del “huésped” o “ligante” con un “anfitrión” o “receptor” con cierta

selectividad hacia los detalles estructurales del huésped o ligante (*selectividad molecular de forma* y selectividad quiral o enantioselectividad), son encontrados en sistemas biológicos y sintéticos, siendo de crucial importancia en áreas médicas y biológicas como inmunología, farmacología y genética. En el área de la química, dichos procesos se emplean en el diseño de sensores y otras aplicaciones analíticas, en diversos métodos de separación e incluso en catálisis. En química orgánica se destaca su uso en los efectos plantilla, los cuales representan una forma especializada del proceso de autoensamblaje.

Además de otras consideraciones, la magnitud de cualquier clase de reconocimiento molecular expresada en términos de las constantes de asociación relativas en un sistema supramolecular se rige por el grado de complementariedad electrónica y estérica entre el receptor y el huésped. De acuerdo a Atkinson y Lindoy, la idea de preorganización del receptor propuesta por Cram,¹⁹ proporciona un medio para racionalizar mucho sobre el comportamiento del huésped y la magnitud de la asociación relativa observada de muchos complejos supramoleculares. En esencia, el *efecto de preorganización* implica que entre más cerca estén los sitios de unión del receptor frente a una molécula huésped, será mayor la constante de asociación para el complejo receptor-huésped formado, dado que así será mínimo el cambio en los grados de libertad conformacional del receptor al enlazar el huésped. De este modo, el tener menor “pérdida de orden” en el receptor debido a la asociación con el huésped se manifestará en una contribución entrópica más favorable hacia la energía libre total del proceso de formación del complejo.

La estabilidad de un complejo huésped-receptor depende del grado de preorganización del receptor con respecto al huésped, dado que las fuerzas que actúan en el momento del reconocimiento, en esencia, continuarán actuando en el producto después de la formación del complejo supramolecular. La imagen ampliamente difundida que resume en forma práctica la relación secuencial que existe entre la preorganización, el reconocimiento y el autoensamble molecular para obtener una entidad supramolecular son las piezas de un rompecabezas: el orden adecuado para acomodarlos, el ajuste preciso entre ellas y entonces, después de la unión de todas se obtiene una imagen (si es 2D) o una estructura (si es 3D) donde lo importante no sólo es la unión de todas las piezas sino la imagen o la figura representada, es



decir, cumple una función que nuestro cerebro reconoce y asocia con algo conocido o que representa algo.

De igual manera, las moléculas así ensambladas llegan a tener propiedades y cumplir funciones que van más allá de un armazón que concuerde y pueda mantenerse unido por interacciones no covalentes. En cuanto a la estabilidad total del complejo molecular claramente dependerá tanto del número como de la naturaleza de los sitios de enlace disponibles en cada componente, por lo que se hace importante contemplar los efectos de solvatación ya que pueden llegar a desempeñar un papel muy importante en la estabilidad de la asociación receptor-huésped.²⁰ En bioquímica, referirse a reconocimiento molecular es referirse en términos de dos componentes: una proteína que actúa como receptor y una especie que es reconocida por el receptor (un ligando, inhibidor, sustrato, epítope, o alguna otra molécula o porción de molécula). El receptor por tanto es la proteína con un declive o bolsillo en su superficie y el ligando es la entidad molecular que ajusta dentro de ese bolsillo.²¹

2.1.1. Tipos de fuerzas en química supramolecular

En general, referirse a química supramolecular va unido al término interacciones “no covalentes” ya que la relación entre los diferentes tipos de fuerzas “débiles” es vital al considerar un sistema supramolecular, así como los efectos tanto en los receptores como en las moléculas huésped. Las interacciones electrostáticas en realidad juegan un papel importante para entender los factores que influyen la alta afinidad observada, en particular en los sistemas biológicos, donde están involucrados un gran número de procesos de reconocimiento que incluyen interacciones carga-carga.²²

Ya sea en un sistema biológico o artificial, las interacciones a las que estarán sometidas las moléculas presentes serán de origen atractivo y repulsivo, dependiendo de la separación entre ellas. En el caso de moléculas no iónicas y poco polares, la acción entre estas fuerzas llega a una distancia de separación de equilibrio que determina la estabilidad del sistema, ya que a medida que la distancia de separación disminuye, la probabilidad de interacción aumenta.

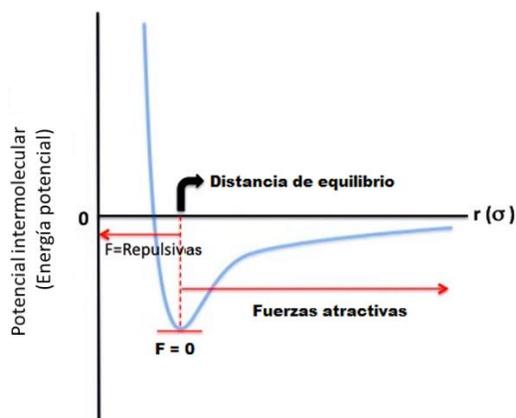


Figura 2.1 Dependencia de la energía potencial con la distancia de interacción de dos moléculas, descrita por el potencial de Lennard-Jones. Adaptado de [23]

Lo anterior puede explicarse de un modo simplificado en función de la distancia de separación del potencial de Lennard-Jones, es decir que a una distancia infinita la interacción será nula, pero a medida que la distancia disminuye se generan fuerzas atractivas del tipo London entre las moléculas y será dominante hasta que se logre la distancia de equilibrio en la cual la energía potencial logra su mínimo y permitirá que permanezcan unidas. A partir de ese punto, si la distancia entre ellas disminuye, causará que las nubes electrónicas de los orbitales empiecen a repelerse y entrarán en acción las fuerzas repulsivas que desestabilizan el sistema aumentando el potencial de forma abrupta.

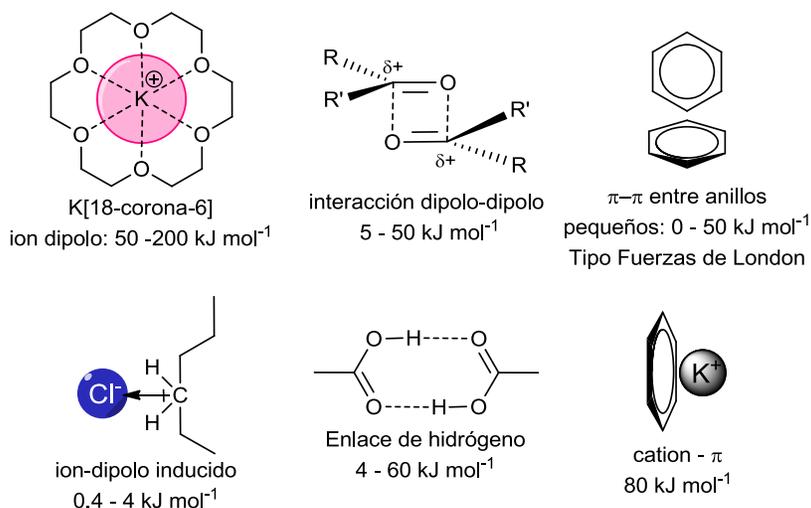


Figura 2.2 Interacciones no covalentes seleccionadas e intervalos de valores de energía característicos.

En la figura 2.2 se presenta una gráfica con el resumen de cada una de las interacciones más comunes cuando se está considerando un sistema supramolecular y la energía característica de dichas uniones:²⁴

Sin duda la naturaleza ha servido como una fuente dominante de inspiración en el área de la química supramolecular, por lo que no sorprende ver que las enzimas han sido vistas como prototipos naturales para el diseño de estructuras supramoleculares. Adicionalmente a este enfoque inspirado en las enzimas, nuevos avances han demostrado que el implementar estrategias supramoleculares en reacciones tradicionales de catálisis pueden ser bastante poderosas. De esta manera la intención no es imitar el comportamiento de las enzimas, sino aplicar las herramientas supramoleculares para resolver los obstáculos que aparecen al buscar obtener una molécula con propiedades específicas.²⁵ Sin dejar de lado la capacidad de la naturaleza para utilizar una cantidad limitada de materiales para construir toda clase de formas vivientes, que además se autogeneran, están organizados por jerarquías, son multifuncionales, no lineales, adaptables, auto-reparables y biodegradables.²⁶

Mucho es lo que se ha avanzado desde 1960 en el área de la química supramolecular, acerca de su definición. Su ágil progreso debe agradecerse a los aportes recíprocos con las demás áreas de la química, la biología, ciencias de los materiales, óptica, entre otras. En particular en el caso de la catálisis, la necesidad de obtener nuevos materiales con características de menor impacto hacia la naturaleza y el estímulo de la química verde hace que el área de la química supramolecular presuma el uso de la ingeniería de cristales y una de sus técnicas donde se combina y se hace uso elegante de las interacciones de la figura 2.2.

En cuanto a las interacciones receptor-huésped, sus características cobran valor principalmente en las áreas de medicina, farmacología y genética. La asociación en este caso ocurre entre fluidos y se basa usualmente en las interacciones no covalentes simultáneas entre los sitios disponibles de un aceptor (A) y un donador (D), las cuales pueden estar entre las descritas en la figura 2.2. Por sí solas estas interacciones son débiles energéticamente y de ahí parte la necesidad de tener varios sitios en el receptor a través de los cuales pueda asociarse de forma específica con una molécula huésped para lograr así la formación del complejo supramolecular, lo cual es denominado *reconocimiento molecular*. Para que la interacción receptor-huésped presente propiedades atractivas debe cumplir algunas características: la forma y tamaño de la cavidad del receptor debe coincidir con la del huésped, las interacciones entre ellos deben ser de tipo atractivas, y no generar tensiones o repulsiones fuertes, es decir, que exista complementariedad.

2.1.2. Asociación covalente reversible

Un aspecto muy importante de las interacciones no-covalentes es su carácter dinámico, es decir, la reversibilidad y los cortos períodos en los que puede mantenerse en equilibrio ante un estímulo. Esto hace posible el proceso de autoensamblaje.

A partir de la definición de química supramolecular acuñada originalmente por Lehn han surgido varias derivaciones, una de ellas es la idea de una biblioteca (*colección*) dinámica combinatoria de componentes moleculares que se auto-ordenan para generar estructuras supramoleculares con extremos reactivos, que estarán predispuestos hacia la formación de enlaces covalentes.

La formación de varios tipos de supermoléculas es fácilmente reversible bajo condiciones de reacción relativamente suaves. Esto es importante ya que, aunque se formen ciertos enlaces covalentes, otras fuerzas pueden combinarse hasta romper los enlaces y restituir los componentes moleculares al conjunto de fragmentos disponibles. Esta posibilidad es esencial en cualquier proceso de comprobación de errores. Sin la capacidad de deshacer los errores químicos se tendría como resultado un método muy ineficaz de perpetuar información codificada, pues cualquier proceso de replicación es susceptible de generar gran cantidad de errores. Existen varios tipos de interacciones covalentes que poseen el mismo carácter dinámico, y que a pesar de no ser considerados formalmente dentro del campo “supramolecular”, son usados ampliamente en procesos de autoensamblaje y de reconocimiento molecular.

Uno de los ejemplos más conocidos de la reversibilidad en la formación de enlaces covalentes es el entrecruzamiento acoplado con el proceso de intercambio tiol-disulfuro de cisteína, un aminoácido que contiene azufre y que define a la estructura terciaria de las proteínas presentes, entre ellas la insulina, la cual contiene tres puentes disulfuro en su estructura.²⁷ Otros ejemplos son la formación de iminas, a partir de la reacción de un grupo amina con un aldehído y los enlaces coordinados entre metales y átomos donadores, los cuales son hallados en muchas enzimas.²⁸

En las últimas décadas debe añadirse a esta lista la formación de los ésteres de los ácidos borónicos, los cuales, al actuar como ácidos de Lewis interaccionan con 1,2-, 1,3-, 1,4- dioles

o con aniones. Su cualidad de reversibilidad es susceptible al medio en el que se lleve a cabo y a estímulos externos específicos. Esta cualidad ha sido explotada en la formación de ésteres borónicos con sacáridos en medios acuosos, y entre los factores externos empleados está el introducir un grupo amino cerca al grupo borónico, el cual se tratará con detalle en las secciones 2.4.2 y 2.5.1.²⁹

2.1.3. Enlaces de hidrógeno mediados por agua

En el caso particular de una interacción entre una proteína y los grupos hidroxilo de los carbohidratos se ha observado que, además de las interacciones directas, el agua puede llegar a mediar indirectamente para dar lugar a enlaces de hidrógeno entre los residuos de aminoácidos de una proteína con los grupos –OH del sacárido. De esta forma, el agua se convierte en un elemento estructural fijo equivalente a los enlaces de hidrógeno de la proteína y puede ser considerada como parte de la arquitectura del sitio de enlace.

En los carbohidratos los grupos funcionales que forman los enlaces de hidrógeno con la proteína se acomodan para usar los estrictamente necesarios, para dar lugar al reconocimiento y discriminación, mientras que las otras posiciones que no son usadas en el reconocimiento son las que tienden a estar expuestas al disolvente y no tienen un contacto directo con la proteína.³⁰ Así los enlaces de hidrógeno cobran mucha importancia en tejidos naturales, tal como las membranas celulares de plantas y animales, cubiertas con una capa densa de más de 140 nm de espesor de carbohidratos denominada glicocáliz, donde está contenida la información sobre el tipo y estado de la célula. Allí se desarrollan los procesos de reconocimiento biológico específicos para cada célula, donde se requiere la interacción de forma selectiva entre las proteínas de la membrana en la superficie de una célula y los oligosacáridos en la periferia de la otra célula, como se observa en la figura 2.3 esta interacción ocurre a través de los enlaces de hidrógeno por medio de proteínas llamadas *lectinas*.³¹

El método de conseguir receptores sintéticos para carbohidratos ha tenido grandes avances en los últimos años, aunque aún continúa siendo todo un desafío para la química supramolecular.³² Las constantes de asociación de los mono o disacáridos con proteínas (lectinas) generalmente están en el intervalo de 10^2 M^{-1} [33] a 10^4 M^{-1} [34] en disolventes

orgánicos, tales como cloroformo y diclorometano, aunque pueden estar por encima de 10^3 M^{-1} cuando se miden en disolventes más competitivos como acetonitrilo, acetonitrilo/metanol, dimetil sulfóxido (DMSO) o diclorometano/agua.^{35,36}

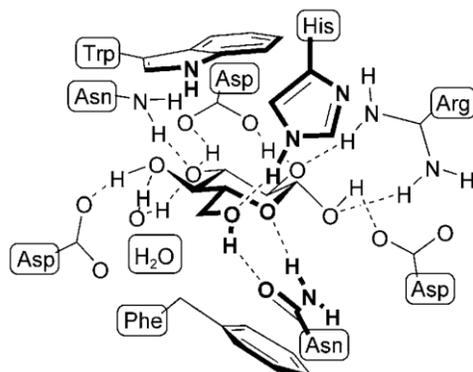
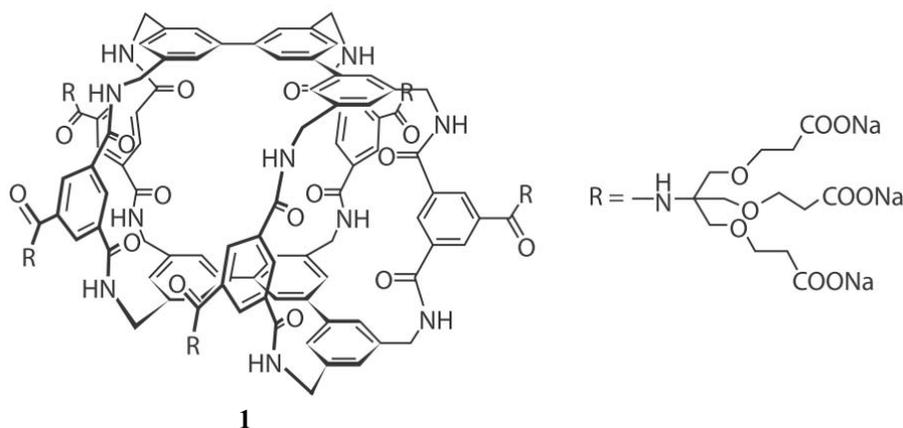


Figura 2.3 Representación de las interacciones de D-glucosa con grupos funcionales dentro del centro activo de la proteína enlazante de D-galactosa.³¹

El uso de “lectinas sintéticas” es un clásico ejemplo de la asociación de carbohidratos a través de interacciones no covalentes. Las lectinas son proteínas que actúan como receptores naturales de sacáridos. De acuerdo a las estructuras cristalinas de los complejos proteína-carbohidrato se ha encontrado que una densa red de enlaces de hidrógeno intermoleculares sólo se forma después de la desolvatación de las superficies asociadas.



La formación del complejo induce el intercambio de grupos hidroxilo del carbohidrato con moléculas de agua, proceso que no es visiblemente favorable. La forma en la que ocurre esta asociación se encuentra muy ligada a la presencia de agua aunque no sea aún del todo claro el mecanismo de asociación natural proteína-sacárido.^{37,38}

Basados en el desempeño de las lectinas como receptores naturales de carbohidratos, el diseño de ellas puede llegar a ser específico para ciertos tipos de sacáridos como es el caso de *I*, el cual es un está dirigido hacia unidades piranósidas con patrón de sustitución todos ecuatoriales.³⁹

Este tipo de receptores biomiméticos dan la oportunidad de estudiar la asociación de carbohidratos a sistemas de referencia en un amplio intervalo de polaridad de los disolventes. Es así como han obtenido receptores con asociación débil con $K = 27 \text{ M}^{-1}$ y otros como en el caso *I* con $K = 900 \text{ M}^{-1}$ con una selectividad de aproximadamente 50:1 para sustratos de pares de disacáridos,³³ es decir, con una afinidad e incluso una selectividad similar a las lectinas naturales, sin embargo, con glucosa la constante de asociación sólo alcanza $K = 60 \text{ M}^{-1}$.⁴⁰

2.1.4. Polioles y poliaminas y su importancia en la detección

2.1.4.1. Sacáridos – Glúcidos – Carbohidratos - Azúcares

Estas denominaciones nos remiten a las biomoléculas presentes en todas las formas de vida e incluso en los fósiles que llevan años degradándose y dan evidencia de muchos aspectos de la evolución. Los carbohidratos son considerados los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza, además están involucrados en los procesos metabólicos de los organismos vivos y de reconocimiento molecular intercelular.

Se conocen más de 200 monosacáridos, los cuales pueden clasificarse de acuerdo al número de carbonos que contengan y su origen puede ser de un polihidroxi-aldehído, en cuyo caso se denominan *aldosas* o de una polihidroxi-cetona, en cuyo caso se llaman *cetosas*. Para clasificarlos se utiliza entonces el prefijo aldo- o ceto- y el prefijo que identifique el número de átomos de carbono: -tetrosa, -pentosa, -hexosa, -heptosa, -octosa.⁴¹ En general las aldosas y cetosas existen como dos formas enantioméricas (formas D- y L-) que son designadas de acuerdo a la orientación del carbono asimétrico más alejado del grupo carbonilo: si el grupo hidroxilo está a la derecha de la molécula es un azúcar D, si está a la izquierda es un azúcar L.

Si bien las representaciones de los azúcares pueden ser lineales, la realidad es que existe una ventaja entrópica hacia las reacciones de adición intramoleculares entre alcoholes y el grupo carbonilo, lo que favorece la formación de un ciclo, haciendo que ésta sea su forma predominante. La reacción de ciclación puede efectuarse por varias opciones entre los grupos hidroxilos presentes, creando así la posibilidad de tener anillos de cinco o seis miembros, nombrados como *furanosas* o *piranosas*, respectivamente.

La adición interna de uno de los hidroxilos establece un nuevo centro asimétrico dando como resultado la existencia de dos diastereómeros. Los diastereómeros sólo difieren en la configuración del carbono proveniente del grupo carbonilo o centro anomérico. Las formas α y β , pueden distinguirse por la relación entre la esteereoquímica del carbono anomérico y el carbono más alejado del centro anomérico. De tal forma que una conformación donde los grupos hidroxilos se encuentren *cis*- se indica como el anómero α y una conformación *trans*- corresponde al anómero β .

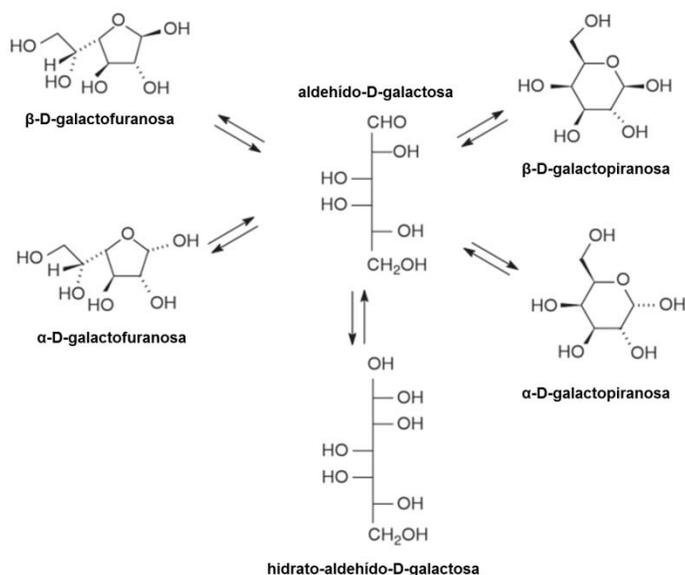


Figura 2.4 Todas las formas detectables de D-galactosa en solución acuosa

Al solubilizar un azúcar, ya sea aldosa o cetosa en agua, lo que se obtiene es una mezcla del equilibrio entre la forma con el grupo carbonilo, la forma hidratada y las posibles ciclaciones con sus respectivos anómeros. Lo anterior se ilustra gráficamente para la D-galactosa en la figura 2.4. Esta conversión puede medirse, en la mayoría de los casos en la escala de minutos a horas y está asociada con el cambio en la rotación óptica.

La interconversión entre la forma cíclica y ramificada que se observa en todos los azúcares reductores se denomina *mutarrotación* y la composición de las distintas especies en disolución variará con respecto a la temperatura, pH, fuerza iónica, disolvente y a las características intrínsecas del carbohidrato. En la tabla 2.1 se presentan los valores de composición observados para D-Glucosa y D-fructosa a 27°C y 31°C, en disolución acuosa respectivamente.

Tabla 2.1 Composición de las formas cíclicas en disolución acuosa para glucosa y fructosa

Carbohidrato	T (°C)	α -furanosa	β -furanosa	α -piranosa	β -piranosa
D-Glucosa	31	-0-	-0-	38%	62%
D-Fructosa	27	4%	21%	trazas	75%

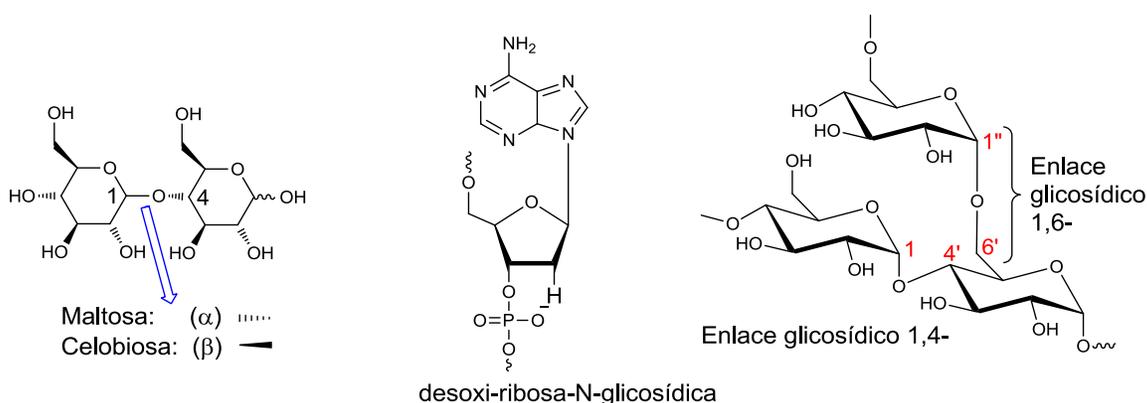
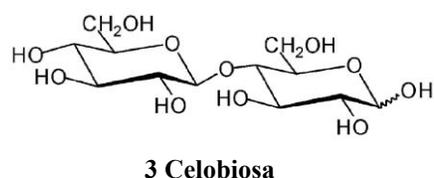
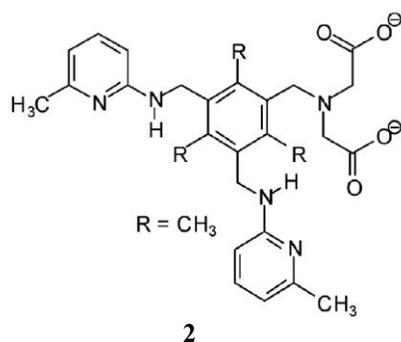


Figura 2.5 Ejemplos de disacáridos con unión α - y β -, N-glicósido, des-oxiazúcar y uniones glicosídicas 1,4- y 1,6-

Al modificar la estructura de estos compuestos se obtienen derivados con características muy específicas que suelen agruparse, como es el caso de reemplazar uno de los $-\text{OH}$ por otros átomos o grupos como $-\text{H}$ o $-\text{NH}_2$, su denominación cambia a desoxiazúcares o aminoazúcares. En el caso de reemplazar el $-\text{OH}$ del carbono anomérico entramos en el grupo de los glicósidos llamados O-, N- o S-glicósidos de acuerdo al átomo que se encuentre unido al carbono anomérico, algunos ejemplos pueden verse en la figura 2.5. La mínima unidad después de la cual ya no se puede obtener otro carbohidrato es el *monosacárido*, la unión de dos de estas unidades se llama *disacárido*, si la unión es entre de 3 a 10 unidades son *oligosacáridos* y si el producto de la hidrólisis da más de 10 monosacáridos unidos son *polisacáridos*.

El carácter omnipresente de estas moléculas, en apariencia simples por su tamaño, en procesos biológicos y su importancia, ha causado que desde la década de los años 90 se reanude la atención sobre la reacción de condensación del ácido borónico con manitol, publicada en los años 50 por Kuivila y colaboradores.⁴² Así mismo, el trabajo realizado por Edward y Lorand⁴³ se ha convertido en un referente desde hace más de dos décadas, ya que es la primera investigación cuantitativa de las interacciones entre ácidos borónicos y polioles, después de pasar varias décadas casi inadvertida puesto que la atención se encontraba dirigida hacia a las proteínas, ácidos nucleicos y otras estructuras más “complejas”.

Los variados procesos en los que intervienen los carbohidratos ocurren por medio de arreglos complejos de interacciones débiles no covalentes, entre ellas: enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e incluso la coordinación de iones metálicos. La destacada capacidad de reconocimiento molecular de los ácidos borónicos con los carbohidratos ha sido materia de estudio durante las últimas dos décadas, con avances y aplicaciones por medio de diferentes técnicas (cromatografía, espectrometría de masas, RMN, UV-Vis y fluorescencia), por medio de la variedad de efectos hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno, modulando su asociación.³⁰



Con el interés de desarrollar receptores que puedan unirse a azúcares neutros, el grupo de Mazik ha optado por incluir centros iónicos en la estructura del receptor, tal como en la estructura dicarboxilato de **2**, la asociación con el disacárido celobiosa (**3**) da una constante de asociación de $K = 305 \text{ M}^{-1}$ para un complejo 1:1, y la asociación de una segunda molécula de azúcar con $K = 66 \text{ M}^{-1}$. Este estudio demostró que la presencia de enlaces de hidrógeno reforzados por carga es de gran importancia en el reconocimiento de carbohidratos neutros

en medios acuosos altamente competitivos ($\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ 93:7 v/v). En contraste, la afinidad observada hacia metil- β -D-glucopiranosidos fue muy inferior.⁴⁴

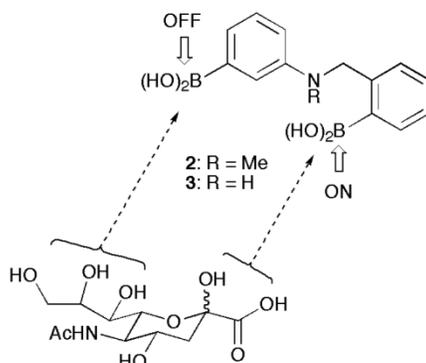


Figura 2.6 Boronoligand diseñada para unirse a ácido siálico ($K_a = \text{ca. } 30\text{M}^{-1}$ a pH 6.2)⁴⁵

Hacia finales de la conclusión de este trabajo, fue publicado por el grupo de Wang una revisión reciente sobre aquellas moléculas donde se combina la especificidad de las lectinas, con los beneficios de los ácidos borónicos, acuñando el término de *borono-lectinas*, las cuales pueden estar basadas en péptidos, ácidos nucleicos, polímeros y moléculas pequeñas y son presentadas como otro futuro promisorio hacia el reconocimiento de sacáridos.⁴⁶

En el sistema específico de la figura 2.6, al enlazarse la molécula de glucosa hace que cambie la fluorescencia del receptor en un modo de “switch” on – off (interruptor de encendido-apagado). Cabe destacar que la ventaja en los casos presentados es la asociación de los receptores con los carbohidratos estrictamente a través de interacciones no covalentes; no obstante, aún con la efectividad y simplicidad sintética de estas estructuras, siguen siendo consideradas como moléculas potenciales hacia el desarrollo de nuevas metodologías con aplicación práctica, por ejemplo, en el monitoreo de glucosa.

Un caso específico a resolver está relacionado con el papel primordial de la glucosa en varios procesos metabólicos. El control de la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo de los pacientes que sufren *diabetes mellitus* y el monitoreo de los procesos de fermentación son procesos que requieren el desarrollo de nuevas sondas fluorescentes sensibles y selectivas.⁴⁷

2.1.4.2. Aminoazúcares

Como ya se mencionó, el origen de estos derivados es cuando un grupo amino sustituye, en general, aunque no exclusivamente, al grupo hidroxilo del C2 de las hexosas (2-

aminoaldohexosas). Ejemplo de ello, son las estructuras de tres de los principales representantes de dicho grupo, la D-galactosamina (**4**), D-glucosamina (**5**) y D-manosamina (**6**) se muestran en la figura 2.7. La forma más común en la que se encuentran los aminoazúcares es como derivados N-acetilados; además son componentes constitutivos de los glicolípidos, glicoproteínas y los proteoglicanos (glicosaminoglicanos).

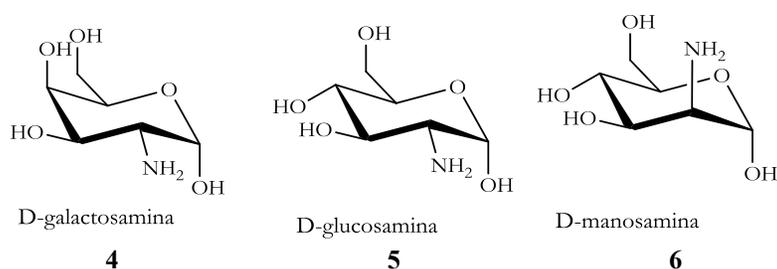


Figura 2.7 Estructuras de los principales aminoazúcares

La presencia de aminoazúcares como los de la figura 2.7 en las paredes celulares bacterianas junto con el ácido murámico, permite obtener información que los hace ser empleados como biomarcadores de residuos microbianos en suelos. Los biomarcadores son típicamente moléculas orgánicas con abundancia celular medible y orígenes biosintéticos conocidos utilizados en microbiología ambiental en cultivos de laboratorio de muestras de campo para inferir la composición de comunidades microbianas en la naturaleza. La presencia de un biomarcador refleja una fuente biológica específica, así como sus productos de degradación, en el medio ambiente.⁸

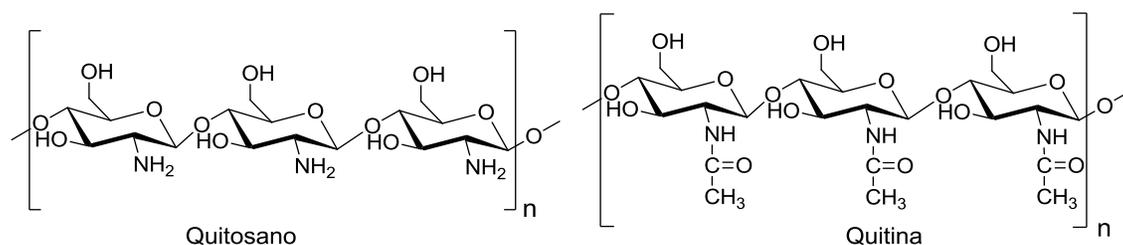


Figura 2.8 Estructura del polímero formado principalmente por unidades de β -1,4-D-GluNH₂ y β -1,4-D-GluNH₂-acetil

Del grupo de aminoazúcares destaca la D-glucosamina, que actúa como un estimulante en la producción de mucina y mucosa, las cuales tienen funciones protectoras y lubricantes que le dan la elasticidad a las articulaciones. La unión de unidades β -1,4-(N-acetil-D-glucosamina) forma el polisacárido quitina, mientras que en su forma no acetilada es la principal

constituyente del quitosano, un polisacárido encontrado en los crustáceos, los cuales son la fuente principal para la obtención del aminoazúcar.^{48,49}

La D-glucosamina también ha sido estudiada por su importancia en el metabolismo bacteriano en *E. coli* y *B. subtilis*, ya que es un azúcar del sistema de fosfotransferasas (PTS), es decir, que su absorción se produce en forma conjunta con su fosforilación, la cual bajo la acción de varios genes y reacciones forman la fructosa 6-fosfato y entra en la ruta glicolítica, convirtiéndola en una eficiente fuente de carbono.^{50,51} Asimismo, se le adjudican efectos beneficiosos en el equilibrio de la remodelación ósea y actividad antiinflamatoria, aunque no existe aún un mecanismo exacto que explique su eficacia. En forma pura, la glucosamina es inestable y se encuentra disponible de forma comercial como sulfato y clorhidrato.⁵²

En cuanto a la química de los aminoazúcares, cabe mencionar que son bases más débiles que las aminas alifáticas, debido a los efectos inductivos. Los valores de disociación de los aminoglucósidos, a menudo son valores aparentes de las mezclas de tautómeros y sus constantes de disociación dependen de la hidratación del grupo amonio que es sensible a la conformación.⁵³ La gran diferencia en acidez con sus sacáridos homólogos es comprensible, si se asume que el grupo amino interrumpe las interacciones entre el agua y los grupos hidroxilo anoméricos más que los iones derivados de alcóxidos. En el caso de derivados del ciclohexano se reporta que el ion amonio $-\text{NH}_3^+$ es conformacionalmente más grande que el grupo amino $-\text{NH}_2$, afectando las constantes de disociación relativas del ion amonio ecuatorial y axial debido a la interacción con los hidrógenos axiales.

Sin embargo, el tamaño del ion $-\text{NH}_3^+$ no es la única razón de la diferencia en la acidez. De ser así los tres aminoazúcares **4**, **5** y **6** presentarían la misma tendencia en los valores de las constantes de disociación para sus respectivos anómeros. En la tabla 2.2 están los valores reportados por Bunton y *col.* de las constantes de disociación halladas por RMN ^1H en D_2O . En el caso de D-glucosamina y D-galactosamina, la mayor acidez resulta para el anómero β . Al respecto se atribuye que la cercanía de grupos hidroxilo- o hemiacetal a grupos amina disminuyen el $\text{p}K_a$ del grupo amina. Así en ambos aminoazúcares el C1-OH está más cerca del $-\text{NH}_2$ en el anómero β .

Tabla 2.2 Constantes de disociación, pK_a (D) de los iones amonio.⁵³

<i>Aminoazúcar</i>	α	β
Glucosamonio	8.12	7.87
Manosamonio	7.76	8.44
Galactosamonio	8.51	8.06

25°C a partir de los valores de δ en D₂O

En el caso de la manosamina se observa una distorsión del anillo debido a la posición axial del grupo $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$, causando que la posibilidad de solvatación del ion y los equilibrios de protonación sean alterados. En el anómero α (**6**) el ion amonio axial y los hidroxilos están muy alejados entre sí como para afectar la hidratación, de tal forma que esta pequeña diferencia en el ambiente que rodea al ion amonio hace que los equilibrios de disociación de los anómeros de la manosamina se comporten de forma inversa a la galactosamina y la glucosamina.

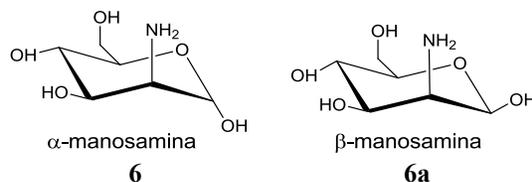


Figura 2.9 Estructuras de los anómeros de D-manosamina

La capacidad de los aminoazúcares de actuar como ligantes se ha explotado para formar complejos con Ni(II), Co(III) y Cu(II) luego de la formación de las bases de Schiff con aldehídos aromáticos; además se describe el equilibrio anomérico entre la forma enol-imina y ceto-imina en disolventes orgánicos como MeOH y DMSO.⁵⁴ De otro lado, dada su importancia en los organismos vivos, también se han desarrollado nuevos intentos por facilitar los métodos analíticos utilizados para su detección. El grupo de James en 1997 combinó un fragmento de aza[18]corona-6-antraceno, (**7**) y ácido arilborónico para detectar D-glucosamina·HCl de forma selectiva en medio acuoso.^{29,55} En otros métodos colorimétricos para discriminar entre sacáridos, glucosa fosfatada, ácidos carboxílicos o aminoazúcares se utilizó un receptor (**8**) basado en resorcinarenos de ácidos tetra-arilborónicos.⁵⁶

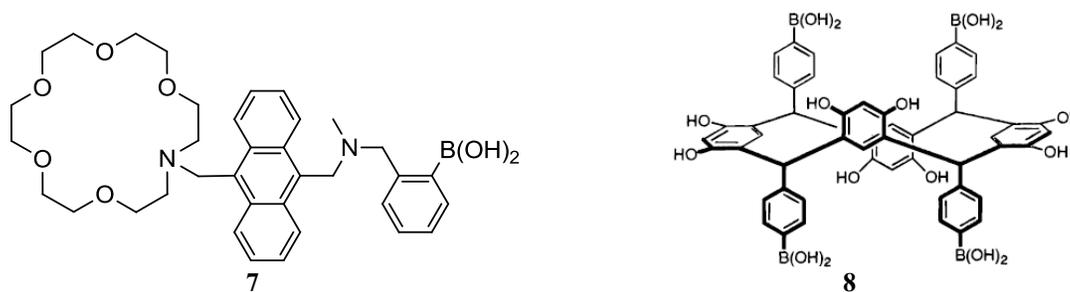


Figura 2.10 Receptores colorimétricos desarrollados para la detección de D-glucosamina

Un receptor más reciente (**9**) utiliza el método de desplazamiento de indicador que permite identificar aminoazúcares y aminoglucósidos. Se trata de un compuesto organometálico de rodio combinado con galocianina, reportado por el grupo de Severin.⁵⁷

Otra estrategia atractiva y moderna para el estudio de los eventos de reconocimiento molecular de glucosamina con sensores fluorescentes, ha sido el uso de materiales de sílica mesoporosa funcionalizada con tamaño de poro ajustable, las cuales se pueden usar para simular los sitios activos de enzimas o anticuerpos por medio de interacciones covalentes, y no covalentes específicas con las moléculas en cuestión.⁵⁸

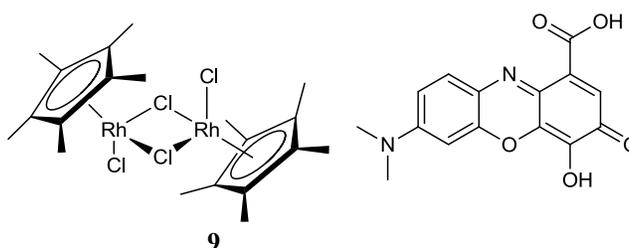


Figura 2.11 Compuesto organometálico para detección de aminoazúcares y aminoglucósidos

2.1.4.3. Aminoglucósidos

En el estricto sentido de la palabra, el conjunto de anillos que componen los aminoglucósidos (AG) no quedan definidos de forma del todo correcta bajo este nombre. Es decir, la estructura central sí contiene grupos amino –modificados– pero se encuentra unida a través de enlaces pseudo-glucosídicos y además no cuenta con el átomo de oxígeno en su ciclo, de tal forma que no es realmente un glucósido.^{41b} Sin embargo, los anillos adyacentes a la 2-DOS sí cumplen con las características de derivados de carbohidratos o azúcares y haciendo énfasis en la exactitud de los términos, los aminoglucósidos podrían clasificarse –de acuerdo a su estructura– como pseudo-oligosacáridos.

La gran popularidad que lograron los aminoglucósidos como antibióticos surgió a raíz del descubrimiento de la estreptomina en 1943 por Waskman y colaboradores,⁵⁹ ya que fueron los primeros fármacos descubiertos a partir del estudio sistemático de productos de fuentes naturales con actividad antibacteriana.⁶⁰ La estreptomina presentaba la ventaja de atacar no solo las cepas de bacterias Gram-positivas sino también las Gram-negativas, lo que le confería ventaja frente a la penicilina.⁶¹ Aún más atractivo fue encontrar su actividad ante *Micobacterium tuberculosis*, convirtiéndola en el primer medicamento para combatir efectivamente la tuberculosis.⁶²

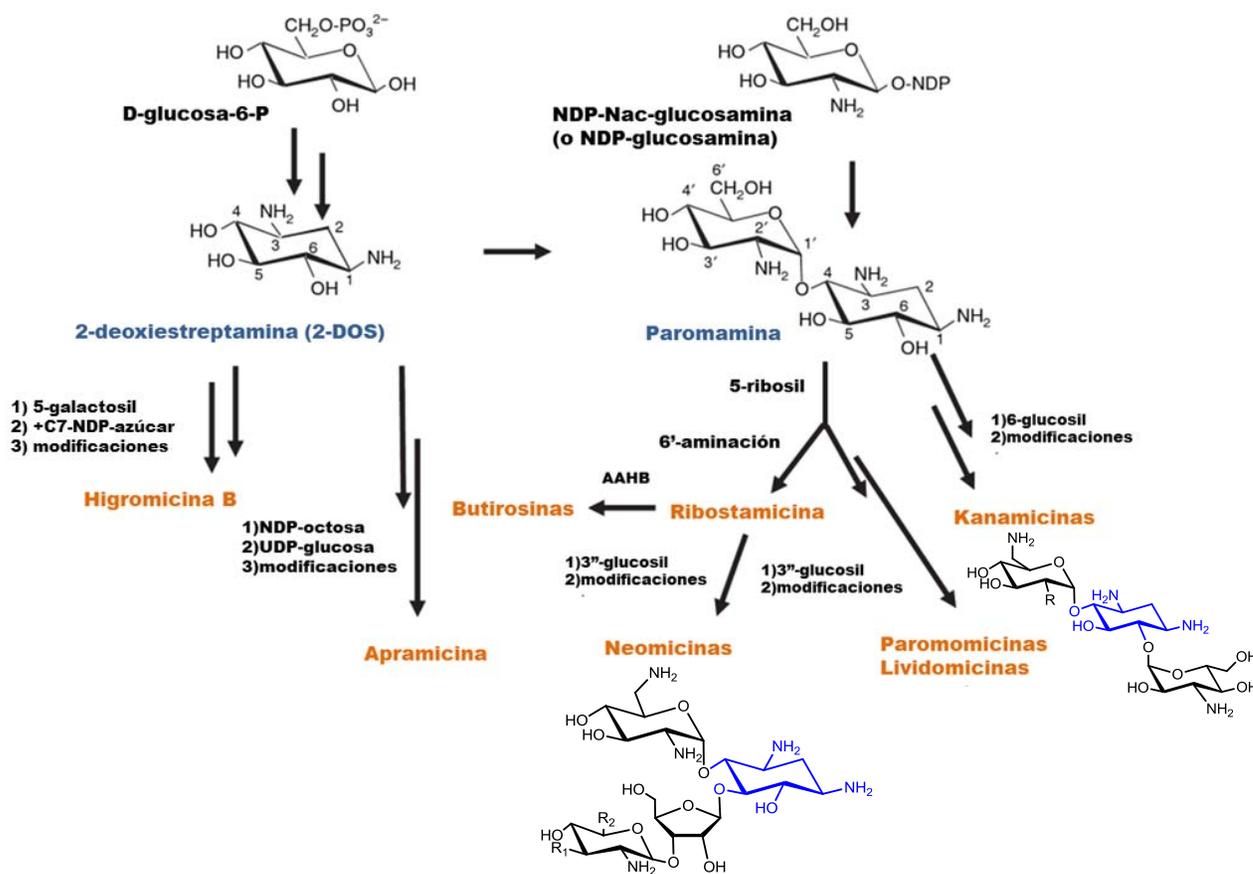


Figura 2.12 Resumen de las rutas biosintéticas de los antibióticos aminoglucósidos con anillo aminociclitol derivados de la 2-deoxiestreptamina. Adaptado de⁶³ (AAHB=Ácido (2S)-4-amino-2-hidroxi-butírico)

La estructura común de la mayoría de los aminoglucósidos está compuesta por un anillo amino-hexitol o ciclitol llamado 2-deoxiestreptamina, 2-DOS en la figura 2.12. A partir de este anillo se dividen los dos grupos principales: la familia de las kanamicinas y gentamicinas, cuyos residuos de aminoazúcar se unen al anillo por enlaces glucosídicos de

los grupos 4- y 6-hidroxi, y la familia de las neomicinas que presentan la unión a través de los grupos 4- y 5-hidroxi.^{64,65}

Las etapas iniciales para la obtención de todos los antibióticos-AG derivados de 2-DOS son biosintéticamente homogéneos, ya que comparten el intermediario común paromamina, a excepción de la higromicina y la apramicina.

Este diverso grupo cuya estructura varía en conectividad y estereoquímica además depende de los restos de azúcares enlazados a la unidad central de la 2-DOS,⁶⁶ de allí se derivan los grupos que se pueden clasificar en cuatro familias de acuerdo a los sitios de sustitución que empleen para unirse a la 2-DOS:

- a) Los 4,5-glicosilados: con los pseudo-tetrasacáridos del grupo de las neomicinas, la paramomicina y lividomicina y los pseudo-trisacáridos como ribostamicina;
- b) Los 4,6-glicosilados: familia de las kanamicinas, gentamicinas y tobramicina,
- c) Los 4-glicosilados: como la apramicina y
- d) Los 5-glicosilados representado por higromicina B.

La biosíntesis del anillo ciclitol requiere de la acción de tres enzimas altamente conservadas: (la 2-deoxi-scylo-inososa sintasa o ciclasa, la ciclitol aminotransferasa y la 2-deoxi-scylo-inosamina deshidrogenasa) las cuales actúan sobre 2-DOS, siendo el punto de partida de la ruta biosintética. La formación de la paromamina ocurre después de la adición de una N-acetil-glucosamina activada. La acción de otras enzimas, así como la unión de otros carbohidratos dan como resultado las familias de las kanamicinas y las neomicinas. En el caso de las neomicinas se unen otros azúcares: 1) una ribosa en la posición 5 común a todos los miembros de esta familia y una glucosa en la posición 3” que comparten las neomicinas, paramomicinas y lividomicinas.

Por otra parte, en la familia de las kanamicinas ocurre la unión de una glucosa en la posición 6 común a la tobramicina, nebramicina y las kanamicinas, y en lugar de la glucosa, una xilosa en la posición 6- da origen a las gentamicinas. Luego de estas uniones, los azúcares experimentan modificaciones tales como la adición de grupos amino o metilos y la remoción de grupos hidroxilo, dando lugar a los productos biosintéticos finales ilustrados en la figura 2.13.

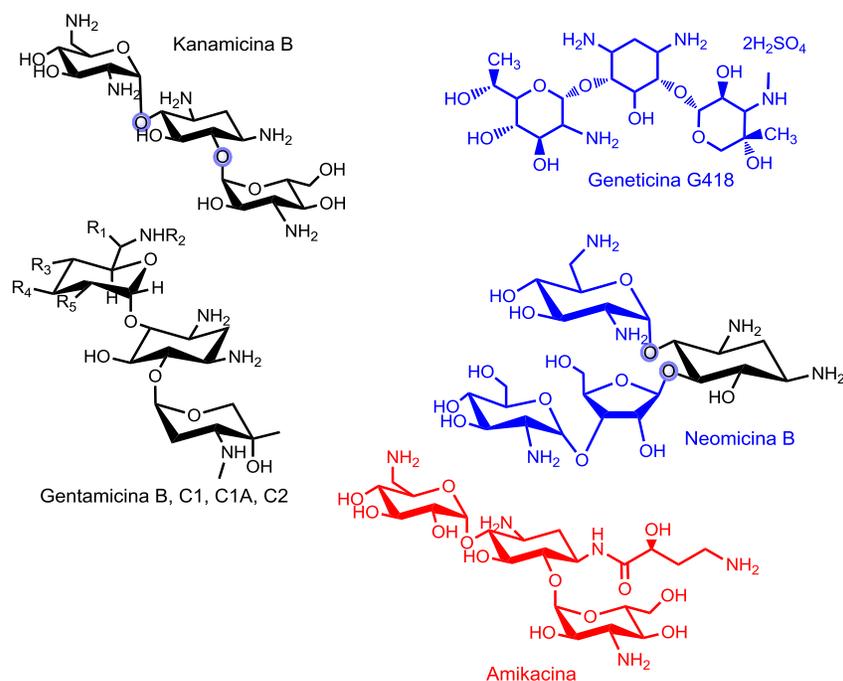


Figura 2.13 Estructuras químicas de algunos antibióticos Aminoglucósidos-aminociclitol importantes.

Algunos años después de la introducción de los AG como antibióticos, empezaron a aparecer organismos resistentes. La resistencia adquirida hacia ellos puede darse a través de diferentes mecanismos: mutación del ribosoma, permeabilidad reducida para los antibióticos, y modificación enzimática de los medicamentos, causando así la inactivación, siendo este último mecanismo el más importante de los tres.^{67,68} Un área en la que los AG son de gran importancia es en el tratamiento de infecciones nosocomiales serias, de ahí que sea relevante entender sus interacciones biológicas, donde la principal característica es que se trata de especies policationicas. En el intervalo de pH fisiológico se encuentran cargados positivamente, característica que le permite tener alta afinidad hacia los ácidos nucleicos, especialmente hacia ciertas porciones del ácido ribosomal procariótico (rARN).^{9b,61,65,69,70}

2.2. Importancia en la detección y aplicaciones en el monitoreo de su unión con el ARN

Las interacciones electrostáticas entre el ARN y los AG han suscitado múltiples interrogantes a la hora de entender el mecanismo de acción, ya sea con el fin de mejorarlos o para identificar las interacciones que se modifican y por las cuales ocurre la resistencia. En la búsqueda de identificar patrones de reconocimiento, la influencia de la carga total de los aminoglucósidos

y la disposición estereoquímica de los grupos amino se han seguido variadas estrategias: por una parte está el modificar el número de grupos amino en su estructura y por otra la síntesis de derivados.⁷¹

Debido a los problemas de resistencia frente a los aminoglucósidos de fuentes biosintéticas y al interés de ampliar su actividad quimio-terapéutica se han obtenido cierto número de AG por medio de química orgánica preparativa. Es de resaltar que los compuestos con actividad satisfactoria han sido aquellos cuyas alteraciones estructurales imitan las modificaciones que ocurren de forma natural. Los ejemplos más importantes son la amikacina, dibekacina, netilmicina e isepamicina, todos derivados de las familias de las kanamicinas y gentamicinas.⁶³

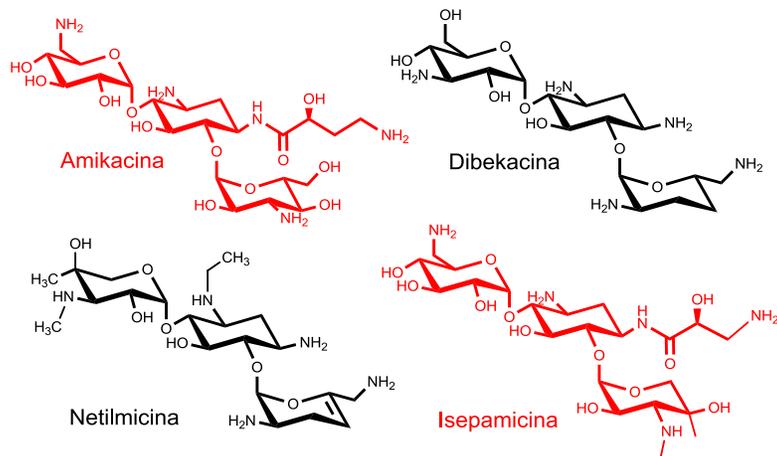


Figura 2.14 Aminoglucósidos sintéticos derivados de la familia de las gentamicinas y kanamicinas.

Además de la resistencia existe un factor desfavorable sobre el uso de los AG respecto a la tolerancia hacia ellos debido a que se ha demostrado su relación con nefrotoxicidad y ototoxicidad irreversible.^{9b,69,72}

2.2.1. Estrategias para la formación de derivados, monitoreo y detección.

Otro ámbito en el que se requiere el análisis rápido y sensible de antibióticos es en la industria alimentaria, por decir, en productos como la leche o la carne, donde los límites residuales máximos de estos fármacos están incluso controlados en algunos países, ya que se ha demostrado que representan un riesgo de la salud pública.⁷³ En respuesta a ello algunos

grupos han desarrollado diferentes plataformas de detección, por ejemplo, el caso de un antibiótico de la familia de las fluoroquinonas. Mediante una prueba con un inmunosensor impedimétrico competitivo que permite la detección de ciprofloxacino en concentraciones del orden picomolar,⁷⁴ donde la plataforma para lograr el análisis con este inmunosensor está basada en resonancia de plasma de superficie (SPR) y permite la detección simultánea de varios antibióticos en la leche.⁷³

Dada la similitud en la estructura de los aminoazúcares y los aminoglucósidos, ha surgido la necesidad de métodos que permitan realizar el análisis, superando los problemas de mutua interferencia al momento de su detección. La posibilidad de utilizar la formación de ésteres iminoboronatos en medios acuosos para lograr el reconocimiento de aminoglucósidos es un desafío que ha dado lugar a algunas aproximaciones de este diseño. Hasta el momento, la formación de tales ésteres se ha logrado en medios no polares, con excelentes resultados en cuanto a la estabilidad, pero que difícilmente pueden extrapolarse a las condiciones fisiológicas, donde es relevante su uso, ya que como consecuencia de la acción como ácido de Lewis del átomo de boro en los ácidos borónicos, también pueden reaccionar con el agua y cambiar de la forma neutra trigonal a la forma aniónica tetraédrica.⁴⁷

La formación del éster iminoboronato también ha sido utilizada en el desarrollo de protocolos espectroscópicos. Tal es el caso en la determinación del exceso enantiomérico de aminas primarias y dioles quirales. Por medio de la reacción del analito con ácido 2-formil fenilborónico y BINOL [(S)-1,1'-bi-2-naftol] en cloroformo se obtiene la complejación cuantitativa de una mezcla de ésteres iminoboronato diastereo-isoméricos.⁷⁵ Los distintos efectos anisotrópicos de los *N*-fragmentos tienen espectros de RMN ¹H significativamente diferentes, que permiten una fácil identificación y determinación por medio de la comparación de las intensidades de las integrales de resonancia de los pares diastereotópicos.

Aminas y Poliaminas

Desde el punto de vista estructural las aminas son compuestos en los que se han sustituido uno o varios de los hidrógenos del amoníaco por radicales alquilo o arilo. Las aminas son abundantes en la naturaleza y pueden variar desde una gran complejidad estructural como en

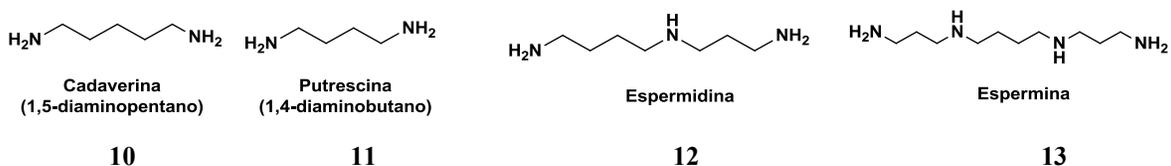
el caso de los alcaloides, como transmisores importantes en funciones fisiológicas o bien estar en compuestos menos complejos pero esenciales para la vida, como en los aminoácidos.

Las aminas se clasifican según el número y la naturaleza de los sustituyentes del nitrógeno, el número de ellos determina si son aminas primarias, secundarias o terciarias, dependiendo de si la amina resulta de la sustitución de uno, dos o los tres hidrógenos del amoníaco. Si se habla de la naturaleza de los sustituyentes se dividen en arilaminas, cuando al menos uno de los sustituyentes es un radical aromático, y alquilaminas, si todos los sustituyentes son radicales alquilo.⁴¹

La química de las aminas se rige por el par de electrones no compartido del nitrógeno, lo que le confiere a esta función un carácter básico como nucleófilo. Pero es la presencia de los protones en las aminas primarias y secundarias lo que marca la diferencia en reactividad con respecto a las aminas terciarias. La posibilidad de perder un protón permite que las primeras experimenten reacciones de adición o de eliminación, mientras que las aminas terciarias sólo dan reacciones de adición.

Un gran grupo de las aminas es el conformado por las poliaminas, compuestos ubicuos en la naturaleza, presentes en una gran variedad de procesos importantes de los organismos vivos. Su estructura está conformada por cadenas alifáticas nitrogenadas del tipo: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ o $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ entre las que se incluyen la putrescina, cadaverina, espermina y espermidina.⁷⁶

La putrescina **11** es una diamina sintetizada por la acción de arginina decarboxilasa sobre arginina; la cadaverina, **10** con igual número de grupos amino, resulta de la acción de lisina decarboxilasa sobre lisina. La espermidina **12** es una triamina formada en la transferencia catalizada por espermidina sintasa. La espermina, **13** una tetraamina, puede ser obtenida a partir de la misma reacción, catalizada por espermina sintasa.^{28,77}



Esquema 2.1 Estructuras de algunas poliaminas

Al igual que los aminoglucósidos, las poliaminas a valores de pH fisiológico se encuentran en alguna de sus formas catiónicas y esta propiedad les permite la interacción con macromoléculas que poseen cargas negativas, en especial el ARN, el ADN, las proteínas y los fosfolípidos. Así pues están involucradas directamente a la regulación de las propiedades físicas y químicas de la membrana, la estructura de los ácidos nucleicos y la modulación de actividades enzimáticas, además de estar presentes en la proliferación y diferenciación celular.^{78,79,80}

Las anomalías en su función o metabolismo juegan un papel importante en enfermedades tales como cáncer e infecciones parasitarias. Un sinnúmero de agentes terapéuticos potenciales dirigidos hacia la modulación del metabolismo de las poliaminas se han desarrollado desde 1975, con un ascenso vertiginoso en las últimas dos décadas por estar relacionadas con la respuesta citotóxica hacia múltiples tipos de tumores.⁸¹

2.3. Ácidos borónicos

La cualidad de los receptores derivados de ácidos borónicos de enlazar a huéspedes en medios acuosos ha sido su principal atractivo, además de su simplicidad y alta sensibilidad. Así mismo, las sondas fluorescentes han sido herramientas de importante utilidad para monitorizar especies biológicas importantes tanto *in vitro* como *in vivo*.

2.3.1. Generalidades de los ácidos borónicos

Estructuralmente, los ácidos borónicos son compuestos orgánicos que contienen boro en su estado trivalente, con un sustituyente alquilo o arilo y dos grupos hidroxilo (Figura 2.15). Con solo seis electrones de valencia y una consecuente deficiencia de dos electrones, el átomo de boro con hibridación sp^2 tiene un orbital p vacante. Este orbital de baja energía es ortogonal a los tres sustituyentes, los cuales están orientados en una geometría plano trigonal. Su singular propiedad como ácidos de Lewis débiles y su moderado perfil de reactividad,

acoplado con su estabilidad y fácil manejo, hace de los ácidos borónicos una clase particularmente atractiva de intermediarios sintéticos. Además, debido a su baja toxicidad y su degradación final en un compuesto amigable con el medio ambiente, como es el ácido bórico, permite considerarlos como compuestos “verdes”. Los ácidos borónicos, **16** son sólidos que tienden a existir como mezclas de anhídridos oligoméricos, en particular las boroxinas, **19** ciclos de seis miembros. La reactividad y las propiedades de los ácidos borónicos dependen en gran medida de la naturaleza de su único sustituyente, es decir, el tipo de grupo carbonado (R), directamente enlazado al boro. Así los ácidos borónicos pueden clasificarse en subtipos tales como ácidos alquil-, alquenil-, alquilil- y aril- borónicos.

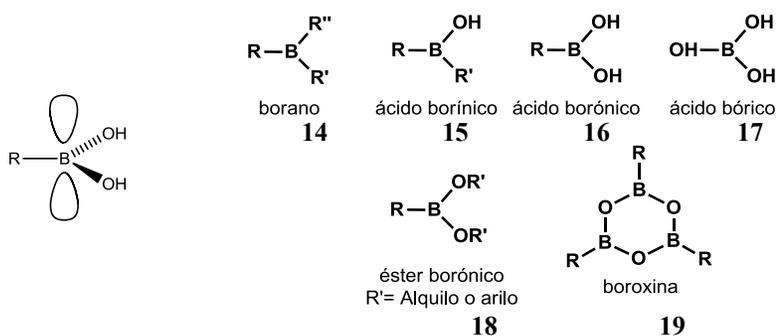


Figura 2.15 Compuestos organoboranos oxigenados

La formación de anhídridos puede complicar los esfuerzos para su análisis y caracterización, luego de ser expuestas al aire, las muestras secas de ácidos borónicos son propensas a descomponerse rápidamente. Por lo cual, los ésteres borónicos correspondientes suelen ser preferidos como intermediarios sintéticos en lugar de los ácidos.²⁹

Hay variadas reacciones en química orgánica que incluyen el uso de ácidos borónicos, la más conocida es la de acoplamiento cruzado de Suzuki que combina su uso con Pt o Pd como catalizadores para la formación de enlaces C–C.^{82,83} Con su llamativa característica de contar con un octeto incompleto se destacan las aplicaciones como materia prima en reacciones de halogenación,⁸⁴ metalación,⁸⁵ oxigenación,^{86,87} aminación.⁸⁸ Su versatilidad además incluye aplicaciones más recientes en catálisis para síntesis enantioselectiva “one-pot”⁸⁹ y reacciones de amidación o reacciones “click”.⁹⁰ Aunque el auge más notorio lo merece por el excepcional carácter reversible de los ácidos borónicos con dioles, usados en la detección de sacáridos^{2a} y materiales poliméricos.^{91, 92}

2.3.2. Propiedades físicas y manipulación

La mayoría de los ácidos borónicos son sólidos blancos cristalinos que pueden ser manipulados en atmósfera abierta sin mayores precauciones. A temperatura ambiente, los ácidos borónicos son químicamente estables y la mayoría son auto-estables por largos períodos. Termodinámicamente la oxidación del enlace C–B resulta como consecuencia directa de la gran diferencia entre la fuerza de enlace B–C y B–O. Adicionalmente, aunque los calores de reacción para, por ejemplo, el rompimiento oxidativo del ácido metilborónico con agua y con peróxido de hidrógeno son respectivamente -112 y -345 kJ mol^{-1} , los primeros pueden ser manipulados aún expuestos al aire, además son estables en agua en un amplio intervalo de pH, lo anterior se debe a que afortunadamente este rompimiento es un proceso cinéticamente lento.

2.3.3. Estructura y Enlace de los Ácidos Borónicos

En el año de 1977 Rettig y Trotter publicaron la estructura cristalina del ácido fenilborónico (PBA), donde elucidaron que la unidad asimétrica está compuesta por dos moléculas de ácido fenilborónico unidas por un par de enlaces de hidrógeno O–H...O, (figura 2.16A).

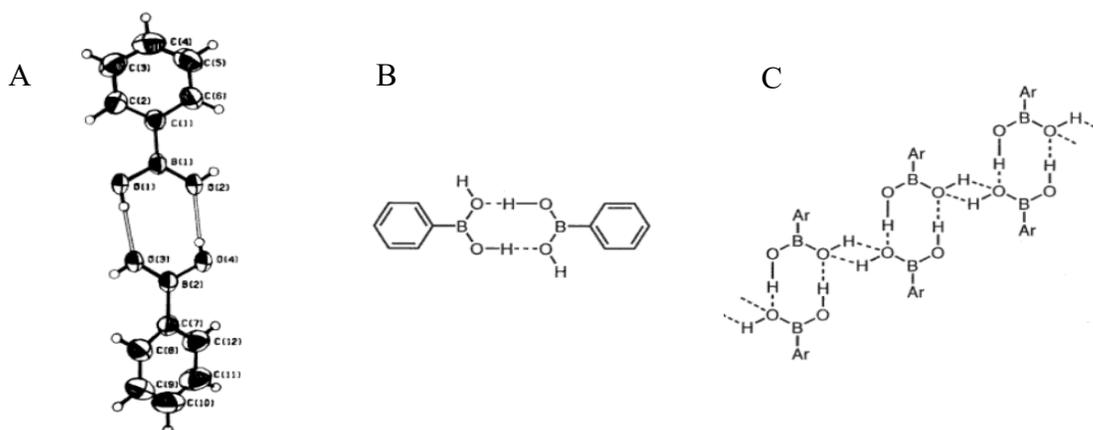


Figura 2.16 Representaciones de la estructura cristalográfica del ácido fenilborónico (A) ORTEP de la unidad dimérica (B) Unidad dimérica, mostrando los enlaces de hidrógeno; (C) Red extendida de enlaces

Los cristales obtenidos de la recrystalización en agua son ortorrómbicos, el plano CBO_2 es coplanar en cierto grado, ya que los anillos de benceno presentan una torsión alrededor del enlace C–B de 6.6° y 21.4° respectivamente para cada una de las moléculas de la unidad

asimétrica. Cada ensamble dimérico está unido también a través de enlaces de hidrógeno a otras cuatro unidades similares para dar un arreglo infinito en forma de capas (figura 2.16C).

Esta característica de auto ensamblaje con arreglo en capas ha sido aprovechada por Shinkai y *col.* con ácidos borónicos unidos a cadenas carbonílicas largas.⁹³ Las monocapas de los ácidos borónicos que se auto-ensamblan en la interfaz aire-agua responden selectivamente hacia sacáridos en la superficie, indicando que la formación de ésteres boronato da lugar a auto-ensamblaje molecular.⁹⁴

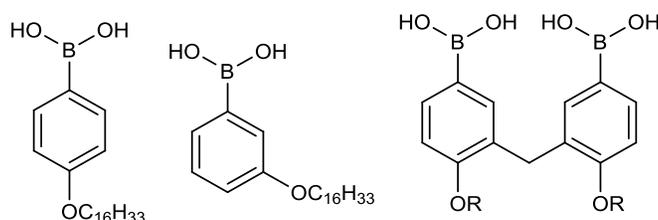
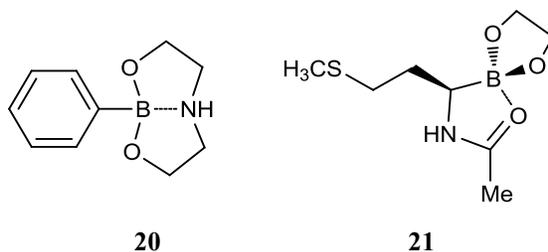


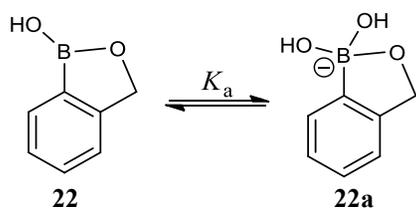
Figura 2.17 Estructuras moleculares de ácidos borónicos con cadenas carbonadas largas que forman monocapas en la interfase agua-aire : R= Me, 2-octil-dodecil, 4-terbutil-bencil o geranil.

Otra aplicación importante de la capacidad de auto-ensamble de los anhídridos y ácidos borónicos con una esterificación cíclica es publicada por el grupo de Yaghi, dando como resultado arquitecturas rígidas porosas.⁹⁵

En las estructuras de los ácidos y ésteres borónicos las distancias del enlace C–B varían en un intervalo de 1.55–1.59 Å, ligeramente más largas que un enlace sencillo C–C, y así mismo la energía de enlace C–B (323 kJ mol⁻¹) es un tanto menor comparada con este mismo tipo la del enlace C–C (358 kJ.mol⁻¹).⁹⁶ En concordancia con la fuerza de los enlaces B–O, las distancias de enlace en los ácidos tricoordinados son mucho más cortas (1.35–1.38 Å) que entre C–O (~1.42 Å) y un poco más para los ésteres borónicos cuyos valores en las estructuras cristalinas reportadas varían entre 1.31–1.35 Å.²⁹ Sin embargo, en compuestos tetracoordinados, como **20** o **21** la distancia del enlace B–O del éster borónico se incrementa hasta alcanzar alrededor de 1.43–1.47 Å, lo que se atribuye a que la introducción del cuarto sustituyente afecta la conjugación entre los orbitales vacíos del B y los pares libres del O que existe en los ácidos tricoordinados.



Otro derivado de los ácidos borónicos, denominados benzoboroxoles o (benzoxaboroles) del tipo 1-hidroxi-3(1H)-1,2-benzoboroxol (**22**),⁹⁷ presentan propiedades químicas similares a los ácidos borónicos y un potencial uso en síntesis y reconocimiento de sacáridos. Al hacer la analogía con el PBA, la primera observación es el aumento en la acidez, pK_a [PBA] = 8.8 y pK_a [benzoxaborol] = 7.2.⁹⁸



Esta diferencia en acidez se atribuye a la tensión en el anillo de la especie lo que hace favorable la rehibridación del átomo de boro para la formación del anión hidroxiboronato. La geometría y las distancias de enlace alrededor del átomo de boro, ofrecen otras posibilidades que han sido exploradas con resultados satisfactorios en el reconocimiento de sacáridos, especialmente glicopiranosídeos no reductores en medios acuosos neutros, que contribuyen a la estabilización del anión boronato por medio de enlaces de hidrógeno intramolecular con los grupos hidroxilo del piranosídeo.⁹⁹

Se ha encontrado que una especie relacionada a este derivado puede existir en equilibrio “tautomérico” en el 2fPBA cuando al anillo se incorporan sustituyentes halógenos en las posiciones 3 y 5. En tal caso, el estudio del equilibrio de la figura 2.18, puede verse como la adición nucleofílica de un grupo hidroxilo del átomo de boro sobre el carbonilo, seguida de la coordinación intramolecular del oxo-anión al ácido borónico,¹⁰⁰ en el estudio publicado por Luliński en 2006, se verificó tal mecanismo por RMN de ^1H en $[\text{d}_6]$ -Acetona/5% D_2O . A diferencia de los métodos de síntesis para obtener el derivado, en este caso no es necesaria la eliminación de agua para obtener el semi-éster: benzoboroxol.^{100,101}

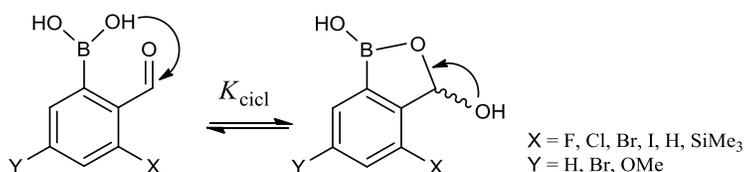


Figura 2.18 Reordenamiento “tautomérico” de 2fPBA funcionalizado

La posibilidad de tal equilibrio intramolecular se suma a la diversidad del comportamiento estructural de los ácidos borónicos. Por medio de cálculos teóricos se comprobó que la especie con más tendencia a formar el ciclo fue la sustituida $X = \text{Cl}$, $Y = \text{H}$ en la figura 2.18, lo cual coincide con los resultados experimentales. No obstante, se requieren más estudios en la elección del disolvente ya que la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno en caso de usar un disolvente polar afectará la estabilidad de la forma cíclica.¹⁰¹

2.4. Reconocimiento molecular utilizando ácidos borónicos

Una cualidad de los ácidos borónicos para el reconocimiento molecular de especies en medios acuosos que es hoy por hoy ampliamente conocida, es su apreciable capacidad como ácido de Lewis. Hoy es amplio su uso en la detección de nucleófilos, compuestos con sistemas 1,2-diol y en el desarrollo de quimio-sensores fluorescentes para la detección de iones metálicos. Conforme a ello, se ha logrado la detección de fluoruro, cianuro, carbohidratos, neurotransmisores como la dopamina,¹⁰² y el desarrollo de la primera sonda selectiva para H_2O_2 .¹⁰³

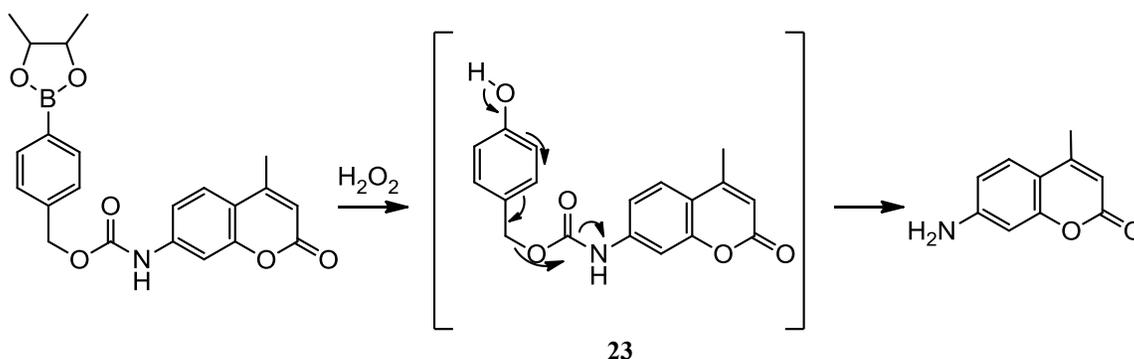


Figura 2.19 Mecanismo de detección del sensor para peróxido.

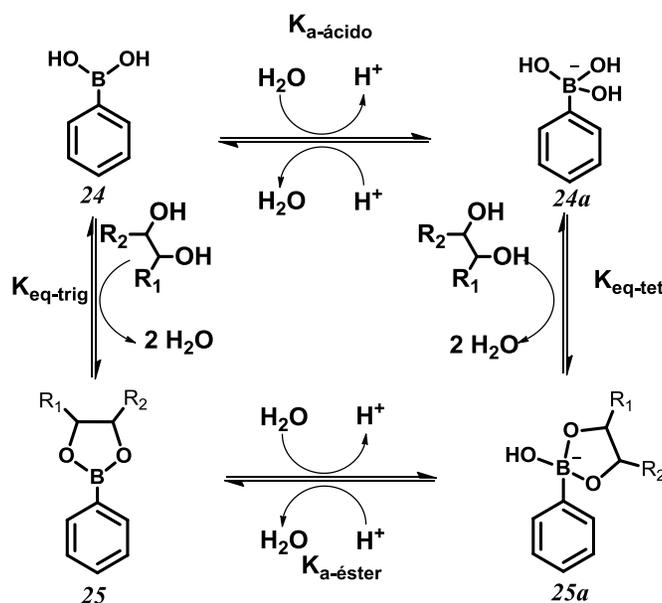
Aprovechando la hidrólisis selectiva del peróxido hacia los arilboronatos para formar el fenol correspondiente, hace ya una década se utilizó el receptor **23** que contiene un grupo

cromóforo el cual es liberado a través una reacción de eliminación 1,6 provocada por la hidrólisis del grupo borónico en el receptor mediada por el peróxido.¹⁰³

En particular tres tipos de interacciones discutidos a continuación han atraído la mirada sobre los compuestos derivados de los ácidos borónicos, cuya pertinencia en el área del reconocimiento molecular ha influido en el progreso de sondas fluorogénicas y colorimétricas y otros sistemas que apuntan a la detección de analitos de importancia bioquímica y médica.

2.4.1. Interacción de Ácido arilborónico-Diol

Dada la importancia del ácido bórico en la síntesis de ésteres de sacáridos-ácido bórico como método para la determinación de la configuración de sacáridos parece sorprendente que estas propiedades no hayan sido observadas en los ácidos borónicos sino hasta 1954⁴² y que la primera investigación cuantitativa de las reacciones entre los ácidos borónicos y los polioles haya sido publicada hasta 1959.⁴³



Esquema 2.2 Equilibrio acuoso entre el ácido fenilborónico y su éster.^{42,104}

Los experimentos de Lorand y Edwards concluyeron que la base conjugada del ácido fenilborónico tenía una estructura tetraédrica en lugar de trigonal, confirmada a partir del estudio sistemático con varios polioles. Una forma de explicar los equilibrios que ocurren, es

a través de un ciclo termodinámico de las posibles especies involucradas y las constantes que intervienen. Los ésteres formados por los ácidos borónicos son análogos a los de los ácidos carboxílicos al reemplazar sus grupos hidroxilo por condensación con un alcohol, ya sea de origen alquílico o arilo, enlazándose de forma covalente favoreciendo la formación de ciclos con 1,2- o 1,3-*cis*-dioles. (Esquema 2.2).

Los resultados experimentales demostraron que después de la estabilización del pH de un ácido fenilborónico **24** en solución y la subsiguiente introducción de un sacárido, el pH de la solución disminuye. Esto llevó a la conclusión que durante la reacción no solo se forma el éster borónico trigonal **25**, sino también la forma tetraédrica **25a**, la cual libera un protón a medida que se da la coordinación de una molécula de agua.

La interacción ácido borónico-diol es por lo tanto un equilibrio entre las cuatro especies comprendidas por $K_{a-ácido}$, constante de acidez del ácido borónico; $K_{a-éster}$, constante de acidez del éster y las K_{tet} y K_{trig} que corresponden a las constantes de equilibrio de la esterificación de **24** y **24a**, respectivamente. La capacidad de los ácidos borónicos de reaccionar con un disolvente prótico, como el agua y formar un complejo boronato aniónico tetraédrico luego de liberar un protón, destaca su cualidad como ácido de Lewis y le permite reaccionar con una variedad de bases de Lewis como grupos hidroxilo, sulfhidrilo, amino o aniones como fluoruro o cianuro.¹⁰⁵

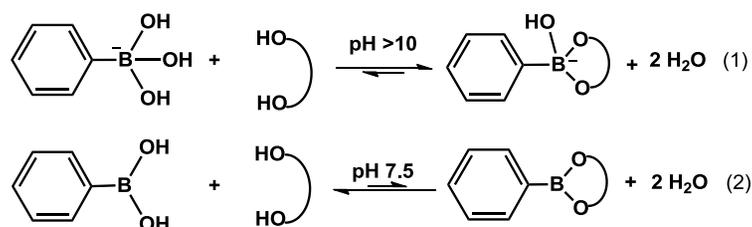


Figura 2.20 Equilibrio de la formación de ésteres borónicos con dioles en agua a pH alto (Ecuación 1) y neutro (Ecuación 2)

Como ya se mencionó, el carácter ácido de los ácidos borónicos no es del tipo ácido de Brönsted (oxiácido) sino del tipo ácido de Lewis. Se ha planteado la hipótesis que la formación del complejo hidroxiboronato con los dioles-1,2 es asistida por una significativa liberación de la tensión angular resultante de la rehibridación del átomo de boro de sp^2 a sp^3 . Al afectar la geometría con la consecuente reducción del ángulo de enlace entre los grupos

de 120° a 109.5° explicaría el efecto termodinámico favorable observado a pH elevado, ecuación (1), comparado con el resultado a pH neutro, ecuación (2) en la figura 2.20.

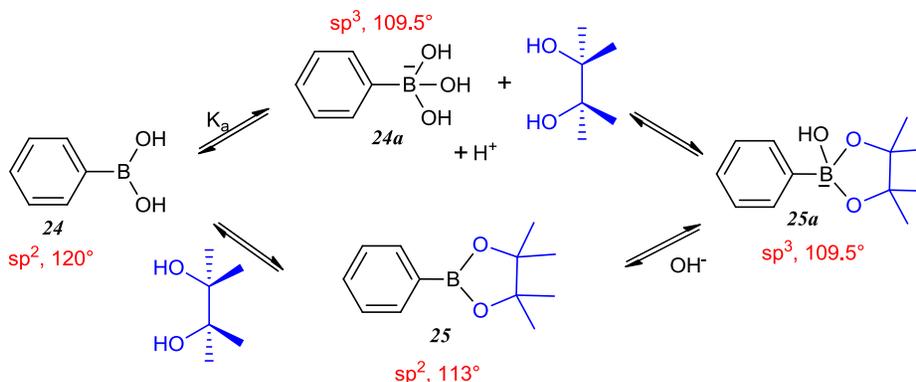


Figura 2.21 Equilibrio ácido-base conjugada para el ácido fenilborónico en agua. La disociación del ión hidrógeno del ácido fenilborónico se da a partir de la interacción del átomo de boro con una molécula de agua. $pK_a = 8.70$ en agua a 25°C

La interacción de **24** con una base de Lewis, como es el caso de un *cis*-diol genera la transformación del ácido en su correspondiente éster, **25** el cual a su vez es un ácido de Lewis, ya que conserva el orbital vacío en el átomo de boro. Varios experimentos demuestran que la formación del éster es más favorable si se lleva a cabo en soluciones a pH elevado^{106,107,108} donde el ion boronato existe en altas concentraciones, lo que confirma el comportamiento ácido de los ácidos borónicos y la estructura tetracoordinada de su base conjugada, es decir, el anión hidroxoboronato, **24a**. Por otra parte, podría decirse que los ácidos borónicos libres son ácidos de Lewis más débiles frente a los ésteres neutros que forman con 1,2-dioles. Por ejemplo, el pK_a del PBA disminuye de 8.8 a 6.8 y 4.6 tras la formación de los ésteres cíclicos con glucosa y fructosa respectivamente.¹⁰⁴ Sin embargo, a lo largo de los estudios realizados se ha visto que la asociación no se rige sólo por este aspecto sino que es una relación entre el pK_a del ácido borónico y del diol, el pH de la solución así como la naturaleza y concentración de la solución amortiguadora.¹⁰⁹

La fuerza de la asociación entre el ácido borónico y el éster está dada por la magnitud de la constante calculada, que describe todos los equilibrios de las especies involucradas en el enlazamiento de las especies que intervienen en la formación del éster boronato, llamada K_{eq} que es una constante aparente, pero directamente relevante al equilibrio entre un receptor y un diol. La K_{eq} reúne a las representadas por K_{tet} y K_{trig} , las cuales no consideran los estados de ionización, ya sea de la forma esterificada o de la especie libre del ácido borónico.

Otra afirmación para garantizar la mejor asociación de los derivados de ácidos borónicos con los dioles que fue tomada como verdadera durante varios años era que el pK_a del ácido borónico debía ser bajo. En estudios realizados por distintos grupos con ácidos arilborónicos sustituidos se demostró experimentalmente que tal resultado no se cumplía para todos los casos y plantearon una relación, Ecuación (3), que se ajustaba más a los datos obtenidos y permitía estimar el pH óptimo de la asociación entre el derivado del ácido borónico y el diol, teniendo en cuenta sus valores de pK_a .¹⁰⁷ Al término del presente trabajo se logró corroborar el razonamiento matemático que permite llegar a esta ecuación que puede lucir bastante simple. El pH óptimo al que se refiere la Ecuación 3, cuya deducción se puede consultar en el apéndice 2, es el pH en el cual se ve más favorecida la formación del éster boronato entre las dos especies.

$$pH_{\text{óptimo}} = \frac{pK_a(\text{diol}) + pK_a(\text{BA})}{2} \quad (3)$$

Dicha asociación se mide por una constante que abarca a todas las constantes involucradas en el equilibrio de las especies del Esquema 2.2. El resultado de esta constante es la que nos da la información sobre la eficacia de la asociación del diol con el derivado del PBA, afectada por la solución amortiguadora y el pH. Para dar un ejemplo de la buena estimación que permite la ecuación 3, en la tabla 2.3 están reproducidos los datos obtenidos por el grupo de Wang para el análisis con catecol a tres valores de pH diferentes.

Tabla 2.3 Constantes de asociación de ácidos borónicos con catecol. K , M^{-1} en solución amortiguadora de fosfato 0.1 M. Tomado de Ref. 107 pK_a^1 9.27, pK_a^2 11.49¹¹⁰

<i>pH</i>	<i>Ácido borónico (pK_a)</i>					
	PBA (8.8)	4-Br-PBA (8.3)	3-Cl-4-F-PBA (7.8)	2,5-Difluoro PBA (7.6)	3,4,5-Trifluoro PBA (6.8)	2-F-5-NitroPBA (6.0)
6.5	150	715	1646	8841	2137	3027
7.5	830	1557	6100	4703	2896	4359
8.5	3300	1966	7487	418 ^a	5376	3792
pH óptimo	9.0	8.8	8.5	8.4	8.0	7.6

^a Valor de K con error entre 40-60%, para los demás valores de K el error es del 10%.

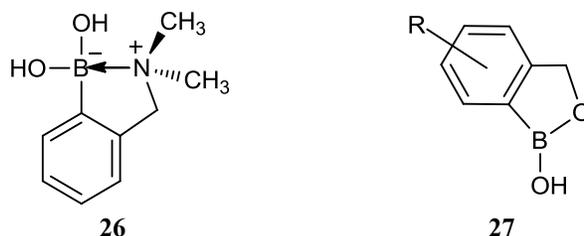
Los mejores resultados observados para K en la asociación de derivados de PBA con catecol se obtienen en valores cercanos al pH estimado a partir de la ecuación 3, lo que evidencia el

comportamiento en cuanto a la afinidad de un diol hacia determinado ácido arilborónico con respecto a las variaciones en el pH. La mejor asociación ocurre cuando se realiza en el valor de pH óptimo, en este mismo estudio se utilizaron otros dioles como la glucosa y la fructosa, donde la tendencia en los resultados fue similar. Sin embargo, dado que son varios los aspectos que influyen en esta interacción en el caso del 2,5-difluoroPBA se observa una ‘desviación’ en los resultados obtenidos, situación que puede asociarse a factores estéricos debido a la presencia de un grupo flúor en la posición vecina al boro.¹¹¹ Cabe resaltar que los derivados del catecol con cualidades fluorescentes, tal como Rojo de Alizarina Sulfona (ARS) también forman aductos covalentes con ácidos borónicos en agua, y este equilibrio ha sido aprovechado para la determinación cualitativa y cuantitativa de la asociación con sacáridos.^{105, 112-114}

2.4.2. Interacción N→B

Otra posible forma de reducir el pH óptimo de asociación es el uso de grupos funcionales donadores en la posición *orto*- al boro. La unión entre nitrógeno y boro a través de un enlace dativo o enlace coordinado ha sido materia de estudio por más de cien años. La fuerza de este enlace es afectada directamente por las cualidades que los sustituyentes ejercen sobre ambos átomos debido a su condición de ácido y base de Lewis.

En el caso del átomo de boro, los sustituyentes del anillo electroattractores causan el incremento en su acidez, mientras que los grupos electrodonadores incrementan la basicidad en el nitrógeno. Sin embargo, las interacciones estéricas y la tensión del anillo en el caso de los ésteres cíclicos, debilitan y alargan el enlace N–B, lo cual va acompañado de una reducción de la geometría tetraédrica del centro borónico. La distancia N...B puede variar entre 1.57 Å, en un enlace covalente B–N en el nitruro cúbico, hasta 2.91 Å que es la suma de los radios de van der Waals entre el nitrógeno y el boro. Esta gran variación en la longitud del enlace permite observar la transición entre el enlace covalente y las interacciones de van der Waals. Ciertos estudios estructurales muestran que esta continua transición parece ser razonable.¹¹⁵ Varios grupos han mostrado interés por explotar las ventajas de la interacción B–N aplicando diferentes estrategias.



En el caso de Wulff y *col.* sintetizaron varios derivados del ácido fenilborónico con funciones intramoleculares donadoras próximas, donde se destaca la contribución de la interacción B–N en procesos reversibles para la separación cromatográfica de sustancias en polímeros a través de reacciones de equilibrio rápido. Con la introducción de un grupo dialquilamino-metil en la posición *–orto* del anillo de PBA, **26**, se logra mejorar la constante de asociación por varios órdenes de magnitud del ácido borónico con dioles en medio acuoso, acompañado de una gran disminución en el pK_a en el compuesto. El aducto formado entre el N→B, le confiere un carácter positivo al átomo de nitrógeno, como consecuencia de la retrodonación electrónica que le brinda al átomo de boro, en el caso de **26** el pK_a es de 5.2, un valor que pocos ácidos borónicos comparten. Otra estructura descrita por Wulff, es el sistema boronofthalido o mejor llamado benzoxaborol **27**, como un sistema que puede esterificarse de forma rápida y reversible con monoalcoholes.⁴

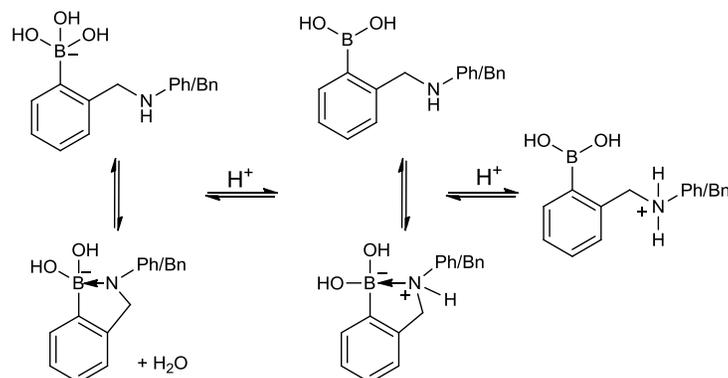
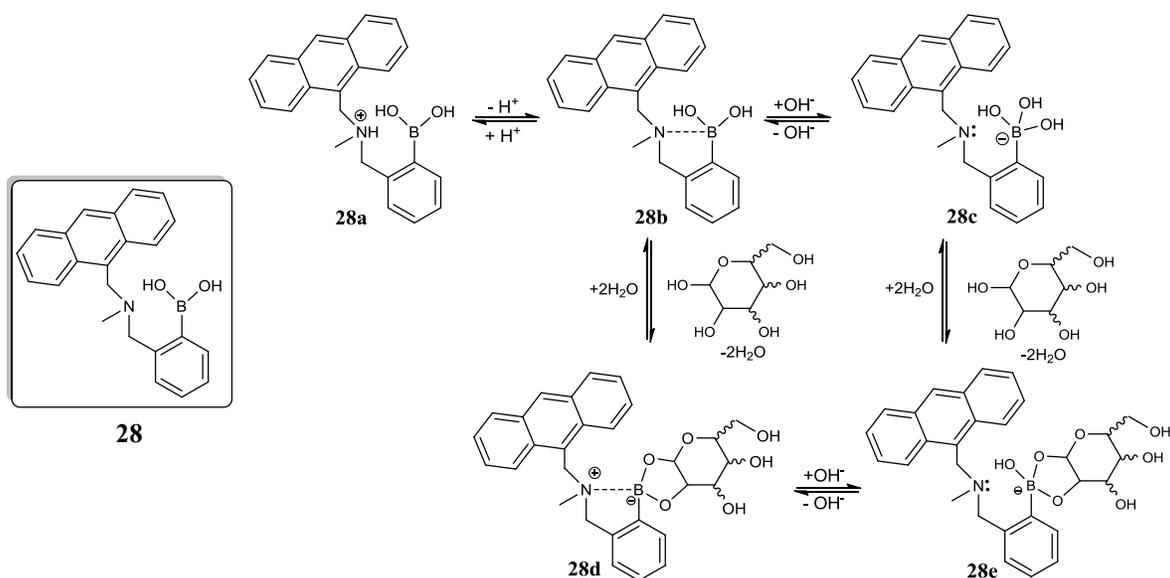


Figura 2.22 Equilibrios de las posibles especies de la interacción B-N cíclicas y no cíclicas.

La medida en que se da una interacción B–N puede formularse como un equilibrio de deshidratación del boronato o una reacción simple de ácido-base de Lewis del ácido borónico. El caso general se expresa en la figura 2.22 por medio del equilibrio entre las formas acíclicas con las formas cíclicas.

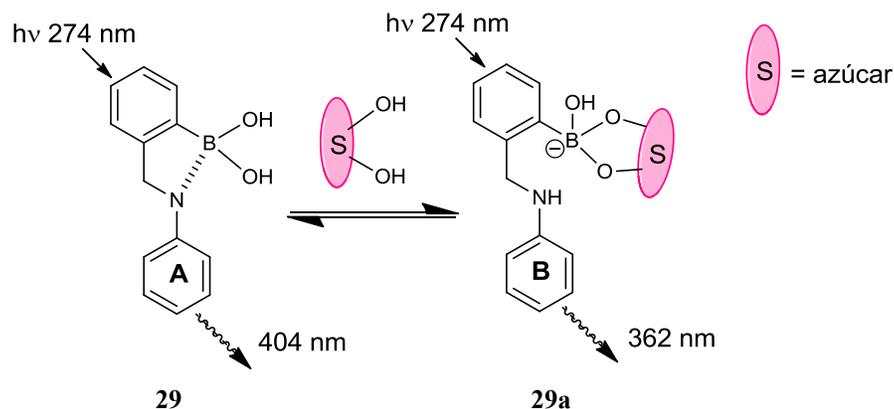
El uso de varias técnicas se hace necesario, ya que, por ejemplo, la técnica de titulación potenciométrica no permite distinguir entre el par de estructuras, ya que tienen la misma estequiometría o sólo difieren en una molécula de agua, y debido a que todo se lleva a cabo en fase acuosa, el agua puede ser considerada como a concentración constante. Desde un punto de vista general, los sistemas cíclicos y acíclicos son similares. Del trabajo realizado por James y *col.* la evidencia experimental favorece predominantemente las formas cíclicas sobre las no cíclicas para la estructura con el anillo bencílico unido al nitrógeno.¹¹⁶

Un revolucionario concepto de receptor fluorescente, en su momento y durante varios años con la interacción B–N fue el diseñado por Shinkai y *col.*¹¹⁷ El receptor **28** en su forma neutra no es fluorescente debido a los efectos de transición electrónica fotoinducida (PET) por parte del grupo amino. Sin embargo, la formación del complejo con glucosa, que acidifica el átomo de boro y hace más fuerte la interacción B–N, impide la transferencia del par de electrones de N al estado excitado de antraceno y así elimina el PET haciendo al éster una especie fluorescente.

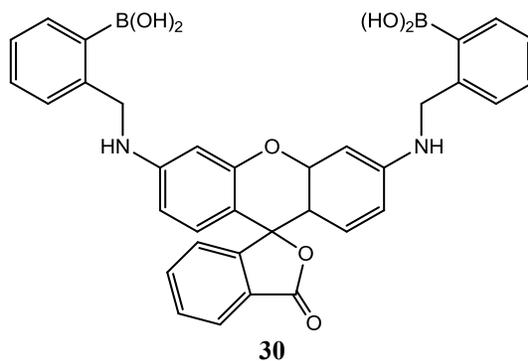


El grupo de James utilizó el efecto a las propiedades fluorescentes del enlace B–N, en la especie **29**.¹¹⁸ Cuando **29** es excitado a 274 nm emite a 404 nm, después de la unión con un sacárido se rompe el enlace y se forma la especie protonada **29a**, la cual emite a 362 nm cuando es excitada a 274 nm. Estas diferencias en las propiedades fluorescentes de las especies A y B son asignadas a estados excitados locales (LE) del fluoróforo anilina. Con estos receptores, las constantes de asociación halladas por el ajuste del incremento de

fluorescencia a valores de pH de 8.21 en 52.1% de MeOH, solución amortiguadora de fosfato y $I_{KCl} = 0.01$ M fueron para fructosa $K = 212.1$ M⁻¹. Sin embargo, bajo tales condiciones el receptor con mejores resultados fue aquel sustituido en la posición *-meta*.



Otro ejemplo de un receptor importante con grupos amino en posición *-orto* fue el diseñado por Strogin y *col.* Al combinar la posibilidad de uniones con sacáridos por interacciones reversibles o no-covalentes, se hace posible la recuperación de biomoléculas costosas o escasas. En 2003, su grupo publicó el uso de una rodamina con un derivado del ácido borónico, **30** como un agente de derivatización post-columna en un método automatizado para Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) hacia la detección de una variedad de azúcares y biomoléculas relacionadas.



La estrategia consistió en modificar una estructura con el esqueleto básico de la rodamina con un grupo arilborónico y de esta manera combinar la alta absorptividad molar en la región del visible de la primera, aprovechar la interacción B-N para favorecer la formación de los ésteres boronato con sacáridos y tener un efecto cromóforo que facilita la detección.¹¹⁹

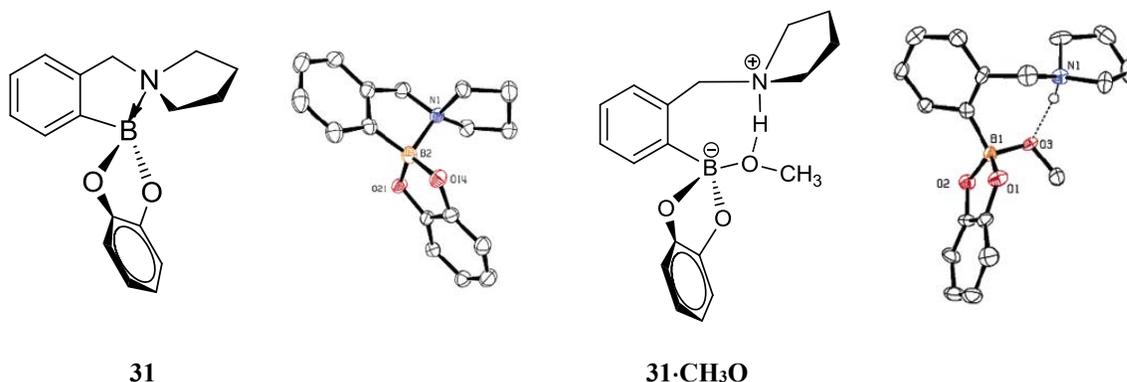
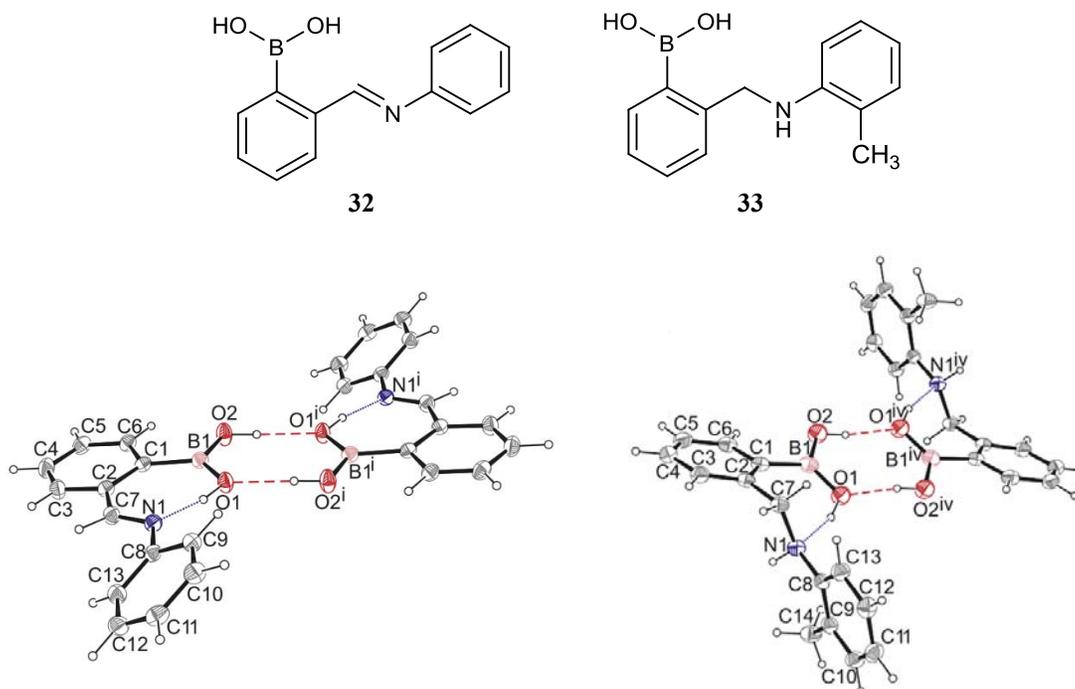


Figura 2.23 Comparación de las estructuras cristalinas de **31**, luego de recrystalizar en un disolvente aprótico y otro prótico, tomadas de [122]

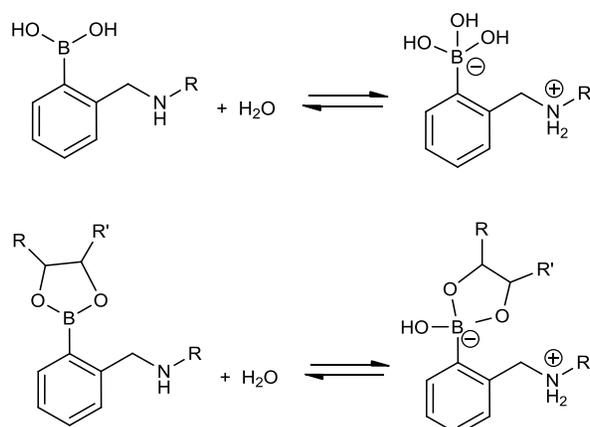
Por otra parte, la investigación estructural dirigida específicamente hacia la interacción N–B realizada por Anslyn y *col.* utilizando DRX y RMN ^{11}B en medios próticos y apróticos proporcionó información sobre las estructuras del tipo *o*-(*N,N*-dialquilaminometil)-fenilboronatos, encontrando que el modo de interacción depende del medio en el que se obtiene y que la presencia del enlace dativo N→B se observa, aunque no en todos los casos, al cristalizar las estructuras en disolventes apróticos.^{120,121}

Sin embargo, cuando se trata de un medio prótico puede predominar la inserción del disolvente en el boronato dando una especie zwitterion unida a través de enlace de hidrógeno y prácticamente anula el enlace dativo N→B. Esta comparación fue evidente con el compuesto **31**. El enlace dativo se obtuvo cuando el compuesto fue cristalizado en cloroformo. Pero al cristalizar el compuesto en metanol se inserta una molécula de disolvente entre el B y el N dejando una asociación a través de enlaces de hidrógeno N–H y B–OCH₃.¹²²

Por la época de la finalización experimental del presente trabajo fue publicado el estudio estructural por DRX de los compuestos **32** y **33**. En el que se observó que los ácidos aminometil- e iminometil- fenilborónicos son estabilizados por enlaces de hidrógeno que involucran tanto los fragmentos hidroxilo del grupo borónico como el átomo de nitrógeno de la posición β del sustituyente *orto*. En ambos casos los compuestos se obtuvieron a partir la reacción en diclorometano. A diferencia de los resultados obtenidos por el grupo de Anslyn el enlace dativo entre el N→B no se verifica y además se espera que sea poco favorecido de acuerdo con los cálculos de energía.¹²³



El trabajo de Anslyn y *col.* confirmó la hipótesis de Wang y *col.* conocida como el “mecanismo de hidrólisis” respecto al estado real de la especie neutra y su éster correspondiente en medio acuoso, descrito en la figura 2.22.^{120,121}



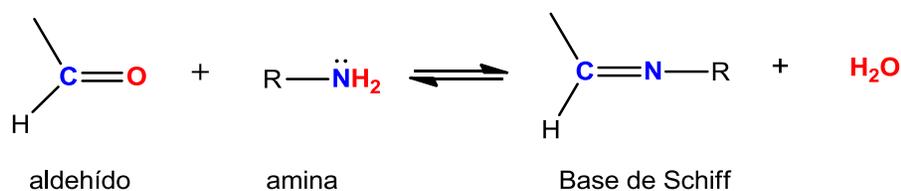
Esquema 2.3 Formación de estructuras zwitterónicas por hidratación.

Según esta hipótesis, las estructuras neutras en realidad son zwitteriónicas y son producidas por adición de agua. Su estabilidad se debe a la interacción electrostática dentro de un par iónico intramolecular y no a la interacción donador–aceptor N–B. Se supone que el equilibrio de hidratación está desplazado hacia la forma zwitterionica mucho más en el caso del éster que tiene mayor acidez, mientras que el ácido está principalmente en forma neutra cíclica

(ver figura 2.22), pero los cálculos teóricos predicen que en ambos casos la forma zwitteriónica tiene mayor estabilidad.¹²⁴

2.5. Formación de Iminas - interacción excepcional

Las iminas o bases de Schiff, son el producto de la condensación entre un aldehído y una amina primaria lo que genera un enlace doble entre el nitrógeno y el carbono proveniente del grupo carbonilo y fueron denominadas así luego que Hugo Schiff publicara sus trabajos sobre esta reacción entre 1850 y 1860.



La disponibilidad del par de electrones libres en el nitrógeno en una base de Schiff le da la capacidad para coordinarse a muchos metales de transición. No obstante, el principal uso de la formación de iminas es el de conectar dos moléculas que tienen propiedades donadoras útiles en sí mismas con el fin de crear un producto multifuncional. El hecho que el doble enlace entre el carbono-nitrógeno sea susceptible de un ataque por una molécula de agua, lo que conduce a la hidrólisis y regeneración de los compuestos carbonilo y amina de partida, dando el carácter de enlace o interacción *covalente reversible* y lo sitúa en un lugar de importancia dentro de la química supramolecular. Algunos trabajos anteriores demuestran que la formación de iminas es en esencia reversible en agua^{125,126}.

La condensación de bases de Schiff es generalmente un método de acoplamiento muy eficiente que le ha conferido gran aplicación en sistemas de auto-replicado donde el alto rendimiento y fidelidad son requeridos.²⁸

2.5.1. Función en síntesis orgánica

En el área de la síntesis asimétrica, la formación de iminas procedentes de la condensación de un aldehído con aminoazúcares o derivados del gliceraldehído con azúcares aminados se remonta a finales de 1980 para la obtención de antibióticos β -lactámicos.¹²⁷ En trabajos más recientes se utilizan como intermediarias en alquilaciones estereoselectivas, Martin y *col.*

obtuvieron a partir de L-xilosa y por medio de un intermediario imina, la 1,6-dideoxi-1-nojirimicina, **34** compuesto que presenta actividad biológica como inhibidor de la glicosidasa.¹²⁸

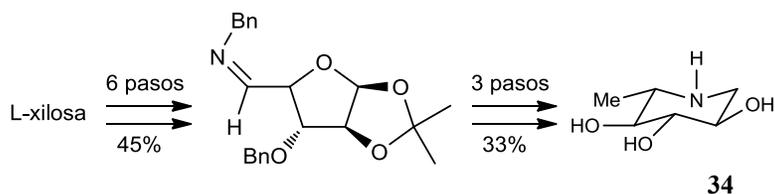
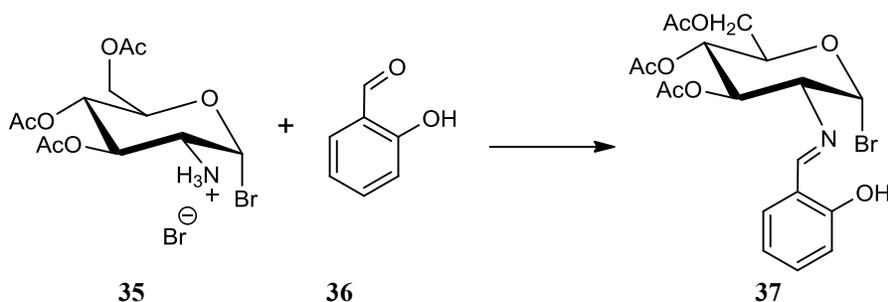


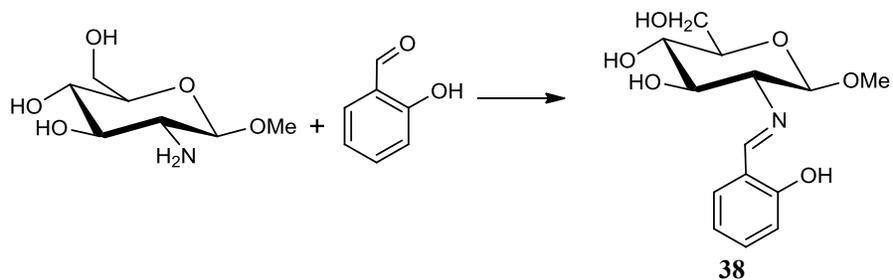
Figura 2.24 Síntesis de 1,6-dideoxi-1-nojirimicina a partir de L-xilosa

Los primeros antecedentes de las bases de Schiff formadas con aminoazúcares es el trabajo de Irvine y *col.* quienes, luego del intento de efectuar la glicosilación de 1-bromo-3,4,6-tri-O-acetil-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranososa (**35**) con *o*-salicilaldehído (**36**), obtuvieron el producto O-glicosilado esperado, en baja proporción frente al que fue el producto mayoritario, la imina de la glucopiranososa después de la condensación con el *o*-salicilaldehído (**37**).¹²⁹



Esquema 2.4

Después de varios experimentos siguiendo este inesperado resultado, finalmente, en 1922 el grupo de Irvine y *col.* al tratar una disolución acuosa del clorhidrato de D-glucosamina con un equivalente de bicarbonato de sodio y un equivalente de *o*-salicilaldehído obtuvieron la primera base de Schiff no protegida, que se separó en alto rendimiento como un producto coloreado, insoluble en agua (**38**).



Esquema 2.5 Formación de la base de Schiff entre el 2fPBA y la glucosamina metilada

Este resultado hizo que la reacción fuera propuesta como un método de fácil preparación para aislar la D-glucosamina con alto rendimiento sumado a la posibilidad de regenerar el azúcar de partida luego del tratamiento con ácidos diluidos en caliente.¹³⁰

La versatilidad del enlace de Schiff ha encontrado aplicaciones en distintas áreas y con propósitos diversos: en reacciones de catálisis asimétrica se obtuvo el primer ligante quiral con grupos cubanos, **39** unidos a través de bases de Schiff para ser utilizados en síntesis estereoselectiva. No obstante, los resultados fueron modestos en la reacción de Henry para la síntesis de β -nitroalcoholes, donde obtuvieron un exceso enantiomérico del 39% al combinar su uso con cloruro de cobre (I) a 65°C.¹³¹

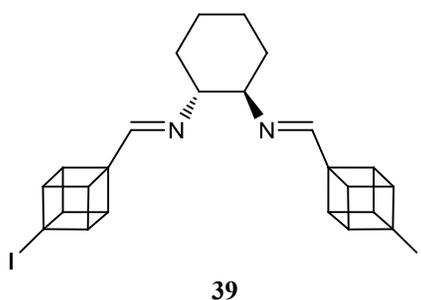


Figura 2.25 (1R,2R)-N,N'-bis[(4-iodocuban-1-il)metilen]-trans-1,2-diamino ciclohexano

2.5.2. Función en Química combinatoria:

El área donde la función imina ha cobrado mayor relevancia en años recientes tiene un punto emergente a mediados de 1990 con la aparición de la Química Dinámica Combinatoria (en inglés DCC, abreviado aquí QDC) el cual es un potente enfoque hacia la identificación rápida de ligandos o receptores basándose en la implementación del ensamblaje dinámico y los procesos de reconocimiento. Así, se tienen en cuenta las posibles conexiones reversibles

entre bloques de construcción adecuados, lo que da lugar al montaje espontáneo de todas sus combinaciones posibles y permite en un solo paso la producción de bibliotecas (colecciones) abastecidas¹³² a partir de un motivo supramolecular concreto.¹³³

El descubrimiento y mejora en la fabricación de nuevos medicamentos se ha transformado en alianza con la química supramolecular, esta sinergia brinda otras formas de plantear nuevas metodologías o moléculas con características mejoradas para su aplicabilidad. El método de química combinatoria asistido por receptores (RAAC) va más allá del uso de bibliotecas (colecciones) enfocadas, es decir, no sólo incluye modificaciones de tipo estructural, sino que también contempla la estequiometría del receptor durante la síntesis de la *colección*. Al incluir el receptor, este desvía la síntesis hacia los compuestos que presentan la mejor asociación, por lo tanto, es una combinación de síntesis y detección en un solo paso.

Un estudio comparativo de la formación de iminas en medio acuoso y en ausencia de disolvente demostró que es posible obtener el producto en mayor rendimiento en ausencia de agua. La razón se atribuye a que, aunque los reactivos de partida sean solubles en agua si el producto final, en este caso la imina, no lo es, puede conducir la reacción a una trampa termodinámica debido a la insolubilidad. De tal forma que para aportar datos que sean utilizables y reproducibles sobre este tipo de interacción a una biblioteca (colección) dinámica combinatoria, se debe procurar que todos los componentes de la reacción sean solubles en el disolvente empleado y que estén libres de interacción unos con otros.¹³⁴

A pesar que la estabilidad de las bases de Schiff en agua es débil,¹³⁵ los intentos de usar esta reacción continúan, dado que la formación de un enlace imina genera en sí mismo un nuevo cromóforo que puede ser empleado en la detección óptica de aminas.

2.5.3. Función como cromóforo:

Inspirados en los excelentes resultados de la reacción con formación de enlaces covalentes con carácter reversible de los ácidos borónicos, surge la idea de inducir lo mismo con cromóforos que tengan la función aldehído para tratar de detectar aminas y aminoácidos por medio de la formación de iminas. Con este propósito los estudios realizados por Glass y *col.* hallaron que las cumarinas sustituidas con aldehídos (**40**) resultan ser excelentes sustratos fluorogénicos para la detección de aminas aún en soluciones neutras y con elevada fuerza

iónica. La respuesta observada con la formación del ion iminio y los enlaces de hidrógeno intramoleculares favorecen la alta respuesta en la señal de fluorescencia y por lo tanto su posible aplicación en sensores específicos para aminas y aminoácidos.¹³⁶

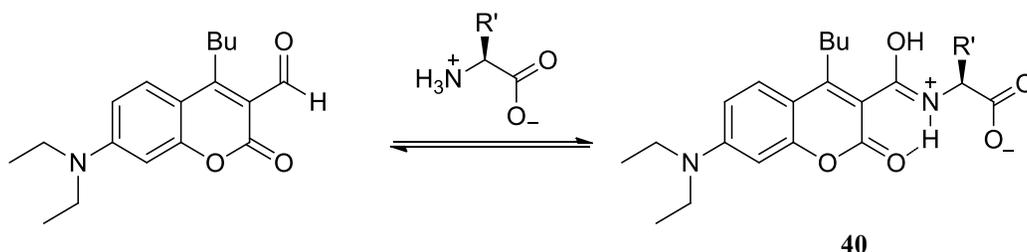


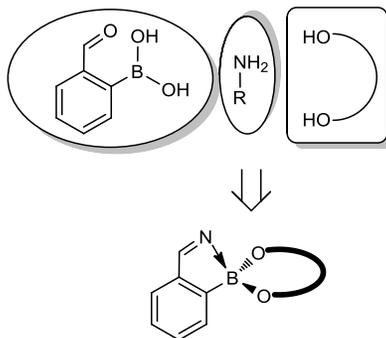
Figura 2.26 Formación de iminio luego de la unión de la cumarina-aldehído con glicina

Las iminas formadas a partir de aminoácidos y aldehídos aromáticos han sido de particular interés, ellas pueden ser usadas como modelos simples, que son de utilidad en la caracterización del comportamiento de iminas más complejas con el cofactor enzimático piridoxal 5-fosfato, responsable de la conversión de aminoácidos, entre otras funciones.

Se sabe que una de las razones por las cuales las enzimas eligen el piridoxal-5-fosfato como catalizador es porque logra equilibrar de manera favorable la reactividad del ion iminio que se forma, convirtiéndolo en un mejor catalizador en la desprotonación si se compara con los compuestos aromáticos homólogos con grupos aldehído o cetona simples.¹³⁷ Un punto a tener en cuenta es el papel que desempeñan los enlaces de hidrógeno intermoleculares, aunque en soluciones acuosas generalmente son muy débiles debido a que las moléculas de agua compiten y son más eficientes en la solvatación de los grupos ácidos y básicos, las interacciones de enlace de hidrógeno en medios acuosos pueden llegar a ser significativas si el ácido donador y la base receptora están en la misma molécula forzando llegar a la geometría apropiada a través de tensiones moleculares.¹³⁸

Las iminas son una clase de compuestos particularmente ricos por su amplia variedad de características conformacionales y configuracionales, así como también por contar con un comportamiento constitucional y dinámico activo.¹³⁹ Estas notables características, combinadas con las del grupo boronato, dan origen a la formación del éster iminoboronato, del cual se mencionó en la interacción B–N en la sección 3.2 en la síntesis de receptores con cualidades enantioselectivas. La estabilidad y buen rendimiento de la reacción entre 2-fPBA

y aminas primarias alifáticas y aromáticas descritas,¹⁴⁰ hacen que este motivo estructural sea de interés por su versatilidad, basada principalmente en la labilidad de los enlaces B–O y C=N.



Esquema 2.6 Subcomponentes para formar un éster iminoboronato: una amina primaria, ácido 2FPBA y un diol.

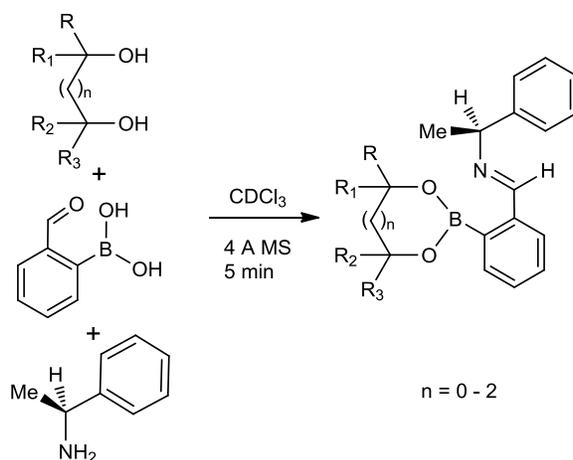
La posibilidad de utilizar este motivo estructural en el diseño de nuevas metodologías de síntesis por autoensamble, que permita predecir los productos a partir de las propiedades electrónicas del grupo amino o el diol seleccionado, ha conducido a investigar las reglas que dirigen la formación de la función iminoboronato. Basados en los resultados experimentales de 14 aminas, 9 de ellas aromáticas y tres diferentes dioles (catecol, etilenglicol y 1,3-dihidroxipropano) el grupo de Nitschke y *col.* propuso cinco tendencias respecto a la formación del éster iminoboronato, de las cuales cabe resaltar las siguientes.

En primer lugar, la baja solubilidad de los materiales de partida y los productos en cloroformo y metanol al utilizar aminas cargadas no permite formar ésteres iminoboronato bien definidos; no así las aminas ricas en electrones y la presencia de dioles aromáticos que dan mejor estabilidad al complejo de boro y sí forman los ésteres iminoboronato, hecho atribuido a la mayor nucleofilicidad de las iminas más ricas electrónicamente, y a la mayor estabilidad de la estructura resonante del dianión catecolato frente a dianiones alifáticos como el dietilenglicolato.

Un efecto mutualista se observó durante la presencia de diol con residuo de catecol y las aminas más ricas electrónicamente, lo que puede explicarse en términos de estabilización preordenada (plantilla), ya que la unión a un catecolato hace al centro borónico más deficiente electrónicamente, dando como resultado un enlace dativo entre el nitrógeno y el boro, que estabiliza al sistema en su conjunto. Esta mutua estabilización de las moléculas de éster e

imina se reflejó en los altos rendimientos, donde se observó alta correlación del rendimiento de ambas condensaciones. Por otro lado, aunque se cuente con alta riqueza electrónica de la fracción amina, los efectos estéricos alrededor del grupo borónico afectan la estabilización del mismo, pudiendo reflejar una baja formación de la doble condensación que conduce a formar el éster iminoboronato.¹²

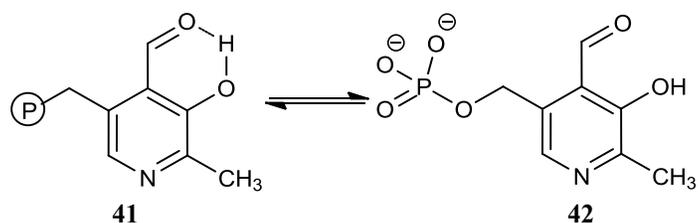
Otro ejemplo es un protocolo bastante práctico y simple para derivatización quiral con tres componentes fue desarrollado por el grupo de James en 2006, con él se facilita la determinación de la enantiopureza de una amplia variedad de dioles quirales por espectroscopía RMN ¹H. El exceso enantiomérico de dioles, producto de protocolos asimétricos puede determinarse de forma rápida y simple, por medio de la comparación de las intensidades relativas de las series de integrales seleccionadas. El estudio demostró su aplicación para determinar la enantiopureza en aminas primarias quirales como α -ariletilaminas, α -metilalquilaminas, β -aminoéteres, α -amino ésteres y β -amino ésteres.¹⁴¹



Esquema 2.7 Reacción acoplada de tres componentes: 2fPBA, (S)-BINOL y (rac)-Aminas

2.5.4. Equilibrio de Bases de Schiff en medio acuoso

La formación de iminas o bases de Schiff se ha desarrollado desde la síntesis original en 1864 realizada por H. Schiff en una gran variedad de disolventes. A partir de allí las ventajas de esta reacción han estado presentes a lo largo del desarrollo de la química, bioquímica, química de materiales y la rama más reciente, la química combinatoria.



Aunque la mayoría de las reacciones se han llevado a cabo en diferentes disolventes orgánicos, con el fin de desplazar la formación reversible de la imina hacia el producto de condensación, existe un estímulo primordial para querer estudiar los equilibrios de esta reacción en medio acuoso y es su importancia en el área de la bioquímica. Dentro del grupo de investigación donde se desarrolló el presente trabajo, se han estudiado las reacciones entre el piridoxal fosfato (**41**) y los aminoácidos que ocurren a través de reacciones de bases de Schiff.

En el trabajo realizado por Godoy (2005), se utilizó una serie de aldehídos y aminas primarias con el interés de establecer las características de la formación de iminas en medio acuoso y los factores que determinan la estabilidad de las mismas.¹²⁵ Como era de esperarse, las constantes de formación de las iminas fueron mayores entre mayor fuera la basicidad de las aminas, pero debido a que los valores de pK_a no reflejan adecuadamente la capacidad de las aminas para formar enlaces covalentes, se incluyeron valores de energía de los orbitales tanto de la amina como del aldehído. Tal consideración permitió correlacionar los resultados experimentales con la ecuación 4, que predice la constante de formación de la imina entre una pareja de aldehído-amina, dentro de los límites de variación con dos términos, utilizando los valores de pK_a , HOMO de la amina y LUMO del aldehído.

$$\log K = 6.40 \pm 1.62 - (1.04 \pm 0.19)E_{\text{LUMO}}^{\text{aldeh}} + (2.00 \pm 0.36)E_{\text{HOMO}}^{\text{amina}} + (0.65 \pm 0.07)pK_a^{\text{amina}} \quad (4)$$

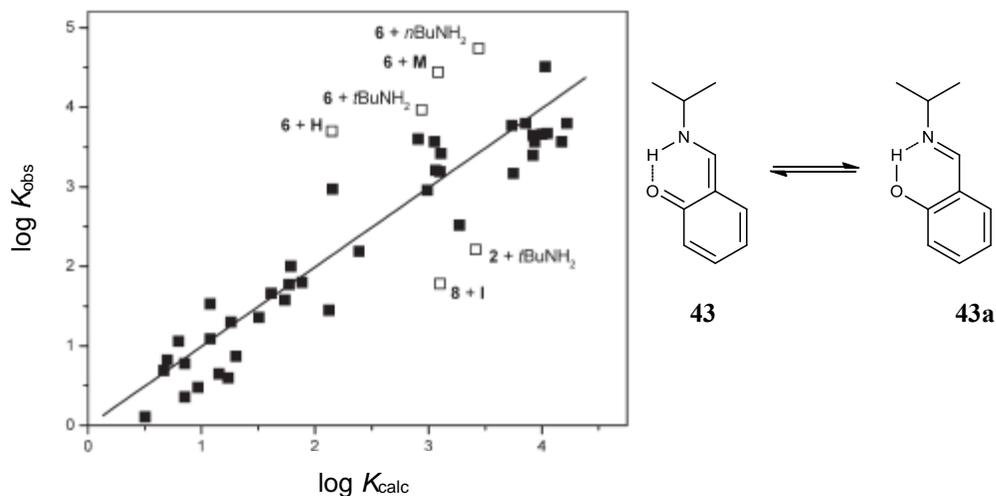


Figura 2.27 Constantes de formación calculadas Vs. experimentales para la serie de aldehídos e iminas en Godoy, *et. al.* [125]

La gráfica de la figura 2.27 es una correlación de los valores experimentales y los calculados a partir de la ecuación 4, en ella se aprecia la desviación positiva observada con el salicilaldehído. Varios estudios de la formación de bases de Schiff con salicilaldehído y derivados de piridoxal fosfato con aminoácidos se han efectuado desde hace varias décadas,¹⁴² y el resultado observado se atribuye a la presencia de un grupo hidroxilo en la posición *-orto* que permite la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular con el nitrógeno de la imina. En la tabla 2.4 están condensados algunos valores de las constantes de formación de bases de Schiff del salicilaldehído (**36**) publicados con aminoácidos y otras monoaminas.¹⁴³ En la formación de una base de Schiff deben ser consideradas todas las formas iónicas y las posibles formas tautoméricas que puedan existir, así como otros equilibrios independientes del pH del medio, tales como la hidratación o la formación de aductos. El espectro electrónico contiene contribuciones de cada una de las especies. Un claro ejemplo es la base de Schiff entre el salicilaldehído (**36**) y el 2-aminopropano, el tautómero quinoidal (**43**) predomina en solución acuosa, mientras que en disolventes menos polares, el equilibrio es desplazado hacia el tautómero fenólico (**43a**).¹⁴³

En el caso de las formas protonadas de iminas se observan dos bandas entre 285–415 nm y una de menor intensidad con menos del 10% del área de la banda cercana a 415 nm entre 320–330 nm. Aunque las bandas pueden representar transiciones electrónicas débiles, lo más probable es que sean indicio de la presencia de tautómeros menores. El sutil equilibrio

tautomérico de las bases de Schiff también se ha estudiado utilizando las técnicas de RMN de ^1H y de ^{13}C . Además, se ha comprobado por cálculos teóricos que la diferencia en energía de ambos tautómeros es muy cercana dentro de los límites de precisión actuales de los cálculos de mecánica cuántica.

Tabla 2.4 Constantes de formación ($\log K$) de bases de Schiff del salicilaldehído reportados con aminoácidos y otras monoaminas

<i>Aldehído</i>	<i>Amina</i>	<i>log K</i>
Salicilaldehído	2-aminopropano	1.88 ^a
	etilendiamina	2.68; 2.37; 4.87 ^a
	1,3-diaminopropano	2.20 ^a
	valina	2.68 ^a
	β -alanina	2.97 ^b
	n-butilamina	4.74 ^b
	2-metoxi etilamina	3.70 ^b
Piridoxal fosfato	valina	2.37 ^a
Benzaldehído	anilina	2.24 ^b

^a Ref 145, ^b Ref 125

Estos estudios se han realizado en disolventes orgánicos, el análisis estructural demuestra que la transformación de la forma enol-imina a la de ceto-amina causa un aumento considerable de la distancia C–N de 1.317 Å a 1.330 Å y la reducción de 1.279 Å to 1.263 Å en la distancia C–O. Basados en estos resultados se ha propuesto que el tautómero dominante dependerá del tipo de precursor carbonílico y no de la estereoquímica de la molécula ni del sustituyente del nitrógeno de la imina. En los resultados hallados por Flores-Leonar (2011), la estabilidad de una u otra forma tautomérica depende sólo de la aromaticidad, aunque la polaridad del disolvente estabilizará la forma ceto-amina, debido al enlace de hidrógeno del tipo (O \cdots H–N) de la forma ceto- frente al (N \cdots H–O) de la especie enol-imina.¹⁴⁴

Por otra parte, la determinación de las constantes de equilibrio por métodos de UV-Vis de la formación de las bases de Schiff en presencia del ácido bórico, a partir del salicilaldehído por el grupo de Okuyama, *et. al.* (1984),¹⁴⁵ demostró que el ácido bórico acelera la formación de la base de Schiff y las constantes catalíticas. Sin embargo, la literatura refleja que son escasos los estudios y análisis sistemáticos sobre la influencia del ácido bórico en la formación de bases de Schiff, y el modo que afecta las constantes de formación de las iminas.

OBJETIVOS

Hipótesis

En este trabajo de tesis se propone examinar el posible reconocimiento de amino polioles a través de la formación del grupo iminoboronato en agua. El ensamble de este modo de arreglo es típico observarlo en medios no polares. Dado que la formación de la estructura con el enlace covalente coordinado del $N \rightarrow B$ es improbable en medios polares, lo que se puede esperar es la formación simultánea de una imina y un éster boronato tetraédrico entre un amino poliol y un isómero apropiado del ácido fPBA. La disposición geométrica idónea entre el ácido borónico y el carbonilo permitirá lograr un motivo de reconocimiento que combine la funcionalidad de ambos grupos, una estrategia que se observa para catecolaminas, donde un ácido fenilborónico se ensambla a un aldehído cumarínico.

Justificación

Las razones del planteamiento de la presente tesis doctoral residen en la importancia que ha adquirido el desarrollo de sensores químicos moleculares fluorogénicos y cromogénicos en los últimos años en el campo biológico, de la medicina y de la química de materiales. Estos sistemas pueden ser abordados desde la ciencia básica con el fin de estudiar y entender las interacciones que rigen la asociación entre los receptores y huéspedes, estudiar su estructura y la introducción de indicadores que mejoren la señal recibida. También pueden ser abordados por la vía de la aplicación, donde el desarrollo de sistemas de detección de especies químicas de importancia biológica a través de cambios de color y/o emisión fluorescente es cada día de mayor interés. En virtud de aportar en el conocimiento del modo en que ocurren las interacciones que intervienen en la asociación del ácido borónico, sustituido con la función aldehído, con polioles y poliaminas se plantean los objetivos a continuación:

Objetivos

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el de examinar la posibilidad de reconocimiento molecular de polioles, aminopolioles y aminas a través de la formación de iminas y ésteres boronato en medio acuoso con derivados de los ácidos arilborónicos.

Objetivos específicos

- Caracterizar las propiedades ácido-base de los isómeros del ácido formil fenilborónico y examinar su asociación con azúcares en medio acuoso.
- Realizar el estudio del reconocimiento de amino azúcares, aminoglucósidos, monoaminas y poliaminas con los isómeros del ácido formil fenilborónico en medio acuoso empleando las técnicas espectroscópicas de UV-Vis, RMN ^1H y ^{11}B y cálculos teóricos.
- Examinar por medio de las técnicas de UV-Vis y RMN de ^1H , y de ^{11}B , tomando como modelo la interacción del 2fPBA-kanamicina A, los procesos involucrados en la detección de analitos aminopoliolés.
- Estudiar el comportamiento de la interacción de derivados carbonilo de los ácidos tiofenborónico y furanborónico como análogos de los ácidos formil fenilborónicos en los mismos procesos.

3. Resultados y discusión de la caracterización y pruebas preliminares de ácido fenilborónico (PBA) e isómeros del ácido formil fenilborónico (fPBA) con polioles.

En el presente apartado se detallan los procedimientos y resultados preliminares para la caracterización de los receptores seleccionados, frente a la estructura del ácido fenilborónico. Para lograr un avance progresivo en la comparación de los receptores seleccionados se realizó el estudio con analitos que contienen sólo función poliol. También, se comparan y discuten los resultados que sugieren el sentido de este estudio.

3.1. Caracterización espectroscópica y potenciométrica del PBA y de los isómeros de fPBA

Los isómeros del ácido formil fenilborónico, pese a ser utilizados como piezas de ensamble en la construcción de estructuras supramoleculares, han sido poco estudiados como entidades independientes en la asociación con sistemas diol.¹⁰¹ Como punto de partida se realizó la caracterización y comparación de los isómeros con el ácido fenilborónico utilizando las técnicas de potenciometría y espectrofotometría UV-Vis.

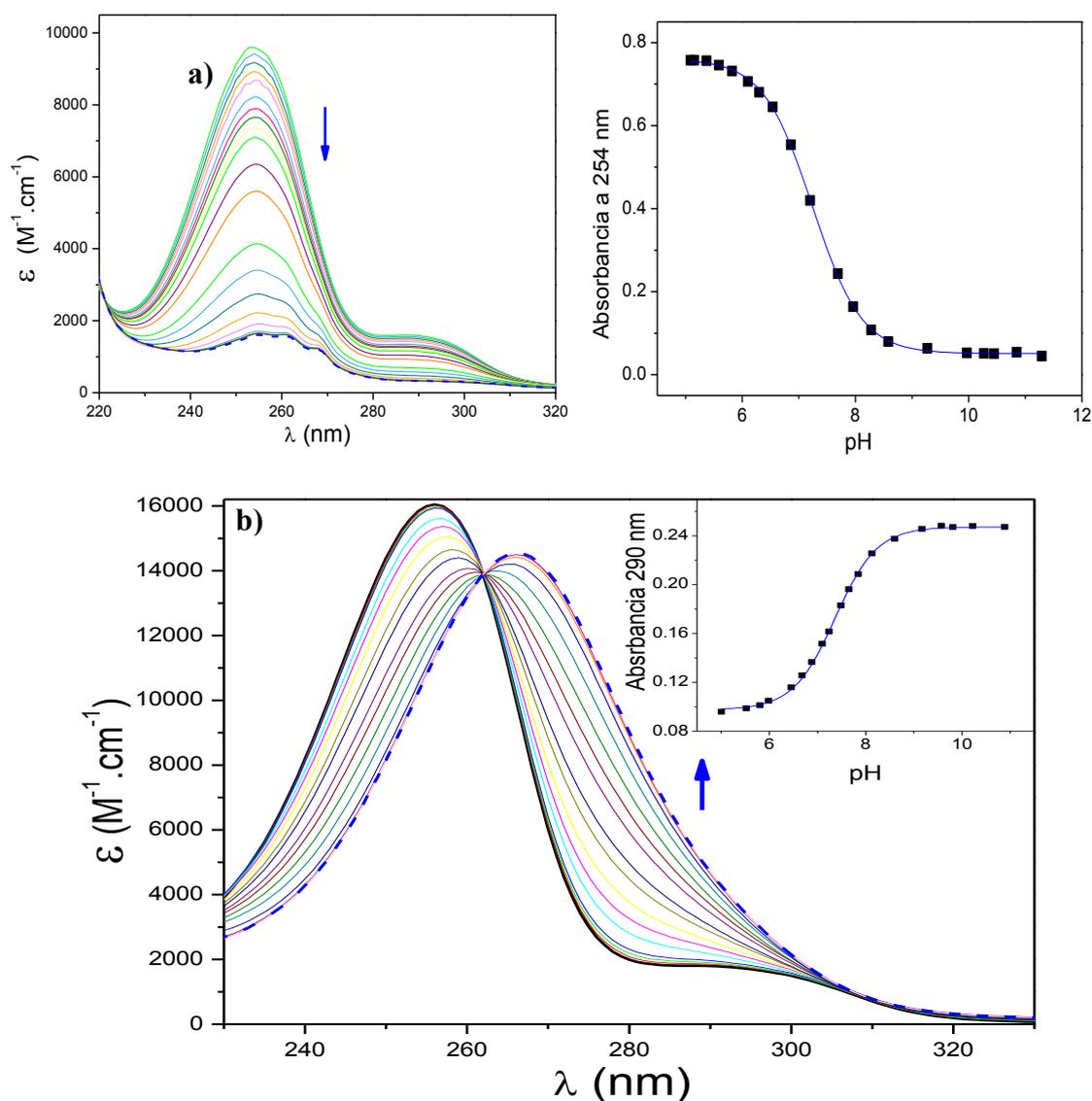
3.1.1. Determinación de pK_a

La formación de un nuevo éster entre un poliol y un ácido borónico es sensible a la estructura química del poliol. La asociación y los cambios en el pK_a son un punto de partida para explicar el comportamiento de la solubilidad.

La primera etapa en la caracterización de los ácidos borónicos isómeros fue determinar su grado de acidez, a partir de los perfiles de pH vs. Absorbancia en soluciones a 25°C con la metodología descrita en la parte experimental. El electrolito de soporte para mantener constante la fuerza iónica en 0.1 M fue NaCl. Para cada ácido se realizaron tres titulaciones por separado y los datos experimentales se analizaron con el programa Microcal Origin® 7.5 para obtener los valores de pK_a .

Los cambios espectrales, así como las gráficas de los perfiles de los isómeros del ácido formil fenilborónico a medida que se incrementa el pH difieren entre los isómeros. Los cambios del

isómero 2fPBA concuerdan con lo reportado para el PBA, la banda de absorción entre 230–270 nm, disminuye a medida que se produce la ionización del grupo $-B(OH)_2$ en el inicio neutro, a un valor de pH igual a 5.2 con geometría trigonal plana hacia el $-B(OH)_3^-$ aniónico y tetraédrico.¹⁴⁶ Los cambios espectrales para los isómeros 3- y 4- producen un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción. Este cambio puede atribuirse a la conjugación del grupo carbonilo con el anillo aromático más rico electrónicamente por la ionización del grupo boronato aunque por motivos distintos en cada isómero. En el isómero *para* el anión boronato contrarresta el δ^+ (atracción de la densidad electrónica) del grupo carbonilo por efectos de resonancia, mientras que en el isómero *meta* la estabilización por resonancia es menos favorable y el desplazamiento de la banda de absorción puede atribuirse a un efecto inductivo.



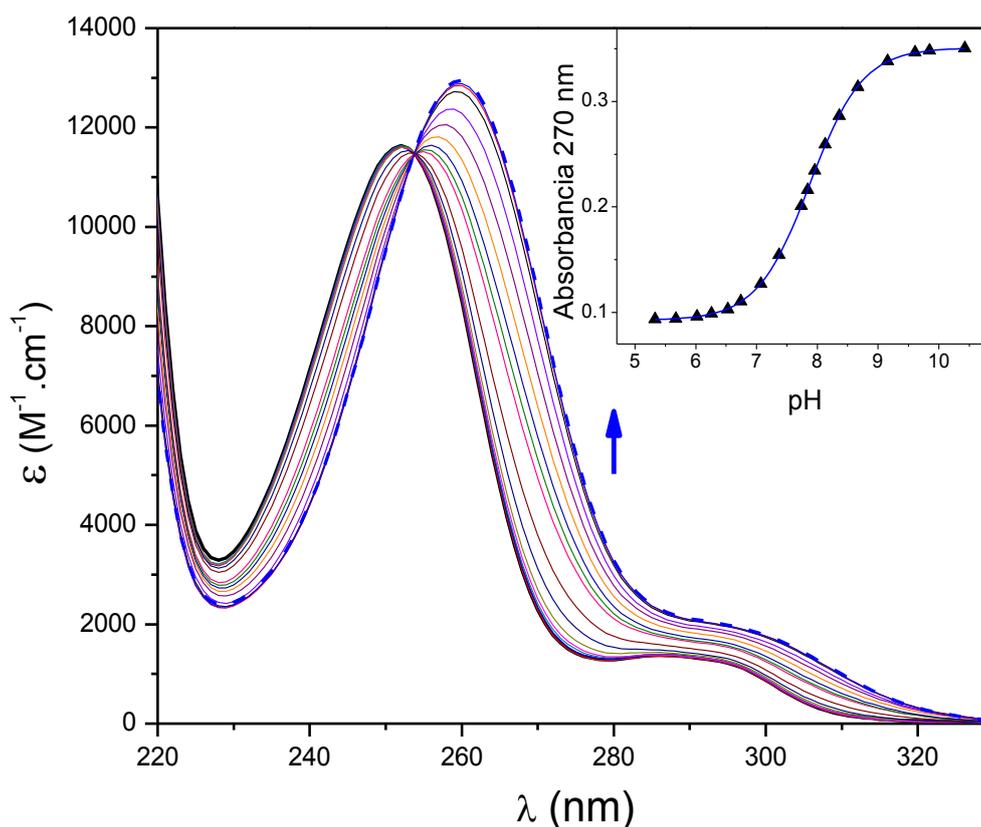


Figura 3.1 Cambios espectroscópicos de los ácidos formil fenilborónicos con el aumento del pH, $I=0.1$ M, 25°C . a) 2fPBA y al lado derecho, el perfil de los cambios espectrales a 254 nm de pH ácido a básico. b) 3fPBA, con el perfil de cambios espectrales a 290 nm inserto; c) 4fPBA, con el perfil de cambios espectrales a 270 nm inserto.

En cuanto a la diferencia en acidez de los isómeros del ácido formil fenilborónico frente al PBA se observa, como es de esperar tras introducir un grupo carbonilo en el anillo aromático, el aumento en su acidez en general. La tendencia en los valores de la acidez es la esperada: pK_a 2fPBA < 4fPBA < 3fPBA. En la tabla 3.1 se encuentran relacionados los valores para cada uno de los isómeros.

Tabla 3.1 Valores de pK_a , $I=0.1$ M, 25°C del PBA y los isómeros del ácido formil-fenilborónico (fPBA).

Ácido borónico	pK_a exp	pK_a Lit.
PBA	–	8.8 ^a
2fPBA	7.30 ± 0.0062	–
3fPBA	7.84 ± 0.0026	7.8 ^b
4fPBA	7.43 ± 0.0108	7.6 ^b

^a Ref. 104 ^b Ref. 107

En el caso del isómero 2fPBA los efectos inductivos y estéricos disminuyen en 1.5 unidades el pK_a frente al valor reportado para el PBA, y la mayor acidez del 4fPBA frente al 3fPBA puede explicarse en términos de la conjugación, ya que, el efecto electroattractor del

carbonilo es más efectivo sobre la posición *para* ($\sigma_p = 0.42$) que en la posición *meta* ($\sigma_m = 0.35$).¹⁴⁷

3.1.2. Caracterización por RMN ^1H

Las mediciones de RMN de ^1H y de ^{11}B se efectuaron para analizar y caracterizar los isómeros del fPBA en condiciones ácidas y básicas. Se prepararon disoluciones en D_2O de cada uno de los isómeros en concentraciones de 5 y 15 mM, de acuerdo a su solubilidad. Posteriormente se ajustó el pH directamente con NaOD. Las señales observadas, al igual que en la espectroscopía UV-Vis, muestran una mayor diferencia del isómero *orto* frente a sus pares, los isómeros *meta* y *para*.

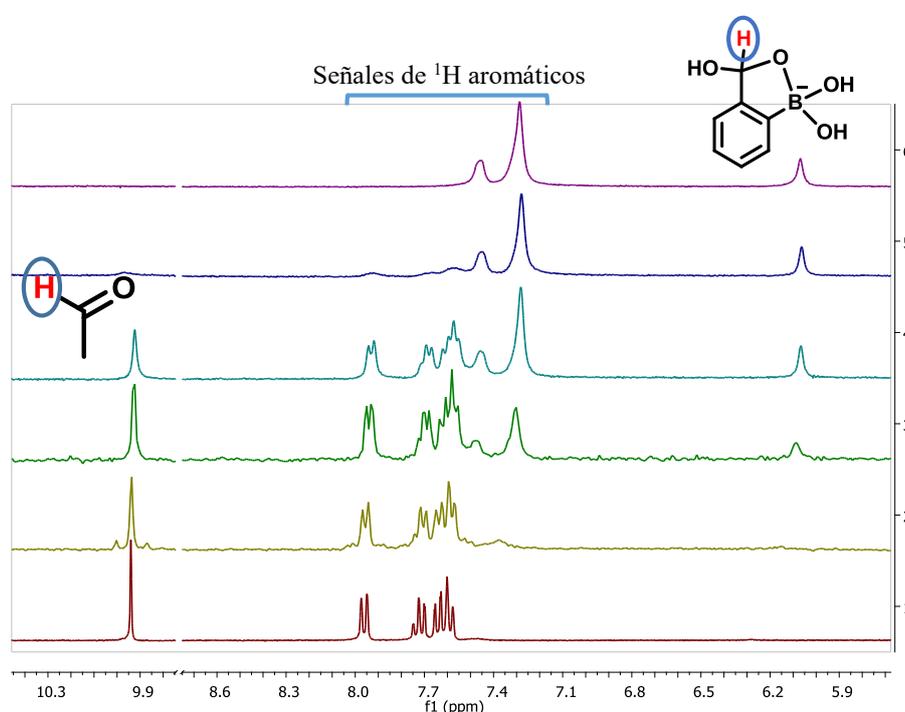


Figura 3.2 Espectro de RMN ^1H de 2fPBA en D_2O a diferentes condiciones de pH ajustado con NaOD o DCl.

Con base en los resultados obtenidos en los espectros de RMN ^1H , se encontró que a diferencia de lo reportado para otros ácidos borónicos en medio acuoso¹⁴⁸, el intercambio entre la forma neutra y aniónica del 2fPBA es un proceso lento en la escala de resonancia lo que causa la aparición de dos conjuntos simultáneos de señales en los espectros en los valores de pH cercanos al $\text{p}K_a$. Con el objeto de tener mayor claridad sobre el proceso de la transformación del 2fPBA de la forma neutra a la aniónica se efectuaron los experimentos presentados en la figura 3.2 en el intervalo de pH de 5.8, que corresponde al pH donde el

ácido se encuentra en forma neutra, hasta pH igual a 9.0 donde el ácido se encuentra totalmente desprotonado.

En el isómero 2fPBA la variación del pH hacia valores alcalinos causa la desaparición de las señales de los protones de la materia prima, como es la señal del aldehído a 9.96 ppm a medida que se observa la aparición una nueva señal ancha a 6.09 ppm, la cual es característica de grupos de aldehídos hidratados $-\text{CH}(\text{OR})_2$. El hecho de que las señales coexistan en los valores cercanos al $\text{p}K_a$ del 2fPBA, confirma el equilibrio lento de las especies en la escala de RMN.

En las señales de la región aromática a pH 5.8 se observa un conjunto de picos distinguibles entre 7.55 y 8.0 ppm; al incrementar el pH a 7.0 y 7.3, el efecto es el ensanchamiento de los picos y la aparición de dos nuevas señales anchas a 7.30 y 7.43 ppm, las cuales a medida que incrementa aún más la basicidad son las únicas señales de la región aromática que permanecen a pH 9.0. Un comportamiento análogo de la sobreposición de dos conjuntos de señales del tipo observado a un pH igual 7.0 y 7.3 ha sido descrito reportado para derivados de 2fPBA sustituidos con halógenos en acetona. Se atribuye a un efecto de los “tautómeros” en equilibrio durante la formación de un ciclo del tipo benzooxaborol, descrito en la sección 2.3 de los antecedentes y que se pudo comprobar con los experimentos de RMN ^{11}B descritos en la siguiente sección¹⁰¹.

En el caso de los isómeros 3- y 4-fPBA los cambios espectrales de RMN ^1H observados en la figura 3.3 se obtuvieron a tres valores de pH: entre 7.0 y 8.6 el incremento en el valor de pH provoca dos efectos distintos a los obtenidos para el 2fPBA. En primer lugar, la señal aldehído en el 3fPBA permanece invariable durante el intervalo mientras que en el 4fPBA hay una diferencia en el desplazamiento químico de 0.06 unidades ($\Delta\delta = 0.06$ ppm). En el último caso la mayor influencia del efecto de resonancia en la posición *para* en relación con la posición *meta* puede causar este cambio en el desplazamiento.¹⁴⁹ En segundo lugar, las señales de la región aromática en ambos isómeros son desplazadas a menores ppm (campo alto).

En el isómero 3fPBA, los protones adyacentes al grupo borónico son los más afectados, ya que estas posiciones están sujetas en mayor grado a los efectos de resonancia e inductivos ante el anillo que está aumentando su densidad electrónica, causando que la señal de los protones se desplace 0.11 y 0.18 ppm hacia menores ppm (campo alto). Por su parte, en el conjunto de señales del 4fPBA, la separación de los dobletes es más definida a medida que

aumenta la basicidad y hay una diferencia en la señal centrada en 7.91 ppm, desplazada a 7.85 ppm.

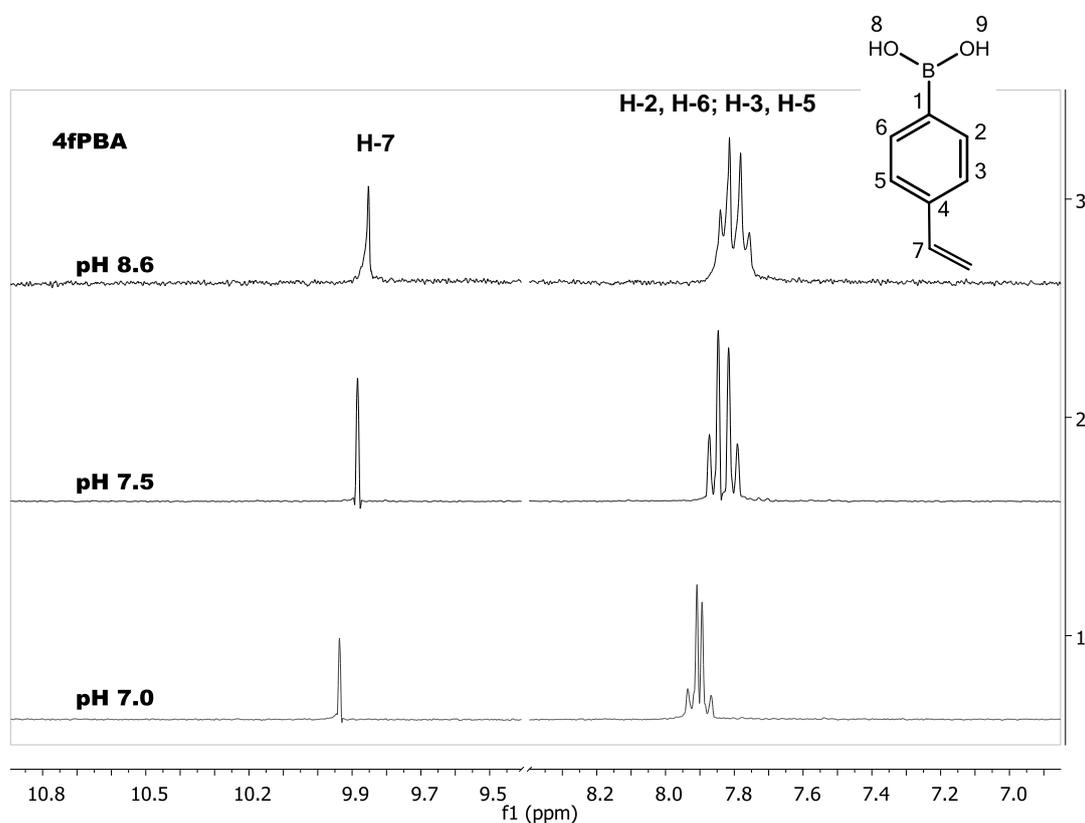
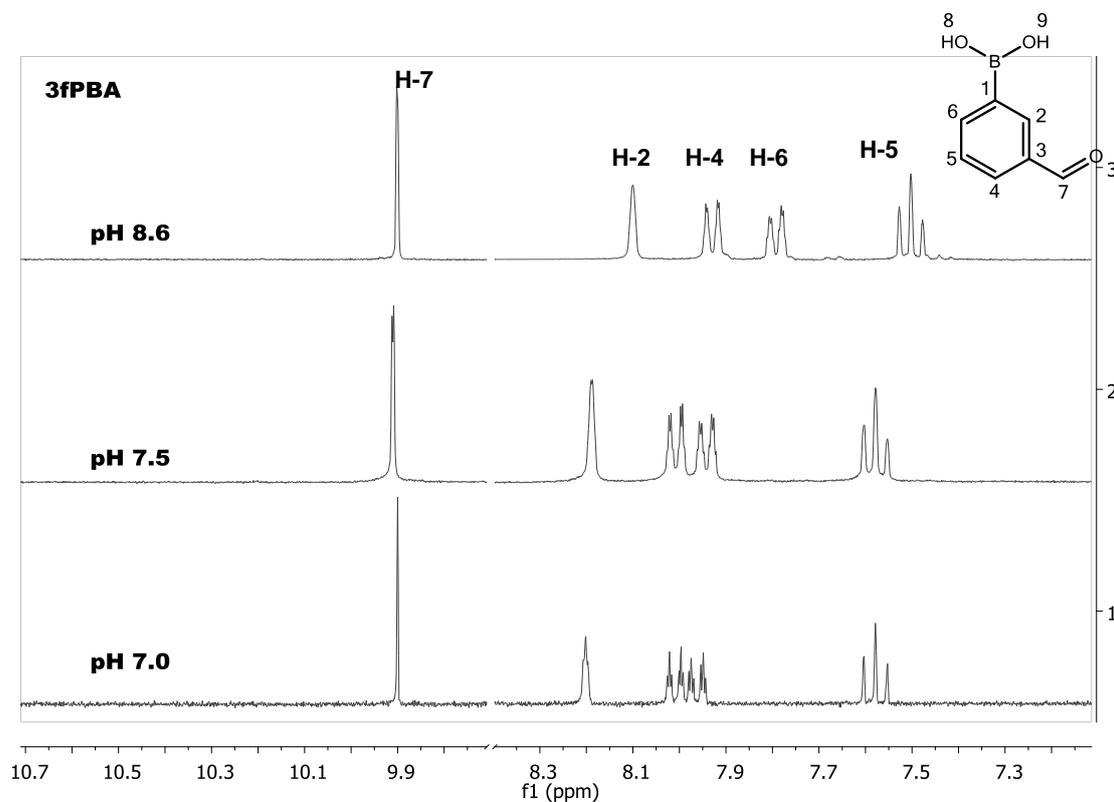


Figura 3.3 Espectros de RMN ^1H de los isómeros 3fPBA y 4fPBA a tres valores de pH diferentes en D_2O y ajustado con NaOD 0.1 M.

Tabla 3.2 Valores de constantes de acoplamiento para las señales de RMN ^1H del 3fPBA y 4fPBA a tres valores de pH.

3fPBA	H-2	H-4	H-5	H-6	H-7
pH 7.0	8.20 (s)	8.01 (d) $J = 7.4 \text{ Hz}$	7.49 (t) $J = 7.5 \text{ Hz}$	7.92 (d) $J = 7.4 \text{ Hz}$	9.90 (s)
pH 7.5	8.18 (s)	8.00 (d) $J = 7.4 \text{ Hz}$	7.57 (t) $J = 7.6 \text{ Hz}$	7.93 (d) $J = 7.8 \text{ Hz}$	9.90 (s)
pH 8.6	8.09 (s)	7.78 (d) $J = 7.7 \text{ Hz}$	7.58 (t) $J = 7.4 \text{ Hz}$	7.96 (d) $J = 7.8 \text{ Hz}$	9.89 (s)
4fPBA	H-2	H-3	H-5	H-6	H-7
pH 7.0	8.20 (s)	8.01 (d) $J = 7.4 \text{ Hz}$	7.49 (t) $J = 7.5 \text{ Hz}$	7.92 (d) $J = 7.4 \text{ Hz}$	9.93 (s)
pH 7.5	8.18 (s)	8.00 (d) $J = 7.4 \text{ Hz}$	7.57 (t) $J = 7.6 \text{ Hz}$	7.93 (d) $J = 7.8 \text{ Hz}$	9.87 (s)
pH 8.6	8.09 (s)	7.78 (d) $J = 7.7 \text{ Hz}$	7.58 (t) $J = 7.4 \text{ Hz}$	7.96 (d) $J = 7.8 \text{ Hz}$	9.85 (s)

Estos resultados evidencian que la desprotonación provoca mayor apantallamiento de los átomos de hidrógeno del anillo y, en general, el desplazamiento químico se observe a campo más alto. Otra diferencia de estos dos isómeros con el 2fPBA es el desplazamiento en conjunto de todas las señales tras la formación de la base conjugada, sin afectar del todo la multiplicidad de las señales esperadas, lo que es otro indicador de que con estos isómeros la ionización es un proceso rápido en la escala de RMN, característica típica en otros ácidos borónicos.¹⁵⁰

3.1.3. Caracterización por RMN ^{11}B

Esta técnica permite obtener información sobre las características electrónicas y el estado de coordinación de la molécula, por lo que es una herramienta ampliamente utilizada en el análisis de ácidos borónicos. De los dos isótopos activos en RMN, ^{10}B y ^{11}B el último es el más abundante en forma natural (80%), y presenta una baja frecuencia de resonancia, un espín igual a $\frac{3}{2}$ y un menor momento cuadrupolar ($Q(^{11}\text{B}) = 40.59 \text{ mb}$). El intervalo que abarca los desplazamientos químicos de las especies tricoordinadas y tetracoordinadas es de aproximadamente 210 ppm.^{29,151} Los ácidos borónicos libres y los compuestos tricoordinados en solución se detectan en el intervalo de 25–35 ppm, y los derivados tetracoordinados se observan alrededor de 0-10 ppm.²⁹

Las mediciones de RMN de ^{11}B se realizaron con el objetivo de elucidar con mayor claridad el equilibrio que ocurría a valores de pH altos con el isómero 2fPBA, ya que los

resultados obtenidos por la técnica de RMN ^1H fueron insuficientes para definir con claridad las especies que se obtenían. Las disoluciones de 2fPBA 18 mM se prepararon en D_2O y se ajustó el pH directamente con NaOD. En la figura 3.4 se observan los desplazamientos químicos para el 2fPBA a diferentes valores de pH tal como se realizó para los experimentos de ^1H .

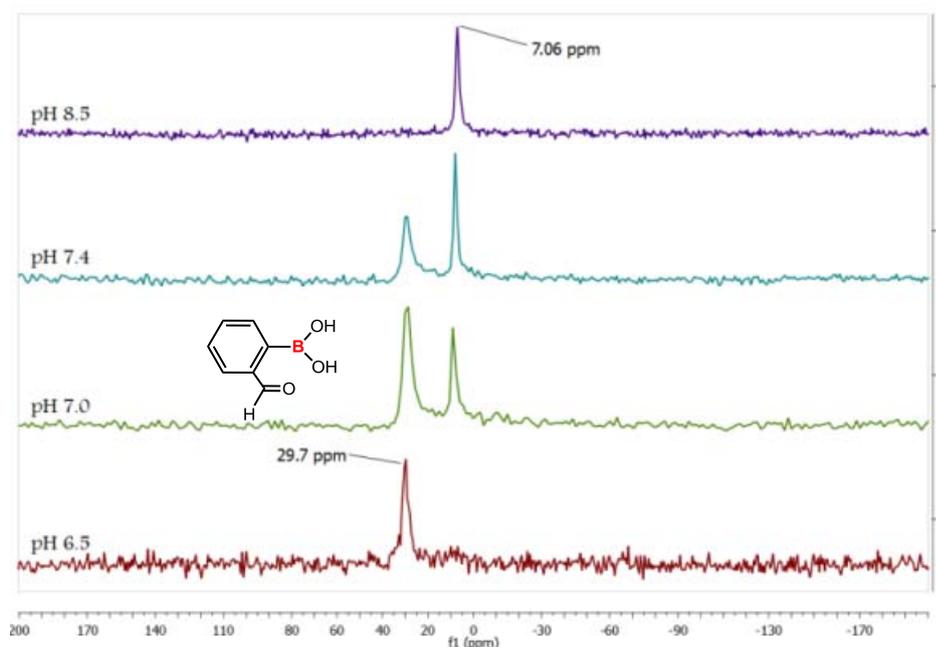
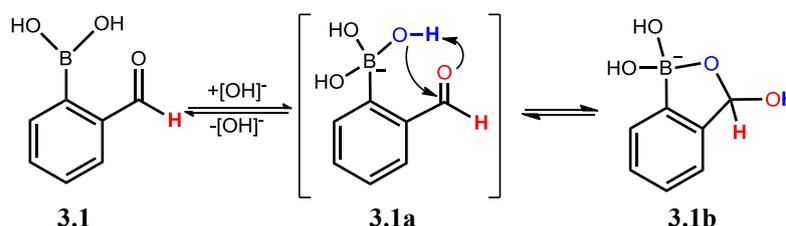


Figura 3.4 Espectros de RMN de ^{11}B de 2fPBA a pH variable en D_2O .

En conformidad a los desplazamientos esperados, tanto para la forma neutra como para la forma aniónica,^{2a,29,151} en el pH inicial de 6.5, se registró el desplazamiento químico de 29.7 ppm, aquí se espera que la especie predominante sea la forma neutra tricoordinada $[-\text{B}(\text{OH})_2]$, y al elevar el valor de pH a 8.5, el desplazamiento observado es de 7.06 ppm, donde se espera la formación del grupo boronato tetracoordinado $[-\text{B}(\text{OH})_3^-]$. En la figura 3.4, también se aprecia que en los valores de pH intermedios se registra la presencia de ambas especies y el incremento en intensidad de la especie identificada como el boronato a medida que disminuye la especie tricoordinada.

Como ya se había mencionado, los ácidos borónicos libres por lo general presentan un equilibrio rápido en la escala de RMN ^{11}B ,¹⁵⁰ y sólo en algunos casos en los que el sustituyente contiene una función N-alquil se ha detectado la presencia de dos señales, correspondientes al equilibrio entre la geometría tetraédrica y trigonal del átomo de boro.^{122,152} Este resultado sobre la geometría del boro durante el equilibrio ácido-base, unido

a los resultados obtenidos por RMN ^1H , permitió plantear la formación de la especie 3.1b del esquema 3.1.



Esquema 3.1 Formación del enlace covalente intramolecular a en medio básico para el 2fpBA.

Teniendo en cuenta que por espectroscopía UV-Vis el valor de $\text{p}K_a$ hallado para el 2fpBA fue de 7.3, era de esperar que ocurriera la formación del ion boronato en el intervalo de pH entre 7.0–7.4. Pero el cambio exclusivo del estado de ionización tras la adición del ion hidroxilo sobre el grupo borónico no afectaría, en principio, los desplazamientos de los protones de la región aromática en el espectro de ^1H de la forma en que se observa. Luego, con el resultado del equilibrio lento en los espectros de ^{11}B , confirma que se forma una estructura más compleja.

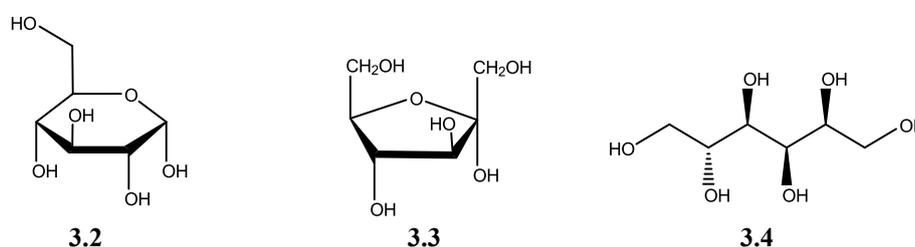
Hasta la realización del presente trabajo no se encontraba descrita la formación de un ciclo del tipo de la estructura **3.1b** que existiera en medio acuoso para el 2fpBA sin sustituyentes. Al interpretar los resultados experimentales se plantean dos posibles explicaciones. Es evidente que el medio básico es quien favorece esta formación. Por analogía a la estabilidad alcanzada, tras la formación de los ésteres boronato con dioles, se puede pensar que el equilibrio se ve desplazado hacia la forma tetraédrica del grupo boronato, y que, en este caso, la presencia del ion hidroxilo de igual forma causa este mismo efecto. La otra posible explicación es ver dicha formación como el resultado de una adición nucleofílica simple del anión hidroxilo al grupo carbonilo, seguido por la coordinación intramolecular del oxoanión al átomo de boro, que da lugar al ciclo benzo-oxaborol. La formación de esta nueva especie le confiere un comportamiento especial al 2fpBA, cuyas características se advierten y destacan frente a los otros dos isómeros en materia de la asociación con los polioles y aminopolioles, lo cual podrá comprobarse durante el avance del presente trabajo.

3.2. Asociación con azúcares

La interacción del PBA con sistemas diol en sacáridos ha sido ampliamente estudiada. Una característica general es que todos los sacáridos con sistemas cis-diol preordenados formen

complejos estables con los ácidos borónicos, y es inherente la capacidad del PBA de asociarse mejor con fructosa en medio acuoso y pH neutro, frente a los demás sacáridos usualmente disponibles, siendo la glucosa uno de los monosacáridos con menor afinidad hacia el PBA.

Los estudios publicados anteriormente relacionan esta tendencia con la abundancia del anómero en medio acuoso y que cuente con la coplanaridad adecuada para que ocurra la asociación con el ácido borónico.^{153,154,155} Esta diferencia en las afinidades es aprovechada con los isómeros del fPBA, ya que los resultados permiten establecer un contraste en la asociación de los isómeros frente al PBA, se evalúa si la presencia del grupo aldehído en el anillo aromático favorece la asociación con los sacáridos y se puede medir su magnitud.

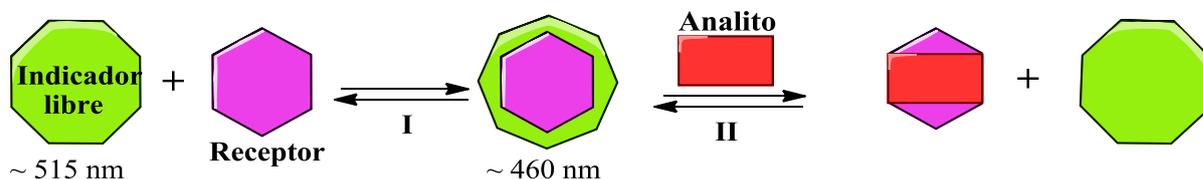


La espectroscopía UV-Vis fue empleada para caracterizar la asociación de los isómeros fPBA con D-(+)-Glucosa (3.2), D-(-)-Fructosa (3.3) y D-Sorbitol (3.4). De acuerdo a lo sugerido en la literatura, se utilizó el método de desplazamiento de indicador con ARS,^{112,114} el cual además permite la detección colorimétrica. Simultáneamente se procedió a monitorizar la asociación sin la presencia de una molécula indicadora, método que se seguirá denominando “directo”, lo que permitió determinar las constantes de asociación entre receptor–analito sin interferencia en el sistema.

3.2.1. Método por desplazamiento de indicador (IDA)

Incorporado por Wang como una herramienta en la determinación cuantitativa de las constantes de asociación de los complejos diol-ácidos borónicos,¹¹² este método ha sido útil para medir varios tipos de carbohidratos, en especial fructosa, en niveles por debajo de 100 μM a través de las técnicas de fluorescencia o absorción UV-Vis; incluso permite hacer un seguimiento colorimétrico de la solución en la formación de los ésteres borónicos.¹¹¹ Por otra parte, Anslyn y colaboradores han descrito el uso de este método con otros indicadores como pirocatecol violeta y fluoresceína en la detección de grupos carboxilato, α -hidroxicarboxilatos y dioles, para lo cual señalan que a la hora de seleccionar el indicador

debe tener grupos funcionales complementarios al receptor y tener un pK_a cercano al pH que se requiere para las mediciones y así asegurar que el indicador sea sensible a los cambios del microambiente¹⁵⁶.



Esquema 3.2 Equilibrios del método de desplazamiento de indicador.¹⁵⁷

El principio por el cual opera el método de IDA, puede tratarse como una reacción de formación de un complejo por competencia con dos equilibrios como se observa en la figura 3.5 con el indicador ARS. En el esquema 3.2 se resumen los equilibrios involucrados en el método IDA. El primer equilibrio, **I** ocurre tras la formación del complejo entre el receptor con el indicador, lo que causa el desplazamiento del máximo de absorción del indicador. El segundo equilibrio ocurre al agregar el analito, en este caso un diol o sacárido, que da lugar a la formación del nuevo complejo que desplaza la unión del receptor con el indicador, regresando así a su forma libre **II**. Los cambios espectrales observados corresponden a la transformación de I en II y es lo que permite calcular de forma indirecta la interacción entre el analito y el receptor para la determinación de las constantes de asociación.

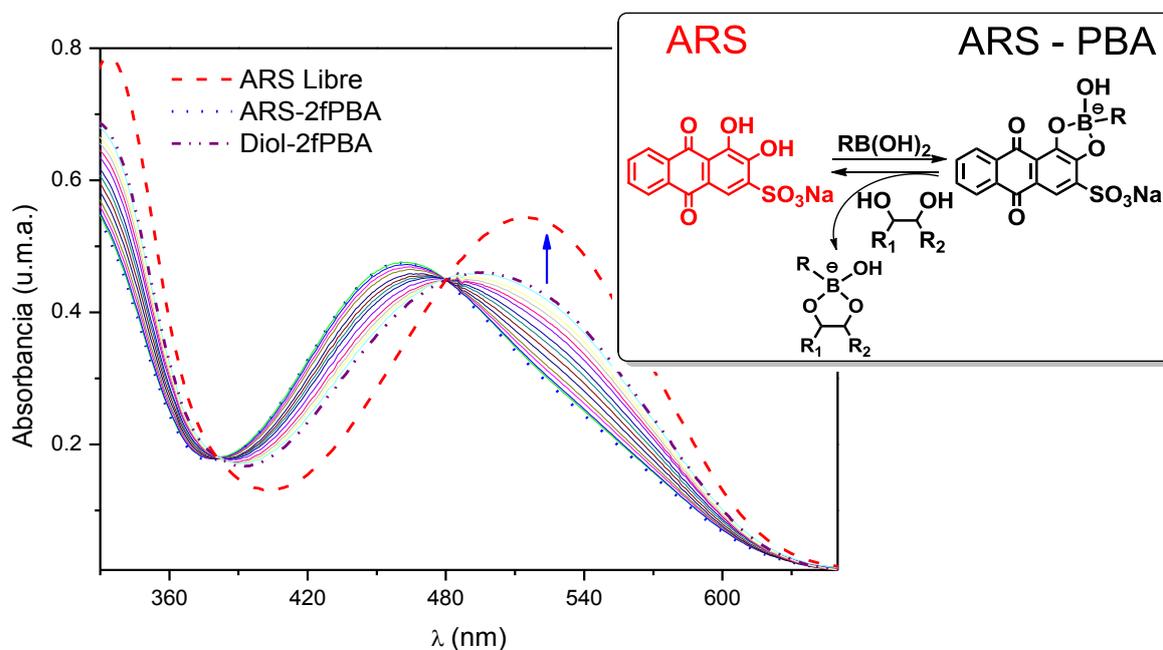
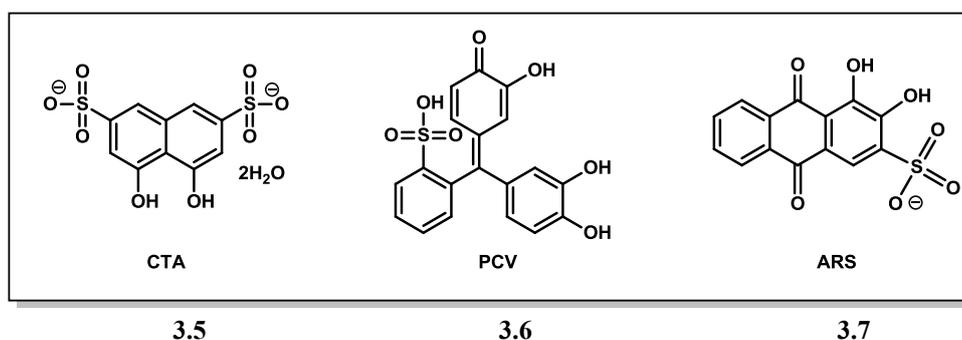


Figura 3.5 Espectros de absorbancia para el equilibrio de la formación del complejo ácido borónico-diolo por competencia con el indicador ARS enmarcado en el esquema.

Esta técnica posee varias ventajas, siendo la más importante de ellas, que el cambio de coloración puede ser detectado a simple vista, lo cual es muy útil con analitos que no contienen cromóforos en su estructura. Así mismo, por su versatilidad en diferentes técnicas ópticas, se ha empleado para medir la concentración de aniones, detección de analitos y en el seguimiento cinético de reacciones.^{114,158,159}

3.2.1.1. Análisis espectroscópico de indicadores

Teniendo en cuenta la característica estructural 1,2- y 1,3- diol de los indicadores violeta de pirocatecol (PCV), ácido cromotrópico (CTA) y ARS, mostrados en el esquema 3.3, fueron seleccionados para evaluar la capacidad de actuar como mensajero en las titulaciones por IDA y su utilidad para hallar las constantes de asociación con los analitos. Así mismo se evaluaron las propiedades fluorescentes para los indicadores CTA y ARS.



Esquema 3.3 Estructuras de indicadores a pH 7.0

El ARS (7) es un indicador derivado de la antraquinona utilizado como reactivo de tinción para la detección de calcio en pruebas biológicas,¹⁶⁰ en la determinación de clotrimazol y ketoconazol,¹⁶¹ y como indicador de pH por su viraje de color amarillo a púrpura en el intervalo de 3.7–5.2. Dada su interacción con los ácidos arilborónicos y la acción como competidor frente a la asociación con carbohidratos u otros reactivos con sistemas 1,2- o 1,3-diol, se ha potenciado su uso en los últimos años en métodos para determinar la asociación con ciertos analitos, que cumplan con las características mencionadas, a través de los cambios espectroscópicos al asociarse o disociarse del ácido arilborónico.

El PCV es un indicador colorimétrico con un catecol y un ácido bencensulfónico unido a un anillo α -hidroxicetona, comúnmente usado en la determinación de estaño y bismuto y cuyo color depende del estado de protonación¹⁵⁶. En otros ensayos por IDA, se ha usado para el cálculo de las constantes de asociación de un receptor diborónico con carboxilatos, α -

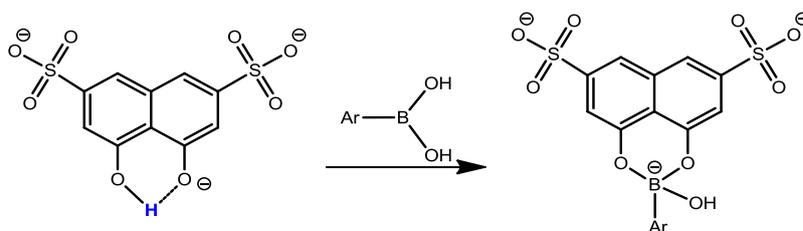
hidroxicarboxilatos y dioles, así como en un método colorimétrico para el análisis rápido de azúcares aniónicos y glucosa.^{162,163}

El CTA es un ácido dihidroxi-naftalen-disulfónico, ampliamente conocido como el reactivo por excelencia para el análisis espectrofotométrico cuantitativo de formaldehído,¹⁶⁴ utilizado también para estimar trazas de nitrato en suelos y agua,¹⁶⁵ en la fabricación de colorantes y como intermediario de derivados azoicos usados como reactivos analíticos.¹⁶⁶ Su propiedad fluorogénica lo convierte en un candidato idóneo para aplicaciones en técnicas de UV-Vis y fluorescencia.

Previo a los experimentos de desplazamiento de indicador se efectuaron las titulaciones con los indicadores para calcular sus constantes de asociación con 2fPBA a tres valores de pH diferentes: 6.5, 7.0 y 7.6.

Ácido Cromotrópico (CTA)

Las bandas de absorción del espectro electrónico del CTA en la región de 330 a 370 nm se atribuyen a las transiciones $\pi-\pi^*$ con los complejos por transferencia de protón formados entre los grupos $-\text{OH}$. Al añadir el 2fPBA se espera que la interacción ocurra en el sistema 1,3 diol, interrumpiendo la transferencia de protón y como consecuencia la disminución en la absorción.



Esquema 3.4 CTA acuoso en presencia de 2fPBA.

El indicador presenta dos máximos de absorción a 347 y 360 nm, los espectros electrónicos mostraron tres puntos isobéuticos a 339, 349 y 353 nm, tras el incremento gradual de la concentración de 2fPBA, excepto a pH 7.6 donde sólo se observan los de 339 y 353 nm observándose con un desplazamiento de los máximos a 335 y 352 nm y disminución en la absorción. En el esquema 3.4 se muestra el probable estado inicial monodesprotonado donde existe el puente de hidrógeno intramolecular y el posible producto resultante de la reacción con el ácido arilborónico. Los valores de pK_a reportados para el CTA son = 5.36, 15.6.¹⁶⁷

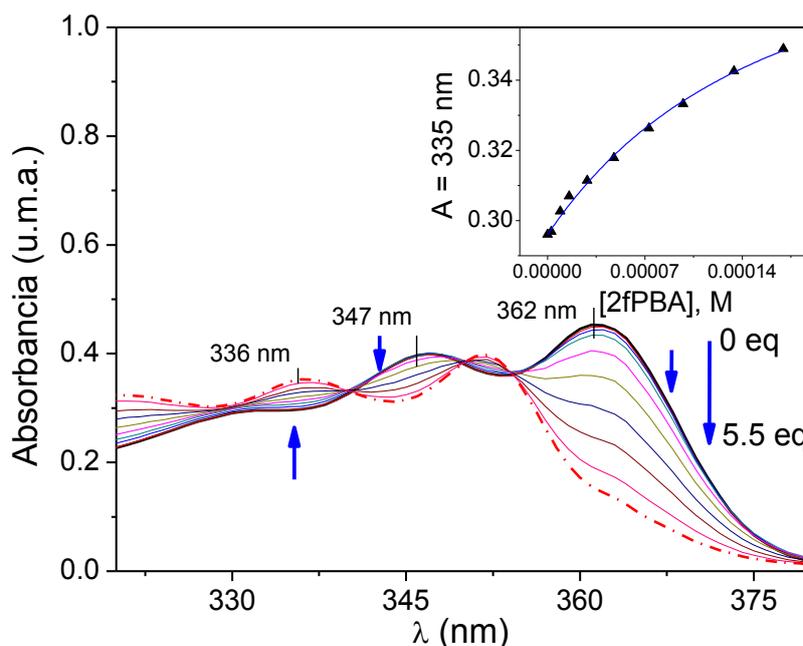
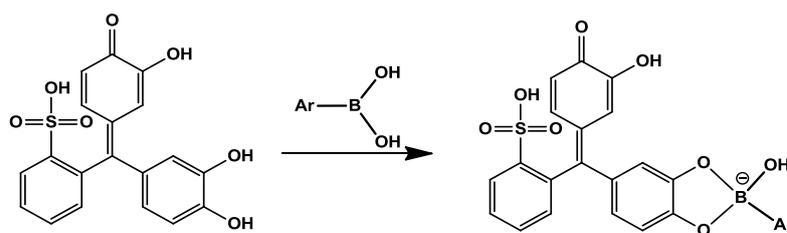


Figura 3.6 Cambios espectroscópicos de la titulación de CTA con 2fPBA a pH = 7.0, en solución amortiguadora MOPS 0.05 M, 25°C.

En la gráfica inserta se muestra la variación en la absorción a una longitud de onda en presencia de 0 a 5.5 equivalentes de 2fPBA. El espectro final del complejo formado entre el ácido arilborónico con el diol corresponde a la línea roja (— · — · —), notándose los efectos hipso e hipocrómico en el espectro de absorción del CTA. Con dicho indicador el análisis requiere de un estudio más profundo; aunque presenta cualidades favorables como fluorógeno, los equilibrios observados a las diferentes longitudes de onda evidencian que puede existir más de un proceso involucrado durante la formación del complejo, algo que se pudo comprobar al no lograr un ajuste óptimo a la interacción por IDA en longitudes de onda superiores de 350 nm, dificultando su uso para las necesidades del presente trabajo.

Pirocatecol Violeta (PCV)

En el espectro electrónico del PCV se observan dos máximos de absorción relacionados con su equilibrio ácido-base¹⁶³ a 444 y 595 nm a pH 7.5 y 7.6. En las disoluciones a pH 6.5 y 7.0 sólo sobresale el primer máximo de absorción. Los valores de pK_a para el PCV establecidos son: 1.0, 7.82, 9.76, 11.7¹⁶⁸. Aunque no hay asignación de acidez especificada, puede esperarse que el protón más ácido corresponda al ácido sulfónico, seguido del -OH del anillo de hidroquinona y los dos restantes a la función catecol.



Esquema 3.5 PCV en presencia de 2fPBA

Las mediciones se realizaron a cuatro valores de pH diferentes: 6.5, 7.0, 7.5 y 7.6. Se presentaron dos puntos isobésticos en los pH =6.5 (366 y 495 nm) y 7.0 (340 y 475 nm) y tres puntos isobésticos en el valor de pH =7.5 (372, 472 y 555 nm) y pH =7.6 (385, 459 y 563 nm), el cual es presentado en la figura 3.7.

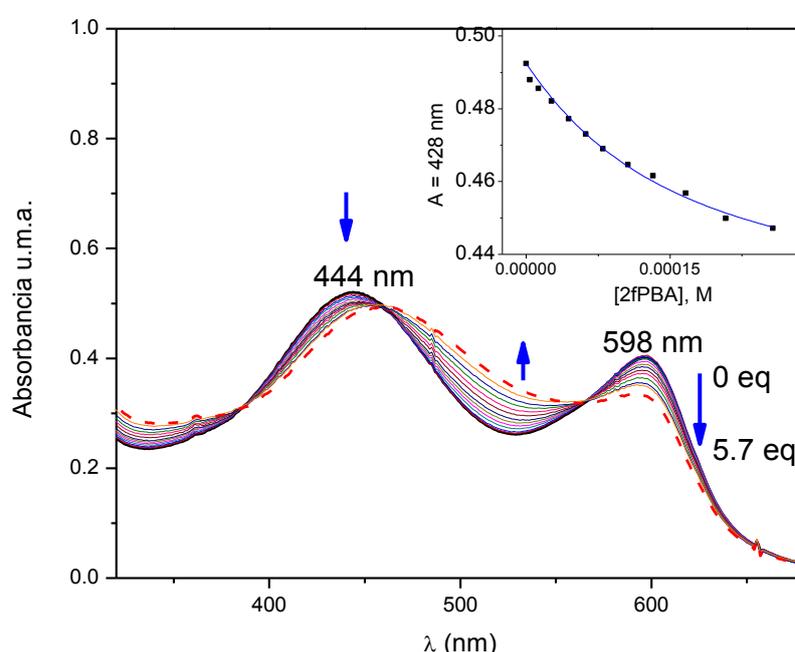


Figura 3.7 Cambios espectroscópicos de la titulación de PCV con 2fPBA a pH =7.6, en solución amortiguadora MOPS 0.05 M, 25°C.

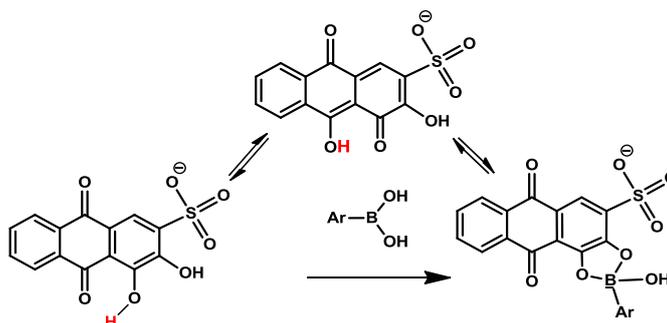
Con este indicador, la interacción esperada, de acuerdo a los antecedentes de asociación de los ácidos borónicos con 1,2 dioles, debe ocurrir a través del diol del anillo catecol, variando así las transiciones $\pi-\pi^*$ del sistema conjugado tal como se presenta en el esquema 3.5.

La figura 3.7 muestra los cambios espectrales para el indicador al valor de pH de 7.6, donde se observó el desplazamiento del $\lambda_{\text{máx}}$ de 444 a 459 nm y de 598 a 593 nm a medida que se incrementan los equivalentes de 2fPBA. Los espectros electrónicos registrados para los demás valores de pH están consignados en el Apéndice 1, figuras A.2 a A.4. Se observa que a 0.8 y 1.3 unidades de pH por debajo de su pK_a la especie está protonada y la introducción del grupo cromóforo afecta poco el espectro electrónico.

Alizarina roja sulfonato (ARS)

El ARS ha sido el indicador más utilizado por diferentes grupos en el método de desplazamiento de indicador para el cálculo de las constantes de asociación de varios tipos de receptores derivados de arilboronatos. Su estructura se compone del ácido antraquinona sulfónico con la función dihidroxi en el mismo anillo sustituido por el ácido. Ha sido el fluoróforo elegido por su razonable solubilidad en agua, el cambio colorimétrico y aumento en la señal de fluorescencia al estar en presencia de ácidos arilborónicos, lo que permite realizar las mediciones en medios acuosos con buena respuesta óptica.¹⁵¹

En el espectro de absorción comprendido en el intervalo de 300 a 620 nm se observan dos máximos de absorción a 334 y 514 nm, atribuidos a las transiciones $\pi-\pi^*$ y $n-\pi^*$ del sistema conjugado y los grupos cromóforos. La efectiva autoasociación entre ARS-PBA se ha empleado en el desarrollo de sensores fluorescentes para la detección selectiva de iones metálicos,¹¹⁴ así como la asociación con gran variedad de grupos dioles como los ya mencionados en la sección 1.2.



Esquema 3.6 Equilibrio de ARS acuoso en presencia de 2fPBA

El gran cambio en la absorbancia no ha sido elucidado por completo, aunque en estudios realizados dentro del grupo recientemente, demuestran que hay una diferencia en el valor de pK_a determinado por métodos espectroscópicos y fluorogénicos de 1.5 unidades, lo que conduce a pensar que el fluoróforo del estado excitado es más ácido que el fluoróforo en su estado basal.¹⁶⁹ Otras opiniones lo asocian con la posible transferencia de protón en el estado excitado del hidroxilo próximo al carbonilo y la formación del complejo con el ácido arilborónico interrumpe esta transferencia.¹⁷⁰ En el espectro se observa un efecto hipsocrómico de 34 y 57 nm a pH 7.4 ver figura A.7 de apéndice 1.y 7.0 en la Figura 3.8, respectivamente en la banda de $\lambda_{m\acute{a}x}$.

El ARS en su estado libre no es fluorescente, pero la formación del éster boronato con el grupo catecol detiene la transferencia de protón y se obtiene un complejo que sí lo es. Este es el fenómeno utilizado en el método de desplazamiento de indicador con ARS, ya que a medida que el diol lo desplaza, ocurre el apagamiento de fluorescencia.

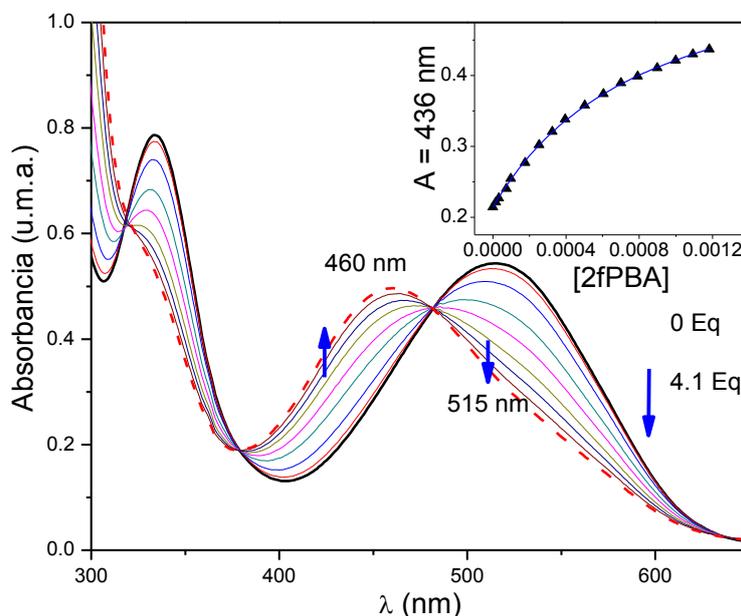
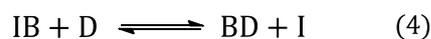


Figura 3.8 Cambios espectrales de la titulación de ARS con 2fPBA a pH=7.0, MOPS 0.05 M, 25°C.

3.2.1.2. Determinación de las constantes de asociación por IDA

La detección de sacáridos de forma rápida y confiable ha catapultado el uso del IDA, en particular, para el método que se compone del ácido borónico (B), el indicador (I) que permite detectar el cambio espectral y el diol (D) a estudiar. El primer equilibrio del esquema insertado en la figura 3.5 es la asociación entre el ácido borónico y el indicador, que son los cambios espectroscópicos observados para los tres indicadores en las secciones anteriores. El siguiente equilibrio corresponde a la introducción del diol, el cual desplaza al indicador para dar lugar a la formación del éster boronato. La perturbación del primer equilibrio es lo que permite determinar de forma indirecta las constantes de asociación entre el ácido borónico y el diol. La expresión (2) representa el equilibrio total de la reacción de competencia entre el diol-indicador para la formación del éster sacárido-ácido borónico.

Para analizar los resultados con los tres indicadores seleccionados se hace el ajuste de los datos con un algoritmo correspondiente al tipo de asociación 1:1,¹⁵⁶ tal interacción se define mediante la expresión (3).



Con el CTA la respuesta fluorogénica es muy buena; sin embargo, al tratar de ajustar los resultados a la ecuación de interacción no fue posible obtener resultados que fueran reproducibles, lo que indica que los equilibrios presentes son más complicados que una interacción 1:1, y para el método de IDA donde se procede a través de una reacción por competencia de ambos analitos, la existencia de equilibrios con estequiometrías adicionales hace que este indicador no sea apto para los experimentos que se requiere.

En el caso del PCV, para los espectros obtenidos en los valores de pH de 6.5 y 7.0, la interacción observada con el 2fPBA es muy débil, lo cual impidió calcular la constante de asociación del indicador con el analito y sólo fue posible la detección a un valor de pH de 7.6, el uso del indicador PCV sólo ha sido reportado a $\text{pH} = 7.0$.^{156,163,171}. Uno de los objetivos de caracterizar la asociación de los isómeros del fPBA, implica realizar perfiles de asociación en un intervalo de pH amplio, de tal forma que, el tener una variación tan pronunciada en el espectro electrónico del indicador dificulta el análisis. Al utilizar el PCV a valores de pH por debajo de 7.4 causó que la sensibilidad disminuyera, lo cual se debe a que su efectividad depende del equilibrio ácido-base.

El ARS ha sido el indicador utilizado por excelencia en el IDA para la determinación de las constantes de asociación de ácidos borónicos con una gran variedad de dioles. Las cualidades que se destacan aquí son: la poca variación espectral del ARS libre en los valores de pH neutro y fisiológico (pH 7.4) y la alta sensibilidad que le confiere al método por su gran cambio espectral tras la formación del éster con pocos miliequivalentes de ácido borónico.

En los cambios espectrales del ARS en la figura 3.8 los máximos de absorción se observan a 333 y 515 nm. Al incrementar la concentración de 2fPBA, los cambios en el espectro de UV-Vis provocan tres puntos isobéuticos a 320, 380 y 482 nm y el desplazamiento del máximo de absorción a menores longitudes de onda. La gráfica inserta muestra la variación en la absorción a una longitud de onda en presencia de 0 a 4.1 equivalentes de 2fPBA.

Tabla 3.3 Interacción entre ARS y 2fPBA comparado con los valores reportados para PBA. Solución amortiguadora de fosfato.

	<i>log K (sd)</i>	
	pH 7.0	pH 7.4
2fPBA	3.13 (0.02)	2.73 (0.20)
PBA	3.176 ^a	3.114 ^a

^aRef. 104,112

La constante de asociación para la interacción entre el 2fPBA y el ARS hallada fue menor que la calculada para el PBA a pH = 7.0. A simple vista tal diferencia podría atribuirse a los efectos estéricos entre el grupo carbonilo y el grupo sulfonato, cuyas repulsiones llegaran a interferir con la formación del éster. Sin embargo, será demostrado más adelante que tal disminución no es de tipo estérico, sino que está relacionada con los valores de pK_a del ácido borónico en cuestión y el ARS o el diol con el que se asocia en forma general. Por ahora basta decir que se ha encontrado que la mayor afinidad se logra en condiciones de pH que corresponden al promedio de los pK_a del ácido borónico y el diol, ver ecuación 3 de sección 2.4.1

El pH óptimo para la asociación ARS–PBA, por ejemplo, es (pK_a ARS=5.5, pK_a PBA=8.8) $pH_{\text{óptimo}} = 7.15$ y en el caso del 2fPBA ($pK_a = 7.3$) $pH_{\text{óptimo}} = 6.4$, de tal forma que, la constante de asociación medida a pH 7.0 será mayor para el complejo más favorecido, en este caso el PBA–ARS que es el más cercano al valor predicho como pH óptimo.

Competencia entre ARS y dioles

Después de seleccionar por sus ventajas al ARS entre los otros indicadores, se continuaron los experimentos espectroscópicos por UV-Vis con glucosa, fructosa y sorbitol. Las soluciones fueron preparadas en solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, se mantuvieron constantes las concentraciones de ácido borónico (1.0×10^{-3} M) y ARS (1.0×10^{-4} M), la variación en la concentración de fructosa y sorbitol se hizo dentro del intervalo de 1 a 15 mM, mientras que para glucosa el intervalo fue entre 10 a 300 mM. El espectro inicial corresponde al esperado para la asociación ARS-ácido borónico y a medida que se incrementa la concentración del diol aumenta el máximo de absorción a mayor longitud de onda.

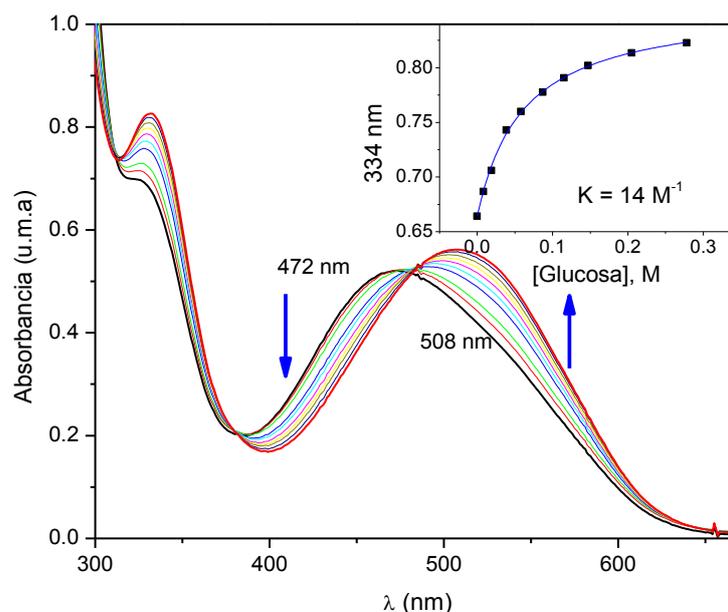


Figura 3.9 Cambios espectrales típicos y perfil de interacción por IDA de Glucosa en [2fPBA y ARS]

Los cambios espectrales de la figura 3.9 corresponden a una titulación con glucosa cuyos resultados espectrales son típicos para una titulación por IDA con ARS. El aumento del máximo de absorción alrededor de 510 nm, a medida que aumenta la concentración del diol, es prueba de la liberación del indicador ARS gracias a la cualidad reversible del éster formado entre el ARS-ácido borónico, permitiendo que la molécula de diol desplace al indicador en el complejo. Durante la titulación también era posible comprobar un cambio del color de la solución contenida en la celda de amarillo a púrpura, aunque de forma muy tenue debido a la baja concentración de indicador.

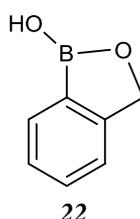
Conservando las condiciones mencionadas se realizaron las titulaciones en los valores de pH = 7.0 y 7.4 con tres analitos. Para la determinación de las constantes de asociación de los dioles se hace uso de las ecuaciones 2, 3 y 4 junto con el balance de masa. Las gráficas de los espectros y la deducción de la ecuación para el cálculo de las constantes pueden consultarse en los Apéndices 2 y 3, respectivamente. En la tabla 3.5 se incluyen los resultados de la asociación con CTA y PCV a los valores de pH donde se presentó menor error en las constantes calculadas. La gráfica inserta en la figura 3.10 corresponde al perfil de interacción a una de las longitudes de onda seleccionadas. En el caso de la glucosa, la baja afinidad intrínseca con los ácidos borónicos exige concentraciones más elevadas para lograr la saturación, es decir, cuando ya no es posible desplazar más ARS del complejo con el ácido borónico. En la tabla 3.5 se encuentran los valores de las constantes de asociación calculadas para el PBA y 2fPBA en los dos valores de pH estudiados por el método de IDA.

Tabla 3.4 Valores de constantes de asociación K_{obs} calculadas por IDA, solución amortiguadora de fosfato 0.1 M. Valores promediados de experimentos por duplicado y calculados a varias λ . Los valores están expresados como log K y entre paréntesis se reporta el error relativo a cada medición, (n.r.) señala valores tomados de la literatura que no cuentan con el dato de error.

	$\log K_{obs}, M^{-1}$			
	pH 7.0		pH 7.4	
	2fPBA	PBA	2fPBA	PBA
CTA	3.68 (0.08)	-	-	-
PCV	-	-	3.55 (0.11) ^a	-
ARS	3.12 (0.02)	3.18 (0.02) 3.18 (n.r.) ^b	2.74 (0.16)	3.15 (0.01) ^c 3.11 (n.r.) ^b
Glucosa	0.78 (0.06)	0.30 (n.r.) ^b	1.15 (0.02)	0.066 (n.r.) ^b
Fructosa	1.93 (0.024)	1.96 (n.r.) ^b	2.26 (0.01)	2.20 (n.r.) ^b
Sorbitol	2.16 (0.04)	2.20 (n.r.) ^b	2.46 (0.04)	2.57 (n.r.) ^b

^apH 7.6 ^bRef. 104 ^cpH 8.0.

Los resultados de la asociación del 2fPBA con los dioles fueron comparados con aquellos reportados para el PBA. En ambos valores de pH los resultados de las constantes de asociación para los dos ácidos borónicos son cercanos, aunque se debe destacar que en el caso de la glucosa a pH igual a 7.4, el valor obtenido es un orden de magnitud mayor que el reportado para el PBA. Cabe recordar aquí que la especie principal del 2fPBA (**2**) al encontrarse en valores de pH superiores a su valor de pK_a , se asemeja al receptor benzoxaborol (**22**), cuya constante reportada para la asociación con glucosa es de $17 M^{-1}$ por RMN 1H y $31 M^{-1}$ por IDA con ARS a un pH igual a 7.4. El benzoxaborol tiene una mayor capacidad de asociación hacia monosacáridos reductores frente a varios ácidos borónicos, el valor observado entre 2fPBA-glucosa se puede relacionar a la semejanza estructural del 2fPBA ionizado y **22**.⁹⁸



Con lo expuesto se resalta la utilidad de los métodos por desplazamiento de indicador, como una herramienta útil a valores de pH determinados y específicos. Dado que la presente investigación está dirigida a realizar mediciones con variaciones en la acidez, el método de titulación denominada directa que será descrito a continuación, presenta la ventaja que, al incluir menos especies en el equilibrio, por lo que se minimiza el error en las determinaciones. Como podrá apreciarse, la absorbancia de las especies en la región UV es

suficientemente buena para detectar y calcular las constantes de asociación en forma satisfactoria.

3.2.2. Método Directo

Al indagar en la literatura sobre la tendencia y versatilidad de los ácidos borónicos y arilborónicos, así como las variadas investigaciones sobre su excepcional interacción con los cis-dioles, los resultados coinciden en la dependencia del medio, del pK_a del ácido borónico, del pK_a del diol, así como en la confiabilidad de la técnica empleada al momento de calcular dicha interacción. Varios de estos estudios han logrado elucidar los factores que realmente afectan los equilibrios involucrados; sin embargo, son escasos los dedicados al estudio en medios exclusivamente acuosos.³²

3.2.2.1. Caracterización por espectroscopía UV-Vis

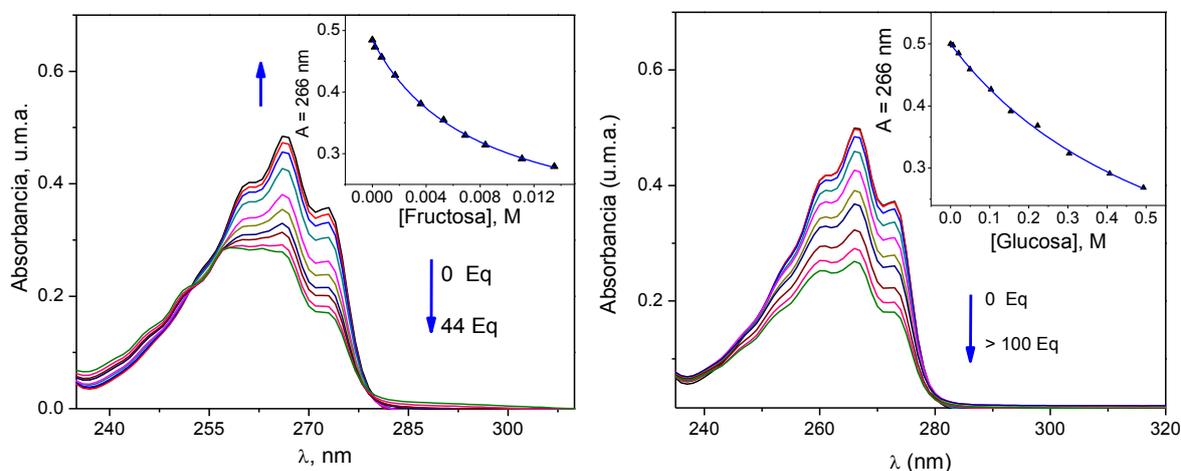
Uno de los principales intereses del presente trabajo es el estudio en medio acuoso de las cualidades de receptores que contengan el grupo $-B(OH)_2$, comprender el efecto de una modificación estructural en principio sencilla como es la introducción del grupo carbonilo en la estructura del ya muy estudiado PBA, y su interacción con polioles y moléculas de interés biológico en condiciones acuosas. Lo anterior fue analizado en los valores de pH de 7.0 y 7.4 principalmente, con soluciones amortiguadoras de fosfato, MOPS y MES, los cuales serán analizados en mayor detalle en la sección 4.1.1.1.

Las titulaciones con los glucósidos se efectuaron permitiendo que el sistema llegara al equilibrio, según cada caso, tal como se describe en la Parte Experimental y, para todos los casos, los perfiles de interacción reflejaron una asociación de tipo 1:1. El incremento de la concentración de los glucósidos en contacto con los ácidos borónicos provocó cambios espectrales similares a los obtenidos con el aumento de pH, aunque menos pronunciados, consecuencia de la formación del grupo boronato.

Hay una apreciable similitud del comportamiento espectral del PBA y el 2fPBA a medida que se aumenta la concentración de glucósidos. En la figura 3.10 se aprecia cómo disminuye la banda de absorción del PBA entre 254 – 275 nm, a medida que aumentan los equivalentes de glucosa y fructosa en las titulaciones realizadas a pH 7.0.

Por su parte, en la figura 3.11a y 11b, el 2fPBA también exhibe la disminución del máximo de absorción a 253 nm. En la detección de glucosa fue necesario emplear elevadas

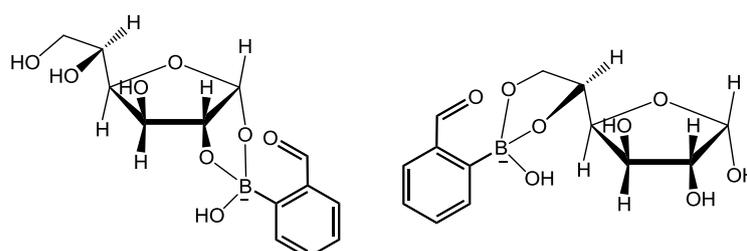
cantidades de analito y sólo a partir de 100 mM se verificó la interacción con el PBA y los isómeros fPBA, lo que significa diez veces más que la concentración necesaria para fructosa y sorbitol.



Glucosa 1.5M

Figura 3.10 Cambios espectrales e interacción de PBA 0.1 mM con fructosa (izq) y glucosa (der). Las gráficas insertadas corresponden a los perfiles de titulación a 266 nm, ajustado a un modelo de asociación 1:1. Buffer fosfato 0.1 M, pH 7.0.

En medio acuoso, la tendencia de los ácidos arilborónicos es la de formar el éster con la glucosa en su forma furanosa. De acuerdo a las investigaciones realizadas por los grupos de Eggert y James, la asociación más probable será a través de los hidroxilos 1,2 y 5,6 como se observa en el esquema 3.7.^{2a,153} Cabe recordar, como se mostró en la sección 2.4.1 que esta característica es la que favorece principalmente que en medios acuosos neutros y temperatura ambiente, la asociación observada hacia la fructosa sea más favorable.



Esquema 3.7 Posibles modos de unión entre el 2fPBA y glucosa

La disminución de la banda con máximo a 266 nm del 2fPBA, así como la formación de un punto isobéptico entre 254–262 nm para los isómeros 3 y 4fPBA son evidencia de la nueva especie obtenida.

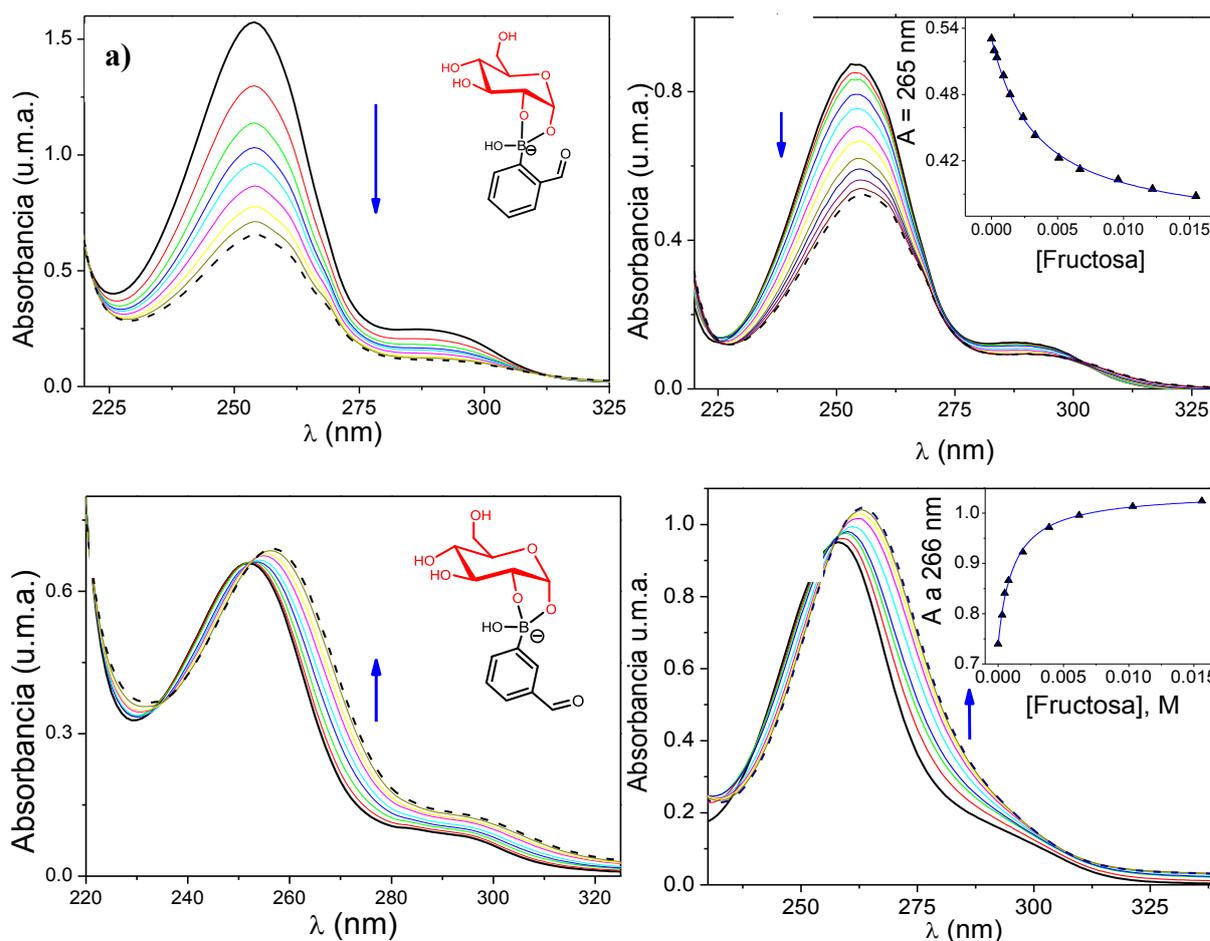


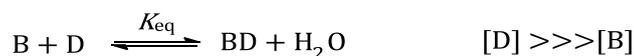
Figura 3.11 Cambios espectrales de a) 2fPBA 0.3 mM en función del aumento de concentración de glucosa, pH 7.0 b) 2fPBA 0.1 mM en función del aumento de concentración de fructosa, pH 7.0. c) 3fPBA 0.07 mM en función del aumento de concentración de glucosa, pH 7.0. d) 4fPBA 0.06 mM en función del aumento de concentración de fructosa, pH 7.4. Buffer fosfato 0.1 M.

3.2.2.2. Determinación de las constantes de asociación por el método directo

La disposición espacial de los hidroxilos, como se ha mencionado, influye de manera importante en el valor de la constante. Mientras que, en el caso de la fructosa el enlazamiento con ácidos borónicos puede ocurrir de forma bi o tridentada en una interacción de tipo 1:1, el mejor resultado para glucosa ha sido con receptores diborónicos, que le permitan asociarse en su forma α -D-glucofuranosa por medio de uniones 1,2 y 4,6, como es el caso del receptor diborónico reportado por Shinkai y colaboradores.¹¹⁷

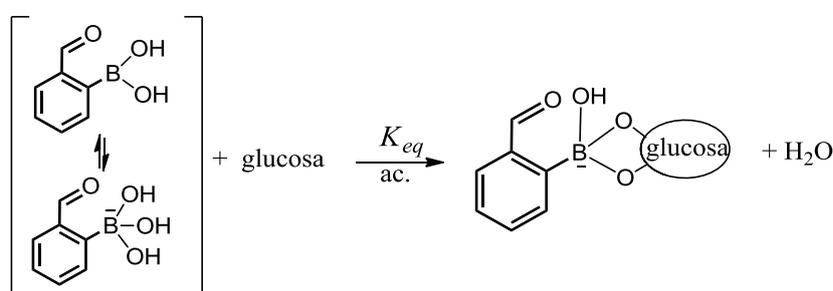
El cálculo de la constante de equilibrio observada para la formación del complejo ácido borónico–azúcar se hizo por medio de la construcción de las gráficas de Absorbancia (A) Vs. concentración de azúcar (D), de los isotermas de asociación a varias longitudes de onda seleccionadas de acuerdo a la mejor interacción observada. A través de la ecuación (5)

más simple que la utilizada en IDA, y que considera el caso de un exceso de azúcar sobre el ácido borónico (B) como se esquematiza en el equilibrio a continuación:



$$A = \frac{A_0 + A_C K_{obs} [D]_T}{1 + K_{obs} [D]_T} \quad (5)$$

En la ecuación 5, definida en la Parte Experimental, A_0 es la absorbancia inicial del ácido borónico, A_C es la absorbancia del complejo formado, y el subíndice T hace referencia a la concentración total.



Esquema 3.8 Formación del éster boronato entre el 2fPBA y la glucosa

Tabla 3.5 Valores de K_{obs} , M^{-1} calculados y utilizados en el estudio. Comparación de resultados obtenidos por IDA y el método directo. Solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, pH 7.0, 25°C.

Analito	Método IDA (ARS)		Método directo	
	$\log K (sd)$			
	2fPBA	PBA	2fPBA	PBA
Glucosa	0.78 (0.06)	0.30 (n.r.) ^a	1.04 (0.01)	0.41 (0.03)
Fructosa	1.93 (0.02)	1.96 (n.r.) ^a	2.43 (0.02)	2.19 (0.01)
Sorbitol	2.16 (0.04)	2.20 (n.r.) ^a	2.44 (0.02)	-

^bRef. 104

Los valores de las constantes de asociación halladas para el PBA y 2fPBA con los analitos del método directo, se compararon con los hallados por medio del método de desplazamiento de indicador, obteniendo resultados similares. En la tabla 3.5 se presenta el comparativo de las constantes halladas para 2fPBA y PBA a pH 7.0 por ambos métodos.

Basados en estos resultados se continuó utilizando únicamente el método directo para la obtención de las constantes de los isómeros 3 y 4fPBA. La tabla 3.6 reúne los valores

experimentales calculados para los tres isómeros y el PBA con glucosa y fructosa y el 2fPBA con sorbitol.

Tabla 3.6 Valores de K_{obs} (M^{-1}) de la interacción de los isómeros de fPBA con sacáridos, pH 7.0, solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, T=25°C. Entre paréntesis se incluyen los valores de pK_a de los compuestos.

	K_{obs}, M^{-1}				
	2fPBA (7.4)	3fPBA (7.3)	4fPBA (7.2)	PBA (8.2)	
Glucosa (12.5)[§]	11 (0.2)	16 (0.7) [†]	9 (0.8)	40 (9)	2.6 (0.2)
Fructosa (12.3)[§]	270 (11)	488 (17) [†]	421 (14)	976 (91)	155 (5)
Sorbitol (13.6)[‡]	278 (13)	567 (45) [†]	-	-	-

[†]pH 7.4 [§]Ref 107 [‡]Ref 172

La mejor interacción de los ácidos borónicos más ácidos con los azúcares de la tabla 3.6 se refleja en los valores superiores de las constantes de asociación observada, en particular el resultado con el 4fPBA. En el 2fPBA con la fructosa, el valor obtenido se relaciona con el impedimento estérico que la presencia del grupo carbonilo en la posición *orto*- tiene frente al hidroxilo del C-3 del sacárido, dado que es el sustituyente que está en posición *cis*- a la cadena, causando que las repulsiones entre los grupos disminuyan la afinidad entre 2fPBA-Fructosa.¹⁷³

En el caso del isómero 3-fPBA se encuentra reportado por algunos autores que un grupo carbonilo o en general grupos electroattractores en la posición *-meta* respecto al $B(OH)_2$ disminuyen la constante de asociación, atribuido a un descenso en la acidez del boro.¹⁷⁴

Respecto a las diferencias observadas entre el PBA y el 2fPBA, la señal observada es mucho más pronunciada para el último, así como el valor de la constante de asociación es cerca de cinco veces más grande para la asociación con la glucosa, aún en disolución cien por ciento acuosa, utilizando soluciones amortiguadoras de fosfato. Los experimentos realizados por UV-Vis, RMN ¹H y ¹¹B permitieron comprobar que el modo de interacción, con la glucosa en particular, se facilita debido a, por una parte la mayor acidez (menor pK_a) del ácido borónico sustituido, y por otra a la propiedad del 2fPBA de transformarse en el benzoxaborol, en parte por la cualidad de favorecer el equilibrio entre la forma tetraédrica y trigonal del boro.⁹⁸

3.3. Conclusión

En este capítulo se presentó la caracterización de los isómeros del fPBA y el PBA en medio completamente acuoso y a pH neutro y fisiológico con los sacáridos glucosa y fructosa y el poliol sorbitol. La caracterización de la acidez de los tres isómeros no se encontraba registrada en la literatura más que para el isómero *p*-formil fenilborónico.

Se logró demostrar que el uso del isómero 2fPBA presenta ventajas sobre el PBA en la asociación con los sacáridos estudiados.

Aunque el uso de indicadores está bastante extendido por su aporte en el análisis cuantitativo colorimétrico en las mediciones de la asociación entre ácidos borónicos con sacáridos con resultados reproducibles, en la presente investigación, además, se determinaron las constantes de asociación con titulaciones espectrofotométricas donde las posibilidades de error, al tener menos especies presentes en el equilibrio, fueron menores y se denominó método directo. Las constantes fueron obtenidas haciendo uso de la ventaja que tienen en su conjunto los isómeros del fPBA frente al PBA, de presentar dos bandas de absorción características, cuyo uso al momento de la asociación con los sacáridos favorece la precisión en el cálculo de sus valores.

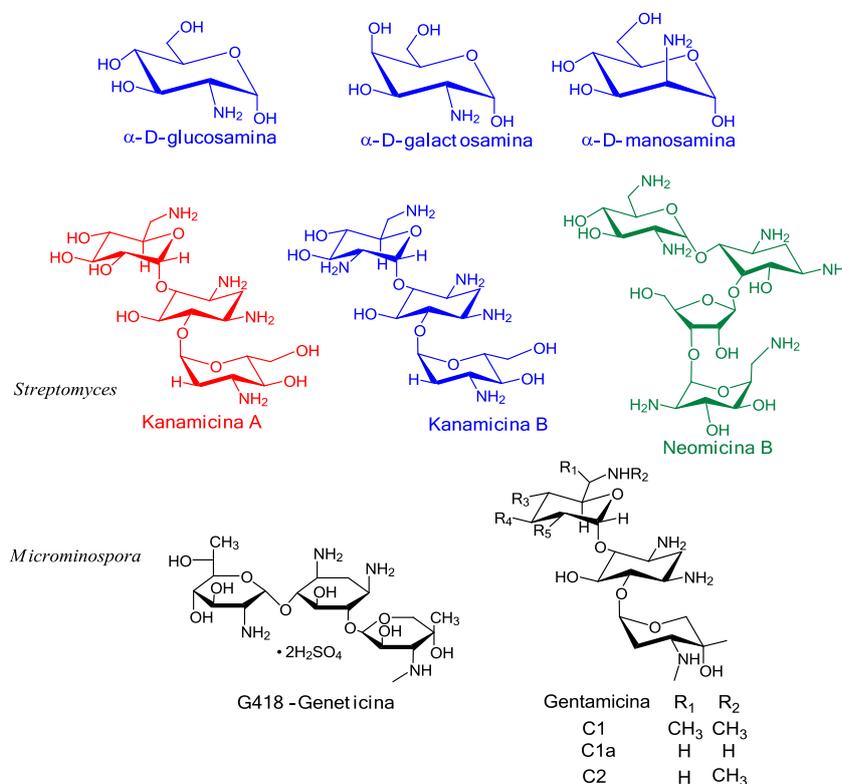
En comparación con el PBA, los isómeros del fPBA demostraron tener una mayor afinidad hacia la asociación con los sacáridos. Como se esperaba y comprobando lo reportado en la literatura, la respuesta en todos los casos fue mayor para la fructosa que para la glucosa. De igual manera, debido a la mayor acidez del conjunto de isómeros la asociación fue mayor; sin embargo, se destaca principalmente el isómero 4fPBA que con glucosa y fructosa las constantes medidas fueron cuatro veces mayores que incluso para el 2fPBA, en las mismas condiciones. Una posible explicación es el limitado acceso a los dioles que dispone la glucosa para enlazarse con el grupo borónico ocasionado por el impedimento estérico del aldehído en la posición *-orto*.

CAPÍTULO 4

Este capítulo incluye datos teóricos y experimentales sobre el modo de asociación del 2fPBA con el aminoazúcar glucosamina, el aminoglucósido knmyA, la monoamina 2-MEA y la poliamina SPMN, entre otros. El Dr. Felipe Medrano, desarrolló y colectó los datos teóricos (sección 4.6) sugeridos a partir de los resultados experimentales obtenidos con el fin de tener mayor claridad acerca de la estructura que adopta el complejo formado luego de la asociación con el 2fPBA.

4. Resultados y discusión de la asociación de los isómeros del fPBA con aminos, aminoazúcares y aminoglucósidos

La singular respuesta espectroscópica de los receptores 2fPBA, 3fPBA y 4fPBA con los dioles y polioles que contienen la función amina en su estructura se expone a continuación. El análisis del tipo de asociación se realizó con el fin de profundizar en los mecanismos a los que obedece dicha respuesta óptica. Para este particular, se emplearon los aminoazúcares glucosamina, galactosamina y manosamina. En el caso de los aminoglucósidos se probó con una amplia lista, de los cuales se seleccionaron los siguientes: kanamicina A (**knmyA**) y kanamicina B, amikacina, neomicina B (**nmyc**), gentamicina, y geneticina (G418).



Esquema 4.1 Analitos utilizados en el estudio de la interacción con los isómeros del fPBA

4.1. Caracterización por espectroscopía UV-Vis

4.1.1. Aminoazúcares

Las titulaciones con los compuestos que contienen grupos amina en su estructura se efectuaron en las mismas condiciones que las utilizadas para los glucósidos, permitiendo que el sistema llegara al equilibrio. El primer analito que se analizó fue la glucosamina, a partir de la cual se observan dos diferencias notables de la interacción con el 2fPBA.

La primera diferencia está relacionada con el PBA, los cambios espectrofotométricos indican que la interacción del ácido con la glucosamina es prácticamente nula. A medida que se incrementa la concentración de analito no ocurre ninguna modificación en el espectro de absorción. La variación del espectro del 2fPBA consiste en una pequeña disminución del máximo a 253 nm, un gran aumento de la banda de absorción entre 270 – 320 nm y está acompañado por la formación de dos puntos isobésticos a 232 nm y 260 nm. En la sección 1.4.4 Equilibrio de Bases de Schiff en medio acuoso de los antecedentes se mencionó la aparición de esta banda la cual se asocia a la formación de bases de Schiff, lo que demuestra que la magnitud de la interacción del grupo amino de la glucosamina con el aldehído del 2fPBA supera por mucho a la esperada para los ésteres boronato.

En la figura 4.1a y b se ilustra la comparación de los cambios espectrales del PBA con 38 equivalentes de D-glucosamina y el 2fPBA con 12 equivalentes del mismo aminoazúcar como sustrato. En el Apéndice 4 están consignados los espectros a pH 7.4.

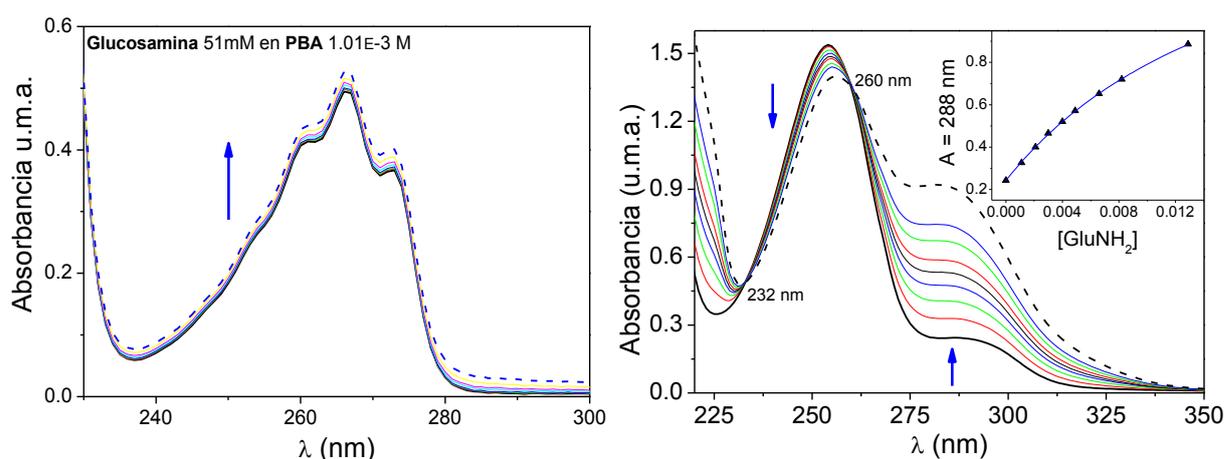


Figura 4.1. a. Titulaciones espectrofotométricas de a) PBA 1 mM y b) 2fPBA 0.025 mM con D-Glucosamina (0 – 13 mM). Solución amortiguadora fosfato 0.1 M, pH 7.0.

La segunda y más notoria diferencia ocurre entre el 2fPBA y los otros dos isómeros 3 y 4fPBA (Figura 4.2). Lo más particular de éstos experimentos es que al igual que con el PBA los cambios espectrales con glucosamina son apenas perceptibles, muy distinto a lo observado para el 2fPBA. El inserto de la figura 4.2a describe la diferencia en absorción del máximo de 3fPBA con la titulación de GluNH₂, el cual permite ver la débil interacción cercana a 265 nm para el isómero 3fPBA. Los antecedentes apuntaban a que el comportamiento fuera más parecido al del 2fPBA puesto que existía la posibilidad de formar la base de Schiff, sin embargo, lo observado es que el 2fPBA estaba demostrando ser un receptor con una afinidad muy superior hacia este tipo de analitos.

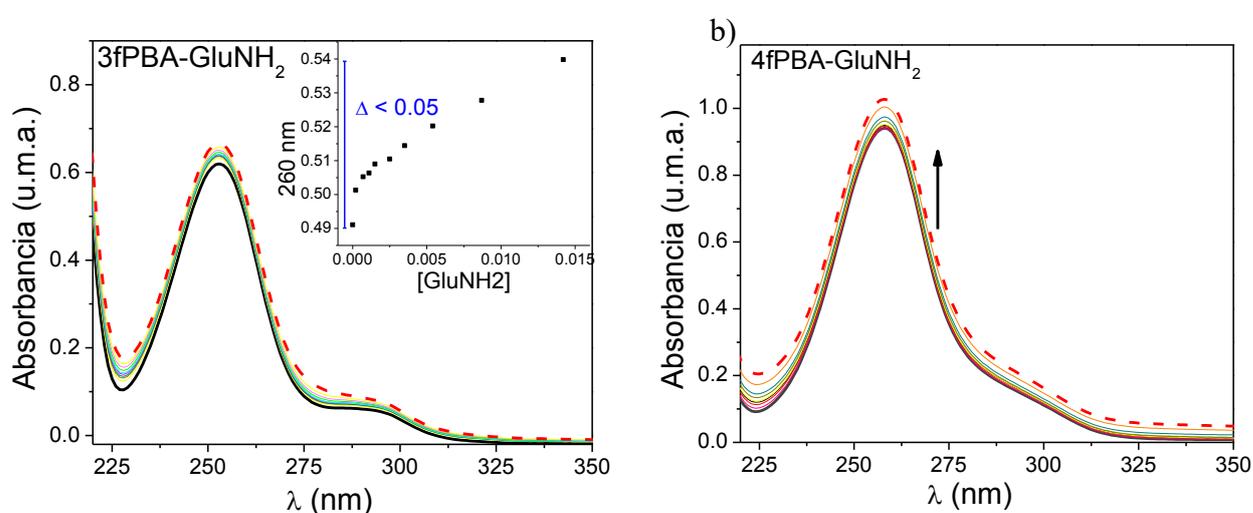


Figura 4.2a. Titraciones espectrofotométricas de 2fPBA 0.012 mM y 3fPBA 0.046 mM con D-Glucosamina (0 – 13 mM). Solución amortiguadora fosfato 0.1 M, pH 7.0.

Se continuaron los experimentos con el 2fPBA y los aminoazúcares galactosamina y manosamina, los cuales se llevaron a cabo a pH igual a 7.3 (Figura 4.3). Las titulaciones con manosamina presentaron anomalías con respecto a lo observado con glucosamina y galactosamina. Los cambios espectrales en la región alrededor de 254 nm no presentaron disminución en la absorción y el aumento de la absorción en la región correspondiente a la formación de la base de Schiff alrededor de 281 nm fue inferior al observado para GluNH₂ y galactosamina. Tampoco se llegó a un punto de saturación ni se observó la presencia de puntos isobéuticos.

disminución en la absorción del máximo a 253 nm y el gran incremento de la banda entre 270–320 nm (Figura 4.3a). Lo anterior corrobora la probable formación de las bases de Schiff de la D-glucosamina y D-galactosamina con el 2fPBA, cuyos valores de absorptividad molar en el máximo de 281 nm se pueden ver en la tabla 4.1. El análisis de la manosamina requiere una investigación más detallada, de acuerdo al espectro observado. No hay presencia de puntos isobésticos, aunque alrededor de 252 nm se perciba la presencia de uno. Los resultados y descripción en la literatura, permiten estimar que son más los equilibrios involucrados, aparte de la formación de la base de Schiff.

Tabla 4.1 Coeficientes de extinción para las especies de la reacción entre el 2fPBA y los aminoazúcares indicados.

	$\lambda(\text{nm})$	$\epsilon (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$	pH
Glucosamina	281	7426	7.5
Galactosamina	281	7033	7.3
Manosamina	281	10x105	7.3

4.1.1.1. Efecto de la disolución amortiguadora

Para continuar con el curso de las investigaciones sobre la asociación del 2fPBA con analitos que contienen las funciones diol y amina en su estructura, se adelantaron pruebas con el aminoglucósido knmyA. Las mediciones realizadas hasta este punto se habían efectuado en disoluciones amortiguadas en fosfato, sin embargo, se observó que por la naturaleza de los aminoglucósidos en su estado polication, se presentaba interferencia por la asociación notable con el anión fosfato al realizar las titulaciones¹⁷⁶.

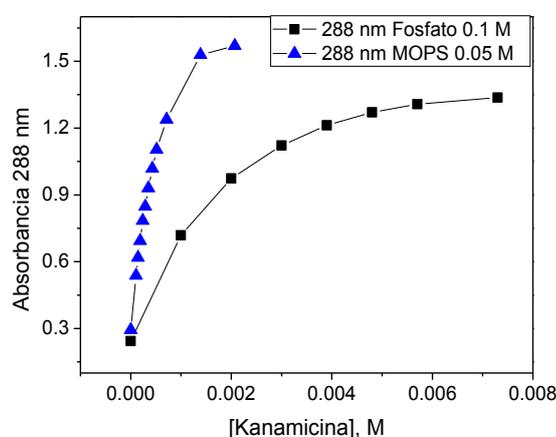


Figura 4.5 Perfiles de titulación espectrofotométrica para obtener la K_{obs} de KnmyA pH 7.0 en soluciones amortiguadoras MOPS 0.05 M y Fosfato 0.1 M

En la figura 4.5, se presenta la comparación de los perfiles de asociación con el 2fPBA y knmyA en solución amortiguadora de fosfato (-■-) y otra con MOPS (-▲-) donde claramente se nota un efecto inhibitor por parte del fosfato. Con lo anterior y para evitar datos erróneos debido a la presencia de los iones fosfato, a partir de tales observaciones el ajuste del pH de las mediciones de analitos que contenían grupos amina, se continuó realizando con disoluciones 0.05 M de los amortiguadores MES, MOPS o CHES.

4.1.2. Aminoglucósidos

Como ya se mencionó el primer analito del grupo de aminoglucósidos estudiado fue la knmyA. La estrategia de conseguir la doble asociación a través de la formación del éster boronato y la base de Schiff parecía avanzar con los resultados de espectroscopía electrónica. Las variaciones espectrales durante la titulación del 2fPBA con kanamicina A (**knmyA**) reproducen lo observado con D-glucosamina y D-galactosamina. Los puntos isobécticos a 235 nm y 259 nm son prácticamente iguales a los presentados con los aminoglucósidos, de igual forma hubo disminución del máximo de absorción a 253 nm y el aumento en la banda de absorción por encima de 270 nm se extendió hasta 320 nm, figura 4.6.

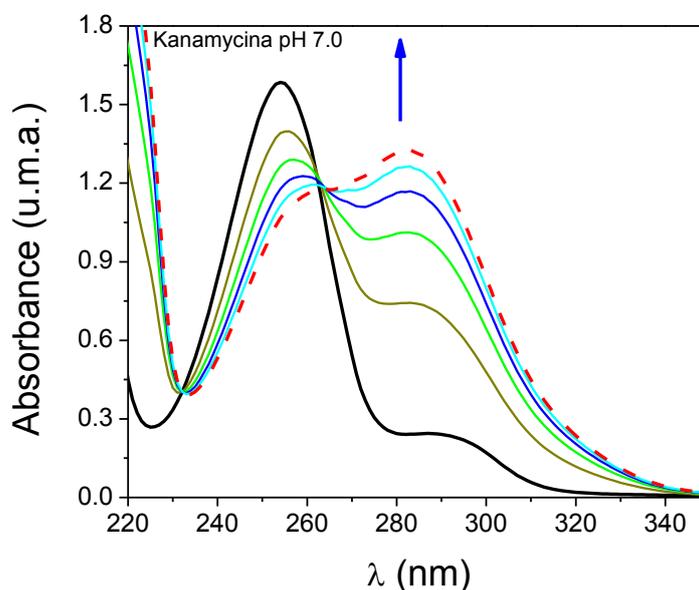


Figura 4.6 Cambios espectrales para la titulación de 2fPBA 0.025 M con knmyA (0 - 15 eq) en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.0

Los cambios espectrales con otros aminoglucósidos semejan los presentados para la knmyA y pueden encontrarse las figuras del Apéndice 5.

4.1.3. Monoaminas

Los resultados presentados hasta el momento de las titulaciones de 2fPBA con D-GluNH₂, D-galactosamina y knmyA dan indicios que la banda de absorción observada entre 270-320 nm es ocasionada por la formación de bases de Schiff. Como método de comprobación de tal afirmación se decidió llevar a cabo experimentos con aminas primarias. Para iniciar las pruebas se eligió la amina primaria 2-metoxi-etilamina (2MEA), para la titulación de la figura 4.7 se utilizaron 25 equivalentes de analito en 0.21 mM de 2fPBA en disolución amortiguadora de MOPS a pH igual a 7.0.

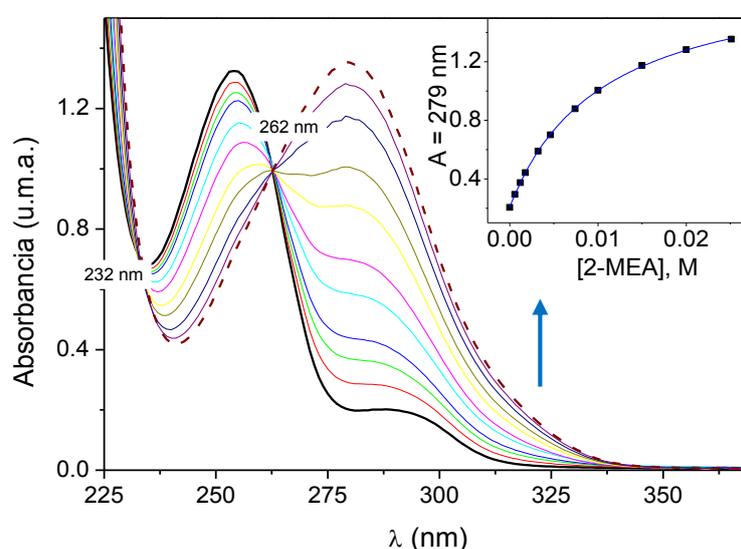


Figura 4.7 Titulación espectrofotométrica de 2fPBA 0.21 mM con 2-MEA (0 – 25 mM). Solución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.0.

Los resultados espectrales fueron similares a los mostrados hasta ahora, de nuevo la banda de absorción entre 270 - 320 nm con máximo en 281 nm es verificada, la disminución en el máximo a 253 nm y la aparición de dos puntos isobésticos a 232 nm y 262 nm sustentan la hipótesis planteada sobre la condensación entre el 2fPBA y los glucoamino derivados.

4.2. Caracterización por espectroscopía RMN ¹H

Las mediciones por la técnica de RMN ¹H se realizaron con el fin de analizar la asociación entre los aminoazúcares, aminoglucósidos y aminas con el 2fPBA y sus isómeros. De tal forma que se preparó una disolución 5 mM de cada ácido en D₂O y se ajustó a pH igual a 7.0 con NaOD, posterior a ello se registró los espectros en presencia de incrementos graduales de los analitos preparados en disoluciones deuteradas y ajustadas al mismo pH.

En ausencia de analito, el espectro de RMN ^1H del 2fPBA a pH de 7.0, presenta un pico definido para la señal aldehído $\text{CH}=\text{O}$ ($\delta = 9.96$ ppm), y en la región aromática se observan agrupadas tres señales anchas entre 7.2 y 8.1 ppm. En concordancia con los resultados obtenidos por UV-Vis, a medida que aumenta la concentración durante la titulación de 2fPBA con D-glucosamina la variación de la señal del protón del aldehído va disminuyendo gradualmente y es sustituida por dos nuevas señales en 8.78 y 8.58 ppm, lo que corresponde al desplazamiento esperado para la señal $\text{CH}=\text{N}$ ($\delta \sim 8.2$ ppm), además el intercambio lento en la escala de resonancia, es una característica típica de la formación de iminas a partir de aldehídos aromáticos.

El constante equilibrio en solución entre las formas anoméricas α y β de la D-GluNH₂, origina el fenómeno que ha sido observado anteriormente en bases de Schiff de D-glucosamina con salicilaldehído, un proceso lento para la escala de resonancia que ocasiona la aparición de dos señales, correspondiente al equilibrio $\alpha \rightarrow \beta$, siendo el desplazamiento a campo más alto la que corresponde al anómero β , el cual se ha descrito como el anómero principal de las iminas derivadas de carbohidratos.^{53,54}

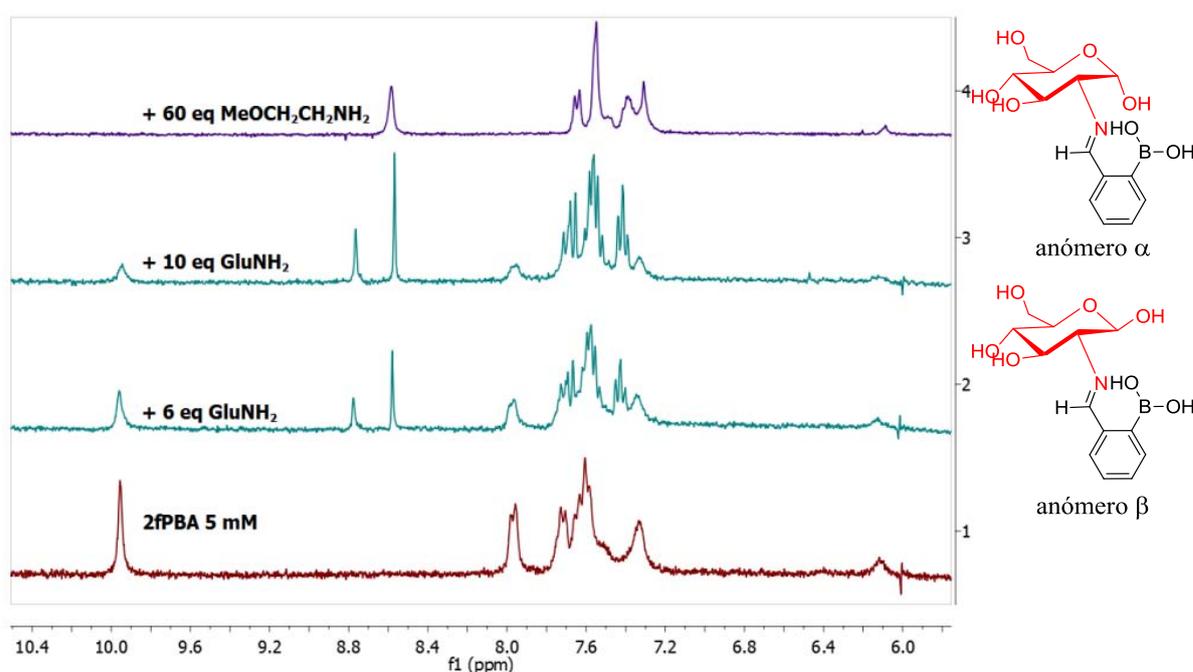


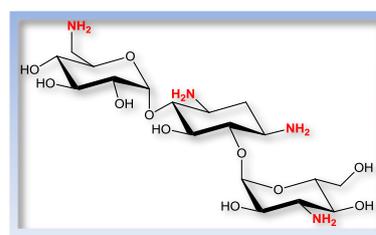
Figura 4.8 Espectros de los δ RMN ^1H de 2fPBA en presencia de GluNH₂ y 2-MEA, pH 7.0 ajustado con NaOD o DCl en D₂O

En la figura 4.8 se pueden apreciar los desplazamientos químicos (δ) para el 2fPBA libre y en presencia de 6 y 10 equivalentes de D-glucosamina determinados a pH igual a 7.0. En la parte superior de la figura se incluyó un espectro de 2fPBA con una alta concentración de

2MEA, para aportar evidencia adicional sobre la formación de la nueva especie, es decir, la base de Schiff. La señal observada a 6.1 ppm corresponde a la fracción de aldehído que se encuentra protonado $\text{RHC}=\text{OH}$. El desplazamiento del $\text{CH}=\text{N}$ corresponde a la señal en 8.5 ppm. De esta manera se comprueba la formación de la imina *in situ* con el 2fPBA. Los C-H aromáticos son desplazados en conjunto a campo alto, con el ensanchamiento de las señales que fue analizado en la sección 3.1.2 en valores de pH cercanos al $\text{p}K_a$ del 2fPBA.

De forma similar a los estudios electrónicos y luego de confirmar la formación de la imina se continuó el análisis del 2fPBA con el analito representativo de los aminoglucósidos, la knmyA. Los experimentos se ejecutaron de forma similar que para D-glucosamina y 2MEA. Con el fin de realizar un estudio más detallado de los valores de los equilibrios existentes, se llevaron a cabo los experimentos cubriendo un espectro amplio de pH entre 6.5 – 9.0, con disoluciones de 2fPBA ~20 mM, el cual variaba hasta un 15%, de acuerdo al grado de solubilidad en el valor de pH analizado. Los desplazamientos de los protones a campo bajo del 2fPBA en presencia de un exceso de knmyA para cada valor de pH estudiado están descritos en la figura 4.10. Los espectros de RMN ^1H para el avance de las titulaciones en cada uno de los valores de pH están consignados en el Apéndice 6, donde puede apreciarse que el efecto de la knmyA sobre las señales del 2fPBA es similar al observado con la D-glucosamina, es decir, un equilibrio lento para la transformación del ácido en la nueva especie.

Una característica común a todos los espectros es la total desaparición de la señal aldehído en las condiciones descritas en la figura 4.10. La señal del protón del aldehído desaparece por completo en los valores de $\text{pH} > 7.0$, lo que sugiere la completa transformación del 2fPBA en la base de Schiff. Sin embargo, otro efecto destaca al comparar los espectros de protón a diferentes valores de pH. Cabe recordar en este punto la estructura de la knmyA, ya que, al tratarse de una poliamina, las posibilidades de la condensación con el 2fPBA para la formación de la base de Schiff se amplía a cuatro posibles sitios donde puede darse lugar la reacción *in situ*.



Tal efecto se hace evidente al observar varias señales en la región donde se espera la aparición de los protones imina $\delta \sim 8.5$ a ~ 8.7 ppm. Si se observa con detalle la señal principal en los valores de pH igual a 6.5 – 7.4 es diferente a la observada a los $\text{pH} = 8.0$ y 9.0. Por

otra parte, el efecto sobre las señales de los protones aromáticos es el ensanchamiento de las mismas, en el pH = 8.0 es más pronunciado y este comportamiento podrá ser explicado en la próxima sección sobre caracterización cuantitativa de la formación de iminas.

De los experimentos por espectroscopía electrónica, la interacción observada con los isómeros 3 y 4fPBA con los analitos fueron prácticamente despreciables. No obstante, al demostrarse la formación de la base de Schiff con el 2fPBA, es de esperar que con sus isómeros también se verifique esta reacción.

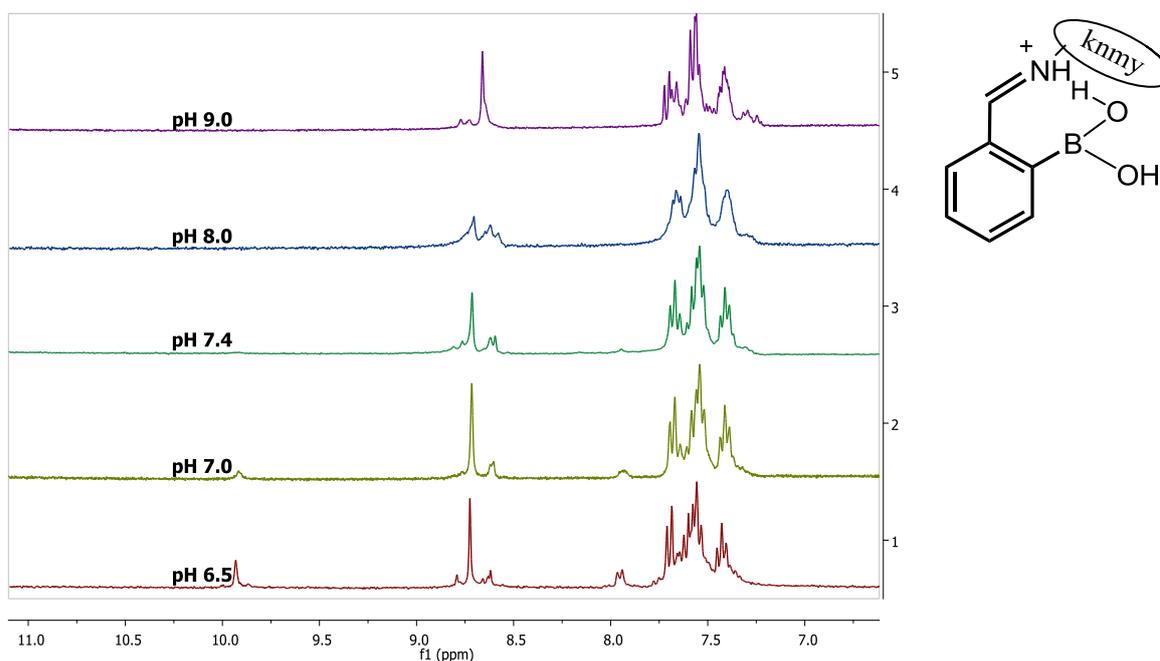


Figura 4.10 Espectros de los δ RMN ^1H de 2fPBA ~ 20 mM en presencia de un exceso de knmyA, pH 6.5: 3 Eq (equivalentes de knmyA); pH 7.0: 4 Eq; pH 7.4: 2 Eq, pH 8.0: 4 Eq; pH 9.0: 4 Eq. Valores de pH ajustados con NaOD y DCl, en D_2O .

La técnica de RMN da la posibilidad de obtener mayores datos para describir los equilibrios de la interacción entre el 3fPBA y 4fPBA con los analitos. Los experimentos se realizaron en disoluciones deuteradas y para el ajuste de pH se empleó NaOD o DCl, según el caso. La concentración para el isómero 3fPBA fue igual que para el 2fPBA, pero debido a la baja solubilidad del 4fPBA la máxima concentración obtenida fue de 6 mM.

Para las titulaciones de los de los isómeros 3- y 4fPBA se observó la formación de la imina con la aparición de la señal $\text{CH}=\text{N}$, los protones imina aparecen en $\delta = 8.4$ ppm para ambos isómeros. No obstante, en el caso de la titulación con aminas fue necesario emplear concentraciones mucho más altas para observar por lo menos la aparición de la señal que indicara la formación de la imina.

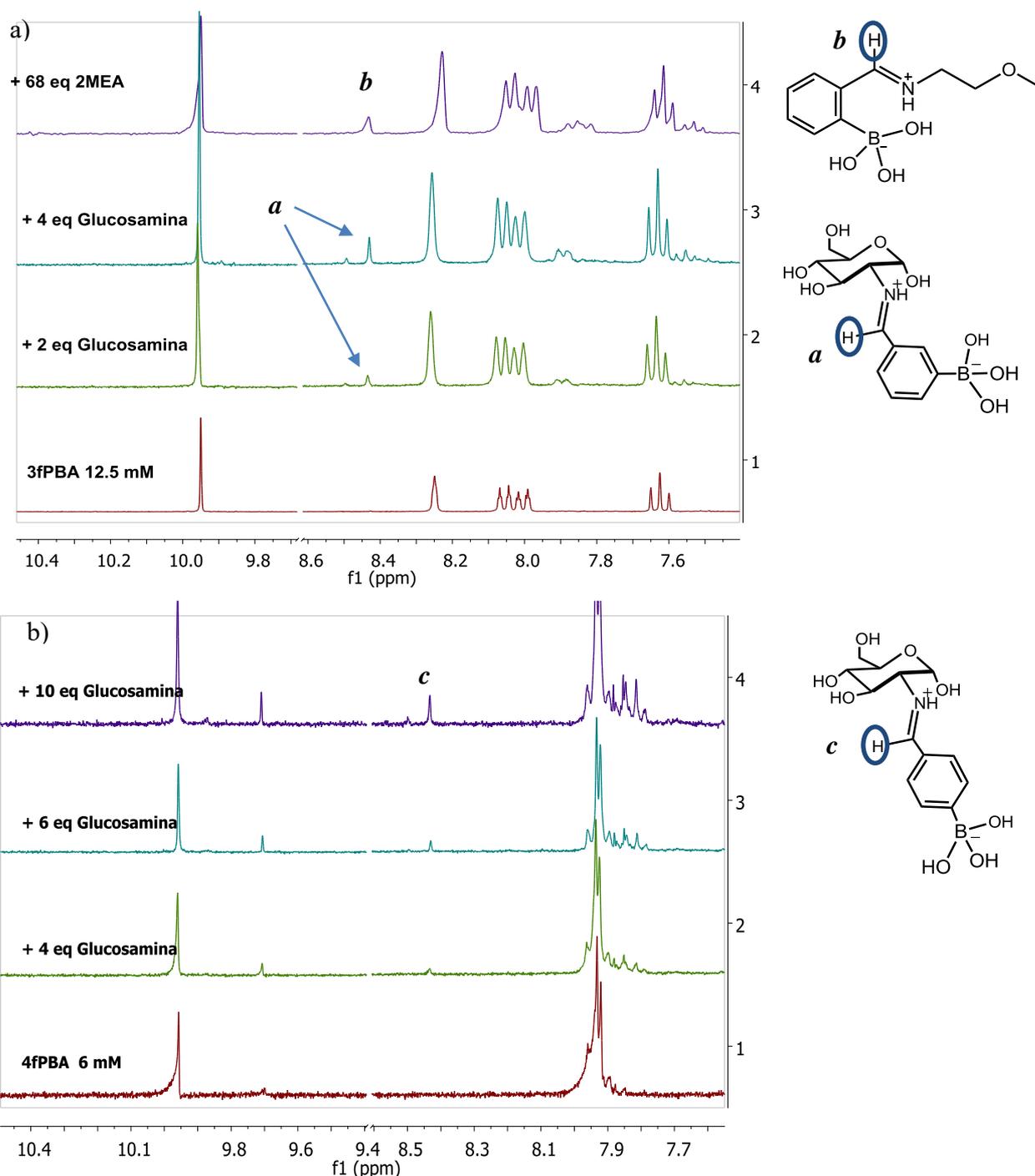


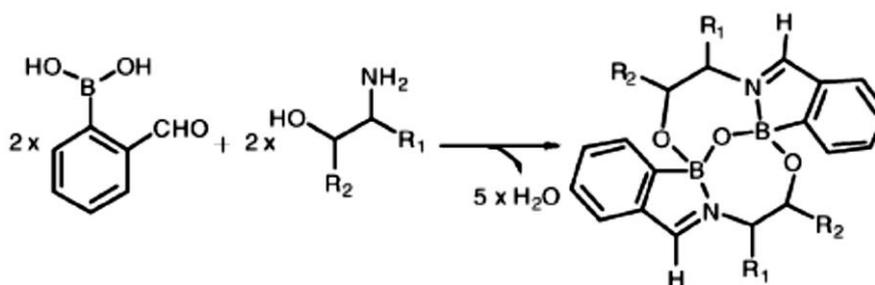
Figura 4.11 Espectros de RMN ^1H de 3fPBA y 4fPBA en D₂O en presencia de cantidades de GluNH₂ y 2MEA, pH 7.0

La región aromática muestra pequeños subconjuntos de señales luego de la formación de la imina, descritos en las figuras 4.11a y 4.11b; sin embargo, a diferencia de los espectros con 2fPBA, en ninguno de los dos casos se obtuvo la conversión completa del aldehído en la imina. Se omiten *a priori* las señales menores a 7.5 ppm debido a la alta cantidad de analito que debe emplearse, como consecuencia el orden de magnitud de absorción es mucho mayor, respecto a la región aromática luego de la formación de la imina, que no permite identificar

picos de manera simultánea. Sin embargo, se realizó la comprobación que las señales correspondieran al aminoglucósido.

4.3. Estudio de la asociación de los ácidos fPBA con aminoazúcares, aminoglucósidos y aminas

Los ácidos borónicos, y su relación con derivados polioles, abundan en la esperada interacción de asociación que rinden los ésteres borónicos en medios acuosos o medianamente acuosos. En el presente caso de estudio y a la luz de los resultados presentados hasta este punto, se observa que en medios ciento por ciento acuosos, el 2fPBA permitiría la determinación cuantitativa de los compuestos con funciones diol y amina. Esto despertó mayor interés en descubrir si la asociación era una combinación de la formación del éster boronato y la base de Schiff. En el caso descrito por el grupo de James, la interacción de 2fPBA con amino-alcoholes en medio no acuoso, resultó en la formación de un producto cíclico binuclear, en el cual, un grupo amino del amino-alcohol forma la base de Schiff con el grupo aldehído de una molécula de 2fPBA y el grupo hidroxilo del amino-alcohol forma el enlace éster con el grupo borónico de otra molécula de 2fPBA.¹³³



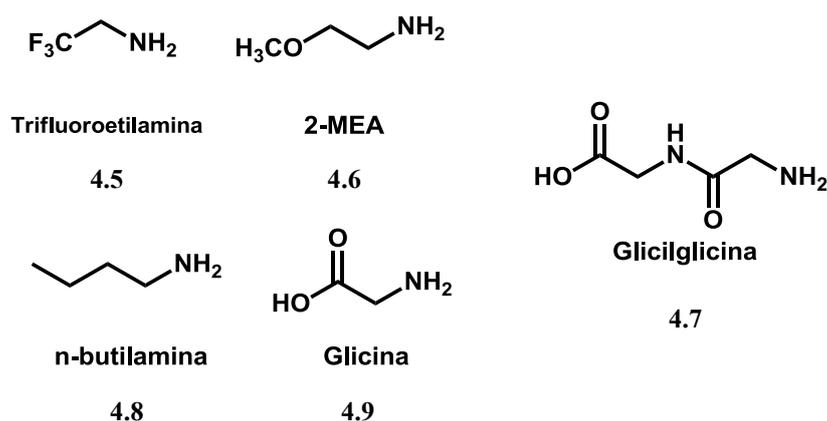
Esquema 4.2 Representación tomada del original, condensación de 2fPBA con dos moles de un aminoalcohol.¹³³

4.3.1. Determinación de las constantes de asociación por espectroscopía UV-Vis y RMN ¹H

La espectroscopía de UV-Vis se usó para la caracterización cuantitativa de la estabilidad de las iminas entre el 2fPBA y los analitos descritos en el Esquema 4.1 y las aminas del Esquema 4.2. Lo anterior se logró después de la determinación de sus respectivas constantes de formación, por medio del método denominado directo evitando así la interferencia provocada por compuestos mensajeros (indicadores). Estas determinaciones fueron únicas, al realizar el presente estudio, ya que no se encontraban datos publicados acerca de la

asociación de ácidos borónicos con este tipo de analitos como son los aminoazúcares y aminoglucósidos (y aún hasta la fecha).

En primer lugar, para obtener una percepción rápida de la interacción los analitos con el isómero 2fPBA, se hallaron los perfiles de titulación a longitudes de onda seleccionadas. Para tal efecto se fijó la concentración del 2fPBA en 0.25 mM como constante para los experimentos por UV-Vis y las disoluciones de los analitos fueron preparadas en esta misma solución del ácido para evitar la dilución



Esquema 4.3 Monoaminas utilizadas en el estudio de la interacción con los isómeros del fPBA

Lo anterior permitió establecer la estequiometría de la interacción para la determinación de las constantes de asociación. En los experimentos realizados con los azúcares se había encontrado interacción 1:1, de tal forma que si en este caso se presentaba la formación de la imina y la formación de los ésteres boronato, se esperaba obtener una interacción 2:1. Sin embargo, para todos los casos se reconoce la forma hiperbólica típica para un tipo de interacción 1:1 con cada uno de los analitos estudiados, como se aprecia en los perfiles de la figura 4.12 para knmyA, GluNH₂ y 2MEA, de igual manera que los perfiles para los demás analitos que se encuentran en el Apéndice 7.

Los resultados de la asociación entre los aminoazúcares y los aminoglucósidos con PBA comprueban que, la estabilidad de complejos de los ácidos borónicos en solución acuosa es baja, por tal razón, la interacción 1:1 que se observa con los aminopolioles y los isómeros del fPBA, corresponde únicamente a la formación de las bases de Schiff. A diferencia de la concentración en exceso que fue necesaria utilizar en la determinación de las constantes con los azúcares, es claro, a partir de los perfiles con 2fPBA que la concentración apropiada de los analitos incluidos en este capítulo ya no requieren un alto exceso y que para cada tipo de analito es variable. Por ejemplo, en el caso particular de los tres analitos, 2MEA, GluNH₂ y knmyA; mientras que para la interacción con knmyA

bastaban 2 mM para alcanzar la saturación, con GluNH₂ y 2MEA eran necesarios 12 y 24 mM respectivamente, a pH = 7.0 para lograr el mismo efecto.

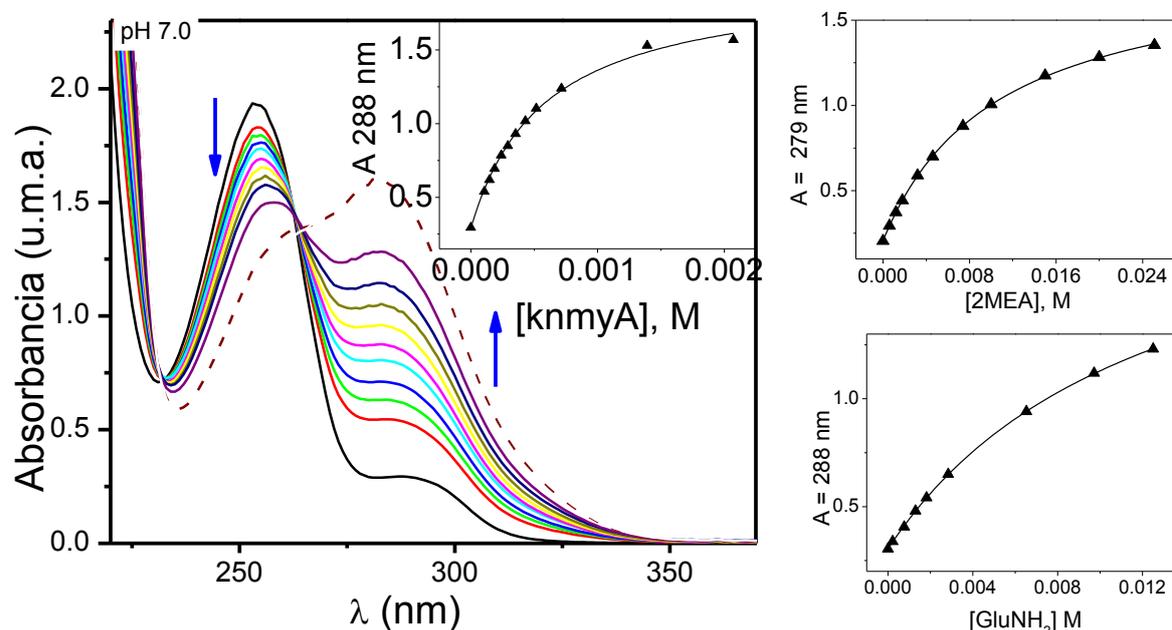


Figura 4.12 Perfiles de interacción de 2fPBA en presencia de KNMYA, GluNH₂ y 2MEA. Solución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.0

La espectroscopía de RMN ¹H se utilizó para lograr obtener los datos que permitieran el análisis de la asociación de los analitos con los isómeros 3fPBA y 4fPBA, debido a los cambios espectrales tan pequeños obtenidos por UV-Vis como se expuso en la sección 4.1.1.

Tabla 4.2 Comparación de las constantes de asociación K (M⁻¹) para el 2fPBA por UV-Vis en solución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.0. y de 3fPBA y 4fPBA con analitos seleccionados a partir de experimentos por RMN ¹H.

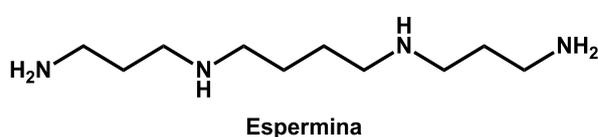
	2fPBA	3fPBA	4fPBA
n-BuNH₂	27	– ^b	– ^b
MeOCH₂CH₂NH₂ (2MEA)	81	0.21	0.66
TFEA	10	– ^b	– ^b
Gly	16.1	– ^b	– ^b
GlyGly	130 ^a	0.8 ^a	– ^b
Glucosamina	83.1	3.7 ^a	4.0 ^a
knmyA	2790	170 ^a	43 ^a

^a Determinados por RMN ¹H, D₂O, pH 7.0. ^b El error instrumental supera los límites de error relativo, para la determinación exacta de K_{obs}

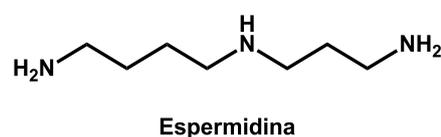
Las constantes de equilibrio calculadas a partir de los ajustes a pH = 7.0 con 2fPBA para cada uno de los analitos y con 3fPBA y 4fPBA con los analitos seleccionados, son

presentadas en la tabla 4.2. Como se esperaba desde los resultados cualitativos, hay una gran diferencia entre el 2fPBA y sus dos isómeros. Las constantes de asociación del 2fPBA superan por más de un orden de magnitud las halladas para el 3 y 4fPBA. Los valores de las constantes en el primer caso están por encima de 10 ($K > 10$), mientras que sólo para la asociación con knmyA se observó un resultado superior a este valor con los otros isómeros.

Los valores de las constantes de asociación demuestran que la presencia del grupo *orto*-boronato causa un efecto estabilizante frente a las interacciones más débiles observadas para los isómeros 3- y 4fPBA. No obstante, al no contar con datos para comparar el efecto estabilizador del 2fPBA sobre la formación de las iminas se incluyó en el estudio la determinación de las constantes de equilibrio para dos monoaminas: n-butilamina (n-BuNH₂) y trifluoroetilamina (TFEA); dos aminoácidos: glicina (gly) y glicil-glicina (GlyGly) y dos poliaminas biológicas: SPMN (SPMA) **4.10** y SPDNA (SPDN) **4.11**, además de los tres aminoazúcares y seis aminoglucósidos en condiciones similares con solución 0.05 M de MOPS a pH = 7.0. El resumen de los datos se presenta en la tabla 4.3. De la tendencia observada respecto a la asociación con el 2fPBA se destaca la gran diferencia en la asociación de los aminoglucósidos knmyA y neomycina B (nmyc) frente a los demás analitos del estudio con el 2fPBA.



4.10



4.11

Tales resultados incrementaron nuestro interés, y se encontró necesaria una evaluación de la selectividad en la formación de iminas con el 2fPBA, no publicada hasta este momento. Incluso al comparar los valores publicados de la formación de iminas en medio acuoso dentro de nuestro grupo de trabajo (Godoy 2005), con monoaminas y salicilaldehído, descritos en la sección 2.5.4, presentando valores de las K aparentes que se ven superados por el 2fPBA y cuyo análisis será ampliado en la sección 4.4.

La manosamina, como era de esperarse, fue la de menor rendimiento entre el grupo de aminoazúcares, lo cual está relacionado con los equilibrios de dimerización adicionales que fueron descritos previamente. Del grupo de monoaminas el mejor resultado se obtuvo para la 2MEA en un efecto que está relacionado con su valor de pK_a . La comparación de la afinidad del 2fPBA con los aminoglucósidos, en especial los valores obtenidos para knmyA

(2790 M⁻¹) y neomicina B (4900 M⁻¹), describe que son mayores en más de un orden de magnitud frente a los valores para los aminoazúcares y para finalizar, el incremento en el número de grupos amina en la estructura de las poliaminas también correspondió a un aumento en los valores de las constantes de formación de iminas, los cuales fueron bastante altos para SPMN y SPDNA.

Tabla 4.3 Constantes de asociación K_{obs} (M⁻¹) para el 2fPBA con cada uno de los analitos en estudio, solución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.0.

Analitos	2fPBA
n-BuNH ₂	27
MeOCH ₂ CH ₂ NH ₂ (2MEA)	81
TFEA	10
Gly	16.1
GlyGly	130 ^a
GluNH ₂	83.1
Galactosamina	140
Manosamina	8.3
KnmyA	2790
KnmyB	1350
Amicacina	1900 ^b
Geneticina	850
Gentamicina C	1340 ^b
NmcyB	4900
SPMN	1420
SPDNA	1500

^a RMN ¹H ^bpH 7.3

Con éstos resultados era necesario obtener una visión más detallada acerca del proceso involucrado en la formación de las bases de Schiff y las razones que le confieren la estabilidad observada con el 2fPBA. Aunque se haya descartado la posible formación del éster boronato con los dioles de los aminoazúcares y aminoglucósidos es evidente que la presencia del ácido borónico en la posición *orto*- al aldehído está aportando un efecto singular que favorece la formación de las bases de Schiff en sistemas acuosos. En función de encontrar las razones de dicho efecto se seleccionó un analito representativo de cada grupo estructural para estudiar con mayor detalle su interacción con el 2fPBA, los analitos seleccionados fueron: 2MEA, GluNH₂, knmyA y SPDN.

4.4. Estudio de la selectividad del 2fPBA

Los experimentos para estudiar la selectividad del receptor 2fPBA se condujeron evaluando la formación de las iminas a 25 °C a diferentes intervalos de pH. El análisis de la interacción se investigó con las técnicas de UV-Vis y RMN ^1H y ^{11}B . Para los experimentos por RMN la concentración del ácido borónico fue de ~20 mM, luego de añadir la cantidad apropiada de analito el tiempo de equilibrio fue de 10 minutos para protón y 20 minutos para las resonancias de boro antes de la medición del espectro.

La interpretación del efecto observado requiere el conocer la estructura real de la imina. En medios no polares se esperaría la formación de un enlace covalente coordinado $\text{N}\rightarrow\text{B}$ que estabilizara la imina tal como ha sido descrito para otros casos de 2fPBA con aminas primarias y fue descrito en la sección 1.4.3 de antecedentes^{133,177}. Además se tuvo en consideración los reportes del grupo de Anslyn en disolventes como metanol o etanol, quienes han detectado por medio de DRX y RMN ^{11}B que en el caso de ésteres boronato con grupos *orto*-alquilamina, el grupo amina forma un ion amonio en lugar de coordinarse al átomo de boro y a través de la inclusión de una molécula de disolvente en su estructura logra estabilidad por la formación intramolecular de un enlace de hidrógeno, como se mostró en las estructuras **31** y **31-CH₃O** en la sección 1.3.2.¹²² Por analogía se podría plantear en este caso la posible coordinación de una molécula de agua, lo que daría origen a una estructura zwitterion con un enlace de hidrógeno intramolecular.

Para aclarar esta posibilidad, los espectros de resonancia de ^{11}B aportan resultados concluyentes acerca del estado electrónico y estructura de las bases de Schiff en el equilibrio, ya que, aunque el estado de hibridación del boro sea sp^3 , tanto para la especie solvatada como para la coordinada, el desplazamiento químico para cada uno varía al menos en 2-3 ppm, lo que permite diferenciar si se tiene una especie u otra, y a partir de allí determinar si hay formación de éster boronato o sólo se encuentra el ion boronato en forma aniónica.

Como fue observado en la caracterización de 2fPBA por RMN ^{11}B , las señales del equilibrio de las especies $-\text{B}(\text{OH})_2$ trigonal y $-\text{B}(\text{OH})_3$ tetraédrica son identificables en la escala de tiempo de RMN. De acuerdo al pH inicial se observa la diferencia en la proporción del ácido borónico en su forma trigonal o neutra y tetraédrica o ionizada como boronato. En la figura 4.13a y b se indican las titulaciones con knmyA a pH =7.0 y glucosamina a pH =7.5 respectivamente. La evolución de la transformación del 2fPBA con aminas por RMN ^{11}B causa un cambio en la estructura alrededor del átomo de boro que se refleja como un gran ensanchamiento de la señal, efecto que puede relacionarse con el ambiente menos simétrico

alrededor del boro, posterior a la formación de la o las bases de Schiff¹⁷⁸, en el caso de la knmyA. Sin embargo, se puede ver claramente que la formación de la imina causa que la señal correspondiente al ácido borónico neutro a 29.3 ppm desaparezca y aparezca una sola señal a 8.6 ppm, la cual es corresponde a un desplazamiento típico del anión boronato.

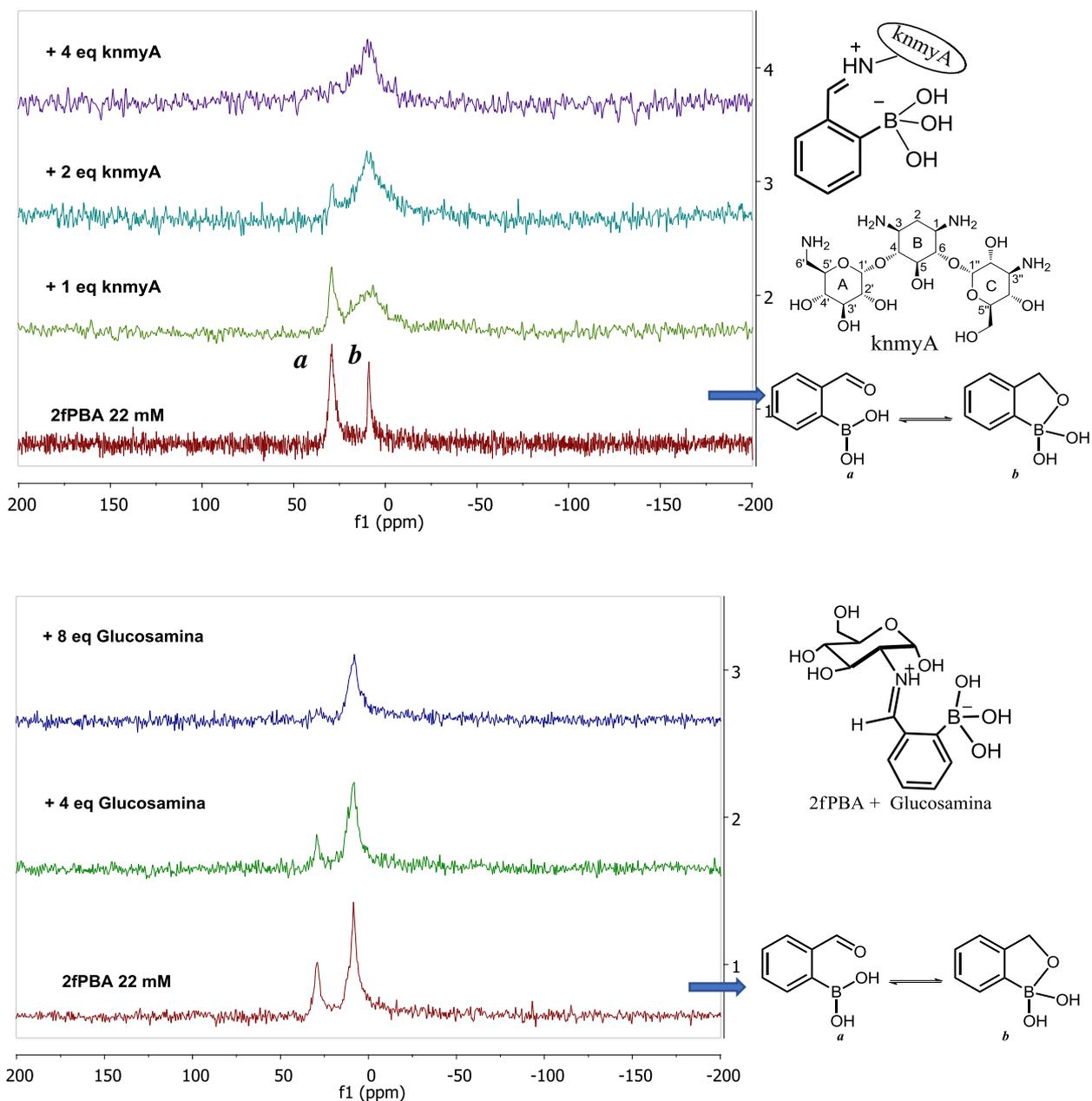


Figura 4.13 Espectros de RMN de ¹¹B. δ, ppm de para las titulaciones de 2fPBA 20 mM con a) knmyA pH 7.0 (0 – 4 Eq) en D₂O, y b) GluNH₂ pH 7.5 (0 – 8 Eq).

Experimentos en similares condiciones para las titulaciones con monoaminas requirió concentraciones muy elevadas para observar cambios que manifestaran el cambio en el ambiente alrededor del boro. Con n-BuNH₂ la señal en ~30 ppm disminuye sin observarse la desaparición completa y sólo se conserva la señal en ~8 ppm aún con una alta

concentración de la amina de más de 10 veces la necesaria para observar un mayor efecto con la knmyA. De la figura 4.13 se puede comparar que con la glucosamina es necesario utilizar el doble de la concentración utilizada con el aminoglucósido.

Estos resultados obtenidos por RMN ^{11}B , daban un claro indicio de que la formación de iminas con el 2fPBA se ve altamente favorecida hacia los aminoglucósidos frente a las otras aminas; no obstante, era necesario cuantificar dicha selectividad, lo que permitiría conocer, aparte de la selectividad, un límite de detección óptimo para el analito en estudio.¹⁷⁹

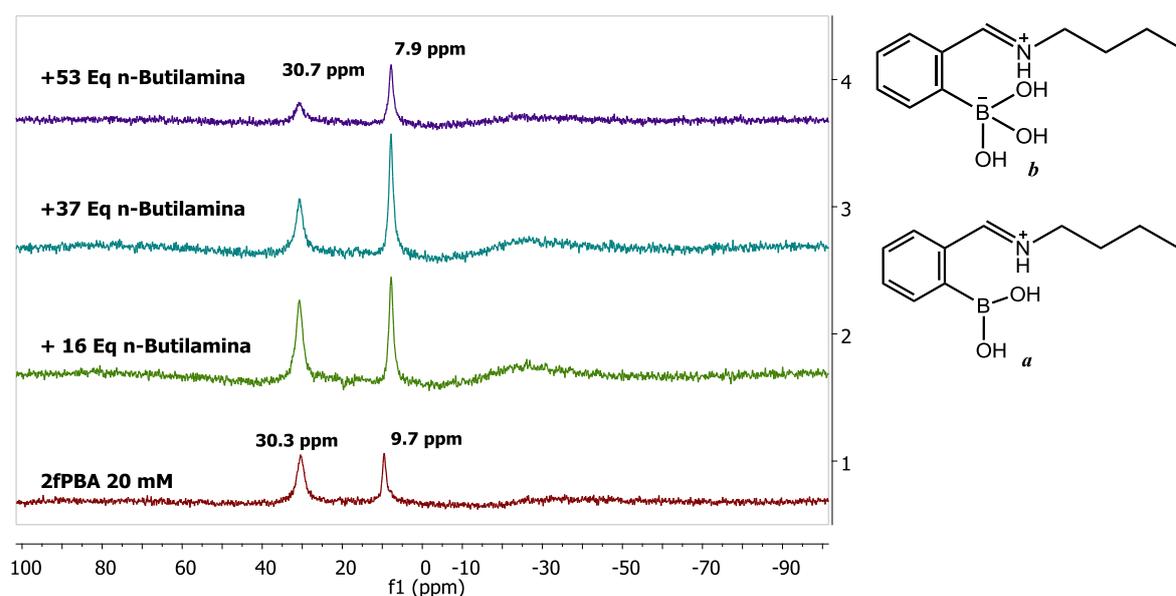


Figura 4.14 Espectros de RMN de ^{11}B . δ , ppm de 2fPBA en presencia de cantidades crecientes de n-BuNH₂, D₂O pH 7.0

La presencia de una cantidad superior en número de grupos amina en los aminoglucósidos ante los aminoazúcares y monoaminas motivó la necesidad de incluir las poliaminas SPMA y SPDN, ya que podría suponerse que el mayor número de éstos grupos de lugar a la gran diferencia en asociación con el 2fPBA. A pH =7.0 y bajo las mismas condiciones experimentales el resultado de la asociación mostrado en la tabla 4.3 nos indicó que, aunque sí fue mayor la asociación con las poliaminas frente a las monoaminas aún están muy por encima los valores hallados para knmyA y nmyc. Dado que dentro del grupo de trabajo ya se contaba con un estudio previo sobre la knmyA con datos sobre los equilibrios y la asignación de los valores de pK_a de los grupos amino, se decidió emplear este aminoglucósido para lograr profundizar en el estudio de la interacción con el 2fPBA. De este modo se condujeron los experimentos que nos permitieran caracterizar la estructura de la imina o iminas que se originaban y que resultaban en las señales observadas a través de las distintas técnicas.

4.4.1. Equilibrios de la estructura de la imina

La existencia de la base de Schiff formada *in situ* entre el 2fPBA y los analitos era un punto que ya había logrado verificar a través de los resultados de resonancia de ^1H y ^{11}B . No obstante, la razón de la alta absorción en los experimentos por espectroscopía electrónica aún quedaba por resolver.

Hasta este punto, el efecto sobre la estabilidad de las iminas observado puede ser interpretado a través de la estructura real de la imina, la cual puede estar unida por un enlace de coordinación intramolecular $\text{N}\rightarrow\text{B}$ que brindaría la estabilidad a la formación de la imina o como especie zwitterion con el enlace de la imina protonado y el grupo boronato aniónico tetraédrico. La segunda especie descrita al final de ésta sección en el esquema 4.4 (4.15), tiene una estabilidad adicional debido a la formación del enlace de hidrógeno intramolecular, tal como se describió antes, la formación de la especie zwitterion requiere la adición de una molécula de agua a 4.14 y por lo tanto no es posible discriminarla directamente de los resultados de las titulaciones en solución acuosa.

El análisis de los espectros de UV-Vis de las titulaciones realizadas con los tres isómeros, refleja que, con el 2fPBA el máximo de la absorción, después de la formación de la imina, ocurre a mayor longitud de onda (máx 288 nm) que con los isómeros 3 y 4 (hombro 265 nm) de las figuras 4.2a y b.

Con el fin de probar la formación de la imina protonada en el caso de 2fPBA, se realizó el análisis de los productos por medio de los espectros de UV-Vis. De los espectros con los tres isómeros (figuras 4.1 y 4.2) se observa que con 2fPBA el máximo de la absorción, luego de la formación de la imina ocurre a mayor longitud de onda, $\lambda_{\text{máx}}=280$ nm, que con los isómeros 3 y 4 (hombro 265 nm). Tal comportamiento es propio de la protonación de bases de Schiff, donde es común encontrar un efecto batocrómico, razón que incentiva a suponer que en este caso, el máximo desplazado se debe a la protonación del enlace imínico de la base de Schiff con el 2fPBA.^{142a,180}

Esta afirmación requería ser comprobada, el experimento que permitió notar este efecto con mayor claridad, fue el de observar la formación de la imina en un disolvente prótico, que favoreciera la especie zwitterion, y otro aprótico en el cual se evidenciara la ausencia de ella. Con este propósito se preparó la base de Schiff del 2fPBA con n-BuNH₂ en el disolvente prótico elegido, que fue etanol y para el disolvente aprótico el acetonitrilo. En ambos

disolventes el equilibrio fue completo hacia la base de Schiff, la cual fue generada cuantitativamente al mezclar las cantidades equimolares de los reactivos. En la figura 4.15 se muestran los espectros correspondientes al experimento descrito y se incluye el espectro en agua, que al contrastarlo frente al espectro en etanol es en principio el mismo, con un máximo de absorción a 282 nm, a diferencia del espectro obtenido en acetonitrilo, cuyo máximo se observa a 254 nm con hombros de absorción débil entre 290 – 300 nm.

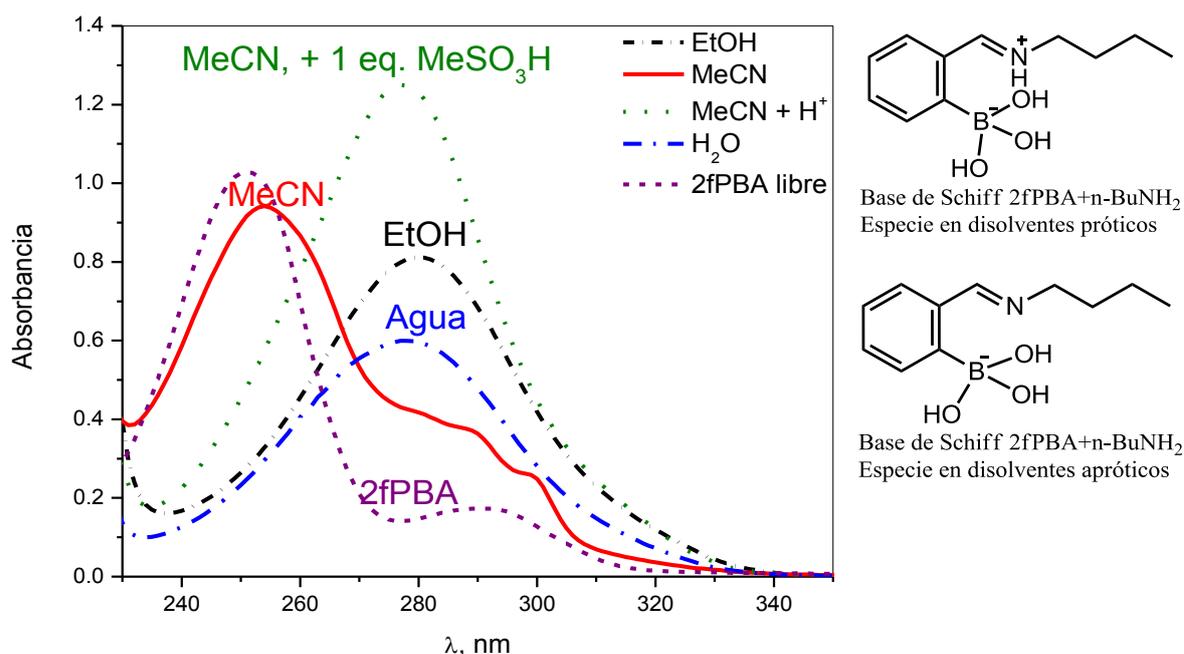
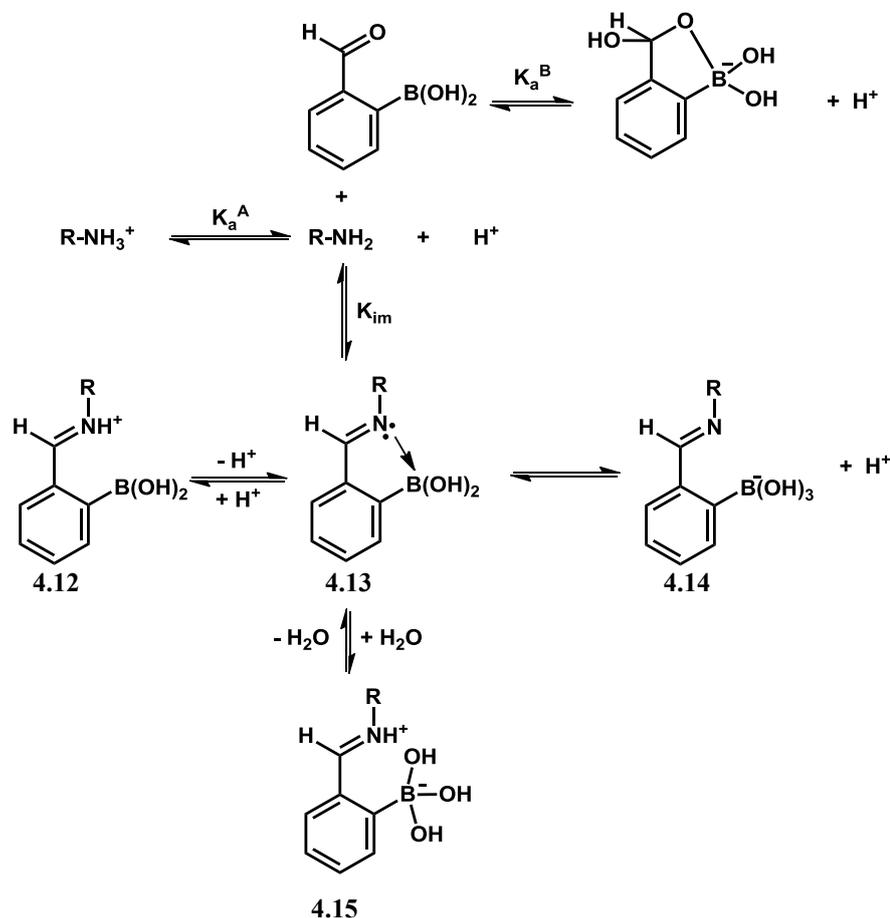


Figura 4.15 Espectros de absorción por UV-vis de las bases de Schiff 0.1 mM preparadas a partir de 2fPBA y n-BuNH₂ en etanol (EtOH), acetonitrilo (MeCN) y agua (a concentraciones de saturación de n-BuNH₂ (0.1 M) a pH =7.0). Así mismo, se incluyen los espectros en MeCN, después de añadir 1 equivalente de ácido metanosulfónico (MeSO₃H) y el espectro de 2fPBA disuelto en agua.

Es obvio que en etanol después de añadir una molécula de disolvente se puede producir la estructura zwitterion similar a **4.15**, la cual tendría un enlace imina protonado y un grupo aniónico de $-B(OH)_2(OEt)-$. Dicha estructura es improbable en el disolvente aprótico, donde la imina se espera que sea como **4.14**. Sin embargo, el agregar un equivalente de un ácido fuerte como el metanosulfónico a la solución de acetonitrilo, dio lugar a la aparición del máximo a 282 nm, lo que confirma que esta banda sin duda corresponde a la base de Schiff protonada.

A partir de estos resultados es posible plantear con certeza los equilibrios ácido-base y de condensación involucrados en la formación de las iminas, presentados en el esquema 4.3 que tiene como punto de partida los equilibrios ácido base del 2fPBA y del grupo amina libres. Luego de la interacción que da lugar a la imina, se pueden obtener ambas formas, catiónica (**4.12**) y aniónica (**4.14**). La contribución de tales especies se espera que sea baja debido a la

pérdida de estabilización por las interacciones intramoleculares. De la misma manera, como ya fue mencionado, la posibilidad de un enlace coordinado $N \rightarrow B$ (4.13), en medio acuoso, es improbable y en lugar de ello, se puede predecir que se forma la especie zwitterion (4.15).



Esquema 4.4 Equilibrios ácido base y de condensación para la formación de las bases de Schiff.

Resultados más contundentes se obtienen del espectro de RMN ^{11}B , ya que el desplazamiento para la estructura neutra (4.13) se esperaría alrededor de 14 ppm y en las estructuras zwitterion (4.15) esta señal sigue apareciendo en la misma posición del anión boronato por debajo de 10 ppm.¹⁸¹ Es importante resaltar aquí que en la estructura cristalina observada para el 2fPBA con anilina, donde se esperaba observar el enlace $N \rightarrow B$ coordinado éste no se formó¹²³ y en su lugar la imina es estabilizada por un enlace de hidrógeno intramolecular $B-O-H \cdots N$. Algunos estudios computacionales basados en los resultados experimentales de varios grupos sobre sistemas *o*-(*N,N*-dialquilaminometil)-aril-boronato demuestran que la participación de una molécula de agua (hidratación) es favorable tanto para ésteres como ácidos borónicos libres.¹²⁴

A diferencia de nuestro caso, al tratarse de iminas, se esperaría una menor contribución de la especie zwitterion, teniendo en cuenta la menor basicidad de éstas frente a las aminas, pero tal como será demostrado a continuación, también en el caso de las iminas el zwitterion es la especie predominante.

Hasta el momento todos los resultados presentados han sido en los valores de $\text{pH} = 7.0$ o 7.4 . La segunda parte de los experimentos que permitieron el análisis de los equilibrios de formación de las iminas fue el estudio a pH variable, presentado en la siguiente sección.

4.5. Perfiles de interacción a pH variable con 2fPBA

4.5.1. Monoaminas

Los espectros de absorción UV-Vis para cada valor de pH de la tabla 4.4 fueron determinados con 2fPBA 0.3 mM en disoluciones amortiguadoras de MES, MOPS o CHES 0.05 M . La disolución de los analitos se preparó en la misma disolución del ácido, para evitar los efectos de dilución, utilizando concentraciones apropiadas para alcanzar la saturación del sistema. De esta forma se efectuó la determinación de K_{obs} y se construyeron los perfiles a pH variable para las monoaminas, la GluNH_2 , la kmmyA y las poliaminas.

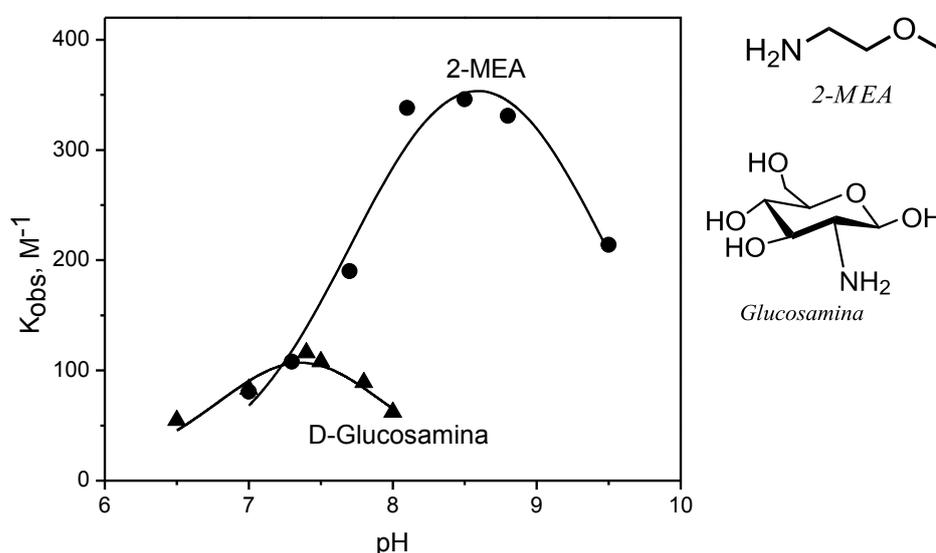


Figura 4.16 Perfiles de K_{obs} a pH variable de 2fPBA con (-▲-) D-GluNH_2 , (-●-) y 2-MEA.

Cada punto de la figura 4.16 corresponde a titulaciones por duplicado del 2fPBA con cada analito en las mismas condiciones de temperatura, pH y proporciones de concentración, a partir de los cuales se encontró que la distribución de los perfiles adoptaba una forma de campana para la D-GluNH_2 y 2MEA.

Teniendo en cuenta el diagrama de equilibrios ácido-base y de condensación del esquema 4.3 e ignorando las especies 4.12 y 4.14, se obtiene la constante de equilibrio observada para la formación de la imina (K_{obs}). K_{imina} representa la constante de equilibrio de la formación de la imina, K_a^A y K_a^B son la constante de acidez de la amina y del ácido borónico respectivamente.

$$K_{obs} = \frac{K_{imina}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_a^A}\right) \left(1 + \frac{K_a^B}{[H^+]}\right)} \quad (6)$$

La expresión 6 hizo posible obtener un óptimo ajuste de la tendencia de los perfiles obtenidos, además permite predecir el perfil observado cuyo máximo corresponde al valor del pH donde la interacción es mejor, denominado $pH_{\text{óptimo}} = (pK_a^A + pK_a^B)/2$ (Ecuación 3, sección 3.2.1). Los ajustes de los perfiles hallados son mostrados como líneas sólidas en la figura 4.16.

Tabla 4.4 Constantes de asociación (K_{obs} , M^{-1}) para kanamicina, monoaminas y poliaminas biológicas a pH variable. Solución amortiguadora 0.05 M de MES, MOPS o CHES, de acuerdo al pH.

	KNMYA	SPMN	SPDN	TFEA	GluNH ₂	GlyGly	2-MEA	Gly	n-BuNH ₂
pK_a^A	6.05, 7.45, 8.15, 9.0	10.80, 10.02, 8.85, 7.96 ¹⁸²	10.89, 9.81, 8.24 ¹⁴	5.6	7.4	8.1	9.4	9.6	10.77
pH	K_{obs} , M^{-1}								
5.5	820	-	-	-	-	-	-	-	-
6.0	1100	-	-	-	-	-	-	-	-
6.5	2140	-	-	29.5	54.6	-	-	-	-
7.0	2790	1420	1500	-	83.1	105	81	16.1	26.7
7.3	3700	-	1760	-	-	-	108	-	-
7.4	-	-	-	-	116	-	-	-	-
7.5	3070	2200	-	-	108	130	-	-	-
7.7	1930	-	-	-	-	-	190	-	-
7.8	-	-	-	-	89	171	-	-	-
8.0	1460	7150	5600	-	62	-	-	33.9	250
8.1	-	-	-	-	-	-	340	-	-
8.5	-	9850	-	-	-	-	350	-	-
8.6	1100	-	-	-	-	-	-	-	-
8.8	-	-	-	-	-	-	331	-	-
9.0	-	5250	-	-	-	-	-	-	-
9.2	370	-	2200	-	-	-	-	-	-
9.5	275	-	-	-	-	-	214	-	-

En la tabla 4.4 se presenta el resumen de los valores de K_{obs} (M^{-1}) determinados a pH variable para la knmyA, monoaminas y poliaminas, incluye también los valores de pK_a de cada uno

de los analitos. Las K_{obs} (M^{-1}) determinadas para las monoaminas se llevaron a cabo en los valores de pH seleccionados en función de su pK_a , puede notarse a partir de sus valores que, las monoaminas seleccionadas cubren un amplio intervalo de basicidad (n-BuNH₂, glicina, 2-MEA, GlyGly, D-GluNH₂ y TFEA), que abarca la diferencia en los valores de pK_a de los grupos amino de la knmyA.

Los perfiles de la asociación a pH variable con knmyA y SPMN también presentaron la tendencia con forma de campana, pero con valores de K_{obs} muy superiores a los correspondientes para las monoaminas. Tal como queda demostrado en la figura 4.17, la constante de asociación para la SPMN-2fPBA a pH =8.5 presenta un máximo muy superior incluso al máximo observado para la knmyA.

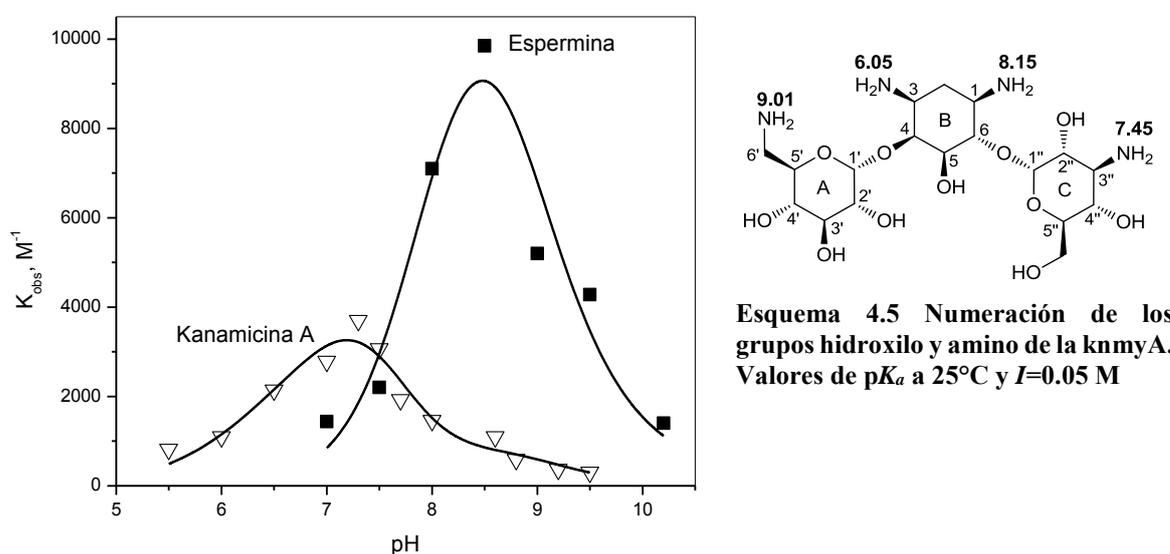


Figura 4.17 Perfil de K_{obs} a pH variable para knmyA y SPMN a 25°C, $I = 0.05 M$, (-▽-) knmyA, (-■-) SPMN, las líneas sólidas representan el ajuste teórico con las ecuaciones (4.2) y (4.3).

Antes de abordar el análisis con las poliaminas, primero se debe considerar la estructura de cada una de ellas. En el caso de la knmyA, en el esquema 4.5 se identifica como A, B y C a los anillos y dado que contiene cuatro grupos amino primarios no equivalentes, se incluyen los valores de pK_a asignados a cada uno de ellos¹⁷⁶. Los puntos (-▽-) distribuidos en la figura 4.17 corresponden a la knmyA donde se observa el máximo situado a alrededor del valor de pH 7.3, resultado que coincide con el pK_a del 2fPBA. Guiados por la predicción de la ecuación (3), de forma cualitativa se infiere que la principal contribución proviene del grupo amina con el valor de pK_a más cercano, es decir, el grupo amina del C-3'' del anillo C con pK_a de 7.45, muy alejado del observado para SPMN a pH =8.5. En ese valor de pH la afinidad del 2fPBA con la knmyA es bastante inferior en términos de la K_{obs} .

El estudio cuantitativo de los perfiles de pH de las poliaminas en general y de knmyA en particular, requiere un análisis más complejo, ya que implica considerar la formación de cada imina como un proceso independiente de la interacción de cada grupo amina con la forma neutra del 2fPBA, expresado a través de la ecuación (7), en la cual las K_{a_1} , K_{a_2} , etc., corresponden a la constante de disociación ácida de cada uno de los grupos amonio de la knmyA en orden ascendente, es decir, K_{a_1} = grupo menos ácido y K_{a_4} = grupo más ácido y K_{im_1} y, K_{im_2} , etc. son las constantes de equilibrio de la formación de iminas con los grupos amina neutros en el mismo orden.

$$K_{obs} = \frac{K_{im_1} + K_{im_2}[\text{H}^+]/K_{a_1} + K_{im_3}[\text{H}^+]^2/K_{a_1}K_{a_2} + K_{im_4}[\text{H}^+]^3/K_{a_1}K_{a_2}K_{a_3}}{(1 + K_a^B/[\text{H}^+]) (1 + [\text{H}^+]/K_{a_1} + [\text{H}^+]^2/K_{a_1}K_{a_2} + [\text{H}^+]^3/K_{a_1}K_{a_2}K_{a_3} + [\text{H}^+]^4/K_{a_1}K_{a_2}K_{a_3}K_{a_4})} \quad (7)$$

Los resultados del mejor ajuste de la expresión 7 para los datos de knmyA y SPMN se muestran como líneas sólidas en la figura 4.17. Dados los buenos resultados de los ajustes obtenidos a partir de las ecuaciones 6 para las monoaminas y 7 para las poliaminas se logró calcular las constantes de formación para cada una de las iminas. La tabla 4.5 contiene los valores respectivos para cada grupo amina.

Tabla 4.5 Constantes de formación de imina calculadas

Compuesto	pK _a	K _{im} , M ⁻¹	log K _{im}
n-BuNH ₂	10.77	6.0x10 ⁵	5.77
Gly	9.8	1.4x10 ⁴	4.15
2MEA	9.4	5.1x10 ⁴	4.71
GlyGly	8.3	2.9x10 ³	3.46
D-GluNH ₂	7.4	510	2.71
TFEA	5.6	29.5	1.47
knmyA	9.0	6.3x10 ⁴	4.80
	7.45	1.4x10 ⁴	4.15
	6.05	2.1x10 ³	3.32
SPMN	10.8	9.8x10 ⁵	6.00
	7.96	4.3x10 ⁴	4.63

A partir de éstos resultados se destaca la mayor estabilidad de las iminas que provienen de los grupos amina más básicos, como son n-BuNH₂, 2MEA y los grupos más básicos de la SPMN y knmyA, lo que deja claro que por lo menos en términos cuantitativos el grupo amina más básico de la knmyA (C6'-NH₂, anillo A) es el que forma la imina más estable.

Las K_{im} para estos cuatro grupos superan en más de un orden de magnitud a los obtenidos con las aminas cuyo pK_a es inferior a 8.0 como es el caso de la glygly, D-GluNH₂, TFEA y los grupos menos básicos de knmyA y SPMN.

Con el conjunto de datos recopilados fue posible construir el diagrama de distribución de especies entre el 2fPBA y knmyA de la figura 4.18, del cual se puede interpretar que a pesar de la alta estabilidad de los grupos amino de mayor basicidad, para los intereses del estudio en medio acuoso a valores de pH fisiológicos, en el caso de la knmyA, esta interacción contribuye poco a la K_{obs} a pH =7.0 debido a que este grupo amina se encontrará completamente protonado en esas condiciones. Sin embargo, se debe mencionar que es desconcertante la baja contribución del segundo grupo amina en orden de disminución de basicidad (C1—NH₂, anillo B) con pK_a 8.15, a tal grado que el cálculo para hallar K_{im} no es posible estimarlo de forma confiable a partir del ajuste. Por otra parte, las interacciones del tercer grupo amina (C3''—NH₂, anillo C, pK_a 7.45) y cuarto grupo amina (C3-NH₂, anillo A, pK_a 6.05) son tan fuertes, que superan en más de dos órdenes de magnitud el valor de K_{im} para D-glucosamina, monoamina de basicidad similar.

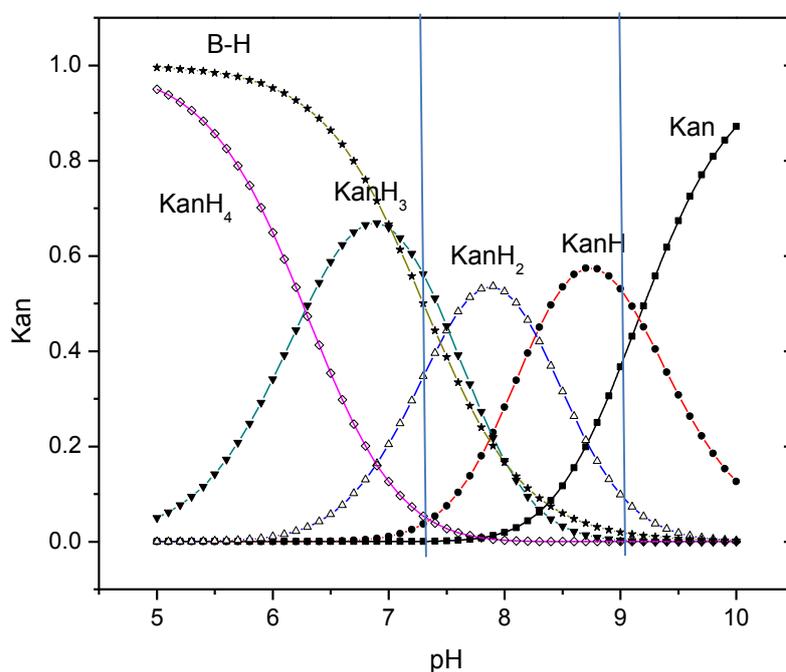


Figura 4.18 Diagrama de especies de knmyA calculado.

Los espectros de resonancia magnética complementan lo encontrado en los resultados de espectroscopía electrónica. De los espectros de RMN ¹H de knmyA de la figura 4.10 a valores de pH que abarcan los pK_a se puede observar la variación en la intensidad de las señales imina de 8.74 ppm a pH =6.5 hacia 8.68 ppm a pH =9.0, lo que manifiesta, con

seguridad, la mayor interacción con cada grupo amina de acuerdo a la distribución de las especies y a las condiciones de pH.

4.5.2. *Discusión de la asociación 2fPBA-SPMN*

La interpretación de los resultados obtenidos para SPMN es aún más complejo, ya que ésta contiene grupos amina tanto primarios como secundarios. Sin embargo, la ecuación (7) se puede aplicar para el ajuste, ya que al igual que knmyA, tiene cuatro estados de protonación formales con su propia afinidad hacia el 2fPBA. En la figura 4.17 puede observarse la línea sólida que representa el ajuste, el cual es bastante aceptable. Además, al comparar con knmyA, el pH óptimo de la asociación está desplazado hacia un mayor valor, lo que refleja la mayor basicidad de la SPMN cuyo primer pK_a es 7.96, frente al primer pK_a de la knmyA de 6.05.

Otra diferencia es que los valores calculados para K_{im} a partir del ajuste no pueden asignarse a cada grupo amino con su respectivo pK_a , como en el caso de knmyA, en la que los grupos amino están alejados entre sí y son prácticamente independientes. La SPMN posee dos pares de grupos amino primarios y secundarios, ubicados simétricamente y con una distribución más bien compleja de los grupos amina libres y protonados dentro de cada uno de los estados de protonación macroscópicos.¹⁸³

Así, sólo una asignación para K_{im} puede hacerse con certeza, la que corresponde a la forma totalmente desprotonada de la SPMN y que equivale a la primer K_{im} en la ecuación (7). Así mismo puede estimarse el valor para la última K_{im} , que corresponde a la interacción con la SPMN triprotonada a partir de los resultados a pH por debajo de 8, donde esta especie es la única forma desprotonada de la poliamina, presente en una cantidad apreciable. En la tabla 4.5 al comparar los respectivos parámetros para aminas, aminoazúcares, knmyA y SPMN se puede observar que la estabilidad de la imina formada con la poliamina neutra es semejante a la obtenida para una monoamina de basicidad similar como es el caso de la n-BuNH₂, pero en el caso de la especie triprotonada de la poliamina la formación de la imina es mucho más favorable y se obtiene una estabilidad muy superior a la observada para una monoamina de basicidad similar.

De lo anterior se concluye que, tanto en el caso de knmyA como de SPMN, la aventajada estabilidad de las iminas formadas con 2fPBA sólo es posible cuando las poliaminas se encuentran semi-protonadas.

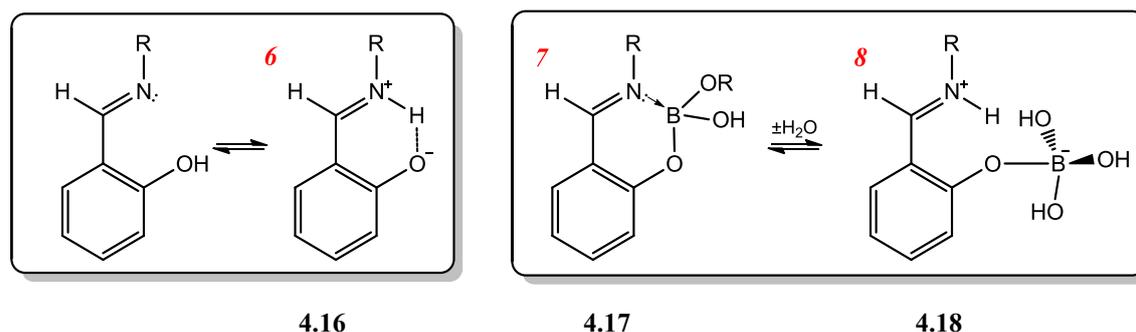


Figura 4.19 Imina del salicilaldehído y su complejo con ácido bórico.

El efecto estabilizador del par iónico interno en la estructura **4.15** evoca el ya conocido caso de estabilización de imina intramolecular por parte del grupo *ortho*-OH del salicilaldehído, **4.16**, que sucede también en bases de Schiff del piridoxal, mostrado en la figura 4.19.

Aunque los detalles de la naturaleza del efecto estabilizante en la estructura zwitterion de **4.16**, así como la contribución real de la estabilidad por resonancia y el grado de enlace de hidrógeno en el par iónico son todavía materia de estudio, el hecho de la formación predominante de la especie zwitterion está bien establecida.¹³⁷ Un resultado que llama la atención de forma particular es el hecho que la estabilidad de las bases de Schiff con monoaminas y el 2fPBA obtenidas sea superior a las descritas con salicilaldehído por un orden de magnitud, el cual puede atribuirse al efecto electrónico del ácido borónico sobre el anillo, respecto al grupo hidroxilo. En la tabla 4.6 se puede apreciar esta comparación para tres monoaminas.

Tabla 4.6 Comparación de los valores de las constantes de formación de bases de Schiff de aminas con salicilaldehído y 2fPBA.

Amina	$K_{im} (M^{-1})$	
	Salicilaldehído	2fPBA
n-BuNH₂	5.5×10^4 ^a	6.0×10^5
2-MEA	6.0×10^3 ^b	5.1×10^4
Gly	3.6×10^3 ^b	1.4×10^4

^aRef 185 ^bRef 125

Otros sistemas importantes que serán mencionados en la sección 4.5.4, son los complejos de iminas del salicilaldehído con ácido bórico o ácidos borónicos, los cuales han sido estudiados como intermediarios en su hidrólisis catalítica.^{145,184}

De allí, tanto los complejos de tipo **4.17**, similares a **4.14**, y del tipo **4.18**, similares a **4.15**, fueron propuestos con base a consideraciones generales. Sin embargo, puede notarse que el espectro UV-Vis descrito para el complejo de la base de Schiff salicilaldehído-2MEA y el

ácido bórico, **4.17a** tiene una banda de absorción a 345 nm, la cual es típica de iminas protonadas, mientras que la absorción de iminas neutras se observa a 305 nm¹⁸⁴.

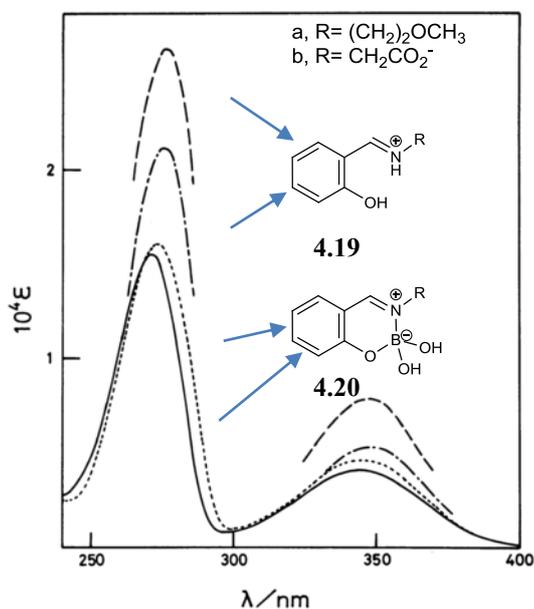


Figura 4.20 Espectro UV-Vis de iminas del salicilaldehído en presencia de borato a pH 8.94. **17a**, (—); **17b**, (····) y espectros de las iminas protonadas sin borato **a**, (---) y **b**, (-·-·). Tomado de Ref 184a

Los experimentos desarrollados a pH variable como los mostrados en las figuras 4.16 y 4.17 demuestran que las iminas del 2fPBA permanecen protonadas a valores de pH por encima del pK_a de las aminas de las cuales proceden. En el caso de bases de Schiff protonadas provenientes del benzaldehído, los valores típicos de pK_a están *c.a.* tres unidades por debajo de las formas protonadas de las aminas precursoras.^{142a,185} Por consiguiente, se espera que la presencia de un grupo boronato aniónico debe al menos compensar este efecto. El grupo fenolato en la posición *orto*- en el salicilaldehído aumenta el pK_a de un grupo imina protonado en la estructura **4.16** por seis unidades,¹³⁷ aunque gran parte de este efecto proviene de la estabilización por resonancia del catión imino, el cual es imposible con un grupo $-B(OH)_3-$. Sin embargo, el efecto inductivo (F) de B^- es mayor que el de O^- ($F = -0.42$ y -0.26 respectivamente)¹⁴⁷ y junto con la estabilización electrostática, esto puede ser suficiente para inducir el cambio advertido en el pK_a .

4.5.3. Coordenadas de Brönsted

El conjunto de la serie de datos de las constantes de formación de iminas, puede discutirse utilizando para ello la correlación de Brönsted entre $\log K_{\text{imina}}$ y el pK_a de las aminas protonadas. Esta misma correlación para aldehídos de diferentes estructuras ha sido

publicada previamente con una pendiente de 0.64.¹²⁵ En la figura 4.21 se presenta la gráfica en las coordenadas Brønsted de los datos de la tabla 4.5.

Los datos para las monoaminas (cuadrados negros) siguen una razonablemente buena dependencia lineal con valor de la pendiente 0.8 ± 0.1 . Es de resaltar que, el punto para D-GluNH₂ se ajusta a esta línea, lo cual indica la ausencia de cualquier interacción adicional del 2fPBA con los grupos hidroxilo del aminoazúcar. Un efecto semejante ocurre con el punto para el grupo amino más básico de la knmyA (6'-NH₂), que tiene la misma tendencia lineal, lo que indica que este grupo amino se comporta como una amina "normal" de su basicidad correspondiente, por el contrario, lo observado para los grupos C3-NH₂ y C3"-NH₂, es una anómala gran afinidad con el 2fPBA, que desvía los puntos a valores positivos de los esperados para grupos amina de basicidad media. En la misma línea de las monoaminas se ubica el punto para la SPMN neutra con pK_a 10.8, pero el punto correspondiente a la SPMN tricatiónica con pK_a 7.96 también presenta una gran desviación positiva. En la parte inferior de la gráfica de Brønsted se incluyen los resultados para los isómeros 3 y 4fPBA (-◇-).

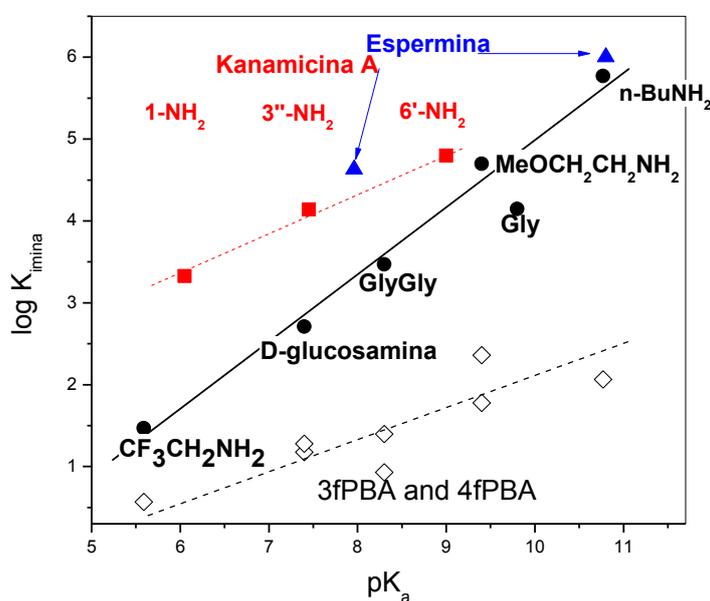


Figura 4.21 Coordenadas Brønsted de la formación de iminas entre los isómeros del ácido formil fenilborónico 2fPBA y 3 y 4fPBA (-◇-) con los analitos de la tabla 4.6.

Teniendo en cuenta que la SPMN no contiene grupos hidroxilo, la desviación positiva hacia la forma desprotonada puede atribuirse a la estabilización del grupo boronato aniónico de la imina zwitteriónica, con las interacciones provocadas por las cargas positivas adicionales en el polication protonado. La SPMN en el estado totalmente protonado tiene una conformación

todo *trans* prácticamente, lo cual hace imposible el contacto del anión boronato, aún con el grupo amonio vecino en la cadena. No obstante, en estudios de esperminas marcadas con ^2H , específicamente utilizando la técnica de RMN descubrieron que el contacto con un anión induce un alto incremento en la fracción de rotámeros *gauche* alrededor de los enlaces C2-C3, C3-C4 y C6-C7 de tal modo que el plicación lo que hace es envolver la especie aniónica.¹⁸⁶

4.6. Estudios teóricos

Con el objetivo de obtener un mejor entendimiento del modo en que ocurre la interacción de 2fPBA con knmyA y SPMN, se desarrollaron simulaciones moleculares del sistema por métodos cuánticos utilizando el funcional M06-HF/6-31G(**)¹⁸⁷ para las estructuras de las iminas formadas con los grupos amino C3-NH₂ y C3''-NH₂ del antibiótico.

4.6.1. D-glucosamina

En la simulación de la imina formada entre la D-glucosamina con 2fPBA de la figura 4.22, es visible la interacción de uno de los -OH del boronato con el -OH del C3 de la estructura formando un enlace de hidrógeno de distancia $d(\text{O}-\text{O})$ 2.49 Å y un ángulo de enlace O-H-O de 172.59°. Sin embargo, esta potencial interacción, no aporta estabilidad adicional a la formación de la base de Schiff, como se observa en los resultados experimentales.

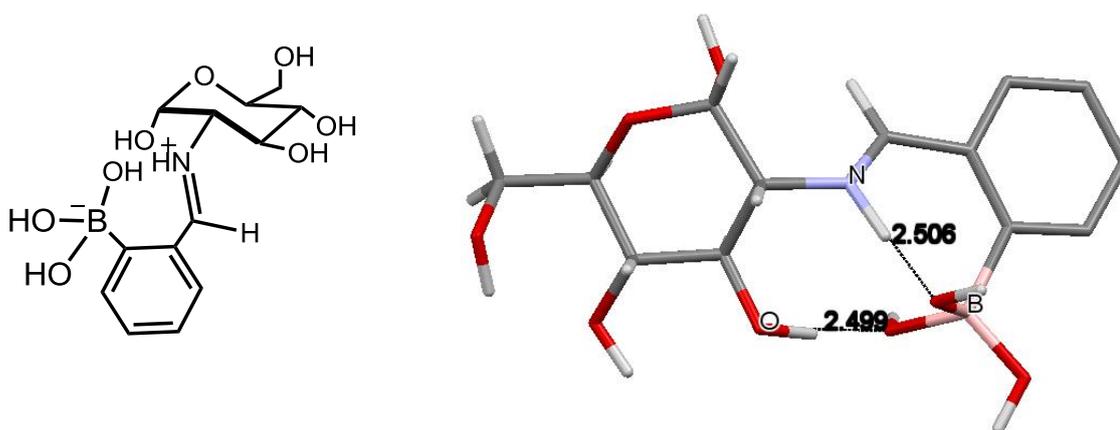


Figura 4.22 Estructura simulada de la formación de imina entre 2fPBA y D-glucosamina.

La cercanía del hidroxilo con el grupo borónico conlleva a plantear la posible formación del enlace de éster boronato en lugar del enlace de hidrógeno, sin embargo, como se verá para la knmyA, este cálculo fue realizado y la estructura minimizada está representada en la figura 4.24. La transformación de la estructura con enlace de hidrógeno de la figura 4.22 en un éster iminoboronato provoca la eliminación de una molécula de agua, esta reacción tiene un

cambio de energía calculado de $+13.55 \text{ kcal mol}^{-1}$, lo cual indica que la formación del éster iminoboronato sería desfavorable debido al aumento de la tensión por la formación de un ciclo de ocho miembros y la pérdida del enlace de hidrógeno del grupo iminio que termina siendo expulsado por el grupo boronato.

4.6.2. *knmyA*

Para la simulación de la base de Schiff con *knmyA*, fue necesario considerar los cuatro posibles sitios por los cuales podría ocurrir la reacción. Dependiendo del pH al que se lleve a cabo la condensación se podrá involucrar uno u otro grupo. Las estructuras de la figura 4.23 simulan la formación de las iminas con los grupos menos básicos entre el 2fPBA y la *knmyA*. En la figura 4.23a el -C3-NH_2 , el grupo más ácido de la *knmyA*, se observa a través de los resultados, que el considerar la formación de enlaces de hidrógeno en este caso también está favorecido. La formación de la imina puede llevarse a cabo cuando los demás grupos amino aún están protonados y puede darse una interacción adicional de par iónico gracias a una apropiada posición de los grupos amonio con el grupo boronato aniónico.

En la imina formada con dicho grupo amino, se observa que el grupo boronato aniónico está siendo estabilizado por el grupo amonio del C6' por medio de enlaces de hidrógeno aparte del enlace de hidrógeno con el grupo iminio, además, debe notarse que esta posición deja al ácido borónico fuera del alcance de los hidroxilos de la *knmyA*. En este caso las distancias de los enlaces de hidrógeno son menores que las encontradas para la base de Schiff con la SPMN, como se describe más adelante, con distancias de enlace $d(\text{N-O})$ 2.47 y 2.60 Å y ángulos de enlace (N-H-O) de 167.5 y 172.4° para los grupos iminio y amonio respectivamente; lo más probable es que tal efecto esté asociado con la mayor rigidez del esqueleto del aminoglucósido. A partir de esta simulación se observa que la posible interacción del grupo boronato con hidroxilos de la *knmyA* es prácticamente nula, confirmando que la estabilidad adicional observada en la formación de la base de Schiff, en este caso, debe atribuirse a la estabilización electrostática proporcionada por los enlaces de hidrógeno formados con los grupos amonio.

En la estructura simulada para la imina con el siguiente grupo amino en orden de aumento de la basicidad, el C3''-NH₂, las razones para la mayor estabilidad encontrada son menos evidentes, dado que tal como se observa de la figura 4.23b, la formación de la imina con el grupo amino del C3'' hace que el grupo boronato quede alejado de cualquier interacción con los otros grupos amino aún protonados y en lugar de esto se observa un enlace de hidrógeno

con el C4–OH del anillo C con distancia $d(\text{O}–\text{O})$ 2.59 Å y ángulo O–H...O de 175.2°. Por otra parte, cuando el grupo amino de –C6'–NH₂ logra neutralizarse para dar inicio a la formación de la base de Schiff, los demás grupos amino ya no se encuentran protonados y por lo tanto no pueden brindar ninguna estabilidad adicional a la interacción.

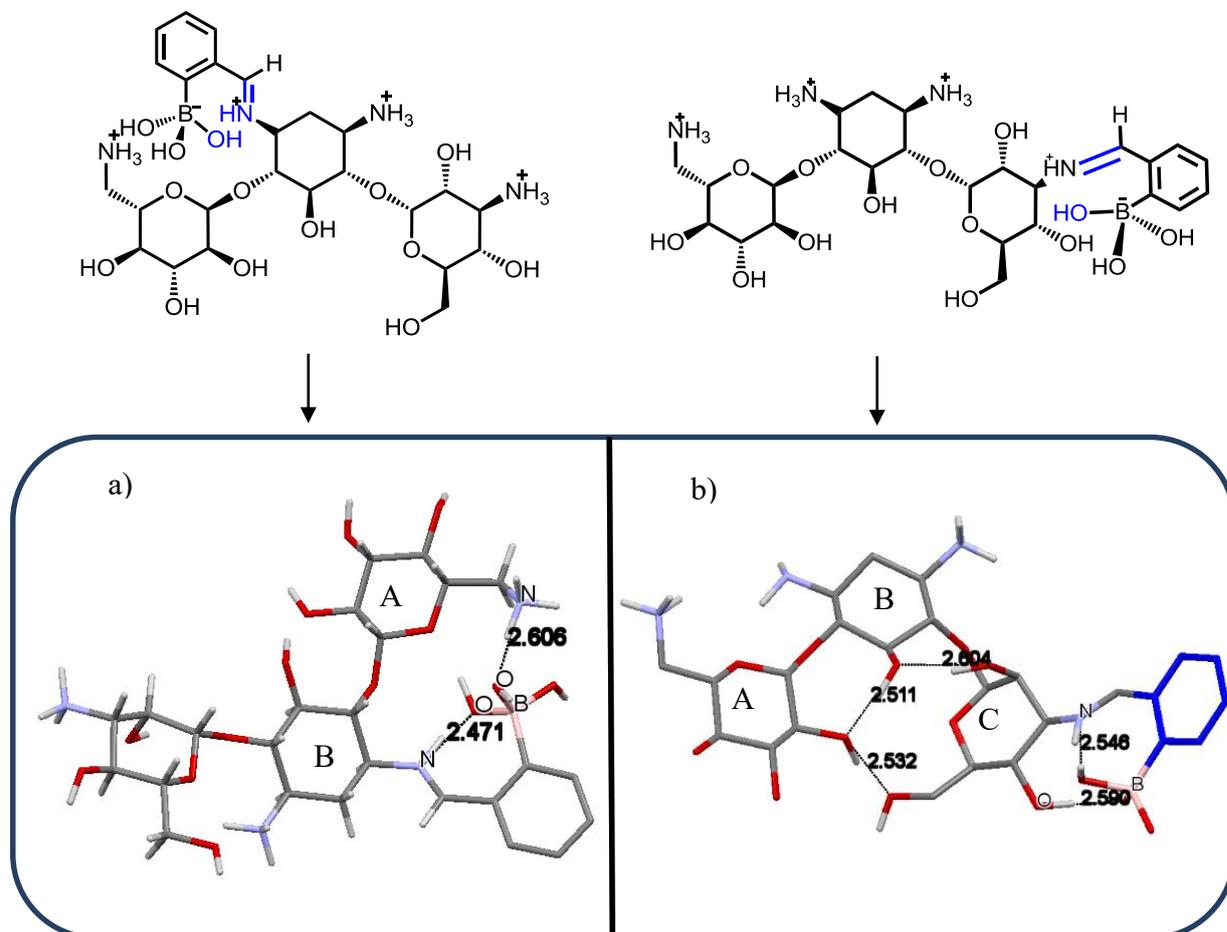
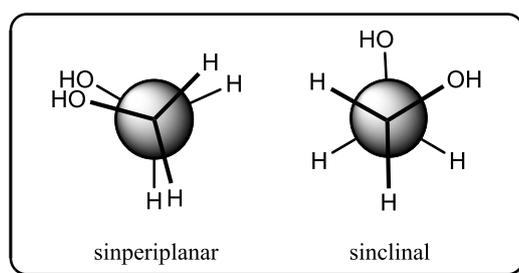


Figura 4.23 Estructuras simuladas de las iminas formadas entre el 2fPBA y los grupos amino C3-NH₂ (a) y C3''-NH₂ (b).

Las energías calculadas para las reacciones de 2fPBA con el grupo C3''-NH₂ de la knmyA y el de la D-glucosamina en medio acuoso son $-41.0435 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $-33.4045 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente, lo que demuestra que efectivamente la formación de la base de Schiff del 2fPBA con el antibiótico es significativamente más exotérmica. A primera vista, el origen de este gran aumento en la estabilidad no es muy claro. Sin embargo, a partir de observar en detalle la conformación del aminoglucósido después de la formación de la imina, se tiene que ésta ejerce un notable cambio conformacional, el cual causa que el anillo C sea empujado más cerca del anillo A, haciendo más compacta la estructura. Este nuevo ordenamiento da lugar a la formación de tres enlaces de hidrógeno intramoleculares entre cuatro grupos

hidroxilo (C2''OH-C5OH-C2'OH-C6''OH) de la knmyA, logrando de este modo incrementar la estabilidad por medio del consabido “efecto cooperativo”.¹⁸⁸

Un efecto similar es observado en el caso de los demás aminoglucósidos. Sin embargo, debido a la presencia de los grupos hidroxilo en ellos, no puede excluirse la estabilización adicional de la base de Schiff a través de la posible formación de ésteres boronato.



Esquema 4.6 Proyecciones Haworth de las posiciones de los hidroxilos en la knmyA

Aunque en general los grupos hidroxilo de los aminoglucósidos tienen una conformación desfavorable para la formación de ésteres boronato, en el caso concreto de la knmyA hay tres grupos hidroxilo en el anillo A, todos de conformación *sinclinal* (alternada gauche) mientras que la formación de ésteres boronato requiere que la conformación de los hidroxilos sea *sinperiplanar* (eclipsada anti).¹⁵⁴

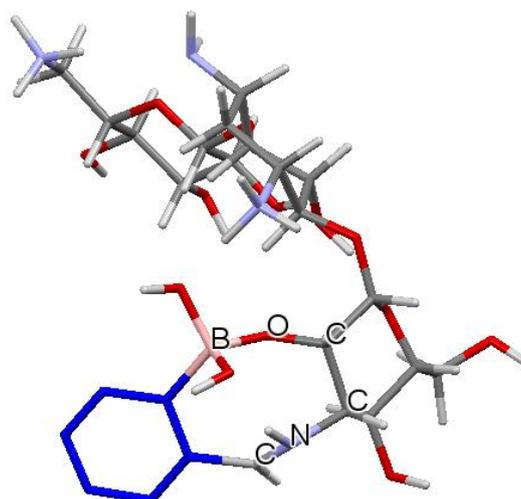


Figura 4.24 Estructura simulada de la formación del éster iminoboronato entre el 2fPBA y knmyA.

La estructura del diol 4'',6'' en el anillo C generalmente es un sitio de asociación más bien débil^{154,189} y la knmyA pierde el hidroxilo anomérico, el cual es el sitio de asociación principal para la formación de los ésteres boronato con los carbohidratos, pero aquí está comprometido con la formación del enlace glucosídico. En acuerdo con lo especificado no se observó interacción entre la knmyA y el PBA aún a concentraciones superiores a 0.01 M

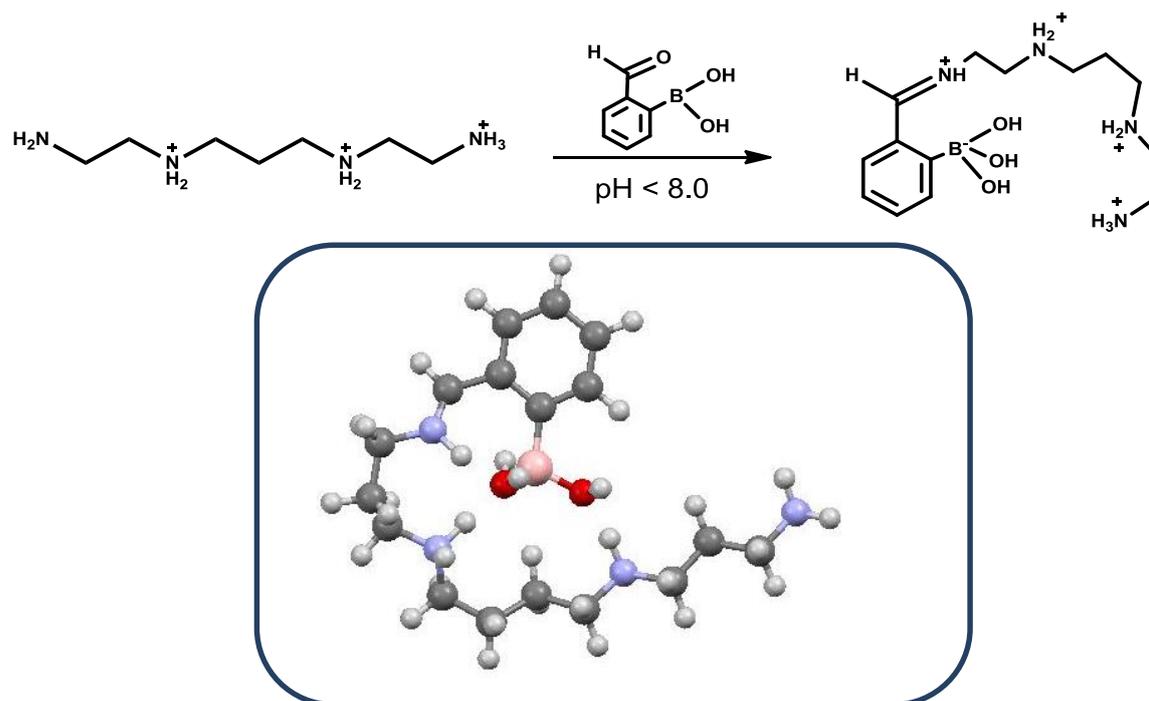
y valores de pH por encima de 10. En los resultados de los espectros de RMN ^{11}B , la formación de ésteres podría verse reflejada en las señales de $-\text{B}(\text{OH})_3^-$ libre y tetraédrico, donde el grupo éster debería distinguirse aunque fuera por un ligero cambio. Sin embargo, el gran ensanchamiento del espectro en presencia de knmyA no permite detectar esta diferencia con claridad.

Para llegar a un mayor entendimiento del modo en que ocurre la interacción de 2fPBA con knmyA, incluyendo la posible formación de algún éster iminoboronato, se desarrollaron las simulaciones moleculares descritas y en la formación de la imina con el grupo $\text{C}3''-\text{NH}_2$, el hidroxilo que queda próximo al grupo borónico podría estar involucrado en la formación del éster boronato, en lugar de un enlace de hidrógeno. La simulación de esta posible estructura está representada en la figura 4.24. El resultado es que la transformación del enlace de hidrógeno de la figura 4.23b en el éster iminoboronato de la figura 4.24 requiere la eliminación de una molécula de agua. El cambio de energía calculado para esa reacción es $+13.55 \text{ kcal mol}^{-1}$, lo cual indica que la formación del grupo iminoboronato sería desfavorable por una parte por la deformación inducida y por otra, por la pérdida del enlace de hidrógeno del grupo iminio $-\text{NH}^+$.

4.6.3. Espermina

Aprovechando que el estudio por nivel cuántico M06-HF/6-31G(**) permite considerar estructuras que tengan en cuenta la solvatación en agua, se logró simular la estructura de la imina formada con el grupo amino terminal de la SPMN tri-protonada, ver esquema 4.6 de la sección 4.4.1. En la estructura minimizada se puede observar claramente la conformación *gauche* en los tres C—C esperados, los cuales permiten la formación de tres enlaces de hidrógeno iónicos de corto alcance $\text{N}\cdots\text{H}-\text{O}$ cuyos ángulos ($162.3^\circ-177^\circ$) y distancias N—O ($2.52-2.75 \text{ \AA}$), concuerdan con los respectivos parámetros descritos para estructuras cristalinas de ésteres de arilboronatos con grupos amino protonados en posición *orto*.^{122,181,190}

De igual manera, las distancias calculadas para B—N, oscilan entre $3.0-3.9 \text{ \AA}$, los cuales son valores que están en el intervalo de los parámetros usuales para este tipo de estructuras. Por lo tanto, el aumento en la estabilidad de las bases de Schiff con las formas parcialmente protonadas de SPMN, puede explicarse satisfactoriamente, si se tiene en cuenta la posibilidad de los múltiples enlaces de hidrógeno provistos por los grupos amonio, además de los aportados por el grupo imina.



Esquema 4.7 Interacción del grupo amino menos básico de la SPMN con 2fpBA y simulación de la estructura obtenida por M06-HF/6-31G()**

Con los resultados experimentales y los cálculos de las estructuras simuladas, se puede concluir que las razones del aumento en la estabilidad de las bases de Schiff entre el 2fpBA y las formas semi-protonadas de la knmyA son, con mayor probabilidad, el resultado de la formación de enlaces de hidrógeno del grupo boronato aniónico con los grupos amonio apropiadamente ubicados del antibiótico o a cambios conformacionales, en lugar que a la formación de ésteres borónicos.

Una revisión en detalle de los resultados obtenidos a $\text{pH} = 7$ para las K_{im} de monoaminas y poliaminas demuestra un estrecho intervalo entre ellas con sólo un orden de magnitud de diferencia, lo cual puede explicarse con ayuda de la correlación de Brönsted. El principal factor que aumenta la estabilidad de las bases de Schiff es el aumento en la basicidad, según los datos observados luego de efectuar la correlación en la figura 4.21 de la correlación de Brönsted. Sin embargo, la fracción de amina libre a $\text{pH} = 7.0$ va a ser menor para las aminas más básicas y dado que la pendiente de Brönsted es cercana a la unidad, puede decirse que unos efectos estarían compensando a los otros.

Adicionalmente la diferencia en un grado de magnitud entre las K_{im} de monoaminas y poliaminas atribuidas a los efectos estabilizantes de par iónico $-\text{NH}_4^+$ y $-\text{B}(\text{OH})_3^-$ corresponde justamente a -6.5 kJ mol^{-1} , es decir, al incremento de energía libre promedio de una interacción de par iónico en complejos supramoleculares.¹⁹¹

4.7. Conclusión

En este capítulo se utilizó una variedad de analitos suficiente que permitiera estudiar en un amplio intervalo de pH con detalle las cualidades del 2fPBA. Inicialmente, se presentaron los resultados con aminoazúcares, aminoglucósidos y monoaminas de prueba.

Respecto al efecto anomérico en los aminoazúcares, se confirmó que, tal como está descrito en la literatura, para los tres representantes más importantes de ese grupo, la galactosamina formó la imina más estable, la glucosamina en segundo lugar y por último la manosamina, la cual debido al comportamiento anómalo por la posible dimerización que da lugar al anillo de pirazina, presentó cambios espectrales distintos a los observados para los otros aminoazúcares. Al continuar con el estudio con los aminoglucósidos, al ser estos compuestos policatiónicos en solución acuosa a pH neutro, se tuvo que evitar la interferencia de la solución amortiguadora de fosfato que perturbaba los análisis. El uso de los amortiguadores derivados del ácido sulfónico permitió implementar los experimentos sin las desviaciones que ocasionaban los iones fosfato.

Luego de elaborar el diagrama de los equilibrios ácido-base involucrados en la formación de las iminas, fue posible demostrar que al combinar los resultados que aportaban las técnicas de UV-Vis y RMN ^1H y ^{11}B , la estructura de la imina que ocasiona la gran respuesta óptica se trataba de una especie zwitterion. De allí se puede explicar que gracias al efecto estabilizador provocado por las interacciones electrostáticas del grupo boronato en la posición *-orto* con el grupo iminio, se obtiene una K_{im} que es superior para las monoaminas-2fPBA, frente a los otros isómeros. En el caso de los aminoglucósidos, la asociación y estabilidad mucho mayor se entendió a través de un análisis similar, sin embargo, dados los interesantes resultados observados, se incluyeron compuestos que solo contuvieran grupos amina. Las poliaminas SPMN y SPDN se incluyeron en el estudio por UV-Vis y RMN ^1H , donde, adicional a lo ocurrido con las monoaminas, la presencia del grupo boronato demostró estabilizar la formación de la imina con resultados de K_{im} cercanos.

La última parte del capítulo expone los resultados de las simulaciones teóricas para glucosamina, kanamicina y espermina, en un nivel cuántico que permite considerar la solvatación de las estructuras formadas. Este estudio confirmó las predicciones formuladas con base a los resultados experimentales. Para la glucosamina se observó que la formación del éster boronato no favorece energéticamente a la estructura, en lugar de ello lo que se tiene es la formación de la imina, estabilizada a través de un enlace de hidrógeno entre uno

de los –OH del ácido con el –NH de la imina. Para la knmyA y la espermina, los cálculos permiten apreciar de forma explícita el arreglo conformacional que se genera alrededor del grupo boronato ocasionado por las interacciones electrostáticas de los grupos amino protonados con el grupo borónico ionizado, pero en gran medida por la participación de enlaces de hidrógeno que aportan estabilidad extra a la estructura de la imina formada.

Si se tiene en cuenta la gran absorción debida a las iminas protonadas formadas, la respuesta espectral para la interacción de aminoglucósidos con 2fPBA es bastante grande y permite la detección de cantidades tan bajas como 10 μM de knmyA o nmcyB, inclusive en presencia de azúcares, aminoazúcares o aminoácidos. Por otra parte, el procedimiento analítico puede ser mejorado si se utiliza la técnica de desplazamiento de indicador descrito en la sección 3.2.1., con el ácido cromotrópico (CTA), un posible candidato idóneo como indicador fluorogénico en la detección de knmyA en disoluciones neutras.

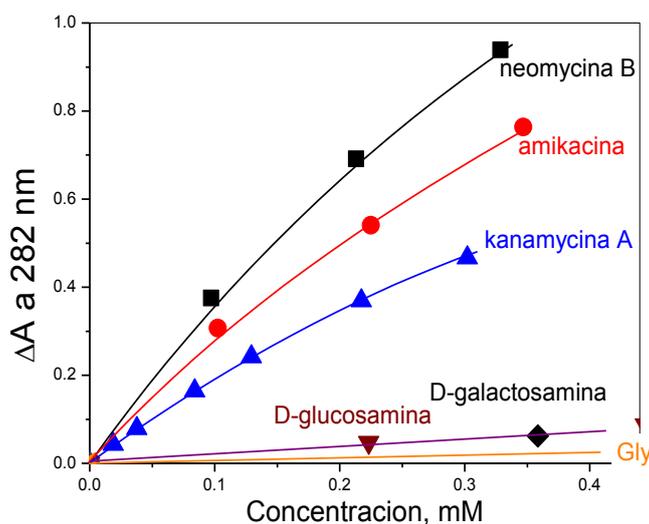


Figura 4.25 Primera sección de las titulaciones espectrofotométricas de aminoglucósidos y aminoazúcares a 282 nm con 2fPBA 0.3 mM a pH 7.3.

El incluir nuevos compuestos que puedan tener propiedades de inhibir la capacidad de algunas bacterias para evolucionar a formas resistentes a los antibióticos es relevante en el ámbito de la medicina clínica. Con la premisa anterior presente, se emplearon derivados de ácidos borónicos con diferentes sustituyentes R-, que varían entre, alquil y heterociclos y combinaciones entre ellos, los cuales son reconocidos por su capacidad inhibitoria directamente en enzimas β -lactamasas.¹⁹²

5. Resultados y discusión de la asociación de los heterociclos análogos del ácido fPBA con aminoazúcares, aminoglucósidos y aminas.

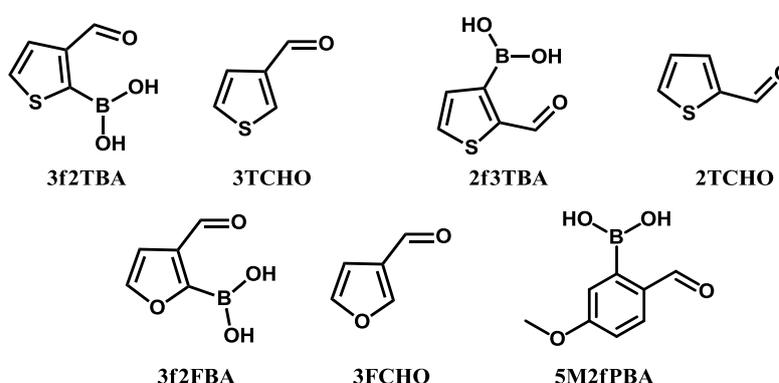
5.1. Introducción

Los ácidos borónicos son reconocidos por ser agentes inhibidores útiles, algunos compuestos son utilizados como “antirresistentes” ya que tienen un amplio intervalo de estructuras funcionales y pueden inhibir las β -lactamasas en forma reversible y competitiva. Este mismo principio puede ser empleado en el diseño de receptores basados en ácidos formil-borónicos, tras las propiedades observadas de formar bases de Schiff cromogénicas y estables. Con este fin, se estudió la asociación de los ácidos borónicos derivados de formil- tiofeno y furano, además, como evidencia de la acción del grupo borónico en la formación de la especie imina, se incluyen los aldehídos correspondientes. De tal manera que, se intenta evaluar si estas estructuras son diferencialmente afines hacia cierto tipo de analitos entre aminoglucósidos, aminoazúcares o aminas.

Por otra parte, se incluyó una modificación del anillo del 2fPBA con un grupo electrodonador como una alternativa a mejorar los isómeros evaluados hasta ahora. Los analitos seleccionados para estudiar la afinidad de los heterociclos hacia alguno de los patrones estructurales, incluidos en la presente Tesis doctoral, fueron la monoamina 2MEA, el aminoazúcar GluNH₂ y los aminoglucósidos knmyA y nmyc, y su interacción se estudió por medio de la técnica de UV-Vis.

5.2. Caracterización por espectroscopía UV-Vis

Los compuestos usados como receptores en este capítulo son presentados en el esquema 5.1. Para lograr comparar el efecto simultáneo del grupo formil y borónico en la estructura de los heterociclos, se incluyeron los aldehídos libres y sustituidos con el ácido borónico. Los compuestos se analizaron por medio de la técnica de UV-Vis en condiciones experimentales similares a las usadas con los isómeros del fPBA. La concentración de cada receptor correspondió a la mejor solubilidad de cada ácido en un intervalo de 0.02 – 0.2 mM. Los cuatro analitos con los que se llevó a cabo el análisis cualitativo fueron preparados en una disolución del aldehído o ácido, la cual a su vez estaba preparada en disolución amortiguadora MOPS 0.01 M a pH 7.0.



Esquema 5.1 Receptores utilizados en el estudio de la interacción con los isómeros del fPBA

La sustitución del ácido borónico en compuestos heterocíclicos se espera que haga aumentar la acidez del mismo, por lo tanto, se puede suponer que los resultados a pH =7.0 podrían ser mejores frente a los sistemas ya estudiados con los isómeros del fPBA. Los máximos de absorción de los derivados heterociclos son 254 nm para el isómero tiofeno-3-carbaldehído (3TCHO), 257 nm para el tiofeno-2-carbaldehído (2TCHO), al igual que en el furano-3-carbaldehído (3FCHO). El efecto electrónico inmediato observado, al sustituir el anillo con el grupo borónico en los compuestos aldehídos de los heterociclos es el desplazamiento batocrómico del máximo de absorbancia. La figura 5.1 muestra la absorción de los aldehídos del tiofeno 2TCHO y 3TCHO, así como los cambios espectrales tras el incremento en la concentración de los analitos señalados en cada caso.

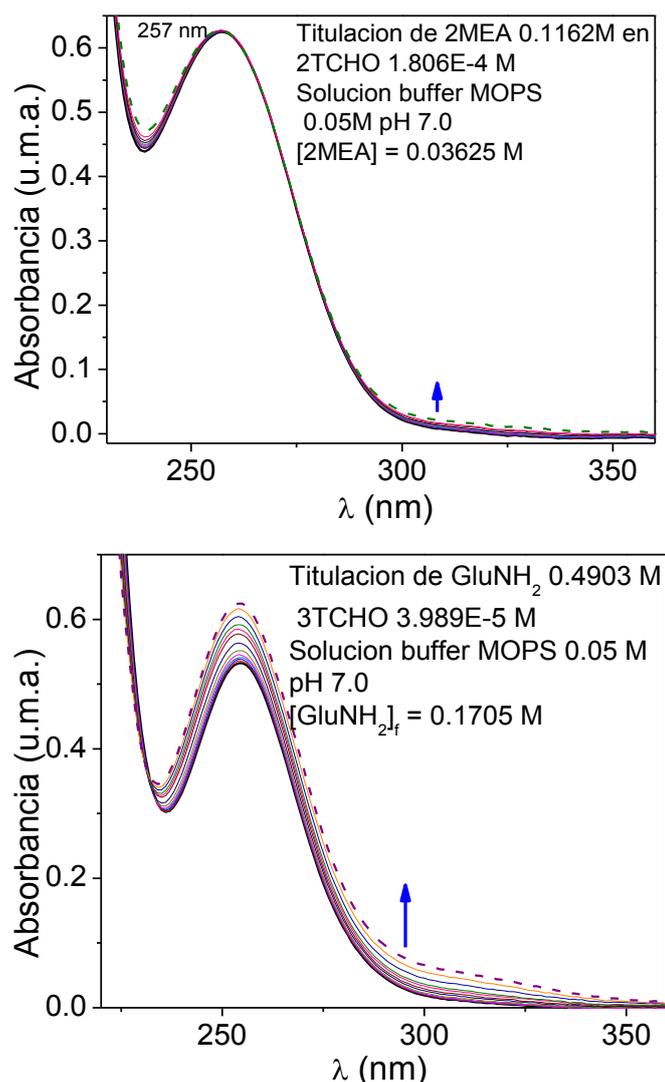


Figura 5.1 Cambios espectrales para titulaciones espectrofotométricas de a) 2TCHO 0.18 mM con 2MEA (0–36 mM), b) 3TCHO 0.04 mM con D-Glucosamina (0 – 17 mM)

5.3. Análisis de la asociación de los compuestos heterocíclicos con 2MEA, GluNH₂, knmyA y nmcyB

El propósito del estudio de la asociación de los ácidos borónicos de heterociclos es observar si es posible mejorar la detección de los analitos estudiados en los valores de pH de interés biológico y medios acuosos. En línea con esta motivación se comparó la respuesta con los aldehídos de los heterociclos libres de ácido borónico. Con lo anterior pretendía observar el efecto de la modificación estructural primero en el ácido borónico y luego en el heterociclo. Se puede apreciar en la figura 5.2a y 5.2b que al menos a pH 7.0 no se detectó la formación de iminas de los aldehídos con ninguno de los analitos. La interacción con 2MEA en todos los casos fue para los fines prácticos nula, como se observa en la figura 5.1a, y sólo en el caso de los aminoglucósidos hubo ciertos cambios espectrales que podrían suponer la

formación de iminas, pero tras el análisis cuantitativo la interacción era muy débil para ser calculada con exactitud y ser considerada.

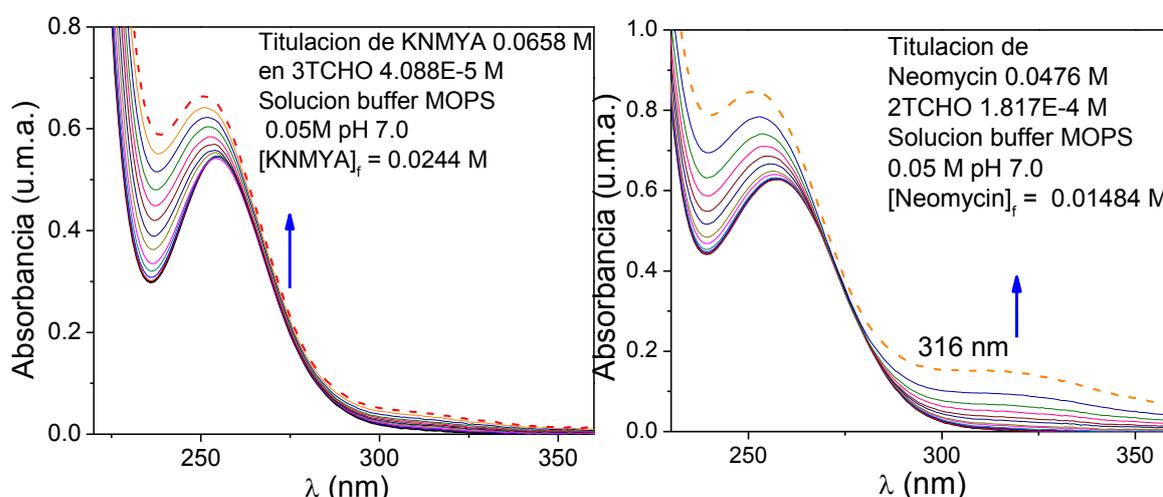


Figura 5.2 Cambios espectrales para titulaciones espectrofotométricas de a) 3TCHO 0.045 mM con knmyA (0–24 mM), b) 2TCHO 0.18 mM con nmcy (0–15 mM). Solución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.0.

Como se mencionó antes, el ácido borónico tiene un efecto batocrómico en el $\lambda_{\text{máx}}$ y se comprobó, cómo se esperaba, que su presencia tendría un efecto estabilizador hacia la formación de las bases de Schiff, sin embargo sólo fue notorio en las titulaciones con GluNH_2 y los aminoglucósidos.

Algunos cambios en las bandas de absorción fueron observados sólo para los compuestos 2f3TBA y 3f2FPBA. Dado que el interés de las pruebas cualitativas era el de comparar y observar si se podría mejorar la respuesta óptica de la asociación con los analitos frente al obtenido con los isómeros del fPBA, no se cuenta con los datos de la acidez (pK_a) de los compuestos heterocíclicos. Lo anterior, da lugar a suponer que la acidez del compuesto 2f3TBA podría estar más cercana al pH óptimo en el valor de pH 7.0 utilizado, es posible que la acidez de Lewis en el anillo de tiofeno genere un ambiente débil electrónicamente en el átomo de boro y por ello sea mejor frente a los otros derivados.

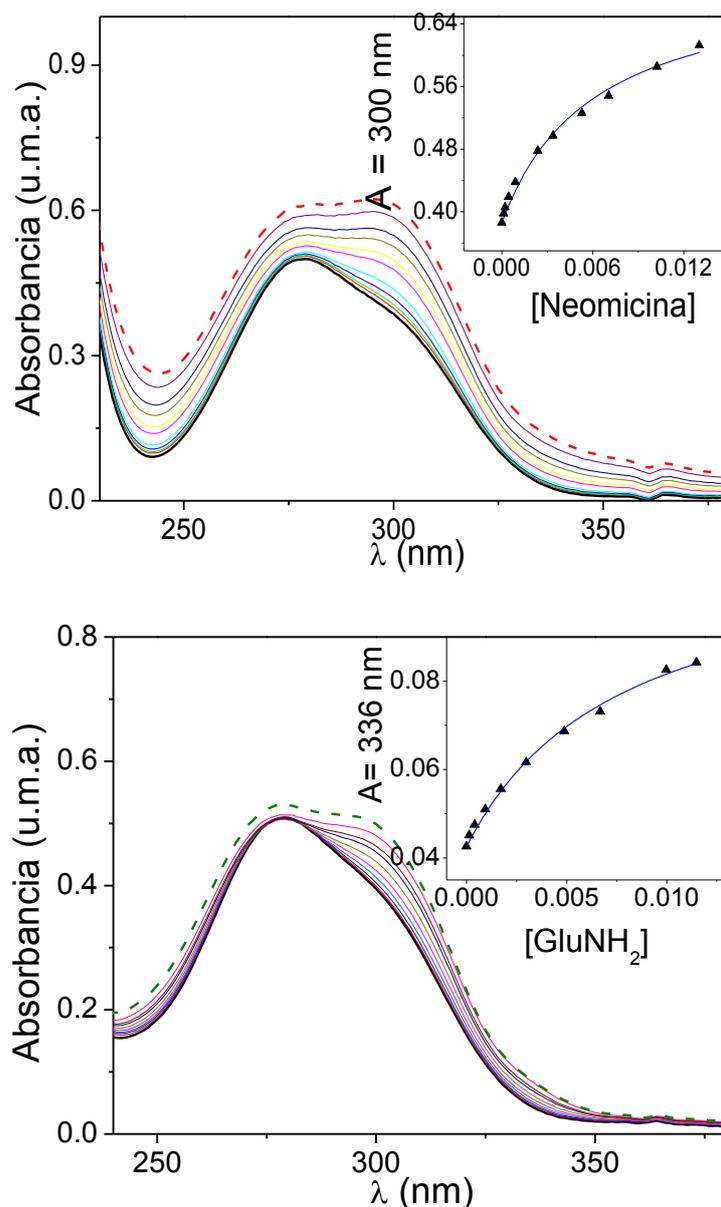


Figura 5.3 Cambios espectrales de titulaciones espectrofotométricas de 2f3TBA 0.046 mM con a) nmcy (0 – 14 mM) y b) GluNH₂ (0 – 12 mM), en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.0.

La menor K_{obs} en los heterociclos que la K_{obs} en los derivados del fPBA puede estar relacionada con el tamaño del heteroátomo y la rigidez del anillos, afectando la estabilidad vista por las interacciones electrostáticas del grupo boronato ($-\text{BO}_3^-$) y la imina protonada en las bases de Schiff descritas en el capítulo 6 y en este caso las interacciones del oxígeno o azufre con el boro disminuyan tal efecto. Sin embargo, sin un estudio más profundo sobre la asociación y formación de ésteres o iminas de compuestos de ácidos borónicos formil-heterociclos es difícil dar una apreciación contundente sobre los factores que están afectando la respuesta óptica.

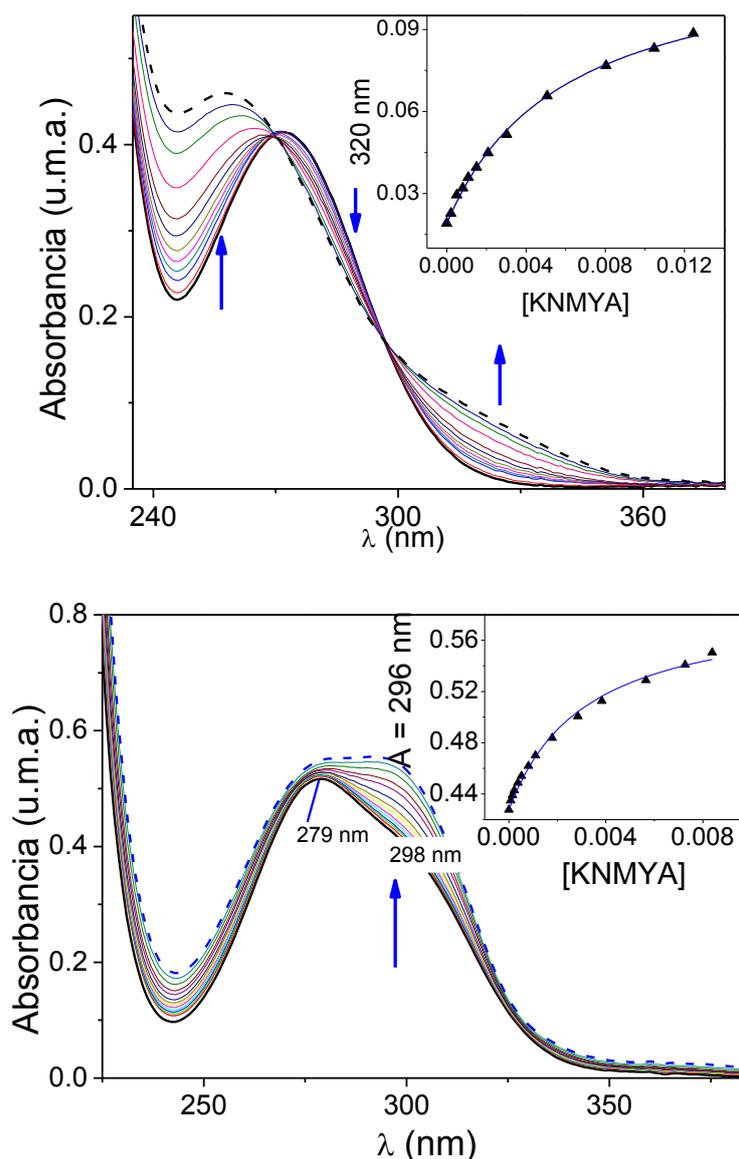


Figura 5.4 Cambios espectrales de titulaciones espectrofotométricas de a) 3f2FBA 0.090 mM con knmyA (0 – 12 mM) y b) 2f3TBA 0.048 mM con knmyA (0 – 12 mM), en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.0.

En las figuras 5.3 y 5.4 se aprecia que las titulaciones con los ácidos borónicos confirieron mejor estabilidad a la formación de la base de Schiff, tanto que fue posible calcular los valores de las constantes consignados en la tabla 5.1 que contiene el resumen de las K_{obs} (M^{-1}) para los casos en los que fue detectable asociación. Se destacan los valores obtenidos para el compuesto con tiofeno 2f3TBA y furano 3f2FBA con el aminoglucósido knmyA, cuya K_{obs} fue cercana o mayor de 200 M^{-1} .

Tabla 5.1 Resumen de constantes observadas K_{obs} (M^{-1}) de la asociación de los aldehídos y ácidos borónicos derivados de los compuestos heterociclos y el 5M2fPBA.

	<i>2MEA</i>	<i>GluNH₂</i>	<i>knmyA</i>	<i>nncy</i>
2f3TBA	-	128 ± 15 (336 nm)	319.1 ± 24 (305 nm)	157.3 ± 27 (296 nm) 163.4 ± 26 (300 nm)
2TCHO	-	7.7 ± 0.7 (258 nm)	-	-
3f2TBA	-	-	-	-
3TCHO	-	5 ± 0.4 (255 nm)	12.6 ± 5 (320 nm)	-
3f2FBA	-	2.2 ± 0.2 (310 nm)	193.1 ± 12 (310 nm)	42.3 ± 4 (258 nm)
		4.3 ± 0.4 (320 nm)	168.4 ± 10 (320 nm)	22.0 ± 4 (310 nm) 24.3 ± 4 (320 nm)
3FCHO	-	7.3 ± 0.8 (257 nm)	10.6 ± 7 (320 nm)	18.6 ± 2 (257 nm)
5MeO2fPBA	-	3 ± 0.8 (258 nm)	9 (281 nm)	-
		2 ± 1.5 (310 nm)		

5.3.1. Discusión de los resultados preliminares con ácidos borónicos heterocíclicos

Las bases de Schiff son un sintón ampliamente elegido para la construcción de variadas estructuras en el área de la dinámica molecular basado en la versatilidad de la función imina. La asociación de los analitos seleccionados con los compuestos heterociclos confirma que la estabilidad de esta función es sensible a los efectos electrónicos ocasionados por el ambiente que la rodea, lo cual es un buen recurso al momento de diseñar receptores específicos hacia cierto tipo de analitos. Los presentados aquí son derivados del ácido borónico disponibles que pueden contribuir a la construcción de la biblioteca (*colección*) dinámica combinatoria de compuestos con cualidades similares a los de otros receptores sin recurrir a procedimientos de síntesis sofisticados¹⁹².

Algunos reportes previos demuestran que la presencia de heterociclos en el anillo del PBA puede modificar el comportamiento de la resistencia bacteriana con antibióticos derivados de β -lactamas. Entre el grupo de heterociclos, la mejor respuesta a la asociación se obtuvo con el derivado del tiofeno, 2f3TBA. Estos resultados son un estímulo hacia la importancia de ampliar el conocimiento de los cambios estructurales en receptores simples. Otros trabajos, como el realizado por el grupo de Wang han utilizado compuestos con propiedades fluorescentes de derivados del 2-benzotiofeno para el reconocimiento molecular de carbohidratos. En dicho trabajo obtuvieron una mejora sustancial en la detección, frente a la hallada para el PBA, como es el caso de glucosa con una K_{obs} de 38 M^{-1} y 1342 M^{-1} para la fructosa en medios acuosos a pH 7.4.¹⁹³

Una de las interrogantes que se deseaba responder con el análisis de los receptores heterociclos mostrados era si podía mejorarse la respuesta óptica u obtener una tendencia en la afinidad distinta a la observada con el 2fPBA. Con los resultados aquí presentados no puede descartarse el uso de los compuestos heterocíclicos, por el contrario, se deja una puerta abierta porque se requiere un análisis más detallado. Los compuestos de furano y tiofeno son reconocidos por tener propiedades deseables en cuanto a detección, como son mejor emisión en términos de longitud de onda, rendimiento cuántico y sensibilidad a la polaridad del microambiente¹⁶. Es preciso entonces encontrar las condiciones óptimas que permitan obtener receptores solubles en agua, con las propiedades ópticas descritas y que puedan emplearse como sintones en la fabricación de sensores artificiales con aplicaciones biológicas o sistemas poliméricos para el reconocimiento de azúcares.¹⁹⁴

En el caso del 5M2fPBA la presencia del grupo $-OCH_3$ a pesar del efecto esperado como activador y la función como un sustituyente electrodonador que podría estabilizar imina protonada, la asociación con los analitos tampoco aportó una mejor respuesta a la obtenida al mismo pH con el 2fPBA.

6. Conclusiones

Los anteriores capítulos recopilan los aspectos examinados sobre el modo de interacción en medio acuoso de los ácidos formil borónicos (fPBAs) con moléculas que contienen a la vez las funciones diol y amina en su estructura. El análisis de los resultados presentados en los anteriores capítulos, permiten concluir lo siguiente:

A través de la caracterización de los isómeros del fPBA con la glucosa, fructosa y sorbitol se comprobó la mayor afinidad de la asociación con los sacáridos de los isómeros derivados, en comparación con el PBA. En acuerdo con lo reportado en la literatura, la respuesta en todos los casos fue mayor para la fructosa que para la glucosa, y debido a la mayor acidez del conjunto de isómeros, las K_{obs} de la asociación fueron mayores. Se destaca el isómero 4fPBA, cuyas constantes observadas con la glucosa y la fructosa fueron cuatro veces mayores que para el isómero más ácido: el 2fPBA, en las mismas condiciones. Posiblemente como resultado del limitado acceso a los dioles que dispone la glucosa para enlazarse con el grupo borónico y, comparado con el isómero *-meta*, el impedimento estérico del aldehído en la posición *-orto*.

Los análisis por RMN ^1H permitieron observar que el equilibrio ácido-base del 2fPBA ocurre en una escala de tiempo más lenta que para otros ácidos borónicos. La evidencia, a partir de los análisis espectroscópicos, de una nueva especie que ocasionaba la desaparición del pico correspondiente a la señal aldehído, permitió elucidar la estructura del benzoboroxol formado.

Se estableció el modo de asociación del 2fPBA con los analitos bifuncionales como son los aminoazúcares y aminoglucósidos; y monofuncionales, las monoaminas, aminoácidos y algunas poliaminas biológicas. La interacción de los aminopolioles con PBA, mostraron una interacción deficiente, y con los isómeros 3 y 4fPBA, la interacción debida a la formación de las bases de Schiff sólo fue observable por titulaciones conducidas por RMN ^1H . Luego de corroborar la formación de la estructura cíclica del benzoboroxol, el análisis estructural de las iminas por RMN de ^1H y ^{11}B , confirmaron la propuesta de la estabilización vía ion boronato del 2fPBA hacia la formación de las bases de Schiff detectada en primer lugar por los estudios de UV-Vis.

Se reportan las constantes de formación de las iminas, K_{im} , para una serie de aminoglucósidos, amino azúcares, monoaminas y poliaminas con el 2fPBA. Se observó que entre el 2fPBA y las monoaminas, incluidos los amino azúcares, los valores superan hasta en dos órdenes de magnitud los obtenidos con los otros dos isómeros 3 y 4fPBA. La gran afinidad del 2fPBA hacia los aminoazúcares y poliaminas se comprobó por las constantes de asociación llegan a ser un orden de magnitud mayor del observado para las monoaminas. Siguiendo el mismo análisis, se postula que el ion boronato del 2fPBA puede estabilizar a través de interacciones de par iónico a los grupos amino de las poliaminas en valores de pH en los cuales dichos grupos se encuentren protonados, dando como resultado una gran respuesta óptica que permite detectar los aminoglucósidos y poliaminas en concentraciones del orden micromolar (μM).

Los cálculos de energía con las estructuras teóricas corroboraron las predicciones hechas con base a los resultados experimentales. El aumento en la estabilidad de las bases de Schiff entre el 2fPBA y las formas semiprotonadas de knmyA, se estima que sean el resultado de un enlace de hidrógeno formado entre la forma aniónica del grupo boronato ubicado adecuadamente, con los grupos amonio del antibiótico o por acomodos conformacionales, en lugar de la formación del éster boronato. El aumento de la energía calculada es de $+13.55 \text{ kcal.mol}^{-1}$, tras la transformación de la estructura con enlace de hidrógeno en un éster iminoboronato. La formación del éster iminoboronato sería desfavorable al aumentar de la tensión por la formación de un ciclo de ocho miembros y la pérdida del enlace de hidrógeno del grupo iminio.

El 2fPBA se resalta en la presente tesis como un receptor muy versátil, con una amplia posibilidad de ser utilizado en el área biológica *i.e.* con poliaminas. La alta estabilidad de la formación de bases de Schiff se comprobó con los estudios teóricos que se debe a una compensación energética, por la estabilidad electrostática del grupo boronato hacia los grupos amonio protonados. También, en el área de síntesis, las posibilidades de crear ensamblajes supramoleculares por medio de reacciones de condensación que conduzcan a la formación de bases de Schiff supera por mucho la de aldehídos aromáticos sin la función $-\text{B}(\text{OH})_2$.

Finalmente, las cualidades analíticas del sistema ácido borónico-analitos no se vieron mejoradas a $\text{pH}=7.0$ tras la sustitución con compuestos heterocíclicos en el ácido borónico. Los resultados, aunque fueron modestos con respecto al 2fPBA, contrastaron la influencia

de la función del ácido borónico, que mejora la estabilidad del equilibrio hacia la formación de las iminas. La formación de las bases de Schiff, para fines prácticos fue imperceptible con el formil-tiofeno, mientras que con los ácidos 2-formil-3-tionilborónico (2f3TBA) y 3-formil-2-furanilborónico (3f2FBA) fueron suficientes 10–15 μM de knmyA para observar la asociación con una K_{obs} de 319 M^{-1} y 193 M^{-1} respectivamente. De acuerdo a los resultados observados con el 2fPBA puede suponerse que la geometría no es la adecuada para dar lugar a la estabilización por parte del grupo boronato aniónico a la función imina protonada.

PARTE EXPERIMENTAL

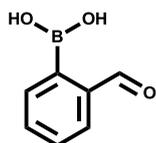
Parte experimental

Reactivos

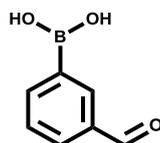
Los reactivos empleados durante el presente trabajo se clasifican en receptores y analitos, los cuales fueron comprados a Sigma-Aldrich, sólo en el caso del ácido 5-Metoxi-2-formil fenilborónico, el cual, fue adquirido de Synthonix. Se utilizaron tal como fueron recibidos, exceptuando aquellos donde se especifique el método de purificación o transformación empleado, la pureza fue comprobada con espectros de RMN ¹H.

Receptores

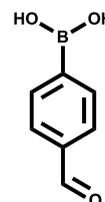
Ácido 2-formil fenilborónico
(2fPBA) Sigma-Aldrich 95%
Recristalizado a partir de
metanol:agua::1:8
p.f. 115 – 120 °C, *M*=149.94



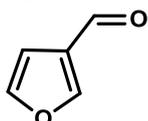
Ácido 3-formil fenilborónico
(3fPBA)
Sigma-Aldrich
p.f. 109 – 113 °C
M=149.94



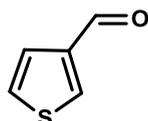
Ácido 4-formil fenilborónico
(4fPBA)
Sigma-Aldrich 95.0 %
p.f. 237 – 242 °C
M=149.94



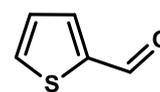
3-Furanocarboxaldehído
(3FCHO)
Sigma-Aldrich 97.0 %
p.e. 144 °C *M*= 96.08
 $\rho = 1.111$ g/mL a 25 °C



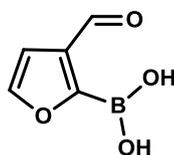
3-Tiofenocarboxaldehído
(3TCHO)
Sigma-Aldrich 98%
p.eb. 194-196 °C
 $\rho = 1.28$ g/mL a 25 °C



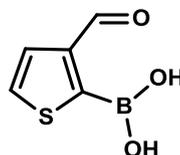
2-Tiofenocarboxaldehído
(2TCHO)
Sigma-Aldrich 98%
p.eb. 198 °C *M*= 112.15
 $\rho = 1.2$ g/mL a 25 °C



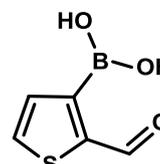
Ácido 3-formilfuran-2-
borónico
(3f2FBA)
Sigma-Aldrich *M* = 139.90



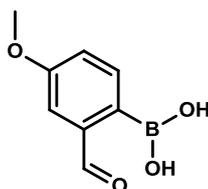
Ácido 3-formil-2-
tienilborónico (3f2TBA)
Sigma-Aldrich *M*= 155.97
p.f. 303 °C



Ácido 2-formil-3-
tienilborónico (2f3TBA)
Sigma-Aldrich *M*= 155.97
p.f. 167-193 °C



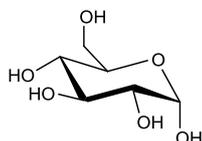
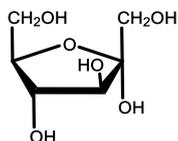
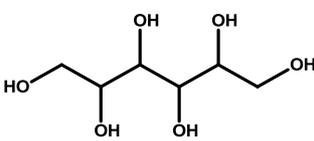
Ácido 2-Formil-5-metoxi
fenilborónico
(5M2fPBA)
Synthonix 98%
M = 179.96



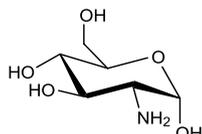
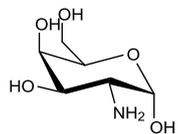
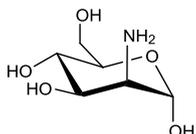
Analitos

Los analitos empleados son de especial importancia biológica, en primer lugar, los azúcares y sorbitol dan un punto de referencia ya que se encuentran reportados datos sobre su asociación con innumerables receptores derivados del ácido fenilborónico. Con los amino azúcares y aminoglucósidos ésta interacción es aún inexplorada a pesar de los múltiples enlaces 1,2 y 1,3-diol de sus estructuras, la detección de los primeros es relevante por su papel como biomarcadores y los segundos por su principal característica como antibióticos. Se amplía el alcance de éste trabajo al introducir además otros compuestos de origen biológico como son las poliaminas y para lograr aclarar detalles específicos de las interacciones se incluyen algunas monoaminas y aminoácidos.

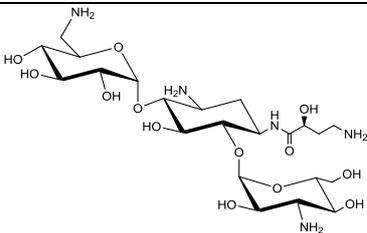
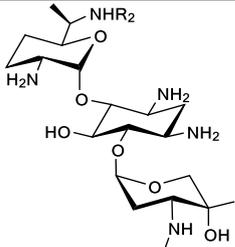
Azúcares

<p>D-(+)-Glucosa Sigma-Aldrich $\geq 99.5\%$ p.f. 150-152 °C $M= 180.16$</p> 	<p>D-(-)-Fructosa Sigma-Aldrich $\geq 99\%$ $\leq 0.05\%$ Glucosa p.f. 119-122 °C $M= 180.16$</p> 	<p>Sorbitol Sigma-Aldrich 99% p.f. 98-100 °C $M=182.17$</p> 
--	--	--

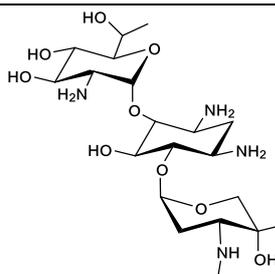
Aminoazúcares

<p>D-(+)-Glucosamina·HCl Sigma-Aldrich $\geq 99\%$ p.f. 190-194 °C $M= 215.63$</p> 	<p>D-(+)-Galactosamina·HCl Sigma-Aldrich 99% $\leq 0.5\%$ Glucosamina $M= 215.63$</p> 	<p>D-Manosamina·HCl Sigma-Aldrich $\geq 98.0\%$ p.f. 170 – 175 °C $M= 215.63$</p> 
--	---	---

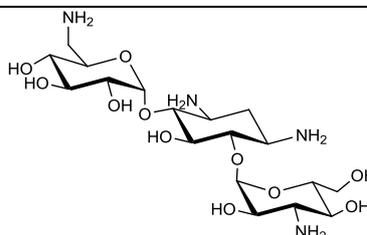
Aminoglucósidos

<p>Amicacina·2H₂SO₄ Sigma</p> 
<p>Gentamicina· H₂SO₄ C1, C1a, C2 Sigma C1: < 45% $M= 477.6$ C1a: < 35% $M= 449.5$ C2: < 30% $M= 463.6$ p.f. 218-237 °C</p> 

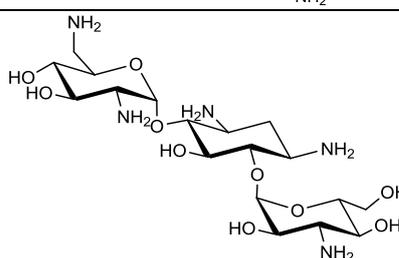
Geneticina (G418) · 2H₂SO₄
Sigma *M* = 692.71



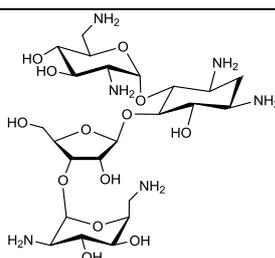
Kanamicina A · H₂SO₄
Sigma
M = 582.6 g/mol



Kanamicina B · xH₂SO₄
≥99 % 483.51

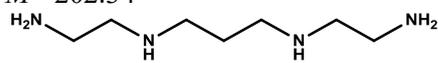


Neomicina B · 3H₂SO₄ · xH₂O
Sigma
M = 908.88

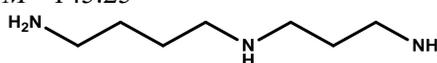


Poliaminas

Espermina
Sigma ≥97%
p.eb. 150 °C; p.f. 28-30
M = 202.34

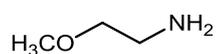


Espermidina
Sigma ≥99.0%
p.f. 23–25 °C
M = 145.25

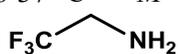


Monoaminas

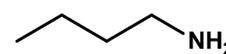
2-Metoxietilamina (2MEA)
Sigma-Aldrich 98.5%
ρ = 0.864 g/mL at 25 °C
p.eb. = 95 °C *M* = 75.11 g/mol



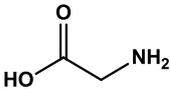
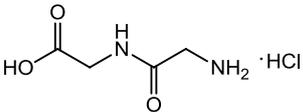
Trifluoroetil amina
(TFEA)
Aldrich 99.5%
ρ = 1.262 g/mL at 20 °C
p.eb. 36-37 °C *M* = 99.06



n-Butilamina (n-BuNH₂)
Aldrich 99%
ρ = 0.74 g/mL at 25 °C
p.eb. 78 °C *M* = 73.14



Aminoácidos

Glicina (Gly) Sigma-Aldrich $\geq 98.5\%$ p.f. 240 °C $M = 75.07$	Glicilglicina-HCl (GlyGly) Sigma $M = 168.58$
	

Disolventes

Los disolventes utilizados fueron metanol y etanol anhidro, acetonitrilo, diclorometano, cloroformo y éter. Para los procedimientos de síntesis, los disolventes se destilaron y secaron por técnicas convencionales y en caso necesario se almacenaron en malla molecular de 3 Å. Los disolventes deuterados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich y se mantienen en refrigeración hasta su uso. El agua utilizada en todos los experimentos fue destilada y purificada con el desionizador Barnstead Nanopure, resistividad $18.2 \pm 0.3 \text{ M}\Omega\text{-cm}$, que produce agua calidad reactiva Tipo 1.

Condiciones generales de Instrumentos y Equipos

Durante todos los experimentos la medición de volumen se realizó con micropipetas Eppendorf o Gibson de graduación adecuada según lo requiriera el análisis 1–10, 10–100 ó 100–1000 μL .

Potenciometría

En las titulaciones potenciométricas y ajuste de pH de las soluciones amortiguadoras y soluciones titulantes se utilizó un electrodo de vidrio Orion con medidor de pH Orion. La calibración se realiza con soluciones amortiguadoras de pH frescas de 4.01, 7.00 y 10.01, marca. Las titulaciones se llevan a cabo en una celda de vidrio de 50 mL de capacidad con control de temperatura, con agitación y burbujeo de nitrógeno constante. La estandarización del NaOH utilizado se realizó por triplicado con biftalato de potasio como patrón primario. Las mediciones de pH en D_2O se les aplica la corrección de pH ($\text{pH} = \text{pD} - 0.4$) y las soluciones fueron ajustadas con NaOD o DCl.

UV-Vis

Las mediciones espectrofotométricas de ultravioleta y visible se realizaron en dos equipos: *Hewlett-Packard Agilent 8453* y *Thermo Scientific Evolution Array*, ambos con arreglo de diodos, resolución de 1 nm, ventana espectral de 190 – 1100 nm y precisión de longitud de onda $\leq \pm 0.5 \text{ nm}$. Se utilizaron celdas de cuarzo con longitud de paso óptico de 1 cm y volumen de 2.4 mL. Para regular la temperatura se utilizó un baño recirculador de agua *Thermo Scientific Haake A 10* con termóstato *SC 100* y se comprobó con un termómetro digital *digi-thermo Quartz*, todas las mediciones se efectuaron a 298 K.

RMN

Los espectros de ^1H y ^{11}B fueron medidos en un equipo *Varian Gemini 300* y *Varian 400* (^1H y ^{11}B) de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación, de la Facultad de Química. Algunos espectros de titulaciones monitoreadas para el átomo de ^{11}B se midieron en un equipo *JEOL 260* del Departamento de Química Inorgánica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de la Ciudad de México (CINVESTAV) operado a 199 MHz. Los desplazamientos químicos (δ , ppm) en el caso del núcleo de ^1H se referenció a la señal residual del

disolvente deuterado referida al TMS ($\delta=0$ ppm). Para el núcleo de boro se utilizó como referencia externa BF_3 ($\delta=0$ ppm).

Cálculos teóricos

Las estructuras electrónicas fueron calculadas con el programa *Jaguar*, versión 7.7, *quantum chemistry software*.¹⁹⁵ Los cálculos DFT fueron afinados usando el funcional de Zhao y Truhlar de intercambio completo HF y el funcional local M06 que elimina las autointeracciones de largo alcance (M06-HF). Las geometrías de todos los compuestos fueron optimizadas usando la base estándar 6-31G(**). La solvatación en agua fue tomada en cuenta aplicando el método de *continuum-solvation* al resolver numéricamente la ecuación de Poisson-Boltzmann.¹⁹⁶ Como punto de partida para el cálculo de las estructuras se usaron las estructuras cristalinas disponibles para la kanamicina A¹⁹⁷ y la D-glucosamina¹⁹⁸.

Software

Los valores de $\text{p}K_a$ fueron calculados utilizando el programa Microcal Origin 7.5 a partir de los datos de titulaciones monitoreadas por potenciometría y espectroscopía UV-Vis simultáneamente. Los diagramas de distribución de especies fueron generados usando los valores de $\text{p}K_a$ reportados para knmyA y los valores de $\text{p}K_a$ calculados para los ácidos fenilborónicos en agua, por medio del programa HYSS Academic Software 1999 K. J. Powell. Las constantes de equilibrio aparentes se ajustaron por regresión no lineal por el método de mínimos cuadrados con el paquete estadístico Microcal Origin 7.5 y 8.0.

Procedimientos

Síntesis de receptores derivados de 2fPBA

Se probaron varias rutas de síntesis del 2fPBA con kanamicina A, siguiendo el protocolo de aminación reductiva.

En un matraz se ponen de kanamicina A (0.0945 g, 0.195 mmol) disuelta en 1.3 mL de solución 0.862 M de EtONa. Se agrega 2fPBA recristalizado (0.0910 g, 0.585 mmol), disuelto en 15 mL de EtOH. La mezcla se deja reaccionar por 2 h a temperatura ambiente. Luego se agrega NaCNBH_3 0.0735 g (1.2 mmol), se deja reaccionar 5 horas con agitación y calentamiento suave usando una trampa Dean-Stark. La mezcla se lava con salmuera y el producto se extrae con AcOEt. El disolvente es evaporado y se separa el sólido amarillo resultante.

Determinación de $\text{p}K_a$

Las soluciones fueron preparadas volumétricamente usando agua destilada y desionizada. A partir de soluciones patrón 0.01 M de los ácidos formil fenilborónico, se diluyen en 25 mL para tener una concentración final de 5×10^{-5} M, con fuerza iónica $I_{(\text{NaCl})} = 0.1$ M, y en presencia de solución amortiguadora de fosfato 0.001 M para iniciar en pH 5.0. La titulación se lleva a cabo con NaOH 0.1102 M estandarizado previamente con biftalato de potasio. Durante la titulación se controla la temperatura y se mantiene burbujeo con flujo constante de nitrógeno. Para cada volumen agregado de hidróxido se registra el pH y graba el espectro UV-Vis. Para la determinación de los $\text{p}K_a$ los perfiles de pH se ajustaron a la ecuación:

$$\varepsilon_{obs} = \frac{\varepsilon_{B^-} + \varepsilon_B [H^+] / K_a^B}{(1 + [H^+] / K_a^B)} \quad (1)$$

Donde, ε_{obs} es la absorptividad molar medida a determinada longitud de onda, ε_B y ε_{B^-} es la absorptividad de las especies neutra y aniónica del ácido borónico y K_a^B es la constante de disociación.

Titulaciones in situ UV-Vis

Ley de Beer

El cálculo de la concentración apropiada y el estricto control de la misma durante las titulaciones espectrofotométricas de los ácidos fenilborónicos y los analitos se efectuó para cada uno de ellos hallando las curvas de calibración a partir de la ley de Beer por duplicado. Con los isómeros del ácido 2fPBA éste procedimiento se efectuó para cada valor de pH, utilizando soluciones amortiguadoras MES, MOPS o CHES, según el caso y con los analitos se realizó a pH 7.0, además para comprobar que no se presentara absorbancia adicional en las longitudes de onda entre 254 – 300 nm y evitar así interferencia en las mediciones. En primer lugar, se prepara una solución patrón de cada uno, en la celda se mide el espectro del punto inicial, es decir, sólo con la solución amortiguadora y se miden los espectros luego de agregar cantidades conocidas de la solución patrón. En segundo lugar se efectúa el cálculo de la curva de calibración por dilución directamente en la celda de UV se mide el espectro partiendo de una disolución con la concentración que presentó la absorbancia apropiada y diluyendo con tres a cuatro adiciones de 200 μ L de solución amortiguadora en la celda.

Método indirecto, por competencia o desplazamiento de indicador (IDA)

Para medir las constantes de asociación del experimento por competencia se llevó a cabo en primer lugar el cálculo de las constantes de asociación del 2fPBA con los indicadores, para éste efecto se utilizaron disoluciones $3-5 \times 10^{-5}$ M de CTA y PCV y 1×10^{-4} M de ARS en disoluciones amortiguadoras 0.05 M de MOPS a los pH correspondientes del análisis. Luego se agregó 2fPBA en el intervalo de concentración de (0 – 5.5 eq). Las constantes de asociación se calcularon a las longitudes de onda apropiadas de acuerdo al espectro de absorción.

Los experimentos de desplazamiento de indicador (IDA), con azúcares se realizó a partir de una solución patrón de indicador ARS 1×10^{-3} M y de 2fPBA (0.015 mM), se prepara la disolución A (ARS 1×10^{-5} M, 2fPBA o PBA 1×10^{-4} M) con buffer fosfato 0.1 M. Se utilizan para las pruebas glucosa, fructosa, sorbitol y kanamicina A. El glucósido se disuelve en 10 mL de solución A dando como resultado la disolución B (ARS + 2fPBA o PBA + glucósido). Se inicia la titulación con 2.4 mL de solución A en la celda y se usa la solución B como valorante.

En el análisis cualitativo de desplazamiento de indicador con CTA y aminoazúcares y aminoglucósidos se empleó la técnica de fluorescencia. La λ de excitación fue 330 nm y se obtuvo el espectro en el intervalo de 350 a 500 nm.

Método directo

Con el fin de evitar errores por dilución se procede de forma similar que en el método indirecto. A partir de una solución patrón se prepara la solución del ácido fPBA de concentración adecuada para UV-Vis en el buffer del pH correspondiente y se disuelve el analito en ésta solución. Se comprueba el pH y la titulación se inicia con 2.4 mL de solución de fPBA en la celda y después de la adición se

dejan transcurrir 5 minutos antes de grabar cada espectro, el cual es el tiempo que se determinó en una prueba independiente es el necesario para alcanzar el equilibrio.

Titulaciones espectrofotométricas UV-Vis con los ácidos PBA y fPBA

Los análisis cuantitativos para la asociación de los analitos se realizaron mediante titulaciones espectrofotométricas de UV-Vis. Inicialmente se prepara una solución patrón 0.005 o 0.02 M de ácido, a partir de ella se obtiene la disolución que irá en la celda, preparada en el buffer apropiado, se rectifica la concentración por absorbancia. Luego se utiliza una parte de ésta disolución para disolver el analito correspondiente y se rectifica nuevamente el pH. Por último, se lleva a cabo la titulación, añadiendo alícuotas de los analitos a la celda.

Las constantes de equilibrio de formación de las bases de Schiff (K_{obs}), se calculan a partir de los perfiles de absorbancia, (A) contra concentración de analito (X) medidos a varias longitudes de onda en el intervalo de 260–310 nm, cada valor de constante corresponde al promedio del ajuste no lineal de mínimos cuadrados de la ecuación (2).

$$A = A_0 + 0.5\Delta\varepsilon \left\{ [B]_T + [X]_T + \frac{1}{K_{obs}} - \sqrt{\left([B]_T + [X]_T + \frac{1}{K_{obs}} \right)^2 - 4[B]_T[X]_T} \right\} \quad (2)$$

Donde, A_0 es la absorbancia inicial a la concentración del ácido formil fenilborónico $[B]$, medido en ausencia de analito, X . El subíndice T se refiere a concentración total, $\Delta\varepsilon$ es la diferencia de absorptividad molar entre la base de Schiff y B libre. En la asociación de los ácidos borónicos con azúcares, las constantes de equilibrio observadas también se calcularon a partir de los perfiles de A Vs. concentración de azúcar; sin embargo, como la concentración de azúcar estuvo presente en un gran exceso frente a la concentración de ácido, se hace uso de la ecuación (3), la cual es válida sólo cuando se cumple ésta condición. En la ecuación, A_C corresponde a la absorbancia del complejo azúcar-ácido borónico y los demás términos representan lo mismo que en la ecuación (2).

$$A = \frac{A_0 + A_C K_{obs} [X]_T}{1 + K_{obs} [X]_T} \quad (3)$$

Las concentraciones de los ácidos e intervalos de concentración de los analitos están listados en la tabla 1.

Tabla 1 Concentraciones experimentales de las titulaciones espectrofotométricas para la determinación de las constantes de asociación de 2fPBA a pH 7.0

Analito	[2fPBA] _{celdas} , M	[analito] _{celdas} , M
Glucosa	2.6x10 ⁻⁴	0 – 0.3576
Fructosa	2.5 x10 ⁻⁴	0 – 0.0100
Sorbitol	2.6x10 ⁻⁴	0 – 0.0160
D-Glucosamina	2.5x10 ⁻⁴	0 – 0.0125
D-Galactosamina ^{a)}	2.0x10 ⁻⁴	0 – 0.0061
D-Manosamina ^{a)}	2.7x10 ⁻⁴	0 – 0.0042
Glicina	2.3x10 ⁻⁴	0 – 0.0193
Glicil glicina	2.7x10 ⁻⁴	0 – 0.0154
2-Metoxietil amina	2.5x10 ⁻⁴	0 – 0.0565
n-Butil amina	2.0x10 ⁻⁴	0 – 0.0951

trifluoroetilamina	2.6×10^{-4}	0 – 0.0210
amicacina	2.6×10^{-4}	0 – 0.0043
neomicina B	2.6×10^{-4}	0 – 0.0031
kanamicina A	2.7×10^{-4}	0 – 0.0021
kanamicina B	2.3×10^{-4}	0 – 0.0032
gentamicina	2.0×10^{-4}	0 – 0.0095
geneticina (G418)	2.5×10^{-4}	0 – 0.0105
espermina	2.5×10^{-4}	0 – 0.0024
espermidina	2.7×10^{-4}	0 – 0.0011

^apH 7.3

Analito	[3fPBA] _{celda} , M	[analito] _{celda} , M
Glucosa	6.4×10^{-5}	0 – 0.3576
Fructosa	6.4×10^{-5}	0 – 0.0100
D-Glucosamina	4.6×10^{-5}	0 – 0.0142
Glicina ^a)	6.4×10^{-5}	0 – 0.0301
Glicil glicina	7.3×10^{-5}	0 – 0.0205
kanamicina A	4.3×10^{-5}	0 – 0.0137
kanamicina B	4.3×10^{-5}	0 – 0.0103
geneticina (G418)	7.6×10^{-5}	0 – 0.0149

^apH 8.6

Analito	[4fPBA] _{celda} , M	[analito] _{celda} , M
Glucosa	6.1×10^{-5}	0 – 0.3588
Fructosa	6.4×10^{-5}	0 – 0.0156
D-Glucosamina	6.3×10^{-5}	0 – 0.0127
Glicil glicina ^a)	2.5×10^{-5}	0 – 0.0196
kanamicina A	6.2×10^{-5}	0 – 0.0148
geneticina (G418)	6.5×10^{-5}	0 – 0.0148

^apH 7.6

Analito	[2f3TBA] _{celda} , M	[analito] _{celda} , M
2-Metoxietil amina	4.5×10^{-5}	0 – 0.0357
D-Glucosamina	4.6×10^{-5}	0 – 0.0115
kanamicina A	4.7×10^{-5}	0 – 0.0084
neomicina B	4.5×10^{-5}	0 – 0.0143

Analito	[3f2TBA] _{celda} , M	[analito] _{celda} , M
2-Metoxietil amina	3.9×10^{-5}	0 – 0.0471
D-Glucosamina	3.8×10^{-5}	0 – 0.1141
kanamicina A	3.9×10^{-5}	0 – 0.0124
neomicina B	3.8×10^{-5}	0 – 0.0233

Analito	[3fF2BA] _{celda} , M	[analito] _{celda} , M
2-Metoxietil amina	8.3×10^{-5}	0 – 0.0476
D-Glucosamina	9.0×10^{-5}	0 – 0.1106
kanamicina A	9.0×10^{-5}	0 – 0.0162

neomicina B	8.7×10^{-5}	0 – 0.0192
-------------	----------------------	------------

Analito	[2TCHO] _{celda} , M	[analito] _{celda} , M
2-Metoxietil amina	1.8×10^{-4}	0 – 0.0362
D-Glucosamina	1.8×10^{-4}	0 – 0.1666
kanamicina A	1.8×10^{-4}	0 – 0.0095
neomicina B	1.8×10^{-4}	0 – 0.0148

Analito	[3TCHO] _{celda} , M	[analito] _{celda} , M
2-Metoxietil amina	3.6×10^{-5}	0 – 0.0405
D-Glucosamina	4.0×10^{-5}	0 – 0.1705
kanamicina A	4.1×10^{-5}	0 – 0.0244
neomicina B	4.1×10^{-5}	0 – 0.0212

Analito	[3FCHO] _{celda} , M	[analito] _{celda} , M
2-Metoxietil amina	1.24×10^{-4}	0 – 0.0304
D-Glucosamina	1.25×10^{-4}	0 – 0.1325
kanamicina A	1.21×10^{-4}	0 – 0.0151
neomicina B	1.23×10^{-4}	0 – 0.0173

Analito	[5M2fPBA] _{celda} , M	[analito] _{celda} , M
2-Metoxietil amina	1.24×10^{-4}	0 – 0.0362
D-Glucosamina	1.25×10^{-4}	0 – 0.2203
kanamicina A	1.21×10^{-4}	0 – 0.0226
neomicina B	1.23×10^{-4}	0 – 0.0230

Titulaciones *in situ* RMN ¹H y ¹¹B

Las disoluciones patrón de los ácidos formil fenilborónicos y analitos utilizadas en las titulaciones espectrométricas se preparan para todos los casos en D₂O, para ambos el pH es ajustado con DCl o NaOD (sin corrección de la escala). Se preparan dos tubos de resonancia con 600 y 550 μ L de la disolución de ácido. La titulación se lleva a cabo directamente en los tubos de resonancia con solución patrón de analito, dejando transcurrir diez minutos entre la adición del analito y la medición de cada espectro. Las constantes de asociación con los isómeros 3 y 4fPBA se determinaron sólo a partir de los datos de RMN ¹H debido a la baja interacción que no hizo posible determinarlas por UV-Vis. En las tablas a continuación se resumen las concentraciones de ácido e intervalos de concentración de analito utilizados a pH 7.0.

Tabla 2 Concentraciones experimentales de las titulaciones por RMN ¹H y ¹¹B para determinar las constantes de asociación de los ácidos formil fenilborónicos a pH 7.0 en D₂O.

Analito	[2fPBA] _{tubo} , M	[analito] _{tubo} , M
D-Glucosamina ^{a)}	5.47×10^{-3}	0 – 0.0483
Glicina	2.74×10^{-2}	0 – 0.7232
Glicil glicina	2.64×10^{-2}	0 – 0.1674
2-Metoxietil amina	5.54×10^{-3}	0 – 0.6463
n-Butil amina	2.59×10^{-2}	0 – 0.5432

kanamicina A	2.68×10^{-2}	0 – 0.0749
espermina	2.35×10^{-2}	0 – 0.0155
Analito	$[3fPBA]_{tubo}, M$	$[analito]_{tubo}, M$
D-Glucosamina ^{a)}	1.25×10^{-2}	0 – 0.0453
Glicina	1.98×10^{-2}	0 – 0.3580
Glicil glicina ^{b)}	1.90×10^{-2}	0 – 0.2009
2-Metoxietil amina	1.51×10^{-2}	0 – 0.8588
n-Butil amina	1.96×10^{-2}	0 – 0.7576
Trifluoroetilamina	1.81×10^{-2}	0 – 0.3225

^{a)}pH 6.89, ^{b)}pH 7.5

Analito	$[4fPBA]_{tubo}, M$	$[analito]_{tubo}, M$
D-Glucosamina	6.00×10^{-3}	0 – 0.0483
Glicil glicina*(7.5)	5.47×10^{-3}	0 – 0.2010
2-Metoxietil amina	4.84×10^{-3}	0 – 0.0623
n-Butil amina	6.67×10^{-3}	0 – 0.7275
Trifluoroetilamina	1.39×10^{-2}	0 – 0.2764

Referencias

- ¹ Dowlut, M. & Hall, D. G. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 4226–7.
- ² (a) James, T. D.; Phillips, M. D.; Shinkai, S., 2006. *Boronic acids in saccharide recognition; Monographs in Supramolecular Chemistry*; Royal Society of Chemistry: Cambridge. (b) Fujita, N.; Shinkai, S.; James, T. D. *Chem. Asian. J.* 2008, 3, 1076.
- ³ Nishiyabu, R.; Kubo, Y.; James, T. D.; Fossey, J. S. *Chem. Commun.*, 2011, 47, 1124–50.
- ⁴ Wulff, G. *Pure Appl. Chem.* 1982, 54, 2093–2102.
- ⁵ Mirri, G.; Bull, S. D.; Horton, P. N.; James, T. D.; Male, L.; Tucker, J. H. R. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 8903–8905.
- ⁶ Pérez-Fuertes, Y.; Kelly, A. M.; Fossey, J. S.; Powell, M. E.; Bull, S. D.; James, T. D. *Nat. Protoc.* 2008, 3, 210–4.
- ⁷ Yeste, S. L.; Powell, M. E.; Bull, S. D.; James, T. D. *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 427–430.
- ⁸ Liang, C.; Pedersen, J. A.; Balsler, T. C. *J. Chromatogr., A*, 2009, 1216, 5296–5301.
- ⁹ (a) H. Umezawa, I. R. Hooper, Eds., 1982. *Aminoglycoside Antibiotics*; Springer, New York, Heidelberg. (b) Houghton, J. L.; Green, K. D.; Chen, W.; Garneau-Tsodikova, S. *ChemBiochem*, 2010, 11, 880–902.
- ¹⁰ Stead, D. A. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 2000, 747, 69–81.
- ¹¹ Yang, M.; Tomellini, S. *J. Chromatogr. A*, 2001, 939, 59–67.
- ¹² Hutin, M., Bernardinelli, G.; Nitschke, J. R. *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 4585–93.
- ¹³ Secor, K. E.; Glass, T. E. *Org. Lett.*, 2004, 6, 3727–3730.
- ¹⁴ (a) Hartley, J. H., Phillips, M. D.; James, T. D. *New J. Chem.*, 2002, 26, 1228–1237. (b) Yuan, X.-X.; Wang, Y.-F.; Wang, X.; Chen, W.; Fossey, J. S.; Wong, N.-B. *Chem. Cent. J.*, 2010, 4, 6–10.
- ¹⁵ Irvine, J. C.; Earl, J. *J. Chem. Soc. Trans.* 1922, 121, 2376–2381.
- ¹⁶ Sinkeldam, R. W.; Greco, N. J.; Tor, Y. *Chem. Rev.* 2010, 110, 2579–619.
- ¹⁷ Atwood, J.L., Steed, J.W. (Eds.), 2004. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry* 1a. ed., Taylor-Francis: Boca Ratón, FL.
- ¹⁸ Ariga, K.; Kunitake, T., 2006. *Supramolecular Chemistry. Fundamentals and Applications*. Springer, p. 9.
- ¹⁹ (a) Cram, D. J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1986, 25, 1039; (b) Cram, D.J., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1988, 27, 1009; (c) Bryant, J.A.; Knobler C.B.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 1254; (d) Bryant, J.A.; Ericson, J.L.; Cram, D.J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 1255.
- ²⁰ C. David Gutsche en: Lindoy, L.F., Atkinson, I. M. (Eds.) J Fraser Stoddart (Ed. serie), 2000. *Self-Assembly in Supramolecular Systems. Monographs in Supramolecular Chemistry*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK., 224 p.
- ²¹ Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G.M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1998, 37, 2755–2794.
- ²² Steed, J.W., Turner, D.R., Wallace, K.J., 2007. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry* 1a. ed., London: John Wiley & Sons, Ltd. 307 p.

- ²³ Imagen adaptada de:
chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Intermolecular_Forces/Lennard-Jones_Potential.
Visitado: 25 de noviembre de 2014.
- ²⁴ Lindoy, L.F., Atkinson, I. M. en: Lindoy, L.F., Atkinson, I. M. (Eds.) J Fraser Stoddart (Ed. serie), 2000. *Self-Assembly in Supramolecular Systems. Monographs in Supramolecular Chemistry*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK., 224 p.
- ²⁵ Meeuwissen, J.; Reek, J.N.H. *Nature Chemistry*, 2010, 2 (8), pp.615–21.
- ²⁶ Raluca Stan, L.G.; Mirela Nita, R.; Meghea, A. A. Meghea (Ed) *Molecular Interactions in Natural and Synthetic Self-Assembly Systems, Molecular Interactions*, 2012, ISBN: 978-953-51-0079-9, InTech, DOI: 10.5772/35537. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/molecular-interactions/molecular-interactions-in-natural-and-synthetic-self-assembly-systems>.
- ²⁷ Ebina, Y., Rutter, W.J., *et al. Cell*, 1985, 40, 747–758.
- ²⁸ Cragg. P. J., 2010. *Supramolecular Chemistry. From Biological inspiration to Biomedical applications*, London.
- ²⁹ Hall, D. G. (Ed.), 2005. *Boronic Acids - Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine*. 1st ed. WILEY-VCH, Weinheim, 571 p.
- ³⁰ A. Lützen en: Atwood, J.L., Steed, J.W. (Eds). *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry* 1a. ed., Taylor-Francis: Boca Ratón, FL; 2004 p. 171.
- ³¹ Kubik, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 1722-1725
- ³² Pal, A.; Bérubé, M., Hall, D. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 1492–1495
- ³³ Ferrand, Y.; Crump, M. P.; Davis, A. P.; *Science*. 2007, 318, 619.
- ³⁴ Liao, D. I., Kapadia, G., Ahmed, H., Vasta, G. R., Herzberg, O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994, 91, 4. 1428-1432
- ³⁵ Schwarz, F. P., Puri, K. D., Bhat, R. G., Surolia, A. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 7668–7677.
- ³⁶ Mandal, D.K., Kishore, N., Brewer, C.F. *Biochemistry*, 1994, 33, 1149–1156.
- ³⁷ Brewer, C. F., Miceli, M. C., Baum, L. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002, 12, 616–623.
- ³⁸ Arthur, C. M., Baruffi, M. D., Cummings, R. D., Stowell, S. R. *Methods Mol. Biol.* 2015, 1207, 1–35.
- ³⁹ a) Davis, A.P., Wareham, R.S., *Angew. Chem.* 1998, 110, 2397; *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 2270; b) Klein, E., Crump, M. P., Davis, A. P. *Angew. Chem.* 2005, 117, 302; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 298.
- ⁴⁰ Barwell, N. P., Crump, M. P., Davis, A. P. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, 48, 7673.
- ⁴¹ Carey, F. A., 2000. *Organic Chemistry*. 4a edición. McGraw-Hill Higher Education, New York; b) Yurkanis B, P. 2004. *Organic Chemistry*, 4ª edición. Pearson Prentice Hall, New Jersey.
- ⁴² Kuivila, H. G.; Keough, A. H.; Soboczenski, E. J. *J. Org. Chem.*, 1954, 19,780-783.
- ⁴³ Lorand, J. P., Edwards, J. O. *J. Org. Chem.*, 1959, 24, 769–774.
- ⁴⁴ (a) Mazik, M.; Cavga, H. *J. Org. Chem.* 2006, 71, 2957–2963. (b) Mazik, M. *Chem. Soc. Rev.* 2009. 38, 935–956.
- ⁴⁵ Levonis, S.; Kiefel, M. J.; Houston, T. A. *Chem. Commun.* 2009, 2278–2280
- ⁴⁶ Dai, C.; Wang, B. *et al. Pure Appl. Chem.* 2012, 84, 2479.
- ⁴⁷ Mader, H. S.; Wolfbeis, O. S. *Microchim. Acta.* 2008, 162, 1–34.
- ⁴⁸ Vlad, S.C.; LaValley, M. P.; McAlindon, T. E., Felson, D.T. *Arthritis Rheum.* 2007, 56, 2267–2277.
- ⁴⁹ Kirkham S.G.; Samarasinghe R. K. *J. Orthop Surg (Hong Kong)*. 2009, 17, 72-6.

- ⁵⁰ Álvarez-Añorve, L. I.; Calcagno, M. L.; Plumbridge, J. *J. Bacteriol.* 2005, 187, 2974–2982.
- ⁵¹ Gaugué, I.; Oberto, J.; Putzer, H.; Plumbridge, J. *PLoS ONE*. 2013, 8, 5: Open Acces.
- ⁵² Sahoo, S. C.; Tharalekshmy, A.; Weng Ng, S.; Naumov, P. *Cryst. Growth Des.* 2012, 12, 5148–5154.
- ⁵³ Blaskó, A.; Bunton, C. A.; Bunel S.; Ibarra, C.; Moraga, E. *Carbohydr. Res.* 1997, 298, 163–172.
- ⁵⁴ Costamagna, J.; Lillo, L.E.; Matsuhira, B.; Nosedá, M.D.; Villagrán, M. *Carbohydr. Res.* 2003, 338, 1535–1542.
- ⁵⁵ Cooper, C. R.; James, T. D. *Chem. Commun.* 1997, 15, 1419–1420.
- ⁵⁶ Strongin, R.M.; Davis, C.J.; Lewis, P.T.; McCarroll, M.E.; Read, M.W.; Cueto, R. *Org. Lett.* 1999, 1, 331–334.
- ⁵⁷ Zaubitzer, F.; Buryak, A.; Severin, K. *Chemistry Eur. J.* 2006, 12, 3928–3934
- ⁵⁸ Lin, V. S-Y.; Lai, C-Y.; Huang, J.; Song, S-A.; Xu, S. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 11510-11511.
- ⁵⁹ American Chemical Society National Historic Chemical Landmarks. *Selman Waksman and Antibiotics*.
<http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/selmanwaksman.html>
Visitado: Abril 4, 2015).
- ⁶⁰ Hermann, T. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, 64, 1841–1852
- ⁶¹ Magalhães, M. L.; Blanchard, J. S, en: Douglas Mayer, (Ed.) 2009. *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance*, Vol. 1; Humana Press Springer: New York., 670 p.
- ⁶² Hinshaw, C.; Feldman, W. H.; Pfuete, K.H. *JAMA*. 1946; 132, 13, 778-782.
- ⁶³ Piepersberg W.; Wehmeier, U.F., 2009 en: *Encyclopedia of Microbiology Vol. 1*. Schaechter., 3^a. Ed., Elsevier Inc., Oxford.
- ⁶⁴ Weizman H.; Tor Y. 2003, en: *Carbohydrate-based drug Discovery*. Wong, C.-H., Ed.; John Wiley & Sons: Weinheim. 947 p.
- ⁶⁵ Magnet, S.; Blanchard, J.S. *Chem. Rev.* 2005, 105, 477–98.
- ⁶⁶ Hanessian, S.; Maianti, J.P.; Ly, V.L.; Deschênes-Simard, B. *Chem. Sci.* 2012, 3, 249.
- ⁶⁷ Revuelta, J.; Asensio, J.L. *et al. J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 5086–5103.
- ⁶⁸ Wright, G.D. en Wax, R.G.; Lewis, K.; Salyers, A.A.; Taber, H.(Eds). 2001, *Bacterial Resistance to Antimicrobials*; 2^a. Edición. Taylor & Francis Group, CRC Press: London. 528 p.
- ⁶⁹ von Nussbaum, F.; Brands, M.; Hinzen, B.; Weigand, S.; Häbich, D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2006, 45, 5072–129.
- ⁷⁰ Carter, A.P.; Clemons, W.M.; Brodersen, D.E.; Morgan-Warren, R.J.; Wimberly, B.T.; Ramakrishnan, V. *Nature*, 2000, 407, 340-348.
- ⁷¹ Wang, H.; Tor, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 109–111.
- ⁷² Hainrichson, M.; Nudelman, I.; Baasov, T. *Org. Biomol. Chem.* 2008, 6, 227–39.
- ⁷³ Frasconi, M.; Tel-Vered, R.; Riskin, M.; Willner, I. *Anal. Chem.* 2010, 82, 6, 2512-2519.
- ⁷⁴ (a) Ionescu, R.E.; Jaffrezic-Renault, N.; Bouffier, L.; Gordran, C.; Cosnier, S.; Pinacho, D. G.; Marco, M.P.; Sánchez-Baeza, F.J.; Healy, T.; Martelet, C. *Biosens. Bioelectron.* 2007, 23, 549–555. (b) Giroud, F.; Gorgy, K.; Gondran, C.; Cosnier, S.; Pinacho, G. D.; Marco, M.-P.; Sánchez-Baeza, F. *J. Anal. Chem.* 2009, 81, 8405–8409.

- ⁷⁵ Kelly, A. M.; Pérez-Fuertes, Y.; Arimori, S.; James, T. D. *et al. Org. Lett.* 2006, 8, 609–612.
- ⁷⁶ Verma, A. K. en: Paz, E.; Garcia-Huidobro, J.; Ignatenkos, N. *Adv. Clin. Chem.* 2011, 54, 45–70.
- ⁷⁷ Galston, W.; Sawhney, R. K. *Plant Physiol.* 1990, 94, 406–10.
- ⁷⁸ Becker, B.; Cooper, M. *ACS Chem. Biol.* 2013, 8, 105–115.
- ⁷⁹ Lee, B.; Scopelliti, R.; Severin, K. *Chem. Commun.* 2011, 47, 9639–9641.
- ⁸⁰ Agostinelli, E.; Marques, M. P. M., Calheiros, R.; Gil, F. P. S. C.; Tempera, G.; Viceconte, N.; Battaglia, V.; Grancara, S.; Toninello, A. *Amino Acids*, 2010, 38, 393.
- ⁸¹ Casero, R.A. Jr.; Wang, Y.; Stewart, T.M.; Devereux, W.; Hacker, A.; Smith, R.; Woster, P.M. *Biochem. Soc. Trans.* 2003, 31, 361–365.
- ⁸² Suzuki, A. *J. of Organomet. Chem.* 1999, 576, 147-168.
- ⁸³ (a) Franzen, R. *Can. J. Chem.* 2000, 78, 957-962. (b) Franzen, R.; Xu, Y. J. *Can. J. Chem.* 2005, 83, 266-272.
- ⁸⁴ Huber, M. L.; Pinhey, J. T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1990, 721-722.
- ⁸⁵ Brown, H. C.; Basavaiah, D. *J. Org. Chem.* 1982, 47, 3806-3808.
- ⁸⁶ Ainley, A.D.; Challenger, F. *J. Chem. Soc.* 1930, 2171-2180.
- ⁸⁷ Prakash, G.K.S.; Panja, C.; Mathew, T.; Surampudi, V.; Petasis, N.A.; Olah, G.A. *Org. Lett.* 2004, 6, 2205-2207.
- ⁸⁸ Snyder, H. R.; Kuck, J. A.; Johnson, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1938, 60, 105-111.
- ⁸⁹ Zhang, D.; Cheng, T.; Zhao, Q.; Xu, J.; Liu, G. *Org. Lett.*, 2014, 16 (21), 5764–5767.
- ⁹⁰ (a) Al-Zoubi, R.M.; Marion, O.; Hall, D.G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2008, 47, 2876-2879. b) Zheng, H.C.; McDonald, R.; Hall, D.G. *Chem. Eur. J.* 2010, 16, 5454-5460.
- ⁹¹ Cash, J.J.; Kubo, T.; Bapat, A.P.; Sumerlin, B.S. *Macromolecules.* 2015, 48, 7, 2098–2106.
- ⁹² Xu, Z.; Uddin, K. M. A.; Kamra, T., Schnadt, J.; Ye; L. *Appl. Mater. Interfaces.* 2014, 6, 3, 1406–1414.
- ⁹³ Shinkai, S.; Tsukagoshi, K.; Ishikawa, Y.; Kunitake, T. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1991, 1039–1041.
- ⁹⁴ Ludwig, R.; Shiomi, Y.; Shinkai, S. *Langmuir*, 1994, 10, 3195–3200.
- ⁹⁵ (a) Cote, A.P.; Benin, A.I.; Ockwig, N.W.; O’Keeffe, M.; Matzger, A.J.; Yaghi, O.M. *Science*, 2005, 310, 1166–1170; (b) Cote, A.P.; El-Kaderi, H.M.; Furukawa, H.; Hunt, J.R.; Yaghi, O.M. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 12914; (c) El-Kaderi, H.M.; Hunt, J.R.; Mendoza-Cortes, J.L; Cote, A.P.; Taylor, A.E; O’Keeffe, M.; Yaghi, O.M. *Science*, 2007, 316, 268–272.
- ⁹⁶ Rettig, S. J.; Trotter, J. *Can. J. Chem.* 1977, 55, 3071–3075.
- ⁹⁷ Zhdankin, V. *Tetrahedron Lett.* 1999, 40, 6705-6708.
- ⁹⁸ Bérubé, M.; Dowlut, M.; Hall, D.G. *J. Org. Chem.* 2008, 73, 6471–6479.
- ⁹⁹ (a) Sporyński, A.; Lewandowski, M.; Rogowska, P.; Cyrański, M. K. *Appl. Organomet. Chem.* 2005, 19, 1202–1203 (b) Schumacher, S. *et al. Polymer.* 2011, 52, 2485–2491. (c) Dowlut, M.; Hall, D.G. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 4226–4227.
- ¹⁰⁰ Lennarz, W.J.; Snyder, H.R. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 82, 2172–2175.
- ¹⁰¹ Luliński, S.; Madura, I.; Serwatowski, J.; Szatyłowicz, H.; Zachara, J. *New J. Chem.* 2007, 31, 144-154.
- ¹⁰² Guo, Z.; Shin, I.; Yoon, J. *Chem. Commun.*, 2012, 48, 5956–5967.

- ¹⁰³ Lo, L.-C.; Chu, C.-Y., *Chem. Commun.*, 2003, 2728-29.
- ¹⁰⁴ Springsteen, G.; Wang, B., *Tetrahedron*, 2002, 58, 5291–5300
- ¹⁰⁵ Jin, S.; Cheng, Y.; Reid, S.; Li, M.; Wang, B. *Med Res Rev.* 2010, 30, 171–257.
- ¹⁰⁶ Gao, X.; Zhang, Y.; Wang, B. *Tetrahedron* 2005, 61, 9111–9117.
- ¹⁰⁷ Yan, J.; Springsteen, G.; Deeter, S.; Wang, B. *Tetrahedron* 2004, 60, 11205–11209.
- ¹⁰⁸ Norrild, J. C.; Eggert, H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1996, 12, 2583–2588.
- ¹⁰⁹ Yang X; Cheng, Y.; Jin, S.; Wang, B. en: Mirsky, V.M.; Yatsimirsky, A.K. (Eds.) 2010, *Artificial Receptors for Chemical Sensors*. John Wiley & Sons: Weinheim, Germany. 486 p.
- ¹¹⁰ Pizer, R.; Babcock, L. *Inorg. Chem.* 1977, 16, 1677 – 1681.
- ¹¹¹ Mulla, H.R., Agard, N.J.; Basu, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 25–27.
- ¹¹² Springsteen, G.; Wang, B. *Chem. Commun.* 2001, 1608–1609.
- ¹¹³ Adamczyk-Wo. niak, A., Brzózka, Z.; Cyrański, M.K.; Filipowicz-Szymańska, A.; Klimentowska, P.; Żubrowska, A.; Żukowski, K.; Sporzyński, A. *Appl. Organomet. Chem.* 2008, 22, 427–432.
- ¹¹⁴ Kubo, Y., Ishida, T., Kobayashi, A.; James, T. D. *J. Mater. Chem.* 2005, 15, 2889-2895.
- ¹¹⁵ Höpfl, H. *J. Organomet. Chem.* 1999, 581, 129–149.
- ¹¹⁶ Bosch, L.I.; Fyles, T.M.; James, T. D. *Tetrahedron* 2004, 60, 11175–11190.
- ¹¹⁷ James, T. D.; Sandanayake, K.R.A.S.; Iguchi, R.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 8982-8987.
- ¹¹⁸ Bosch, L. I.; Mahon, M. F.; James, T. D. *Tetrahedron Lett.* 2004, 45, 2859–2862.
- ¹¹⁹ Kim, K. K.; Escobedo, J.O.; St. Luce, N.N.; Rusin, O.; Wong, D.; Strongin, R.M. *Org. Lett.* 2003, 5, 5007–10.
- ¹²⁰ Ni, W.; Kaur, G.; Springsteen, G.; Wang, B.; Franzen, S. *Bioorg. Chem.* 2004, 32, 571–581.
- ¹²¹ Franzen, S.; Ni, W.; Wang, B. *J. Phys. Chem. B.* 2003, 107, 12942–12948.
- ¹²² Zhu, L.; Anslyn, E.V.; *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 1222–1232.
- ¹²³ Adamczyk-Woźniak, A.; Cyrański, M.K.; Frączak, B.T.; Lewandowska, A.; Madura, I.D. *Tetrahedron.* 2012, 68, 3761–3767.
- ¹²⁴ Larkin, J. D.; Fossey, J. S.; James, T. D.; Brooks, B. R.; Bock, C. W. *J. Phys. Chem. A.* 2010, 114, 12531–12539
- ¹²⁵ Godoy-Alcantar, C.; Yatsimirsky, A.K.; Lehn, J.M. *J. Phys. Org. Chem.* 2005, 18, 979–985.
- ¹²⁶ Simion, A.; Simion, C.; Kanda, T.; Nagashima, S.; Mitoma, Y.; Yamada, T.; Mimura, K.; Tashiro, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* 2001, 2071–2078.
- ¹²⁷ Wagle, D.R.; Bose, A.K. *J. Org. Chem.* 1988, 53, 4227–4236.
- ¹²⁸ Bordier, A.; Compain, P.; Martin, O.R.; Ikeda, K.; Asano, N. *Tetrahedron: Asymmetry.* 2003, 14 1, 47–51.
- ¹²⁹ Irvine, J.C.; Hynd, A. *J. Chem. Soc.*, 1913, 103, 41-56.
- ¹³⁰ Irvine, J.C.; Earl, J.C. *J. Chem. Soc.*, 1922, 121, 2376-2381.
- ¹³¹ Biegasiewicz, K.F.; Priefer, R. *et al. Beilstein J. Org. Chem.* 2012, 8, 1814–1818.
- ¹³² Ramström, O.; Lohmann, S.; Bunyapaiboonsri, T.; Lehn, J.M. *Chem. Eur. J.* 2004, 10, 1711–1715.
- ¹³³ Galbraith, E.; Kelly, A. M.; Fossey, J. S.; Kociok-Köhn, G; Davidson, M.G.; Bull, S.D.; James, T. D. *New J. Chem.* 2009, 33, 181-185.
- ¹³⁴ Saggiomo, V.; Lüning, U. *Tetrahedron Lett.* 2009, 50, 4663–4665.

- ¹³⁵ (a) Yatsimirskaya, N.T.; Sosnovskaya, I.N.; Yatsimirsky, A.K. *Anal. Biochem.* 1995, 249–155. (b) Yatsimirsky, A.K.; Yatsimirskaya, N.T.; Kashina, S.B. *Anal. Chem.* 1994, 66, 2232–2239.
- ¹³⁶ Feuster, E. K.; Glass, T. E. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 16174–5.
- ¹³⁷ Crugeiras, J.; Rios, A., Riveiros, E.; Richard, J.P. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 13, 15815–15824.
- ¹³⁸ (a) Frey, P.A.; Cleland, W.W. *Bioorg. Chem.* 1998, 26, 175–192. (b) Hibbert, F.; Emsley, J. *Adv. Phys. Org. Chem.* 1990, 26, 255–79.
- ¹³⁹ Kovaříček, P.; Lehn, J.M. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 9446–55.
- ¹⁴⁰ Dunn, H.E.; Catlin, J.C.; Snyder, H.R. *J. Org. Chem.* 1968, 33, 4483–4486.
- ¹⁴¹ Kelly, A.M.; Pérez-Fuertes, Y.; Arimori, S.; Bull, S.D.; James, T.D. *Org. Lett.* 2006, 8, 1971–4.
- ¹⁴² (a) Cordes, E.H.; Jencks, W.P. *J. Am. Chem. Soc.* 1962, 84, 832–837. (b) Bruyneel, W.; Charette, J.J.; de Hoffman, E. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 88, 3808–3813. (c) Herscovitch, R.; Charette, J.J.; de Hoffman, E. *J. Am. Chem. Soc.* 1974, 96, 4954–4958.
- ¹⁴³ Metzler, C. M.; Cahill, A.; Metzler, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* 1980, 102, 6075–6082.
- ¹⁴⁴ Flores-Leonar, M.; Esturau-Escofet, N.; Méndez-Stivalet, J.M.; Marín-Becerra, A.; Amador-Bedolla, C. *J. Mol. Struct.* 2011, 1006, 600–605.
- ¹⁴⁵ Nagamatsu, H.; Okuyama, T.; Fueno, T. *Bull. Chem. Soc. Japan* 1984, 57, 2508–2514.
- ¹⁴⁶ Soundararajan, S.; Badawi, M.; Kohlrust, C. M.; Hagerman, J. H. *Anal. Biochem.*, 1989, 178, 125–134.
- ¹⁴⁷ Hansch, C., Leo, A., Taft, W., *Chem. Rev.*, 1991, 91, 165–195
- ¹⁴⁸ Stolowitz, M. L.; Ahlem, C. K.; Hughes, A.; Kaiser, R. J.; Kesicki, E.A.; Li, G.; Lund, K. P.; Torkelson, S. M.; and Wiley, J. P. *Bioconjugate Chem.*, 2001, 12, 229–239.
- ¹⁴⁹ Yurkanis B, P. 2004. *Organic Chemistry*, 4ª edición. Pearson Prentice Hall, New Jersey. Sección 16.4
- ¹⁵⁰ Pizer, R., Tihal, C. *Inorg. Chem.* 31, 3243–3247 (1992).
- ¹⁵¹ Weiss, J. W. E.; Bryce, D. L. *J. Phys. Chem. A* 2010, 114, 5119–5131
- ¹⁵² Wiskur, S. L.; Lavigne, J.J.; Ait-Haddou, H.; Lynch, V.; Chiu, Y.H.; Canary, J.W.; Anslyn, E.V. *Org. Lett.* 2001, 3, 1311–1314.
- ¹⁵³ Norrild, J. C., and Eggert, H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 1479–1484.
- ¹⁵⁴ Nicholls, M.P.; Paul, P. K. C. *Org. Biomol. Chem.* 2004, 2, 1434–1441.
- ¹⁵⁵ Sandanayake, K. R. A. S.; James, T. D.; Shinkai, S. *Pure Appl. Chem.* 1996, 68 (6), 1207–1212.
- ¹⁵⁶ Wiskur, S. L.; Lavigne, J. J.; Metzger, A.; Tobey, S. L.; Lynch, V.; Anslyn, E. V. *Chem. Eur. J. Weinheim an der Bergstrasse, Ger.* 2004, 10, 15, 3792–3804.
- ¹⁵⁷ Adaptado de Boduroglu, S.: Tesis: New supramolecular approach for sugar analysis. *University of Akron*, 2006.
- ¹⁵⁸ Nguyen, B. T.; Wiskur, S. L.; Anslyn, E. V. *Org. Lett.* 2004, 6, 2499–501.
- ¹⁵⁹ Nonaka, A.; Horie, S.; James, T. D.; Kubo, Y. *Org. Biomol. Chem.* 2008, 6, 3621–5.
- ¹⁶⁰ Paul, H.; Reginato, A.J.; Schumacher, R. H. *Arthritis Rheum.* 1983, 26, 191–200.
- ¹⁶¹ Farhadi, K.; Maleki, R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 30, 1023–1033.
- ¹⁶² Zhang, T.; Anslyn, E. V. *Org. Lett.* 2006, 8, 1649–52.
- ¹⁶³ Boduroglu, S.; El Khoury, J. M.; Venkat Reddy, D.; Rinaldi, P. L.; Hu, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 3974–7.

- ¹⁶⁴ (a) Fagnani, E.; Melios, C. B.; Pezza, L.; Pezza, H. R. *Talanta* 2003, 60, 171–6. (b) NIOSH Manual of Analytical Methods. Ed. Peter M. Eller, Mary E. Cassinelli. Formaldehyde: Method, 1994, 3500, 2.
- ¹⁶⁵ (a) Clarke, A. L.; Jennings, A. C. *J. Agric. Food Chem.*, 1965, 13, 2, pp 174–176. (b) Cogan, D.; Cleary, J.; Phelan, T.; McNamara, E.; Bowkett, M.; Dermot, D. *Anal. Methods*, 2013, 5, 4798-4804.
- ¹⁶⁶ Sleem, H. F.; Dawe, L. N.; Georghiou, P. E. *Tetrahedron Lett.* 2013, 54, 26, 3444–3448.
- ¹⁶⁷ Dawson, R.M.C., *et al.*, 1959. *Data for Biochemical Research*, Oxford, Clarendon Press.
- ¹⁶⁸ Cheng, K.L. Ueno, K.; Imamura, T. (Eds.) 1982. *Handbook of Analytical Reagents*, p. 35-43. Información de producto: Sigma-Aldrich CRC.
- ¹⁶⁹ Martínez-Aguirre; M. A., Villamil-Ramos, R., Guerrero-Álvarez, J. A.; Yatsimirsky, A. K. *J. Org. Chem.* 2013, 78, 4674–4684.
- ¹⁷⁰ Brustad, E. M., 2011., Dissertation Publishing UMI (*University of Michigan*). ProQuest.
- ¹⁷¹ Zhang, T.; Anslyn, E. V. *Org. Lett.* 2006, 8, 1649–52.
- ¹⁷² Bhattacharyya, L.; Rohrer, J. S. (Eds.). 2012. *Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products*. John Wiley & Sons, Inc.
- ¹⁷³ Angyal, S. J. en: Tipson, R. S. y Horton, D. (Eds.), 1984. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. The composition of reducing sugars in solution*. Elsevier, 42, 15–68
- ¹⁷⁴ Yan, J., Springsteen, G., Deeter, S. & Wang, B. *Tetrahedron*, 2004, 60, 11205–11209.
- ¹⁷⁵ S. Fujii, R. Kikuchi, H. Kushida. *J. Org. Chem.*, 1966, 31 7, p. 2239–2241. En Tesis: Pérez-Rosa, E.M.S. *Universidad de Extremadura*. Badajoz, 2006.
- ¹⁷⁶ Fuentes-Martínez, Y.; Godoy-Alcántar, C.; Medrano, F.; Dikiy, A.; Yatsimirsky, A. K. *Supramol. Chem.*, 2010, 22, 212–220.
- ¹⁷⁷ Hutin, M.; Bernardinelli, G.; Nitschke, J.R. *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 4585–93.
- ¹⁷⁸ Adamczyk-Woźniak, A.; Madura, I.; Velders, A. H.; Sporyński, A. *Tetrahedron Lett.* 2010, 51, 6181–6185.
- ¹⁷⁹ Schneider, H.-J.; Yatsimirsky, A. K. *Chem. Soc. Rev.* 2008, 37, 263–277.
- ¹⁸⁰ Metzler, C. M.; Cahill, A.; Metzler, D. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 6075–6082.
- ¹⁸¹ Collins, B. E.; Sorey, S.; Hargrove, A. E.; Shabbir, S. H.; Lynch, V. M.; Anslyn, E. V. *J. Org. Chem.* 2009, 74 (11), 4055–4060.
- ¹⁸² Bencini, A.; Bianchi, A.; Garcia-España, E. *Coord. Chem. Rev.* 1999, 188, 97-156.
- ¹⁸³ Frassinetti, C.; Alderighi, L.; Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A.; Ghelli, S. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 376, 7, 1041–1052.
- ¹⁸⁴ (a) Nagamatsu, H.; Okuyama, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1984, 2502–2507.; (b) G. Rao and M. Philipp, *J. Org. Chem.*, 1991, 56, 1505–1512.
- ¹⁸⁵ Cordes, E. H.; Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85, 2843
- ¹⁸⁶ Maruyoshi, K.; Yamaguchi, T.; Demura, T.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Chem.–Eur. J.*, 2011, 17, 4788–4795.
- ¹⁸⁷ Los cálculos fueron realizados en colaboración con el Dr. Felipe Medrano, adscrito al *Centro de Investigaciones en Química (CIQ)* de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).
- ¹⁸⁸ Allen, F. H.; Kennard, O.; Taylor, R. *Acc. Chem. Res.* 1983, 16, 5, 146–153.
- ¹⁸⁹ Cooper, C. R.; James, T. D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 2000, 1, 963–969.
- ¹⁹⁰ Zhao, J.; Davidson, M. G.; Mahon, M. F.; Kociok-Köhn, G.; James, T. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 49, 16179–16186.

- ¹⁹¹ Schneider, H.-J. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, 48, 3924–3977.
- ¹⁹² Weston, G. S.; Blázquez, J.; Baquero, F.; Shoichet, B. K. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 23, 4577–4586.
- ¹⁹³ Akay, S.; Yang, W.; Wang, J.; Lin, L.; Wang, B. *Chem. Biol. Drug Des.* 2007, 70, 279–289.
- ¹⁹⁴ Schumacher, S.; Grüneberger, F.; Katterle, M.; Hettrich, C.; Hall, D.G.; Scheller, F. W.; Gajovic-Eichelmann, N.; *Polymer*, 2011, 52, 2485-2491.
- ¹⁹⁵ *Jaguar, version 7.7*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2010.
- ¹⁹⁶ Tannor D. J.; Marten, B.; Murphy, R.; Friesner, R. A.; Sitkoff, D.; Nicholls, A.; Ringnalda, M.; Goddard, W. A. III; Honig, B. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 11875.
- ¹⁹⁷ Puius, Y. A.; Stievater, T. H.; Srikrishnan, T. *Carbohydr. Res.*, 2006, 341, 2871–2875.
- ¹⁹⁸ Harrison, W. T. A.; Yathirajan, H. S.; Narayana, B.; Sreevidyac, T. V.; Sarojini, B. K. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online*, 2007, 63, o3248.

APÉNDICE 1

Contenido

Espectros electrónicos para la asociación de 2fPBA con indicadores

Alizarina roja sulfonato (ARS), pH 7.4

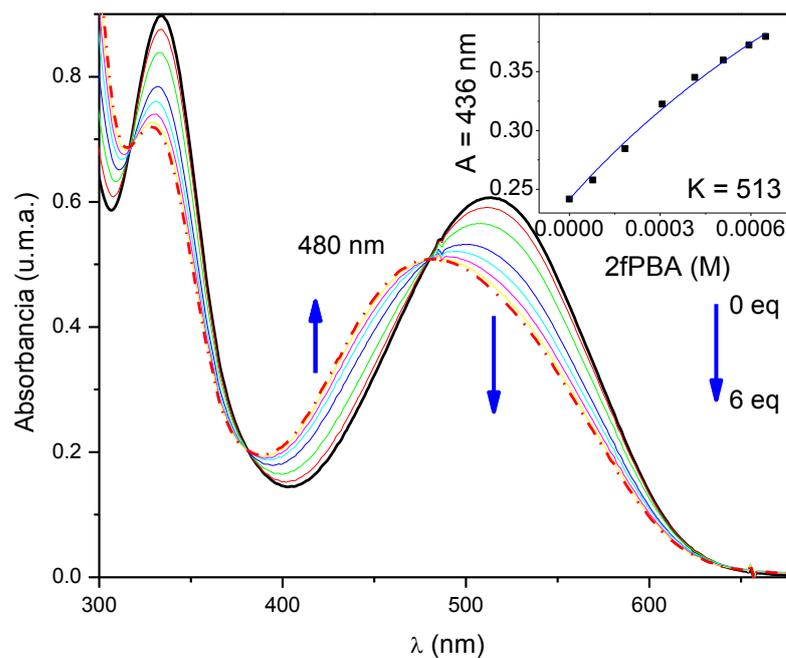


Figura A. 1 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 1.9 mM con ARS 1.03×10^{-4} M. Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.4

Pirocatecol Violeta (PCV) pH 6.5

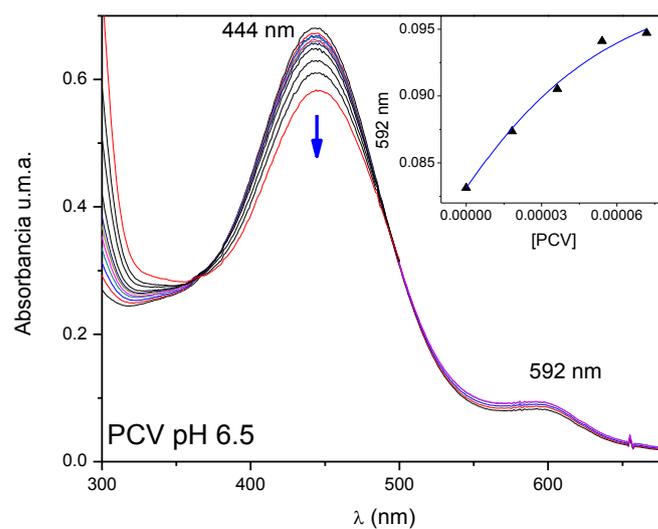


Figura A.2 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 4.39 mM con PCV 4.44e-5 M. Solución amortiguadora MOPS 0.051 M, pH 6.5.

- Pirocatecol Violeta (PCV) pH 7.0

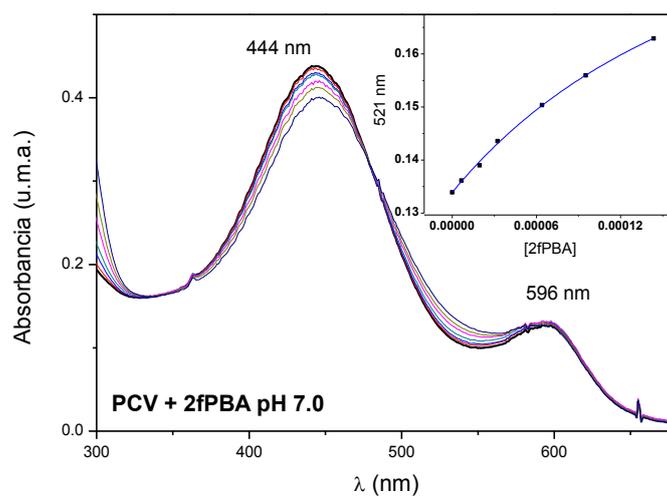


Figura A. 3 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 3.1 mM con PCV 3.28 E-5 M. Solución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.0.

Pirocatecol Violeta (PCV) pH 7.6

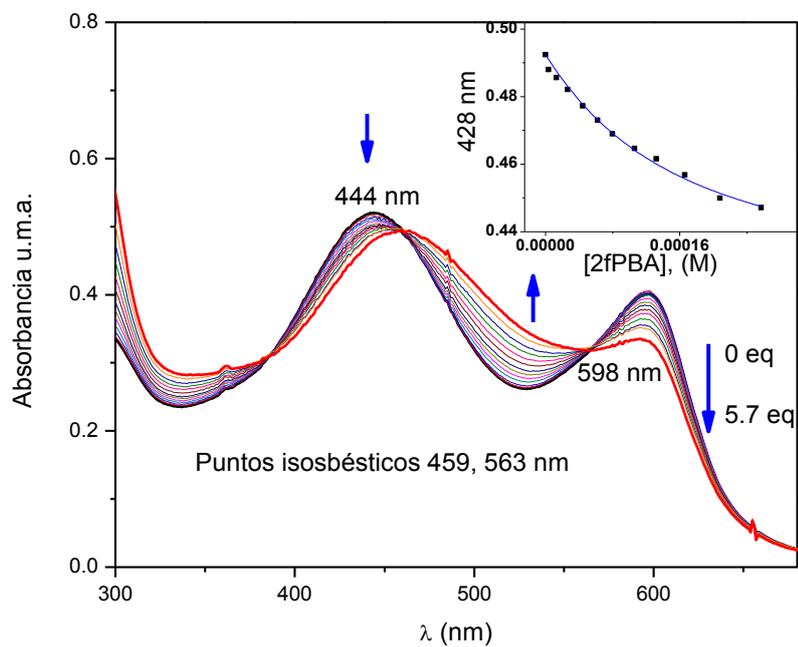


Figura A.4 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 3.1 mM con PCV 4.7 E-5 M. Solución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.6.

Ácido Cromotrópico (CTA) pH 6.5

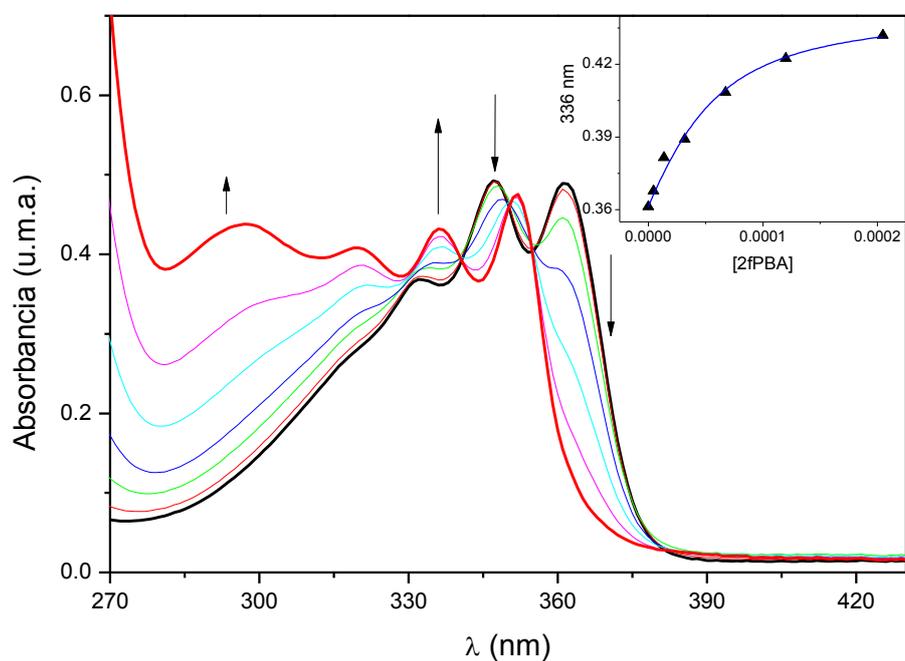


Figura A. 5 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 4.4 mM con CTA 4.4 E-5 M. Solución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 6.5.

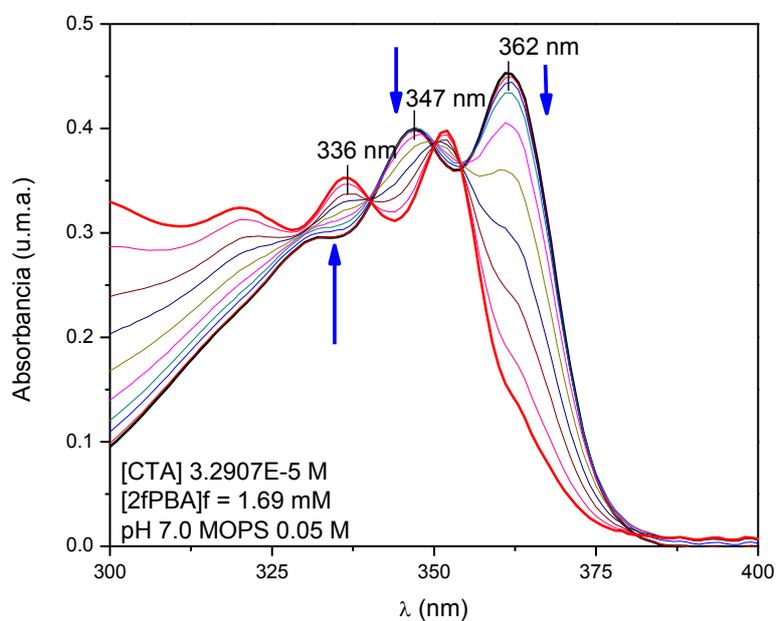


Figura A.6 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 3.1 mM con CTA 3.3 E-5 M. Solución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.0.

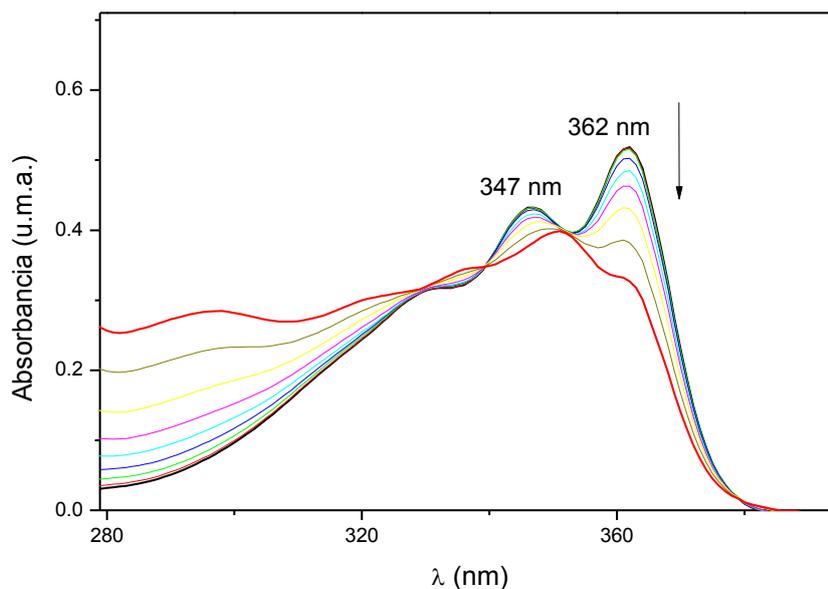
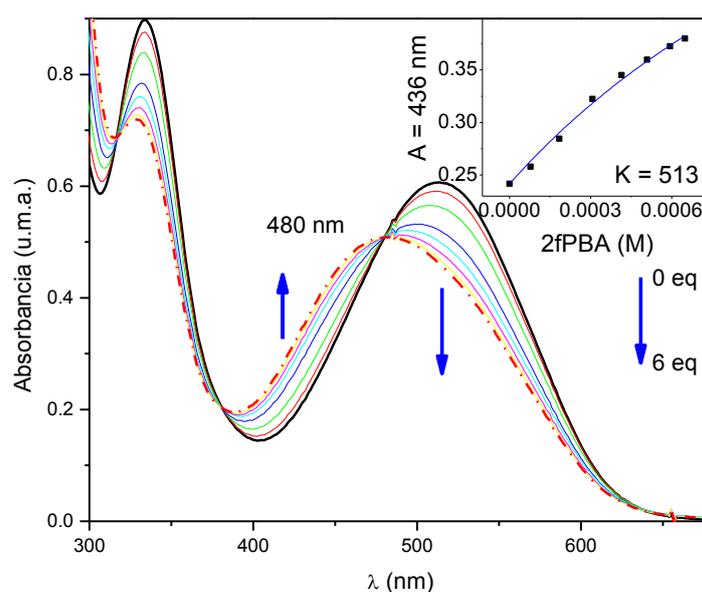


Figura A. 7 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 3.1 mM con CTA 3.8×10^{-5} M. Solución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.6.

Sulfonato de Rojo de alizarina (ARS) pH 7.4



Titulación de 2fPBA 1.94×10^{-3} en ARS
Buffer fosfato 0.1M pH 7.4

Figura A. 8 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 1.9 mM con ARS 1.04×10^{-4} M. Solución amortiguadora fosfato 0.1 M, pH 7.4.

APÉNDICE 2

CONTENIDO

Demostración:

El pH óptimo se puede reducir al promedio del pK_a de las dos especies, el ácido y el diol:

Deducción de la constante K_{obs}

En un sistema donde $B + D \xrightleftharpoons{K_{eq}} BD + H_2O$ $[D] \gg [B]$

$$K = \frac{[BD]}{[B][D]}$$

Definiciones: $[B]_0 = [B] + [BD]$; $[B] = [B]_0 - [BD]$

$[D]_T = [D] + [BD]$; $[D] = [D]_T - [BD]$

$$K = \frac{[BD]}{([B]_0 - [BD])([D]_T - [BD])}$$

Dado que $[D] \gg [B]$; entonces $[D]_T - [BD] \approx [D]_T$

$$K = \frac{[BD]}{([B]_0 - [BD])[D]_T}$$

$$K[B]_0[D]_T = [BD] + [BD](K[D]_T)$$

$$[BD] = \frac{K[B]_0[D]_T}{1 + K[D]_T}$$

tenemos que $A = A_B + A_{BD}$:

$$A = \varepsilon_B[B] + \varepsilon_{BD}[BD]$$

$$A = A_0 + [BD](\varepsilon_{BD} - \varepsilon_B)$$

$$A = A_0 + \varepsilon_{BD}[BD] - \varepsilon_B[BD], \text{ reemplazando } [BD]$$

$$A = A_0 + \frac{K[D]_T[B]_0}{1 + K[D]_T} \varepsilon_{BA} - \frac{K[D]_T[B]_0}{1 + K[D]_T} \varepsilon_B$$

se tiene que: $[B]_0 \varepsilon_B = A_0$ y $[B]_0 \varepsilon_{BA} = A_c$; entonces:

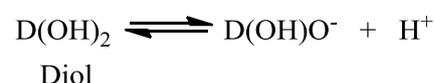
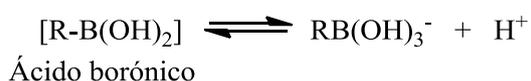
$$A = A_0 \left(1 - \frac{K[D]_T}{1 + K[D]_T} \right) + \frac{A_c K[D]_T}{1 + K[D]_T}$$

$$A = \frac{A_0 + A_c K[D]_T}{1 + K[D]_T}$$

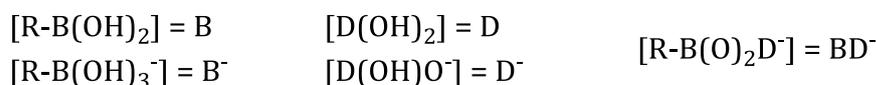
Deducción de la ecuación para pH óptimo:

$$\text{pH}_{\text{óptimo}} = \frac{\text{p}K_a(\text{diol}) + \text{p}K_a(\text{BA})}{2}$$

La reacción para la que es posible aplicar esta deducción es la de un ácido borónico con su diol, cada uno de ellos con sus propios equilibrios de protonación:



Definiciones para continuar con la deducción:



Equilibrios ácido-base:

$$K_a^B = \frac{[\text{B}^-][\text{H}^+]}{[\text{B}]}$$

$$K_a^D = \frac{[\text{D}^-][\text{H}^+]}{[\text{D}]}$$

Para la reacción inicial se tiene:

$$K_{\text{obs}} = \frac{[\text{BD}^-]_T}{[\text{B}]_T[\text{D}]_T}$$

Balance de masa

$$[\text{B}]_T = [\text{B}] + K_a^B \frac{[\text{B}]}{[\text{H}^+]} = [\text{B}] \left(1 + \frac{K_a^B}{[\text{H}^+]} \right)$$

$$[\text{D}]_T = [\text{D}] + K_a^D \frac{[\text{D}]}{[\text{H}^+]} = [\text{D}] \left(1 + \frac{K_a^D}{[\text{H}^+]} \right)$$

La constante elemental será:

$$K = \frac{[BD^-][H^+] \left(1 + \frac{K_a^B}{[H^+]}\right) \left(1 + \frac{K_a^D}{[H^+]}\right)}{[B]_T[D]_T} = K_{obs} \left(1 + \frac{K_a^B}{[H^+]}\right) \left(1 + \frac{K_a^D}{[H^+]}\right) [H^+]$$

$$K_{obs} = \frac{K}{\left(1 + \frac{K_a^B}{[H^+]}\right) \left(1 + \frac{K_a^D}{[H^+]}\right) [H^+]} = \frac{K[H^+]}{(K_a^B + [H^+])(K_a^D + [H^+]})$$

El momento de máxima asociación corresponde a: $\frac{\partial K_{obs}}{\partial [H^+]} = 0$

Por lo tanto:

$$\frac{\partial K_{obs}}{\partial [H^+]} = \frac{-K[H^+]^2 + KK_a^B K_a^D}{[(K_a^B + [H^+])(K_a^D + [H^+])]^2} = 0$$

$$-K[H^+]^2 + KK_a^B K_a^D = 0; K[H^+]^2 = KK_a^B K_a^D$$

$$[H^+] = (K_a^B K_a^D)^{1/2}$$

$$\log_{10}[H^+] = \frac{\log K_a^B + \log K_a^D}{2}$$

Se multiplica por -1 a ambos lados y se obtiene que:

$$pH = \frac{pK_a^B + pK_a^D}{2}$$

APÉNDICE 3

Interacciones de glucósidos con 2fPBA por el método Desplazamiento de indicador, pH 7.0 y 7.4 con ARS.

Fructosa

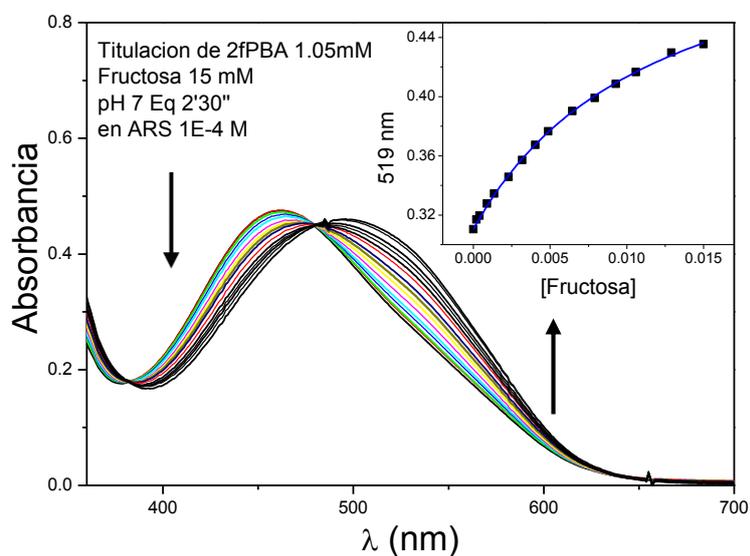


Figura A. 9 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 1.0 mM con fructosa 15 mM. ARS 1E-4 M, solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, pH 7.0.

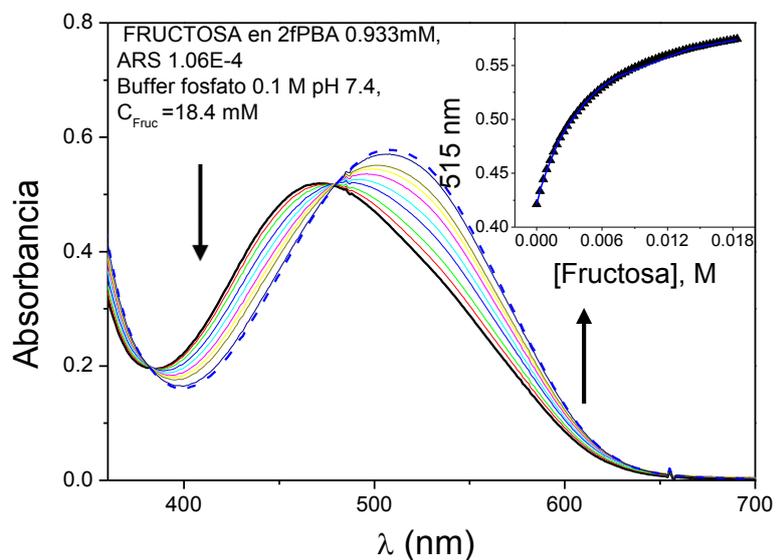


Figura A. 10 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 1.0 mM con fructosa 18.4 mM. ARS 1E-4 M, solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

Glucosa

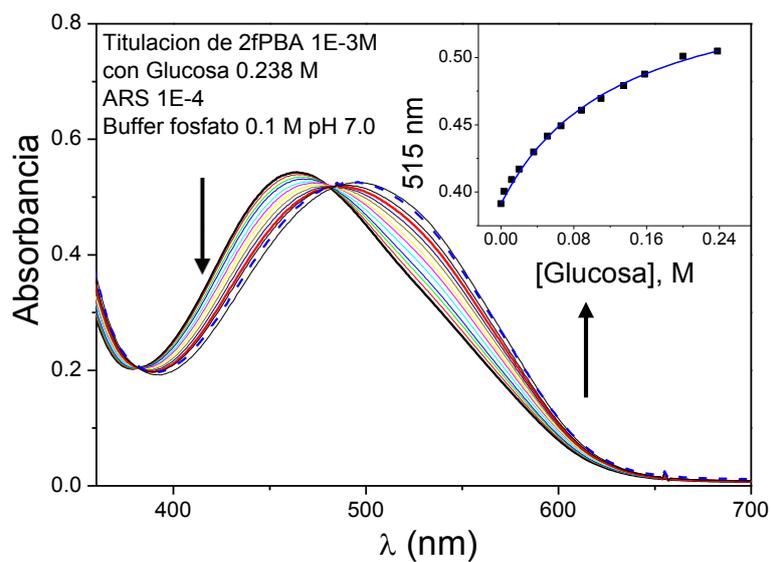


Figura A. 11 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 1.0 mM con glucosa 0.238 1E-4 M, solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, pH 7.0.

M. ARS

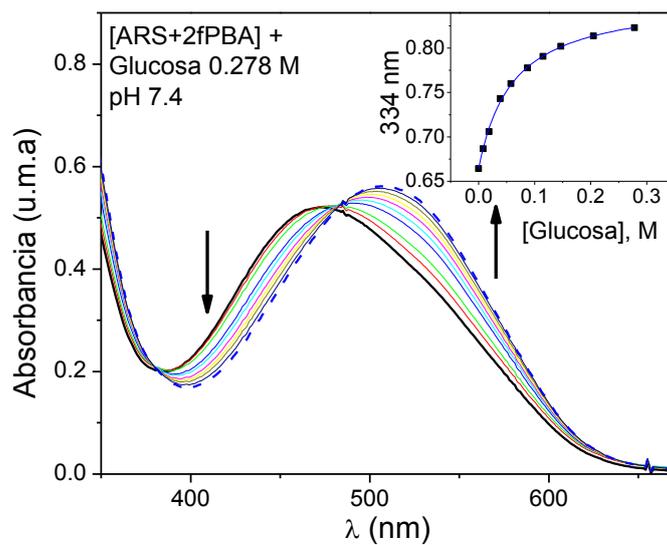


Figura A. 12 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 1.0 mM con glucosa 27.8 mM. ARS 1E-4 M, solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

Sorbitol

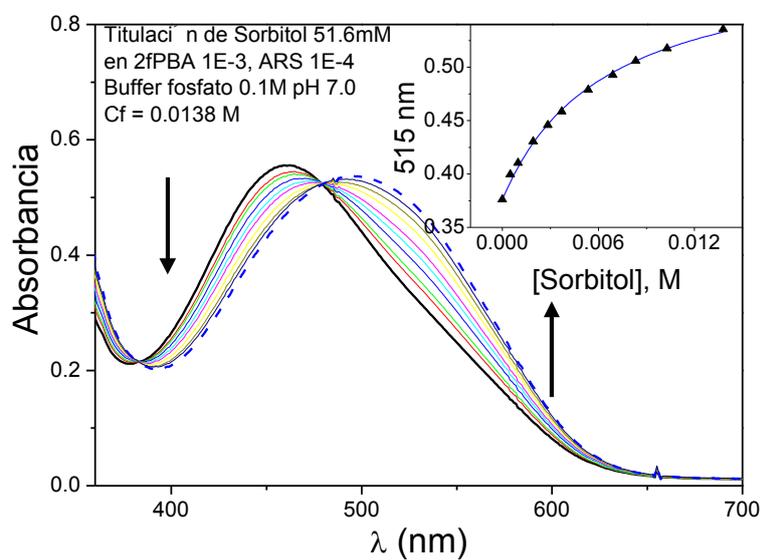


Figura A. 13 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 1.0 mM con glucosa 27.8 mM. ARS 1E-4 M, solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

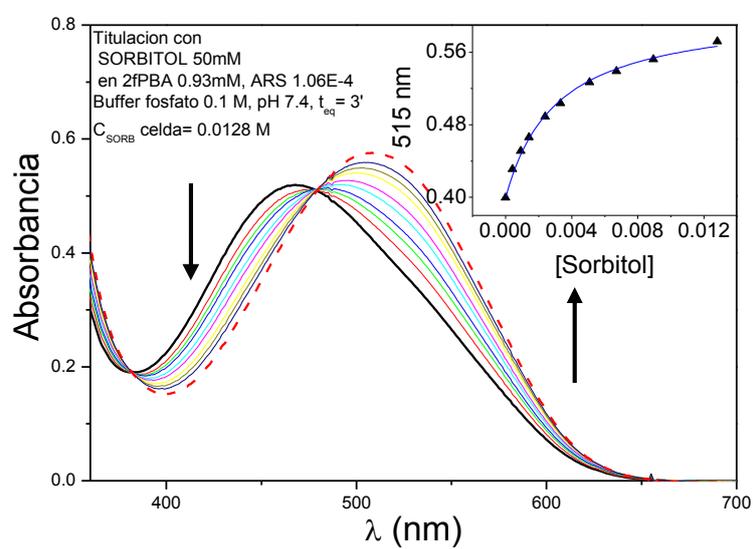


Figura A. 14 Cambios espectrales para la titulación por IDA de 2fPBA 1.0 mM con glucosa 27.8 mM. ARS 1E-4 M, solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

APÉNDICE 4

Cambios espectrales del PBA y el 2fPBA con GluNH₂ a pH 7.4.

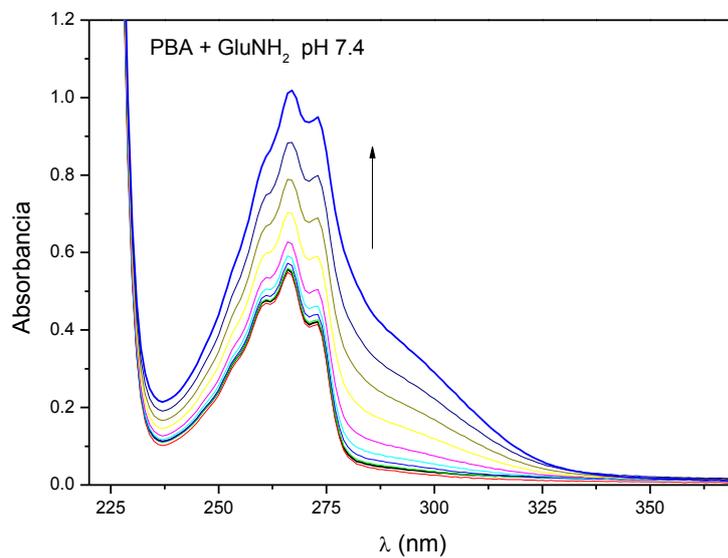


Figura A. 15 Cambios espectrales para la titulación de PBA 1.11 mM con GluNH₂ 49.5 mM (0 – 17 mM), solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

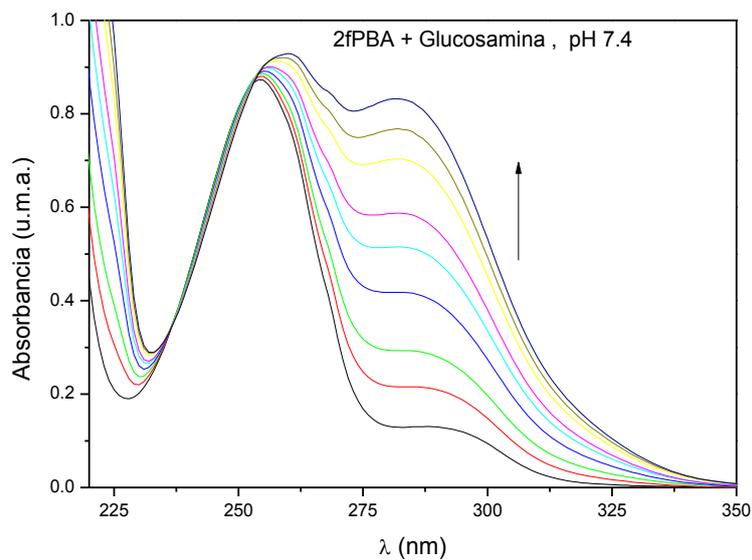


Figura A. 16 Cambios espectrales para la titulación de 2fPBA 0.23 mM con GluNH₂ 50.5 mM (0 – 12 mM), solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

APÉNDICE 5

Cambios espectrales con aminoglucósidos con 2fPBA, pH 7.3

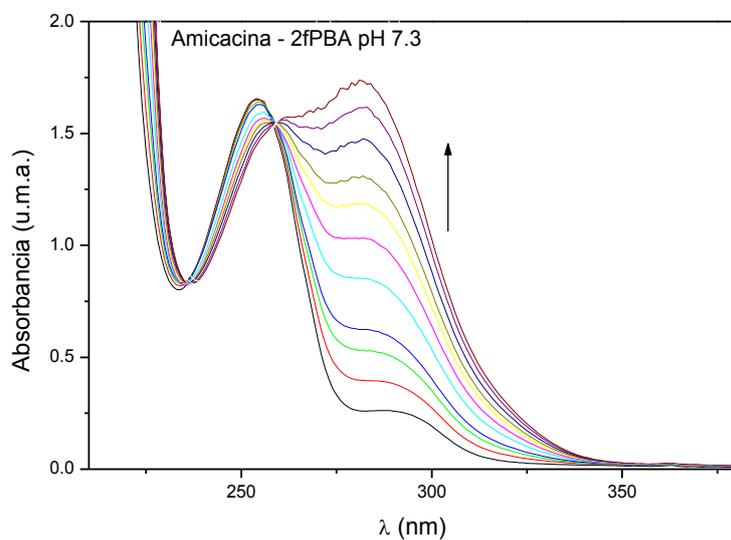


Figura A. 17 Cambios espectrales para la titulación de 2fPBA 0.26 mM con amikacina 49.31 mM (0 – 4 mM) en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.3

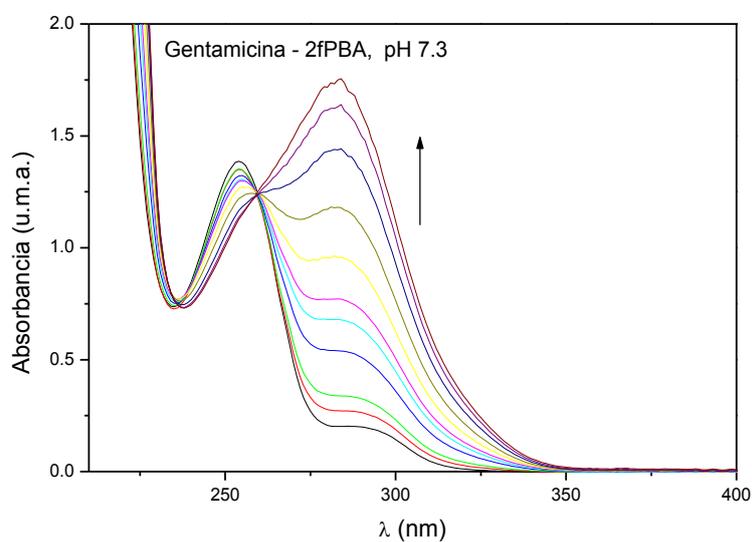


Figura A. 18 Cambios espectrales para la titulación de 2fPBA 0.25 mM con gentamicina (0 – 7 mM) en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.3

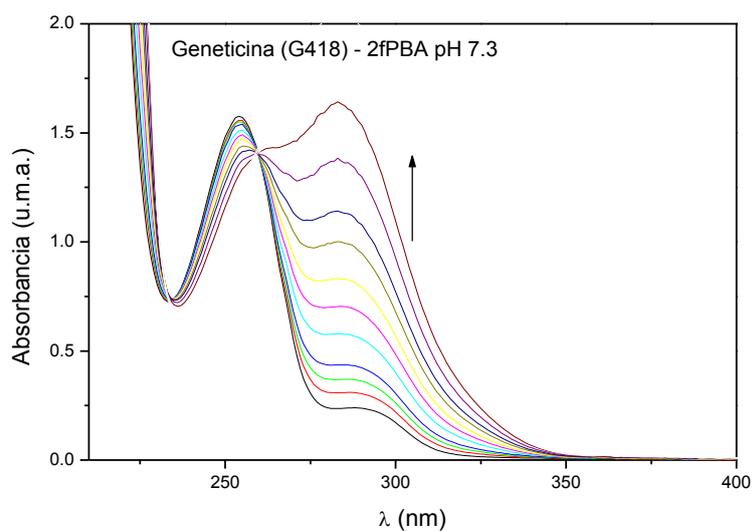


Figura A. 19 Cambios espectrales para la titulación de 2fPBA 0.24 mM con geneticina 57.2 mM (0 – 9 mM) en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.3

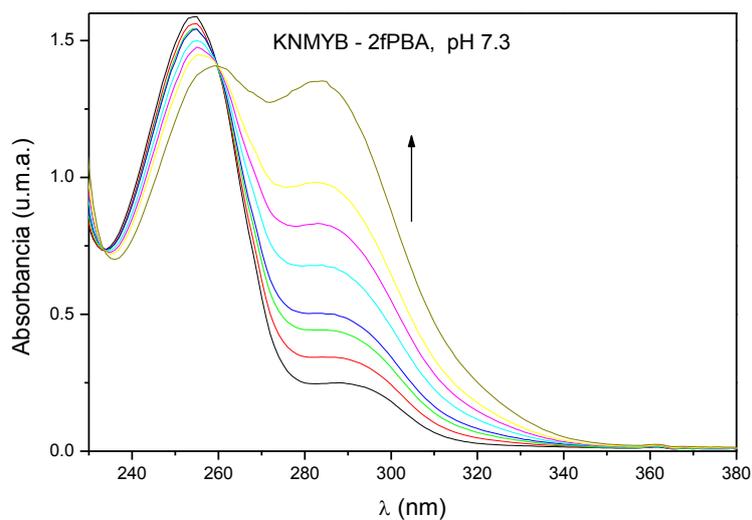


Figura A.20 Cambios espectrales para la titulación de 2fPBA 0.24 mM con knmyB 48.4 mM (0 – 8 mM) en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.3

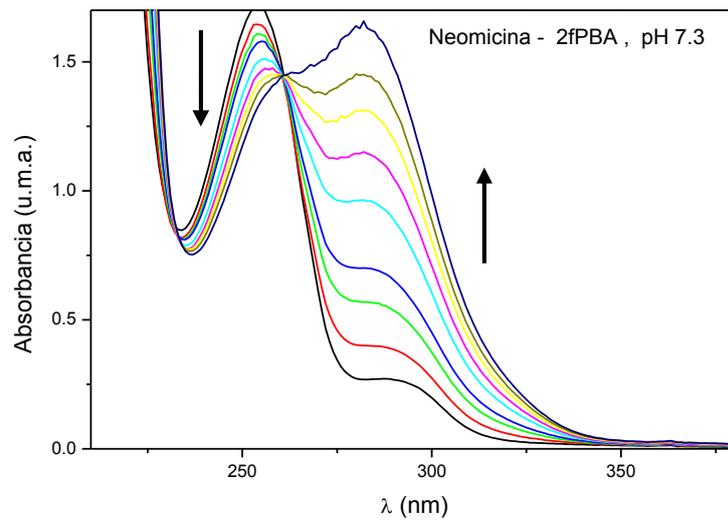


Figura A.21 Cambios espectrales para la titulación de 2fPBA 0.24 mM con nmcy 46.7 mM (0 – 4 mM) en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.3

APÉNDICE 6

Espectros de RMN ^1H del avance de las titulaciones en los valores de pH analizados:

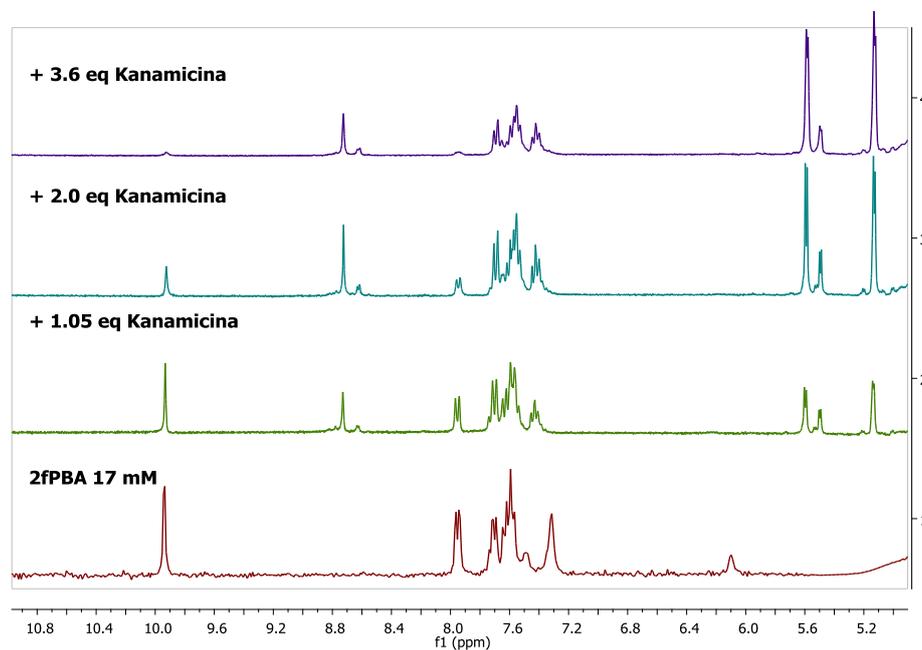


Figura A. 22 δ RMN ^1H de 2fPBA en presencia de knmyA (0 – 3.6 eq), pH 7.0 ajustado con NaOD en D_2O .

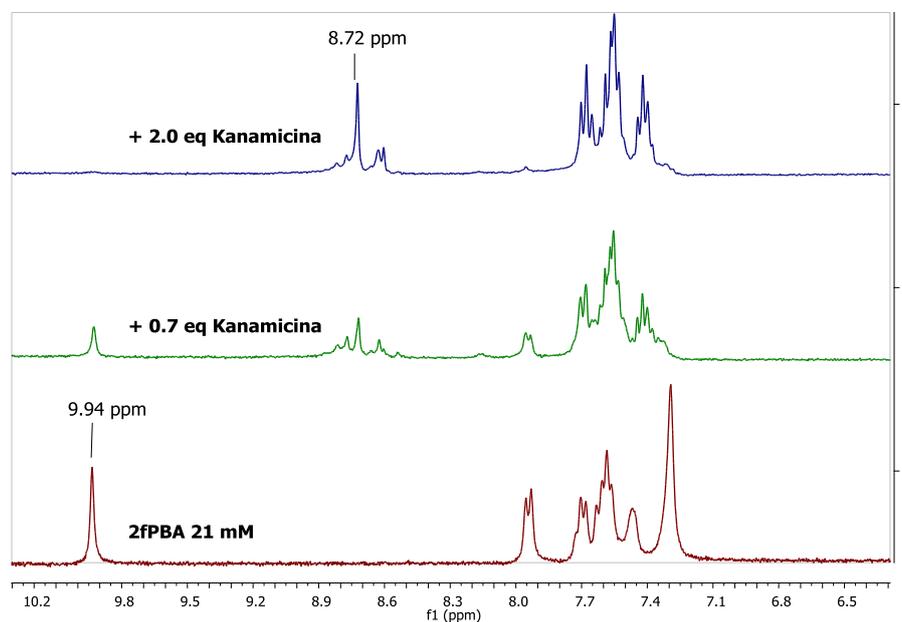


Figura A. 23 δ RMN ^1H de 2fPBA 21 mM en presencia de knmyA (0 – 2.0 eq), pH 7.3 ajustado con NaOD en D_2O .

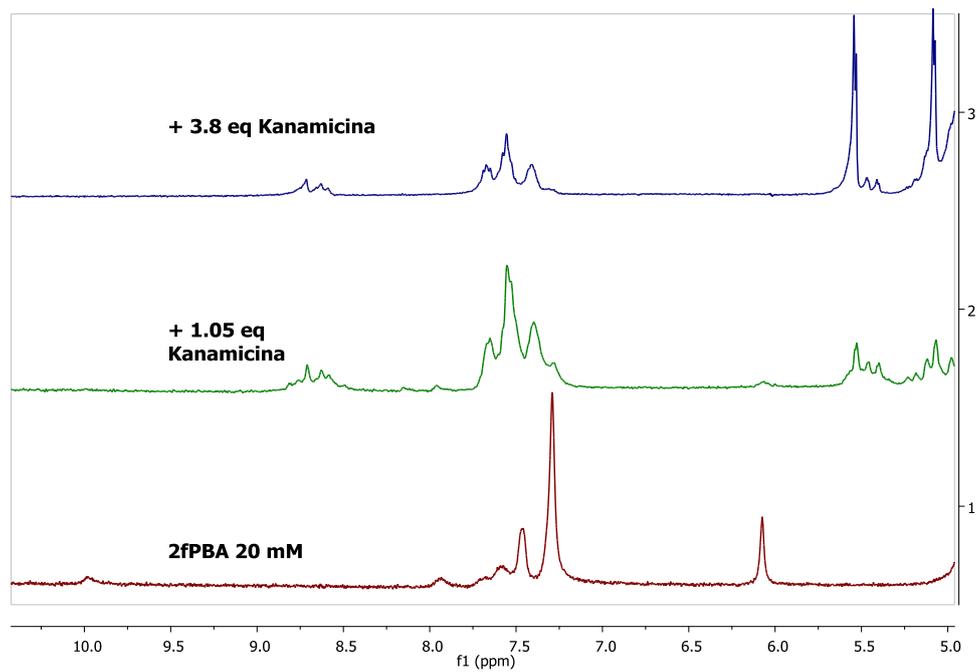


Figura A.24 δ RMN ^1H de 2fPBA 20 mM en presencia de knmyA (0 – 3.8 eq), pH 8.0 ajustado con NaOD en D_2O .

GluNH₂

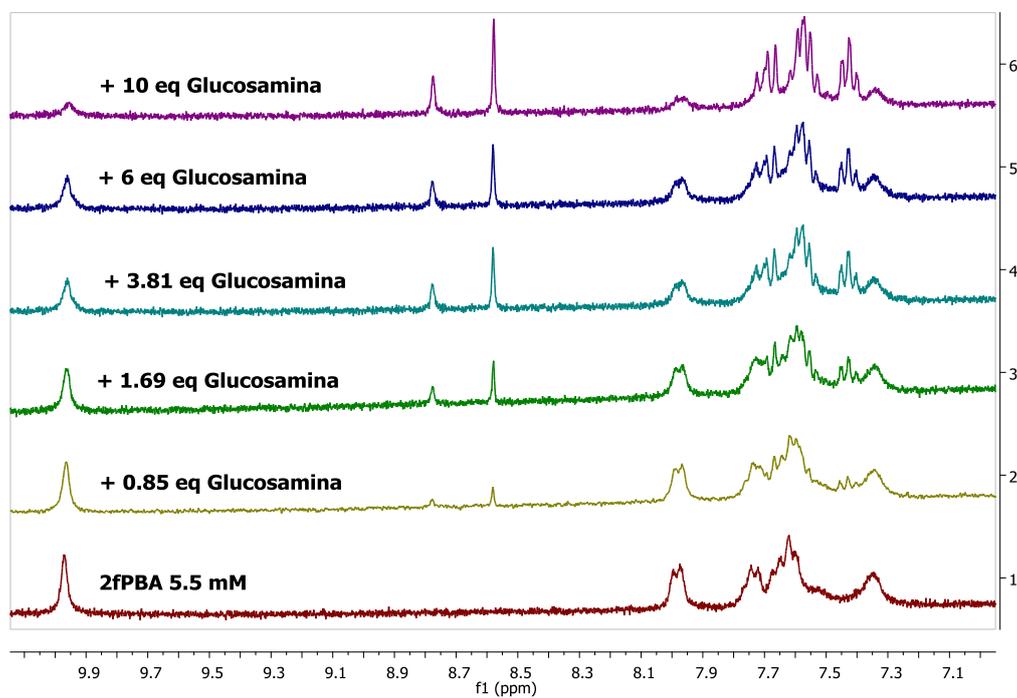


Figura A. 25 δ RMN ^1H de 2fPBA 5.5 mM en presencia de GluNH₂ (0 – 10 eq), pH 6.89 en D_2O .

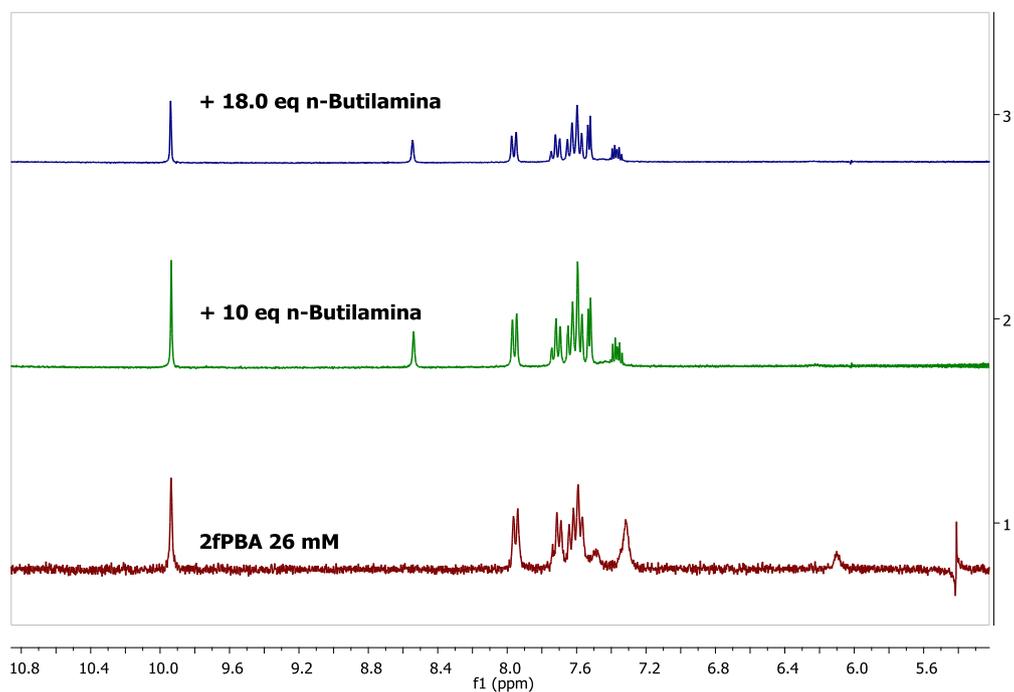


Figura A. 26 δ RMN ^1H de 2fPBA 26 mM en presencia de n-BuNH_2 (0 – 18 eq), pH 7.0 ajustado en D_2O .

- 3fPBA

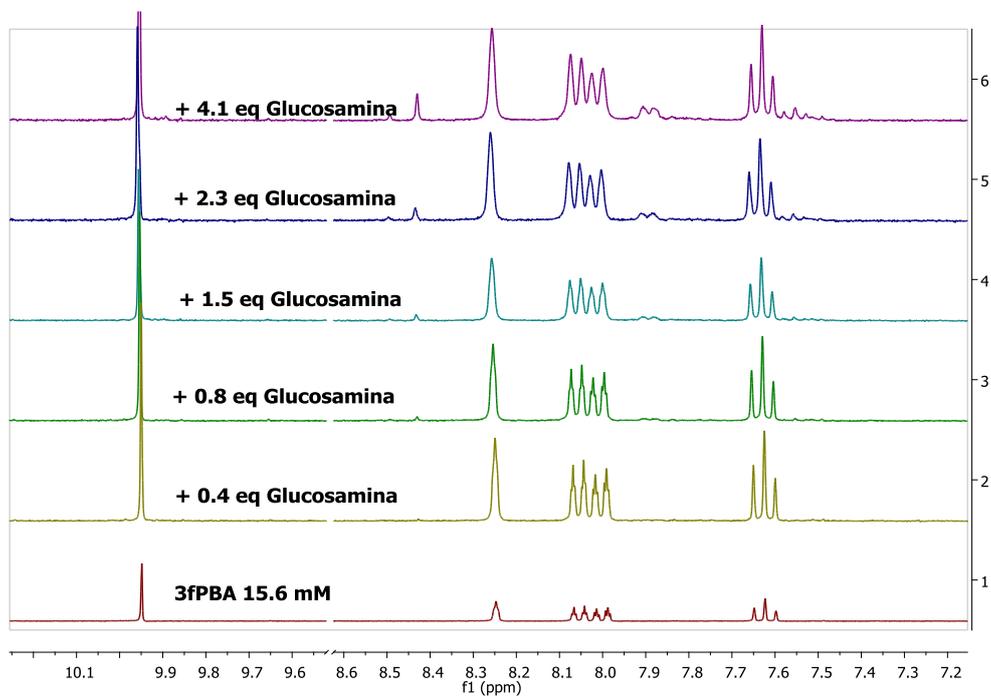


Figura A. 27 δ RMN ^1H de 3fPBA 15.6 mM en presencia de GluNH_2 (0 – 4.1 eq), pH 7.0 ajustado en D_2O .

• 4fPBA

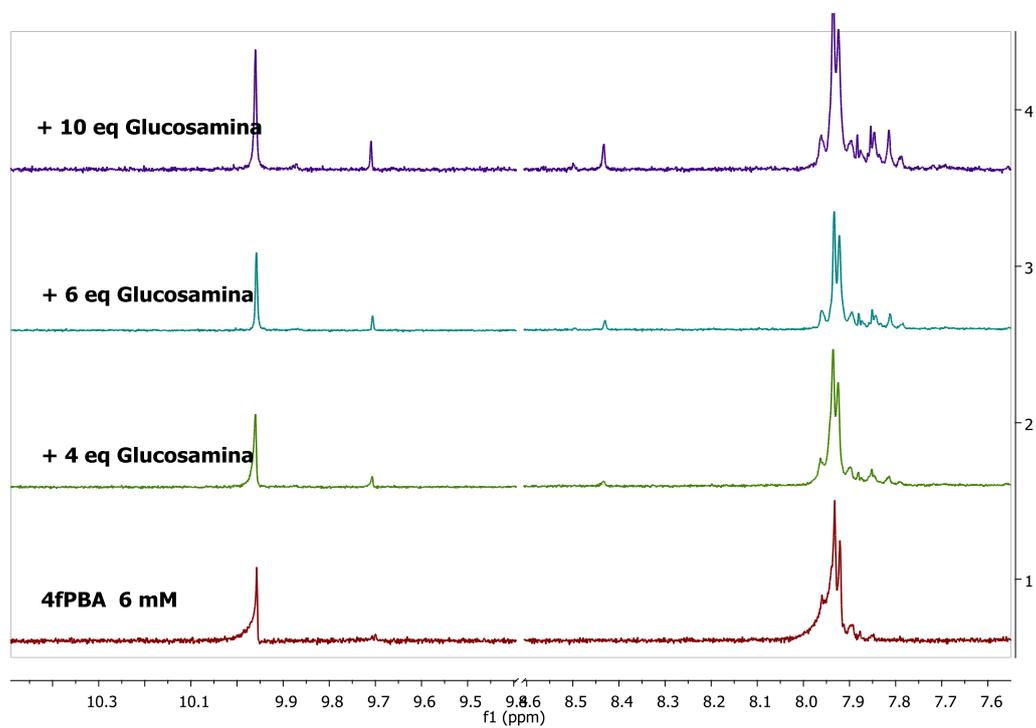


Figura A. 28 δ RMN ^1H de 4fPBA 6.0 mM en presencia de GluNH_2 (0 – 10 eq), pH 6.89 ajustado en D_2O .

APÉNDICE 7

Interacción aminoglucósidos con 2fPBA, pH 7.3

Amicacina

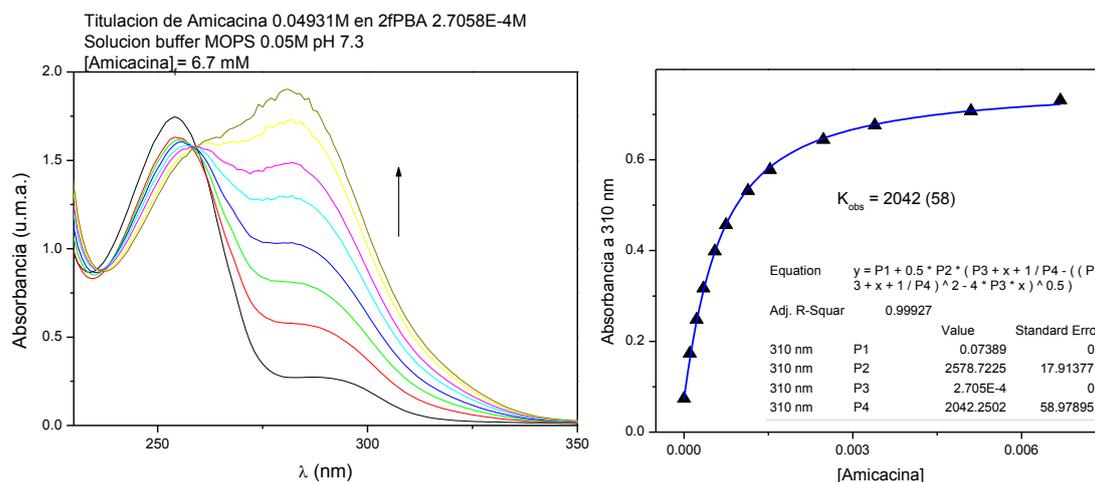


Figura A. 29 Cambios espectrales para la titulación de 2fPBA 0.27 mM con amikacina 49.31 mM (0 – 6.7 mM) en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.3 y perfil a 310 nm con ajuste al modelo de interacción 1:1.

G418 - Geneticina

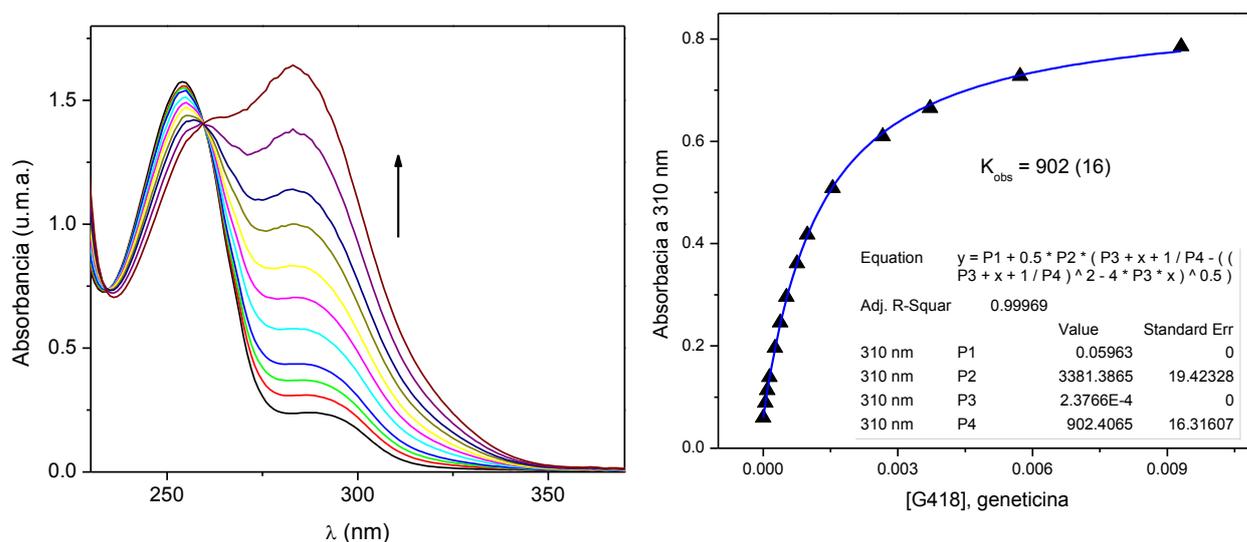


Figura A. 30 Cambios espectrales para la titulación de 2fPBA 0.24 mM con gentamicina (0 – 9 mM) en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.3 y perfil a 310 nm con ajuste al modelo de interacción 1:1.

Gentamicina

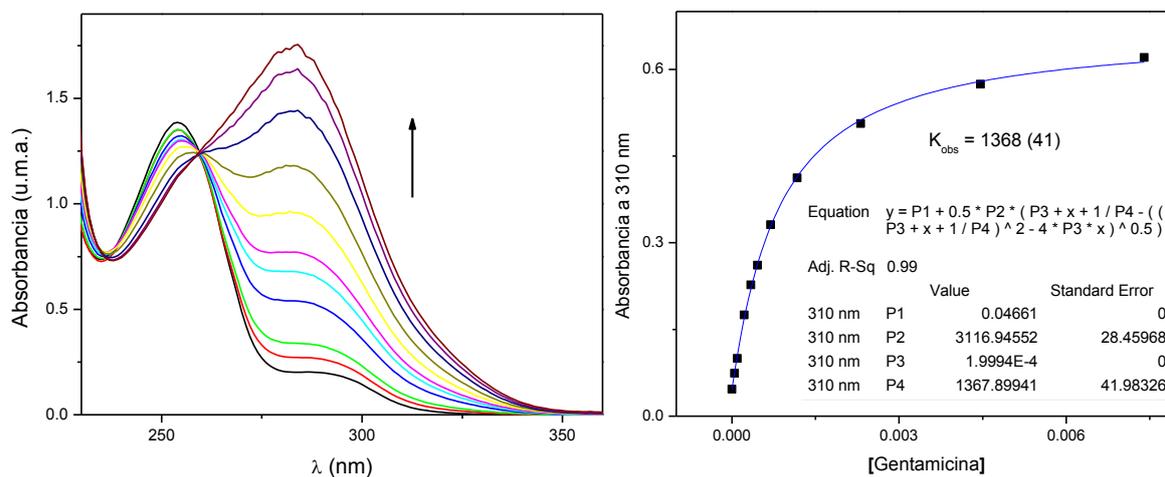


Figura A. 31 Cambios espectrales para la titulación de 2fPBA 0.25 mM con gentamicina (0 – 7 mM) en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.3 y perfil a 310 nm con ajuste al modelo de interacción 1:1.

Kanamycina B

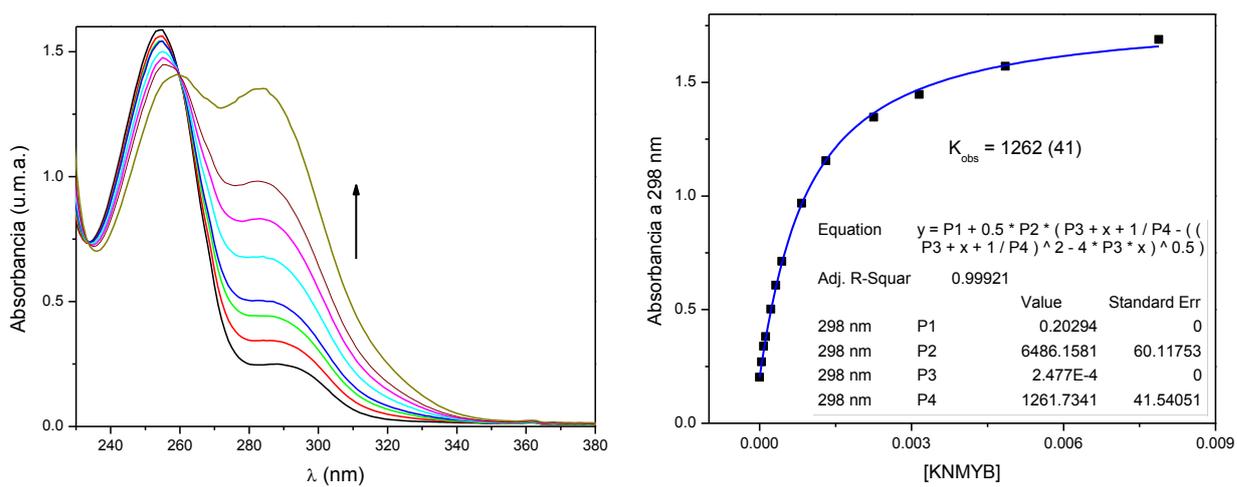


Figura A. 32 Cambios espectrales para la titulación de 2fPBA 0.25 mM con kanamycina B (0 – 8 mM) en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.3 y perfil a 298 nm con ajuste al modelo de interacción 1:1.

Neomycina

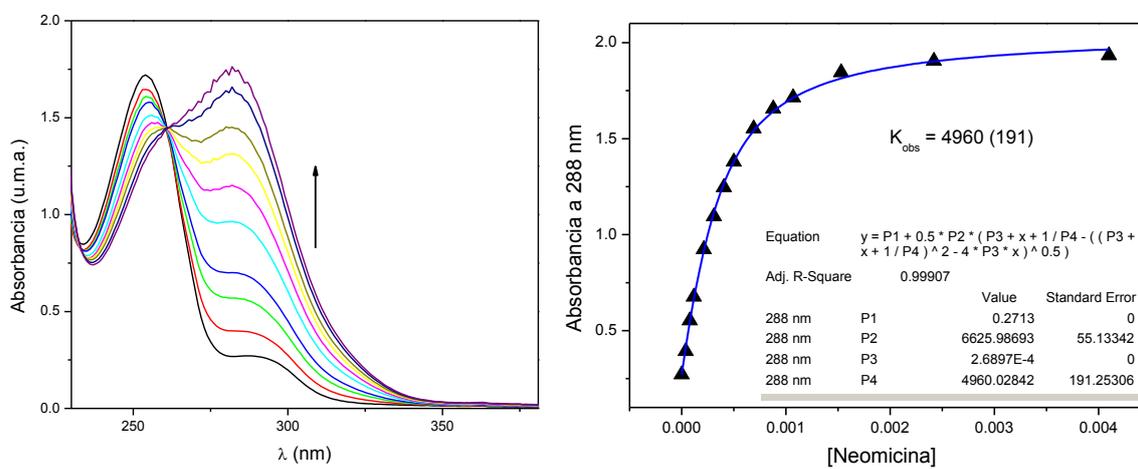


Figura A. 33 Cambios espectrales para la titulación de 2fPBA 0.27 mM con gentamicina (0 – 4 mM) en disolución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH 7.3 y perfil a 288 nm con ajuste al modelo de interacción 1:1.

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 6960

www.rsc.org/obc

PAPER

Schiff base formation and recognition of amino sugars, aminoglycosides and biological polyamines by 2-formyl phenylboronic acid in aqueous solution†

Nini J. Gutiérrez-Moreno,^a Felipe Medrano^b and Anatoly K. Yatsimirsky*^a

Received 10th April 2012, Accepted 10th July 2012

DOI: 10.1039/c2ob26290h

Interactions of 2-, 3- and 4-formyl phenylboronic acids (FPBAs) with sugars, amino sugars, aminoglycosides and various poly- and monoamines have been studied by UV-vis, ¹H and ¹¹B NMR titrations in water at variable pH. Behavior of 2-FPBA was anomalous in several aspects. Transformation of the acid into its conjugate base was slow in NMR time scale and was accompanied by intramolecular cyclization affording the respective benzoboroxole. The equilibrium constants for imine formation (K_{imine}) between 2-FPBA and simple monoamines including amino sugars were *ca.* 2 orders of magnitude larger than those with other isomers. Still one order of magnitude larger K_{imine} values were observed for 2-FPBA with aminoglycosides (kanamycin, amikacin, gentamicin, neomycin) and polyamines (spermine, spermidine). The examination of UV-vis and ¹¹B NMR spectra of imines formed with 2-FPBA showed that formally neutral Schiff bases in fact were zwitterionic species containing a protonated imine group and an anionic B(OH)₃⁻ group. The enhanced stability of imines with monoamines can therefore be attributed to the electrostatic stabilization provided by the zwitterionic structure and further increased stability of imines with antibiotics and polyamines is explicable by additional stabilization of the borate anionic group by ion pairing with ammonium groups not involved in Schiff base formation. Thanks to high molar absorptivity of protonated imines interaction of 2-FPBA with aminoglycosides allows detecting them spectrophotometrically in a μM concentration range in neutral aqueous solutions in the presence of sugars, amino sugars and amino acids.

Introduction

Formyl phenylboronic acids (FPBA, Chart 1) have found numerous applications as bifunctional building blocks for construction of self-assembling macrocyclic, cage and polymeric supramolecular structures owing to their capacity of reversible formation of iminoboronate esters.¹ In area of molecular recognition a convenient and efficient procedure for determination of enantiomeric excess of chiral amines and chiral diols has been developed on the basis of self-assembly of 2-FPBA with formation of diastereomeric iminoboronate esters of general type **1**.²

These reactions are performed in low polar media, typically in chloroform, in order to shift the equilibria of imine and boronate ester formation to the respective products. The initial purpose of this paper was to explore a possibility of recognition of amino polyols *via* iminoboronate formation in water. Although formation of structures of type **1** is unlikely in polar media,³ one may expect simultaneous formation of an imine and a tetrahedral boronate ester bonds between an amino polyol and a suitable isomer of formyl phenylboronic acid with geometrically matching carbonyl and boronic acid functionalities in a manner similar to recognition of catecholamines by a boronic acid-containing coumarin aldehyde.⁴ In the course of this study we did not find, however, any convincing evidences of such binding mode, but we did observe significantly improved imine formation with 2-FPBA, particularly strong with polyamines including aminoglycosides. This effect is of interest because the imine formation generates a new chromophore and can be employed for optical detection of amines, but the reaction suffers from very low stability of Schiff bases in water.^{5,6}

The target amino polyols employed in this study are amino sugars and aminoglycosides, which serve as biomarkers⁷ and antibiotics⁸ respectively (Chart 2). Recognition and sensing of these compounds is an important analytical problem. They do

^aFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México. E-mail: anatoli@unam.mx

^bCentro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 62209 Cuernavaca, Morelos, México

† Electronic supplementary information (ESI) available: Spectrophotometric titrations of isomeric formyl phenylboronic acids by glucose; ¹H NMR titrations of 3-FPBA and 4-FPBA by MeOCH₂CH₂NH₂; observed imine formation constants of 2-FPBA with different amines at variable pH; the species distribution diagram for 2-FPBA in the presence of kanamycin A; spectrophotometric titrations plots at 282 nm of 2-FPBA by some aminoglycoside antibiotics and amino sugars in μM concentration range. See DOI: 10.1039/c2ob26290h

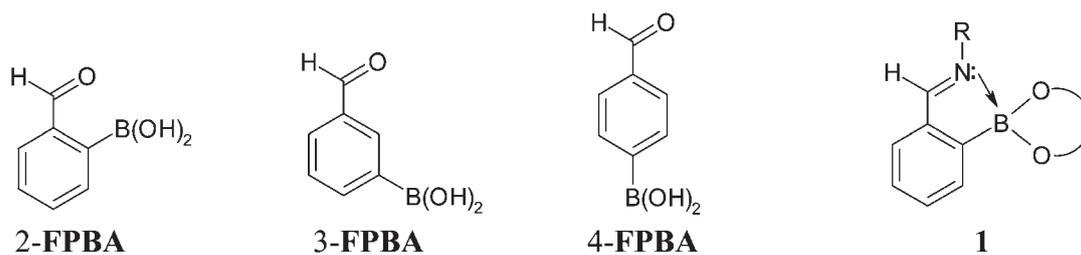


Chart 1

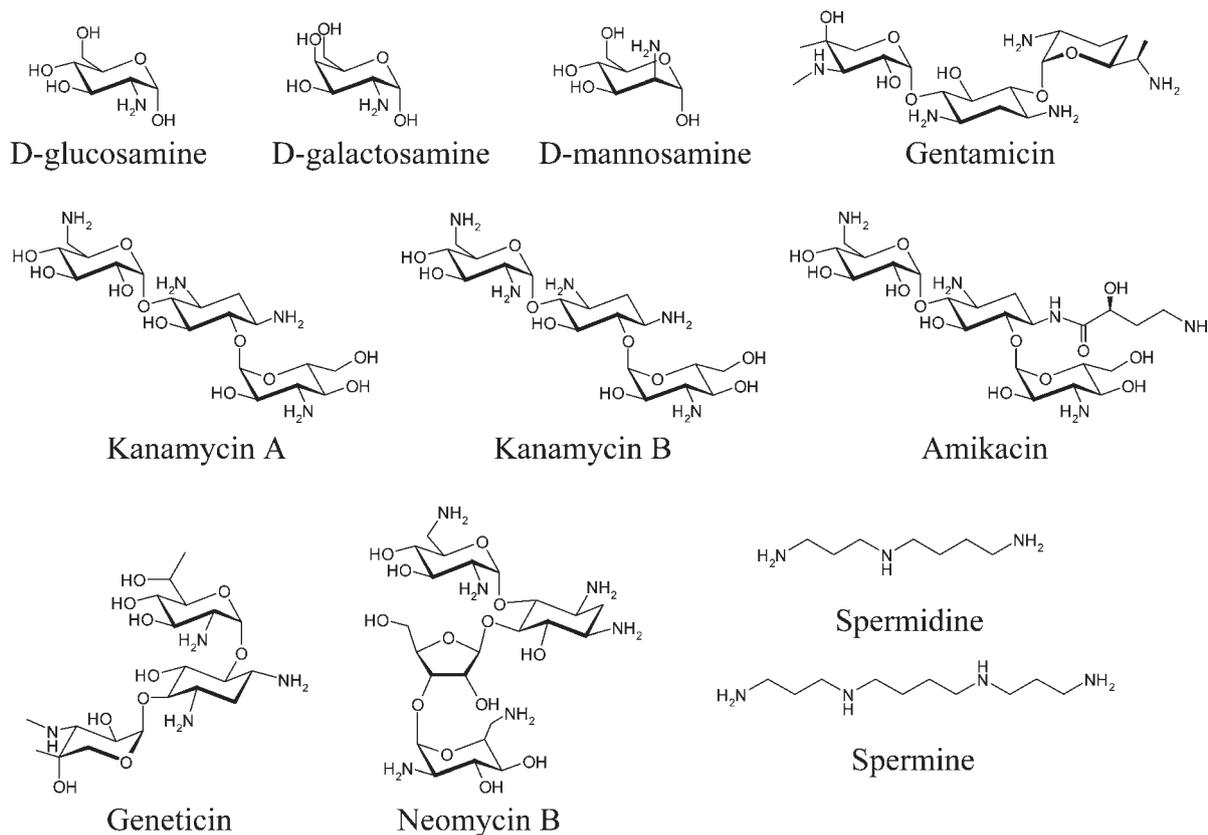


Chart 2 Amino sugars, aminoglycosides and polyamines employed in this study.

not absorb light and are not electroactive. In addition, due to close similarity in their structures both groups of compounds interfere with each other in their analysis.⁷ Their determination is achieved mostly by chromatographic techniques with pre-column or post-column derivatization.⁹ Recently an interest to direct sensing of amino sugars and aminoglycosides has been awoken. Sophisticated bifunctional receptors combining a crown-ether and phenylboronic acid as recognition elements were proposed for fluorometric sensing of glucosamine.¹⁰ The receptors discriminate D-glucose and D-glucosamine in the range of concentrations 10–100 mM. An indicator-replacement assay based on the organometallic complex $[\{Cp^*RhCl_2\}_2]$ as the receptor was proposed for detection of amino sugars and aminoglycosides in the range 50–120 μ M.¹¹ A “mini-array” version based on comparison of optical signals at three different pH values allowed to discriminate analytes of different structures. An impedimetric assay for neomycin in μ M range using an

aptamer-based sensor was recently proposed.¹² Highly sensitive surface plasmon resonance analysis of aminoglycoside antibiotics using imprinted boronic acid-functionalized Au nanoparticle composites was developed.¹³ As will be shown below, 2-FPBA acts as a simple yet highly selective receptor for aminoglycosides, which allows detecting them spectrophotometrically in a μ M concentration range in the presence of sugars, amino sugars and biological monoamines. It also allows one to detect polyamines such as spermine in the presence of monoamines.

Results and discussion

At the first step the acid dissociation constants and interactions of all three isomeric formyl phenylboronic acids with simple sugars were determined by spectrophotometric titrations. Fig. 1a and b show the spectral course of pH-titrations with insets

illustrating the fitting of absorbance vs. pH plots to the eqn (1), where ϵ_{obs} is the measured molar absorptivity at a given wavelength, ϵ_{B^-} and ϵ_{B} are the molar absorptivities of anionic and neutral forms of the boronic acid and K_{a}^{B} is the acid dissociation constant.

$$\epsilon_{\text{obs}} = \frac{\epsilon_{\text{B}^-} + \epsilon_{\text{B}}[\text{H}^+]/K_{\text{a}}^{\text{B}}}{(1 + [\text{H}^+]/K_{\text{a}}^{\text{B}})} \quad (1)$$

The spectral changes observed for 2-FPBA are similar to those reported for phenylboronic acid (PBA).¹⁴ The decrease in absorbance is attributed to the transformation of planar neutral $-\text{B}(\text{OH})_2$ group into tetrahedral anionic $-\text{B}(\text{OH})_3^-$ group. The red shift observed for 3- and 4-isomers probably reflects some sort of conjugation between the carbonyl group and more electron-rich phenyl group of the anionic form of acid. The values of $\text{p}K_{\text{a}}$ are given in Table 1.

The ^{11}B NMR spectra of 2-FPBA in neutral solutions show two signals, one at 29.3 and another one at 8.6 ppm (Fig. 2a). The first signal disappears in more basic solutions when pH is significantly higher than $\text{p}K_{\text{a}}$ and the second signal disappears in more acid solutions when pH is significantly lower than $\text{p}K_{\text{a}}$ indicating that they belong to neutral $\text{R}-\text{B}(\text{OH})_2$ and anionic $\text{R}-\text{B}(\text{OH})_3^-$ forms of 2-FPBA respectively. Thus in contrast to what is typically observed for boronic acids in aqueous solutions¹⁵ the ionization of 2-FPBA is a slow process in the NMR time scale. This happens because the process is accompanied by

cyclization with an intramolecular covalent bond formation as follows from the ^1H NMR study of the system.

The transformation of 2-FPBA into the anionic form affects also the aldehyde and aromatic signals in ^1H NMR spectrum (Fig. 2b). On increase in pH from 6.5 to 9.0 the signal of aldehyde $-\text{CH}(\text{=O})$ proton at 9.96 ppm gradually disappears and is substituted with the signal at 6.09 ppm characteristic of $-\text{CH}(\text{OR})_2$ group. Both signals co-exist at intermediate pH values around $\text{p}K_{\text{a}}$ of 2-FPBA indicating slow interconversion of species in the NMR time scale. In this range of pH one also observes a superposition of two sets of signals of aromatic protons, one observed at higher pH shifted up-field in respect to another one observed at lower pH. A type of spectrum similar to those in the pH range from 7 to 8 was reported previously for halogen substituted 2-FPBA derivatives in organic solvents and was interpreted in terms of their reversible cyclization to a benzoboroxole (Scheme 1a).¹⁶ Such process was not reported for

Table 1 Values of $\text{p}K_{\text{a}}$ (relative error ± 0.05) and observed binding constants (K_{obs} , M^{-1} , relative error $\pm 10\%$) of carbohydrates to isomeric formyl phenylboronic acids at pH 7.0 (0.1 M phosphate buffer)

	2-FPBA	3-FPBA	4-FPBA	PhB(OH) ₂
$\text{p}K_{\text{a}}$	7.30	7.84	7.43	8.8 ¹⁷
		$K_{\text{obs}}, \text{M}^{-1}$		
Glucose	10.9	9.5	36	2.6
Fructose	270	460	900	155

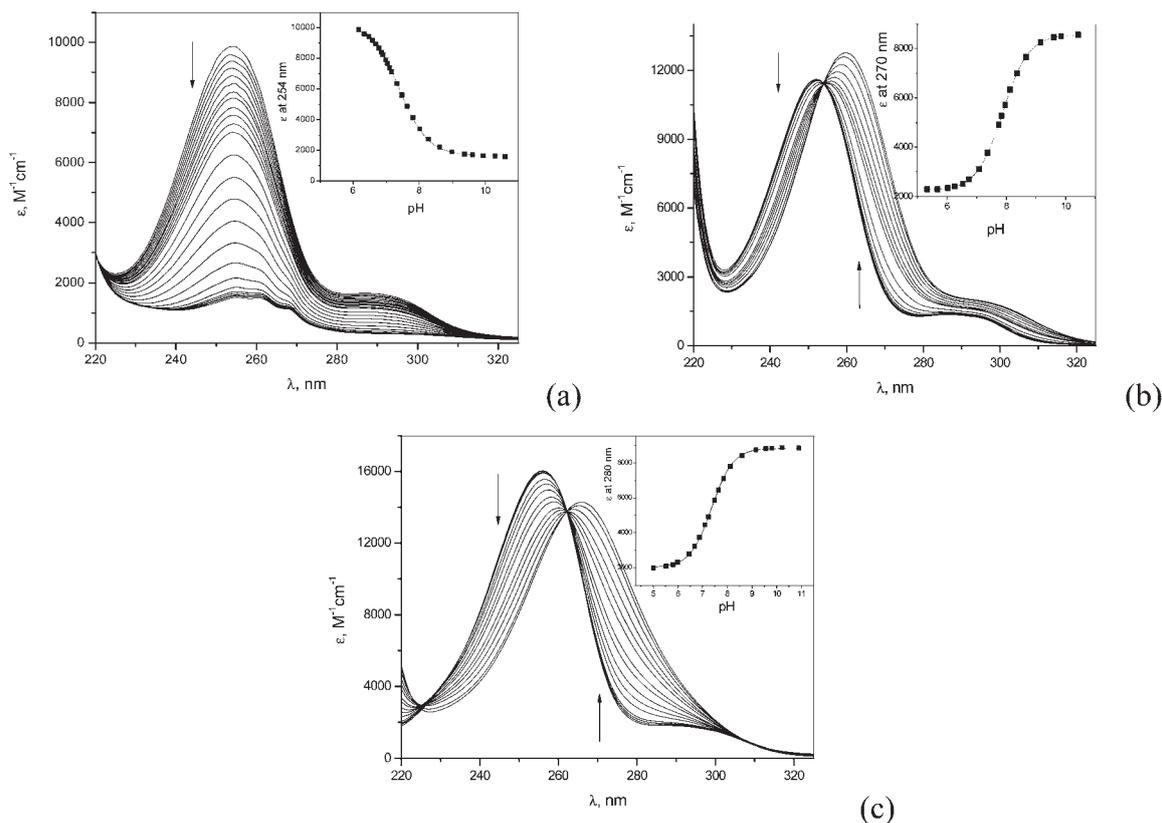


Fig. 1 The course of spectrophotometric pH-titrations of 2-FPBA (a), 3-FPBA (b) and 4-FPBA (c) in water. Insets show the absorbance vs. pH profiles at selected wavelengths fitted to eqn (1).

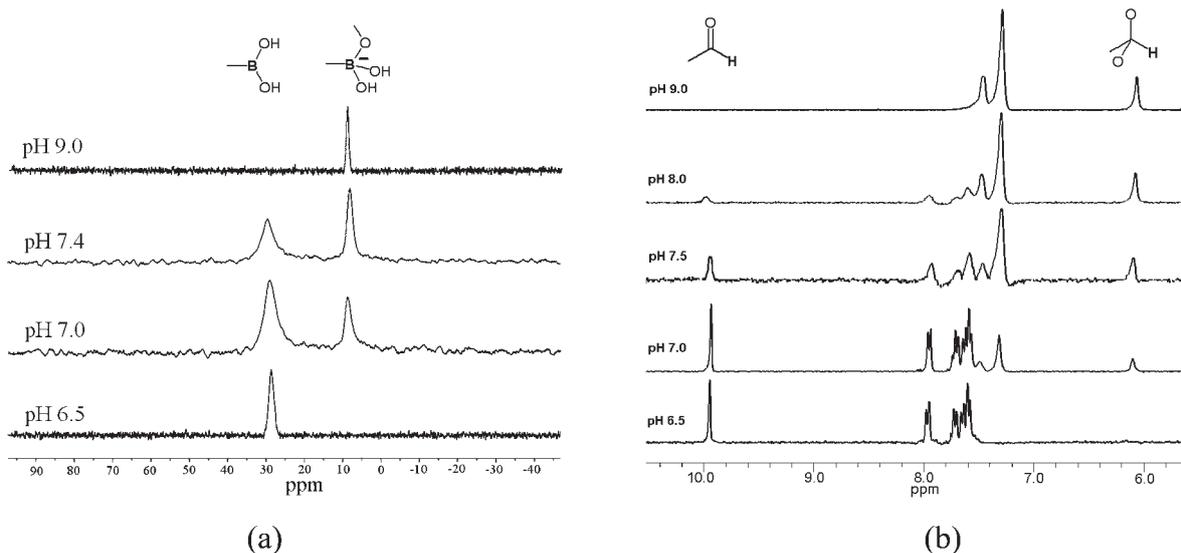
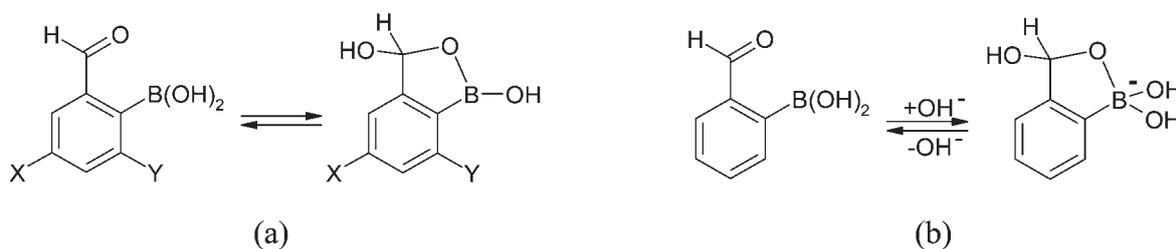


Fig. 2 The ^{11}B (a) and ^1H (b) NMR spectra of 2-FPBA at variable pH in D_2O .



Scheme 1

non-substituted 2-FPBA and for substituted compounds it was suppressed by water; however it seems that basic conditions favor the cyclization as shown in Scheme 1b. The reaction can be viewed either as nucleophilic addition of hydroxide anion to the carbonyl group assisted by intramolecular coordination of emerging oxo-anion to the boronic acid group or as a shift of the equilibrium of boroxole formation (Scheme 1a) by addition of hydroxide to the trigonal boron atom and converting it into the tetrahedral state in a way similar to classical stabilization of boronate diol esters.

The binding constants of glucose and fructose to all three isomers of FPBA were determined by direct UV-titrations and in some cases also by indicator-displacement method with alizarin red S.¹⁷ Both methods gave the same binding constants within the limits of experimental errors. Typical results of a spectrophotometric titration are shown in Fig. 1S (ESI†) for glucose. The spectral changes are similar to those observed for addition of hydroxide anions to the respective isomers of FBPA in agreement with formation of anionic tetrahedral boronate esters. In all cases the titration plots were satisfactorily fitted to a simple 1 : 1 binding isotherm; the examples of fittings are shown in insets in Fig. 1S.† The values of observed binding constants (K_{obs}) at pH 7.0 in 0.1 M phosphate buffer solution are given in Table 1 together with the respective data for phenylboronic acid for comparison. All isomeric FPBAs are stronger acids than

phenylboronic acid and as a result they have larger K_{obs} at pH 7, which is below $\text{p}K_{\text{a}}$ values for all acids. However, among them the most acidic 2-FPBA does not form the most stable complexes apparently because of steric hindrance from the *ortho*-carbonyl group.

The spectral course of titrations of FPBAs by compounds containing amino groups is completely different. A typical behavior is illustrated in Fig. 3 with D-glucosamine as a substrate. Titration of 2-FPBA induces a decrease in absorption maximum at 254 nm and a strong increase in absorption above 260 nm with appearance of a new maximum at 282 nm (Fig. 3a). Titrations of 3- and 4-isomers induce very small spectral changes in the same concentration range of D-glucosamine as exemplified in Fig. 3b for the titration of 3-FPBA. The differential spectrum shown in the inset has a weakly absorbing maximum near 265 nm.

Similar spectral changes were observed for all compounds containing amino groups. Fig. 4 illustrates typical titration profiles of 2-FPBA for a simple mono amine $\text{MeOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ and an aminoglycoside antibiotic neomycin B. In both cases like in the case of D-glucosamine one observes an isosbestic point at 262 nm and a strong increase in absorbance with maximum at 282 nm. Titrations of 3- and 4-isomers by these compounds induced minor spectral changes like those in Fig. 3b. No interaction of these compounds with phenylboronic acid was detected under similar conditions.

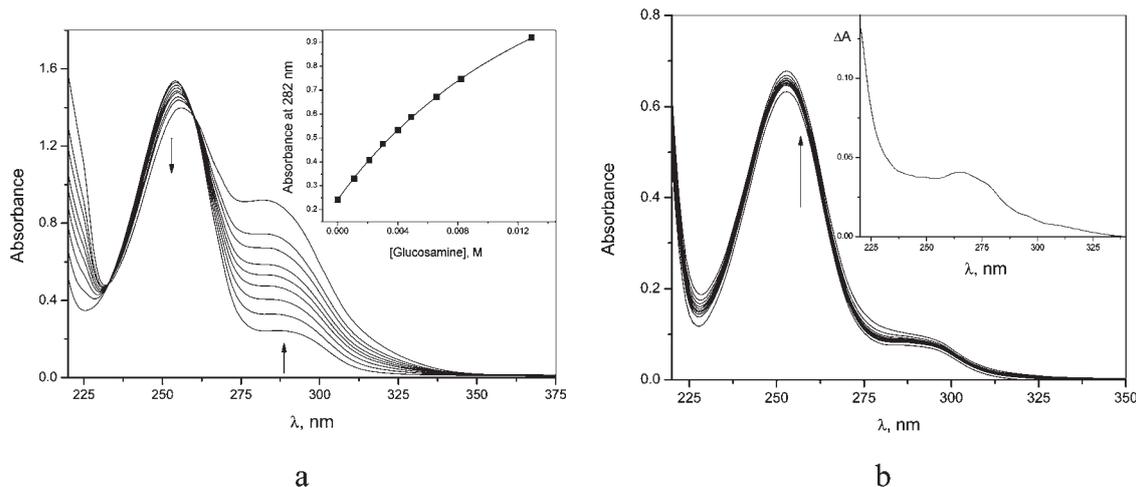


Fig. 3 Spectrophotometric titrations of 0.25 mM 2-FPBA (a) and 0.046 mM 3-FPBA (b) by D-glucosamine (0–13 mM) at pH 7.0. Inset in (a) shows the fitting of the titration plot at 282 nm to the 1 : 1 binding isotherm; inset in (b) shows the differential spectrum at maximum concentration of D-glucosamine.

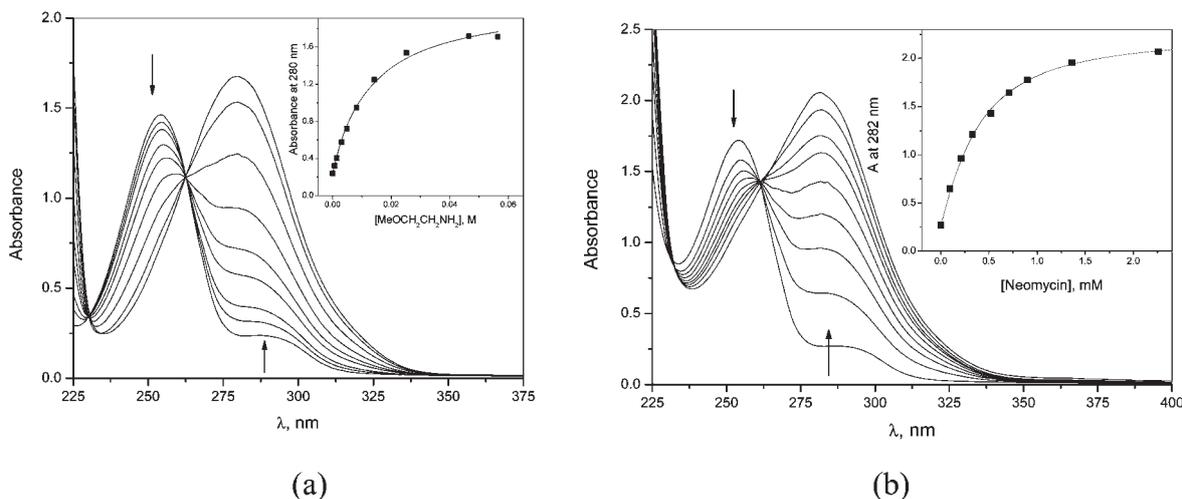


Fig. 4 Spectrophotometric titrations of 0.25 mM 2-FPBA by MeOCH₂CH₂NH₂ (a) and neomycin B (b) at pH 7.0. Insets show the fittings of titration plots at selected wavelengths.

The observed spectral changes can be attributed to imine formation, which proceeds much more efficiently with 2-FPBA than with 3- and 4-isomers. Further evidences supporting imine formation come from NMR studies. Fig. 5a shows the ¹H NMR spectra of 2-FPBA recorded at increasing amounts of added D-glucosamine. The signal of aldehyde proton at 9.96 ppm gradually disappears and is substituted by two new growing signals at 8.78 and 8.58 ppm. Such up-field shift is typically observed on transformation of the aldehyde group into an imine.¹⁸ Like with other aldehydes¹⁸ imine formation with 2-FPBA is a slow process in the NMR time scale. The existence of two signals of imine C–H proton was observed previously for the Schiff base of D-glucosamine and salicylaldehyde and was attributed to the anomeric equilibrium.¹⁹ The upper spectrum in Fig. 5a corresponds to the Schiff base of 2-FPBA with MeOCH₂CH₂NH₂ obtained in the presence of a high excess of the amine and it contains only one signal of the imine proton at

8.6 ppm. The low field portions of ¹H spectra of 2-FPBA in the presence of an excess of kanamycin A at variable pH are shown in Fig. 5b. Under these conditions the signal of aldehyde proton disappears completely because of complete transformation of 2-FPBA into the Schiff base. The presence of more than one signal of the imine proton indicates in this case interactions with different amino groups of kanamycin (see below). Spectral changes on titrations of 3- and 4-FPBA by D-glucosamine, MeOCH₂CH₂NH₂ and kanamycin A were of the same type, but with imine peak appearing at somewhat higher field at 8.4 ppm for both isomers and detectable only at much higher concentrations of amines (Fig. 2S in ESI† shows as an example titration data for 3- and 4-FPBA with MeOCH₂CH₂NH₂).

The interaction of 2-FPBA with aminoalcohols in non-aqueous medium proceeds somewhat differently with formation of binuclear cyclic products where the amino group of aminoalcohol forms the Schiff base with the aldehyde group of one

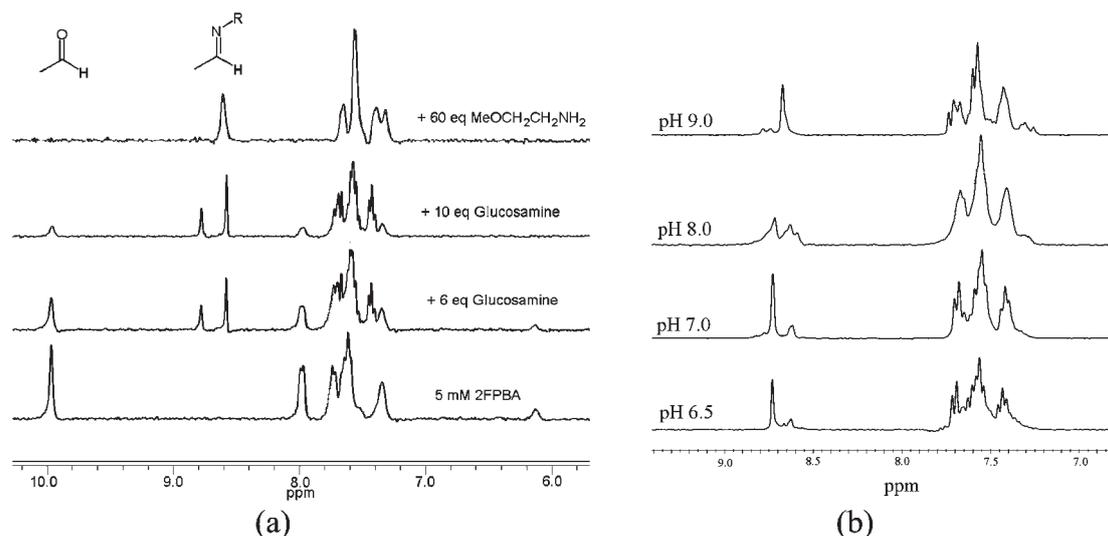


Fig. 5 ^1H NMR spectra of 5 mM 2-FPBA in D_2O : (a) at pH 7.0 at increasing amounts of added D-glucosamine and in the presence of saturating concentration of $\text{MeOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (upper spectrum); (b) at different pH in the presence of 2–3 equivalents of kanamycin A.

Table 2 Observed imine formation constants (K_{obs} , M^{-1} , relative error less than $\pm 10\%$) of amines, amino sugars and aminoglycosides with isomeric formyl phenylboronic acids at pH 7.0 (0.05 M MOPS)

	2-FPBA	3-FPBA	4-FPBA
<i>n</i> -BuNH ₂	27		
$\text{MeOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	81	0.21 ^a	0.66 ^a
Gly	16.1		
GlyGly	130 ^b	0.8 ^{a,b}	
D-Glucosamine	83	3.7 ^a	4.0 ^a
D-Galactosamine	140		
D-Mannosamine	8.3		
Kanamycin A	2790	170 ^a	43 ^a
Kanamycin B	1350		
Amikacin	1900		
Geneticin	850		
Gentamicin	1340		
Neomycin B	4900		
Spermine	1420		
Spermidine	1500		

^a ^1H NMR titration. ^b pH 7.5.

2-FPBA molecule and the hydroxyl group of aminoalcohol forms the ester bond with $\text{B}(\text{OH})_2$ group of the other 2-FPBA molecule.²⁰ Formation of simple 1 : 1 Schiff bases in water may be attributed to reduced stability of boronic acid esters in aqueous solutions.

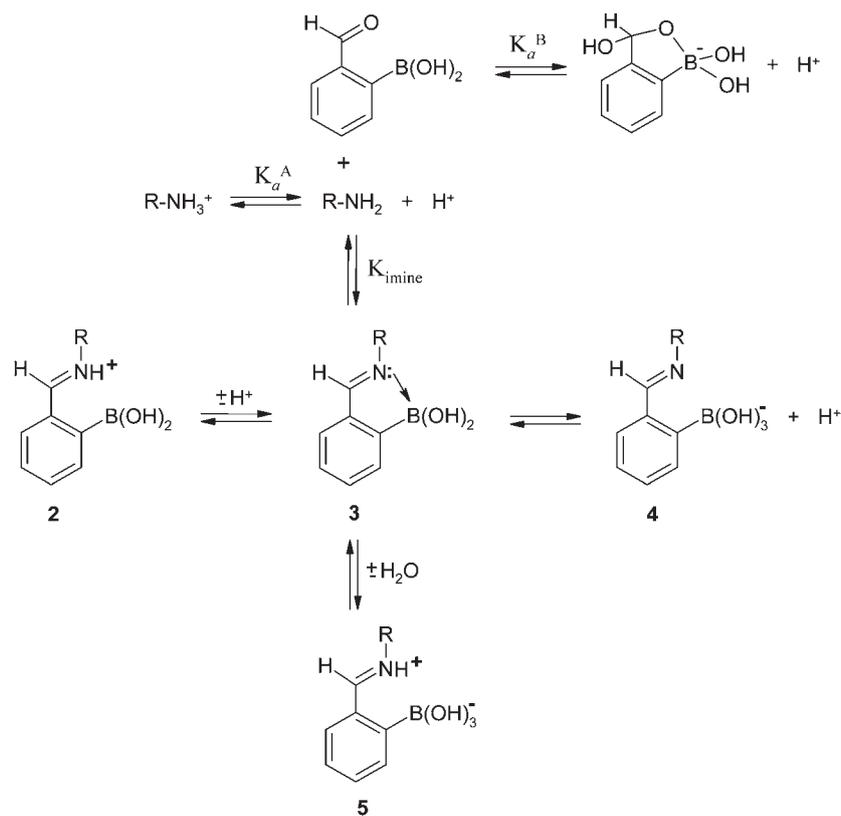
Quantitatively the stability of imines was characterized by the respective formation constant. The titration profiles for 2-FPBA, examples of which are shown in insets in Fig. 3a and 4a,b, followed very well the simple 1 : 1 binding isotherm. The equilibrium constants calculated from the fitting of these results at pH 7 are given in Table 2. The equilibrium constants for 3- and 4-FPBA cannot be calculated from similar data because of too small spectral changes. They were determined by ^1H NMR titrations for several systems and also are shown in Table 2. The stabilizing effect of the *ortho*-boronate group is evident from much weaker interactions of amines with 3- and 4-isomers of FPBA.

In the course of this study we noticed that the phosphate buffer solution exerted strong inhibitory effect on interaction of 2-FPBA with aminoglycosides apparently caused by rather strong association of phosphate anions with aminoglycoside polycations.²¹ For this reason all further measurements were performed in 0.05 M MES, MOPS or CHES buffers.

In order to evaluate possible selectivity of imine formation with 2-FPBA the equilibrium constants were determined for a wide range of mono- and polyamines of different structures under similar conditions at pH 7 in 0.05 M MOPS buffer, Table 2. As follows from Tables 1 and 2 the affinity of 2-FPBA to aminoglycosides, particularly to kanamycin A and neomycin B, surpasses that to sugars, amino sugars and monoamines by more than one order of magnitude. Also high imine formation constants were obtained for biological polyamines, spermine and spermidine. To obtain a deeper insight into this effect more detailed studies were performed with $\text{MeOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, D-glucosamine, kanamycin A and spermine.

The general scheme of acid–base and condensation equilibria involved in imine formation with 2-FPBA is shown in Scheme 2. Contributions of cationic form **2** and anionic form **4** should be small because they are lacking the stabilizing intramolecular interactions (see below). It is worth noting that in recently reported crystal structure of the Schiff base of 2-FPBA with aniline the expected $\text{N} \rightarrow \text{B}$ dative bond shown in **3** is absent.²² Instead the imine is stabilized by an intramolecular $\text{BOH} \cdots \text{N}$ hydrogen bond. The zwitterionic (hydrated) form **5** was found to be the predominant form of boronate esters containing the *ortho*-methylamino group in protic solvents.^{23,24} Recent high level computational investigation of *o*-(*N,N*-dialkylaminomethyl)arylboronate systems demonstrated that hydration is favorable both for esters and for free boronic acids.²⁵ Since imines are weaker bases than amines, a significant contribution of this form seems less probable here, but as it will be shown below this is the predominant form for imines too.

In accordance with Scheme 2 and ignoring forms **2** and **4** one obtains for the observed equilibrium constant of imine formation



Scheme 2 General scheme of acid–base and condensation equilibria involved in imine formation with 2-FPBA.

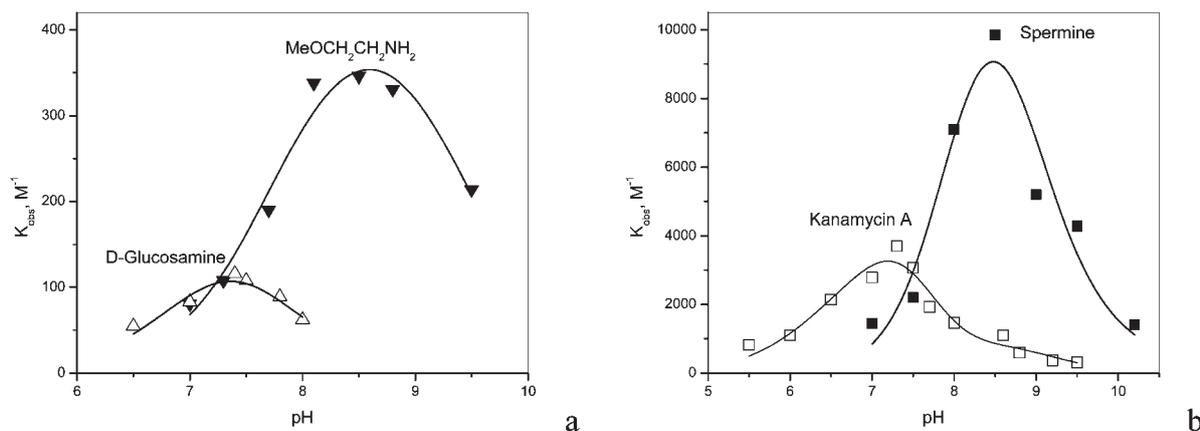


Fig. 6 Observed imine formation constants of 2-FPBA with (a) D-glucosamine and MeOCH₂CH₂NH₂; (b) kanamycin A and spermine at variable pH. The solid lines are the theoretical fits to eqn (2) or (3).

(K_{obs}) the expression (2), which predicts the bell-shaped K_{obs} vs. pH profile with the maximum at $\text{pH} = (\text{p}K_a^A + \text{p}K_a^B)/2$.

$$K_{\text{obs}} = \frac{K_{\text{imine}}}{(1 + [\text{H}^+]/K_a^A)(1 + K_a^B/[\text{H}^+])} \quad (2)$$

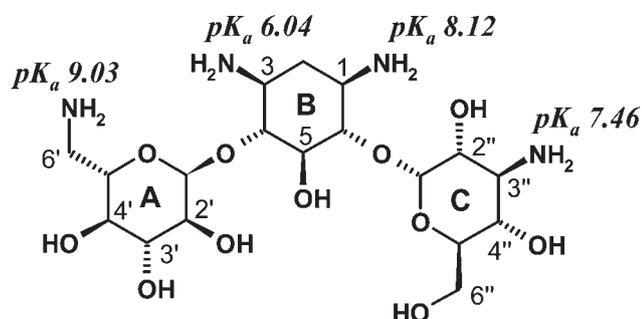
The values of K_{obs} for different compounds at variable pH are collected in Table 1S (ESI†) and the pH profiles for interaction of 2-FPBA with D-glucosamine, MeOCH₂CH₂NH₂, spermine and kanamycin A are shown in Fig. 6a and b. The fitting of profiles for D-glucosamine and MeOCH₂CH₂NH₂ to the eqn (2)

shown as solid lines in Fig. 6a were satisfactorily good and allowed us to calculate the imine formation constants K_{imine} given in Table 3. Additional K_{imine} values also shown in Table 3 were obtained for several other mono amines, which cover a wide range of basicity of amino groups (*n*-butylamine, glycine, glycyglycine, 2,2,2-trifluoroethylamine) by using the eqn (2) from data collected in Table 1S†.

The analysis of results with polyamines is more complex. Kanamycin A has four non-equivalent primary amino groups with $\text{p}K_a$ values indicated on Scheme 3.²⁶ The observed optimum in affinity at pH about 7.3, which coincides with $\text{p}K_a$

Table 3 Imine formation constants for 2-FPBA and different amines

Compound	pK _a	K _{imine} , M ⁻¹
<i>n</i> -BuNH ₂	10.77	6.0 × 10 ⁵
Gly	9.8	1.4 × 10 ⁴
MeOCH ₂ CH ₂ NH ₂	9.4	5.1 × 10 ⁴
GlyGly	8.3	2.9 × 10 ³
D-glucosamine	7.4	510
CF ₃ CH ₂ NH ₂	5.6	29.5
Kanamycin A	9.03	6.3 × 10 ⁴
	7.46	1.4 × 10 ⁴
	6.04	2.1 × 10 ³
Spermine	10.8	9.8 × 10 ⁵
	7.96	4.3 × 10 ⁴

**Scheme 3** Numbering of hydroxyl and amino groups in kanamycin A with respective pK_a values at 25 °C and ionic strength 0.05 M.

of 2-FPBA, qualitatively indicates in accordance with eqn (2) the principal contribution of an amino group with matching pK_a value, that is the 3'' amino group in the ring C with pK_a 7.45. The quantitative analysis of the pH-profile for kanamycin A can be performed with eqn (3) derived assuming independent imine formation of each amino group with the neutral form of 2-FPBA.

In eqn (3) K_{a1}, K_{a2}, etc. are the acid dissociation constants of ammonium groups of kanamycin A in decreasing order, that is from less to most acidic group and K_{im1}, K_{im2} etc. are the equilibrium constants of imine formation with neutral amino groups in the same order.

$$K_{\text{obs}} = \frac{K_{\text{im1}} + K_{\text{im2}}[\text{H}^+]/K_{\text{a1}} + K_{\text{im3}}[\text{H}^+]^2/K_{\text{a1}}K_{\text{a2}} + K_{\text{im4}}[\text{H}^+]^3/K_{\text{a1}}K_{\text{a2}}K_{\text{a3}}}{(1 + K_{\text{a}}^{\text{B}}/[\text{H}^+]) (1 + [\text{H}^+]/K_{\text{a1}} + [\text{H}^+]^2/K_{\text{a1}}K_{\text{a2}} + [\text{H}^+]^3/K_{\text{a1}}K_{\text{a2}}K_{\text{a3}} + [\text{H}^+]^4/K_{\text{a1}}K_{\text{a2}}K_{\text{a3}}K_{\text{a4}})} \quad (3)$$

The solid line in Fig. 6b shows the best fit to the eqn (3) and the respective imine formation constants for each amino group are given in Table 3. From these results one can see that the most basic amino group of kanamycin A (6'-NH₂, ring A) actually forms the most stable imine with K_{imine} close to that for MeOCH₂CH₂NH₂, a simple monoamine of similar basicity. This interaction contributes however very little to K_{obs} at pH 7 where the 6' amino group is completely protonated. The contribution of second in order of decreasing basicity amino group 1-NH₂ (ring B) is surprisingly small and the respective K_{imine} can not be estimated reliably from the fitting. On the other hand K_{imine} for interaction with 3''-NH₂ (ring C) is very large as compared with K_{imine} for D-glucosamine possessing similar basicity (Table 3).

Also the least basic 3-NH₂ group (ring B) still has the K_{imine} value much larger than glucosamine. The calculated species distribution diagram (Fig. 3S, ESI†) shows that below pH 7 the predominant species is the imine formed with 3-NH₂ group, between pH 7 and 9 – the imine formed with 3''-NH₂ group and at pH 9 and higher – the imine formed with 6'-NH₂ group. The shift from the most intense signal at 8.74 ppm at pH 6.5 to that at 8.68 ppm at pH 9.0 in Fig. 5b most probably reflects this shift in the species distribution as a function of pH.

Interpretation of the results with spermine is more complicated because it contains both primary and secondary amino groups. Formally there are also 4 protonation states of the polyamine each with its own affinity to 2-FPBA and therefore the eqn (3) still can be applied for the fitting. Indeed, the fitting illustrated with the solid line in Fig. 6b is acceptably good. Shifted to a higher value pH-optimum as compared to kanamycin A reflects larger basicity of the former (first pK_a 7.96 of spermine vs. first pK_a 6.05 of kanamycin A). However, one cannot attribute the individual K_{imine} values calculated from the fitting procedure to amino groups with corresponding pK_a values in this case. In contrast to kanamycin A, which possesses four distant and practically independent primary amino groups, spermine has two pairs of symmetrically positioned primary and secondary amino groups with a complex distribution of protonated and free amino groups within each macroscopic protonation state.²⁷ The only certain attribution is for the first K_{imine} in the eqn (3) which corresponds to the completely deprotonated form of spermine. One also may estimate the last K_{imine} corresponding to the interaction with triprotonated spermine from results at pH below 8 where this form is the only one deprotonated form of the polyamine, which is present in a significant amount. The respective parameters are given in Table 3 and as one can see the stability of imine formed with the neutral polyamine is practically the same as that of imine formed with a monoamine of similar basicity *n*-BuNH₂, but the triprotonated polyamine forms much more stable imine than expected from its basicity. We conclude therefore that in both cases (with kanamycin A and spermine) the strongly enhanced stability of imines formed with 2-FPBA is observed when the polyamines are partly protonated.

To interpret this effect one needs to know the actual structure of the imine, which may be either a neutral species **3** with intra-

molecular coordination bond stabilizing the imine formation or the respective zwitterion **5** with the protonated imine bond and tetrahedral anionic boronate, which has an increased stability due to formation of an intramolecular ionic hydrogen bond (see above). The zwitterion is produced by addition of a water molecule to **3** and therefore cannot be discriminated with **3** in aqueous solution simply from titration results. Similar ambiguity exists also in the case of boronate esters containing an *ortho*-methylamino group and it was demonstrated that conclusive evidence regarding their structure can be obtained analyzing the ¹¹B NMR spectra.²³ In the neutral structure of the type **3** the ¹¹B signal should be observed around 14 ppm, but in the zwitterionic structure of the type **5** it appears at the same position as in the

boronate anion below 10 ppm. Following the interaction of 2-FPBA with amines by ^{11}B NMR we observed a strong broadening of the spectrum in the presence of added amine, nevertheless it was possible to see clearly that imine formation leads to disappearance of the signal at 29.3 ppm, which belongs to the neutral boronic acid and to appearance of a single signal at 8.6 ppm, which belongs to the boronate anion $-\text{B}(\text{OH})_3^-$, as illustrated in Fig. 7a and b with titration of 2-FPBA by D-glucosamine and kanamycin A.

To further prove the formation of protonated imine in the case of 2-FPBA, the UV-vis spectra of the products were analyzed. As follows from results shown in Fig. 3a–c the imine absorption band appears at longer wavelength in the case of 2-FPBA (maximum at 280 nm) than with other two isomers (shoulder at 265 nm). A red shift is typically observed on protonation of Schiff bases²⁸ and therefore this observation may reflect the protonation of the imine bond in the Schiff base with 2-FPBA. To observe the effect more clearly the Schiff base of 2-FPBA and *n*-BuNH₂ was prepared in two organic solvents: protic ethanol and aprotic acetonitrile. In both solvents the equilibrium was completely shifted to the Schiff base, which was quantitatively generated by mixing the equimolar amounts of reactants. As one can see from Fig. 8 the spectrum in ethanol is essentially the same as in water with the maximum at 282 nm, but in aprotic acetonitrile the maximum is observed at 254 nm with weakly absorbing shoulders at 290–300 nm. Obviously, in ethanol the addition of EtOH molecule can produce the zwitterionic structure similar to **5** containing a protonated imine bond and a $-\text{B}(\text{OH})_2(\text{OEt})^-$ anionic group, but this cannot happen in aprotic acetonitrile where the Schiff base should have the structure **3**. However, when 1 equivalent of strong methanesulfonic acid was added to the acetonitrile solution the maximum at 282 nm appeared also in this solvent confirming that this band indeed belongs to the protonated Schiff base.

The stabilizing effect of the internal ion pairing in the structure **5** is reminiscent of well known intramolecular imine stabilization by *ortho*-OH group of salicylaldehyde, operating also in pyridoxal Schiff bases (Scheme 4). Although the details of the nature of the stabilizing effect in the zwitterionic structure **6**,

such as the real contribution of resonance stabilization and the degree of hydrogen bonding inside the ionic pair, are still a matter of discussion, the fact of predominant formation of this structure is well established.²⁹

Interestingly, the stability of Schiff bases with 2-FPBA is even higher than that with salicylaldehyde. Thus, reported K_{imine} values for Schiff bases of salicylaldehyde with *n*-BuNH₂, MeOCH₂CH₂NH₂ and Gly are 5.5×10^4 , 6.0×10^3 and $3.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ respectively,^{18,30} which are one order of magnitude smaller than those for 2-FPBA (see Table 3).

Other relevant systems are complexes of salicylaldehyde imines with boric or boronic acids studied as intermediates in their catalytic hydrolysis.^{30,31} Both complexes of type **7**, similar to **3**, and of type **8**, similar to **5**, were proposed on basis of general considerations. One may notice, however, that the reported UV-vis spectrum of the complex of salicylaldehyde 2-methoxyethylamine Schiff base and boric acid has the absorption band at 345 nm, typical of the protonated imine, while the neutral imine has the absorption band at 305 nm.³⁰

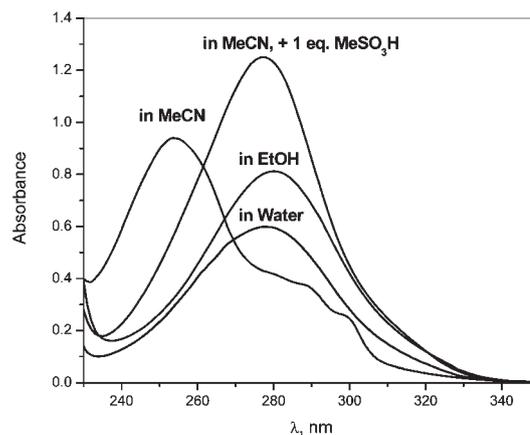


Fig. 8 UV-vis absorption spectra of 0.1 mM Schiff bases prepared from 2-FPBA and *n*-BuNH₂ in ethanol, acetonitrile and water (at saturation concentration of *n*-BuNH₂ (0.1 M) at pH 7) as well as the spectrum in acetonitrile after addition of 1 equivalent of MeSO₃H.

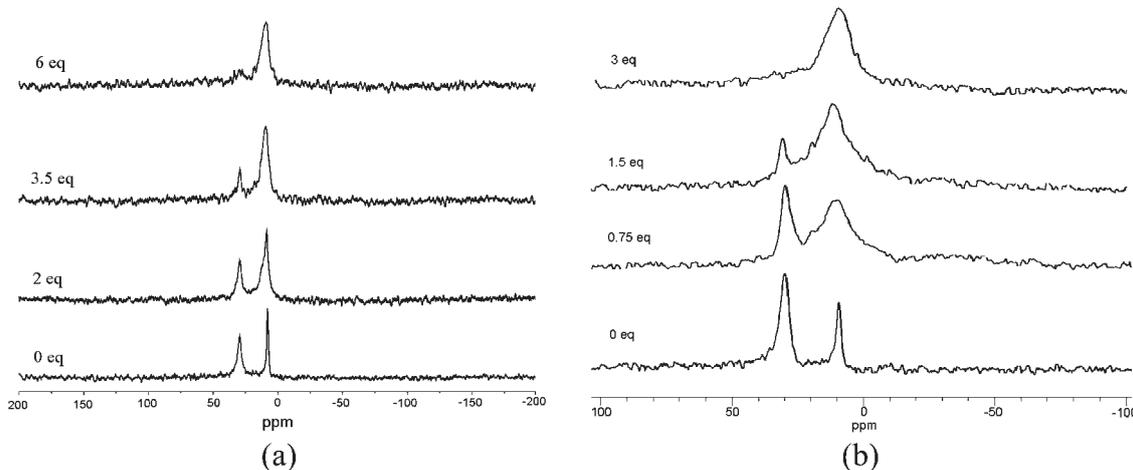
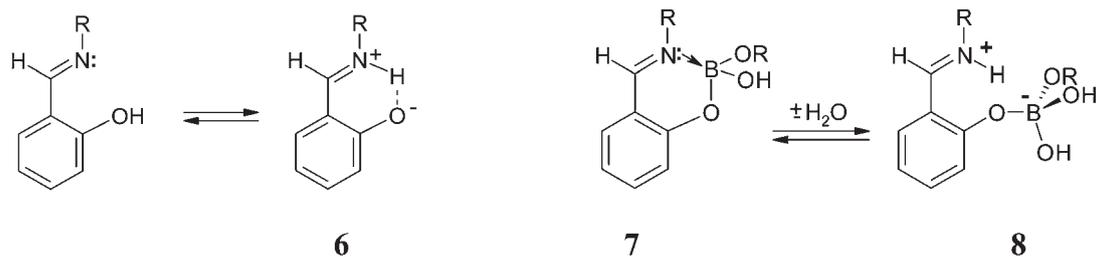


Fig. 7 The ^{11}B NMR spectra of 5 mM 2-FPBA recorded at increased amounts of added D-glucosamine at pH 7.5 (a) or kanamycin A at pH 7.0 (b) D₂O. Amounts of added amines are shown as number of equivalents on the spectra.



Scheme 4 A salicylaldehyde imine and its complex with boric or boronic acid.

The studies at variable pH like those shown in Fig. 6 demonstrate that imines with 2-FPBA remain protonated at pH above pK_a of a parent amine. The protonated forms of Schiff bases of benzaldehyde typically have pK_a values by *ca.* 3 units lower than the protonated forms of parent amines.^{28a,32} Therefore the presence of an anionic boronate group must at least compensate this effect. The phenolate group in the *ortho*-position of salicylaldehyde increases the pK_a of a protonated imine group in structure **6** by 6 units,²⁹ but a large part of this effect comes from the resonance stabilization of the iminium cation, which is impossible with a $B(OH)_3^-$ group. However, the inductive effect of $B(OH)_3^-$ is larger than that of O^- ($F = -0.42$ and -0.26 respectively)³³ and together with electrostatic stabilization this may be sufficient to provide the required shift in pK_a .

The whole set of data for imine formation constants can be discussed in terms of the Brønsted type correlation between $\log K_{\text{imine}}$ and pK_a of protonated amines. Such correlation with a slope of 0.64 was reported previously for aldehydes of different structures.¹⁸ The results in Table 3 are plotted in Brønsted coordinates in Fig. 9. Data for simple monoamines (black squares) follow a reasonably good linear dependence with a slope of 0.8 ± 0.1 . The point for D-glucosamine fits to this line indicating the absence of any additional interaction of 2-FPBA with hydroxyl groups of amino sugar. The point for the most basic 6'-NH₂ group of kanamycin A is also close to this line indicating that this amino group behaves as a "normal" amine of the corresponding basicity, but 3-NH₂ and 3''-NH₂ groups have anomalously high affinities to 2-FPBA manifested in large positive deviations of the corresponding points from values expected for amino groups of such low basicity. Similarly the point for the neutral form of spermine (pK_a 10.8) is on the line for monoamines, but the point for spermine trication (pK_a 7.96) shows a large positive deviation. The open squares show for comparison results for 3- and 4-FPBA.

In case of spermine, which does not have hydroxyl groups, the positive deviation for the protonated form may be attributed to stabilization of the anionic boronate group of the zwitterionic imine by interactions with additional positive charges in the protonated polycation. The conformation of fully protonated spermine is practically all-*trans*, which makes impossible contacts of boronate anion even with the next ammonium group in the chain. However, it has been shown by NMR studies of specifically ²H-labeled spermines that contact with an anion induces strong increase in fraction of *gauche* rotamers around C2–C3, C3–C4 and C6–C7 bonds so that the polycation can essentially wrap the anionic species.³⁴ To confirm this possibility we performed a M06-HF/6-31G(**)³⁵ level quantum mechanical

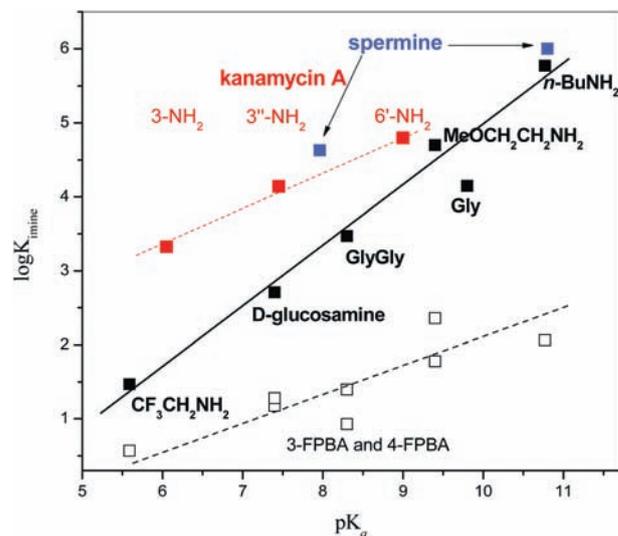


Fig. 9 The Brønsted plot for imine formation constants for 2-FPBA (solid squares) and 3- and 4-FPBA (open squares).

calculation taking into account solvation in water of the structure of imine formed with the terminal amino group of the triply protonated spermine, Fig. 10. In the minimized structure one finds exactly three expected C–C bonds in *gauche* conformation, which allows formation of three short ionic NH \cdots O hydrogen bonds with angles and N–O distances in the range 162.3–177° and 2.52–2.75 Å respectively, in good agreement with respective parameters reported for crystal structures of arylboronate esters containing a protonated amino group in the *ortho* position.^{23,36} Also the calculated B–N distances ranging from 3.0 to 3.9 Å are in agreement with reported for these structures values. Thus the increased stability of Schiff bases with partially protonated forms of spermine can be satisfactorily explained by multiple hydrogen bonding provided by ammonium groups in addition to that provided by the protonated imine group.

In case of kanamycin A similar explanation seems also possible. Indeed, the most basic 6'-NH₂ group becomes neutral and starts to form the Schiff base with 2-FPBA when all other amino groups of kanamycin A are already neutral and cannot provide any additional stabilizing interaction, but imine formation with less basic 3-NH₂ and 3''-NH₂ groups occurs when other amino groups are still protonated and a suitably positioned ammonium group can form an additional ion pair with the boronate anion. Similar effect can be observed to a larger or smaller extent for

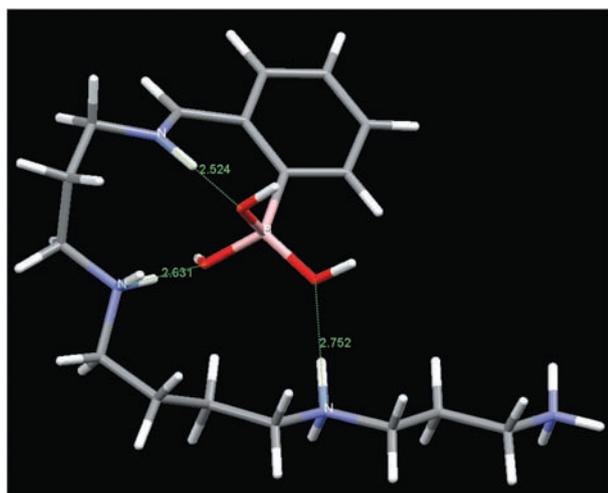


Fig. 10 Simulated M06-HF/6-31G(**) structure of the Schiff base formed between 2-FPBA and triprotonated form of spermine.

other aminoglycosides. However, due to the presence of hydroxyl groups in aminoglycosides one cannot exclude additional stabilization of the Schiff base through formation of boronate ester bonds.

In general, hydroxyl groups of aminoglycosides are poorly positioned for boronate ester formation. Thus, in kanamycin A three hydroxyl groups in the ring A are all in synclinal conformation, while boronate ester formation needs hydroxyls to be synperiplanar;³⁷ 4'',6''-diol structure in ring C generally provides rather weak binding,^{10,37} and kanamycin lacks a free anomeric hydroxyl, which is the principal site of boronate ester formation with carbohydrates, but is involved here in glycoside bond formation. In line with these features we did not observe any interaction of kanamycin A with phenylboronic acid even at high 0.01 M concentration and pH up to 10. The ester formation can be manifested in ¹¹B NMR spectra because the signals of free B(OH)_3^- group and also tetrahedral anionic, but ester group should be at least slightly different. However strong broadening of the spectra in the presence of kanamycin does not allow detecting this difference. To get a better insight in the mode of interaction of 2-FPBA with kanamycin including possible formation of an iminoboronate ester we performed a M06-HF/6-31G(**) level quantum mechanical simulation of the structures of imines formed with 3-NH₂ and 3''-NH₂ groups of the antibiotic. The simulated structures are shown in Fig. 11a and b.

In the imine formed with 3-NH₂ group (Fig. 11a) the anionic B(OH)_3^- group is stabilized by hydrogen bonding to the 6' ammonium group in addition to hydrogen bonding to the iminium group and is positioned very far from all hydroxyls. The bonds are shorter than those found in the structure of the Schiff base with spermine with N–O distances 2.47 and 2.60 Å and N–H–O angles 167.5 and 172.4° (imine and ammonium groups respectively), which probably occurs because of larger rigidity of the aminoglycoside skeleton. The boronate group can hardly reach even a single OH group of the antibiotic and increased stability in this case should be attributed to electrostatic/hydrogen bonding stabilization by ammonium groups.

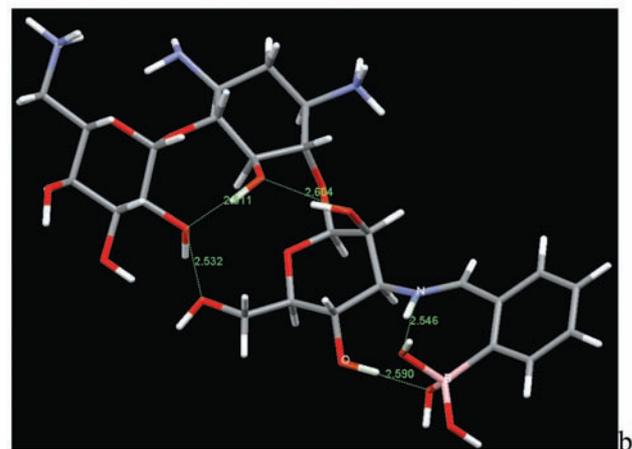
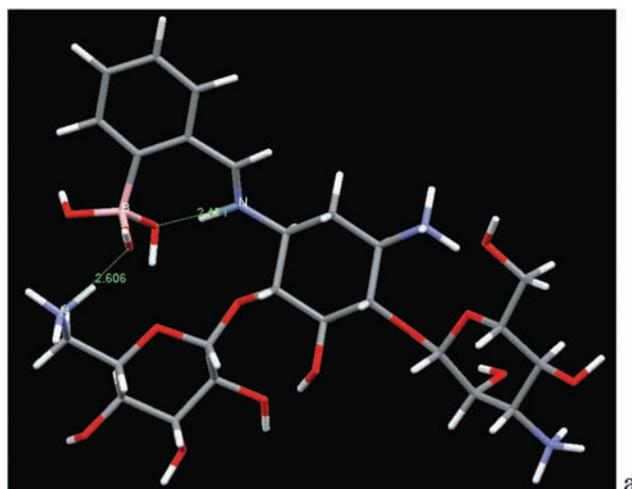


Fig. 11 Simulated M06-HF/6-31G(**) structures of Schiff bases formed by 2-FPBA with 3-NH₂ (a) and 3''-NH₂ (b) groups of kanamycin A.

Such stabilization is less probable for the imine formed with a 3''-NH₂ group in ring C because this group is positioned far from other amino groups as is evident from examination of the minimized structure in Fig. 11b. An attempt to approach the anionic boronate group to the 1-NH₃⁺ group in ring B by rotation of the imine fragment around the 3''C–N single bond produced a structure of higher energy. The anionic boronate group is stabilized by hydrogen bonding to the 4'' hydroxyl of ring C, however similar interaction is observed in the minimized structure of the imine of D-glucosamine (See Fig. 4S in ESI†) and it does not provide any increase in the Schiff base stability in this case. This closely positioned hydroxyl group may be involved in formation of an ester boronate bond instead of hydrogen bonding. The respective minimized structure is shown in Fig. 12. The transformation of the hydrogen bonded structure in Fig. 11b into iminoboronate ester in Fig. 12 involves the elimination of a water molecule. The calculated energy change for this reaction is +13.55 kcal mol⁻¹ indicating unfavorable formation of the iminoboronate ester because of induced strain and loss of hydrogen bonding to the iminium NH⁺ group, which becomes turned outside the boronate group.

The calculated energies of reactions of 2-FPBA with 3''-NH₂ group of kanamycin A and with D-glucosamine in aqueous

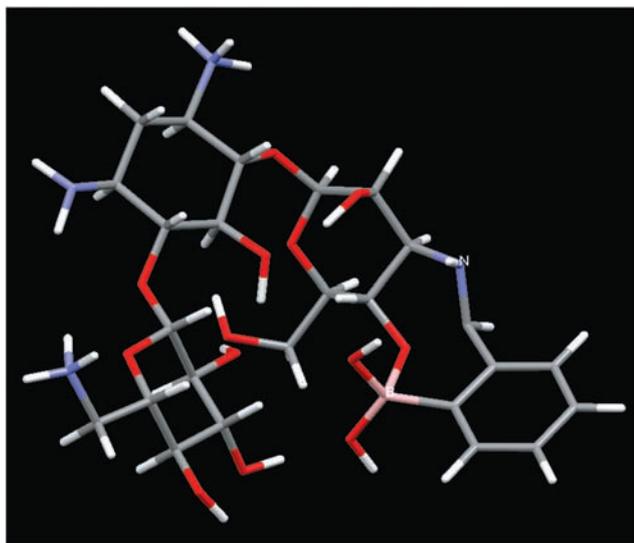


Fig. 12 Simulated M06-HF/6-31G(**) structure of iminoboronate ester formed by elimination of water molecule from boronate OH and 4''-OH of kanamycin A.

environment are $-41.0435 \text{ kcal mol}^{-1}$ and $-33.4045 \text{ kcal mol}^{-1}$ respectively, which means that the Schiff base with kanamycin indeed is significantly more exothermic. The origin of its higher stability is not immediately clear, however. One possible explanation is that imine formation induces a noticeable change in the aminoglycoside conformation moving ring C closer to ring A and making the whole molecule more compact. This allows formation of an array of three intramolecular hydrogen bonds between four OH groups (2''OH-5OH-2'OH-6''OH) of the aminoglycoside, which may have increased stability due to the so-called "cooperative effect".³⁸ Thus we come to the conclusion that increased stability of Schiff bases between 2-FPBA and partly protonated forms of kanamycin A is most probably the result of additional hydrogen bonding of the anionic boronate group to suitably positioned ammonium groups of the antibiotic or to conformational changes rather than to boronate ester formation.

Considering again the results at pH 7 (Table 2) one can notice that observed imine formation constants for all monoamines are below or close to 10^2 M^{-1} , but for all polyamines they are above or close to 10^3 M^{-1} . The rather narrow range of variation in K_{obs} within each group may be explained as follows. The principal factor increasing the imine stability is an increase in amine basicity in accordance with the correlation shown in Fig. 9. However, the fraction of free amine at pH 7 will be smaller for more basic amines. Since the slope of the Brønsted correlation is close to unity these effects nearly compensate each other. The difference in one order of magnitude between formation constants for polyamines and monoamines attributed to a stabilizing effect of an additional ion pair between ammonium and $\text{B}(\text{OH})_3^-$ groups precisely corresponds to the average free energy increment -6.5 kJ mol^{-1} of an ion pairing interaction in supramolecular complexes.³⁹

Finally, owing to formation of protonated strongly absorbing imines the spectral response to the interaction of aminoglycosides with 2-FPBA is fairly large and allows one detection of as

little as $10 \mu\text{M}$ of kanamycin A or neomycin B in the presence of equivalent amounts of sugars, amino sugars or amino acids (See Fig. 5S in ESI†). Further improvement of analytical procedure is possible by using a variant of an indicator displacement assay. In preliminary tests we found that chromotropic acid can serve as a suitable fluorescence indicator for detection of kanamycin A in neutral solutions.

Experimental

Materials

2-Formyl phenylboronic acid (Aldrich) was purified by crystallization from 10% aqueous methanol. Other reagents and components of buffer solutions MES, MOPS and CHES all from Aldrich, were used as supplied. Buffer solutions were prepared by adjusting the pH of 0.05 M free acids with concentrated NaOH to desired values.

Spectrophotometric titrations

Spectrophotometric titrations were performed on a Hewlett-Packard 8453 or Evolution diode array spectrophotometers equipped with a thermostated cell compartment at $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$. Typically to a 0.05–0.3 mM solution of an isomeric formyl phenylboronic acid in an appropriate buffer portion of concentrated solution of the second component (sugar, amino sugar, amine, *etc.*) in the same buffer were added and the mixture was incubated for 5 min after each addition before recording the spectrum. In an independent experiment it was established that the system equilibrates completely during this incubation period. The observed equilibrium constant of the Schiff base formation (K_{obs}) was calculated from the absorbance (A) vs. concentration of the second component (X) profiles at several wavelengths in the interval 260–310 nm by non-linear least-squares fitting to eqn (4) and the results were averaged. In eqn (4) subscript T stands for total concentration, A_0 is the initial absorbance of a formyl phenylboronic acid (R) measured in the absence of X , $\Delta\epsilon$ is the difference in molar absorptivities between the Schiff base and free R .

$$A = A_0 + 0.5\Delta\epsilon\{[\text{R}]_{\text{T}} + [\text{X}]_{\text{T}} + 1/K_{\text{obs}} - (([\text{R}]_{\text{T}} + [\text{X}]_{\text{T}} + 1/K_{\text{obs}})^2 - 4[\text{R}]_{\text{T}}[\text{X}]_{\text{T}})^{0.5}\} \quad (4)$$

The observed equilibrium constants of the formation of boronic acid–sugar complexes were calculated from similar absorbance vs. sugar concentration plots, but by using of a more simple eqn (5) valid under conditions of a large excess of X over R . In the eqn (5) A_{C} is the absorbance of the complex and other symbols have the same meaning as in the eqn (4).

$$A = (A_0 + A_{\text{C}}K_{\text{obs}}[\text{X}]_{\text{T}})/(1 + K_{\text{obs}}[\text{X}]_{\text{T}}) \quad (5)$$

NMR spectroscopy

^1H NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 300 NMR spectrometer and ^{11}B NMR spectra were recorded on a JEOL GX-270 spectrometer in D_2O . Solution pH was adjusted by

additions of NaOD to MOPS free acid. The observed equilibrium constants of Schiff base formation were calculated from integral intensities of signals corresponding to CH(=O) and CH(=N) protons.

Calculation method

Electronic structure calculations were performed with the Jaguar quantum chemistry software.⁴⁰ DFT calculations were carried out using Zhao and Truhlar functional with full HF exchange and M06 local functionals that eliminates long-range self-interaction (M06-HF).³⁵ The geometries of all compounds were optimized using the standard 6-31G(**) basis set. Solvation in water was accounted for by applying the continuum-solvation approach by numerically solving the Poisson-Boltzmann equation.⁴¹ Reported crystal structures of kanamycin A⁴² and D-glucosamine⁴³ were used as starting structures in calculations.

Acknowledgements

The financial support of CONACyT (project 101699) is gratefully acknowledged. N. J. Gutiérrez-Moreno thanks CONACyT for a Ph.D. Fellowship. We thank M.Sc. M. E. Ochoa and Dr R. Santillán at CINVESTAV-IPN for their help with recording of ¹¹B NMR spectra.

References

- Recent review: R. Nishiyabu, Y. Kubo, T. D. James and J. S. Fossey, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 1124–1150.
- (a) A. M. Kelly, Y. Pérez-Fuertes, J. S. Fossey, S. L. Yeste, S. D. Bull and T. D. James, *Nat. Protoc.*, 2008, **3**, 215–219; (b) Y. Pérez-Fuertes, A. M. Kelly, J. S. Fossey, M. E. Powell, S. D. Bull and T. D. James, *Nat. Protoc.*, 2008, **3**, 210–214; (c) S. L. Yeste, M. E. Powell, S. D. Bull and T. D. James, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 427–430; (d) G. Mirri, S. D. Bull, P. N. Horton, T. D. James, L. Male and J. H. R. Tucker, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8903–8905.
- M. Hutin, G. Bernardinelli and J. R. Nitschke, *Chem.–Eur. J.*, 2008, **14**, 4585–4593.
- K. E. Secor and T. E. Glass, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 3727–3730.
- (a) A. K. Yatsimirsky, N. T. Yatsimirskaya and S. B. Kashina, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 2232; (b) N. T. Yatsimirskaya, I. N. Sosnovskaya and A. K. Yatsimirsky, *Anal. Biochem.*, 1995, **229**, 249.
- (a) E. K. Feuster and T. E. Glass, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 16174; (b) K. Secor, J. Plante, C. Avetta and T. Glass, *J. Mater. Chem.*, 2005, **15**, 4073.
- C. Liang, J. A. Pedersen and T. C. Balsler, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 5296–5301.
- Aminoglycoside Antibiotics*, ed. H. Umezawa and I. R. Hooper, Springer, New York, Heidelberg, 1982.
- D. A. Stead, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 2000, **747**, 69.
- C. R. Cooper and T. D. James, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2000, 963–969.
- F. Zaubitzer, A. Buryak and K. Severin, *Chem.–Eur. J.*, 2006, **12**, 3928–3934.
- N. De-Los-Santos-Alvarez, M. J. Lobo-Castanon, A. J. Miranda-Ordieres and P. Tunon-Blanco, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 3808–3809.
- M. Frascioni, R. Tel-Vered, M. Riskin and I. Willner, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 2512–2519.
- S. Soundararajan, M. Badawi, C. M. Kohlrust and J. H. Hagerman, *Anal. Biochem.*, 1989, **178**, 125–134.
- M. L. Stolorow, C. Ahlem, K. A. Hughes, R. J. Kaiser, E. A. Kesicki, G. Li, K. P. Lund, S. M. Torkelson and J. P. Wiley, *Bioconjugate Chem.*, 2001, **12**, 229–239.
- S. Lulinski, I. Madura, J. Serwatowski, H. Szatyłowicz and J. Zachara, *New J. Chem.*, 2007, **31**, 144–154.
- G. Springsteen and B. Wang, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 5291–5300.
- C. Godoy-Alcántar, A. K. Yatsimirsky and J.-M. Lehn, *J. Phys. Org. Chem.*, 2005, **18**, 979–985.
- J. Costamagna, L. E. Lillo, B. Matsuhira, M. D. Nosedá and M. Villagran, *Carbohydr. Res.*, 2003, **338**, 1535–1542.
- E. Galbraith, A. M. Kelly, J. S. Fossey, G. Kociok-Kohn, M. G. Davidson, S. D. Bull and T. D. James, *New J. Chem.*, 2009, **33**, 181–185.
- Y. Fuentes-Martínez, C. Godoy-Alcántar, F. Medrano, A. Dikiy and A. K. Yatsimirsky, *Supramol. Chem.*, 2010, **22**, 212–220.
- A. Adamczyk-Woźniak, M. K. Cyrański, B. T. Frączak, A. Lewandowska, I. D. Madura and A. Sporzyński, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 3761–3767.
- (a) L. Zhu, S. H. Shabbir, M. Gray, V. M. Lynch, S. Sorey and E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 1222–1232; (b) B. E. Collins, S. Sorey, A. E. Hargrove, S. H. Shabbir, V. M. Lynch and E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 4055–4060.
- (a) W. Ni, G. Kaur, G. Springsteen, B. Wang and S. Franzen, *Bioorg. Chem.*, 2004, **32**, 571–581; (b) S. Franzen, W. Ni and B. Wang, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 12942–12948.
- J. D. Larkin, J. S. Fossey, T. D. James, B. R. Brooks and C. W. Bock, *J. Phys. Chem. A*, 2010, **114**, 12531–12539.
- Y. Fuentes-Martínez, C. Godoy-Alcántar, F. Medrano, A. Dikiy and A. K. Yatsimirsky, *Bioorg. Chem.*, 2010, **38**, 173–180.
- C. Frassinetti, L. Alderighi, P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca and S. Ghelli, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **376**, 1041–1052.
- (a) E. H. Cordes and W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 832; (b) C. M. Metzler, A. Cahill and D. E. Metzler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 6075–6082.
- J. Crujeiras, A. Rios, E. Riveiros and J. P. Richard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 15815–15824.
- H. Nagamatsu, T. Okuyama and T. Fueno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1984, **57**, 2508–2514.
- (a) H. Nagamatsu, T. Okuyama and T. Fueno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1984, **57**, 2502–2507; (b) G. Rao and M. Philipp, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 1505–1512.
- E. H. Cordes and W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 2843.
- C. Hansch, A. Leo and R. W. Taft, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 2995–195.
- K. Maruyoshi, T. Yamaguchi, T. Demura, N. Matsumori, T. Oishi and M. Murata, *Chem.–Eur. J.*, 2011, **17**, 4788–4795.
- Y. Zhao and D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 13126.
- J. Zhao, M. G. Davidson, M. F. Mahon, G. Kociok-Kohn and T. D. James, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 16179–16186.
- M. P. Nicholls and P. K. C. Paul, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**, 1434–1441.
- F. Allen, O. Kennard and R. Taylor, *Acc. Chem. Res.*, 1983, **16**, 146–153.
- H.-J. Schneider, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 3924–3977.
- Jaguar; version 7.7*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2010.
- D. J. Tannor, B. Marten, R. Murphy, R. A. Friesner, D. Sitkoff, A. Nicholls, M. Ringnalda, W. A. Goddard, III and B. Honig, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 11875.
- Y. A. Puius, T. H. Stievater and T. Srikrishnan, *Carbohydr. Res.*, 2006, **341**, 2871–2875.
- W. T. A. Harrison, H. S. Yathirajan, B. Narayana, T. V. Sreevidyac and B. K. Sarojini, *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online*, 2007, **63**, o3248.