



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“QUIMIOSENSORES FLUORESCENTES PARA
NUCLEÓTIDOS Y ANIONES BIOLÓGICOS BASADOS EN
RECEPTORES DINUCLEARES DE ZINC (II). SÍNTESIS Y
RECONOCIMIENTO MOLECULAR”**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA
Q. IVÁN JONATHAN BAZANY RODRÍGUEZ**

**DR. ALEJANDRO DORAZCO GONZÁLEZ
CCIQS, UNAM-UAEM.**

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DE 2017.



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**

**“QUIMIOSENSORES FLUORESCENTES PARA
NUCLEÓTIDOS Y ANIONES BIOLÓGICOS BASADOS EN
RECEPTORES DINUCLEARES DE ZINC (II). SÍNTESIS Y
RECONOCIMIENTO MOLECULAR”**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

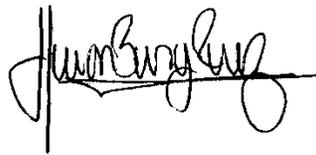
**PRESENTA
Q. IVÁN JONATHAN BAZANY RODRÍGUEZ**



CD. MÉX., ENERO DE 2017.

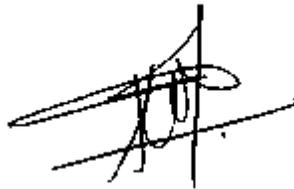
JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Anatoly Yatsimirsky.
Vocal	Dra. María de Jesús Rosales Hoz.
Vocal	Dr. Jesús Valdés Martínez.
Vocal	Dr. José Guadalupe López Cortés.
Secretario	Dra. Martha Verónica Escárcega Bobadilla.



Q. Iván Jonathan Bazany Rodríguez

Sustentante



Dr. Alejandro Dorazco González

Tutor

El trabajo experimental de esta tesis se desarrolló en el laboratorio 1 de Química Inorgánica del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UNAM-UAEMex y en el laboratorio 1-1 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

A la **UNAM** por todos los servicios brindados.

Al **Dr. Alejandro Dorazco González** por su asesoría y apoyo para hacer que este proyecto fuera posible.

Al **CONACyT** por la beca otorgada (No. 577221) para realizar mis estudios de maestría.

A los siguientes proyectos por el financiamiento:

- a. Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales-CONACyT **PDCPN-247495**.
- b. Ciencia Básica-CONACyT **CB-239648**.
- c. Investigación e Innovación Tecnológica, **PAPIIT-UNAM IA203717**.
- d. Fronteras de la Ciencia 2015-CONACyT **ID-179**.

A los miembros del jurado por sus comentarios para mejorar esta tesis:

Presidente: **Dr. Anatoly Yatsimirsky**.

Vocal: **Dra. María de Jesús Rosales Hoz**.

Vocal: **Dr. Jesús Valdés Martínez**.

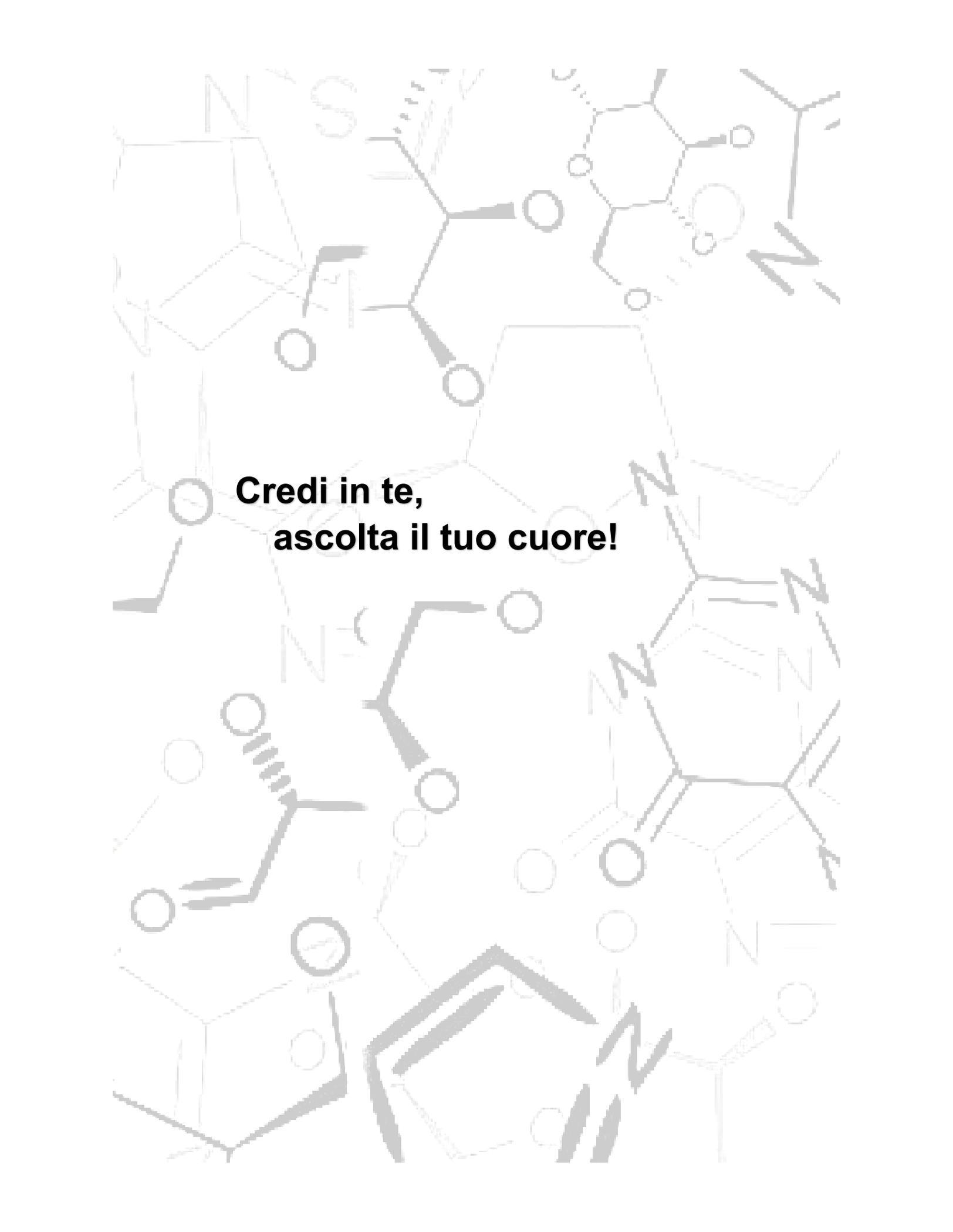
Vocal: **Dr. José Guadalupe López Cortés**.

Secretario: **Dra. Martha Verónica Escárcega Bobadilla**.

A la **Ma. en C. María de las Nieves Zavala Segovia** por su ayuda en las titulaciones espectroscópicas de RMN.

Al personal técnico de espectrometría de masas y cromatografía del Instituto de Química de la UNAM.

A todas personas que me apoyaron (amigos, familia y compañeros) de todas las formas posibles a lo largo de dos años.

The background of the slide is filled with various chemical structures, including organic molecules, rings, and functional groups, rendered in a light gray color. Some structures are more prominent than others, but they all contribute to a scientific, chemistry-themed aesthetic.

**Credi in te,
ascolta il tuo cuore!**

CONTENIDO

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	3
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	10
Sección A. Química Supramolecular en Química Analítica	11
1. Reconocimiento Molecular: Sistemas Huésped-Anfitrión	12
1.1 Respuesta al Reconocimiento Molecular: Dispositivos Fotoquímicos	13
1.2 Quimiosensores Moleculares Ópticos	14
1.2.1 Quimiosensores Basados en su Diseño Molecular	15
1.2.2 Quimiosensores Basados en su Respuesta de Señalización	16
2. Mecanismos Fotofísicos en Quimiosensores Fluorescentes	19
2.1 PET, EET (Transferencia Electrónica Fotoinducida, Transferencia de Energía)	20
2.2 PCT (Transferencia de Carga Fotoinducida)	22
2.3 Transferencia de Protón Fotoinducida	23
2.4 Formación de Excímeros	24
Sección B. Interacciones en Química Supramolecular	25
1. Interacciones No Covalentes	25
1.1 Interacciones Electroestáticas	26
1.2 Enlace de Hidrógeno	27
1.3 Enlace de Halógeno	29
1.4 Interacciones π	31
1.5 Fuerzas de van der Waals	33
2. Enlace de Coordinación	34
3. Efecto Hidrofóbico	35
4. Solvatación	35
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	37
Receptores Artificiales para Moléculas Fosforiladas	38
1. Receptores Basados en Compuestos de Coordinación DPA-Zinc (II)	38
2. Receptores Basados en Compuestos de Coordinación IDA-Cobre (II)	47
3. Receptores Basados en Macrociclos que Coordinan Cobre (II) o Zinc (II)	48

HIPÓTESIS	51
OBJETIVOS	51
JUSTIFICACIÓN	52
CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	53
Sección A. Condiciones Generales de Instrumentación	54
1. Disolventes y Reactivos	54
2. Instrumentación	54
Sección B. Síntesis y Caracterización de Ligantes	55
1. Ruta Sintética de los Ligantes.....	55
1.1 Síntesis de 5,8-Dimetilquinolina	56
1.2 Síntesis de 5,8-Bis(bromometil)quinolina	57
1.3 Síntesis de 5,8-Bis[N-(metil)di-(2-dipicolil)amino]quinolina.....	58
1.4 Síntesis de 5,8-Bis[Dietil N-(metil)iminodiacetato]quinolina.....	59
Sección C. Metodología Empleada en el Reconocimiento Molecular	60
1. Titulaciones Espectrofluorimétricas y Método de Variación Continua	60
2. Titulaciones Espectrofotométricas por UV-Visible.....	61
3. Titulaciones Espectroscópicas por RMN.....	62
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
Sección A. Caracterización Espectroscópica de los Receptores en Disolución	64
1. Estudios Espectroscópicos de RMN, UV-Vis, Fluorescencia y EM	64
1.1 Receptor 1	64
1.2 Receptor 2	71
2. Análisis Estructural de los Complejos en Disolución	76
Sección B. Estudios de Reconocimiento Molecular	78
1. Estudios por Espectroscopia de Fluorescencia.....	78
2. Estudios por ³¹ P-RMN y ¹ H-RMN	85
3. Estudios por Espectroscopia de UV-Vis.....	90
4. Discusión de Constantes de Asociación y Perspectivas	91
CONCLUSIÓN	94
REFERENCIAS	96
ANEXOS	101

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

[A]	Concentración molar del analito
A	Absorbancia
Å	Armstrong
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BPO	Peróxido de benzoilo
°C	Grados Celsius
cAMP	Adenosina monofosfato-3',5'-cíclico
CAPS	Ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico
CEF	Incremento de la fluorescencia por quelatación
CEQ	Incremento del amortiguamiento de fluorescencia por quelatación
cGMP	Guanosina monofosfato-3',5'-cíclico
CTP	Citidina trifosfato
δ	Desplazamiento químico
d	Señal doble
DART	Ionización por análisis directo en tiempo real
dd	Señal doble de dobles
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPA	Dipicolilamina
EET	Transferencia de energía de excitación
EM	Espectrometría de masas
eq. /Eq.	Equivalente
ESI	Ionización por electrospray
EtOH	Etanol
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia

GDP	Guanosina difosfato
GMP	Guanosina monofosfato
GTP	Guanosina trifosfato
h	Hora
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico
His	Histidina
HOMO	Orbital molecular ocupado de más alta energía
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Coherence
I	Intensidad de fluorescencia
IDA	Iminodiacetato
I_0	Intensidad inicial de fluorescencia
IR	Infrarrojo
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
J	Constante de acoplamiento
K_A	Constante de asociación
K_{APP}	Constante de asociación aparente
K_{EFF}	Constante de asociación efectiva
kJ	Kilojoules
λ	Longitud de onda
L	Ligante
LUMO	Orbital molecular desocupado de más baja energía
M	Molaridad/Molar
m	Señal múltiple
m/z	Relación masa carga
M^+	Ion molecular
μM	Micromolar
MeCN	Acetonitrilo
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-(N-morfolín)etanosulfónico
MHz	Megahertz
min	Minuto

MOPS	Ácido 3-(N-mofolín)propanosulfónico
NBS	N-Bromosuccinimida
NIR	Infrarrojo cercano
nM	Nanomolar
NTPs	Nucleótidos trifosfato
OTf/TfO ⁻	Triflato
PCT	Transferencia de carga fotoinducida
PDE	Fosfodiesterasa
PET	Transferencia electrónica fotoinducida
PEt ₃	Trietilfosfina
pH	Potencial de hidrógeno
Phe	Fenilalanina
Pi	Fosfato
pK	Constante de acidez
pK*	Constante de acidez en el estado excitado
PPi	Pirofosfato
ppm	partes por millón
[R]	Concentración molar de receptor
RMN	Resonancia magnética nuclear
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
¹⁹ F-RMN	Resonancia magnética nuclear de flúor 19
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón o hidrógeno
³¹ P-RMN	Resonancia magnética nuclear de fósforo 31
T%	Porcentaje de transmitancia
6-TAMRA	Tetrametil-6-carboxirodamina
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
Trizma	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
Trp	Triptófano
UTP	Uridín trifosfato
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VP	Violeta de pirocatecol

RESUMEN

El diseño de un quimiosensor potente y selectivo para aniones en agua es un tema pendiente en química debido a las elevadas energías libres de hidratación que presentan los aniones y a que el agua compite por los sitios de asociación. El uso de centros metálicos con alta afinidad por aniones ha podido contribuir a desarrollar sensores funcionales y selectivos en agua. El presente proyecto se enfocó en sintetizar dos nuevos receptores fluorescentes basados en complejos dinucleares de zinc (II) y estudiar su afinidad para una serie extensa de bioanalitos (halogenuros, oxoaniones, dicarboxilatos alifáticos derivados del ciclo de Krebs, aminoácidos y nucleótidos) en agua a valores de pH fisiológicos. Los receptores **1** y **2** presentan la fórmula general $[Zn_2L1](OTf)_4$ y $[Zn_2L2]$ respectivamente, donde **L1**= 5,8-Bis[N-(metil)di-(2-dipicolil)amino]quinolina y **L2**= 5,8-Bis[N-(metil)iminodiacetato]quinolina. Estos fueron caracterizados por (1H , ^{13}C , ^{19}F , HSQC) RMN, EM-ESI, UV-Vis y fluorescencia. La afinidad de los ligantes asimétricos **L1** y **L2** a la sal $Zn(OTf)_2$ fue determinada por titulaciones espectroscópicas con valores de $\log K_{[ZnL1]} = 4.76$ y $\log K_{[Zn2L1]} = 4.17 M^{-1}$. El análisis por variación continua soporta la formación de las especies dinucleares en agua neutra. Los resultados de UV-Vis, fluorescencia y (1H , ^{31}P) RMN muestran que el receptor **1** tiene gran afinidad por GTP sobre el resto de los bioanalitos y moderada afinidad por GDP, ATP y PPI. A partir de titulaciones espectroscópicas de fluorescencia se determinó el modo de unión del quimiosensor tetracatiónico **1** con GTP y la formación de especies con estequiometría 1:2 y 2:2, del tipo $[1:GTP_2]$ y $[1_2:GTP_2]$ con valores de constante de asociación de, $\log \beta_1 = 8.49$ y $\log \beta_2 = 18.53 M^{-1}$ respectivamente. Para el caso del quimiosensor neutro **2**, la mayor afinidad fue determinada para GDP con un valor de $\log K_{[2-GDP]} = 3.36 M^{-1}$ (obtenida por fluorescencia). El sensor **2** tiene un orden de selectividad: $GDP > GTP > CTP > GMP > Pi \gg$ resto de los aniones estudiados. Los cambios de las propiedades fotofísicas de los receptores **1** y **2** por adición de GTP y GDP, son resultado de la coordinación del nucleótido a los dos centros metálicos asimétricos del quimiosensor tetracatiónico **1**, $[ZnN_4]^{2+}$ -quinolina- $[ZnN_3]^{2+}$ o quimiosensor neutro **2**, $[ZnN_2O_2]$ -quinolina- $[ZnNO_2]$ a través del fosforo β del grupo tri o difosfato y de un átomo de nitrógeno del imidazol de la guanosina. Los quimiosensores **1** y **2** permiten la detección fluorescente de los nucleótidos GTP y GDP en el intervalo de concentraciones μM con selectividad sobre bioanalitos aniónicos como halogenuros, oxoaniones, CTP, UTP y dicarboxilatos alifáticos.

INTRODUCCIÓN

La química supramolecular, también conocida como la química más allá de la molécula, es el área de la ciencia que se encarga del estudio de las interacciones no covalentes y los ensamblajes intermoleculares. Los ensamblajes intermoleculares generalmente están constituidos por una molécula anfitriona y una molécula que funge como huésped. El concepto de química supramolecular fue introducido en 1978 por el Premio Nobel J. M. Lehn y la define como “la química de los enlaces intermoleculares” o, dicho de otra manera, “la química más allá de la molécula que estudia las entidades organizadas de alta complejidad, que son el resultado de la asociación de dos o más moléculas mediante enlaces intermoleculares no covalentes”.¹ La química supramolecular comprende el reconocimiento molecular, proceso que resulta fundamental en los mecanismos operativos presentes en los seres vivos. El reconocimiento molecular puede describirse como la unión específica de una molécula a un receptor. Las moléculas que logran un reconocimiento eficiente y selectivo, se llaman moléculas anfitrión (host), las cuales presentan sitios de reconocimiento útiles para albergar a otras moléculas regularmente más pequeñas, definidas como huéspedes (guest).² El reconocimiento es una unión con un propósito, como un receptor es un ligante con un propósito, ello implica un proceso de reconocimiento con una pauta a través de un conjunto de interacciones intermoleculares estructuralmente muy bien definidas. Las interacciones intermoleculares constituyen la base de los procesos altamente específicos de reconocimiento, reactividad, transporte y regulación que se dan en la biología, como la unión de un sustrato a una proteína, las reacciones enzimáticas, el ensamblaje de complejos multiproteínicos, la asociación antígeno-anticuerpo, la lectura, transcripción y traducción del código genético, la regulación de la expresión de los genes a través de las proteínas que se unen a ADN, la entrada de virus a las células, la señal de inducción nerviosa que generan los neurotransmisores, el reconocimiento celular, etc.

Una de las metas u objetivos de muchos investigadores que se dedican a la química supramolecular, es imitar los procesos biológicos y entender cada una de las etapas que ocurren en determinado proceso. Así surge el concepto “huésped-anfitrión” o química “host-guest”³ que está basado en una evolución del modelo “llave-cerradura” formulado por Fischer hace más de cien años.⁴

En la actualidad la química supramolecular es un área de investigación de gran interés y es considerada por diversos grupos como pieza clave en el área de las ciencias analíticas⁵, es por ello que el presente trabajo de síntesis y reconocimiento molecular está enfocado a los estudios de asociación en medio acuoso y pH neutro, entre aniones que tienen una participación fundamental en un amplio número de procesos biológicos (nucleótidos, dicarboxilatos derivados del ciclo de Krebs, aminoácidos, etc.) y receptores dinucleares de zinc (II) que presentan como unidad fluorescente un fragmento de quinolina.

En la presente tesis, la información se ha dividido en diferentes capítulos entre los que se encuentran antecedentes, marco teórico, desarrollo experimental, resultados, discusión, conclusión y anexos; con el propósito de cubrir los lineamientos que el método científico amerita.

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

El apartado de antecedentes recopila y describe brevemente aquellos receptores más sobresalientes en el reconocimiento molecular de moléculas fosforiladas como los nucleótidos, haciendo énfasis en dos hechos: primero, que dichos receptores realizan el reconocimiento molecular en medio acuoso, lo cual es poco común; en segundo lugar, logran detectar los sustratos de estudio a pH cercano al fisiológico.

La descripción detallada de los diferentes procedimientos utilizados en cada etapa del presente proyecto se encuentra escrita en el desarrollo experimental. Se hace alusión a temperaturas, concentraciones, métodos y técnicas que se emplearon a lo largo del trabajo en el laboratorio. De igual manera, se incluyen aspectos sobre la caracterización de cada ligante sintetizado, haciendo énfasis en resonancia magnética nuclear en una y dos dimensiones y en espectrometría de masas; así mismo, se comentan características físicas de los ligantes y rendimiento de las reacciones.

En los anexos se incluyen los espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, ¹⁹F-RMN, IR, y EM de cada uno de los productos sintetizados.

De los estudios de reconocimiento molecular podemos citar el uso de equipo instrumental como la espectroscopía de fluorescencia que juega un papel importante en esta investigación, gracias al fenómeno espectroscópico de emisión de fluorescencia, se establece a partir de gráficos de Job, la estequiometría de los sistemas supramoleculares de estudio y la determinación de K_A , estas se obtienen de titulaciones fluorimétricas, dichas titulaciones proporcionan información acerca del proceso de extinción de la fluorescencia de los receptores sintetizados.

Otro tipo de métodos espectroscópicos que complementan el estudio de reconocimiento molecular entre los sustratos de estudio y los receptores sintetizados, radica en el uso de la espectrofotometría de UV-Vis y la espectroscopía de RMN.

Una titulación espectroscópica de ^1H -RMN y ^{31}P -RMN nos permite averiguar qué átomos de la molécula huésped (nucleótido) se encuentran interaccionando con el receptor. El desplazamiento a campos altos o bajos de ciertas señales correspondientes al huésped, indican que ciertos átomos del receptor interaccionan directamente con el huésped para formar un complejo receptor-huésped. La espectroscopía de UV-Vis ofrece un método confiable para determinar constantes de asociación (K_A) por lo tanto el uso de esta técnica resulta ser complementaria para corroborar que efectivamente se lleva a cabo una asociación entre los receptores y sustratos de estudio.

Los obstáculos encontrados, las decisiones tomadas para solucionarlos y las resoluciones inferidas, así como la justificación de los resultados obtenidos durante la elaboración del proyecto, se presentan en el apartado llamado “Resultados y Discusión”, donde se engloban dos secciones. La sección A recopila todos los datos espectroscópicos de la caracterización de los complejos en disolución, comenzando con experimentos de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, HSQC, DEPT, espectros de absorción UV-Vis, espectros de emisión de fluorescencia y determinación estequiométrica empleando el método de variación continua (gráficos de Job). La sección B describe los estudios de asociación de los complejos dinucleares de zinc (II) con los sustratos de estudio. Al final de cada sección de este capítulo se realiza una discusión de los resultados obtenidos.

Posterior al capítulo “Resultados y Discusión” se formula una conclusión del presente proyecto.

CAPÍTULO 1

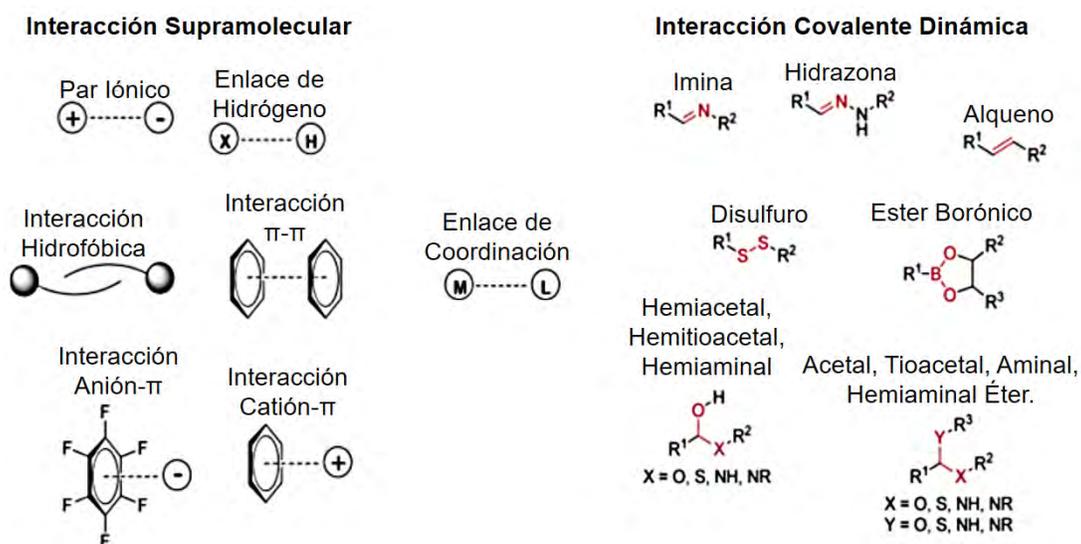
MARCO TEÓRICO

La química supramolecular es un campo interdisciplinario que se encarga del estudio de todas aquellas interacciones intermoleculares y su efecto en la asociación de moléculas, reconocimiento molecular y ensamblajes moleculares.⁶ Las supramoléculas son entidades químicas formadas por dos o más moléculas, que se mantienen unidas por interacciones no covalentes como por ejemplo enlaces de hidrógeno o apilamiento π . Uno de los temas centrales de esta disciplina es el estudio de los sistemas huésped-anfitrión; el estudio de estos sistemas se centra en la forma en que estos se asocian y en las interacciones que intervienen en el proceso de unión.⁷ Los sistemas huésped-anfitrión se engloban en un proceso llamado reconocimiento molecular, es por ello que este capítulo fue dividido en dos secciones.

La sección A resume los aspectos más relevantes dentro del campo de la química supramolecular aplicada a la química analítica, donde se engloban los aspectos del reconocimiento molecular y el uso de receptores artificiales que funcionan como quimiosensores para detectar y cuantificar analitos. Adicionalmente dentro de la sección A existe un apartado dedicado a los diferentes mecanismos fotofísicos que pueden observarse en el diseño de quimiosensores luminiscentes para aniones. Una justificación de este apartado radica en el amplio arsenal de receptores artificiales para detectar aniones a través de alguno de los mecanismos fotofísicos clásicos, uno de estos mecanismos de respuesta, el más popular, reside en la interacción directa entre el “anión (huésped)” y el “receptor (anfitrión)”, este último, generalmente posee grupos fluorogénicos capaces de transducir una señal óptica que es monitoreada por métodos convencionales de análisis. La sección B describe las principales interacciones no covalentes que intervienen en los sistemas anfitrión-huésped, como los enlaces de hidrógeno, apilamiento π , formación de pares iónicos, fuerzas de van der Waals, etc. Cabe resaltar que el entendimiento de la naturaleza de los enlaces de hidrógeno y el enlace de coordinación han permitido diseñar receptores para una amplia gama de moléculas de importancia biológica, por lo cual, el enlace de hidrógeno y el enlace de coordinación, se consideran como algunas de las interacciones más importantes en química supramolecular.

SECCIÓN A. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR EN QUÍMICA ANALÍTICA.

La química supramolecular ha evolucionado hacia la denominada química dinámica combinatoria. La dinámica combinatoria se produce introduciendo en las entidades supramoleculares enlaces reversibles que puedan formarse y romperse, con lo cual se permite un cambio continuo en su estructura supramolecular debido al intercambio y/o reorganización de sus constituyentes. Para la química supramolecular se abren amplias perspectivas, señalándola como una química emergente, adaptativa y evolutiva. Como se ha mencionado anteriormente, la química supramolecular es intrínsecamente una química dinámica dada la labilidad de las interacciones que conectan los componentes moleculares de una entidad supramolecular y a la capacidad resultante de las especies supramoleculares de intercambiar sus constituyentes. En los últimos años, una gran parte de los grupos de investigación de todo el mundo han demostrado que la química supramolecular puede desempeñar un papel de gran alcance en ciencias analíticas. Esto da origen a un nuevo y creciente campo dentro de las ciencias químicas analíticas: la “química supramolecular analítica”, la cual aplica y explora aspectos de receptores químicos sintéticos de naturaleza orgánica o inorgánica que funcionan por el intercambio dinámico covalente (reversibilidad de determinados enlaces covalentes) y no covalente (enlaces de hidrógeno, apilamiento π , pares iónicos, etc.) que crean los ensamblajes huésped-anfitrión que dan lugar a modulaciones de señal (óptica, electroquímica, magnética, etc.) tras la adición de analitos.⁸ (Ver Esquema 1.1).

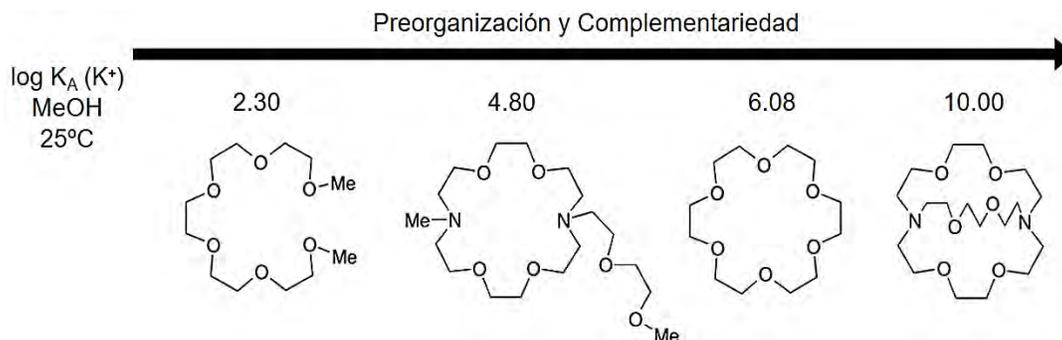


Esquema 1.1 Ejemplos representativos de interacciones supramoleculares e interacciones covalentes dinámicas.⁸

1. Reconocimiento Molecular: Sistemas Huésped-Anfitrión.

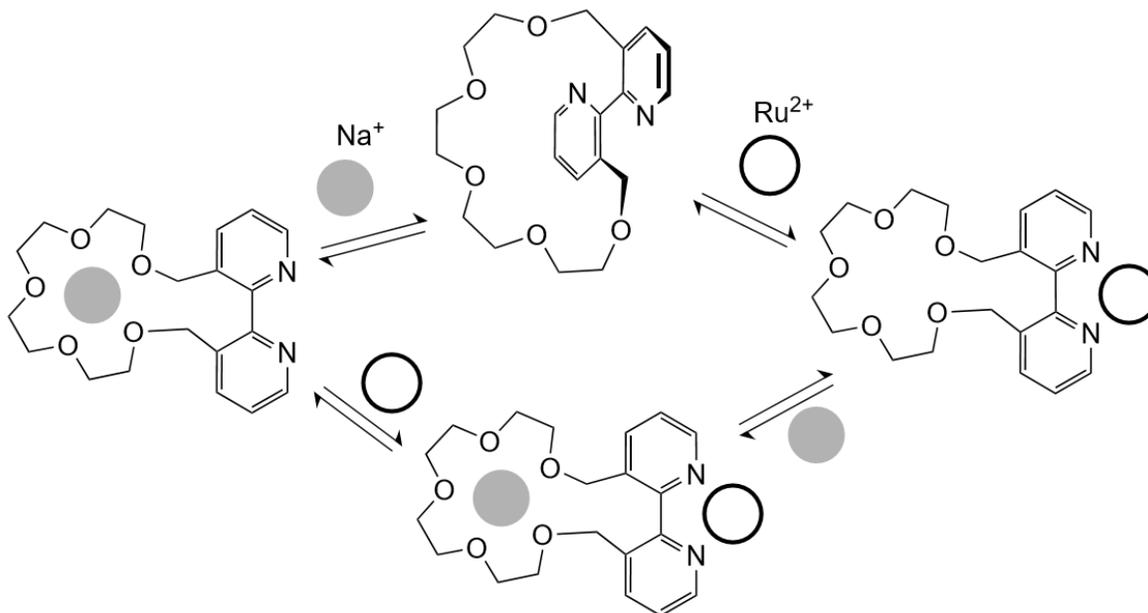
El reconocimiento molecular es una de las grandes áreas que pertenecen a la química supramolecular, este proceso, está determinado por la energía y la información involucrada en la selección y anclaje del sustrato por una molécula receptora dada.⁹ Se han designado varios términos en referencia al proceso de asociación entre dos moléculas. El primero corresponde a Cram que introdujo el término “huésped-anfitrión”, y el segundo corresponde a Ehrlich con “receptor-sustrato”, más enfocado a sistemas biológicos. En ambas acepciones, hay una analogía entre anfitrión-receptor y huésped-sustrato, el receptor es una estructura molecular capaz de unir selectivamente especies mediante diferentes interacciones intermoleculares, proporcionando un ensamblaje de dos o más especies moleculares.² La forma en que un anfitrión y un huésped se asocian generalmente está mediada por las interacciones no covalentes que participan simultáneamente en ese proceso.¹⁰ El reconocimiento molecular es la base del procesamiento de la información a nivel supramolecular. Este puede dar lugar a cambios en las propiedades electrónicas, iónicas, ópticas o conformacionales de una especie supramolecular, generando con esto una señal.¹¹ Para conseguir un alto nivel de reconocimiento (afinidad y selectividad) de un receptor hacia un sustrato determinado, se necesitan tomar en cuenta los siguientes aspectos¹²:

- Complementariedad:** Para reconocer una molécula, el anfitrión debe tener el mayor número posible de sitios de enlace con carácter electrónico complementario a aquellos que posee el huésped. También es preferible que exista una complementariedad geométrica. (Ver Esquema 1.2)
- Preorganización:** Un anfitrión con una elevada preorganización experimenta un cambio conformacional mínimo tras enlazarse con el huésped. En general cuando más organizados para la unión están el receptor y el sustrato, más estable será su complejo.



Esquema 1.2 Efecto de preorganización y complementariedad sobre log K_A de anfitriones poliéter para K^+ .

- c. Cooperatividad: Fenómeno producido por receptores que presentan diversos sitios de unión. Cuando un sustrato se une a una subunidad del receptor, el resto de las subunidades son estimuladas y se activan para favorecer la interacción de otro sustrato. (Ver Esquema 1.3).



Esquema 1.3 Efecto de cooperatividad para facilitar la interacción de Na^+ tras la preorganización de un políéter con Ru^{2+} y viceversa.¹²

- d. Efectos del Disolvente: Los disolventes pueden tener un efecto en la solubilidad, estabilidad y velocidad de reacción, así que la elección del disolvente apropiado permite el control cinético y termodinámico en el proceso de reconocimiento molecular.

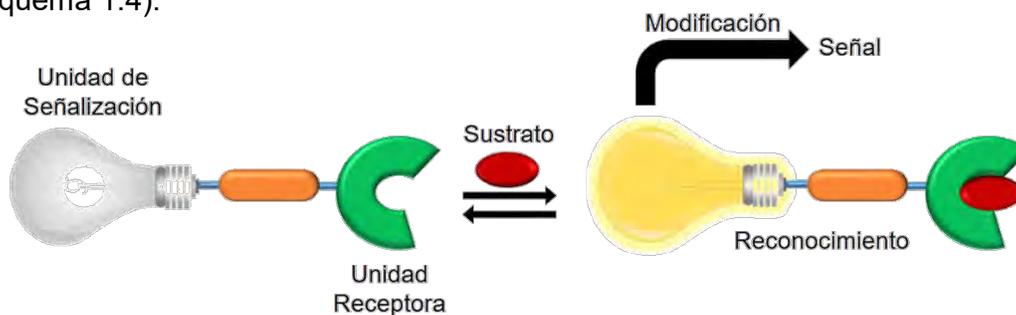
1.1 Respuesta al Reconocimiento Molecular: Dispositivos Fotoquímicos.

Los dispositivos basados en procesos de reconocimiento, son moléculas mediante las cuales se transduce una señal, dicha señal es inducida por la asociación de un huésped, por lo tanto, un quimiosensor es cualquier dispositivo capaz de transformar información química en una señal analítica, esto como consecuencia de la interacción con un sustrato.¹³ En este proceso de reconocimiento, la información a nivel molecular, como la presencia o ausencia de determinadas especies en disolución se amplifica a nivel macroscópico, permitiendo por tanto su determinación cualitativa o cuantitativa. Un quimiosensor constará de al menos un centro de reconocimiento molecular y un centro de generación de señal.¹¹ El centro de reconocimiento molecular debe poseer todas las características citadas anteriormente, estas deben ser apropiadas para el tipo de sustrato que se desea reconocer.

El centro de generación de la señal es el encargado de poner en contacto el ambiente molecular con el mundo macroscópico, comunicando de alguna forma que se ha llevado a cabo la interacción quimiosensor-sustrato. Esta comunicación tiene lugar a través de la variación de una propiedad bien definida que puede ser medible fácilmente a través de un instrumento. De esta manera, podemos utilizar como indicador una variación en la intensidad de una banda tanto de absorción como de emisión en la región del UV-Vis, el desplazamiento de una señal en RMN o el de una onda voltamperométrica.¹⁴ La emisión de fluorescencia es una propiedad muy apropiada para este fin, por varias razones, entre las que podemos destacar la simplicidad de la instrumentación para su detección, la alta sensibilidad que permite la detección del sustrato a nivel de trazas y, lo más interesante, que se puede percibir visualmente incluso a muy bajas concentraciones.¹⁵

1.2 Quimiosensores Moleculares Ópticos.

La selección de moléculas receptoras con capacidad de indicar su interacción con el sustrato mediante la transmisión de algún tipo de señal, ha conducido a la obtención de los denominados sensores o quimiosensores moleculares. Típicamente los quimiosensores son moléculas de origen abiótico que son capaces de enlazar selectiva y reversiblemente a un analito de interés con un cambio concomitante en alguna de las propiedades del sistema, tales como potencial redox, espectros de absorción o fluorescencia, entre otras.¹⁴ Hay dos procesos básicos que ocurren en la detección del analito: el reconocimiento molecular y la transducción de la señal. Por sus propiedades, los quimiosensores ofrecen interesantes y atractivas posibilidades de aplicación en el campo de las ciencias químicas analíticas; de hecho, nos permiten llevar a cabo mediciones en tiempo y espacio real cuando se utilizan inmovilizados en superficies o incluso libres en disolución.¹³ Los quimiosensores se pueden clasificar de manera general tomando en cuenta su diseño o respuesta de señalización.¹⁶ (Ver Esquema 1.4).

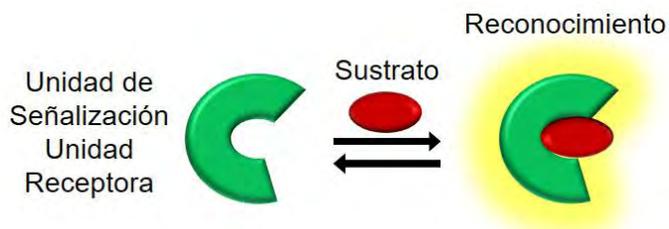


Esquema 1.4 Respuesta al reconocimiento molecular; Funcionamiento de quimiosensores.

1.2.1 Quimiosensores Basados en su Diseño Molecular.

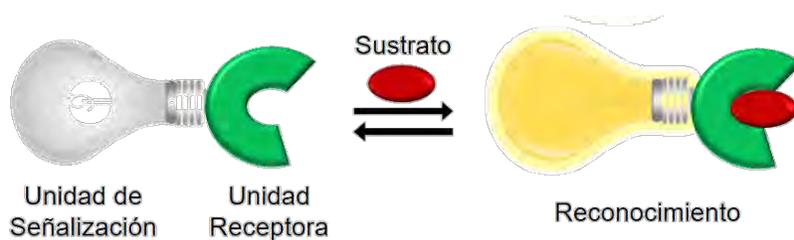
Dentro de los quimiosensores basados en su diseño molecular podemos encontrar diferentes situaciones estructurales:

- a. Quimiosensores Intrínsecos: La unidad receptora es la unidad de señalización. Muchas veces, el analito es un H^+ y a estos sensores se les denomina “indicadores de pH”. Si el analito es un ion, se utiliza frecuentemente el término “agente quelante”.¹⁷ (Ver Esquema 1.5).

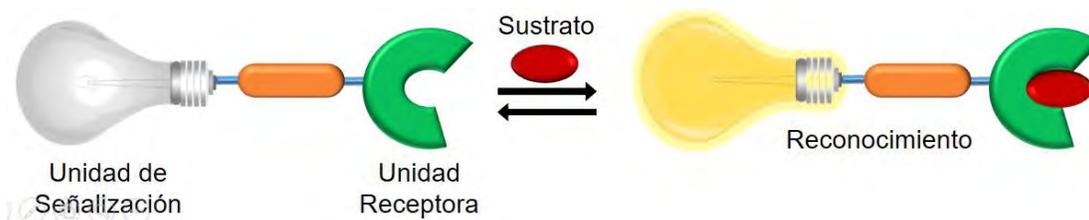


Esquema 1.5 Quimiosensor intrínseco.

- b. Quimiosensores Conjugados: La unidad de señalización está directamente integrada o directamente espaciada a través de enlaces covalentes a la unidad receptora. (Ver Esquemas 1.6-1.7). El diseño de este tipo de sensores, basados en el reconocimiento iónico o molecular, requiere una especial atención, puesto que la parte receptora debe cumplir con ciertos criterios de selectividad y afinidad por el analito. En estos, el analito se coordina de forma reversible al centro de reconocimiento, provocando un cambio en las propiedades de la unidad de señalización, indicativo de que la interacción receptor-analito se ha producido.¹⁸

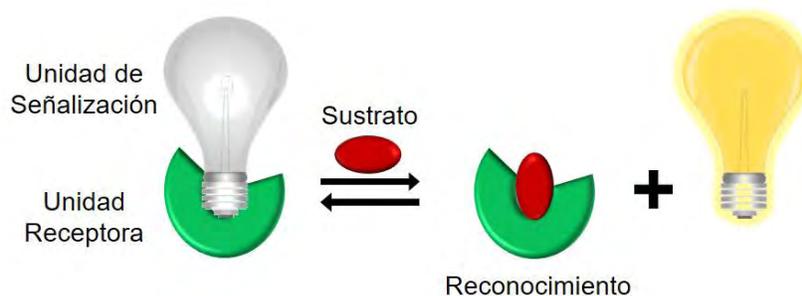


Esquema 1.6 Quimiosensor conjugado directamente integrado.



Esquema 1.7 Quimiosensor conjugado directamente espaciado.

- c. Quimiosensores Ensamblados: El centro de reconocimiento y la unidad de señalización se encuentran formando un complejo supramolecular. (Ver Esquema 1.8). Cuando se añade un determinado anión a la disolución de este complejo, se produce una reacción de desplazamiento por lo que la unidad receptora pasa a formar un complejo con el analito, desplazando a la unidad de señalización hacia la disolución y recuperando esta su comportamiento espectroscópico no coordinado.¹⁹



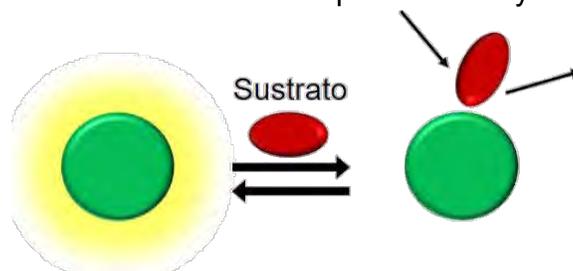
Esquema 1.8 Quimiosensor ensamblado.

1.2.2 Quimiosensores Basados en su Respuesta de Señalización.

Basándonos en la respuesta de señalización los quimiosensores ópticos se pueden clasificar en cromogénicos y fluorogénicos.¹⁹

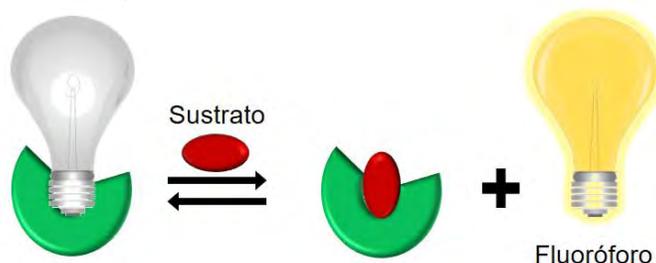
- a. Quimiosensores Fluorogénicos: Dispositivos que tienen la capacidad de interactuar selectiva y reversiblemente al sustrato con un cambio simultáneo en la fluorescencia, estos pueden ser intrínsecos, conjugados o ensamblados. Se pueden dividir en cuatro grandes clases.

- I. Sensores en los cuales se amortigua “quenching” la emisión de fluorescencia como consecuencia de la colisión aleatoria del analito con el fluoróforo. Regularmente el quimiosensor no presenta unidades receptoras que puedan favorecer la formación de un complejo supramolecular. (Ver Esquema 1.9) El proceso de extinción es controlado por difusión y se le denomina “quenching dinámico”.



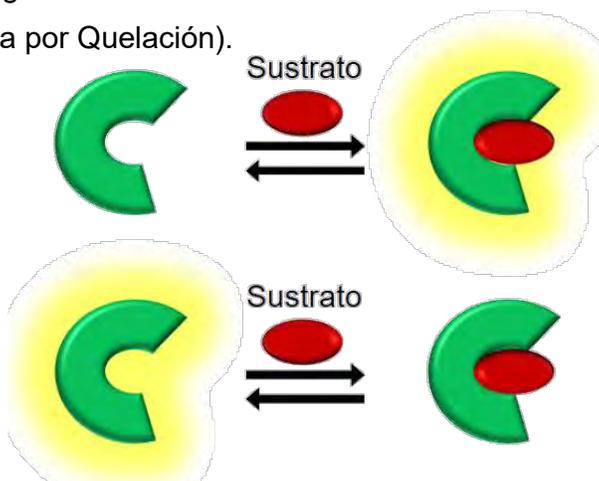
Esquema 1.9 Quenching dinámico no asociativo (colisiones aleatorias).

- II. Sensores ensamblados donde la unidad de señalización es un fluoróforo que ha perdido sus propiedades fotofísicas debido al ensamble con la unidad receptora. (Ver Esquema 1.10).



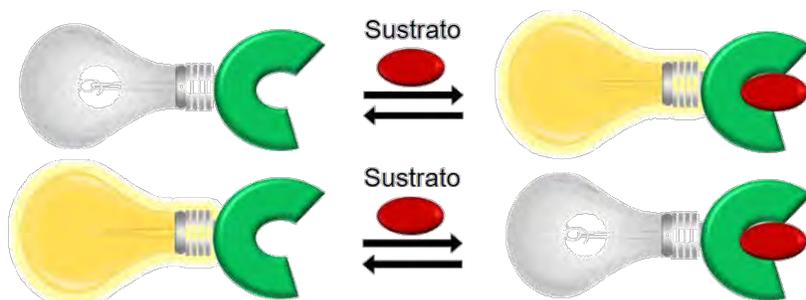
Esquema 1.10 Mecanismo de desplazamiento de fluoróforo en quimiosensores ensamblados.

- III. Sensores intrínsecos donde el fluoróforo pueden unirse reversiblemente al analito. (Ver Esquema 1.11). Estos sensores pueden ser de dos tipos. Aquellos en los que la unión del analito produce un amortiguamiento de la fluorescencia (tipo CEQ. Del inglés Chelation Enhancement of Quenching; Incremento de la Amortiguación por Quelación) o aquellos en los que se produce un incremento en la emisión (tipo CEF. Del inglés Chelation Enhancement of Fluorescence; Incremento de la Fluorescencia por Quelación).

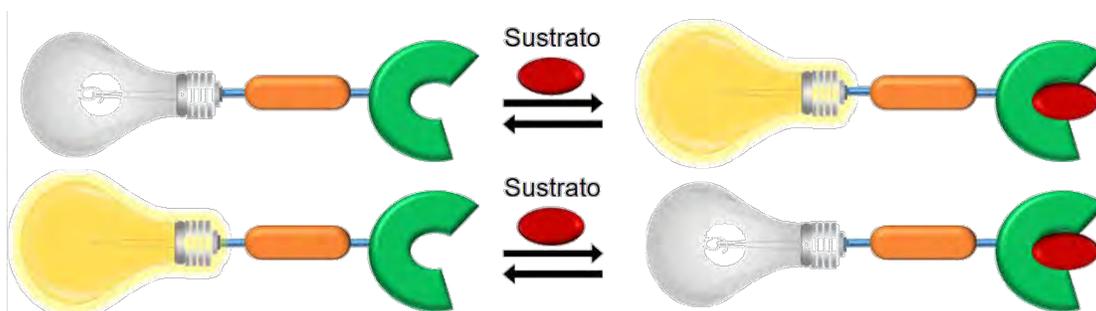


Esquema 1.11 Quimiosensores fluorogénicos intrínsecos tipo CEF y tipo CEQ, respectivamente.

- IV. Sensores cuyos fluoróforos están directamente integrados o espaciados a través de enlaces covalentes. (Ver Esquemas 1.12-1.13). Los cambios en las propiedades fotofísicas de los fluoróforos después de la interacción con el analito, se deben a una perturbación del último a través de un proceso fotoinducido, como una transferencia de energía o de carga, transferencia electrónica, formación o desaparición de un excímero. Como en el caso anterior, la fluorescencia puede que se amortigüe (CEQ) o que se incremente (CEF) después del reconocimiento.



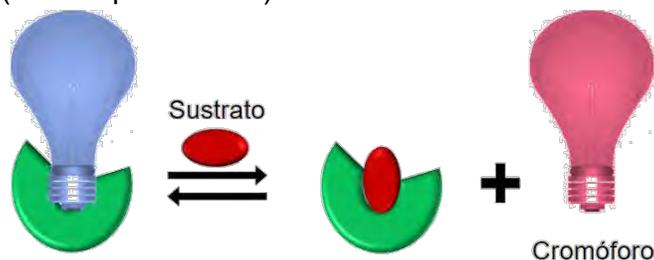
Esquema 1.12 Quimiosensores fluorogénicos directamente integrados, tipo CEF y tipo CEQ, respectivamente.



Esquema 1.13 Quimiosensores fluorogénicos directamente espaciados, tipo CEF y CEQ, respectivamente.

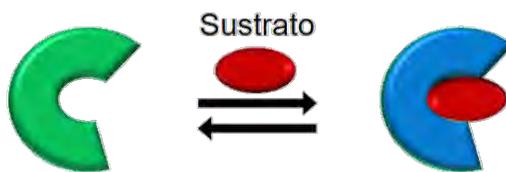
b. Quimiosensores Cromogénicos: Dispositivos que tienen la capacidad de interactuar selectiva y reversiblemente al sustrato con un cambio de color, estos pueden ser intrínsecos, conjugados o ensamblados. Se pueden dividir en tres grandes clases.

I. Sensores ensamblados donde la unidad de señalización es un cromóforo que ha modificado sus propiedades fotofísicas debido al ensamble con la unidad receptora. (Ver Esquema 1.14).



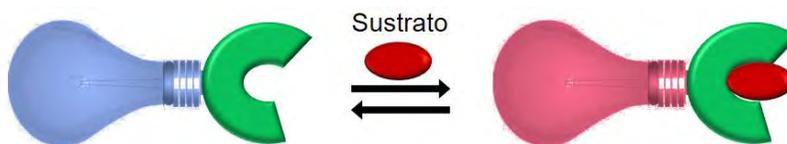
Esquema 1.14 Mecanismo de desplazamiento de cromóforo en quimiosensores ensamblados.

II. Sensores intrínsecos donde el cromóforo puede unirse reversiblemente al analito con un cambio perceptible de color. (Ver Esquema 1.15).

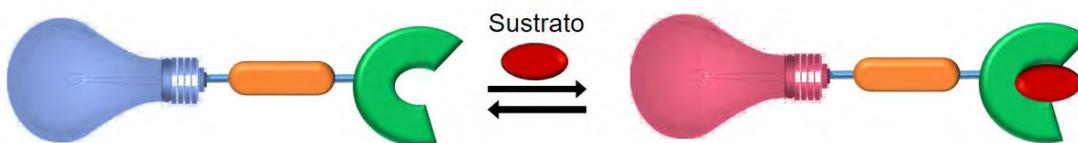


Esquema 1.15 Quimiosensor cromogénico intrínseco.

- III. Sensores cuyos cromóforos están directamente integrados o espaciados a través de enlaces covalentes. (Ver Esquemas 1.16-1.17). Los cambios en las propiedades fotofísicas de los cromóforos ocurren durante la interacción con el analito.



Esquema 1.16 Quimiosensor cromogénico directamente integrado.



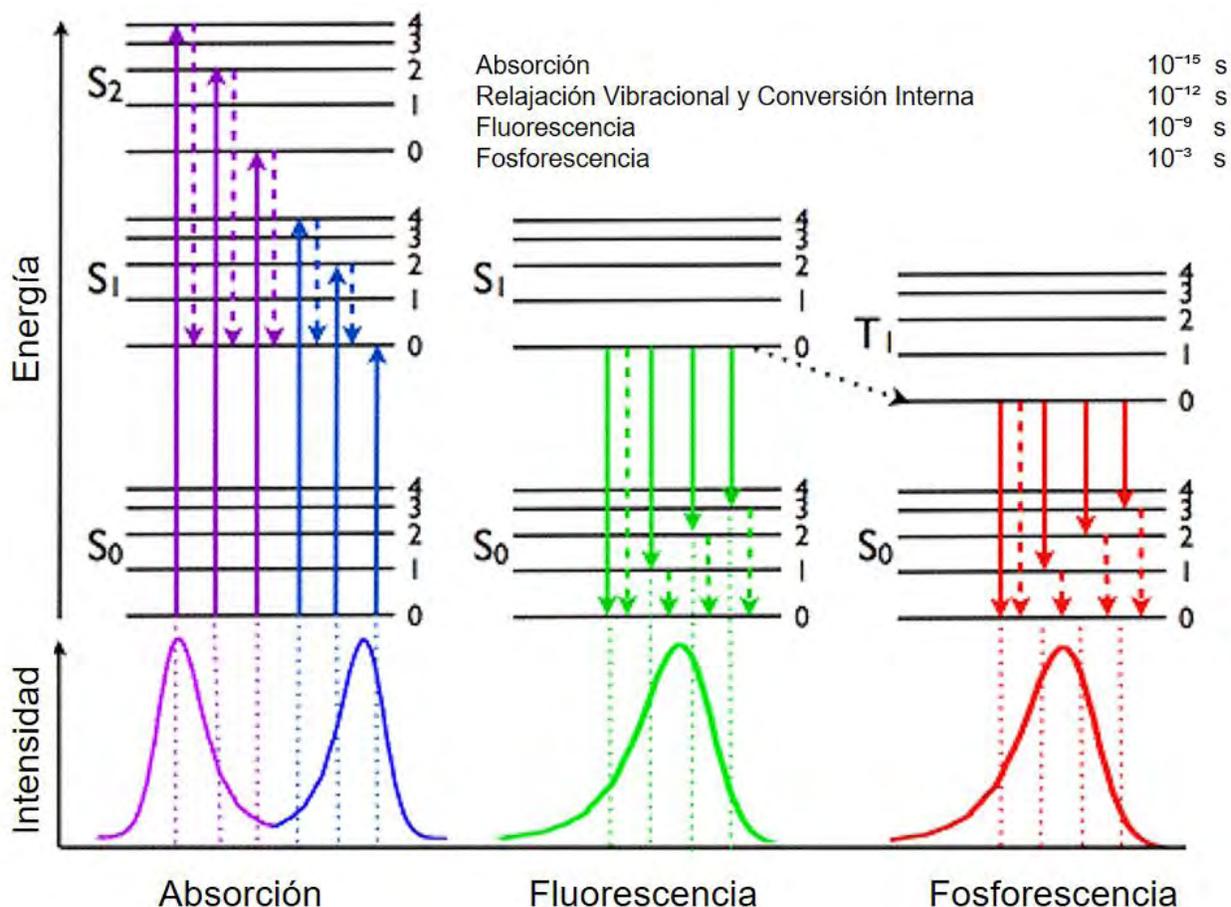
Esquema 1.17 Quimiosensor cromogénico directamente espaciado.

2. Mecanismos Fotofísicos en Quimiosensores Fluorescentes.

El término fluorescencia se incluye dentro del concepto general de luminiscencia que puede ser definido como una emisión de radiación espontánea desde un estado excitado. Si la molécula excitada tiene la misma multiplicidad que la molécula en el estado fundamental se habla de fluorescencia. Una vez que una molécula es excitada por absorción de un fotón, puede volver al estado fundamental con emisión de fluorescencia, pero también son posibles otros muchos caminos de desactivación. (Ver Esquema 1.18).

Las interacciones en el estado excitado con otras moléculas también pueden competir con la desactivación. Estos caminos de desactivación que compiten con la emisión de fluorescencia, tienen lugar en una escala de tiempo comparable con el tiempo de vida media durante el cual las moléculas están en el estado excitado. La asociación del huésped puede contribuir tanto a incrementar como a reducir la intensidad de fluorescencia y en otros casos, lo que se obtiene son desplazamientos en los máximos de emisión. Dichos desplazamientos también conducen a una variación en la intensidad de fluorescencia.

Dada la complejidad de los estados excitados no siempre resulta fácil interpretar cuál es el papel del huésped en el cambio de la emisión del quimiosensor al formarse el complejo, razón por la cual a continuación se describe brevemente los mecanismos más conocidos que conducen al cambio de emisión de los quimiosensores.



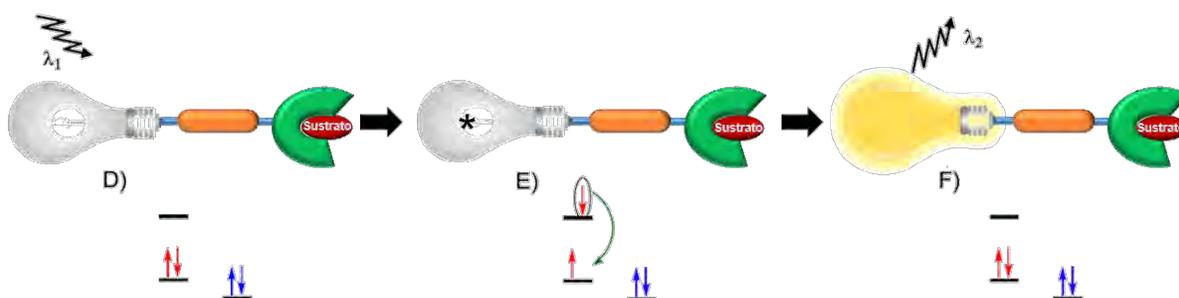
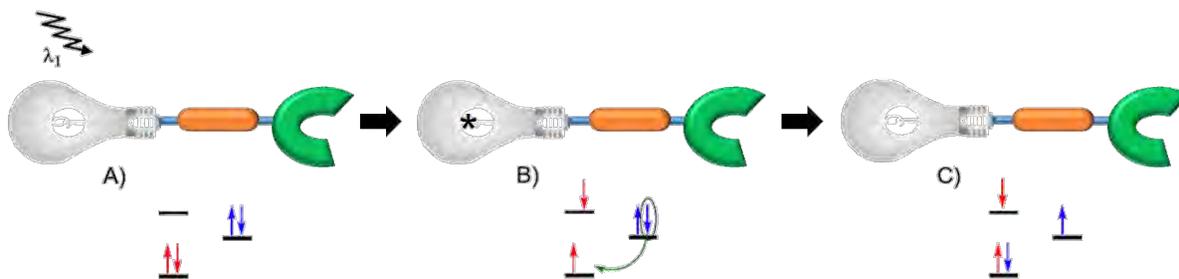
Esquema 1.18 Diagrama de Jablonski:

Representa los niveles de energía de un sistema luminescente. Las flechas continuas indican transiciones radiativas como absorción o emisión (fluorescencia y fosforescencia) de un fotón. Las flechas discontinuas representan transiciones no radiativas. La conversión interna y el cruce entre sistemas son transiciones no radiativas. Por debajo del diagrama de Jablonski se muestran los espectros típicos de absorción, fluorescencia y fosforescencia.

2.1 PET (Transferencia Electrónica Fotoinducida) y EET (Transferencia de Energía).

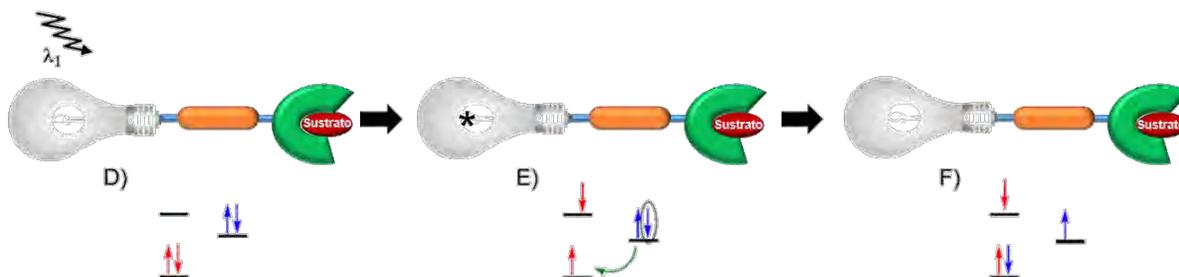
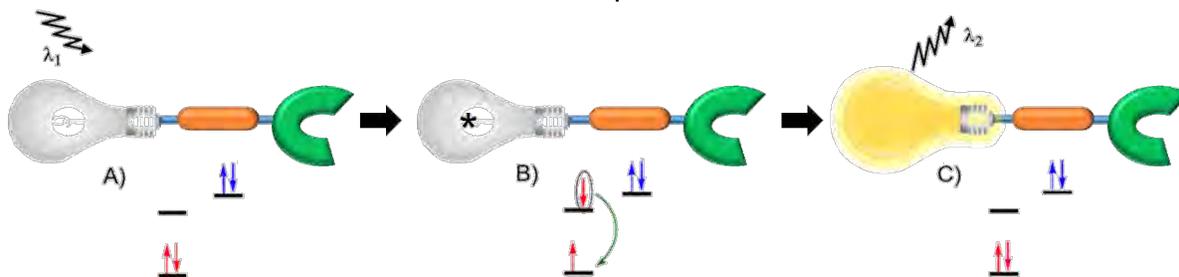
El efecto electrónico más ampliamente utilizado en el desarrollo de quimiosensores fluorescentes para propósitos de detección de cationes, aniones y moléculas neutras, es la transferencia electrónica fotoinducida, más conocida como PET (Photoinduced Electron Transfer).²⁰ El PET es un proceso de transferencia electrónica que ocurre a distancia entre una molécula en estado excitado (fluoróforo) y alguna otra especie que puede actuar como dador o aceptor (amortiguador). El proceso está controlado por las energías relativas de los orbitales HOMO-LUMO del fluoróforo y de un orbital molecular externo. En general, se pueden presentar dos casos:¹⁶⁻²¹ (Ver Esquemas 1.19-1.20).

- a. Quimiosensores tipo Off/On, donde la fluorescencia natural del fluoróforo que estaba considerablemente reducida en el receptor, se restaura tras el proceso de asociación.



Esquema 1.19 Mecanismo PET en sensores Off/On.

- b. Quimiosensores tipo On/Off, donde la asociación del analito amortigua considerablemente la fluorescencia del receptor.

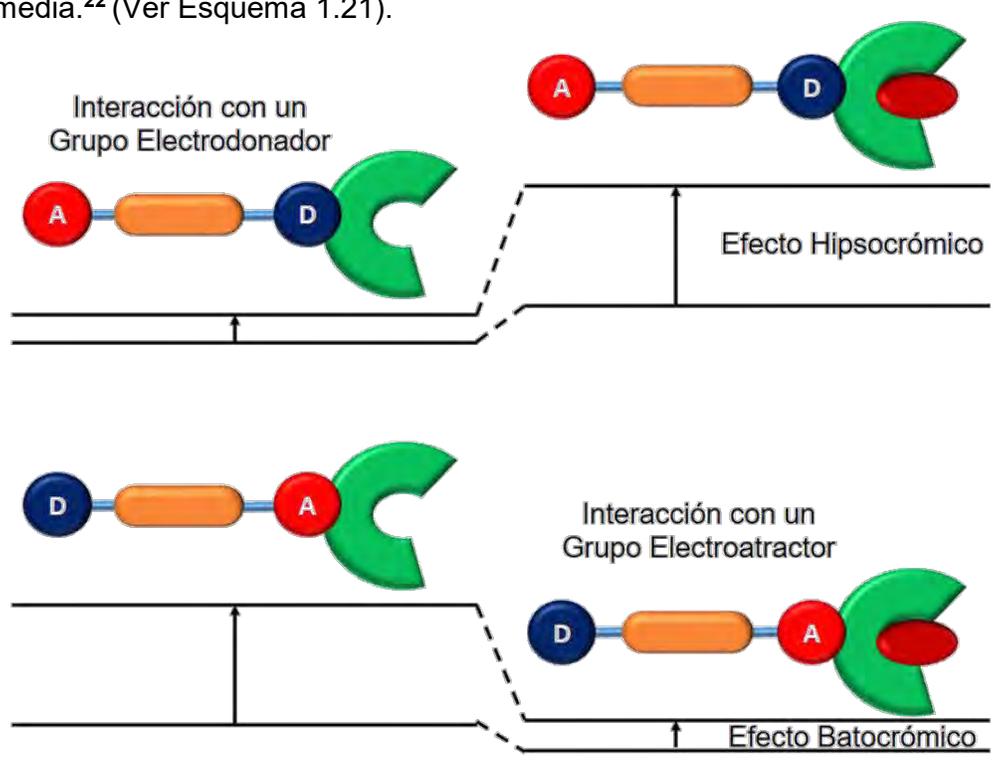


Esquema 1.20 Mecanismo PET en sensores On/Off.

Cuando el proceso en vez de secuencial es sincrónico, es decir, si ocurre un intercambio simultáneo de dos electrones del LUMO al orbital externo y de este al HOMO, se habla de desactivación por transferencia de energía (EET). Lo que se observa a nivel macroscópico es una ausencia total de fluorescencia.^{16, 20}

2.2 PCT (Transferencia de Carga Fotoinducida).

Los quimiosensores basados en transferencia de carga fotoinducida (PCT) contienen un grupo electroattractor conjugado a un grupo electrodonador. Cuando un grupo donador de electrones interacciona con un sustrato de interés, el carácter electrodonador del grupo disminuye, por lo que el espectro de absorción manifiesta un efecto hipsocrómico, una reducción en la conjugación y una disminución en el coeficiente de absortividad molar. Por el contrario, cuando el sustrato interacciona con un grupo aceptor de electrones, incrementa el carácter electroattractor del mismo, por lo que el espectro de absorción manifiesta un efecto batocrómico y un aumento en el coeficiente de absortividad molar. El espectro de fluorescencia, en principio, seguirá la misma tendencia que el espectro de absorción. Además de estos efectos, se pueden observar cambios en el rendimiento cuántico y en los tiempos de vida media.²² (Ver Esquema 1.21).

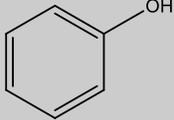
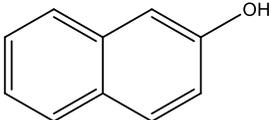
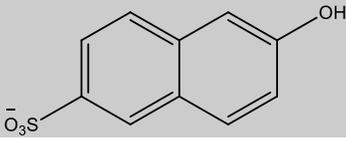
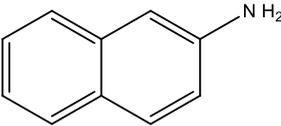
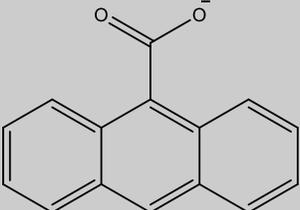
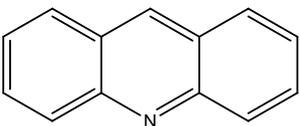


Esquema 1.21 Mecanismo de transducción del evento de reconocimiento de un sustrato mediante un quimiosensor PCT.

2.3 Transferencia de Protón Fotoinducida.

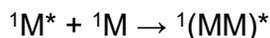
Las propiedades ácidas o básicas de una molécula que absorbe luz no son las mismas en el estado fundamental o en el estado excitado. Una posible causa para este hecho experimental puede deberse a la redistribución de la densidad electrónica dentro de la molécula al promoverse un electrón del HOMO al LUMO. Los casos más interesantes son cuando los ácidos y las bases son más fuertes en el estado excitado que en el fundamental, porque en estos casos, la excitación puede producir una transferencia de protón fotoinducida. (Ver Tabla 1.1) De este modo, el carácter ácido de un grupo donador de protones puede verse aumentado durante la excitación de manera que la constante de acidez en el estado excitado (pK^*) es mucho más grande que el pK en el estado fundamental.²³

Tabla 1.1 Diferencia entre el pK en estado basal y el pK en estado excitado (pK^*) para diversas moléculas.

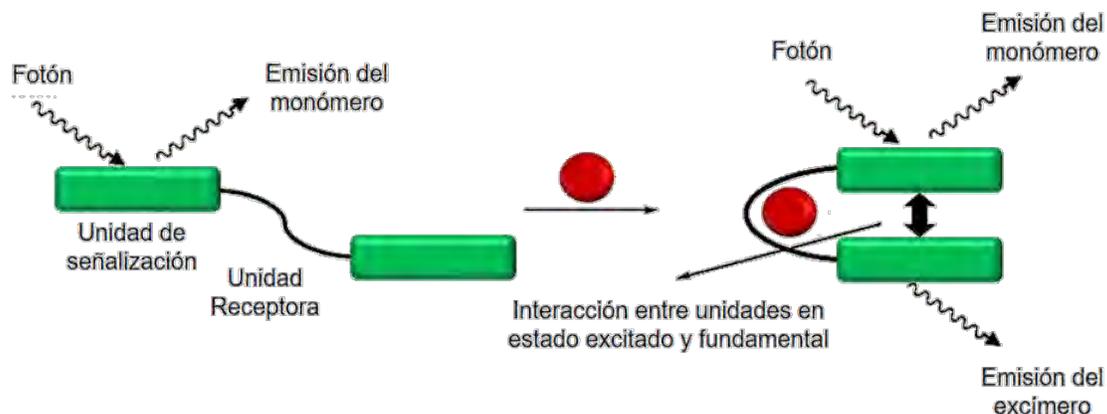
Compuesto	Estructura	pK	pK^*
Fenol		10.6	3.6
2-naftol		9.3	2.8
2-naftol-6-sulfonato		9.12	1.66
2-naftilamina		7.1	12.2
Antraceno-9-carboxilato		3.7	6.9
Acridina		5.5	10.6

2.4 Formación de Excímeros.

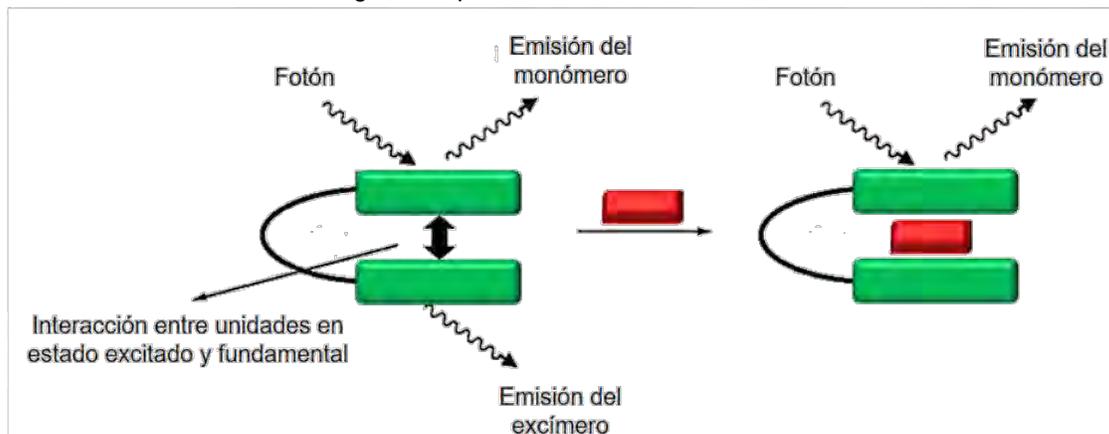
Un excímero es un dímero que se forma en el estado excitado (del inglés excited dimer). Se forma por colisión entre una molécula excitada y una molécula idéntica no excitada:



La representación simbólica $(MM)^*$ intenta describir que la energía de excitación está deslocalizada sobre los dos monómeros. Una vez que se relaja la molécula, el excímero se disocia. La banda correspondiente a un excímero se localiza a λ mayores que la correspondiente al monómero y además nunca exhibe bandas vibrónicas. Los sensores basados en la formación de excímeros se caracteriza por la presencia de dos fluoróforos presentes en la misma molécula que interactúan entre sí por apilamiento π . Podemos describir dos aproximaciones para el diseño de sensores basados en la formación Intramolecular de excímeros.¹⁶⁻²⁴ (Ver Esquemas 1.22-1.23).



Esquema 1.22 La interacción del sustrato induce la aproximación espacial entre los fluoróforos con la consiguiente aparición de la banda del excímero.



Esquema 1.23 La interacción del sustrato impide la interacción entre los fluoróforos con la consiguiente desaparición de la banda del excímero.

SECCIÓN B. INTERACCIONES EN QUÍMICA SUPRAMOLECULAR.

Las especies supramoleculares se mantienen unidas mediante una gran variedad de interacciones no covalentes. En términos generales estas son de menor fuerza comparándolas con un enlace covalente alcanzando valores de enlace entre 2-300kJ mol⁻¹, mientras los enlaces covalentes se encuentran entre 150-450kJmol⁻¹. Este grupo de interacciones no covalentes o también mencionadas en algunas ocasiones como interacciones supramoleculares fueron reconocidas por primera vez por van der Waals en el siglo XIX. (Ver Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Sumario de interacciones supramoleculares.²⁵

Interacción	Energía kJmol ⁻¹	Direccionalidad	Ejemplo
Ión-Ion	200-300	No direccional	Cloruro de tetrabutilamonio
Ión-Dipolo	50-200	Moderadamente direccional	Na ⁺ - [15]corona-5
Dipolo-Dipolo	5-50	Moderadamente direccional	Acetona
Enlace de Hidrógeno	4-120	Direccional	Agua, ácido acético
Enlace de Halógeno	10-50	Direccional	CF ₃ I-Py, S ₈ -CHI ₃
Catión-π	5-80	Direccional	K ⁺ en benceno
Anión-π	2-40	Direccional	I ⁻ -C ₆ F ₆
π-π	0-50	Moderadamente direccional	Grafito, ADN, benceno, pireno
van der Waals	< 5	No direccional	Argón, empaquetamiento molecular cristalino
Enlace de Coordinación	100-300	Direccional	Py-Metal

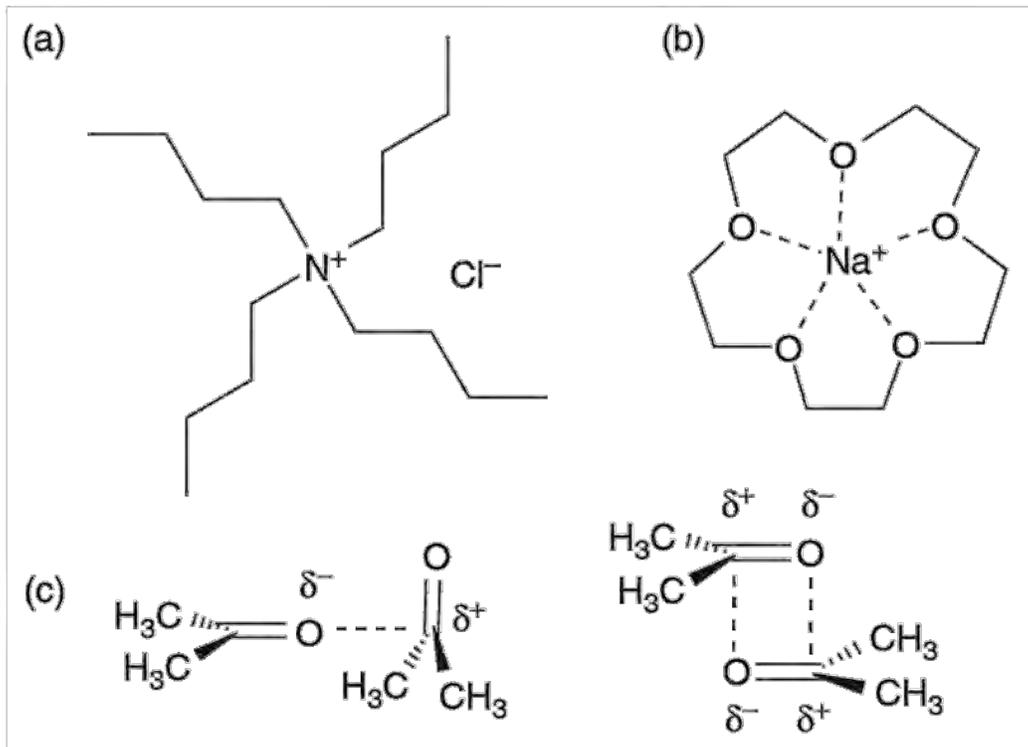
1. Interacciones no covalentes.

Las interacciones intermoleculares constituyen la base de los procesos de autoensamblaje supramolecular, tanto en sistemas biológicos como sintéticos. Por consiguiente, para poder diseñar sistemas artificiales con elevada eficiencia y selectividad, es importante conocer los distintos tipos de interacciones no covalentes junto con sus propiedades y características.

Los criterios para clasificar las diferentes clases de interacciones no covalentes atienden a su fuerza, direccionalidad, distancia o ángulo de enlace.²⁵

1.1 Interacciones Electroestáticas.

Las interacciones electroestáticas están fundamentadas en la ley de Coulomb y abarcan las interacciones ion-ion, ion-dipolo y dipolo-dipolo. (Ver Esquema 1.24). La atracción entre cargas de signo opuesto puede considerarse como el mayor componente de las fuerzas intermoleculares. Las interacciones ion-ion no son direccionales, mientras que sí lo son las interacciones ion-dipolo y dipolo-dipolo, puesto que el dipolo debe orientarse en una determinada dirección para maximizar la intensidad de la interacción.

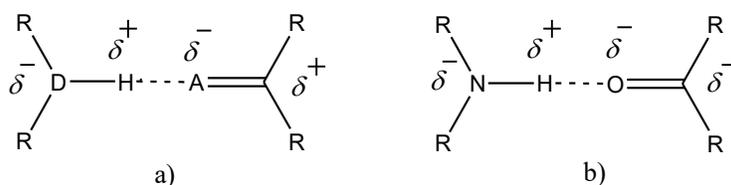


Esquema 1.24 Ejemplos de interacciones electroestáticas: (a) interacción ion-ion en cloruro de tetrabutilamonio; (b) interacción ion-dipolo en complejo Na^+ -[15]corona-5; (c) interacción dipolo-dipolo en acetona.

Las interacciones electroestáticas son consideradas de gran importancia a nivel biológico, estas son fuertemente dependientes de la distancia (r), en el caso de interacciones por par iónico depende del inverso de esta ($1/r$) y no muestran dependencia de la direccionalidad, es decir, éstas pueden ocurrir independientemente de la orientación de las especies participantes. En química supramolecular existen muchos sistemas que forman complejos estables mediante estas interacciones, ya que son la base de la actuación de muchos receptores para cationes (éteres corona, criptandos y esferandos) y aniones (macrociclos de poliaminas protonadas).²⁶

1.2 Enlace de Hidrógeno.

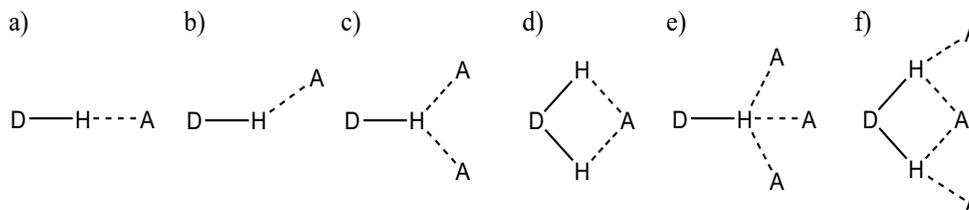
El enlace de hidrógeno es una interacción no covalente de suma importancia en la naturaleza y en los materiales. Esta se puede considerar como un caso particular de interacción dipolo-dipolo. La versatilidad de esta interacción se refleja en la gran cantidad de estructuras cristalinas descritas hasta ahora. (Ver Esquema 1.26). Un enlace de hidrógeno se forma cuando la electronegatividad de D con relación al átomo de hidrógeno H es suficiente como para atraer la densidad electrónica que forma parte del enlace covalente D-H y dejar al átomo H parcialmente desprotegido. Para que el aceptor A interactúe con el donador D este debe tener un par de electrones no compartidos o electrones π polarizables.²⁷ (Ver Esquema 1.25).



Esquema 1.25 a) Representación clásica de enlace de hidrógeno. b) Enlace de hidrógeno establecido entre un grupo carbonilo (aceptor) y un grupo amino (donador).

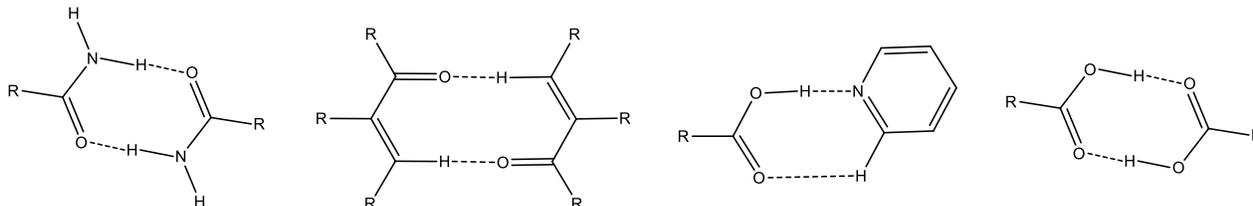
Las estructuras cristalinas ofrecen un excelente medio para estudiar los enlaces de hidrógeno. La gran cantidad de estructuras encontradas en la Cambridge Structural Database son una fuente abundante de información. De esta forma se ha encontrado que no sólo los enlaces de hidrógeno (aquéllos formados por dadores electroattractores y aceptores electronegativos, como O-H \cdots O, N-H \cdots O, etc.), sino que interacciones más débiles del tipo C-H \cdots O tienen una direccionalidad muy marcada. M. Etter²⁸ concretó una serie de reglas para el empaquetamiento de moléculas mediante enlaces de hidrógeno:

1. Todos los buenos donadores y aceptores formarán enlaces de hidrógeno.
2. Enlaces de hidrógeno intramoleculares formando anillos de seis miembros, prevalecen sobre la formación de enlaces intermoleculares.
3. Los mejores donadores y aceptores formarán enlaces de hidrógeno intermoleculares.



Esquema 1.26 Geometrías en enlaces de hidrógeno. a) Lineal. b) Doblada. c) Donador bifurcado. d) Aceptor bifurcado. e) Trifurcado. f) Triple centro bifurcado.

G. R. Desiraju también encuentra patrones fijos de asociaciones por interacciones débiles entre grupos funcionales, a los que denomina “sintones supramoleculares”. Los sintones consisten en fragmentos moleculares que incluyen las asociaciones supramoleculares entre ellos. El Esquema 1.27, muestra algunos ejemplos de sintones supramoleculares.²⁹



Esquema 1.27 Sintones supramoleculares representativos.

Los investigadores que estudian al enlace de hidrógeno por espectroscopia de infrarrojo, Raman y de microondas, pueden dar una definición con base en sus efectos sobre las vibraciones moleculares. En RMN se observa un desplazamiento de la señal química provocada por el cambio en el ambiente electrónico alrededor del protón. En difracción de rayos X o de neutrones se observan características geométricas de los enlaces, como ángulos y distancias. Los termodinámicos miden energías de enlace de hidrógeno, las calculan teóricamente y determinan las configuraciones asociadas con la misma energía. Todas estas propiedades proveen criterios para clasificar los enlaces de hidrógeno tal y como se muestra en la siguiente Tabla 1.3.²⁷

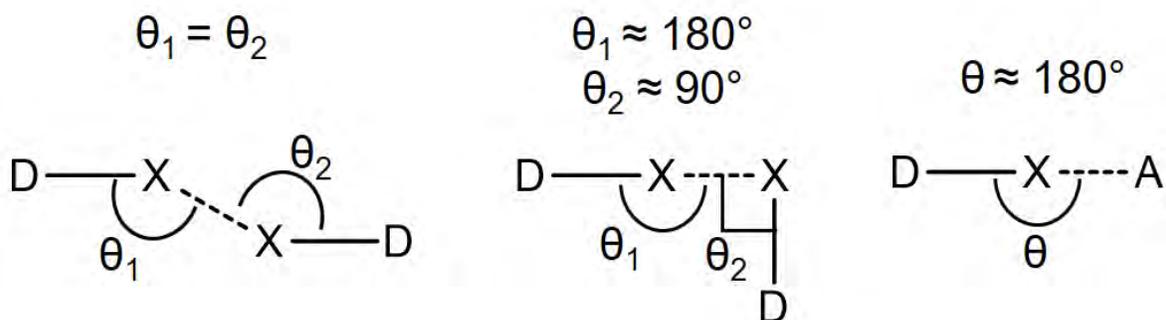
Tabla 1.3 Propiedades del enlace de hidrógeno.²⁷

	Fuerte	Moderado	Débil
Interacción D-H...A	Mayoritariamente covalente	Mayoritariamente electrostático	Electrostático
Longitud de Enlace	D-H \approx H...A	D-H < H...A	D-H \ll H...A
H...A (Å)	~1.2-1.5	~1.5-2.2	2.2-3.2
D...A (Å)	2.2-2.5	2.5-3.2	3.2-4.0
Ángulo de Enlace (°)	175-180	130-180	90-150
Energía de Enlace (kJ/mol)	60-120	16-60	<12
Desplazamiento Relativo en Banda de IR	25%	10-25%	<10%
Desplazamiento señal ¹H a campo bajo (ppm)	14-22	<14	-
Ejemplo	-Eponja de protones. -Complejos con HF.	-Ácidos, alcoholes y fenoles. -Moléculas biológicas.	-Dímeros en fase gas con ácidos o bases débiles. -C-H...O/N

El entendimiento de la naturaleza de los enlaces de hidrógeno ha permitido diseñar sistemas supramoleculares con importantes aplicaciones, por lo que el enlace de hidrógeno es considerado como la interacción intermolecular más importante de la química supramolecular.

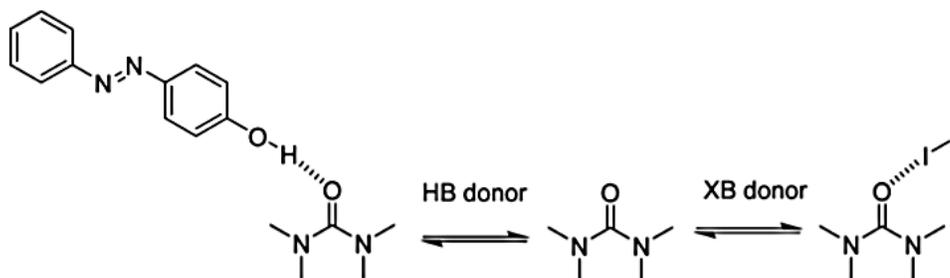
1.3 Enlace de Halógeno.

El enlace de halógeno se refiere específicamente a cuando el halógeno actúa como una especie electrofílica, es una interacción no covalente que se produce entre un átomo de halógeno (ácido de Lewis) y una base de Lewis.³⁰ Una interacción de enlace de halógeno se caracteriza por una interacción $D-X\cdots A$ entre un donador halógeno ($D-X$) y un aceptor (A), en el que la distancia internuclear es menor que la suma de sus radios de Waals. La interacción $D-X\cdots A$ es típicamente colineal con el enlace covalente ($D-X$): en efecto, en la fase gaseosa, el ángulo entre los componentes es normalmente de al menos 175° (aunque hay desviaciones como resultado de interacciones secundarias o efectos del empaquetamiento cristalino. (Ver Esquema 1.28).



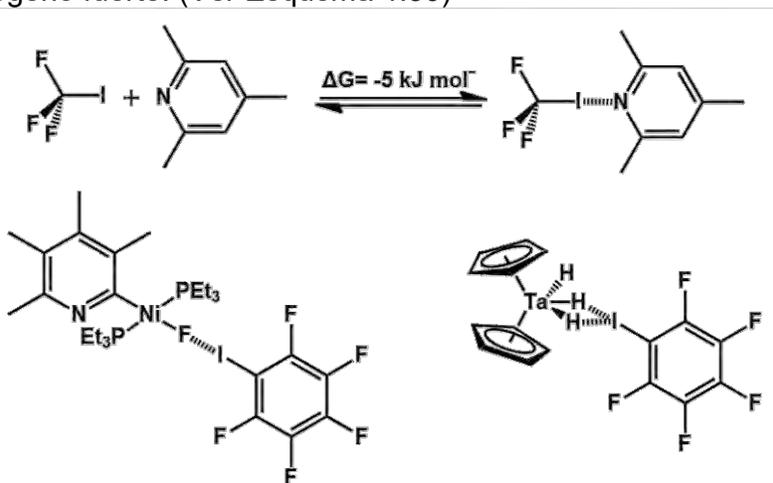
Esquema 1.28 Geometrías más comunes del enlace halógeno, donde X= halógeno, D= C, N, O, halógeno, y A= Base de Lewis neutra (N, O, S, Se) o aniónica. (Cl^- , Br^- , I^-).

$D-X\cdots A$ es comparable en fuerza (hasta 200 kJ/mol) a las interacciones intermoleculares más conocidas como el enlace de hidrógeno. Tendencias similares en propiedades energéticas y geométricas se encuentran para el enlace de hidrógeno y el enlace halógeno. (Ver Esquema 1.29). Los átomos de halógeno son más grandes que los átomos de hidrógeno, sin embargo, las interacciones $D-X\cdots$ Aceptor pueden ser más sensibles al volumen estérico y/o interacciones secundarias. Además, la fuerza de los enlaces de halógeno puede ser modulada mediante la variación del átomo de halógeno y del sustituyente al que está unido covalentemente: un aumento en la capacidad de retirar electrones del sustituyente es proporcional a un aumento en la fuerza de donadores de enlaces de halógeno.



Esquema 1.29 Complejos formados entre tetrametilurea y un donador de enlace de hidrógeno (izquierda) o un donador de halógeno (derecha).³⁰

Los haluros que participan en el enlace de halógeno son: yodo (I), bromo (Br), cloro (Cl) y a veces flúor (F). Los cuatro halógenos son capaces de actuar como donadores (como se demuestra a través de datos teóricos y experimentales) y siguen la tendencia general: $F < Cl < Br < I$, donde el yodo normalmente forma los enlaces más fuertes. Los dihalógenos (I_2 , Br_2 , Cl_2 , F_2) tienden a formar enlaces de halógeno fuertes. La fuerza y la eficacia de cloro y flúor en la formación de enlaces de halógeno dependen de la naturaleza del donante $D-X \cdots A$. Si el halógeno está unido a un fragmento D electronegativo, está más favorecido a que forme un enlace de halógeno fuerte. (Ver Esquema 1.30)



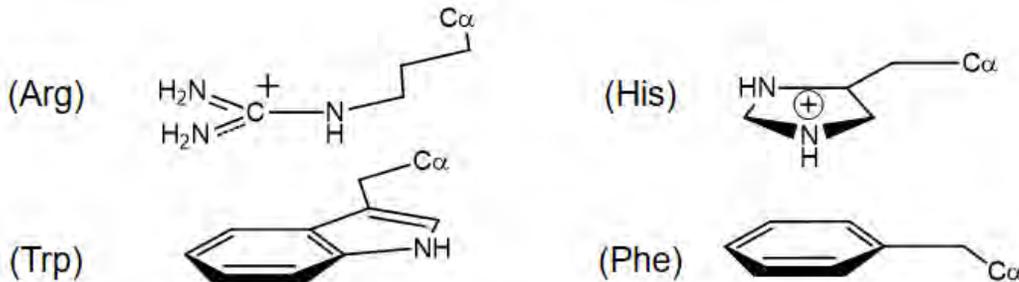
Esquema 1.30 Enlace de halógeno ($D-X \cdots A$) entre 2,4,6-trimetilpiridina y trifluoriodometano en ciclohexano (arriba); Enlace de halógeno neutro para especies organometálicas en disolución de tolueno (abajo).³⁰

En resumen, los enlaces de halógeno son interacciones “fuertes” comparables con las interacciones de enlace de hidrógeno, son interacciones específicas y direccionales que dan lugar a estructuras muy bien definidas. Los enlaces de halógeno van desde 5 hasta 180 kJ/mol; tienden a formar ángulos de 180° o muy cercanos a éste valor. Otro factor que contribuye a la fuerza del enlace de halógeno proviene de la corta distancia entre el halógeno (ácido de Lewis, $D-X$) y base de Lewis (aceptador, A). La interacción $D-X \cdots A$ se vuelve más fuerte a medida que la distancia entre ellos disminuye.

1.4 Interacciones π .

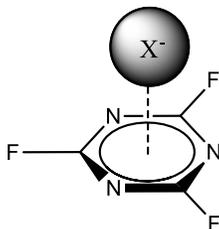
Las interacciones π son fundamentales para eventos biológicos tales como reconocimiento de proteína-sustrato; son de naturaleza no covalente y estas involucran sistemas π . Al igual que en una interacción electrostática donde existe una entidad con carga negativa que interactúa con una carga positiva, un sistema π rico en electrones puede interactuar con otro sistema π , un metal (catión o neutro), un anión u otra molécula. Las interacciones π se pueden clasificar en anión- π , catión- π y apilamiento π - π .³¹ (Ver Esquemas 1.31-1.34).

Los sistemas catión- π implican una interacción de un catión a un grupo de electrones π como los de las moléculas de benceno o acetileno. Estas interacciones se consideran electrostáticas con un componente de polarización. Por ejemplo, el benceno posee un momento cuadrupolar permanente que define regiones de carga negativa relativa por encima y debajo del plano aromático de la molécula, por lo que el catión experimenta una atracción favorable por la región negativa mediante interacciones electrostáticas.³²



Esquema 1.31 Interacciones catión- π en estructuras biológicas.

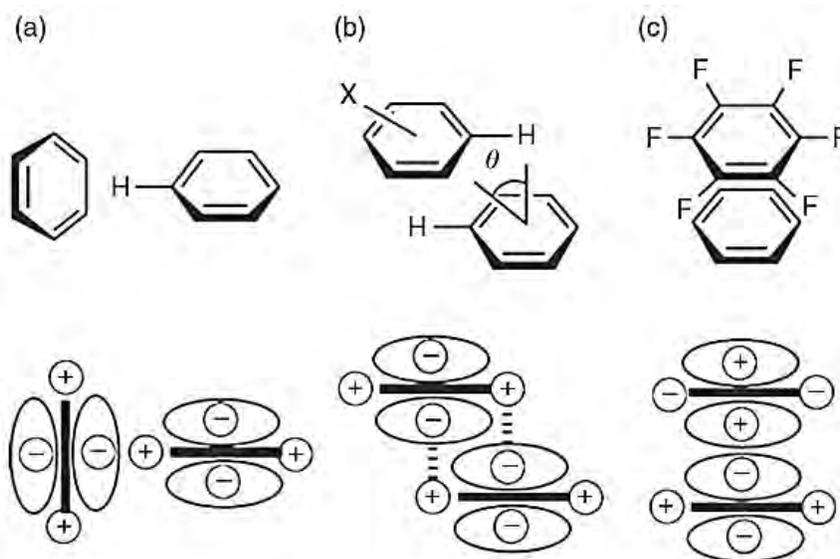
A diferencia de la interacción catión- π , la interacción anión- π es poco intuitiva porque se presupone que los aniones exhiben una repulsión por sistemas aromáticos. A través de estudios teóricos se ha demostrado que las superficies aromáticas deficientes en densidad electrónica (hexafluorobenceno) interactúan favorablemente con aniones, con energías de enlace muy débiles. Diversos ejemplos se pueden extraer de la Cambridge Structural Database, donde hay varios aniones que interactúan con árenos o aminopiridinas.³³



Esquema 1.32 Representación clásica de una interacción anión- π .

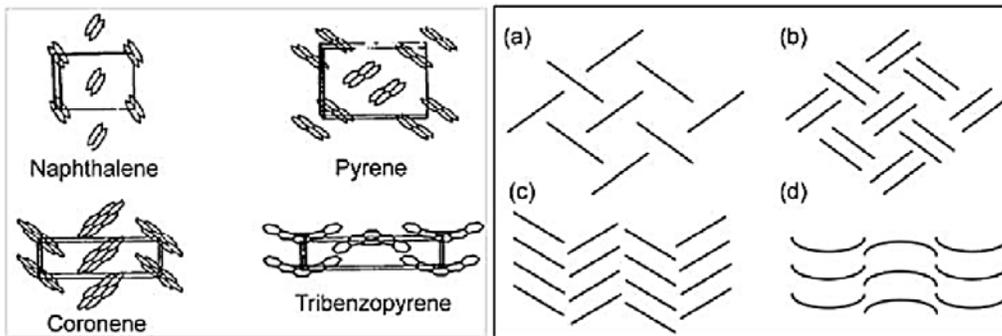
El apilamiento π - π es una interacción débil que ocurre entre anillos aromáticos. Estas son de gran importancia en diferentes niveles y ejemplo de ello son las observadas en diferentes procesos biológicos como el plegamiento de proteínas y la estructura tridimensional del ADN. Se considera que existen tres tipos de orientaciones o conformaciones que generan un apilamiento favorable entre anillos aromáticos: apilamiento desplazado cara-cara, apilamiento eclipsado cara-cara y apilamiento cara-borde. Estas interacciones son débiles, por ejemplo, la interacción de un par de moléculas de benceno ha sido calculada en 2.2 kJ/mol.³⁰

En un sistema π - π , la densidad de carga negativa de la nube de electrones π puede provocar repulsión entre anillos en el acomodo cara-cara, sin embargo, cuando las unidades aromáticas están desplazadas de tal forma que las cargas positivas de estas queden en posición correcta, se puede ejercer una fuerza atractiva con el sistema π . Sustituyentes electroattractores favorecen la conformación desplazada o eclipsada, estas conformaciones dependerán del número de sustituyentes en el anillo aromático. (Ver Esquema 1.33).



Esquema 1.33 Apilamientos presentes en los sistemas aromáticos. a) Cara-Borde, b) Desplazado Cara-Cara y c) Eclipsado Cara-Cara.

La literatura ofrece numerosos ejemplos supramoleculares que interactúan por apilamiento π . La separación entre plano-plano en apilamiento desplazado cara-cara y apilamiento eclipsado cara-cara es comúnmente de entre 3.3-3-8 Å, para apilamiento cara-borde suele tomarse como referencia 5 Å. Existen cuatro sistemas de empaquetamiento que surgen de asociaciones entre moléculas aromáticas.³⁴ (Ver Esquema 1.34).



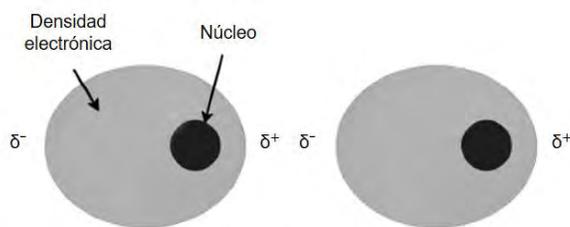
Esquema 1.34 Los cuatro principales sistemas de empaquetamiento en moléculas aromáticas.³⁴

Los sistemas heteroaromáticos (O, N y S incorporados en la estructura) son más propensos a presentar estas interacciones, debido a que se observa un incremento en la deslocalización de electrones en el sistema y se favorecen las conformaciones desplazadas, la polarización de estas moléculas puede ser ligeramente diferentes entre sí en función del número y la posición del heteroátomo en el sistema aromático, estudios revelan que existe un ajuste de la polarización que contribuye y favorece más la interacción de apilamiento desplazado cara-cara y esto se observa en las estructuras de piridina en comparación con los diazobencenos (piridazina, pirimidina y pirazina), y también es comparable a los sistemas de anillos fusionados de quinolina y los naftalenos diazo (ftalazina, quinazolina y quinoxalina); de igual forma las cargas netas presentes en estos sistemas influyen en su geometría y energía.

1.5 Fuerzas de van der Waals.

La primera evidencia sobre la existencia de este tipo de interacción fue reportada por Johannes Diderik van der Waals en 1873. Estas interacciones incluyen tres diferentes tipos de asociación entre dipolos y surgen a partir de las fluctuaciones de la distribución de electrones entre dos especies que se encuentran cercanas. La fuerza de estas interacciones es dependiente de la polarizabilidad de las moléculas que participan, siendo las más polarizables las que forman interacciones más fuertes y su dependencia de la distancia (r) es expresada como $1/r^6$.³⁵

Cuando las moléculas que están interactuando a cierta distancia poseen dipolos permanentes y alinean esos dipolos de forma atractiva se conocen como interacciones de Keesom, por otra parte, cuando una molécula con un dipolo permanente induce un dipolo en otra cercana se conocen como interacción de Debye.



Esquema 1.35 Interacción de London entre dos átomos de Argón.³⁵

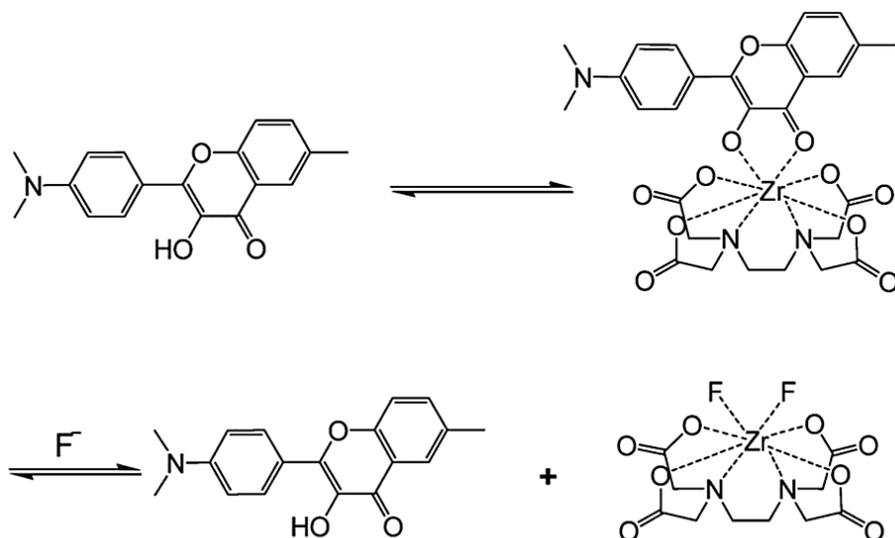
La interacción entre dos moléculas no polares, pero polarizables es conocida como interacción de London. (Ver Esquema 1.35). En química supramolecular, específicamente en sistemas anfitrión-huésped, estas interacciones juegan roles importantes.

2. Enlace de Coordinación.

El enlace de coordinación, es una interacción que se puede considerar de frontera, entre el modelo covalente y el modelo electrostático, la interacción ocurre cuando una base de Lewis dona un par de electrones a un ácido de Lewis. Es de fuerza intermedia y reversible.

Los enlaces de coordinación aportan funcionalidad a las estructuras supramoleculares provocando variaciones en las propiedades ópticas y magnéticas, a través de la coordinación de iones metálicos en ligantes.

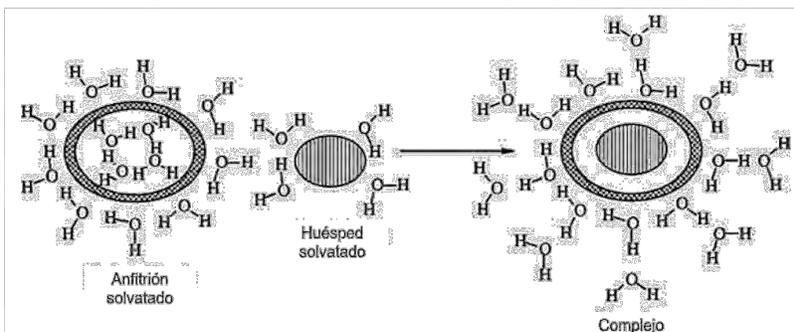
Un complejo de coordinación puede funcionar como quimiosensor (ver Esquema 1.36) si este presenta sitios disponibles para coordinar algún huésped o bien, presenta labilidad en sus enlaces que propician el intercambio de un ligante por un huésped.³⁶



Esquema 1.36 Quimiosensor ensamblado para detectar fluoruro. El complejo de Zr^{4+} -EDTA coordina un cromóforo derivado de 3-hidroxiflavona que posteriormente es desplazado cuando se adiciona fluoruro.

3. Efecto Hidrofóbico.

El efecto hidrofóbico se puede definir como el conjunto de factores termodinámicos que son responsables del agrupamiento de especies o dominios no polares en un medio acuoso. El efecto hidrofóbico se divide en dos componentes energéticos, el entálpico y el entrópico. El componente entálpico ocurre cuando un huésped desplaza de la cavidad de un anfitrión moléculas de disolvente, comúnmente moléculas polares como H_2O . Normalmente la cavidad del anfitrión es hidrofóbica y las moléculas del disolvente polar ubicadas dentro de la cavidad no interactúan fuertemente con los grupos situados en su superficie. Al desplazarse a la matriz del disolvente se estabilizan por interacciones con otras moléculas de disolvente, disminuyendo su energía y, por lo tanto, su entalpía. El componente entrópico relaciona los grados de libertad del sistema. El agua que se encuentra previamente interaccionando dentro de la cavidad presenta menores grados de libertad, cuando estas son desplazadas de la cavidad, por la formación del complejo huésped-anfitrión, aumentan los grados de libertad del sistema y, por lo tanto, la entropía. El proceso se puede ver en el Esquema 1.37.³⁷

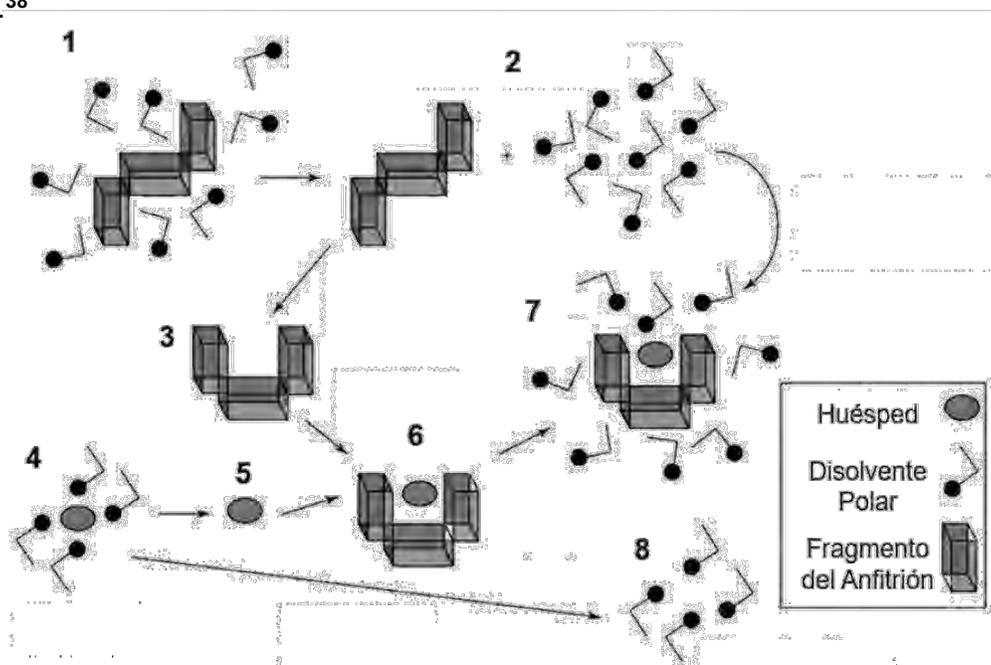


Esquema 1.37 Interacción hidrofóbica entre un huésped orgánico y un anfitrión con cavidad hidrofóbica.³⁷

4. Solvatación.

En disolución todos los fenómenos de complejación se encuentran en competencia con la solvatación, esto se debe a que el disolvente se encuentra en un exceso enorme. Los disolventes polares, en particular el agua, compiten de manera muy eficaz por los sitios de unión de un anfitrión, en particular por enlaces de coordinación y enlaces de hidrógeno. Por lo tanto, la solvatación del huésped y/o del anfitrión puede tener un efecto muy marcado sobre la dinámica y energética de la asociación. Con el fin de que el fenómeno de asociación ocurra, deben romperse muchas interacciones entre el disolvente y los solutos (huésped y anfitrión) lo que tiene consecuencias tanto entálpicas y entrópicas. Este proceso de eliminación de disolvente se muestra de una manera simplificada en el Esquema 1.38.

Entálpicamente, el proceso estará favorecido si la energía gastada para romper las interacciones del disolvente con los solutos (anfitrión y huésped) es mucho menor que la energía liberada por las interacciones que se forman por la asociación huésped-anfitrión. La eliminación de moléculas de disolvente desde el anfitrión y el huésped conduce a las moléculas de disolvente a un mayor número de grados de libertad en la disolución, lo que aumenta la entropía y también conduce a la formación de interacciones disolvente-disolvente. La elección del disolvente puede tener consecuencias significativas en la unión de un huésped.³⁸



Esquema 1.38 Proceso de solvatación durante la formación de complejos huésped-anfitrión.³⁸

En el Esquema 1.38 podemos observar los diferentes fenómenos termodinámicos que participan en el proceso de solvatación y formación de complejos huésped-anfitrión:

1. Anfitrión solvatado (interacciones hidrófobas y van der Waals).
2. Anfitrión desolvatado (entálpicamente desfavorable, entrópicamente favorable).
3. Arreglo conformacional del anfitrión (entálpicamente y entrópicamente desfavorable). Inecesario para anfitriones preorganizados.
4. Huésped solvatado (interacciones hidrófilicas).
5. Huésped desolvatado (entálpicamente desfavorable, entrópicamente favorable).
6. Formación del complejo huésped-anfitrión (entálpicamente favorable).
7. Solvatación del complejo huésped-anfitrión (entálpicamente y entrópicamente favorable).
8. Disolvente libre (entrópicamente favorable).

CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES

El reconocimiento molecular de aniones es un área de gran interés dentro de la química supramolecular, debido a que las especies aniónicas (halogenuros, nucleótidos, cofactores y sustratos de enzimas) juegan un papel importante en los procesos bioquímicos y ambientales. Si bien hay que tener algunas consideraciones muy importantes a la hora de diseñar un receptor selectivo para aniones, como lo es el tamaño, ya que, en comparación con los cationes, son más grandes y presentan una gran diversidad de geometrías. Otro parámetro importante, es el rango de pH para reconocer aniones, ya que este es muy acotado, es decir, no será igual reconocer al anión PO_4^{3-} que al HPO_4^{2-} , puesto que ni las cargas, ni la disposición de las mismas serán idénticas, sin embargo y pese a esto, a la fecha se han sintetizado muchos sistemas que han mostrado ser capaces de unir selectivamente y con gran afinidad a este tipo de huéspedes. Cabe mencionar que el conocimiento generado de estas investigaciones es la base del desarrollo de sensores y/o transportadores de estas especies con aplicaciones en análisis y separación.

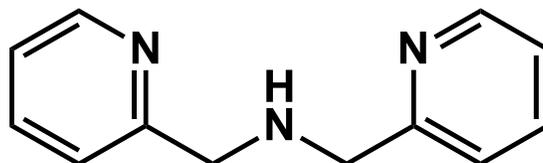
Un área que ha recibido gran atención es el reconocimiento dirigido hacia nucleótidos y sus derivados. Existe un gran número de sistemas capaces de unir mediante interacciones no covalentes este tipo de huéspedes, es por ello que este capítulo recopila únicamente los receptores más sobresalientes en el reconocimiento de nucleótidos. Aunque existe abundante investigación científica dirigida al reconocimiento de este tipo de huéspedes, sin embargo, es limitado el número de reportes dirigido a la quimiodetección en medios polares próticos y aún más reducida la cifra en medio únicamente acuoso (de esta manera logramos centrarnos en un determinado tipo de sensores que pueden detectar nucleótidos en disolución acuosa). El capítulo está dividido en tres apartados, cada uno describe determinado tipo de receptores en función a los grupos funcionales o fragmentos que tienen el rol de ser unidades de señalización o unidades receptoras. Los apartados comprenden a receptores inorgánicos basados en complejos de zinc (II) que contienen ligantes derivados de DPA (dipicolilamina), macrociclos que coordinan iones zinc (II) o cobre (II) y compuestos de coordinación de cobre que contienen ligantes IDA (iminodiacetato).

RECEPTORES ARTIFICIALES PARA MOLÉCULAS FOSFORILADAS.

Los fosfatos son uno de los componentes más importantes de los sistemas vivos, ejemplo de ello tenemos a los nucleótidos o nucleósidos fosfato que son los componentes principales del ADN y ARN. Además, los iones fosfato y sus derivados juegan un papel clave en la transducción y almacenamiento de energía en sistemas biológicos. Por otra parte, los fosfatos son componentes importantes de fármacos y fertilizantes. Por lo anterior, durante los últimos años, se han desarrollado receptores cromogénicos y fluorogénicos para lograr la unión selectiva de fosfato y moléculas fosforiladas. La investigación en materia de receptores de fosfato abióticos, busca proporcionar metodologías mejoradas para la detección, extracción y transporte de fosfatos con importancia biológica, química y ambiental. A continuación, se describen brevemente los receptores abióticos más sobresalientes en el reconocimiento de moléculas fosforiladas.³⁹

1. Receptores Artificiales Basados en Complejos DPA-Zinc (II).

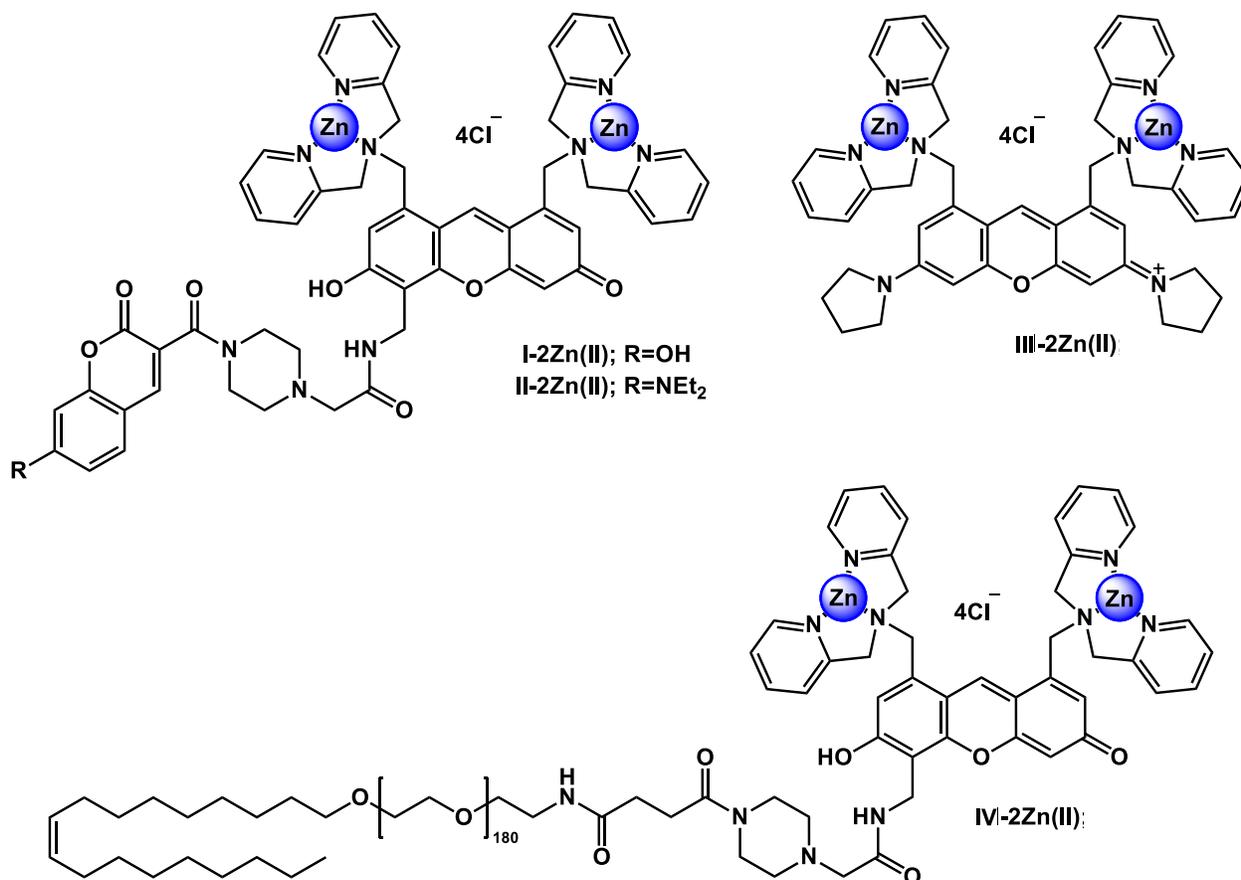
El zinc (II) está presente en sitios activos de diversas metaloenzimas, los aniones fosfato son sustratos o inhibidores de estas metaloenzimas a causa de su tendencia a unirse de forma reversible a uno o más iones de zinc (II) localizados en el grupo prostético de la enzima. Los ejemplos incluyen, las fosfatasas alcalinas en el que dos iones de zinc (II) se encuentran en las proximidades para enlazar e hidrolizar el enlace éster fosfato en monoésteres de fosfato, otro ejemplo son las nucleasas P1 que se encargan de hidrolizar el enlace fosfodiéster en el ARN o ADN de una sola cadena, el sitio activo de estas nucleasas contienen tres iones de zinc (II) que actúan cooperativamente en el proceso de unión e hidrólisis del sustrato.⁴⁰ Por esta razón, es que los receptores sintéticos basados en complejos de zinc (II) son populares en el reconocimiento molecular, además suelen ocuparse como quimiosensores ópticos, debido a que el zinc (II) es biológicamente compatible, no es un redox activo en condiciones fisiológicas y en el caso de quimiosensores fluorogénicos, no extingue la fluorescencia.⁴¹



Esquema 2.1 Dipicolilamina (DPA).

El quelante más popular para coordinar zinc (II) es la dipicolilamina (DPA) (ver Esquema 2.1), este forma complejos estables con constantes de asociación alrededor de 10^7 M^{-1} en agua, dejando uno o dos sitios vacantes para coordinar huéspedes neutros o aniónicos. El quelante es selectivo para zinc (II) sobre otros iones biológicos como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ y Ca^{2+} .⁴²

Hamachi es uno de los investigadores más activos en el área, ha reportado algunos ejemplos de complejos Zn(II)-DPA para reconocer nucleótidos. Los receptores I y II son quimiosensores fluorescentes basados en el mecanismo fotofísico tipo FRET (Transferencia de Energía por Resonancia Fluorescente).⁴³ (Ver Esquema 2.2 y Tabla 2.1). El FRET surge de la interacción entre un par de fluoróforos distintos, uno de los cuales actúa como un donador de energía desde el estado excitado hacia el otro (aceptor). Esto regresa al donador a su estado electrónico basal y la emisión puede ocurrir desde el centro del aceptor. Estos quimiosensores poseen una unidad de cumarina (donador) directamente espaciada a una unidad de xanteno (aceptor).



Esquema 2.2 Quimiosensores derivados de xanteno, diseñados para reconocer nucleótidos en condiciones fisiológicas.

En el estado no enlazante, la unidad de xanteno adopta una forma no conjugada, por lo que los quimiosensores muestran predominantemente emisión azul de la unidad de cumarina. La unión de un nucleótido induce a la recuperación de la estructura conjugada del anillo de xanteno. Este cambio estructural produce un gran solapamiento espectral entre los dos fluoróforos, provocando que los quimiosensores exhiban una fuerte emisión verde desde el xanteno debido a la eficiencia del FRET.

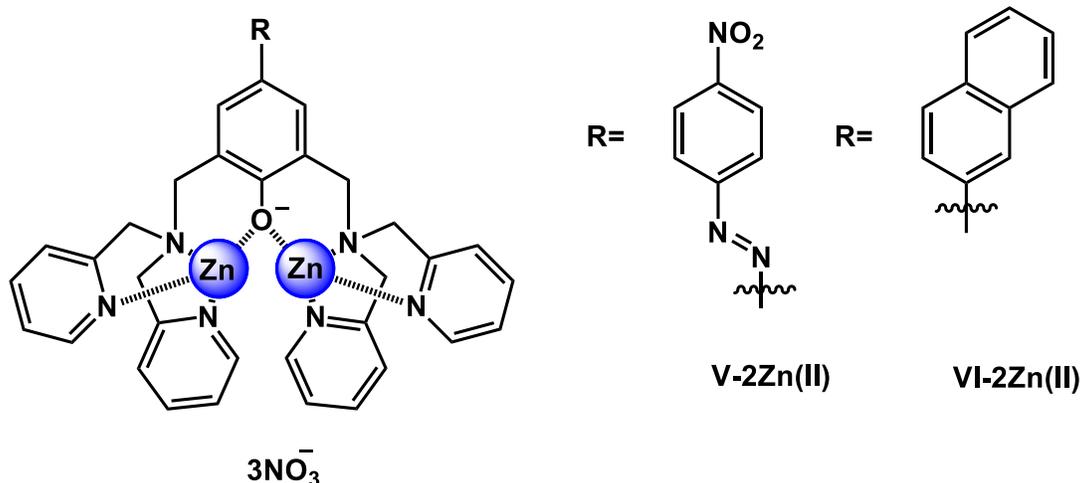
El quimiosensor **III** fue diseñado para localizar nucleótidos y pirofosfato específicamente en la mitocondria, ya que es bien conocido que los derivados de rodamina que poseen anillos de pironina localizan selectivamente en la región negativa de la matriz mitocondrial. El quimiosensor **IV** fue diseñado para localizar nucleótidos y pirofosfato de manera selectiva en la superficie de la membrana plasmática mediante la introducción de una unidad biocompatible, que posee un fragmento alquilo hidrófobo en el extremo de una larga cadena de etilenglicol.⁴⁴ (Ver Esquema 2.2 y Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Constantes de asociación aparente K_{APP} (M^{-1}) de los quimiosensores **I**, **II**, **III** y **IV**, en medio fisiológico, 50 mM HEPES, 10 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, pH 7.4, 25 °C.

	I	II	III	IV
ATP	2.9×10^6	7.3×10^6	3.5×10^6	1.3×10^5
ADP	3.6×10^6	6.6×10^6	4.1×10^6	1.8×10^5
GTP	2.0×10^6	4.5×10^6	1.7×10^7	6.6×10^5
CTP	1.4×10^6	3.3×10^6	5.1×10^6	8.8×10^5
UDP	1.2×10^6	1.8×10^6	1.2×10^6	2.7×10^5
PPi	5.2×10^6	1.3×10^7	1.9×10^7	5.6×10^5

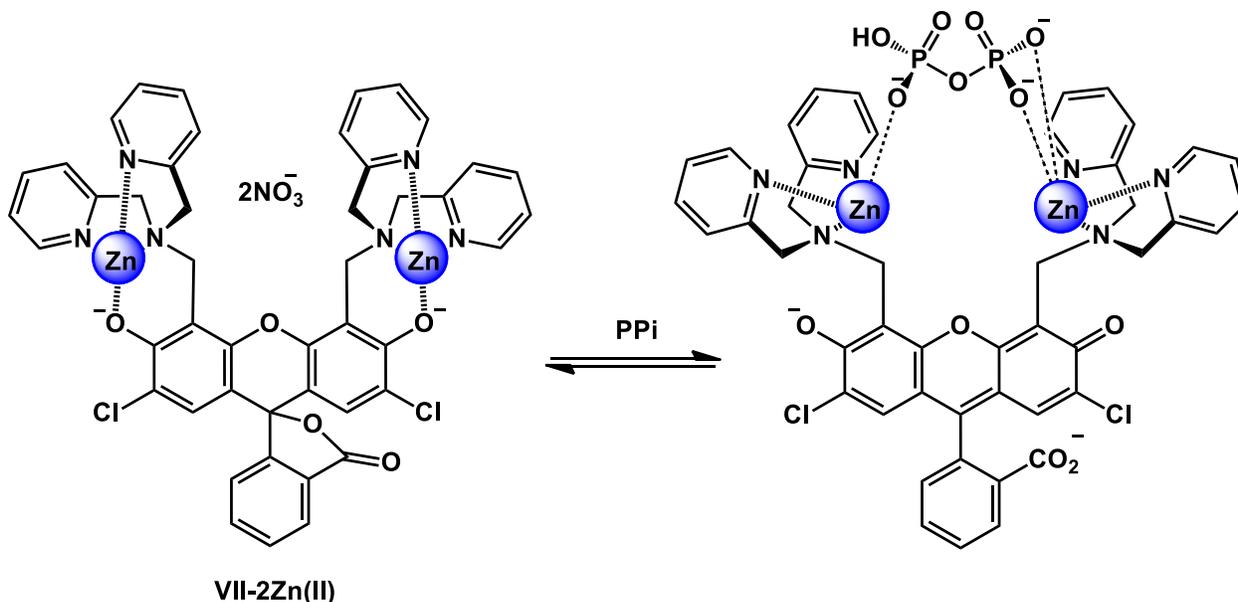
Los quimiosensores **V** y **VI** (ver Esquema 2.3) desarrollados por Hong, contienen un grupo fenóxido que preorganiza dos unidades Zn^{2+} -DPA. El fenóxido contribuye a formar una mayor conjugación entre las unidades de señalización.

El compuesto **V** es un quimiosensor colorimétrico y el compuesto **VI** es un quimiosensor fluorimétrico, ambos receptores muestran selectividad por pirofosfato en agua (pH 7.4; HEPES 10 mM, 25 °C), las constantes de asociación para **V** y **VI** son $K_A = 6.6 \pm 1.2 \times 10^8 M^{-1}$ y $K_A = 2.9 \pm 0.7 \times 10^8 M^{-1}$, respectivamente. Cuando se adiciona pirofosfato a una disolución de los quimiosensores, el espectro UV-Vis de **V** manifiesta un desplazamiento batocrómico y la emisión de fluorescencia de **VI** incrementa. En estado sólido se observa que el pirofosfato se coordina de manera tetradentada a los quimiosensores.⁴⁵



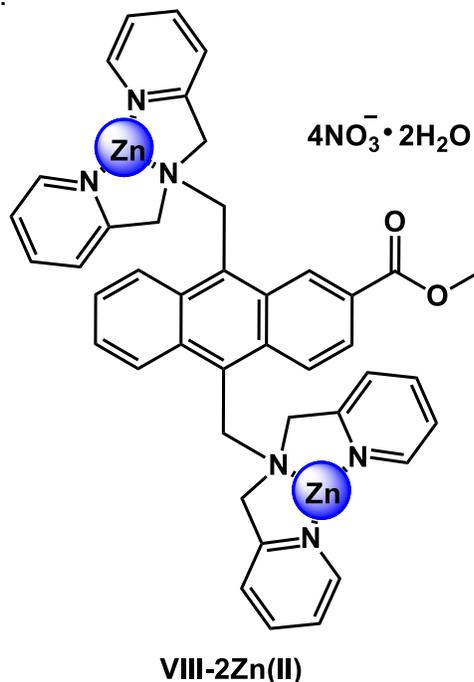
Esquema 2.3 Quimiosensores derivados de fenol, diseñados para reconocer pirofosfato en condiciones fisiológicas.

Recientemente, Yoon demostró que el receptor **VII** actúa como quimiosensor para pirofosfato en medio acuoso (20 mM HEPES, pH 7.4, 25 °C), la constante de asociación obtenida con pirofosfato es $K_A=1.68 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. (Ver Esquema 2.4). La estructura cristalina de **VII** revela que los iones zinc (II) no solo se encuentran coordinados a las unidades de DPA, también lo están a los fenóxidos adyacentes tal y como se muestra en el Esquema 2.4. La propuesta del mecanismo para enlazar pirofosfato se puede observar en el Esquema 2.4. Cuando se adiciona pirofosfato se observa que la fluorescencia de **VII** incrementa y el máximo de emisión se desplaza ligeramente hacia el rojo debido a que se rompen los enlaces de coordinación de los fenóxidos presentes en la fluoresceína.⁴⁶



Esquema 2.4 Mecanismo propuesto para la asociación de **VII** y PPI.

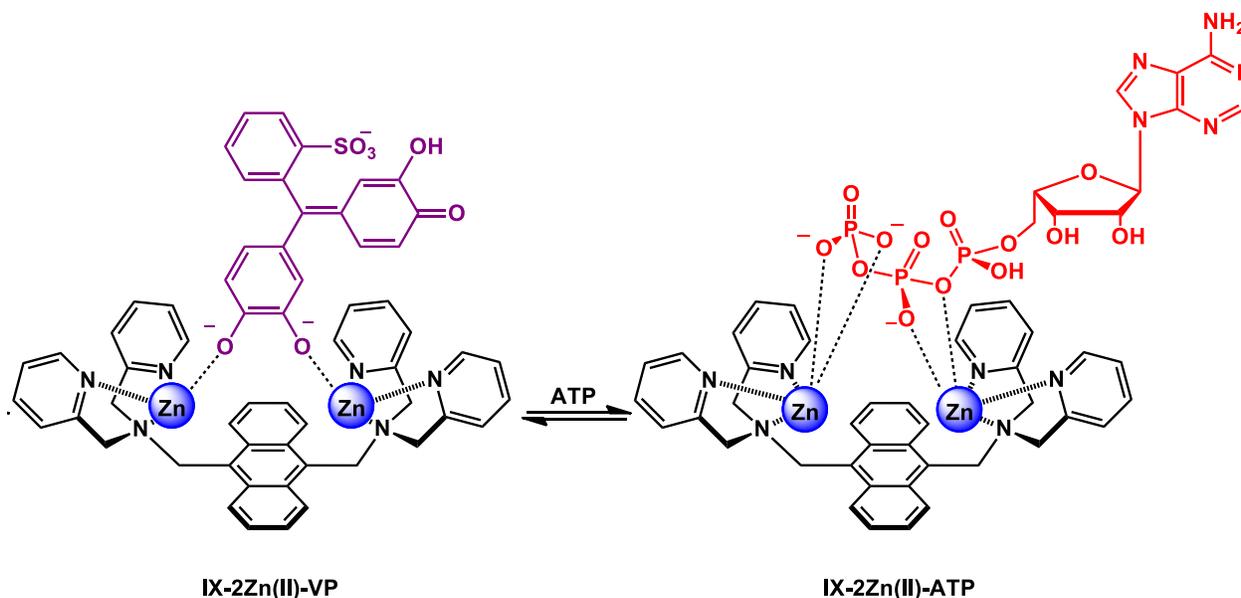
El quimiosensor **VIII** es un complejo dinuclear de zinc (II) derivado de antraceno. (Ver Esquema 2.5). En medio acuoso (10 mM HEPES, pH 7.2, 20 °C) reconoce nucleótidos de adenosina, manifestando una mayor afinidad por ATP. Las correspondientes constantes de asociación aparente K_{APP} (M^{-1}) para ATP, ADP y AMP son 2.2×10^6 , 2.2×10^5 y 6.6×10^4 , respectivamente. La adición de ATP provoca un incremento en la emisión de fluorescencia del complejo dinuclear y estudios de ^{31}P -RMN sugieren la coordinación del fósforo γ y β del ATP en el complejo dinuclear.⁴⁷



Esquema 2.5 Quimiosensor que reconoce nucleótidos derivados de adenosina en medio acuoso.

Los quimiosensor **IX**, **X** y **XI** son receptores dinucleares de zinc (II) ensamblados que pueden detectar exitosamente nucleótidos en disolución acuosa.

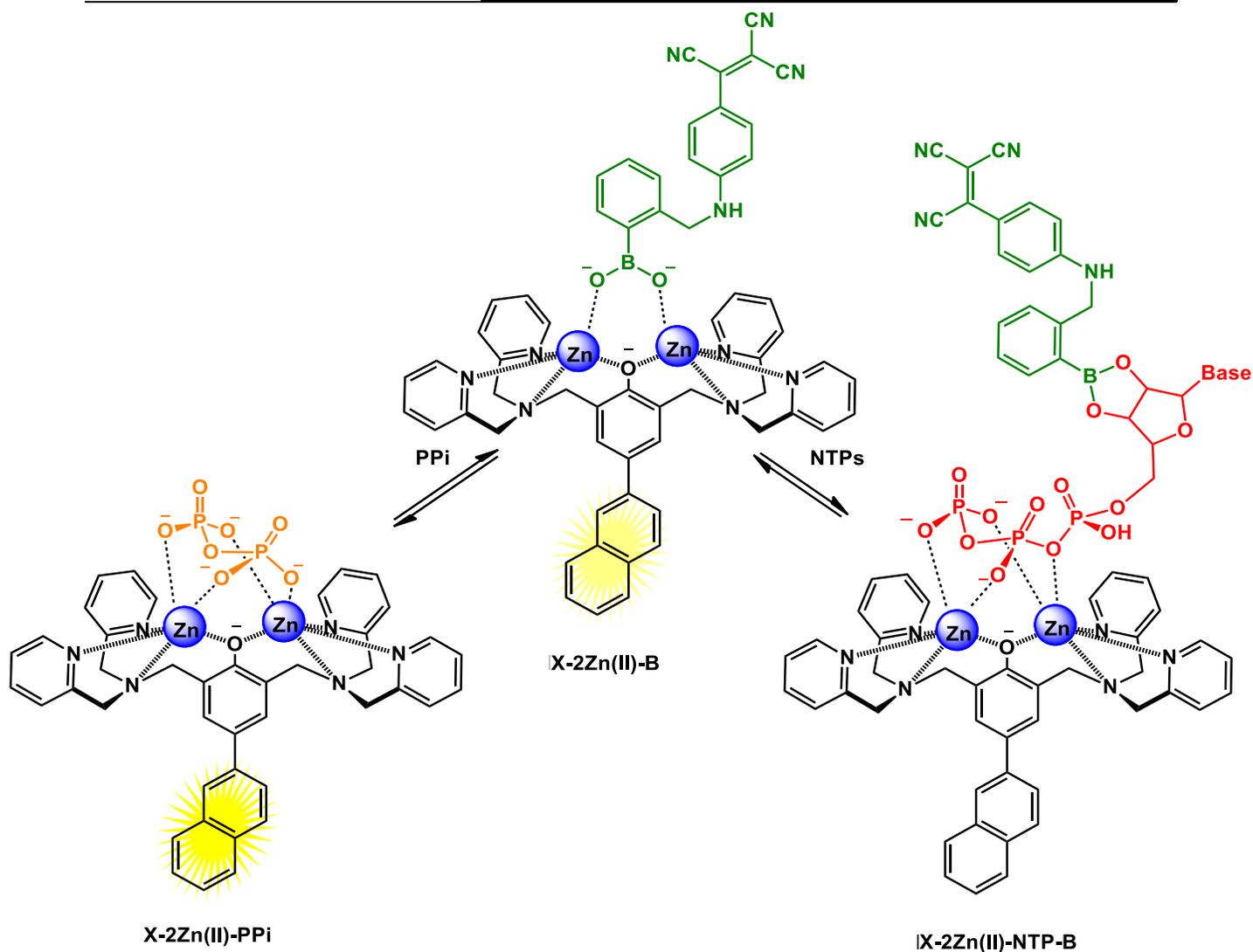
El quimiosensor **IX** ensambla violeta de pirocatecol ($K_A = 2.89 \times 10^6 M^{-1}$; pH 7.2; Buffer de trizma 0.05 M) que es un colorante muy popular en el diseño de quimiosensores ensamblados, regularmente el violeta de pirocatecol (VP) se coordina a receptores dinucleares de zinc (II) que pueden converger para coordinar el difenóxido que presenta dicho colorante. Este sistema ensamblado no fluoresce y es capaz de discriminar ente ATP y varios aniones incluyendo ADP. La adición de ATP a **IX** promueve el desplazamiento del violeta de pirocatecol, desencadenando un aumento en la emisión de fluorescencia atribuida a la formación del complejo **IX**-ATP, la constante de asociación $K_A = 1.36 \times 10^6 M^{-1}$ (pH 7.2; Buffer de trizma 0.05 M)⁴⁸. (Ver Esquema 2.6).



Esquema 2.6 Reconocimiento de ATP con IX.

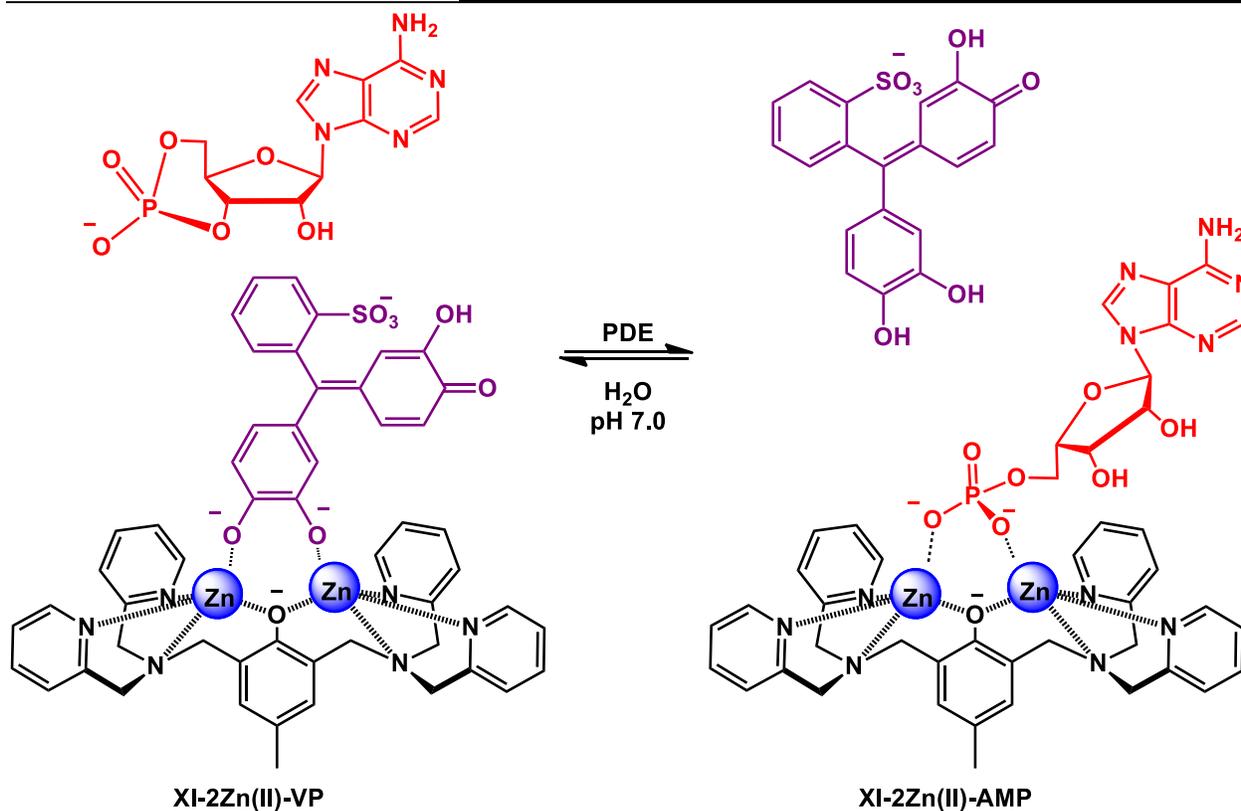
El quimiosensor **X** consiste en el ensamble de dos diferentes quimiosensores (complejo dinuclear de zinc (II) y ácido borónico) que trabajan cooperativamente para detectar nucleótidos. El complejo dinuclear de zinc (II) es un quimiosensor fluorogénico que reconoce PPi en medio acuoso, el ácido borónico (B) es un quimiosensor cromogénico para carbohidratos cuyo espectro de absorción se traslapa con la emisión de fluorescencia del quimiosensor fluorogénico.⁴⁹ El ensamble que presenta **X** fluoresce débilmente debido a la interacción que existe entre el naftaleno y el cromóforo del ácido borónico (Efecto FRET). La constante de asociación del ácido borónico con el complejo dinuclear es $K_A = 2.5(\pm 0.5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (pH 10.5; 10 mM CAPS), **X** puede distinguir entre nucleótidos y PPi. Cuando hay presencia de PPi, este desplaza al ácido borónico que está coordinado a los núcleos de zinc (II) y con ello hay un incremento significativo de fluorescencia. La constante de asociación para el complejo dinuclear con PPi es $K_A = 2.9 \pm 0.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (10 mM HEPES; pH 7.4). Cuando hay presencia de nucleótidos, estos extinguen por completo la fluorescencia del ensamblado y esto se debe a la acción cooperativa de los quimiosensores que conforman **X**. El mecanismo de reconocimiento de **X** dirigido a nucleótidos, es el siguiente (ver Esquema 2.7):

- La molécula de ácido borónico reacciona con el grupo 2,3-*cis*-diol de la ribosa presente en los nucleótidos para formar un éster borónico.
- El complejo dinuclear de zinc (II) con un grupo fenóxido central presenta una fuerte afinidad por los grupos fosfato de los nucleótidos.



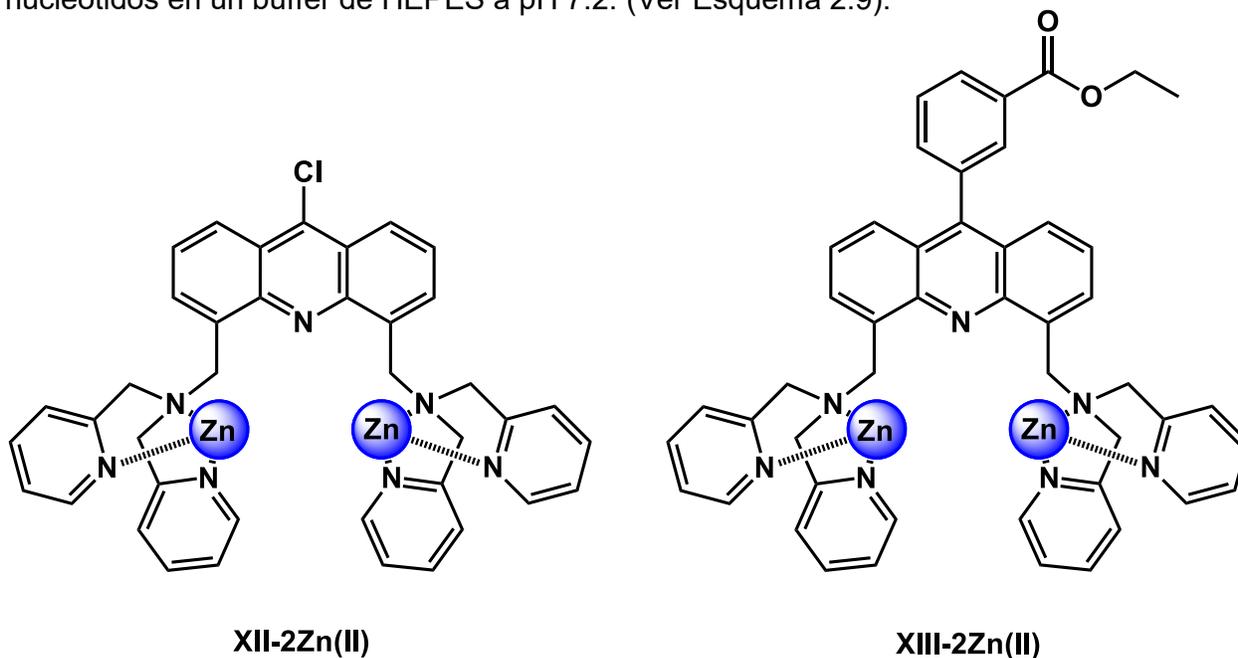
Esquema 2.7 Funcionamiento de **X** para detectar PPI y nucleótidos (NTDs).

Kim ha ensamblado violeta de pirocatecol a un complejo bimetalico de zinc (II) para ocuparlo como un quimiosensor colorimétrico capaz de reconocer AMP. El uso de estos componentes ensamblados conduce a un cambio de color de amarillo a azul en presencia de AMP. (Ver Esquema 2.8). La utilidad del ensamblado **XI** se demostró en el monitoreo de la cinética de las fosfodiesterasas (PDE) que son las hidrolasas responsables de degradar los nucleótidos cíclicos 2',5'-monofosfato de adenosina y guanosina (cAMP y cGMP) a sus respectivos nucleótidos 5'-monofosfatos (AMP o GMP). Este ensayo tiene ciertas ventajas si lo comparamos con otros métodos que son más laboriosos y requieren reactivos isotópicamente marcados. La constante de asociación determinada por ITC (calorimetría de titulación isotérmica) entre el complejo bimetalico y AMP es $K_A=2.51(\pm 0.74) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (pH 7.0; HEPES 10 mM a 30 °C).⁵⁰



Esquema 2.8 Representación del ensayo PDE usando el quimiosensor ensamblado XI para AMP.

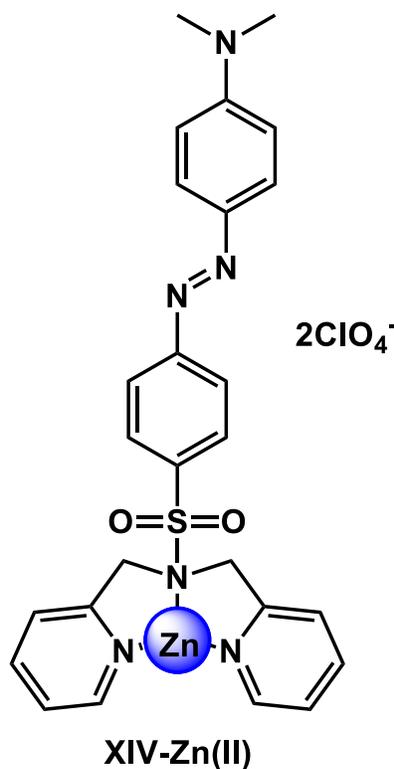
Los receptores a base de acridina XII y XIII muestran una disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia y un desplazamiento hacia el azul en presencia de varios nucleótidos en un buffer de HEPES a pH 7.2. (Ver Esquema 2.9).



Esquema 2.9 Receptores dinucleares basados en acridina.

Hamachi, propone que, en ausencia de fosfatos, las unidades de DPA se coordinan a los iones Zn^{2+} y uno de los átomos de zinc se encuentra formando un enlace adicional con el átomo de nitrógeno de acridina. Estas interacciones conducen a un aumento en la intensidad de emisión y a un desplazamiento al rojo en el espectro de fluorescencia de acridina. Este efecto se invierte en presencia de nucleótidos difosfato o trifosfato. Presumiblemente, estas especies se coordinan a las unidades $Zn(II)$ -DPA y debilitan el enlace de coordinación del átomo de nitrógeno de la acridina con uno de los iones Zn^{2+} . Las constantes de asociación observadas para varios nucleótidos trifosfato y difosfato se encuentran en el rango de 10^6 - $10^7 M^{-1}$. Por otra parte, la afinidad de nucleótidos ciclomonofofosfato y monofofosfato es muy pequeña.⁵¹

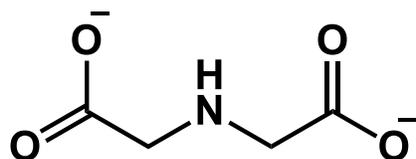
El complejo mononuclear de zinc (II) **XIV** es un quimiosensor cromogénico que cambia de color en disolución acuosa a pH 7.2 en presencia de ATP. (Ver Esquema 2.10). El cambio de color no se presenta en las mismas condiciones cuando se utilizan otros aniones biológicamente relacionados (AMP, ADP, PPI, o Pi). La K_A para ATP es $1130 \pm 6 M^{-1}$. Estudios por ^{31}P -RMN sugieren que el grupo fosfato β se coordina al complejo de zinc (II).⁵²



Esquema 2.10 Quimiosensor cromogénico para detectar ATP en disolución acuosa.

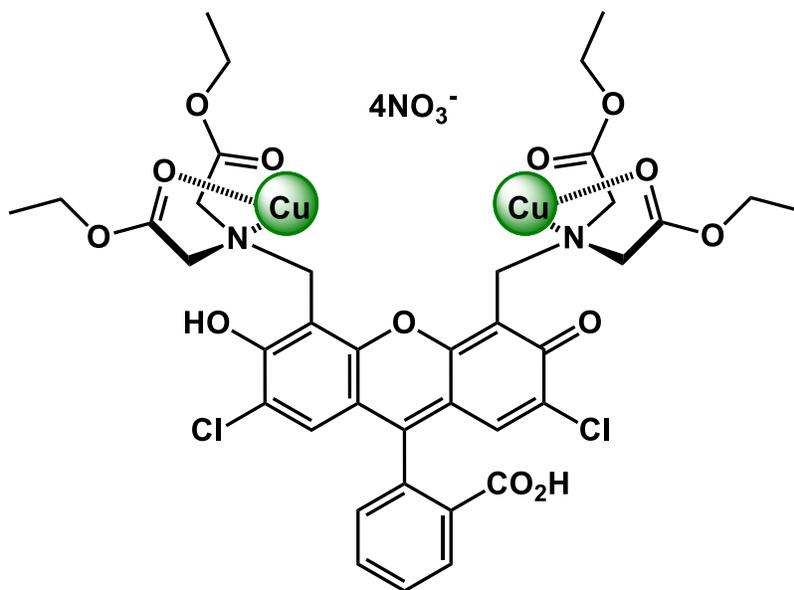
2. Receptores Basados en Compuestos de Coordinación IDA-Cobre (II).

La molécula iminodiacetato (IDA) fue reportada por primera vez en 1862 por Heintz. (Ver Esquema 2.11). Desde entonces, ha sido ampliamente utilizado como un agente quelante para diversos iones metálicos, por ejemplo, Cu (II), Ni (II), Zn (II), Co (III), Fe (III), Al (III), y Cr (III). Los complejos de IDA con metales de transición generalmente presentan estequiometrías 1:1 y 2:1 IDA:M (II). Las constantes de asociación de iones metálicos y la estabilidad termodinámica y cinética, son generalmente muy altas. Dependiendo del número de coordinación del ion metálico, los complejos de IDA pueden presentar sitios de coordinación vacantes para asociar otro tipo de ligantes. Por lo tanto, los complejos de IDA insaturados califican perfectamente para el reconocimiento molecular de huéspedes básicos de Lewis.⁵³



Esquema 2.11 Iminodiacetato (IDA).

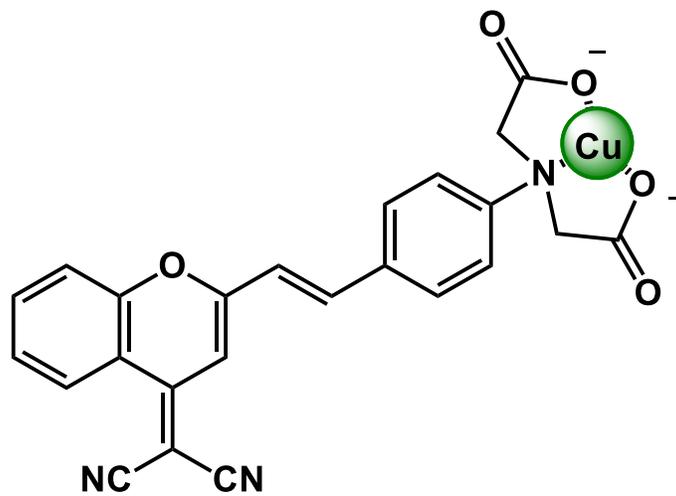
El receptor **XV** intensifica su fluorescencia tras la adición de pirofosfato sin mostrar desplazamiento en su longitud de onda de emisión. (Ver Esquema 2.12). La constante de asociación de **XV** con pirofosfato en agua es $K_A=6.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (HEPES; pH 7.4).



XV-2Cu(II)

Esquema 2.12 Receptor dinuclear de cobre (II) basado en IDA.

El quimiosensor **XVI** es un complejo mononuclear de cobre (II) que no fluoresce en medio acuoso (MOPS 10 mM; pH 7.0). (Ver Esquema 2.13). El quimiosensor enciende su fluorescencia emitiendo en la región del infrarrojo cercano (NIR) con alta selectividad al anión pirofosfato. Debido a que el quimiosensor emite en el NIR al asociarse con PPI, este se utiliza para teñir células de carcinoma epidérmico nasofaríngeo humano, utilizando un microscopio de fluorescencia confocal para evaluar su potencial aplicación en bioimagen, esto debido a que a longitudes cercanas al NIR hay menor autofluorescencia de muestras biológicas.⁵⁵

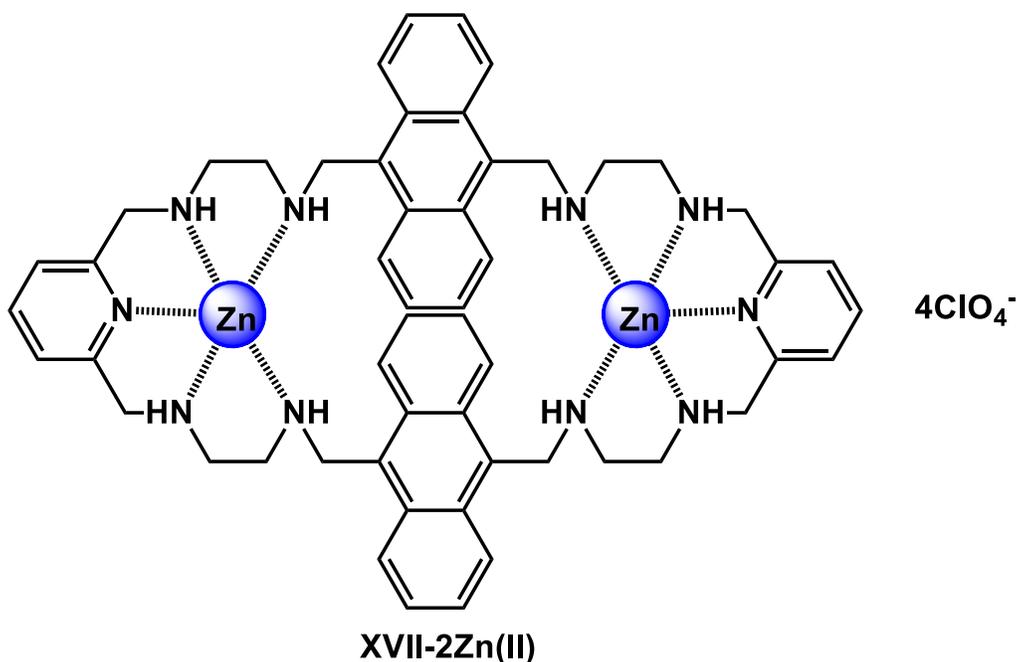


XVI-Cu(II)

Esquema 2.13 Receptor mononuclear de cobre (II) basado en IDA.

3. Receptores Basados en Macrociclos que Coordinan Cobre (II) o Zinc (II).

Además de los receptores basados en DPA-Zn (II) e IDA-Cu (II), otra estrategia adoptada para el diseño de quimiosensores de nucleótidos y pirofosfato es el uso de complejos macrocíclicos de Zn (II) o Cu(II). Por ejemplo, el macrociclo **XVII** presenta una alta selectividad hacia ATP y ADP. (Ver Esquema 2.14). Tras la adición de ATP (o ADP) a una disolución del **XVII** en agua a pH 7.4 (HEPES 40 mM; 25 °C) se observa un aumento en la intensidad de emisión a alrededor de 434 nm. La estequiometría es 1:2 **XVII**:nucleótido y cálculos DFT sugieren que el complejo macrocíclico posee sitios de reconocimiento para dos grupos fosfato y dos grupos adenina en ATP y ADP. Por otra parte, el modo de unión de sándwich entre los dos restos de antraceno de **XVII** y un par de grupos de adenina aumenta la selectividad y la afinidad del complejo hacia ATP / ADP. Las constantes de asociación de **XVII** con ATP y ADP son $3.1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ y $1.5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, respectivamente (pH 7.4, 25 °C).⁵⁶

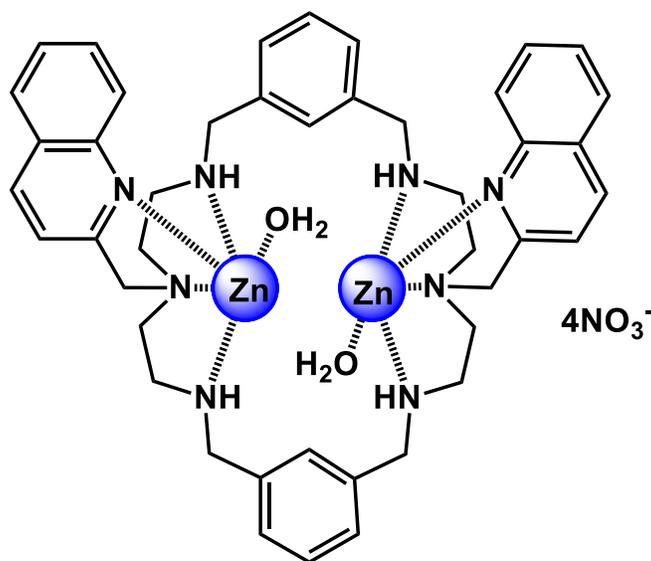


Esquema 2.14 Complejo macrocíclico de Zn (II) basado en antraceno.

Hasta ahora, **XVIII** es el único hexaazamacrociclo que presenta fluoróforos unidos covalentemente. (Ver Esquema 2.15). El complejo exhibe una débil emisión de fluorescencia en disolución acuosa, pero la adición de PPI causa un incremento enorme en la intensidad de la fluorescencia. El quimiosensor responde de manera lineal a valores de $10 \mu\text{M}$ HPPi^{3-} y tiene un límite de detección de 300 nM . El receptor **XVIII** se comporta como un sensor altamente selectivo para PPI y la presencia de otras moléculas fosforiladas no interfiere en la emisión de fluorescencia del complejo, en presencia de PPI. En condiciones fisiológicas (MOPS; pH 7.4) se determinaron las constantes de asociación efectiva (K_{EFF}) para diferentes sustratos, utilizando espectrofluorimetría, el valor más alto de K_{EFF} ($\log 6.22$) corresponde a la asociación de PPI con **XVIII**, este valor, es uno de los más altos que se ha reportado para quimiosensores colorimétricos/fluorimétricos capaces de reconocer PPI a condiciones fisiológicas.⁵⁷ (Ver Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Constantes de asociación efectiva K_{EF} (M^{-1}) de **XVIII** (20 mM MOPS, pH 7.4, 25 °C).

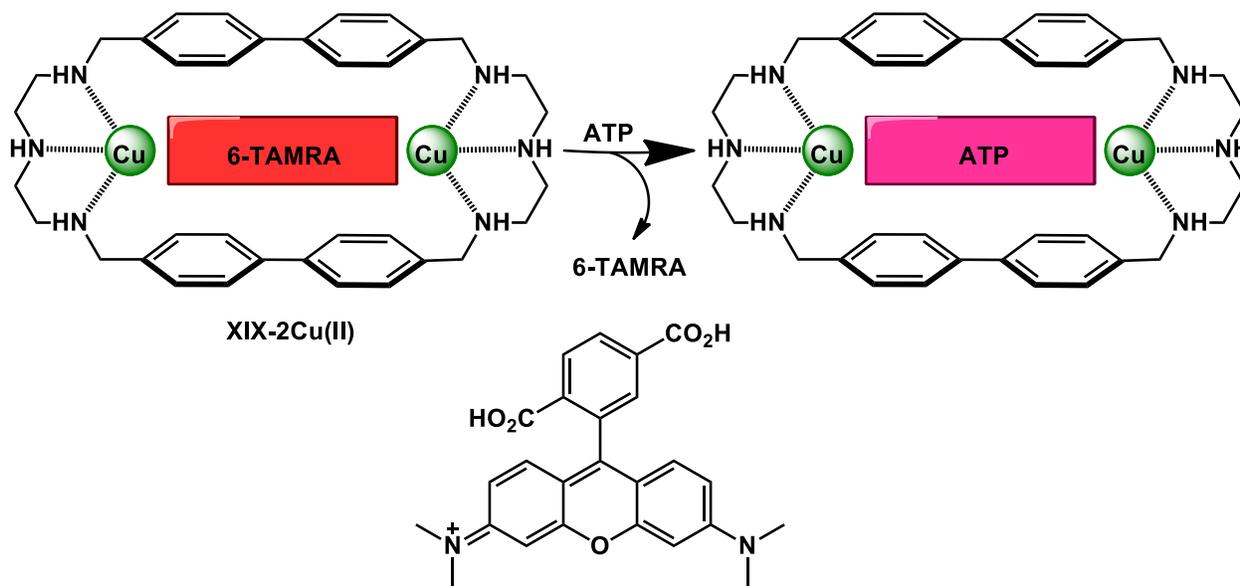
	XVIII
HATP³⁻	3.23×10^5
HADP²⁻	1.00×10^5
HAMP⁻	1.51×10^4
HPPi³⁻	1.66×10^6
HPO₄²⁻	1.07×10^4



XVIII-2Zn(II)

Esquema 2.15 Complejo macrocíclico de Zn (II) basado en quinolina.

El indicador fluorescente tetrametil-6-carboxirodamina (6-TAMRA) no exhibe emisión de fluorescencia cuando se encuentra ensamblado a **XIX**. (Ver Esquema 2.16). Sin embargo, en condiciones acuosas a pH 7.0, el nucleótido ATP logra desplazar el indicador fluorescente y en el proceso la 6-TAMRA recupera su emisión de fluorescencia. El valor de K_A obtenido del equilibrio de **XIX** con ATP es $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.⁵⁸



Esquema 2. 16 Quimiosensor ensamblado basado en difenilos.

HIPÓTESIS

Los receptores dinucleares de zinc (II) con quelantes tridentados de dipicolilamina o iminodiacetato unidos a un fluoróforo de quinolina, funcionarán como quimiosensores fluorescentes para nucleótidos en medio acuoso y pH neutro.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Diseñar, sintetizar y evaluar dos nuevos quimiosensores fluorescentes, basados en complejos dinucleares de zinc (II) que contengan sitios de coordinación disponibles en el centro metálico para la unión selectiva de bioanalitos aniónicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Sintetizar y caracterizar dos nuevos compuestos fluorescentes que incluyan en su estructura química, un fluoróforo de quinolina unido covalentemente a dos quelantes dipicolilamina o iminodiacetato que coordinan zinc (II).
2. Estudiar la estabilidad química y las propiedades fotofísicas de los complejos dinucleares en medio acuoso.
3. Realizar estudios de reconocimiento molecular de los nuevos receptores fluorescentes derivados de complejos de zinc (II) con una serie de bioanalitos (nucleótidos, aminoácidos, dicarboxilatos derivados del ciclo de Krebs, oxoaniones y halogenuros) a través de técnicas espectroscópicas.
4. Determinar la estequiometría de las supramoléculas (quimiosensor-bioanalito) por espectrofluorimetría.
5. Estudiar los modos de unión de los receptores sintetizados con las biomoléculas por Resonancia Magnética Nuclear uni y bidimensional.
6. Determinar la selectividad y constantes de asociación de los receptores con los bioanalitos por técnicas espectroscópicas.

JUSTIFICACIÓN

El presente proyecto explora uno de los retos modernos de la química supramolecular analítica, que es el desarrollo y estudio de nuevos sistemas huésped-anfitrión, con selectividad y afinidad a bioanalitos que mimetizan los fenómenos de asociación en sistemas biológicos.

El proyecto ataca el diseño de nuevos receptores fluorescentes y dinucleares de zinc (II), su síntesis química y estudio de asociación con moléculas que tienen relevancia biológica en enfermedades, procesos bioquímicos y química medicinal. Un punto relevante de esta investigación recae en la estructura de los receptores sintetizados y al modo en cómo estos reconocen bioanalitos, ya que los primeros son asimétricos y contienen dos sitios potenciales de unión para enlazar aniones, lo cual está prácticamente inexplorado. Los receptores sintéticos basados en complejos de zinc (II) son populares en el reconocimiento molecular, además suelen ocuparse como quimiosensores ópticos, debido a que el zinc (II) es biológicamente compatible, no es una especie redox en condiciones fisiológicas, tiene una química de coordinación muy bien conocida y su unión con un fluoróforo usualmente mejora las propiedades fotofísicas.

Se ha reportado, un gran número de quimiosensores orgánicos e inorgánicos para una gran variedad de analitos, sin embargo, pocos realizan el estudio de reconocimiento en medios práticos como el agua, debido a que esta compite por los sitios de asociación, que comúnmente son enlaces de hidrógeno o enlaces de coordinación, en este contexto, la presente investigación realiza todo el estudio de reconocimiento iónico y molecular, de dos nuevos receptores dinucleares de zinc (II) con bioanalitos (nucleótidos, dicarboxilatos, aminoácidos, aniones inorgánicos) en disolución acuosa y a pH neutro, con la finalidad de potencializar sus aplicaciones como quimiosensores. Desde el punto de vista sintético, los quimiosensores para bioanalitos reportados a la fecha, resultan ser moléculas complejas y multifuncionalizadas que hacen laborioso, costoso y complicado el proceso de síntesis, por ello, el presente estudio aborda la síntesis de quimiosensores partiendo de moléculas sencillas y de bajo costo. Por otra parte, los quimiosensores son técnicas analíticas poderosas que requieren poco equipo especializado (por ejemplo, un espectrofotómetro de UV-Visible o un espectrofluorímetro).

CAPÍTULO 3

DESARROLLO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental de esta tesis se desarrolló en el laboratorio 1 de Química Inorgánica del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UNAM-UAEMex y en el laboratorio 1-1 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El capítulo detalla todo el proceso metodológico llevado a cabo a lo largo de esta investigación. Se hace alusión a temperaturas, concentraciones, métodos y técnicas que se emplearon a lo largo del trabajo en el laboratorio. De igual manera, se incluyen aspectos sobre la caracterización de cada ligante sintetizado.

El capítulo se encuentra dividido en tres secciones:

1. Sección A. Condiciones Generales de Instrumentación.

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

2. Sección B. Síntesis y Caracterización de Ligantes.

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

3. Sección C. Estudios de Reconocimiento Molecular.

Sección encargada de detallar la metodología de cada uno de los experimentos de titulación, iniciando con la preparación de soluciones stock y procesos de dilución, hasta terminar con los procedimientos de determinación de constantes de asociación y método de variación continua.

Adicionalmente en el apartado de anexos se puede observar cada uno de los espectros de resonancia magnética nuclear en una y dos dimensiones, espectros de infrarrojo y espectros de masas.

SECCIÓN A. CONDICIONES GENERALES DE INSTRUMENTACIÓN.

1. Disolventes y Reactivos.

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

2. Instrumentación.

Los estudios de asociación, identificación y caracterización de los productos se realizaron a través de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

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

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se realizaron utilizando TMS como referencia y para los núcleos de ^{19}F y ^{31}P , se utilizó como referencia CFCl_3 y H_3PO_4 respectivamente. Equipo Bruker Advanced 300MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.

Los espectros de masas se obtuvieron usando un espectrómetro de masas marca JEOL modelo JMS-T100LC cuando el modo de ionización fue DART⁺ y un cromatógrafo de líquidos acoplado a masas marca Bruker Daltonics modelo Esquire 6000 cuando el modo de ionización fue ESI. Para ESI el complejo **1** se preparó en MeOH y para **2** se usó MeCN.

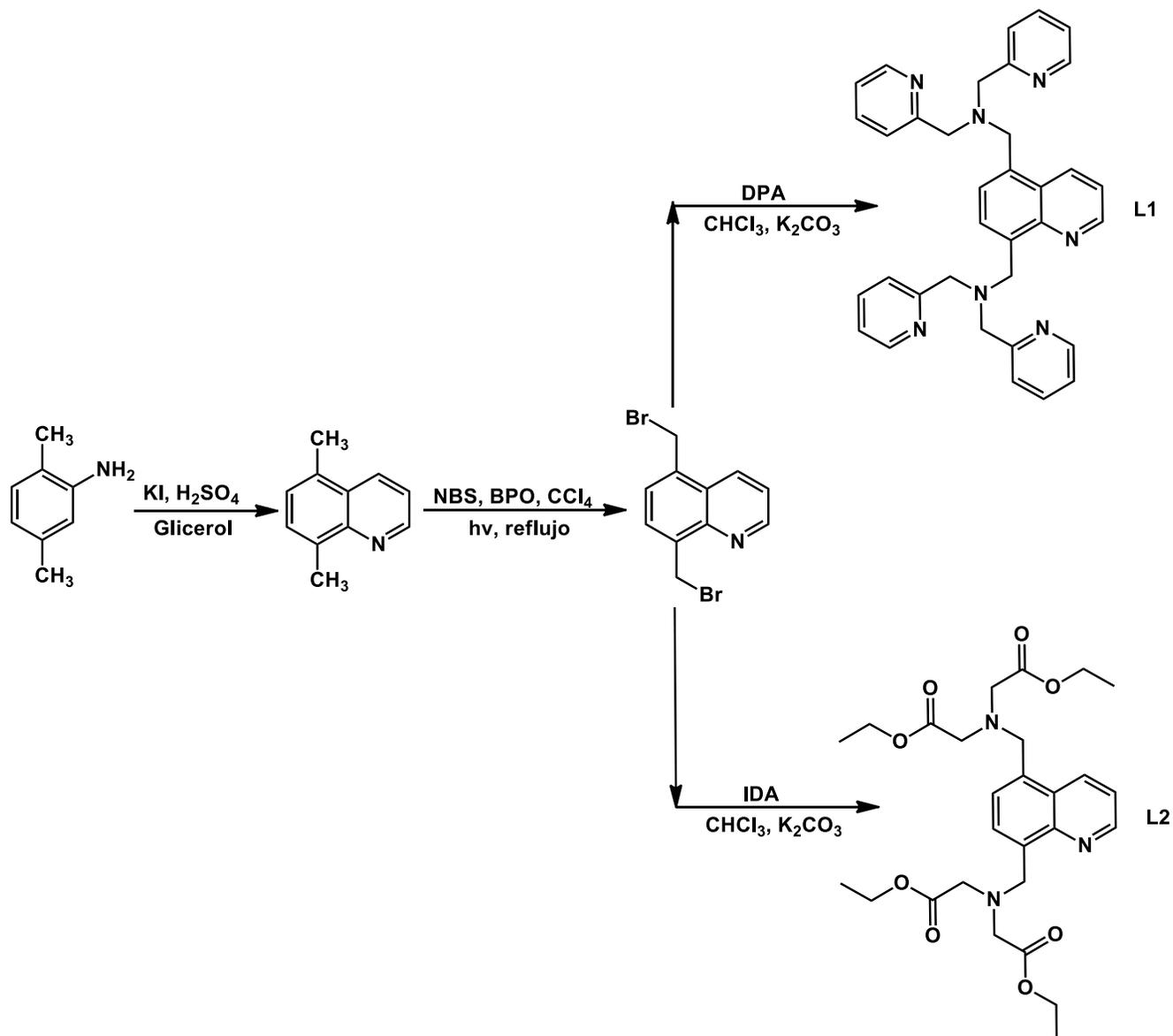
Los experimentos por espectrofotometría de UV-Vis se hicieron con un espectrofotómetro de arreglo de diodos, Perkin Elmer modelo Lambda 25, con resolución de 2nm con una precisión de longitud de onda $<\pm 0.5\text{nm}$ y una precisión fotométrica $<\pm 0.005\text{A}$ a 1.2, acoplados a un controlador de temperatura a 25°C. Se utilizaron celdas de cuarzo (Paso óptico [1cm], Volumen [3mL]).

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

SECCIÓN B. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LIGANTES.

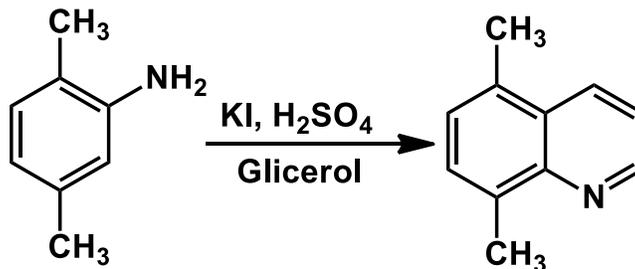
1. Ruta Sintética de los Ligantes.

El Esquema 3.1 muestra la ruta sintética de los ligantes **L1** y **L2**. La caracterización de los ligantes se realizó por espectrometría de masas (DART⁺/ESI) y varios experimentos de resonancia magnética nuclear (¹H, ¹³C, DEPT, HSQC). Los espectros se encuentran en la sección de Anexos.



Esquema 3.1 Ruta sintética de los ligantes **L1** y **L2**.

1.1 Síntesis de 5,8-Dimetilquinolina.

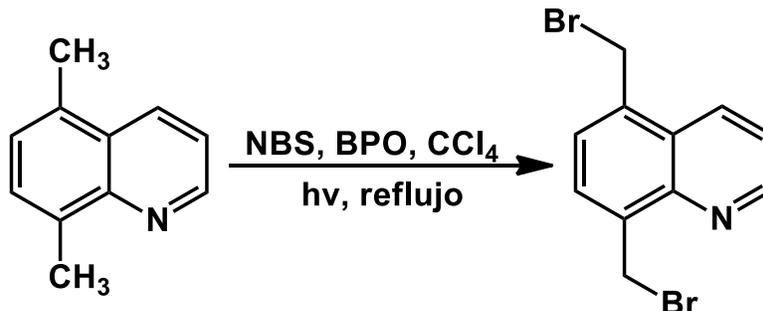


Esquema 3. 2 Síntesis de 5,8-dimetilquinolina.

En un matraz de fondo redondo se preparó una disolución de H₂SO₄ al 80 % (40 mL), posteriormente se añadió KI (0.2 g, 1.2 mmol) y se agitó hasta disolver completamente. Subsiguientemente se adicionó gota a gota 2,5-dimetilanilina (12.5 mL, 0.1 mol) manteniendo una temperatura inferior a 80 °C y una agitación vigorosa. Después de la adición, la mezcla se calentó a 140 °C y se goteó lentamente glicerol anhidro (12 mL, 0.16 mol) durante 1.5 h, transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción se colocó a reflujo por 4 h, conservando una temperatura de 140-145 °C. El reflujo se equipó con una trampa Dean-Stark. Después del reflujo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se neutralizó con una disolución de NaOH al 40% hasta pH 7-8. Posteriormente la mezcla se destiló para separar el agua (el destilado contiene un poco de materia prima). El crudo de la destilación contiene la quinolina, esta se extrajo utilizando CH₂Cl₂, la fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro y consecuentemente se filtró. La fase orgánica se concentró en un rotavapor obteniendo un líquido color negro correspondiente a 5,8-dimetilquinolina. El rendimiento de la reacción se determinó en 66.8 % (10.5 mL).

¹H-NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ= 8.93 (m, 1H), 8.40 (m, 1H), 7.57-7.47 (m, 2H), 7.30 (m, 1H), 2.67 (s, 3H), 2.61 (s, 3H).

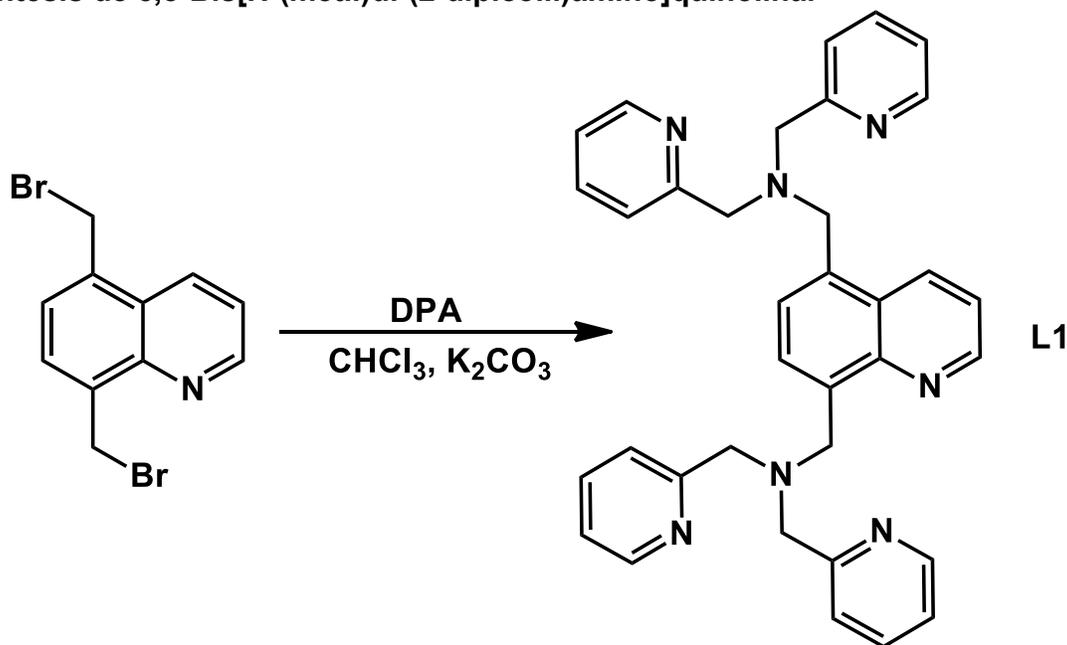
1.2 Síntesis de 5,8-Bis(bromometil)quinolina.



Esquema 3. 3 Síntesis de 5,8-bis(bromometil)quinolina.

En un matraz de fondo redondo se agregaron los siguientes reactivos: 5,8-dimetilquinolina (3.10 mL, 19.74 mmol), NBS (7.48 g, 42 mmol) y BPO (0.70 g, 2.9 mmol), estos se disolvieron en CCl₄ (100 mL), la mezcla de reacción se irradió con luz UV y se colocó a reflujo por 48 h. Después del tiempo transcurrido, la mezcla se dejó enfriar hasta 50 °C, a esa temperatura se filtró a vacío. El filtrado se lavó con una disolución saturada de Na₂SO₃ (25 mL), Na₂CO₃ (25 mL) y H₂O destilada (25 mL) respectivamente. Posteriormente se separó la fase orgánica con un embudo de separación y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y subsiguientemente se concentró en un rotavapor, obteniendo un sólido color marrón que se cristalizó por evaporación lenta en THF (20 mL). El rendimiento de la reacción se determinó en 82.3 % (5.18 g).

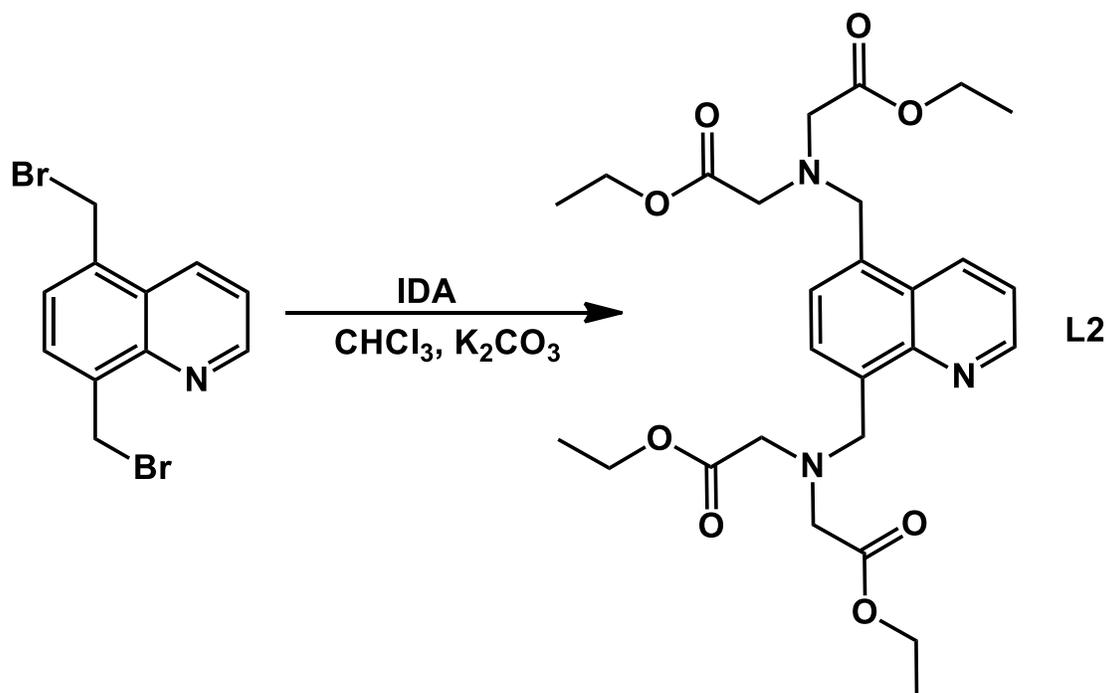
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ= 9.05 (m, 1H), 8.49 (m, 1H), 7.78-7.75 (m, 1H), 7.59-7.54 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 4.89 (s, 2H).

1.3 Síntesis de 5,8-Bis[*N*-(metil)di-(2-dipicolil)amino]quinolina.

Esquema 3. 4 Síntesis de L1.

En un matraz de fondo redondo se mezcló 5,8-Bis(bromometil)quinolina (0.4 g, 1.27 mmol), dipicolilamina (0.46 mL, 2.5 mmol) y K_2CO_3 (0.554 g, 4.0 mmol) en CHCl_3 (20 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 24 h. Después del tiempo transcurrido, la mezcla se filtró a gravedad y consecuentemente el disolvente se evaporó en un rotavapor. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna, utilizando como eluyente una mezcla 2:2:6 AcOEt: MeOH: hexano y una fase estacionaria de alúmina neutra. La fracción que contiene el compuesto de interés se secó con MgSO_4 anhidro y subsecuentemente se filtró, el filtrado se concentró en un rotavapor, obteniendo un aceite café rojizo. Rendimiento de la reacción 76.2 % (0.45 mL).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOD) δ = 8.86 (m, 1H), 8.62-8.59 (m, 1H), 8.40-8.35 (m, 4H), 7.85-7.82 (m, 1H), 7.75-7.61 (m, 6H), 7.56-7.53 (m, 1H), 7.51-7.47 (m, 1H), 7.43-7.40 (m, 2H), 7.22-7.14 (m, 4H), 4.42 (s, 2H), 4.09 (s, 2H), 3.98 (s, 4H), 3.83 (s, 4H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (300 MHz, MeOD) δ = 158.74 (4C), 157.93, 148.75, 148.04 (2C), 147.90 (2C), 146.39, 137.25 (2C), 136.94 (2C), 134.62, 134.10, 129.01, 128.01, 127.45, 123.74 (2C), 123.25 (2C), 122.50 (2C), 122.29 (2C), 120.49, 60.33 (2C), 59.74 (2C), 57.15, 54.13. **EM** (DART⁺) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 552.28775. **Análisis elemental** $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{N}_7$ (Calculado) C, 76.20; H, 6.03; N, 17.77. (Experimental) C, 75.95; H, 6.05; N, 17.71.

1.4 Síntesis de 5,8-Bis[diethyl *N*-(metil)iminodiacetato]quinolina.

Esquema 3. 5 Síntesis de L2.

En un matraz de fondo redondo se mezcló 5,8-Bis(bromometil)quinolina (0.4 g, 1.27 mmol), dietil iminodiacetato (0.45 mL, 2.5 mmol) y K_2CO_3 (0.554 g, 4.0 mmol) en CHCl_3 (20 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 50 °C por 24 h. Después del tiempo transcurrido, la mezcla se filtró a gravedad y consecuentemente el disolvente se evaporó en un rotavapor. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna, utilizando como eluyente una mezcla 5:3:2 hexano: AcOEt: MeOH y una fase estacionaria de sílice. La fracción que contiene el compuesto de interés se secó con MgSO_4 anhidro y subsecuentemente se filtró, el filtrado se concentró en un rotavapor, obteniendo un aceite café rojizo. Rendimiento de la reacción 81.3 % (0.48 mL).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 9.07-9.05 (m, 1H), 8.89-8.88 (m, 1H), 7.80-7.77 (m, 1H), 7.57-7.53 (m, 1H), 7.45-7.42 (m, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.23 (s, 2H), 4.10-4.02 (m, 8H), 3.59 (s, 4H), 3.49 (s, 4H), 1.19-1.13 (m, 12H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ =171.37 (2C), 171.11 (2C), 149.75, 147.04, 137.18, 134.48, 133.64, 128.41, 128.33, 127.64, 121.30, 60.41 (2C), 60.26 (2C), 55.46, 55.02 (2C), 54.65 (2C), 53.03, 14.53 (4C). **EM** (DART⁺) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 532.26481. **Análisis elemental** $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_8$ (Calculado) C, 61.00; H, 7.02; N, 7.90. (Experimental) C, 60.59; H, 7.04; N, 7.85.

SECCIÓN C. METODOLOGÍA EMPLEADA EN EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR.

1. Titulaciones Espectrofluorimétricas y Método de Variación Continua.

Para determinar la estequiometría de los ligantes con los iones zinc (II), se utilizó el método de variación continua. El método, es aplicable a iones complejos formados por reacción de dos componentes, la cual se puede representar por la ecuación: $A + nB \rightarrow AB_n$. Para determinar n , se preparan soluciones de $A + B$ variando la fracción molar de ambos componentes, pero manteniendo la concentración de $A + B$ constante y midiendo una propiedad adecuada de las soluciones resultantes. En el caso de los sistemas de estudio, esta propiedad fue la emisión de fluorescencia. El método de variación continua también se aplicó para determinar la estequiometría del receptor **1** con GTP.

Las titulaciones fluorimétricas de los ligantes con $Zn(OTf)_2$ se realizaron de la siguiente manera. Se prepararon soluciones stock 10 mM de cada uno de los ligantes en MeOH para **L1** y en MeCN para **L2**, a partir de estas soluciones, se tomaron alícuotas que fueron diluidas en una celda de cuarzo con una disolución buffer, 40 mM de MOPS (pH 7.0), hasta obtener una concentración de 150 μ M del ligante. Los espectros de emisión se grabaron a una longitud de excitación de 300 nm a potenciales de 650 V (**L1**) y 800 V (**L2**), posteriormente se adicionaron alícuotas de una disolución stock 10 mM (0-5 eq.) de $Zn(OTf)_2$. Los espectros de emisión de fluorescencia para cada una de las adiciones de $Zn(OTf)_2$ se tomaron por duplicado después de 1 min. Los datos experimentales fueron utilizados para determinar las constantes de asociación respectivas.

Las titulaciones fluorimétricas de los sustratos con los receptores, se realizaron de la siguiente manera. Se prepararon soluciones stock 10 mM de cada uno de los receptores (*in-situ*) en MeOH para **1** y en MeCN para **2**, a partir de estas soluciones, se tomaron alícuotas que fueron diluidas en una celda de cuarzo con una disolución buffer, 40 mM de MOPS (pH 7.0) hasta obtener una concentración de 150 μ M. Los espectros de emisión se grabaron a una longitud de excitación de 300 nm a potenciales de 650 V (**1**) y 800 V (**2**), posteriormente se adicionaron alícuotas de soluciones stock de los sustratos de estudio. Los espectros fueron grabados por duplicado después de agitar y esperar un par de minutos. Los datos experimentales se utilizaron para determinar las constantes de asociación respectivas. Las concentraciones stock de los sustratos utilizados en esta investigación, se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Concentraciones de los sustratos empleados en las titulaciones fluorimétricas y/o espectrofotométricas. Todas las sales de los aniones son de sodio.

Sustrato	[Stock] mM	Sustrato	[Stock] mM
Receptor 1			
ATP	80	AsO ₂ ⁻	35
ADP	80	HAsO ₄ ⁻²	35
AMP	27	HSO ₄ ⁻	35
GTP	23	NO ₃ ⁻	35
GDP	35	CH ₃ CO ₂ ⁻	35
GMP	35	C ₆ H ₅ CO ₂ ⁻	35
Guanosina	12	C ₂ O ₄ ⁻²	35
CTP	29	Malonato	35
UTP	28	Succinato	35
HP ₂ O ₇ ³⁻ (PPi)	35	Glutarato	35
H ₂ PO ₄ ⁻	35	Adipato	35
F ⁻	35	Fumarato	35
Cl ⁻	35	Maleato	35
Br ⁻	35	Malato	35
I ⁻	35	Tartrato	35
CN ⁻	35	Citrato	35
Receptor 2			
L-alanina	50	ATP	80
L-arginina	50	ADP	80
L-aspargina	50	AMP	27
L-aspartato	50	GTP	23
L-cisteina	50	GDP	35
L-fenilalanina	50	GMP	35
L-histidina	50	CTP	29
L-serina	50	UTP	28
L-triptófano	50	HP ₂ O ₇ ³⁻ (PPi)	35
L-valina	50	H ₂ PO ₄ ⁻	35

2. Titulaciones Espectrofotométricas por UV-Visible.

Debido a la gran afinidad que existe entre el receptor **1** y GTP se decidió realizar una titulación espectrofotométrica. Para esto, se preparó una disolución stock concentrada, 10 mM del receptor **1** en MeOH y a partir de esta disolución se tomó una alícuota que fue diluida con una disolución buffer, 40 mM de MOPS en una celda de cuarzo hasta obtener una concentración de 150 μ M, posteriormente se tomó el espectro de absorción y directamente en la celda se adicionaron alícuotas de una disolución stock concentrada, 23 mM de GTP. Los espectros de absorción para cada una de las adiciones del nucleótido se tomaron por duplicado después de 1min. Los datos experimentales se utilizaron para determinar la constante de asociación.

Adicionalmente se realizó una titulación espectrofotométrica del ligante **L1** con $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ para determinar las constantes de asociación respectivas y compararlas con las obtenidas por espectrofluorimetría. Para esto se preparó una disolución stock 10 mM de **L1** y a partir de esta disolución, se tomó una alícuota que fue diluida en una celda de cuarzo con una disolución buffer, 40 mM de MOPS (pH 7.0), hasta obtener una concentración de 150 μM del ligante. Los espectros de absorción se grabaron adicionando alícuotas de una disolución stock 10 mM de $\text{Zn}(\text{OTf})_2$. Los espectros de absorción para cada una de las adiciones de $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ se tomaron por duplicado después de 1 min.

3. Titulaciones Espectroscópicas por RMN.

Los estudios de asociación por RMN, se hicieron para el receptor **1** con GTP y para el receptor **2** con GDP, debido a que estos receptores poseen una alta afinidad al nucleótido correspondiente.

a. Titulación por ^1H -RMN.

Las titulaciones se realizaron directamente en un tubo de resonancia. Se prepararon 500 μL de soluciones 4 mM de los nucleótidos en D_2O , estas se titularon con soluciones stock 50 mM de los receptores. (Ver Tabla 3.2). La disolución stock de **1** se preparó en MeOD y para **2** se utilizó CD_3CN . Los espectros obtenidos de las titulaciones de ^1H -RMN se utilizaron para determinar la constante de asociación respectivas.

Tabla 3.2 Equivalentes de receptor agregados en la titulación por ^1H -RMN.

Vol. Receptor	Eq.	[Receptor] _{Tubo}
10 μL	0.25	1 mM
20 μL	0.50	2 mM
30 μL	0.75	3 mM
40 μL	1.00	4 mM
80 μL	2.00	8 mM

b. Titulación por ^{31}P -RMN.

La titulación se realizó directamente en un tubo de resonancia, se adicionaron 500 μL de soluciones 4 mM de los nucleótidos en D_2O , se grabaron los espectros y posteriormente se adicionó 1 eq. del receptor correspondiente, se agitaron los tubos por 5 min y transcurrido ese tiempo se grabaron los espectros.

CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestran los resultados más sobresalientes de este trabajo, enfocados a la formación de los receptores en disolución, así como los estudios de reconocimiento molecular con nucleótidos, aminoácidos, carboxilatos derivados del ciclo de Krebs y aniones inorgánicos, por medio de técnicas espectroscópicas.

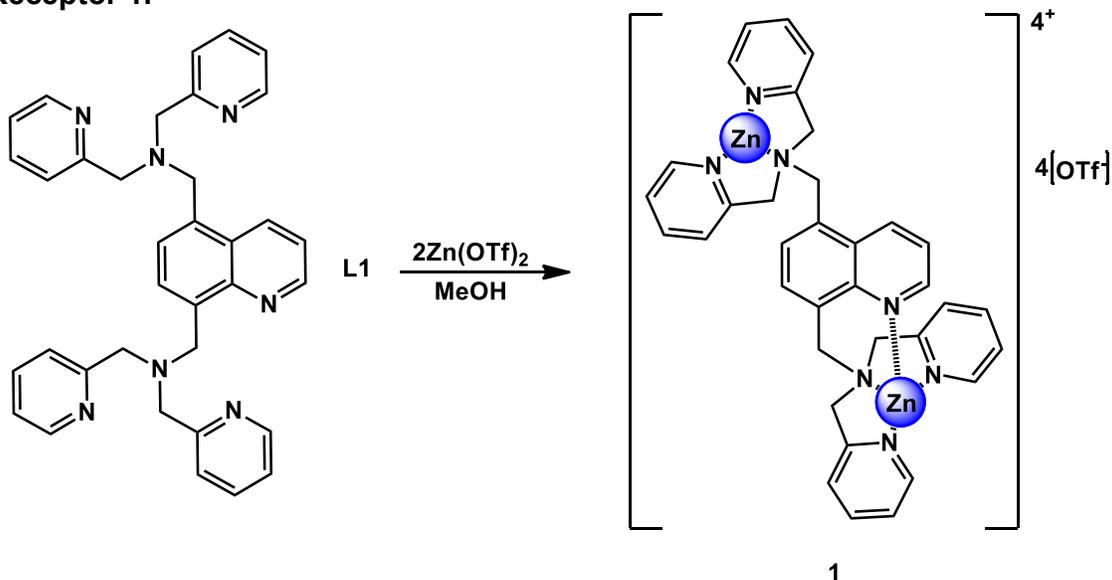
El capítulo está dividido en dos secciones. La sección A describe el análisis estructural en disolución de los dos receptores sintetizados en este trabajo, ambos receptores son complejos dinucleares de zinc (II), estos presentan un fragmento de quinolina que se encuentra funcionalizado en las posiciones 5 y 8 por dos unidades quelantes de zinc (II). El receptor **1**, $Zn[N_4]^{2+}$ -Quinolina- $Zn[N_3]^{2+}$, tiene DPA como unidad quelante y el receptor **2**, $Zn[NO_2]$ -Quinolina- $Zn[NO_2]$, tiene como unidad quelante IDA. El estudio incluye el análisis comparativo de los ligantes **L1** y **L2** respecto a la formación de sus complejos en disolución. La resonancia magnética nuclear en una y dos dimensiones, juega un rol interesante e igual de importante, comparándolo con la espectroscopia de fluorescencia. Debido a los espectros uni y bidimensionales de RMN de los sistemas estudiados, se pueden analizar todas aquellas interacciones entre los iones Zn^{2+} y los ligantes. Adicionalmente también se muestran espectros de absorción UV-Vis y emisión de fluorescencia de los receptores, acompañados de diagramas de Job que corroboran la estequiometría 1:2 Ligante- Zn^{2+} . La sección B engloba y discute todo el estudio relacionado al reconocimiento de aniones biológicos (prestando atención a los nucleótidos) con receptores dinucleares de zinc (II) en agua. Los estudios van desde fenómenos fluorescentes hasta fenómenos magnéticos que involucran el desplazamiento de señales en espectroscopía de RMN. La primera parte de la sección B está enfocada a los estudios de asociación receptor-nucleótido, llevados a cabo por titulaciones fluorimétricas. La segunda y tercera parte discuten las titulaciones espectroscópicas de RMN (1H y ^{31}P) y espectrofotométricas, entre el receptor **1** y GTP, receptor **2** y GDP. La razón por la que únicamente se hizo el estudio de estos sistemas, incide en el elevado valor de su constante de asociación obtenida por espectroscopía de fluorescencia frente al resto de los demás huéspedes.

SECCIÓN A. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS RECEPTORES.

1. Estudios Espectroscópicos de RMN, UV-Vis, Fluorescencia y EM.

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, los receptores sintéticos basados en complejos de zinc (II) suelen ocuparse como quimiosensores ópticos, debido a que el zinc (II) es biológicamente compatible, no es un redox activo a condiciones fisiológicas y en el caso de quimiosensores fluorogénicos, no extingue la fluorescencia. Es por ello, que una vez que se caracterizaron los ligantes **L1** y **L2**, estos se hicieron reaccionar en disolución de MeOH o MeCN con dos equivalentes de $Zn(OTf)_2$, para formar los complejos dinucleares respectivos. Bajo luz UV, se observa un incremento perceptible en la intensidad de fluorescencia cuando los ligantes se coordinan a Zn^{2+} . La caracterización en disolución de los complejos dinucleares de zinc (II), se realizó a través de técnicas espectroscópicas.

1.1 Receptor 1.

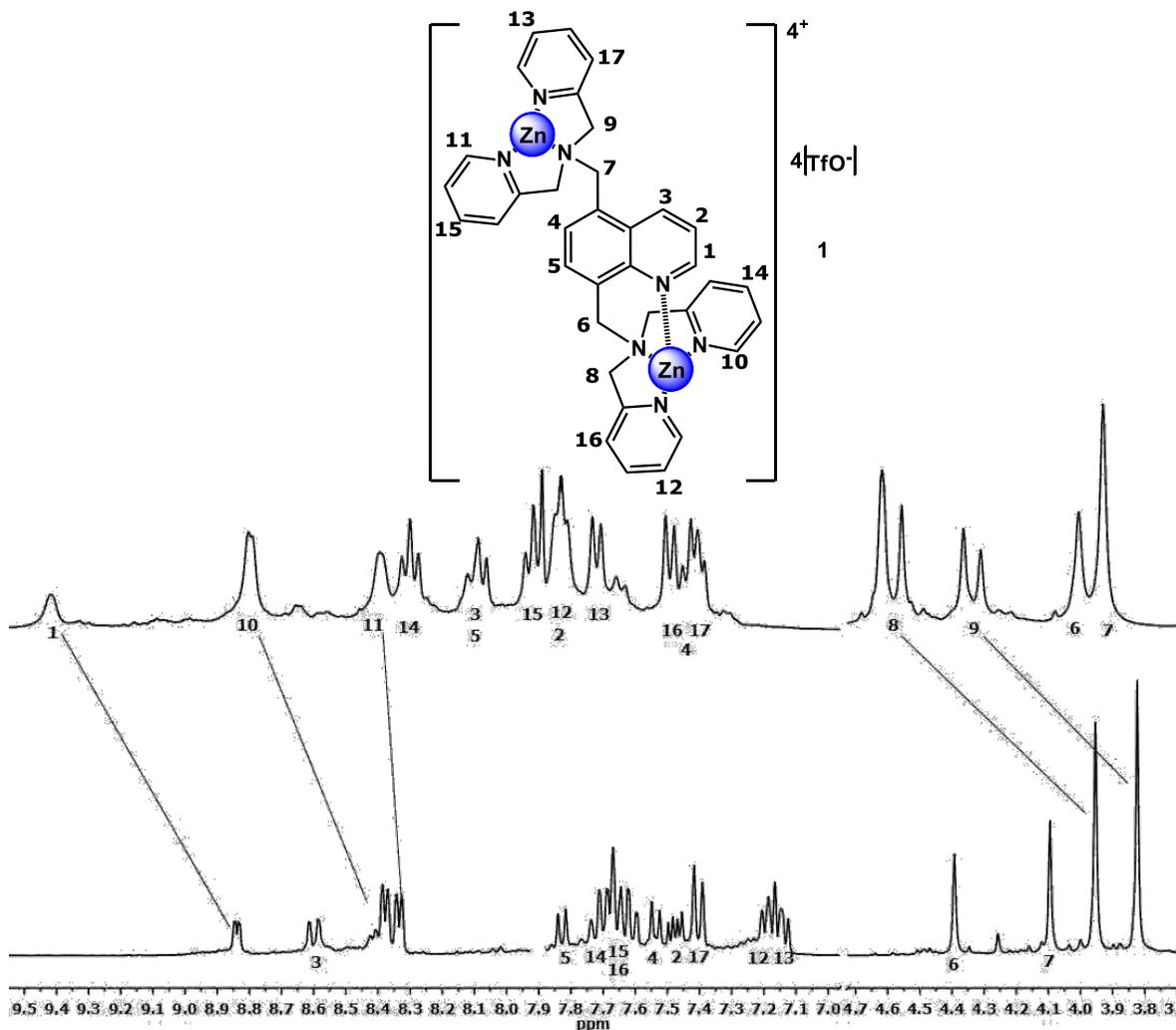


Esquema 4. 1 Síntesis de 1.

1H -NMR (300 MHz, MeOD) δ 9.42 (s, 1H), 8.80-8.79 (m, 2H) 8.40-8.39 (m, 2H) 8.33-8.27 (m, 2H), 8.12-8.06 (m, 2H), 7.94-7.89 (m, 2H), 7.85-81 (m, 3H), 7.73-7.71 (m, 2H), 7.51-7.38 (m, 5H), 4.62 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.31 (s, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.93 (s, 2H). **^{13}C -NMR** (300 MHz, MeOD) δ 154.53 (2C), 154.14 (2C), 152.24, 148.32 (2C), 146.96 (2C), 145.42, 141.95 (2C), 140.49 (2C), 135.89, 134.29, 132.25, 130.96, 130.10, 128.83, 125.64 (4C), 124.51 (2C), 124.36 (2C), 122.58, 59.07 (2C), 58.72 (2C), 55.68, 48.33. **EM** (ESI) m/z $[M + 3OTf]^+$ 1127.9.

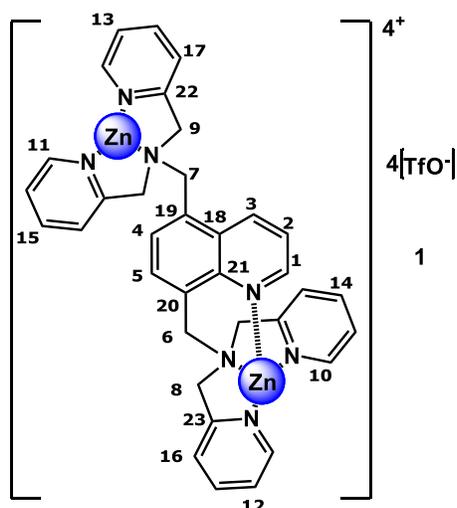
a. Espectroscopia de RMN.

Para realizar un análisis comparativo, a continuación, se presentan los espectros de RMN de **1** y **L1**. Los espectros incluyen experimentos unidimensionales (^1H , ^{13}C , ^{19}F , DEPT) y bidimensionales heteronucleares ($^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC). Todos los experimentos se realizaron en MeOD, en un equipo de 300 MHz. (Ver, Anexos).

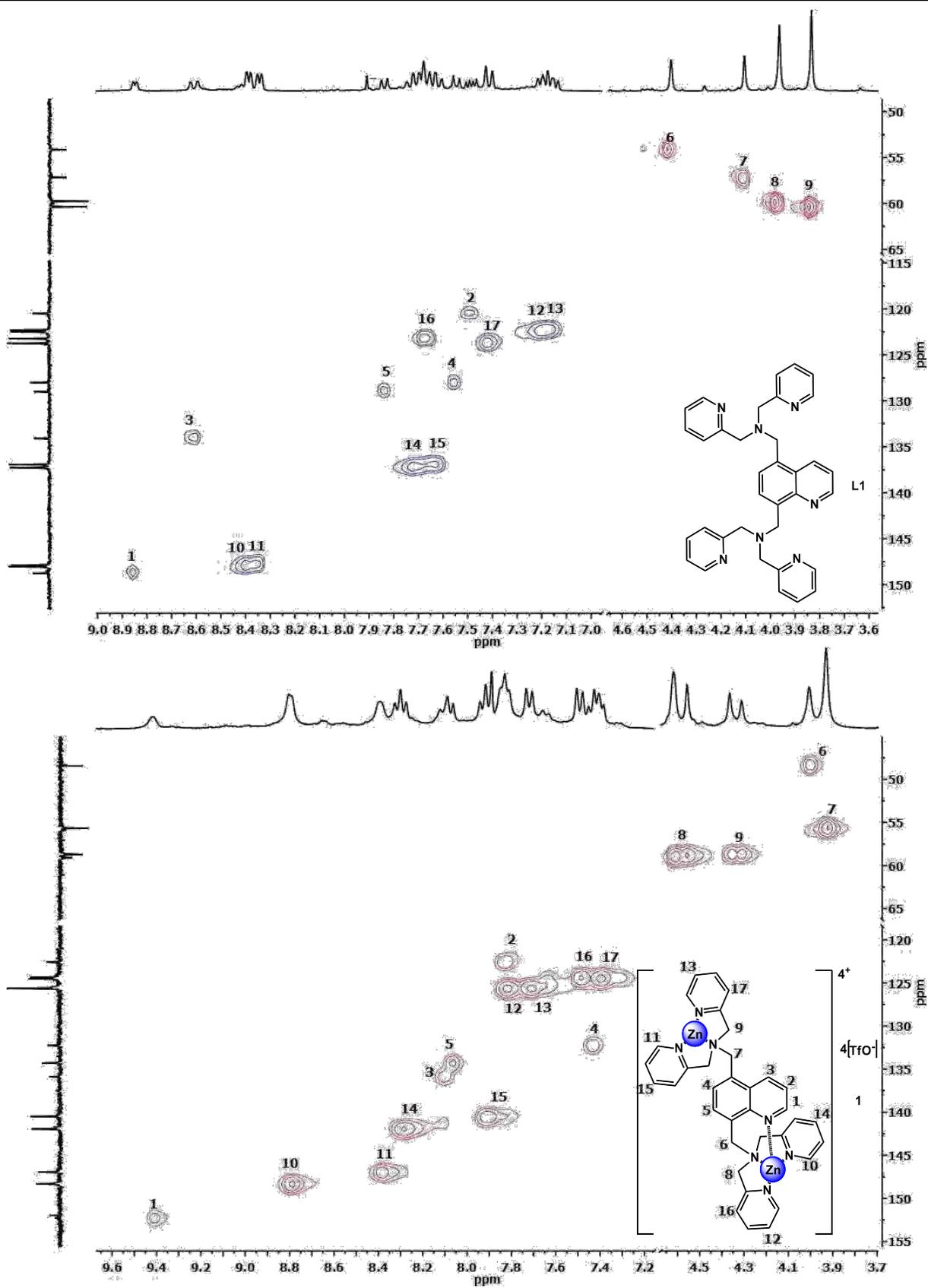


Esquema 4. 2 Espectros de ^1H -RMN de **L1** (inferior) y **1** (superior).

El Esquema 4.2, representa los espectros de ^1H -RMN del **L1** y **1**, se puede observar que hay fenómenos de desprotección cuando las unidades de DPA se coordinan a zinc (II), principalmente de las señales orto al nitrógeno de las piridinas y a las señales alifáticas de las unidades de DPA. Adicionalmente se puede observar que el hidrógeno orto al nitrógeno de la quinolina se desprotege, lo que indica que el nitrógeno de la quinolina participa en la coordinación de uno de los iones zinc (II).

Tabla 4.1 Desplazamientos químicos en MeOD (ppm) de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de L1 y 1.

	L1	1	$\Delta\delta$		L1	1	$\Delta\delta$
	^1H	^1H	^1H		^{13}C	^{13}C	^{13}C
1	8.86-8.85	9.42	0.56	1	148.75	152.24	3.49
2	7.51-7.47	7.85-7.81	0.34	2	120.49	122.58	2.09
3	8.62-8.59	8.12-8.06	0.50-0.53	3	134.1	135.89	1.79
4	7.56-7.53	7.51-7.38	0.05-0.15	4	128.01	132.25	4.24
5	7.85-7.82	8.12-8.06	0.27-0.24	5	129.01	134.29	5.28
6	4.42	3.93	0.46	6	54.13	48.33	5.80
7	4.09	4.01	0.08	7	57.15	55.68	1.47
8	3.98	4.62-4.56	0.64-0.58	8	59.74	59.07	0.67
9	3.83	4.36-4.31	0.53-0.48	9	60.33	58.72	1.61
10	8.40-8.35	8.80-8.79	0.40-0.44	10	148.04	148.32	0.28
11	8.40-8.35	8.40-8.39	0.04	11	147.9	146.96	0.94
12	7.22-7.14	7.85-7.81	0.63-0.67	12	122.5	125.64	3.14
13	7.22-7.14	7.73-7.71	0.51-0.57	13	122.29	125.64	3.35
14	7.75-7.61	8.33-8.27	0.58-0.66	14	137.25	141.95	4.7
15	7.75-7.61	7.94-7.89	0.19-0.28	15	136.94	140.49	3.55
16	7.75-7.61	7.51-7.38	0.24-0.23	16	123.25	124.51	1.26
17	7.43-7.40	7.51-7.38	0.08-0.02	17	123.74	124.36	0.61
				18	146.39	130.96	15.43
				19	127.45	128.83	1.38
				20	134.62	130.1	4.52
				21	157.93	145.42	12.51
				22	158.74	154.14	4.60
				23	158.74	154.53	4.21



Esquema 4. 3 Espectros ^{13}C , ^1H -HSQC de 1 (inferior) y L1 (superior).

Como se puede observar en los Esquemas 4.2-4.3 y en la Tabla 4.1, las señales alifáticas correspondientes a los cuatro grupos metileno de las unidades de DPA, sufren de una desprotección como es de esperarse debido a la coordinación de iones zinc (II), sin embargo, también se desdoblan como consecuencia del mismo fenómeno, esto debido a que los iones zinc proporcionan rigidez en **L1** y, por lo tanto, un ambiente magnético diferente en los núcleos de hidrógeno.

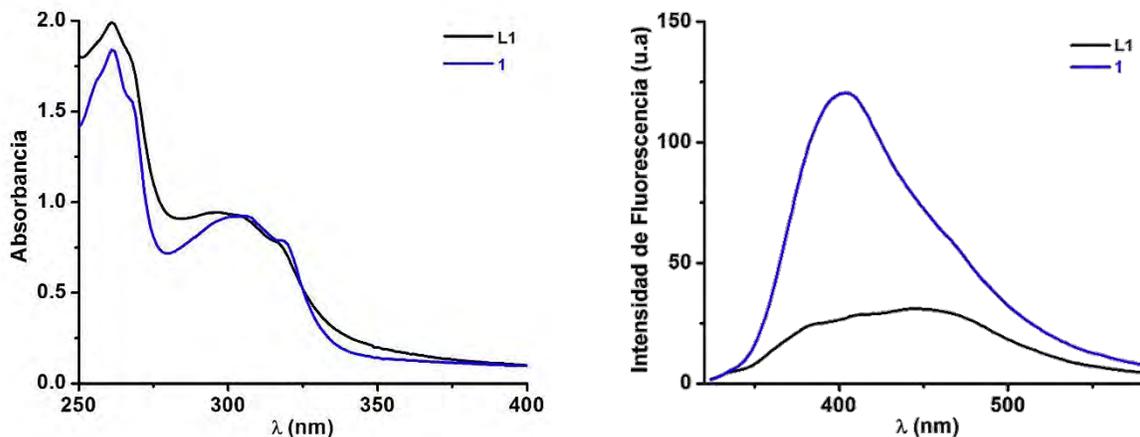
Algunas señales aromáticas y alifáticas, se desplazan a campo alto tras la formación del complejo dinuclear, por ejemplo, los dos grupos metileno asignados como “7” y “6” son de las señales que más se protegen. (Ver, Esquemas 4.2-4.3 y Tabla 4.1). Estos fenómenos de protección son consecuencia de la rigidez que presenta el ligante tras coordinarse a los iones zinc (II), lo que conlleva a incrementar la anisotropía magnética de los grupos aromáticos, que resulta en una disminución del campo magnético efectivo al que se someten los protones y en consecuencia de esto, ciertas señales se desplazan hacia campo alto.

En ^{19}F -RMN, el complejo dinuclear de zinc (II) presenta solo una señal en -80.04 ppm, indicando que los aniones trifluorometanosulfonato (OTf) se hallan en un entorno químico idéntico y además actuando como contraiones de la entidad dinuclear. El hecho de permanecer como contraiones en la especie, no implica un enlace formal dentro de la esfera de coordinación del zinc (II), sino una estabilización de cargas en el sistema, esta afirmación puede ser soportada con el desplazamiento del NaOTf (-80 ppm).

b. Espectrofotometría de UV-Vis y Espectrofluorimetría.

Se realizaron titulaciones espectrofluorimétricas y espectrofotométricas de UV-Vis de **L1** con $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ para determinar las constantes de formación del complejo dinuclear **1**. Cada titulación se realizó en medio acuoso a pH 7.0 conteniendo MOPS 40 mM, utilizando una concentración de **L1** igual a 150 μM , los datos experimentales se pueden consultar en la Tabla 4.2.

El Esquema 4.4 representa los espectros de absorción UV-Vis y emisión de fluorescencia de una disolución 150 μM de **L1** y **1**. Se puede observar un máximo de emisión de fluorescencia en 404 nm de **L1** y **1** cuando la longitud de excitación es a 300 nm. El Esquema 4.5 representa las titulaciones por UV-Vis y fluorescencia, donde se observan los cambios en la absorción UV-Vis y emisión de fluorescencia de **L1**, conforme se adiciona $\text{Zn}(\text{OTf})_2$.

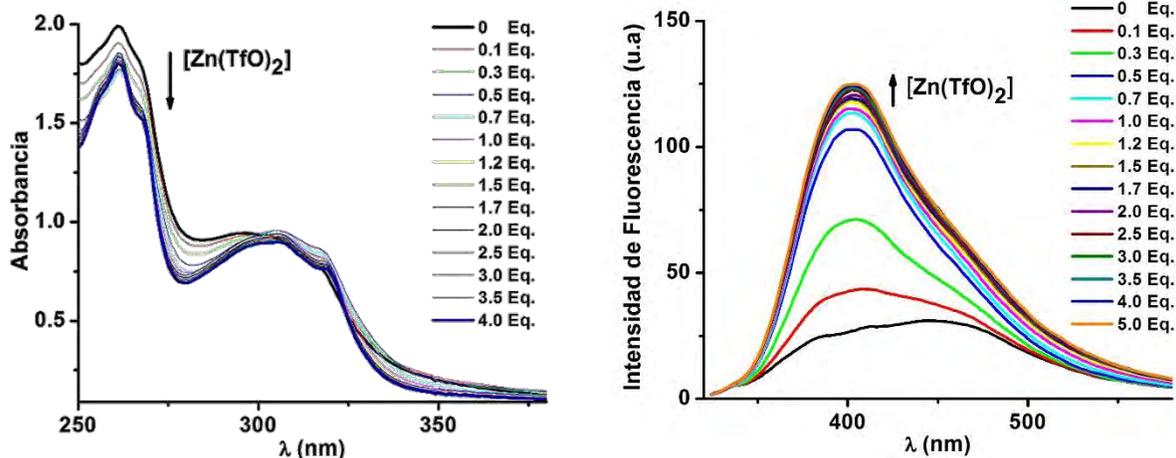


Esquema 4.4 Espectros de absorción y emisión de fluorescencia (λ_{ex} 300 nm) para **L1** (150 μM) y **1** (150 μM) a pH 7.0 (MOPS, 40 mM) en agua.

L1 fluoresce menos que su respectivo complejo dinuclear (**1**), este fenómeno es conocido como CEF (Chelation Enhancement of Fluorescence; Incremento de la Fluorescencia por Quelación) y se debe principalmente a que los pares de electrones libres de los átomos de nitrógeno se encuentran formando enlaces de coordinación con los iones zinc (II), esto minimiza notoriamente el efecto PET, que es un proceso de transferencia electrónica que ocurre a distancia entre el fluoróforo en el estado excitado y alguna otra especie que puede actuar como dador o aceptor (amortiguador). El proceso PET está controlado por las energías relativas de los orbitales HOMO-LUMO del fluoróforo y de un orbital molecular externo. En el caso de **L1**, el fluoróforo es el fragmento de quinolina y los amortiguadores son las unidades de DPA, que actúan como buenos donadores de electrones en el estado excitado, dicho en otras palabras, los electrones no enlazantes de los átomos de nitrógeno de DPA, poseen una energía adecuada para producir el amortiguamiento de la fluorescencia del fragmento de quinolina. Cuando los iones zinc (II) se coordinan a **L1** a través de las unidades de DPA, utilizando los electrones no-enlazantes de estas unidades, la energía de los electrones que forman ahora “enlaces de coordinación”, disminuye drásticamente, por lo que el PET ya no es factible y la fluorescencia de la molécula se restituye.

Tabla 4.2 Constantes de asociación $\log K_A$ (M^{-1}) para **L1** (150 μM) con $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ (0-5.0 eq.) a pH 7.0 (MOPS, 40 mM) en agua.

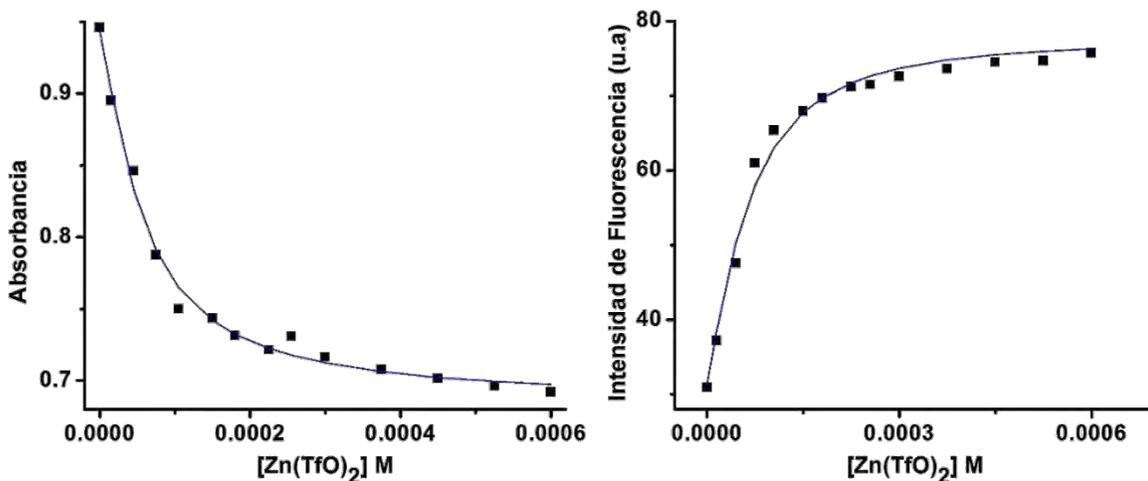
	UV-Vis	Fluorescencia
K_{A1}	4.76 ± 0.04	4.81 ± 0.05
K_{A2}	4.17 ± 0.09	4.00 ± 0.08



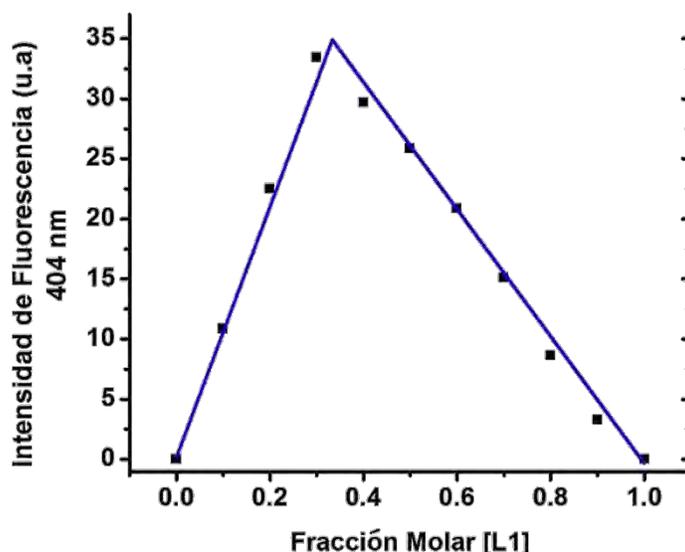
Esquema 4.5 Titulación espectrofotométrica UV-Vis y fluorimétrica (λ_{ex} 300 nm) para **L1** (150 μM) con $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ (0-5.0 eq.) a pH 7.0 (MOPS, 40 mM) en agua.

El Esquema 4.5 (izquierda), representa la titulación entre **L1** y $[\text{Zn}(\text{OTf})_2]$, donde se observa claramente la presencia de dos puntos isobésticos a 300 y 325 nm. Estos puntos isobésticos comprueban la presencia de dos especies en disolución, esto corrobora la formación del complejo dinuclear **1**.

Los perfiles de las titulaciones de **L1** con $[\text{Zn}(\text{OTf})_2]$ se muestran en el Esquema 4.6. Se observa que para el perfil UV-Vis, la absorbancia disminuye (280 nm) conforme se adiciona $[\text{Zn}(\text{OTf})_2]$, para el perfil de fluorescencia se puede observar un incremento en la emisión de fluorescencia (404 nm), conforme se adiciona $[\text{Zn}(\text{OTf})_2]$.



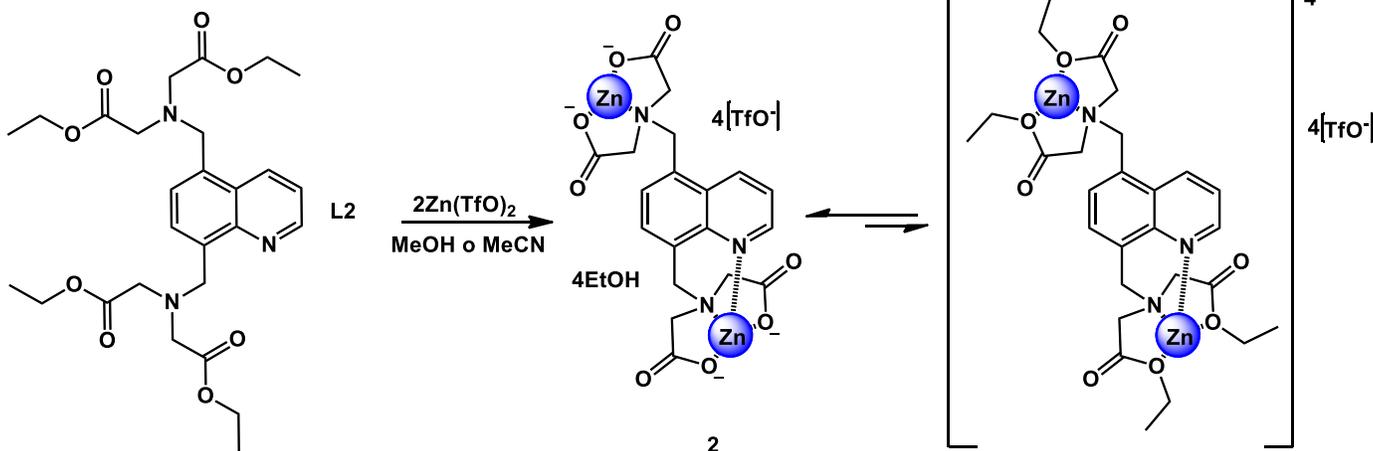
Esquema 4.6 Perfiles de las titulaciones UV-Vis $A=280$ nm (Izquierda) y fluorescencia $\lambda_{\text{ex}}=300$ nm (derecha) para **L1** (150 μM) con $\text{Zn}(\text{OTf})_2$.



Esquema 4.7 Diagrama de Job de **L1** con $\text{Zn}(\text{OTf})_2$. $[\text{L1} + \text{Zn}^{2+}] = 150 \mu\text{M}$.

Para determinar la estequiometría de **L1** con los iones zinc (II), se utilizó el método de variación continua. El Esquema 4.7 representa el diagrama de Job. Se puede observar que el máximo de emisión de fluorescencia se encuentra en una fracción molar de **L1** aproximada a 0.33, por lo tanto, se corrobora que la estequiometría de **1** es 1:2 **L1**: Zn^{2+} .

1.2 Receptor 2.

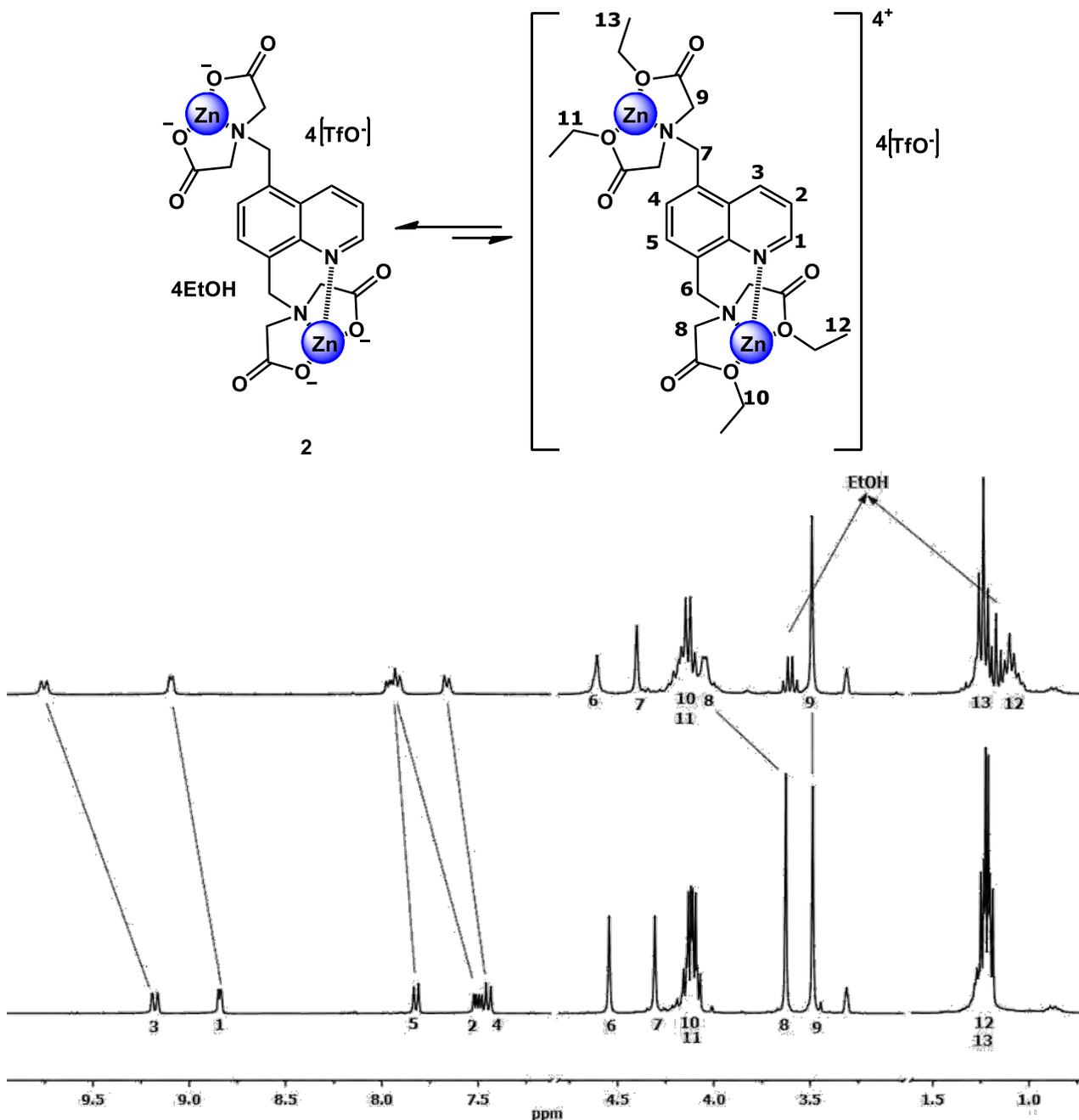


Esquema 4. 8 Síntesis de **2**.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOD) δ 9.77-9.74(m, 1H), 9.10-9.09(m, 1H), 7.98-7.91(m, 2H), 7.68-7.65(m, 1H), 4.61(s, 2H), 4.40(s, 2H), 4.23-4.04(m, 12H), 3.49(s, 4H), 1.26-1.21(m, 8H), 1.13-1.08(m, 4H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (300 MHz, MeOD) δ 176.82 (2C), 171.13 (2C), 151.80, 145.48, 140.40, 138.79, 135.99, 129.25 (2C), 127.33, 122.05, 65.06 (2C), 60.35 (2C), 59.82, 57.14 (2C), 55.03, 54.21 (2C), 13.17 (2C), 12.50 (2C). **EM** (ESI) m/z $[\text{M} + \text{MeCN} + 10\text{Tf}]^-$ 733.2.

a. Espectroscopia de RMN.

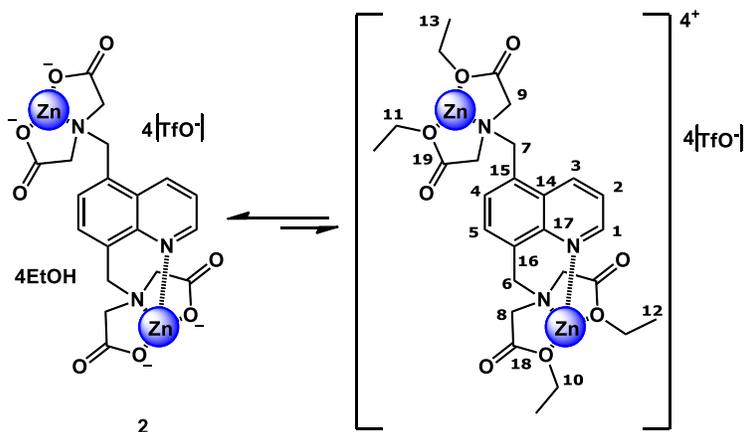
Para realizar un análisis comparativo, a continuación, se presentan los espectros de RMN de **2** y **L2**. Los espectros incluyen experimentos unidimensionales (^1H , ^{13}C , ^{19}F , DEPT) y bidimensionales heteronucleares ($^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC). Todos los experimentos se realizaron en MeOD, en un equipo de 300 MHz. (Ver, Anexos).



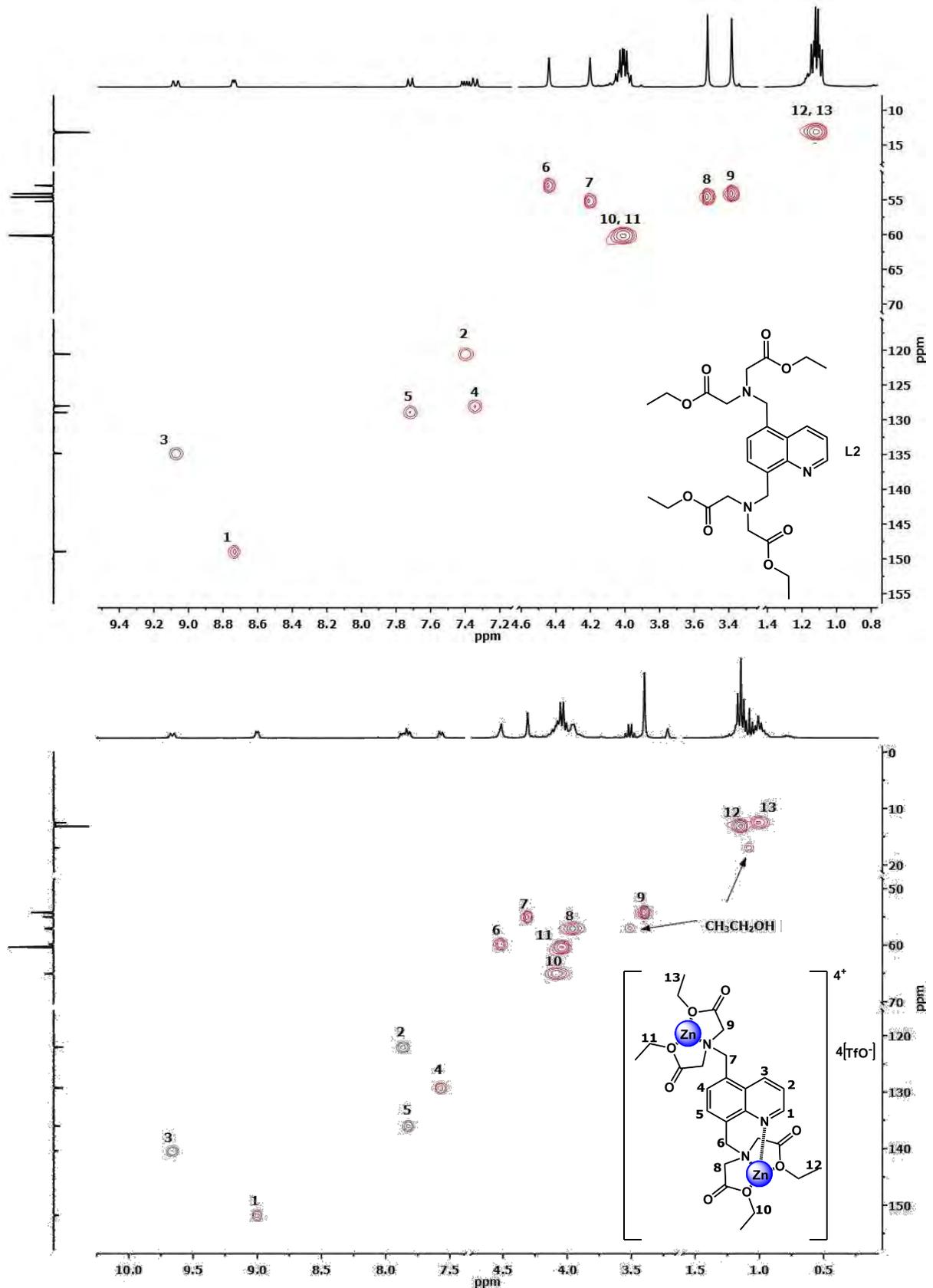
Esquema 4. 9 Espectros de ^1H -RMN de **L2** (inferior) y **2** (superior).

El Esquema 4.9, representa los espectros de ^1H -RMN del **L2** y **2**, se puede observar que hay fenómenos de desprotección cuando las unidades de IDA se coordinan a zinc (II), principalmente de las señales aromáticas de la quinolina y los grupos $-\text{CH}_2\text{CO}_2-$ de las unidades de IDA. Las señales 1 y 3 de los hidrógenos de la quinolina exhiben la mayor desprotección, lo que indica que el nitrógeno de la quinolina participa en la coordinación de uno de los iones zinc (II).

Tabla 4.3 Desplazamientos químicos en MeOD (ppm) de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de **L2** y **2**.



	L2	2	$\Delta\delta$		L2	2	$\Delta\delta$
	^1H	^1H	^1H		^{13}C	^{13}C	^{13}C
1	8.85-8.84	9.10-9.09	0.25	1	148.95	151.80	2.85
2	7.52-7.48	7.98-7.91	0.46-0.43	2	120.54	122.05	1.51
3	9.19-9.16	9.77-9.74	0.58	3	134.86	140.40	5.54
4	7.46-7.43	7.68-7.65	0.22	4	128.03	129.25	1.22
5	7.83-7.81	7.98-7.91	0.15-0.10	5	128.93	135.99	7.06
6	4.54	4.61	0.07	6	55.21	59.82	4.61
7	4.31	4.40	0.09	7	52.97	55.03	2.06
8	3.63	4.23-4.04	0.6-0.41	8	54.60	57.14	2.54
9	3.49	3.49	0	9	54.14	54.21	0.07
10	4.19-4.01	4.23-4.04	0.04-0.03	10	60.18	65.06	4.88
11	4.19-4.01	4.23-4.04	0.04-0.03	11	60.18	60.35	0.17
12	1.28-1.19	1.26-1.21	0.02	12	13.15	13.17	0.02
13	1.28-1.19	1.13-1.08	0.15-0.11	13	13.15	12.50	0.65
				14	136.18	138.79	2.61
				15	127.86	127.33	0.53
				16	133.86	129.25	4.61
				17	146.78	145.48	1.3
				18, 19	171.68, 171.32	176.82, 171.13	5.14, 0.19



Esquema 4.10 Espectros $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HSQC de 2 (inferior) y L2 (superior).

En el Esquema 4.9 se puede observar la presencia de dos señales ajenas al complejo dinuclear, estas señales corresponden a EtOH, este proviene del producto de hidrolisis de los grupos éster que presenta **L2**. Es muy conocido que la hidrolisis de ésteres ocurre a cualquier pH, sin embargo, la presencia de ácidos de Lewis como los iones zinc (II), favorecen la hidrolisis de dichos grupos funcionales, esto debido a que los iones zinc (II) se coordinan a través de los pares de electrones no enlazantes que contiene el grupo éster, este proceso favorece el ataque nucleofílico al carbono del grupo carbonilo y en consecuencia de eso, se promueve la hidrolisis para generar EtOH. El espectro de masas obtenido por cromatografía de líquidos acoplada a masas (ESI), corrobora la presencia del complejo dinuclear **2** con unidades de IDA totalmente hidrolizadas en disolución de MeCN.

Como se puede observar en los Esquemas 4.9-4.10 y en la Tabla 4.3, las señales alifáticas “6”, “7” y “8”, sufren de una desprotección como es de esperarse debido a la coordinación de iones zinc (II).

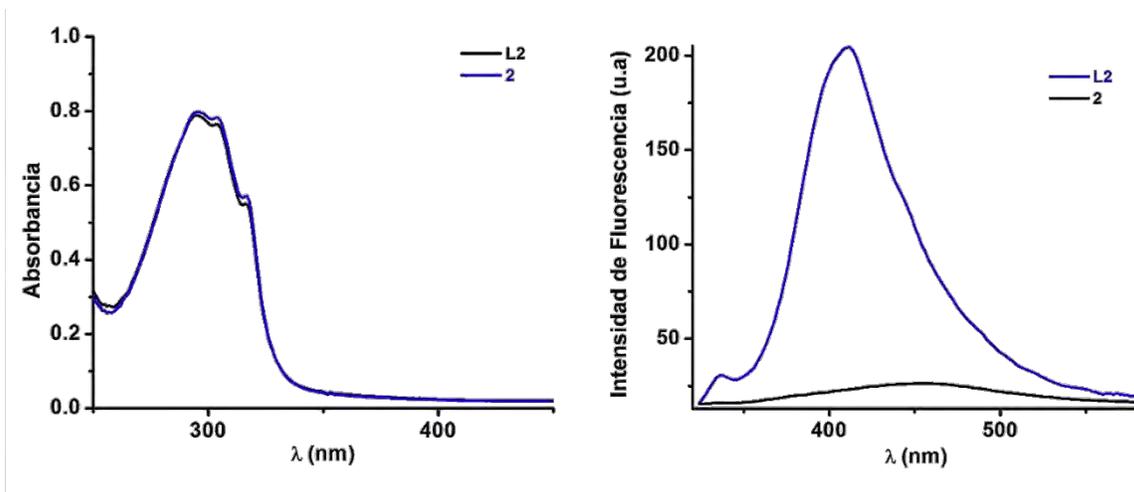
En ^{19}F -RMN, el complejo dinuclear **2** presenta una única banda ubicada en -80.12 ppm, la cual indica que todos los aniones trifluorometanosulfonato (OTf) se hallan en un entorno químico idéntico y no coordinativo. Esta afirmación puede ser soportada con el desplazamiento del NaOTf (-80 ppm).

b. Espectrofotometría de UV-Vis y Espectrofluorimetría.

El Esquema 4.11 representa los espectros de absorción UV-Vis y emisión de fluorescencia de una disolución 150 μM de **L2** y **2**. Se puede observar un máximo de emisión de fluorescencia en 410 nm de **L2** y **2** cuando la longitud de excitación es a 300 nm.

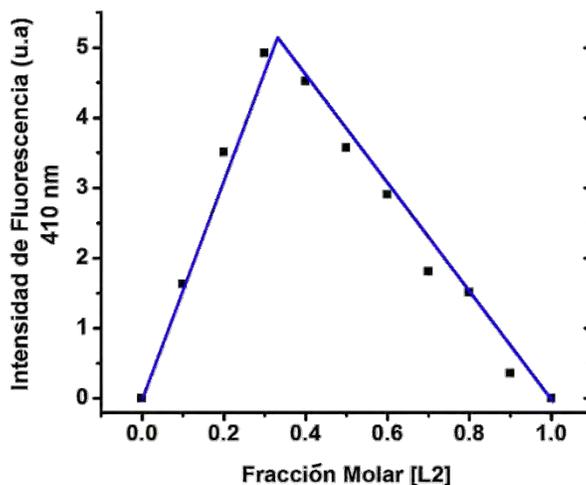
Cada espectro de UV-Vis y de fluorescencia del complejo dinuclear **2**, se tomó 30 min después de su preparación, esto para cerciorarse que se ha formado el complejo dinuclear neutro, es decir, que se han hidrolizado los cuatros ésteres que conformaban a **L2**.

Los espectros UV-Vis de **L2** y **2** (ver Esquema 4.11), son prácticamente idénticos (no hay mucha diferencia en la absorción UV-Vis entre un grupo éster no conjugado y su respectivo carboxilato) y debido a que no hay un cambio espectral significativo entre el ligante y la formación del complejo, no se pudieron calcular las constantes de formación de **L2** con $\text{Zn}(\text{OTf})_2$. **L2** presenta el mismo fenómeno CEF que **L1** cuando coordina dos iones zinc (II).



Esquema 4.11 Espectros de absorción y emisión de fluorescencia (λ_{ex} 300 nm) para **L2** y **2** a pH 7.0 (MOPS, 40 mM) en agua. Los espectros de **2** se tomaron después de 30 min de su preparación.

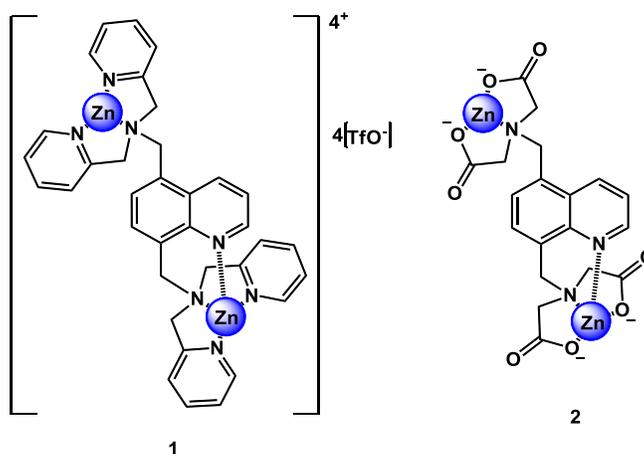
Para determinar la estequiometría de **L2** con los iones zinc (II), se utilizó el método de variación continua. El Esquema 4.12 representa el diagrama de Job. Se puede observar que el máximo de emisión de fluorescencia se encuentra en una fracción molar de **L2** aproximada a 0.33, por lo tanto, se corrobora que la estequiometría de **2** es 1:2 **L2**:Zn²⁺.



Esquema 4.12 Diagrama de Job de **L2** con Zn(OTf)₂. [**L2** + Zn²⁺]= 150 μ M.

2. Análisis Estructural de los Complejos en Disolución.

Los ligandos **L1** y **L2** presentan dos unidades quelantes para coordinar iones metálicos como el zinc (II). De acuerdo a los gráficos de Job, obtenidos por fluorimetría en disolución acuosa y a pH 7.0, los ligandos forman los respectivos complejos dinucleares **1** y **2** de zinc (II). Dichos complejos fluorescen a las mismas condiciones y presentan constantes de formación del orden de 10^4 M^{-1} .



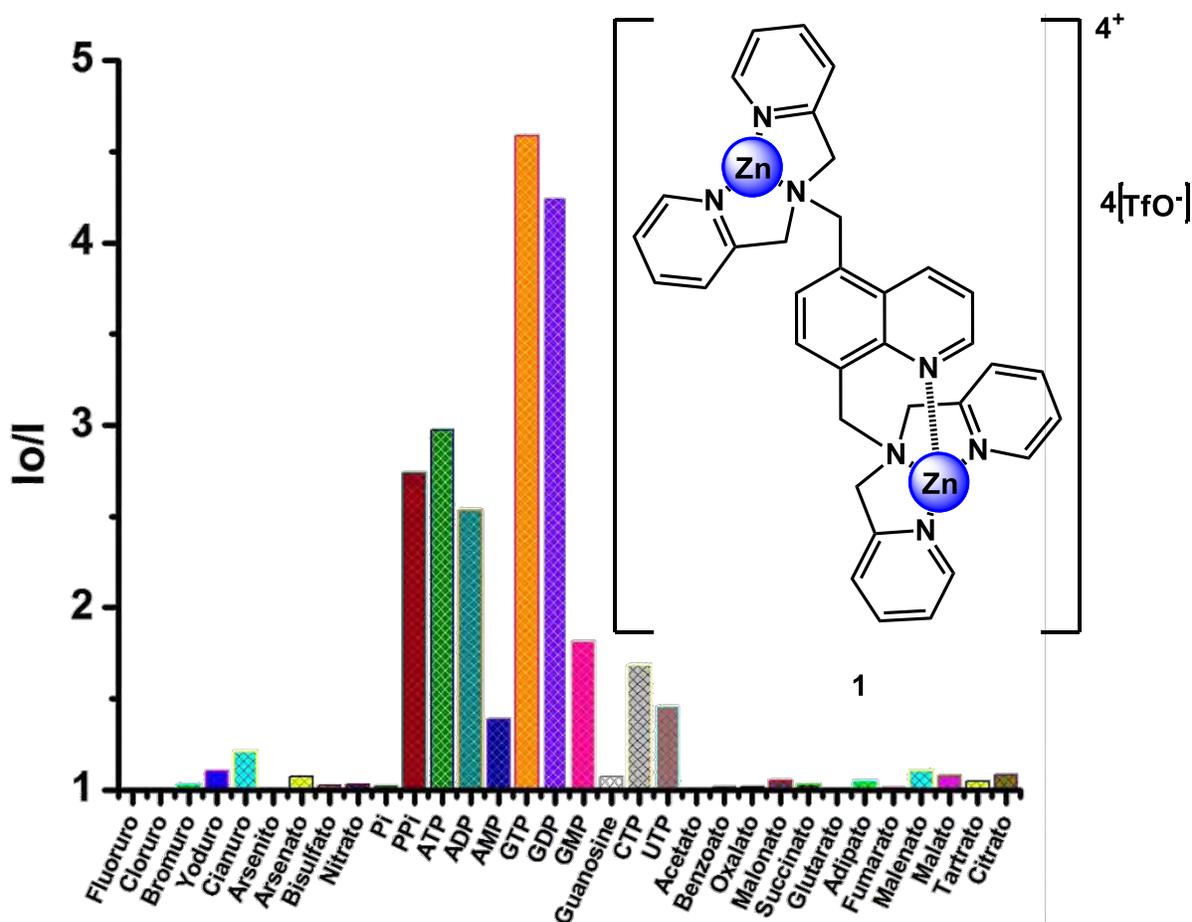
Esquema 4.13 Quimiosensores fluorescentes basados en receptores dinucleares de zinc (II) sintetizados en este estudio.

Como era de esperarse, durante la formación del complejo **2**, se puede observar en RMN, la presencia de dos señales correspondientes a EtOH, que es el producto de hidrolisis de los grupos éster que presenta **L2**. La presencia de ácidos de Lewis como los iones zinc (II), aceleran la hidrolisis de ésteres, esto debido a que los iones zinc (II) se coordinan a través de los pares de electrones no enlazantes que contiene el grupo éster, este proceso favorece el ataque nucleofílico al carbono del grupo carbonilo y en consecuencia de esto, se promueve la hidrolisis para generar EtOH. De esta manera se obtiene un ligante tetraaniónico que coordina dos iones zinc (II) y el resultado es un complejo neutro. Al tener un complejo dinuclear neutro de zinc (II), favorecemos las interacciones electrostáticas entre los iones zinc (II) y las unidades quelantes de IDA, sin quitar la funcionalidad de usarse como quimiosensor luminiscente para moléculas de importancia biológica. El espectro de masas obtenido por cromatografía de líquidos acoplada a masas (ESI), corrobora la presencia del complejo dinuclear **2** con unidades de IDA totalmente hidrolizadas en disolución de MeCN-Agua. Debido a que los ligantes no son simétricos, el número de coordinación de cada ion zinc (II) es diferente, esto se corroboró con experimentos uni y bidimensionales de RMN. Los ligantes **L1** y **L2** presenta dos unidades quelantes de DPA e IDA respectivamente, las unidades quelantes coordina de manera tridentada cada ion zinc (II), sin embargo, la cercanía de los quelantes sustituidos en la posición 5 de la quinolina, promueve a que el nitrógeno de la quinolina también participe en la coordinación, de esta manera, uno de los iones zinc (II) forma un quelato tridentado y el otro, forma un quelato tetradentado. Ambos quelatos presentan sitios vacantes para coordinar huéspedes básicos de Lewis, como nucleótidos, aminoácidos, halogenuros, dicarboxilatos y oxoaniones, por lo que los receptores dinucleares de zinc (II) **1** y **2** pueden fungir como quimiosensores luminiscentes para estas especies.

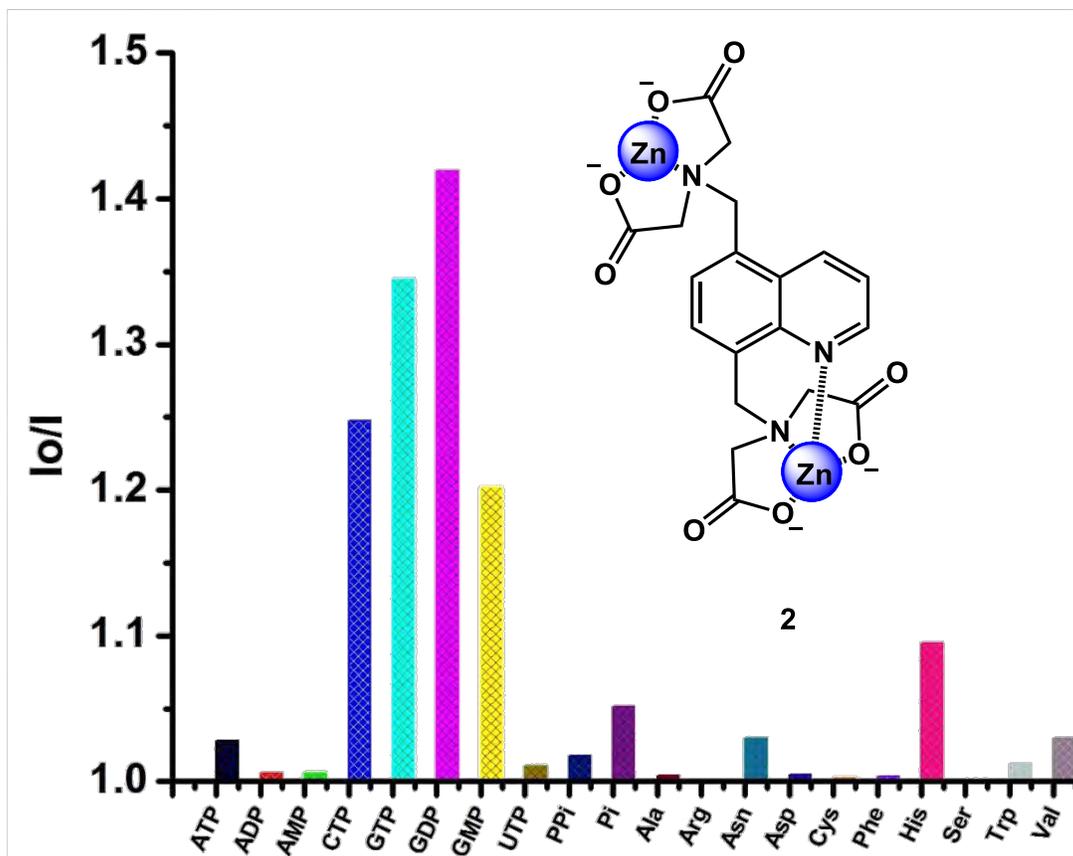
SECCIÓN B. ESTUDIOS DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR.

1. Estudios por Espectroscopia de Fluorescencia.

Los complejos dinucleares **1** y **2** fueron estudiados como quimiosensores para aniones con relevancia biológica los cuales incluyen especies inorgánicas (halogenuros, oxoaniones) y especies orgánicas (nucleótidos, aminoácidos, carboxilatos). En general la adición de alícuotas de aniones extingue la fluorescencia de soluciones acuosas de los quimiosensores **1** y **2** a pH= 7.0 (MOPS, 40 mM). La selectividad relativa " I_0/I vs [Anión]", (I_0 = Intensidad fluorescente del receptor, I = Intensidad después de cada adición de alícuotas de aniones) proporciona información referente a que tanto un sustrato extingue la fluorescencia de un quimiosensor. Los Esquemas 4.14 y 4.15, representan los gráficos de barras " I_0/I vs anión" donde se pueden observar los cambios en la emisión de fluorescencia de los quimiosensores **1** y **2**, después de la adición de 7 eq. de anión.



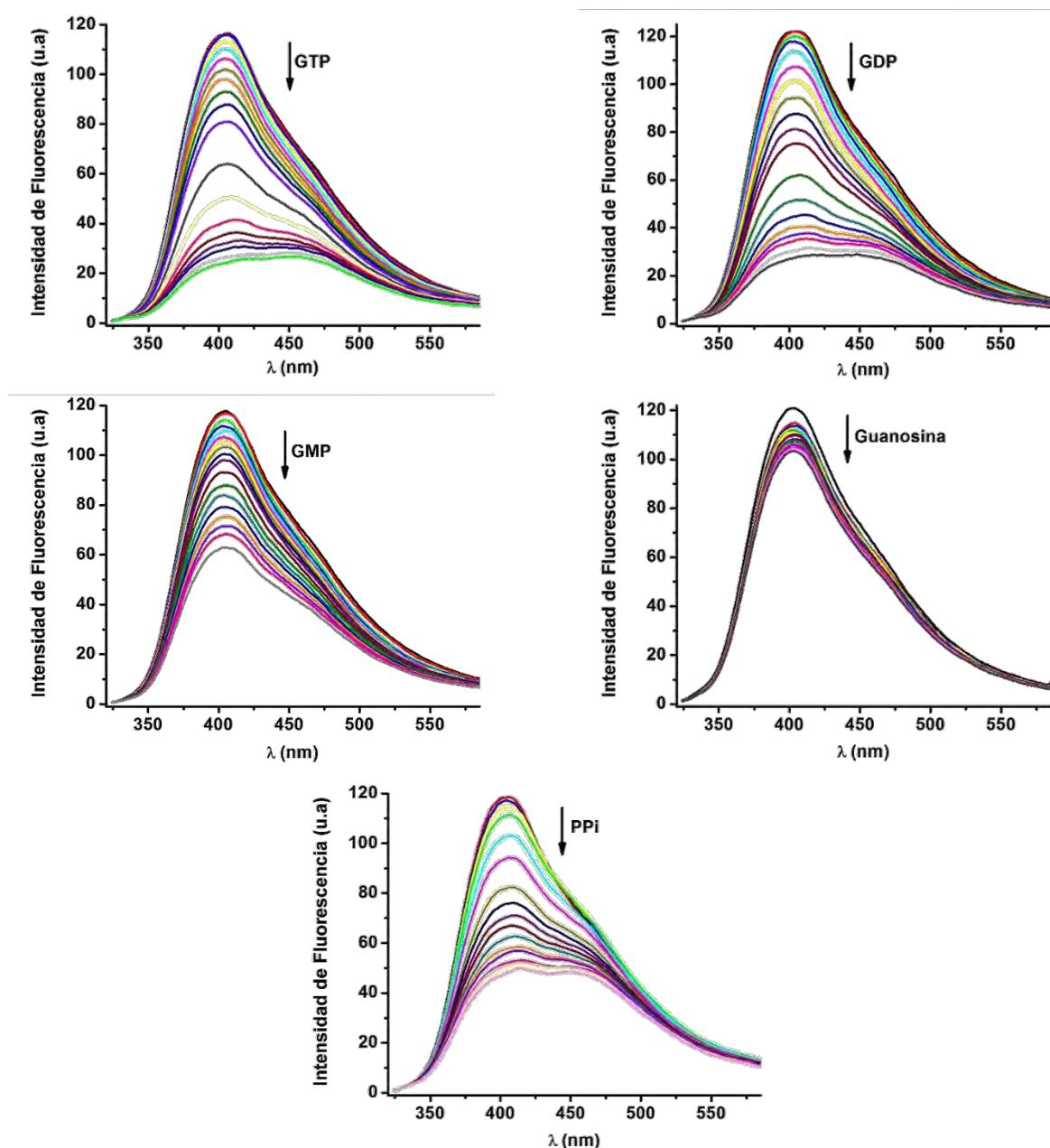
Esquema 4.14 Cambios en la emisión de fluorescencia de **1** (150 μ M) después de adicionar 7 eq. de anión.



Esquema 4.15 Cambios en la emisión de fluorescencia de **2** (150 μ M) después de adicionar 7 eq. de anión.

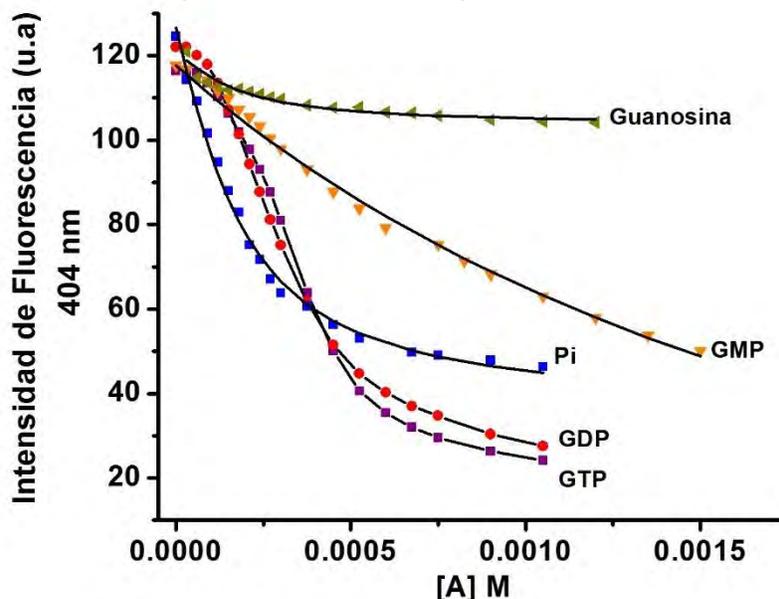
Como se puede observar en el Esquema 4.14, el mayor cambio en la emisión de fluorescencia de **1** ocurre en presencia de PPI y moléculas fosforiladas como los nucleótidos. Debido a que estos aniones apagan fuertemente la fluorescencia de **1**, se decidió hacer un estudio detallado con estas especies, en concreto con la familia de nucleótidos derivados de guanosina, pues el mayor cambio de emisión de fluorescencia se presenta con GTP y GDP. Para el caso del quimiosensor **2**, el mayor cambio en la emisión de fluorescencia se presenta con la familia de nucleótidos derivados de guanosina, en especial con GDP. Si comparamos los cambios que existen en la emisión de fluorescencia de **1** con respecto a los que presenta **2**, para la misma familia de nucleótidos, se puede observar que **1** es más sensible a la presencia de dichos aniones. Una posible razón a esto radica en el modo de unión entre quimiosensor-nucleótido, donde interacciones supramoleculares trabajan de manera aditiva, favoreciendo el proceso de asociación. Para el caso del quimiosensor **1**, las interacciones π existen en mayor probabilidad si se compara con el quimiosensor **2**. Adicionalmente la contribución electrostática en la asociación del sensor **1** (tetracatiónico) puede resultar en una mayor afinidad por aniones que la determinada por el sensor neutro **2**.

El quimiosensor **1** es soluble en un intervalo de concentraciones micromolares en agua pura conteniendo MOPS (40 mM) a pH 7.0. El espectro de emisión ($\lambda_{ex}= 300$ nm) muestra un máximo a 404 nm. (Ver Esquema 4.4). En el caso del quimiosensor **1**, la adición de PPI y derivados de guanosina (GTP, GDP, GMP) genera una fuerte respuesta de apagamiento de sus soluciones acuosas, sin modificación del máximo. El Esquema 4.16, muestra las titulaciones fluorimétricas para PPI, GTP, GDP, GMP y adenosina (0-7 eq.).



Esquema 4.16 Titulaciones fluorimétricas ($\lambda_{ex}= 300$ nm) de **1** (150 μ M) a pH 7.0 con adiciones de guanosina y sales de sodio de PPI, GTP, GDP, GMP.

El Esquema 4.17 muestra los perfiles I vs [A] (I= Intensidad fluorescente del receptor, [A]= Concentración del anión) obtenidos de titulaciones fluorimétricas de **1** con PPI y una serie de nucleótidos en condiciones experimentales del Esquema 4.16.



Esquema 4.17 Perfiles de las titulaciones fluorimétricas de **1** con guanosina, PPI, GTP, GDP, GMP.

Los perfiles obtenidos del Esquema 4.17 para PPI, GMP y guanosina se ajustan bien a la siguiente ecuación

$$I_{obs} = I_0 + \frac{(I_{\infty} - I_0) \left\{ [R]_0 + [A] + \frac{1}{K_A} - \left[\left([R]_0 + [A] + \frac{1}{K_A} \right)^2 - 4[R]_0[A] \right]^{0.5} \right\}}{2[R]_0}$$

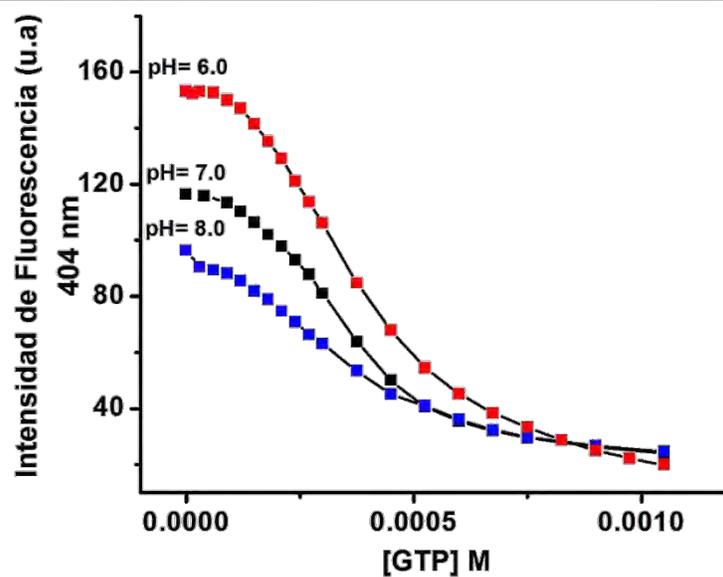
La ecuación se basa en un equilibrio 1:1, donde I_{obs} representa el cambio observado en la emisión de fluorescencia en función del analito, I_0 corresponde a la emisión de fluorescencia del receptor, I_{∞} simboliza la emisión de fluorescencia a saturación con el analito, $[R]_0$ concierne a la concentración del receptor, $[A]$ es la concentración del analito y finalmente K_A es la constante de asociación. Interessantemente, los perfiles obtenidos para GTP y GDP son curvas sigmoideas que no se ajustan a un modelo clásico 1:1 descrito por la ecuación anterior, en principio indican más de un equilibrio. Estos perfiles fueron ajustados a una combinación de modelos estequiométricos 1:2 y 2:2 correspondientes a las especies $[1:Nucleotido_2]$ y $[1_2:Nucleotido_2]$ respectivamente. De los datos experimentales se calcularon constantes de asociación $\log\beta_1$ y $\log\beta_2$ (ver Tabla 4.4) con un error menor al 10 %, utilizando el software Hyp Spec-Stability constants 2014.⁵⁹

La Tabla 4.4 resume los valores calculados de las constantes de asociación para **1** con los aniones. La afinidad del quimiosensor **1** por los aniones, tiene la siguiente tendencia $\text{GTP} > \text{GDP} > \text{PPi} > \text{GMP} > \text{Guanosina}$.

Tabla 4.4 Constantes de asociación $\log K_A$ (M^{-1}) de **1** con guanosina, PPi, GTP, GDP, GMP. (pH 7.0).

	$\log \beta_1$	$\log \beta_2$
GTP	[1:GTP ₂] 8.49±0.03	[1 ₂ :GTP ₂] 18.53±0.03
GDP	[1:GDP ₂] 7.78±0.05	[1 ₂ :GDP ₂] 9.29±0.05
GMP	[1:GMP] 2.83±0.04	-
Guanosina	[1:Guanosina] 2.81±0.05	-
H₃P₂O₇⁻	[1:PPi] 4.02±0.07	-

La tendencia de **1** ($\text{GTP} > \text{GDP} > \text{PPi} > \text{GMP} > \text{Guanosina}$) puede explicarse en función de la longitud del nucleótido, esta es modulada por el número de grupos fosfatos, a mayor número de grupos fosfato, mayor interacción de extremo a extremo entre las dos unidades DPA-Zn²⁺. La presencia de tres o dos grupos fosfatos incrementa notablemente la afinidad de **1** por nucleótidos de guanosina. La ausencia de grupos fosfatos arroja valores de K_A menores por varios órdenes de magnitud, por lo que necesariamente el modo de unión entre los nucleótidos y **1**, es de forma ditópica a través de los grupos fosfato. Adicionalmente y debido a que el nucleótido GTP presenta una mayor respuesta al apagamiento de la emisión de la fluorescencia del quimiosensor **1**. Se decidió analizar el efecto del pH en el reconocimiento de GTP, por lo que el Esquema 4.18 representa los perfiles de las titulaciones fluorimétricas de **1** con GTP a diferente pH (6-8).



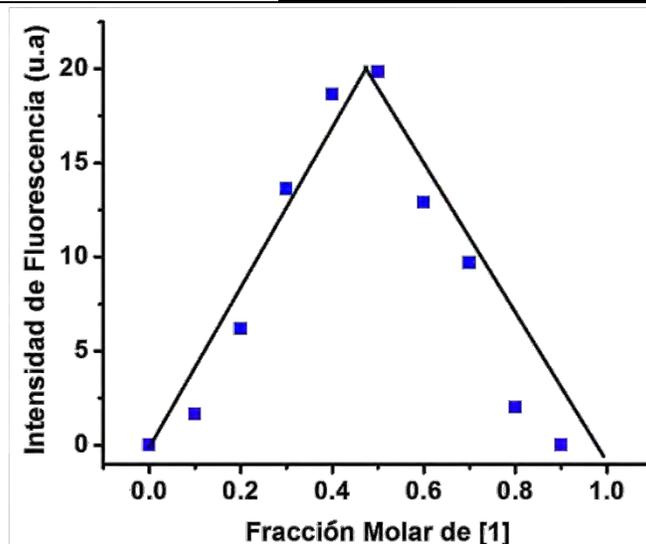
Esquema 4.18 Perfiles de las titulaciones fluorimétricas de **1** con GTP a diferente pH.

Tabla 4.5 Constantes de asociación $\log K_A$ (M^{-1}) de **1** con GTP a diferente pH (MOPS-MES 40 mM).

	$\log \beta_1$	$\log \beta_2$
pH= 8.0	[1:GTP ₂] 4.17±0.04	[1 ₂ :GTP ₂] 12.28±0.05
pH= 7.0	[1:GTP ₂] 8.49±0.03	[1 ₂ :GTP ₂] 18.53±0.03
pH= 6.0	[1:GTP ₂] 7.28±0.03	[1 ₂ :GTP ₂] 16.72±0.05

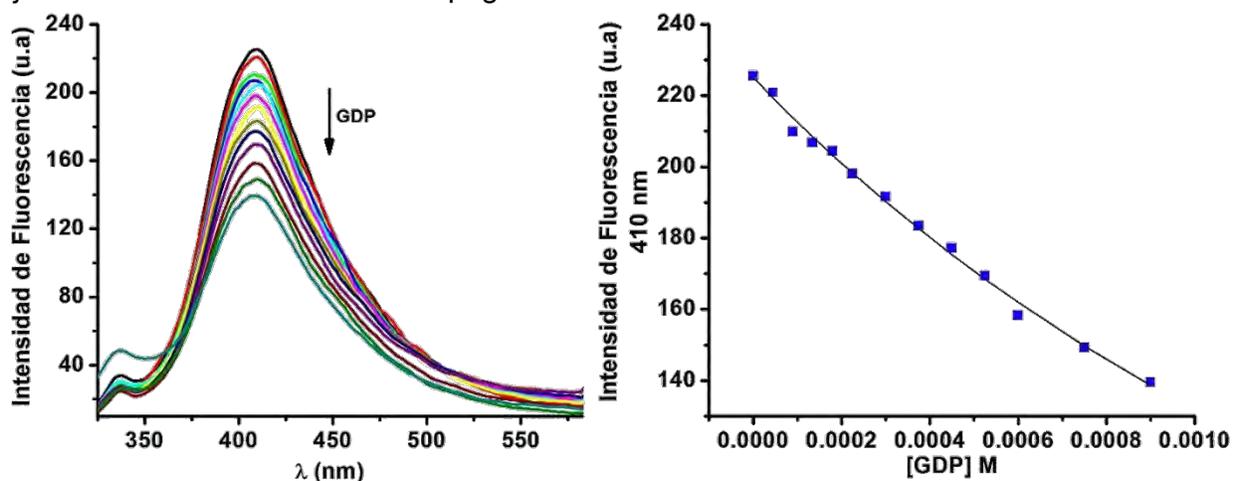
La Tabla 4.5 exhibe los valores calculados de las K_A de **1** con GTP a diferente pH. De acuerdo a los resultados obtenidos de titulaciones fluorimétricas de **1** con GTP a diferente pH, obtenemos un mayor valor de K_A a condiciones neutras. Durante la titulación fluorimétrica a pH 8.0, se observa una ligera turbidez de las soluciones de **1**, esta puede ser atribuida a la posible formación de pequeñas cantidades de $Zn(OH)_2$, este hecho puede explicar el bajo valor de K_A . A pH 6.0, el valor de K_A también disminuye considerablemente si se compara con el valor de K_A obtenido a pH 7.0, es conocido que, a pH ligeramente ácido, las aminas terciarias se protonan con facilidad, por lo que posiblemente el par de aminas terciarias que presenta **L1** en su estructura dificulte la formación del complejo **1** y en consecuencia de esto, el valor de K_A disminuya.

Para corroborar la estequiometría del sistema supramolecular **1**-GTP, se utilizó el método de variación continua. El Esquema 4.19 representa el diagrama de Job. Se puede observar que el máximo de emisión de fluorescencia se encuentra en una fracción molar de **1** aproximada a 0.51, soportando la formación de la especie con estequiometría 2:2 [**1**₂:GTP₂], por este análisis no es posible discriminar las especies 1:1 y 2:2, sin embargo, la forma sigmoidea de los perfiles de emisión descarta la formación de la especie 1:1.⁶⁰ La curva de asociación sigmoidea es típica de sistemas huésped-anfitrión que presentan cooperatividad y se presenta cuando el receptor “anfitrión” posee más de un sitio de unión. El quimiosensor **1** presenta dos sitios de unión que pueden coordinar GTP formando sistemas estequiométricos 1:2 y 2:2. La pendiente inicial en la curva sigmoidea es pequeña ya que la afinidad de **1** con GTP es baja, el aumento de la pendiente significa que la unión de la primera molécula de GTP facilita la asociación de otra molécula de GTP. Por lo tanto, se habla de cooperatividad en la asociación. El análisis de las constantes de asociación considerando la combinación de especies 1:2 [**1**:GTP₂] $\log \beta_1 = 8.49$ y 2:2 [**1**₂:GTP₂] $\log \beta_2 = 18.53 M^{-1}$ muestra que la especie con mayor contribución en el equilibrio es la correspondiente a 2:2 y el pequeño efecto de la curva sigmoidea a bajas concentraciones es por la contribución de la especie 1:2. (Ver Tabla 4.4 y 4.5).



Esquema 4.19 Diagrama de Job de 1 con GTP.

El quimiosensor **2**, es soluble a concentraciones micromolares en agua pura conteniendo un buffer de MOPS (40 mM) a pH 7.0. El espectro de emisión ($\lambda_{ex}= 300$ nm) muestra un máximo a 410 nm. (Ver Esquema 4.11). Para el caso del quimiosensor **2**, únicamente se realizó una titulación espectrofluorimétrica con GDP, debido a que este fue el nucleótido con el que se presentó una mayor respuesta de apagamiento de la emisión de fluorescencia. El Esquema 4.20, muestra la titulación fluorimétrica de **2** con GDP (0-7 eq.) y el respectivo perfil que se ajusta a la misma ecuación de la página 81.



Esquema 4.20 (Izquierda) Titulación fluorimétrica ($\lambda_{ex}= 300$ nm) de **2** (150 μ M) a pH 7.0 con adiciones de GDP. (Derecha) Perfil de la titulación fluorimétrica de **2** con GDP.

La afinidad que presenta **2** por GDP puede explicarse de manera análoga a lo que ocurre con el quimiosensor **1**. A mayor número de grupos fosfato, mayor interacción de extremo a extremo entre las dos unidades IDA-Zn²⁺. La constante de asociación (K_A) de **2** con GDP es igual a 431 ± 6 M⁻¹.

2. Estudios por ^{31}P -RMN y ^1H -RMN.

De acuerdo a los experimentos de reconocimiento molecular llevados a cabo por titulaciones fluorimétricas entre los quimiosensores y nucleótidos, se observa que el sistema **1**-GTP presenta un importante apagamiento de la fluorescencia, dicho en otras palabras, el quimiosensor **1** presenta cierta afinidad por asociarse a GTP y esto se refleja en una constante de asociación alta (K_A), por este motivo se decidió realizar únicamente para el quimiosensor **1** una titulación espectroscópica de RMN utilizando como sustrato GTP. En este contexto, para el sensor **2** se realizó una titulación espectroscópica de RMN utilizando como sustrato GDP.

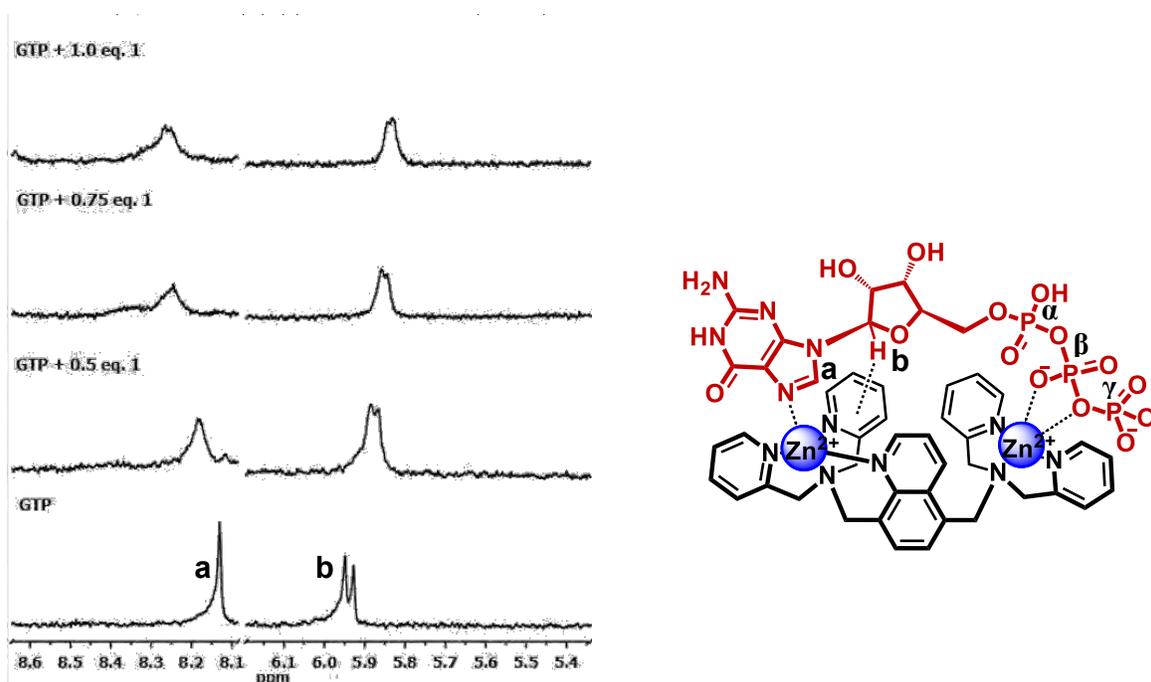
El experimento consiste en obtener primeramente los espectros individuales de ^1H y ^{31}P de los nucleótidos (4 mM, 500 μL de D_2O) y posteriormente se obtiene los espectros de ^1H y ^{31}P de los mismos con adiciones del quimiosensor (0.25-1-00 eq.), este sencillo experimento nos permite elucidar el modo de unión de los sistemas quimiosensor-nucleótido y determinar las constantes de asociación. El desplazamiento de ciertas señales correspondientes al nucleótido indica una interacción, si el desplazamiento es a campo bajo se habla de fenómenos de desprotección como formación de enlaces de hidrógeno o de coordinación, si el desplazamiento es a campos altos se habla de fenómenos de protección como la formación de enlaces de hidrógeno CH- π o apilamientos π - π .⁶⁰

El Esquema 4.21 representa el experimento de titulación de ^1H -RMN de **1** con GTP, donde se puede observar para GTP, que la señal "b" correspondiente al CH de la ribosa, se desplaza a campos altos, lo que indica una interacción donde el núcleo de hidrógeno se encuentran a favor del campo magnético externo y por lo tanto está protegido, esto es normal para interacciones CH- π , donde se propone que el CH de la ribosa se encuentra interaccionando con alguno de los grupos aromáticos presentes en el quimiosensor **1**. La señal "a" corresponde al CH del imidazol de la guanina presente en GTP, esta señal se desplaza a campos bajos, lo que indica fenómenos de desprotección, para explicar este desplazamiento, se propone la formación de un enlace de coordinación entre una de las unidades DPA- Zn^{2+} y el nitrógeno del imidazol. (Ver Esquema 4.21). En el espectro de ^{31}P -RMN de GTP se observan tres señales típicas correspondientes a los tres núcleos de fósforo presentes en la molécula. Cuando se obtiene el espectro de GTP con 1 eq. de **1**, se observa que todas las señales en ^{31}P se desplazan, pero la señal beta (β) presenta un desplazamiento mayor.

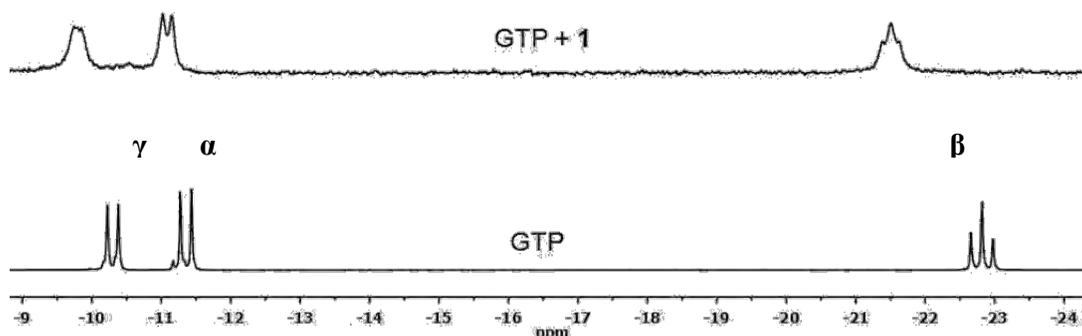
Lo que indica que este núcleo de fósforo está interactuando fuertemente con el quimiosensor **1**, este fenómeno puede ser explicado por el hecho de que el fósforo β representa el grupo fosfato intermedio en el GTP y se piensa que este se encuentra coordinado de manera bidentada a una de las unidades DPA-Zn²⁺ (Ver Esquema 4.22).

Tabla 4.6 Desplazamientos químicos representativos (RMN) correspondientes a GTP y a 1-GTP (D₂O).

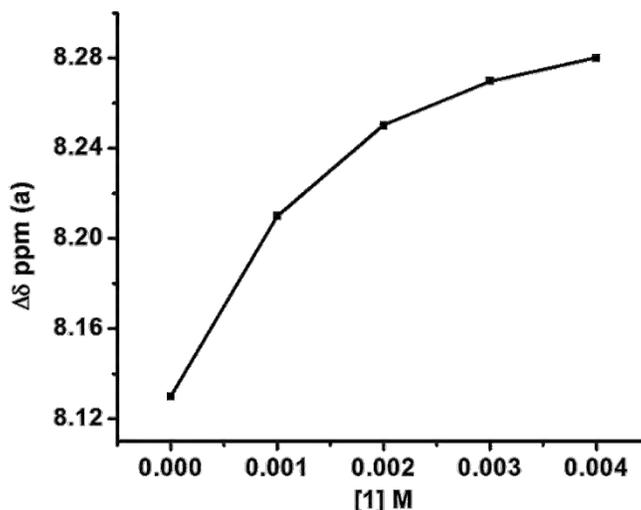
¹ H				³¹ P			
Señal	GTP	1-GTP	$\Delta\delta$	Señal	GTP	1-GTP	$\Delta\delta$
a	8.13	8.28	0.15	α	-11.43	-11.15	0.28
b	5.95	5.83	0.12	β	-22.82	-21.51	1.31
				γ	-10.23	-9.75	0.48



Esquema 4.21 Titulación espectroscópica de ¹H-RMN GTP (4 mM) con **1** (500 μ L D₂O).



Esquema 4.22 Espectros de ³¹P-RMN de GTP y 1-GTP (500 μ L D₂O).



Esquema 4.23 Perfil de la titulación espectroscópica de $^1\text{H-RMN}$ de **1** con GTP.

La constante de asociación calculada para **1** con GTP se obtuvo a través de los desplazamientos químicos de la señal "a" usando la siguiente ecuación.

$$\delta_{obs} = \delta_o + \frac{(\delta_{\infty} - \delta_o) \left\{ [A]_o + [R] + \frac{1}{K_A} - \left[\left([A]_o + [R] + \frac{1}{K_A} \right)^2 - [4][A]_o[R] \right]^{0.5} \right\}}{2[R]_o}$$

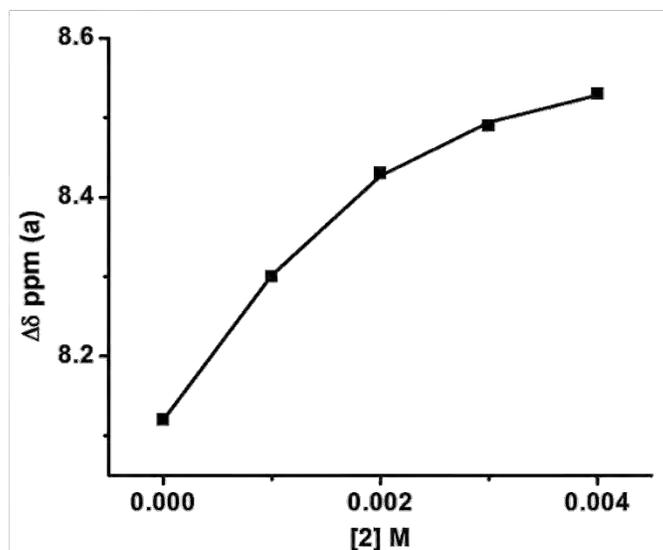
La ecuación se basa en un equilibrio 1:1, donde δ_{obs} representa el cambio observado en el desplazamiento químico (una señal específica presente en el analito) en función del receptor, δ_o corresponde al desplazamiento inicial del analito, δ_{∞} simboliza el desplazamiento del analito a saturación con el receptor, $[A]_o$ concierne a la concentración del analito, $[R]$ es la concentración del receptor y finalmente K_A es la constante de asociación.

El Esquema 4.23 representa el perfil $\Delta\delta$ vs $[1]$. El valor de K_A (**1**:GTP) es igual a $1585 \pm 6 \text{ M}^{-1}$. Este valor es menor que el determinado por fluorescencia y puede ser atribuido a la mayor concentración que se usa en RMN. A concentraciones altas (intervalo de mM) se favorecen los equilibrios 1:1 donde **1** presentan baja afinidad por GTP, debido a que no hay cooperatividad en el proceso de asociación. Por otro lado, en titulaciones fluorimétricas se trabaja a alta dilución (intervalo de μM), lo que favorecen los equilibrios 1:2 y 2:2 donde existe cooperatividad entre **1** y GTP, lo que contribuye a aumentar la afinidad de **1** con GTP. La alta dilución favorece que el quimiosensor ditópico **1** pueda reaccionar intermolecularmente con dos moléculas de GTP formando un sistema 1:2 que conducirá a la formación de un macrociclo con otra unidad de **1** formando un sistema 2:2.⁶¹ (Ver Esquema 4.29).

El Esquema 4.25 representa el experimento de titulación de ^1H -RMN de **2** con GDP, donde se puede observar para GDP, que la señal “b” correspondiente al CH de la ribosa, no se desplaza. La señal “a” corresponde al CH del imidazol de la guanina presente en GTP, esta señal se desplaza a campos bajos, lo que indica fenómenos de desprotección, para explicar este desplazamiento, se propone la formación de un enlace de coordinación entre una de las unidades IDA- Zn^{2+} y el nitrógeno del imidazol.

En el espectro de ^{31}P -RMN de GDP se observan dos señales típicas correspondientes a los dos núcleos de fósforo presentes en la molécula. Cuando se obtiene el espectro de GDP con 1 eq. de **2**, se observa que todas las señales en ^{31}P se desplazan, pero beta (β) presenta el mayor desplazamiento, lo que indica que este núcleo de fósforo está interaccionando fuertemente con el quimiosensor **2**, este fenómeno puede ser explicado por el hecho de que el fósforo β representa el grupo fosfato terminal en el GDP y se piensa que este se encuentra coordinado de manera bidentada a una de las unidades IDA- Zn^{2+} (Ver Esquema 4.26).

La constante de asociación calculada para **2** con GDP se obtuvo a través de los desplazamientos químicos de la señal “a” utilizando la ecuación de la página 87.

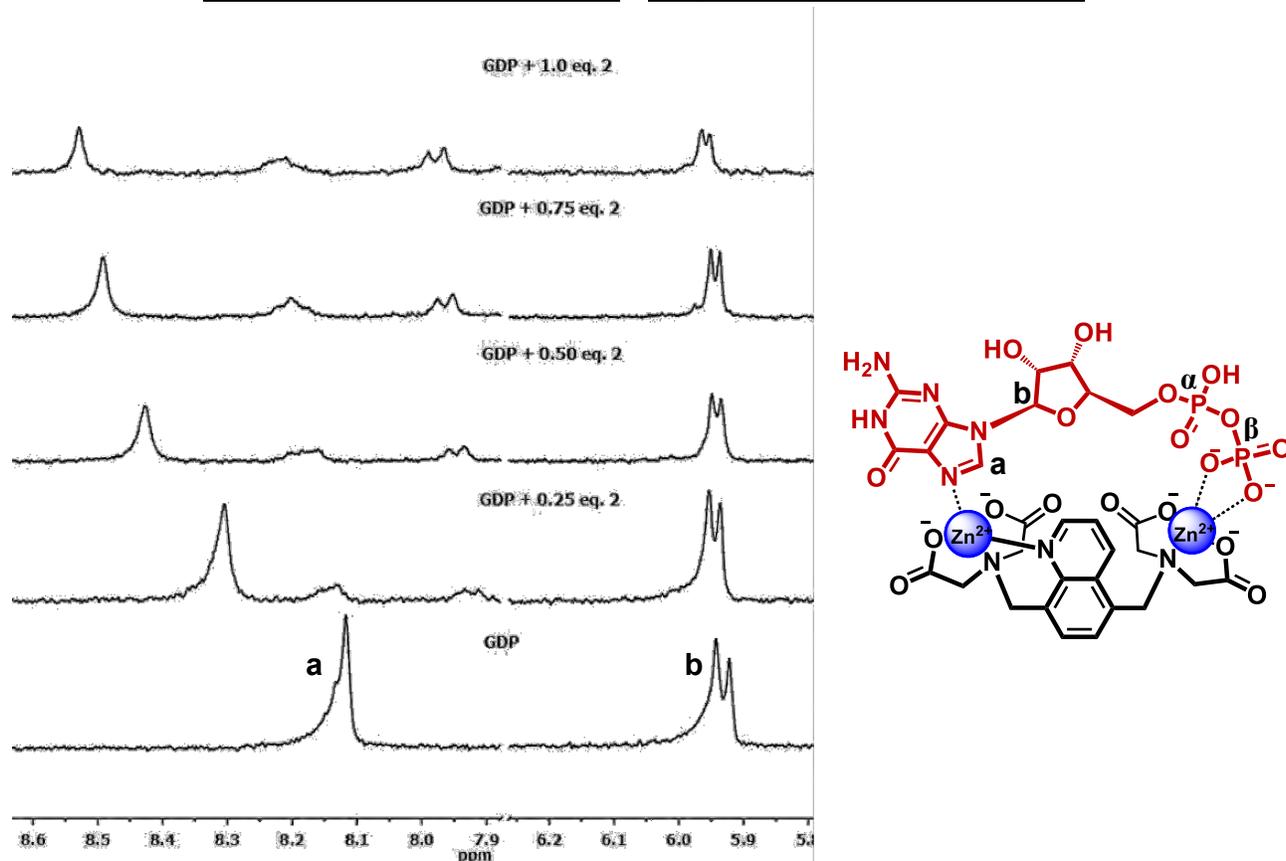
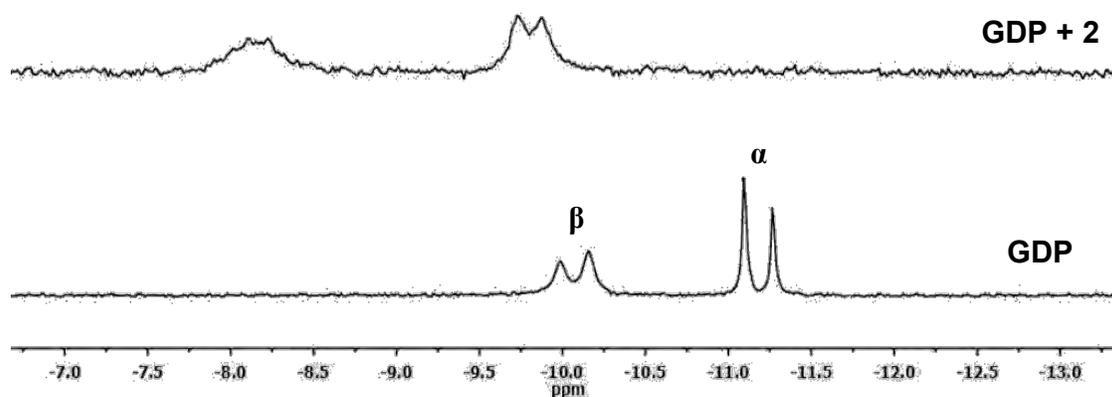


Esquema 4.24 Perfil de la titulación espectroscópica de ^1H -RMN de **2** con GDP.

El Esquema 4.24 representa el perfil $\Delta\delta$ vs $[2]$, los datos se ajustan a un modelo 1:1. El valor de K_A (**2**-GDP) calculado con la ecuación de la página 87 es de $2300 \pm 55 \text{ M}^{-1}$.

Tabla 4.7 Desplazamientos químicos representativos (RMN) correspondientes a GDP y a 2-GDP (D₂O).

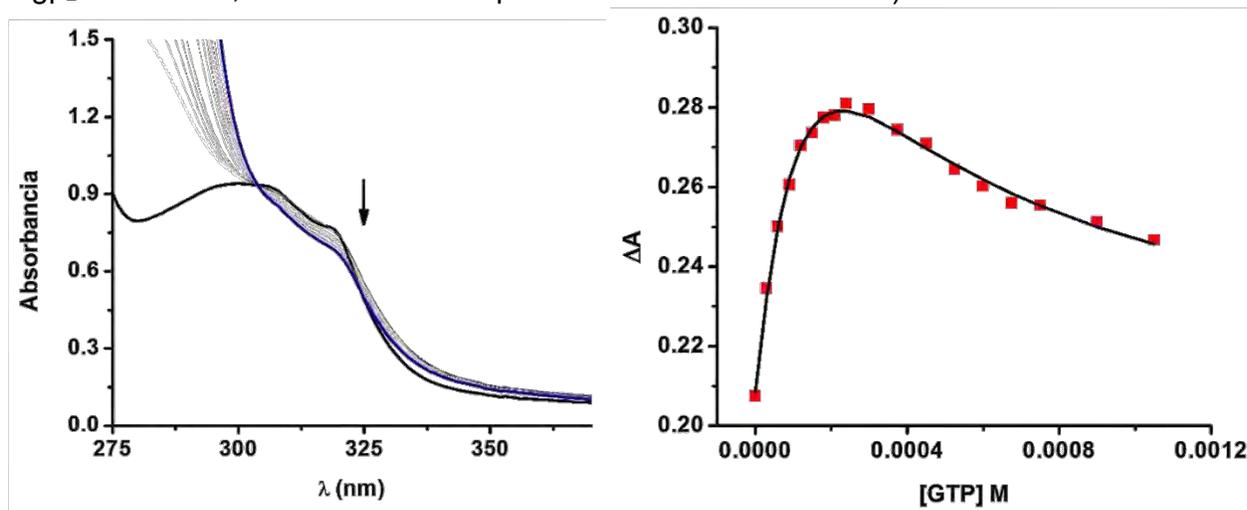
¹ H				³¹ P			
Señal	GDP	2-GDP	Δδ	Señal	GDP	2-GDP	Δδ
a	8.12	8.53	0.41	α	-11.10	-9.73	1.37
b	5.95	5.95	0	β	-9.99	-8.15	1.84

Esquema 4.25 Titulación espectroscópica de ¹H-RMN GDP (4 mM) con 2 (500 μL D₂O).Esquema 4.26 Espectros de ³¹P-RMN de GDP y 2-GDP (500 μL D₂O).

3. Estudios por Espectroscopia de UV-Vis.

La espectroscopia de UV-Visible ofrece un método confiable para determinar constantes de asociación (K_A) por lo tanto el uso de esta técnica resulta ser complementaria para realizar estudios de reconocimiento molecular. Partiendo de lo anterior, se realizó una titulación espectrofotométrica entre el receptor **1** y GTP ya que de acuerdo a los experimentos fluorimétricos este sistema posee la constante de asociación más alta (K_A).

En general la adición de concentraciones micromolares de GTP provocan un cambio de absorbancia en el quimiosensor **1** ($150 \mu\text{M}$) a $\text{pH} = 7.0$ (MOPS, 40 mM). El Esquema 4.27 representa la titulación entre **1** y GTP, donde se observa la presencia de dos puntos isobésticos en los 310 y 325 nm . Estos puntos isobésticos comprueban la presencia de dos especies en disolución, este hecho correlaciona la formación de los complejos supramoleculares entre **1** y GTP. El perfil ΔA vs $[\text{GTP}]$ se muestra también en el Esquema 4.27; se puede observar claramente dos procesos, uno a concentraciones inferiores a $400 \mu\text{M}$ de GTP (formación de la especie 1:2) y otro a concentraciones superiores a $400 \mu\text{M}$ de GTP (formación de la especie 2:2). Los datos se ajustan a una combinación de sistemas 1:2 y 2:2. Las constantes de asociación determinadas a 335 nm para las estequiometrías $[\text{1}:\text{GTP}_2]$ y $[\text{1}_2:\text{GTP}_2]$ se aproximan a los valores obtenidos en fluorescencia ($\log\beta_1 = 8.49$ y $\log\beta_2 = 18.53 \text{ M}^{-1}$; valores obtenidos por titulaciones fluorimétricas).



Esquema 4.27 (Izquierda) Titulación espectrofotométrica entre **1** y GTP a $\text{pH} 7.0$ (MOPS, 40 mM). (Derecha) Perfil ΔA vs $[\text{GTP}]$ usando **1**.

Debido a que no hay un cambio significativo en la titulación espectrofotométrica UV-Vis del quimiosensor **2** con GDP, no se pudo determinar una K_A .

4. Discusión de Constantes de Asociación y Perspectivas.

Una inspección de los valores de las constantes de asociación obtenidas por fluorescencia, colectadas en la Tabla 4.4, muestran que **1** puede detectar concentraciones micromolares de nucleótidos con una tendencia $GTP > GDP > PPI > GMP >$ guanosina. La tendencia puede explicarse en función a la longitud del nucleótido, el número de grupos fosfatos modula tal propiedad, por lo que a mayor número de grupos fosfato, mayor interacción de extremo a extremo entre las dos unidades DPA-Zn²⁺. La presencia de tres o dos grupos fosfatos incrementa notoriamente la afinidad de **1** por nucleótidos de guanosina. La ausencia de grupos fosfatos arroja valores de K_A muy bajos, por lo que necesariamente el modo de unión entre los nucleótidos GTP y GDP con **1**, es de forma ditópica a través de los grupos fosfato y de acuerdo a titulaciones por ¹H-RMN a uno de los átomos de nitrógeno del anillo de purina.

El nucleótido GTP se asocia al quimiosensor **1** con un abatimiento de la fluorescencia, el pH óptimo para detectar GTP es de 7.0. De acuerdo al grafico de Job (ver Esquema 4.19), espectros de masas por ESI (ver Anexos página 114) y a los ajustes por fluorescencia de la curva sigmoidea, la estequiometría del complejo **1**-GTP es 2:2, mayoritariamente.

Tabla 4.8 Resumen de constantes de asociación (M^{-1}) obtenidas de titulaciones fluorimétricas de **1** con nucleótidos, guanosina y PPI.

		$\log \beta_1$		$\log \beta_2$
pH= 8.0	[1 :GTP ₂]	4.17±0.04	[1 ₂ :GTP ₂]	12.28±0.05
	[1 :GTP ₂]	8.49±0.03	[1 ₂ :GTP ₂]	18.53±0.03
	[1 :GDP ₂]	7.78±0.05	[1 ₂ :GDP ₂]	9.29±0.05
pH= 7.0	[1 :GMP]	2.83±0.04	-	-
	[1 :Guanosina]	2.81±0.05	-	-
	[1 :PPI]	4.02±0.07	-	-
pH= 6.0	[1 :GTP ₂]	7.28±0.03	[1 ₂ :GTP ₂]	16.72±0.05

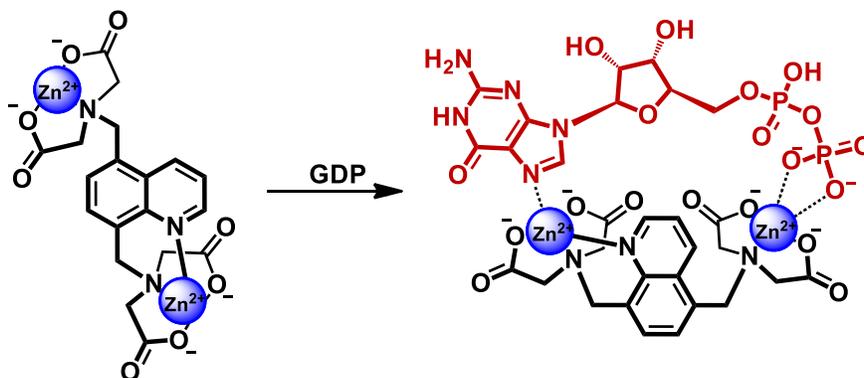
El quimiosensor **2** puede discriminar entre nucleótidos derivados de adenosina y guanosina a pH 7.0. En presencia de ATP, ADP y AMP la fluorescencia de **2** prácticamente no cambia; en presencia de GTP, GDP y GMP la fluorescencia de **2** disminuye, siendo GDP el que abate la fluorescencia en mayor magnitud (ver Esquema 4.15). Si comparamos los cambios que existen en la emisión de fluorescencia (I_0/I) de **1** con respecto a los que presenta **2**, para la familia de nucleótidos derivados de guanosina, se puede observar que **1** es más sensible a la presencia de dichos aniones. Una posible razón para esto radica en el modo de unión entre quimiosensor-nucleótido, donde interacciones supramoleculares trabajan de manera aditiva,

favoreciendo el proceso de asociación, como por ejemplo apilamiento π o formación de enlaces de hidrógeno. Para el caso del quimiosensor **1**, las interacciones π existen en mayor probabilidad si se compara con el quimiosensor **2**, debido a que este, no posee tantos grupos aromáticos como **1**. Adicionalmente la contribución electrostática en la asociación del sensor **1** (tetracación) puede resultar en mayor afinidad por nucleótidos que la determinada por el sensor neutro **2**.

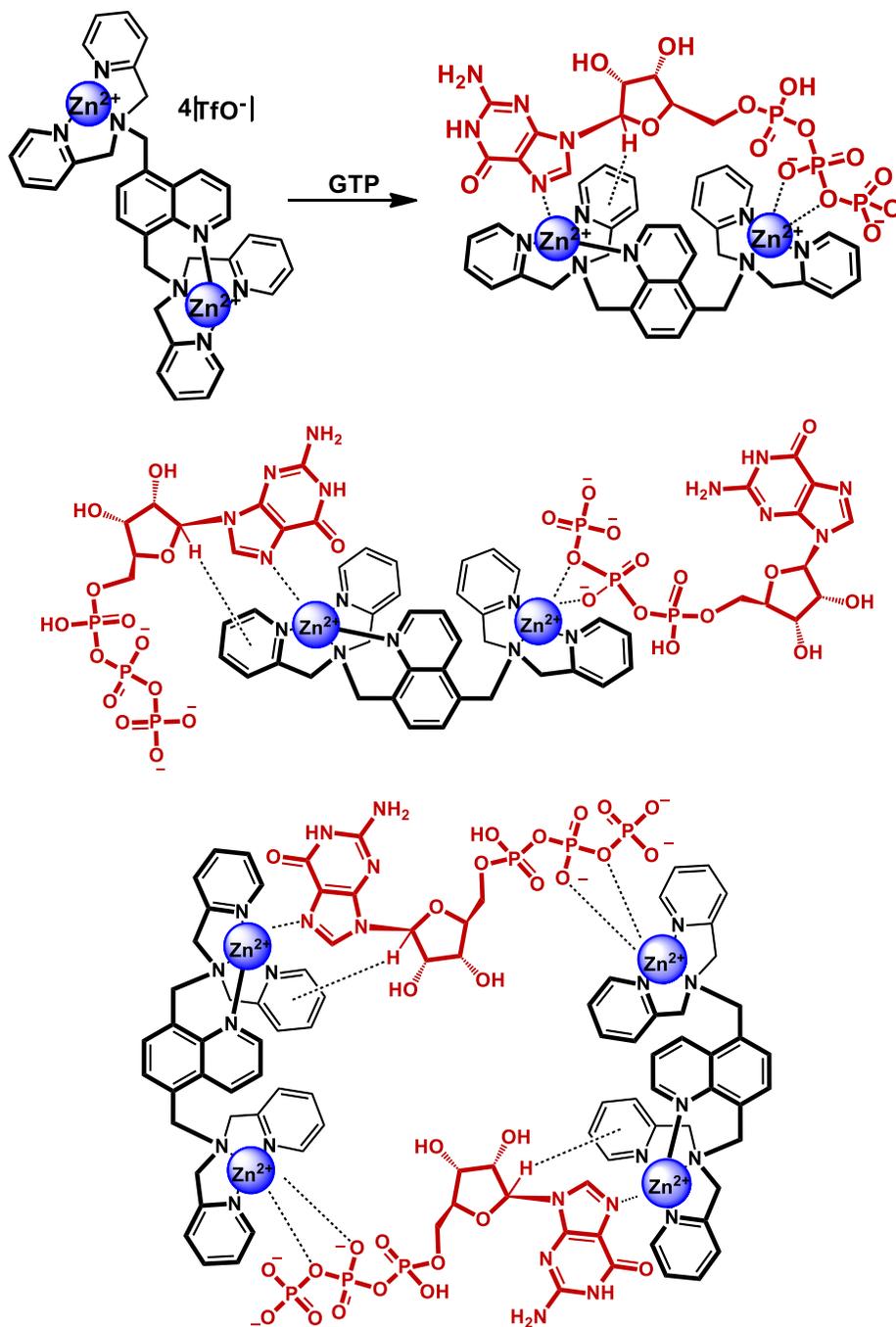
Los estudios UV-Vis proporcionan evidencia adicional que apoya la formación de especies 1:2 y 2:2 entre el GTP y el quimiosensor **1**. El perfil ΔA vs [GTP] muestra dos procesos, uno a concentraciones inferiores a 400 μM de GTP (formación de la especie 1:2) y otro a concentraciones superiores a 400 μM de GTP (formación de la especie 2:2).

Los estudios de RMN de los sistemas **1**-GTP y **2**-GDP, permitieron elucidar el modo de unión de los sistemas quimiosensor-nucleótido. En ambos sistemas hay desprotección del CH del grupo imidazol presente en la guanosina del nucleótido, por lo que se propone la formación de un enlace de coordinación entre la unidad que forman el quelato de zinc (II) tetradentado y el nitrógeno del imidazol, de esta manera se logra saturar la esfera de coordinación de zinc (II) para obtener un quelato pentadentado (ver Esquema 4.28).

En ^{31}P -RMN se observa para ambos sistemas, la desprotección del fósforo β correspondiente al grupo fosfato intermedio en GTP y en el caso de GDP, representa el fosfato terminal. Esto lleva a proponer que el grupo fosfato respectivo se encuentra coordinado de manera bidentada a la unidad que forma el quelato de zinc (II) tridentado, de esta manera se logra saturar la esfera de coordinación de zinc (II) para obtener un quelato pentadentado (Ver Esquema 4.28 y 4.29).



Esquema 4.28 Propuesta del modo de unión entre **2** y GDP, estequiometría 1:1.



Esquema 4.29 Propuesta del modo de unión entre **1** y GTP, estequiometría 1:1, 1:2 y 2:2.

De acuerdo a los estudios de fluorescencia, RMN y espectroscopia de UV-Visible resulta prometedora la afinidad y selectividad del receptor **1** con GTP frente a otros nucleótidos, por lo cual esto abre una perspectiva donde el receptor **1** puede competir en afinidad y selectividad con los receptores informados hasta la fecha que detectan GTP en disolución acuosa y a pH neutro.

CONCLUSIÓN

Se diseñaron y sintetizaron dos nuevos receptores dinucleares de zinc (II) que fluorescen en medio acuoso y pH neutro, estos funcionan como quimiosensores para moléculas con relevancia biológica (nucleótidos, guanosina, PPI).

Los quimiosensores **1** y **2** son producto de la reacción del respectivo ligante (**L1** o **L2**) con $\text{Zn}(\text{OTf})_2$, estos últimos presentan como unidad de señalización un fragmento de quinolina, dicho fragmento se encuentra funcionalizado en las posiciones 5 y 8 por agentes quelantes de dipicolilamina (DPA) para **L1** e iminodiacetato (IDA) para **L2**. Los quelatos de Zn^{2+} -DPA o Zn^{2+} -IDA funcionan como unidades receptoras para coordinan sustratos básicos de Lewis como los nucleótidos que presentan grupos *O*-donadores y *N*-donadores. Los ligantes **L1** y **L2** coordinan iones zinc (II) con constantes de asociación (K_A) alrededor de 10^4 M^{-1} . Diagramas de Job y EM (ESI) corroboran una estequiometría 1:2 ligante-zinc (II). Bajo luz UV, se observa un incremento perceptible en la intensidad de fluorescencia cuando los ligantes se coordinan a Zn^{2+} . Este fenómeno es conocido como CEF (Chelation Enhancement of Fluorescence; Incremento de la Fluorescencia por Quelación).

La caracterización por RMN de los complejos dinucleares de zinc (II) **1** y **2**, muestra que las señales orto y para al nitrógeno de la quinolina presentan el mayor desplazamiento a campo bajo, lo que indica que el nitrógeno de la quinolina participa en la coordinación de uno de los iones zinc (II).

Las constantes de asociación obtenidas de titulaciones fluorimétricas muestran que **1** pueden detectar concentraciones micromolares de nucleótidos, nucleósidos y PPI con una tendencia $\text{GTP} > \text{GDP} > \text{PPI} \gg \text{GMP} > \text{Guanosina}$. Para el caso del quimiosensor **2**, se observa afinidad por GDP, el sistema **2**-GDP presenta una constante de asociación obtenida de una titulación espectroscópica de ^1H -RMN igual a $2300 \pm 55 \text{ M}^{-1}$.

Los perfiles de fluorescencia de **1** muestran asociación con los nucleótidos estudiados manifestando una selectividad para GTP. Los datos experimentales fueron ajustados a una combinación de modelos estequiométricos 1:2 y 2:2 correspondientes a las especies $[\mathbf{1}:\text{GTP}_2]$ y $[\mathbf{1}_2:\text{GTP}_2]$ respectivamente.

De los datos experimentales se calcularon constantes de asociación $\log\beta_1 = 8.49$ [**1**:GTP₂] y $\log\beta_2 = 18.43$ M⁻¹ [**1**₂:GTP₂] con un error menor al 10 %.

Por el método de variación continua se puede observar que el máximo de emisión de fluorescencia para el sistema **1**-GTP se encuentra en una fracción molar de **1** aproximada a 0.51, soportando la formación de la especie con estequiometría 2:2 [**1**₂:GTP₂], por este análisis no es posible discriminar las especies 1:1 y 2:2, sin embargo, la forma sigmoidea de los perfiles de emisión descarta la formación de la especie 1:1.

Estudios de RMN de los sistemas **1**-GTP y **2**-GDP, permitieron elucidar el modo de unión de los sistemas quimiosensor-nucleótido. En ambos sistemas hay desprotección del CH del grupo imidazol presente en la guanosina del nucleótido, por lo que se propone la formación de un enlace de coordinación entre la unidad que forman el quelato de zinc (II) tetradentado y el nitrógeno del imidazol, de esta manera se logra saturar la esfera de coordinación de zinc (II) para obtener un quelato pentadentado. En el sistema **1**-GTP, se puede observar para GTP, que la señal correspondiente a uno de los CH de la ribosa, se desplaza a campos altos, por lo que se propone que el CH de la ribosa se encuentra interaccionando con alguno de los grupos aromáticos presentes en el quimiosensor **1**. En ³¹P-RMN se observa para ambos sistemas, la desprotección del fósforo β correspondiente al grupo fosfato intermedio en GTP y en el caso de GDP, representa el fosfato terminal. Esto lleva a proponer que el grupo fosfato respectivo se encuentra coordinado de manera bidentada a la unidad que forma el quelato de zinc (II) tridentado, de esta manera se logra saturar la esfera de coordinación de zinc (II) para obtener un quelato pentadentado.

Un punto relevante y que vale la pena resaltar de esta investigación recae en la estructura de los receptores sintetizados y al modo en cómo estos reconocen nucleósidos di y trifosfato, ya que los primeros son asimétricos debido a que presentan un quelato tridentado y un quelato tetradentado que en conjunto contienen sitios potenciales de unión para enlazar nucleótidos cooperativamente, lo cual es prácticamente inexplorado.

Combinando todos los estudios espectroscópicos en disolución acuosa y en particular debido a la selectividad que manifestó el quimiosensor **1** por GTP frente a otros nucleótidos alientan a abrir una perspectiva donde **1** puede competir en afinidad y/o selectividad con los receptores informados hasta la fecha que detectan GTP en disolución acuosa.

REFERENCIAS

1. J.-M Lehn, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2002**, 99, 4763.
2. E. P. Kyba, R. C. Helgeson, K. Madan, G. W. Gokel, T. L. Tarnowski, S. S. Moore, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99 (8), 2564.
3. D. J. Cram, *Science* **1983**, 219 (4589), 1177.
4. E. Fischer, *B. Deutsch. Chem. Ges.*, **1894**, 27, 2985.
5. E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (3), 687.
6. J.M. Lehn, *Science*, **1985**; 227 (4689); 849.
7. T.W. Bell, N.M. Hext, *Chem. Soc. Rev.* **2004**; 33 (9); 589.
8. L. You, D. Zha, E. V. Anslyn, *Chem. Rev.* **2015**, 115 (15), 7840.
9. J.M. Lehn, *Struct. Bonding*, **1973**, 16, 1.
10. D. J. Cram, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 1009.
11. L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, L. Parodi, A. Taglietti, “*Transition Metals in Supramolecular Chemistry*”, **1999**, 93-134.
12. (a) J.M. Lehn, “*Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives*”, **1995**. (b) J. P. Behr, “*The Lock and Key Principle*”, **1994**. (c) R. D. Hancock, *J. Chem*, **1992**, 69, 615. (d) G. Ercolani, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 16097. (e) D. J. Cram, *Angew. Chem.*, **1986**, 25, 1039.
13. (a) J. P. Desvergne, A. W. Czarnik, “*Chemosesor of Ion and Molecule Recognition*” Kluwer Academic Publishers, **1997**, 1-16. (b) E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 3, 687.
14. (a)H.-G. Lohr, F. Vogle, *Acc. Chem. Res.* **1985**, 18, 65. (b) M. Takagi, K. Ueno, *Top. Curr. Chem.* **1984**, 121, 39. (c) T. W. Bell, N. M. Hext, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 589. (d) P. D. Beer, J. Cadman, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 205, 131.
15. (a) E. W. Miller, S. X. Bian, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3458. (b) A. S. Vasylevska, A. A. Karasyov, S. M. Borisov, *Chem.* **2007**, 387, 2131. (c) X. Peng, J. Du, J. Fan, J. Wang, Y. Wu, J. Zhao, S. Sun, T. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1500. (d) R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 4419.
16. R. Martinez-Mañez, F. Sancenón. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 4419.
17. A.P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1515.

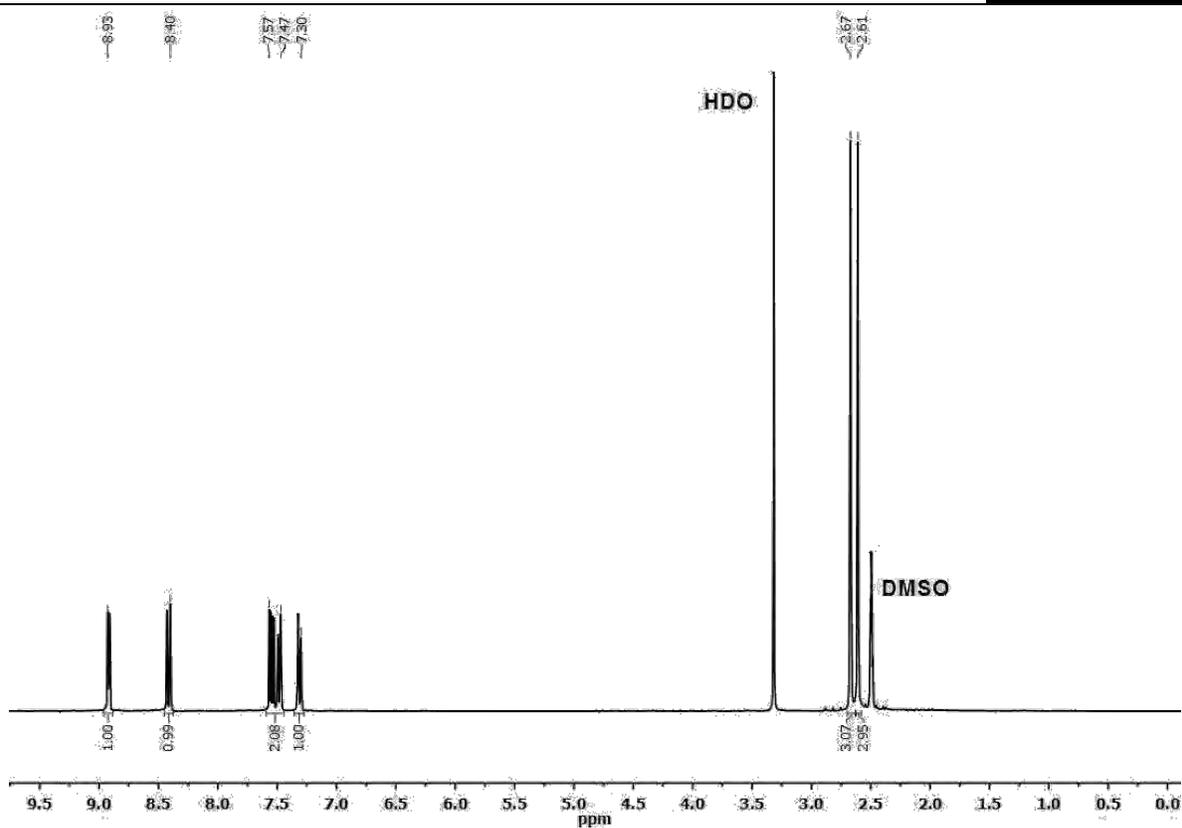
18. (a) N. Busschaert, C. Caltagirone, W. V. Rossom, P. A. Gale, *Chem. Rev.* **2015**, 115, 8038. (b) N. Busschaert, C. Caltagirone, W. V. Rossom, P. A. Gale, *Chem. Rev.* **2015**, 115, 8035.
19. (a) J. Wu, B. Kwon, W. Liu, E. V. Anslyn, P. Wang, J. Seung-Kim, *Chem. Rev.* **2015**, 115, 7893. (b) B.T. Nguyen, E.V. Anslyn, *Coordination Chemistry Reviews*, **2006**, 250, 3118.
20. (a) L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, L. Parodi, A. Taglietti, *Transition Metals in Supramolecular Chemistry*, **1999**, 93. (b) P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson-Huxley, A. J. M. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1515. (c) K. Bowman-James, *Chem. Rev.*, **2005**, 38, 671. (d) M. M. G. Antonisse, D. N. Reinhoudt, *J. Chem. Soc.*, **1998**, 443.
21. (a) A. Weller, *Pure Appl. Chem.*, **1968**, 16, 115. (b) D. Rehm, A. Weller, *Isr. J. Chem.*, **1970**, 8, 259. (c) Y.C. Wang, H. Morawetz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 3611. (d) B.K. Selinger, *Aust. J. Chem.*, **1977**, 30, 2087. (e) G. de Santis, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, C. Mangano, D. Sacchi, N. Sardone, *Inorg. Chim. Acta*, **1997**, 257, 69. (f) L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, A. Perotti, D. Sacchi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, 33, 1975. (g) L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, A. Perotti, A. Taglietti, D. Sacchi, *Chem. Eur. J.*, 1996, 2, 167. (h) D.K. Cabbiness, D.W. Margerum, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 2151.
22. (a) M.M. Martin, P. Plaza, Y.H. Meyer, L. Begin, J. Bourson, B. Valeur, *J. Fluoresc.*, **1994**, 4, 271. (b) M.M. Martin, P. Plaza, Y.H. Meyer, F. Badaoui, J. Bourson, J.P. Lefebvre, B. Valeur, *J. Phys. Chem.*, **1996**, 100, 6879.
23. K. Choi, A. D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3912.
24. (a) Y. Kikazawa, T. Akita, H. Nakamura, *Chem. Lett*, **1993**, 1671. (b) H. Bouas-Laurent, A. Castellan, M. Daney, J.P. Desvergne, G. Guinand, P. Marsau, M.H. Riffaud, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 315. (c) F. Fages, J.P. Desvergne, K. Kampke, H. Bouas-Laurent, J.M. Lehn, J.P. Konopelski, P. Marsau, Y. Barrans, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1990**, 655. (d) F. Fages, J.P. Desvergne, K. Kampke, H. Bouas-Laurent, J.M. Lehn, M. Meyer, A.M. Albrecht-Gary, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 3658.
25. J. W. Steed, *Chem. Commun.* **2006**.
26. (a) E. V. Anslyn, D. A. Dougherty, *Modern Physical Organic Chemistry*, **2006**, 162. (b) J. Schneider, A. Yatsimirsky, "Principles and Methods in Supramolecular Chemistry", **2000**. (c) R. A. Robison, R. H. Stokes, *Electrolite Solution*, Butterworths, **1995**. (d) C. J. Pedersen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 1021.

27. (a) G. A. Jeffrey, "An Introduction to Hydrogen Bonding", **1997**. (b) T. Steiner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 487
28. M. C. Etter, *Acc. Chem. Res.*, 23, **1990**.
29. G. R. Desiraju, T. Steiner, "The Weak Hydrogen Bond in Structural Chemistry and Biology", Oxford University Press, Oxford, **1999**.
30. L. C. Gilday, S. W. Robinson, T. A. Barendt, M. J. Langton, B. R. Mullaney, P D. Beer. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 7118.
31. (a) M. L. Waters, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, 6, 736. (b) G. R. Desiraju, A. Gavezzotti, *Acta Crystallogr.* **1898**, 45, 473.
32. J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.*, **1997**, 97,5.
33. B. L. Schottel, H. T. Chifotides, K. R. Dunbar, *Chem. Soc. Rev.* , **2008**, 37, 68.
34. C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Chem. Soc.* , **2001**, 2, 651.
35. H. J. Schneider, "Encyclopedia of Supramolecular Chemistry", **2004**, 2, 1550.
36. (a) E. J. O'Neil, B. D. Smith, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 3068. (a) J. M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 89. (b) D. J. Cram, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 1009. (e) P. D. Beer, E. J. Hayes, *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, 240, 167.
37. N. T. Southall, K. A. Dill,, A. D. J. Haymet, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106.
38. D. B. Smithrud, E. M. Sanford, I. Chao, S. B. Ferguson, D. R. Carcanague, J. D. Evanseck, K. N. Houk, F. Diederich, *Pure Appl. Chem.*, **1990**, 62, 2227.
39. A.E. Hargrove, S. Nieto, T. Zhang, J. L. Sessler, E. V. Anslyn. *Chem. Rev.* **2011**, 111, 6603.
40. (a) A. Bencini, F. Bartoli, C. Caltagirone, V. Lippolis. *Dyes Pigm.* **2014**, 110, 169. (b) H.T. Ngo, X. Liu, K. A. Jolliffe, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 4928.
41. T. Sakamoto, A. Ojida, I. Hamachi, *Chem. Commun.* **2009**, 141.
42. E.J. O'Neil, B.D. Smith, *Coordn. Chem. Rev.*, **2006**, 250, 3068.
43. Y. Kurishita, T. Kohira, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (38), 13290.
44. Y. Kurishita, T. Kohira, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (45), 18779.
45. (a) D.H. Lee, J.H. Im, S.U. Son, Y.K. Chung, J. Hong, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7752. (b) D.H. Lee, S.Y. Kim, J. Hong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4777.
46. Y.J. Jang, E.J. Jun, Y.J. Lee, Y.S. Kim, J.S. Kim, J. Yoon, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 9603.
47. A. Ojida, S. Park, Y. Mito-oka, I. Hamachi, *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 6193.

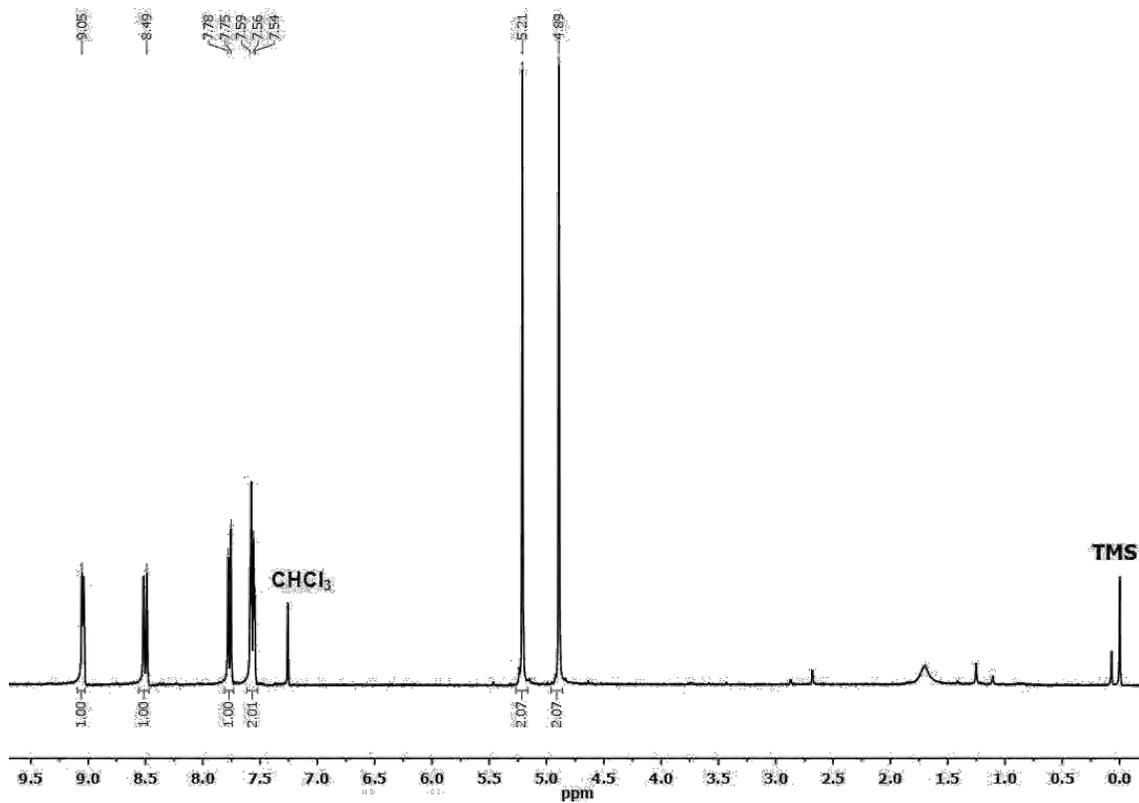
48. H. H. Jang, S. Yi, M. H. Kim, S. Kim, N. H. Lee, M. S. Han, *Tetrahedron Letters*, **2009**, 50, 6241.
49. J. H. Lee, A. R. Jeong, J. H. Jung, C.M. Park, J.I Hong, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 417.
50. M.S. Han, D.H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 1079.
51. A. Ojida, Y. Miyahara, J. Wongkongkatep, S. I. Tamaru, K. Sada, I. Hamachi, *Chem. Asian J.* **2006**, 1, 555.
52. D. A. Jose, S. Mishra, A. Ghosh, A. Shrivastav, S. K. Mishra, A. Das, *Org. Lett.* **2007**, 9 (10), 1979.
53. (a) W. Heintz, A Liebigs. *Chem.* **1862**, 122. (b) A. Podder, J. K. Dattagupta, N. N. Saha, N. Saenger, *Acta Crystallogr.* **1979**, B35, 53. (c) F. G. Kramanenco, T. N. Polynova, M. A Porsai-Koshits, V. P. Chalvi, G. N Kumivanova, L. I. Martynenko, *Zh. Strukt. Khim.* **1973**, 14, 744. (c) Y. R. Wu, L. S. Long, R. B. Huang, L. S. Zheng, S. W. Ng, *Acta Crystallogr.* **2003**, E59, 390. (d) N. J Mammano, D. H. Templeton, Zalkin, A. *Acta Crystallogr.* **1977**, B33, 1251. (e) I. F. Burshtein, A. L. Poznyak, *Kristallografiya*, **2000**, 45, 465. (f) F. Valach, N. N Hoang, I. Lukes, *Chem. Pap.* **1996**, 50, 115. (g) A. C. Morel, D. Choquesillo-Lazarte, C. Alarcon-Payer, J. M. González-Pérez, A. Castiñeiras, N. Gutiérrez, *J. Inorg. Chem. Commun.* **2003**, 6, 1354. (h) M. A. Walters, V. Vapnyar, A. Bolour, C. Incarvito, A. L. Rheingold, *Polyhedron*, **2003**, 22, 941. (i) A. J. Napoli, *Inorg. Nucl. Chem.* **1972**, 34, 1347. (j) M. J. Román-Alpiste, J. D Martín-Ramos, A. Castiñeiras-Campos, E. Bugella-Altamirano, A. G. Sicilia-Zafra, J. M. González-Pérez, J. N. Gutiérrez, *Polyhedron.* **1999**, 18, 3341. (k) W. Schmitt, P. A. Jordan, R. K. Henderson, G. R. Moore, C. E. Anson, A. K. Powell, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 228, 115. (l) M. Klye'n, A. Lakatos, R. Latajka, I. Laba'di, A. Salifoglou, C. P. Raptopoulou, H. Kozlowaki, T. Kiss, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 18, 3578. (m) L. Hong, X. Duan-Jun, Y. Kai-Liang, *Acta Crystallogr.* **2003**, E59, m671. (n) D. Mootz, H. Wunderlich, *Acta Crystallogr.* **1980**, B36, 445.
54. Y. J. Jang, E. J. Jun, Y. J. Lee, Y. S. Kim, J. S. Kim, J. Yoon, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 9603.
55. W. Zhu, X. Huang, Z. Guo, X. Wu, H. Yua, H. Tiana, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 1784.
56. M. Zhang, W.J. Ma, C.T. He, L. Jiang, T.B Lu, *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 4873.
57. L.M. Mesquita, V. André, C.V. Esteves, T. Palmeira, M.N. Berberan-Santos, P. Mateus, R. Delgado. *Inorg. Chem.* **2016**, 55, 2212.
58. N. Marcotte, A. Taglietti, *Supramol. Chem.*, **2003**, 15, 617.

-
59. Software, "*Hyp Spec; Stability constants*", 2014.
60. S. Watchasit, P. Suktanarak, C. Suksai, V. Ruangpornvisutia, T. Tuntulani, *Dalton Trans.*, **2014**, 43, 14701.
61. (a) A.M. Gordon, "*Coordination Chemistry of Macrocyclic compounds*", Plenum press, New York, **1979**. (b) G.A. Melson, "*Coordination Chemistry of Macrocyclic Compounds*". Plenum press, Nueva York, **1979**. (c) Press. L.F Lindloy, "*The Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*", Cambridge University Press, **1989**.

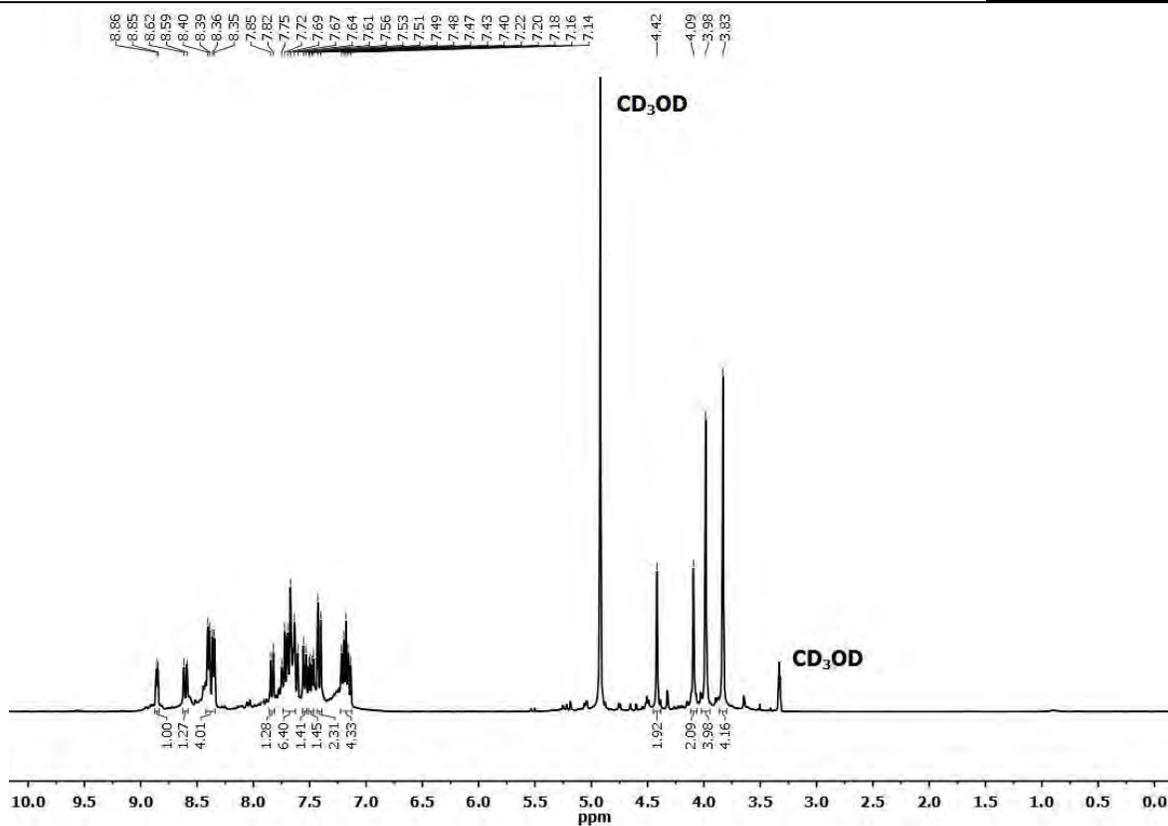
1. Espectro de ^1H -RMN de 5,8-Dimetilquinolina (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	102
2. Espectro de ^1H -RMN de 5,8-Bis(bromometil)quinolina (300 MHz, CDCl_3)	102
3. Espectro de ^1H -RMN de L1 (300 MHz, CD_3OD)	103
4. Espectro de ^{13}C -RMN de L1 (300 MHz, CD_3OD)	103
5. Espectro HSQC de L1 (300 MHz, CD_3OD)	104
6. Espectro DEPT de L1 (300 MHz, CD_3OD)	104
7. Espectro de Masas de L1 (DART $^+$)	105
8. Espectro de ^1H -RMN del Complejo Dinuclear 1 (300 MHz, CD_3OD)	105
9. Espectro de ^{13}C -RMN del Complejo Dinuclear 1 (300 MHz, CD_3OD)	106
10. Espectro HSQC del Complejo Dinuclear 1 (300 MHz, CD_3OD)	106
11. Espectro DEPT del Complejo Dinuclear 1 (300 MHz, CD_3OD)	107
12. Espectro de ^{19}F -RMN del Complejo Dinuclear 1 (300 MHz, CD_3OD)	107
13. Espectro de Masas del Complejo Dinuclear 1 (ESI $^+$)	108
14. Espectro de ^1H -RMN de L2 (300 MHz, CD_3OD)	108
15. Espectro de ^{13}C -RMN de L2 (300 MHz, CD_3OD)	109
16. Espectro HSQC de L2 (300 MHz, CD_3OD)	109
17. Espectro DEPT de L2 (300 MHz, CD_3OD)	110
18. Espectro de Masas de L2 (DART $^+$)	110
19. Espectro de ^1H -RMN del Complejo Dinuclear 2 (300 MHz, CD_3OD)	111
20. Espectro de ^{13}C -RMN del Complejo Dinuclear 2 (300 MHz, CD_3OD)	111
21. Espectro HSQC del Complejo Dinuclear 2 (300 MHz, CD_3OD)	112
22. Espectro DEPT del Complejo Dinuclear 2 (300 MHz, CD_3OD)	112
23. Espectro de ^{19}F -RMN del Complejo Dinuclear 2 (300 MHz, CD_3OD)	113
24. Espectro de Masas del Complejo Dinuclear 2 (ESI $^+$)	113
25. Espectros de Masas del Complejo Supramolecular [1 -GTP]= 25 μM en H_2O (ESI $^\pm$)	114



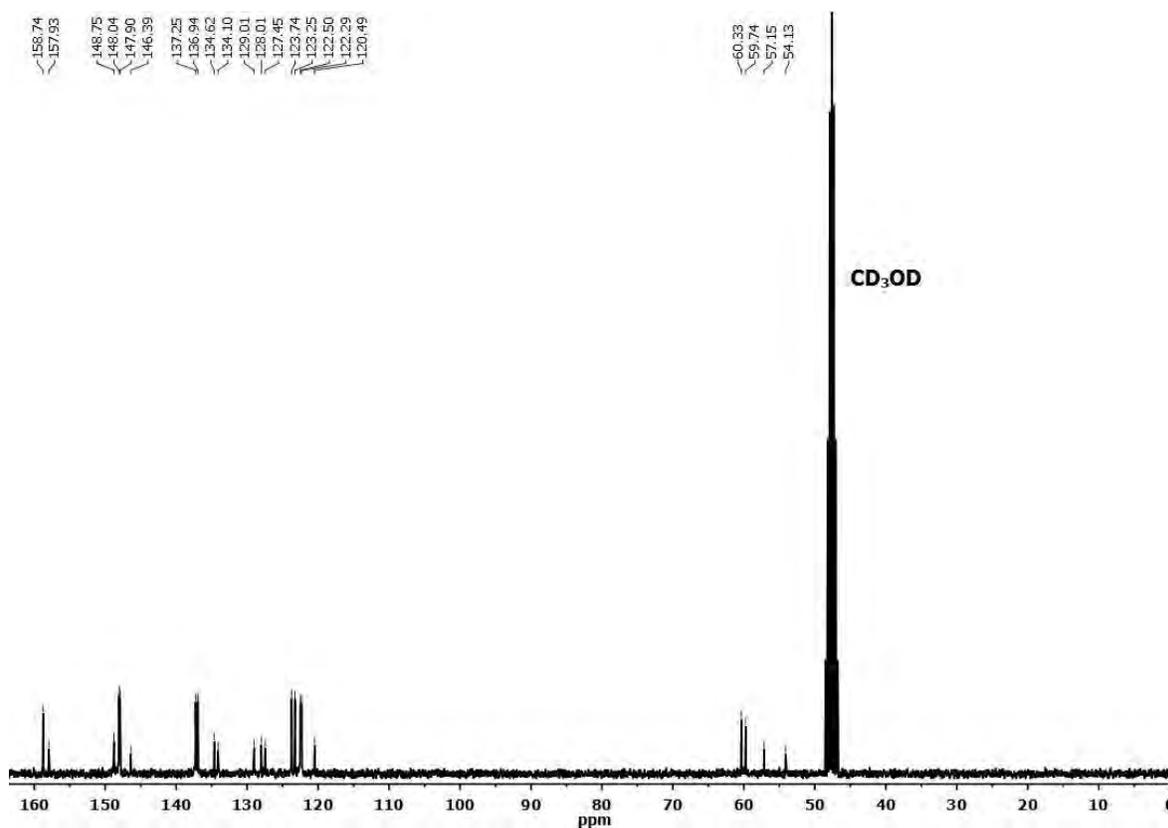
1. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 5,8-Dimetilquinolina.



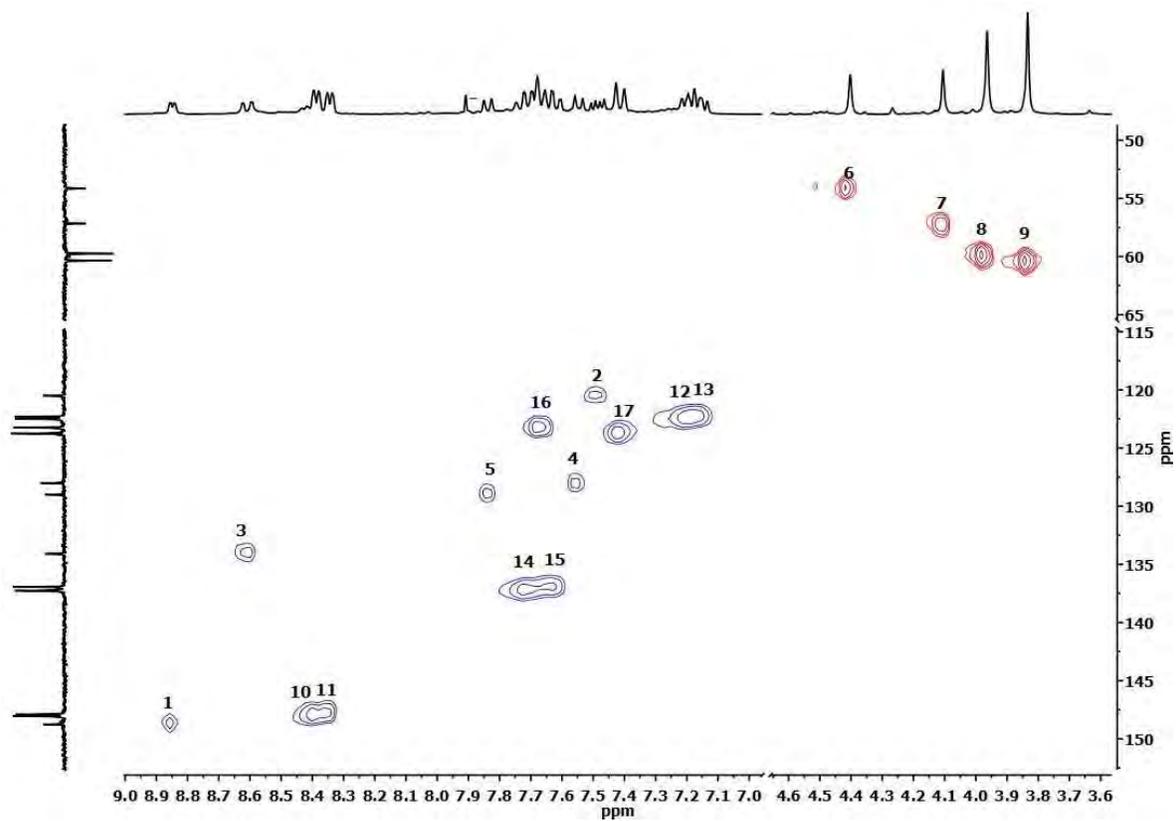
2. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de 5,8-Bis(bromometil)quinolina.



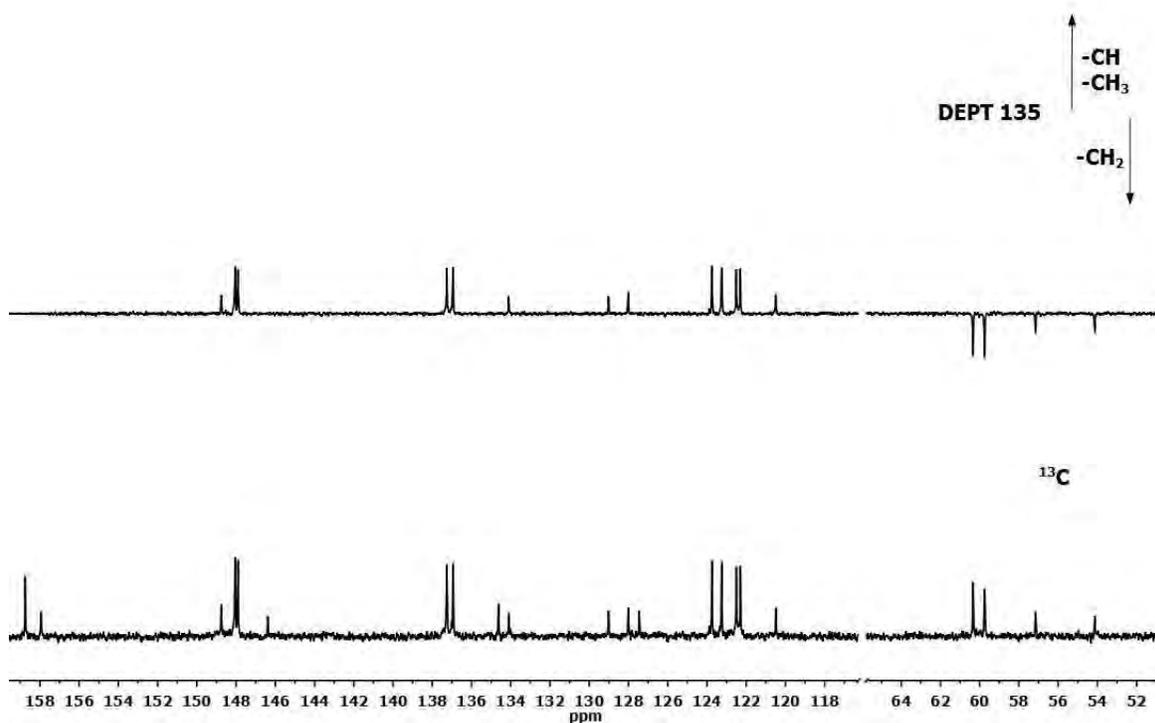
3. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) de 5,8-Bis[*N*-(metil)di-(2-dipicolil)amino]quinolina, L1.



4. Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) de 5,8-Bis[*N*-(metil)di-(2-dipicolil)amino]quinolina, L1.



5. Espectro HSQC (300 MHz, CD₃OD) de 5,8-Bis[N-(metil)di-(2-dipicolil)amino]quinolina, L1.



6. Espectro DEPT (300 MHz, CD₃OD) de 5,8-Bis[N-(metil)di-(2-dipicolil)amino]quinolina, L1.

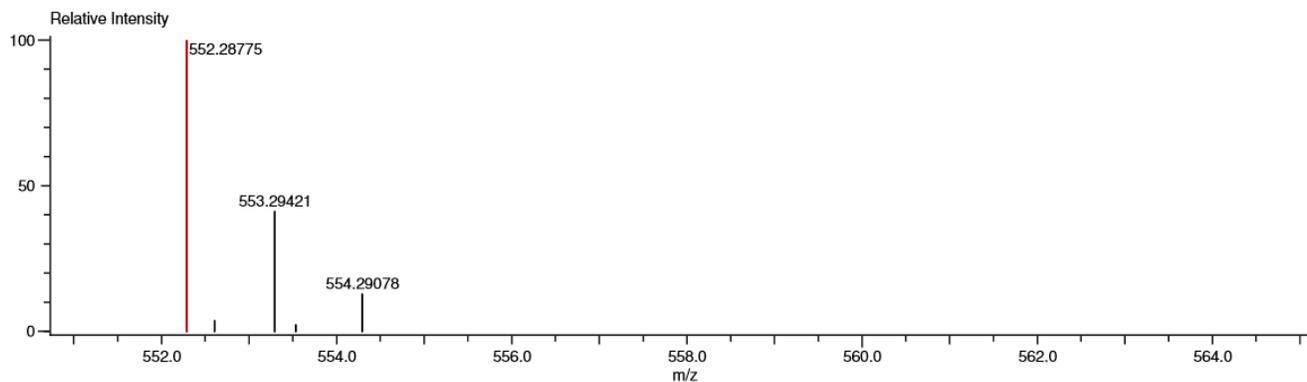
Data:2302 QDPy-F
 Sample Name:Dr Dorazco Alejandro/Operador:Carmen Garcia-Javier Perez

Acquired:6/17/2016 12:52:44 PM
 Operator:AccuTOF
 Mass Calibration data:Cal PEG 600
 Created:12/9/2016 2:08:59 PM
 Created by:AccuTOF

Charge number:1
 Element:¹²C:0 .. 45, ¹H:0 .. 80, ¹⁴N:2 .. 7

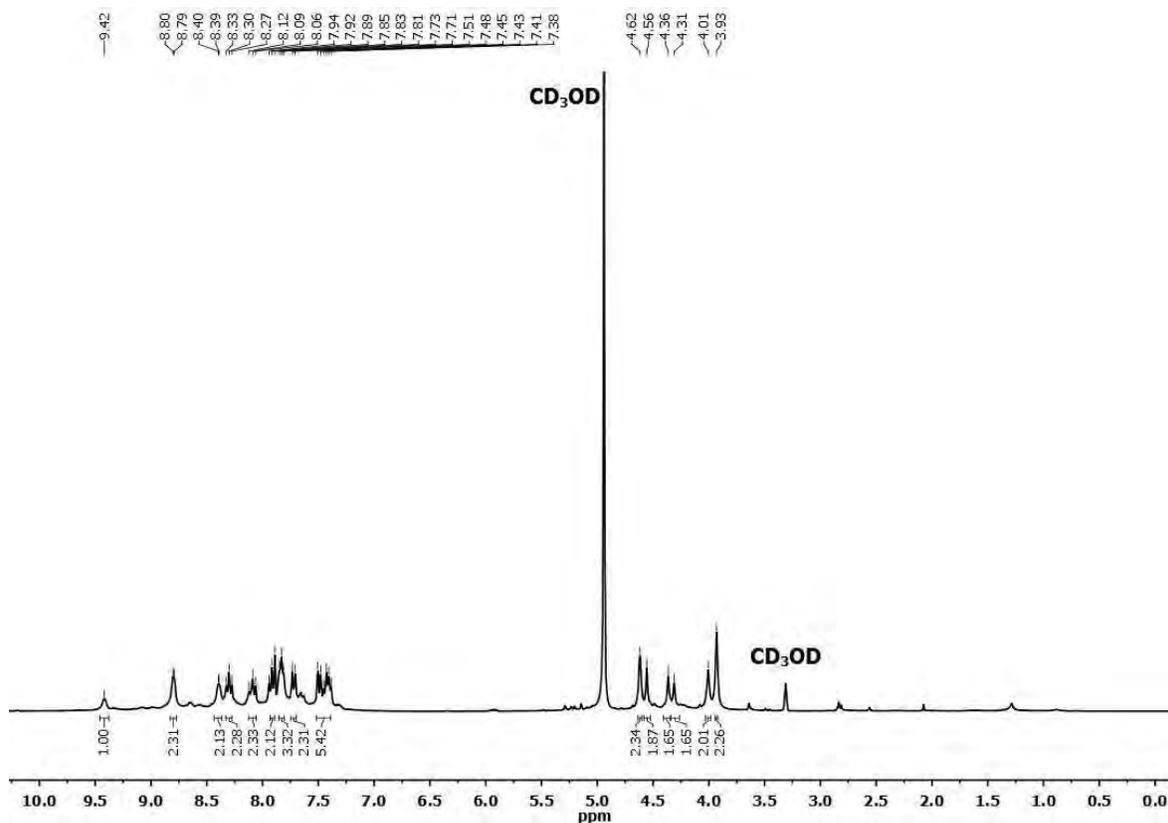
Tolerance:2.00(mmu)

Unsaturation Number:3.0 .. 24.0 (Fraction:Both)

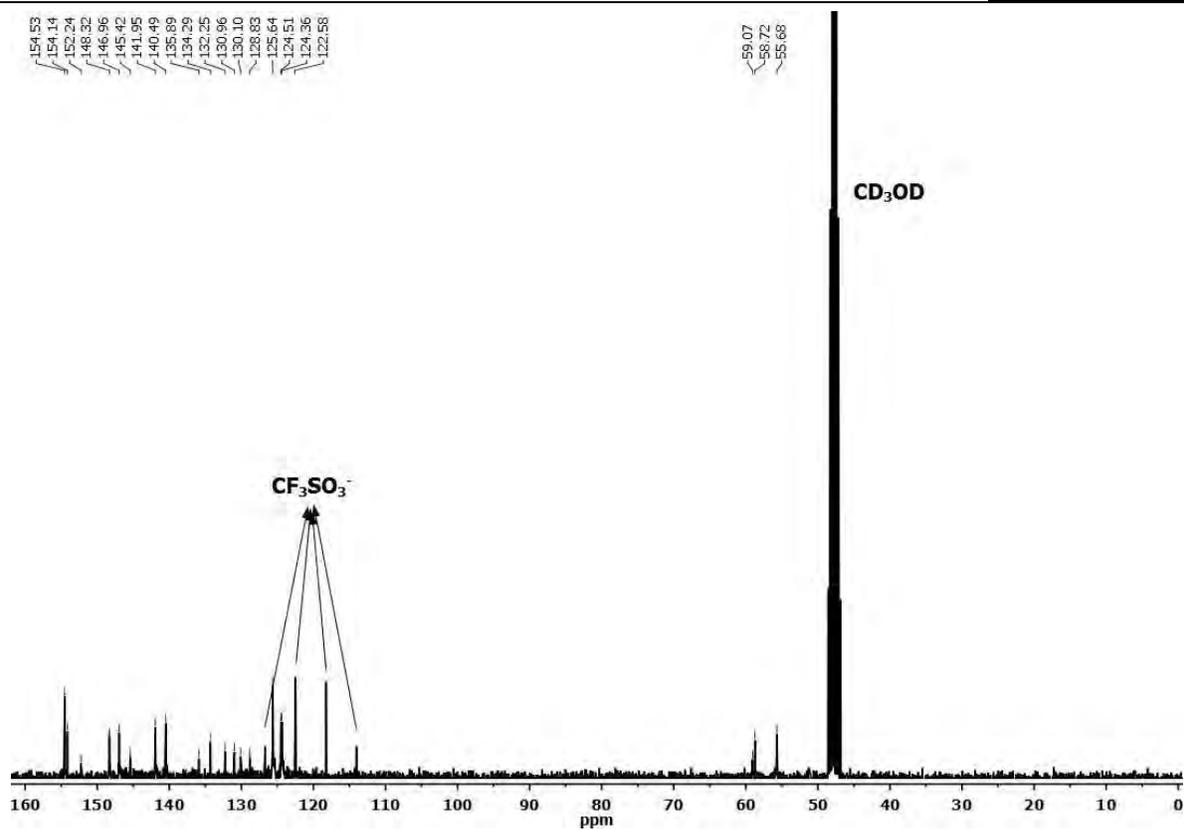
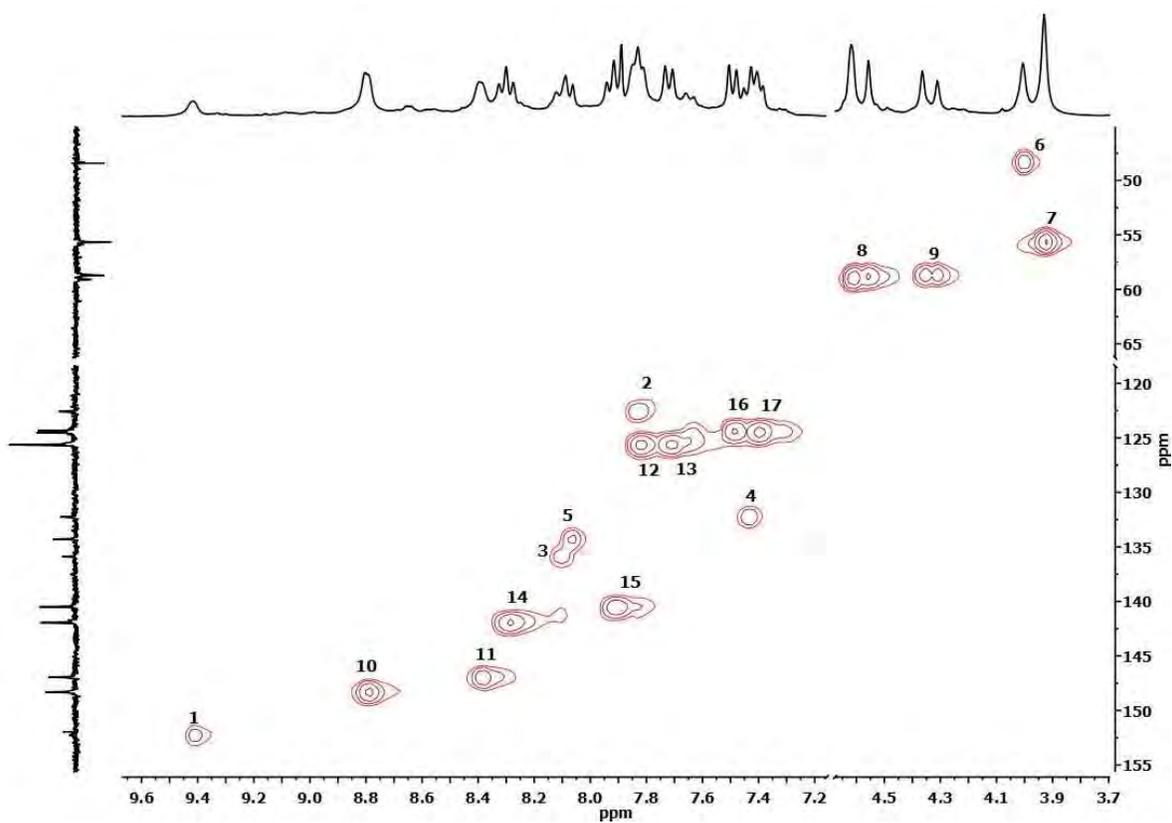


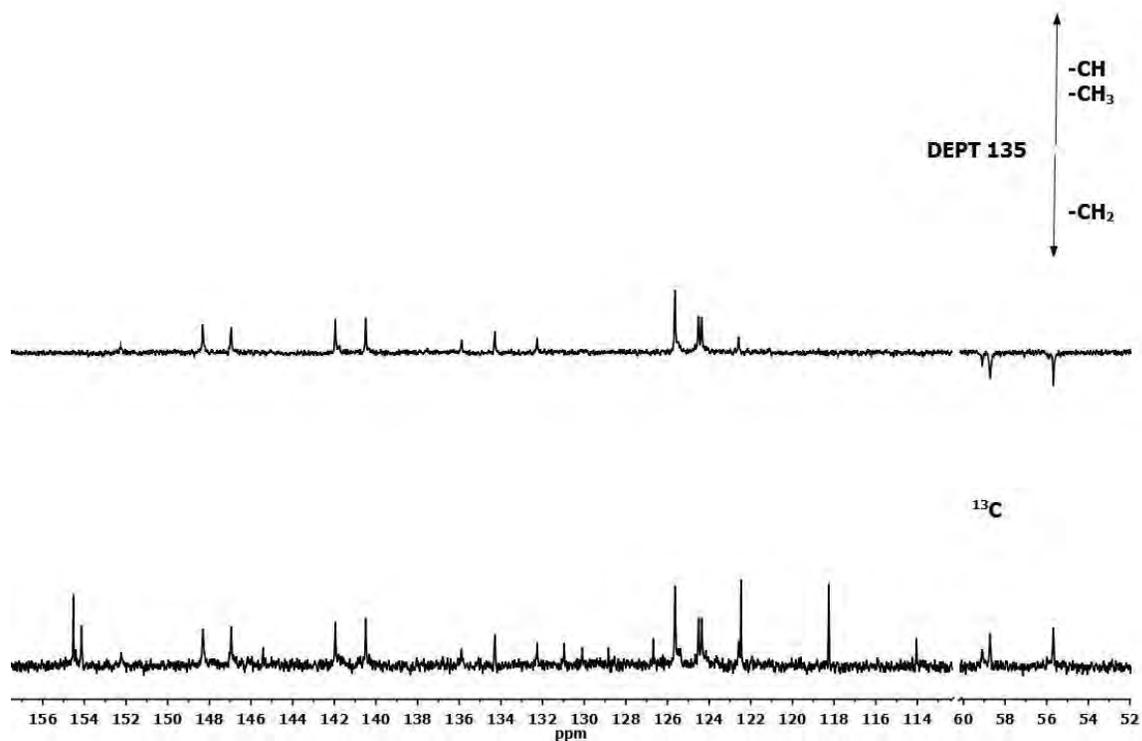
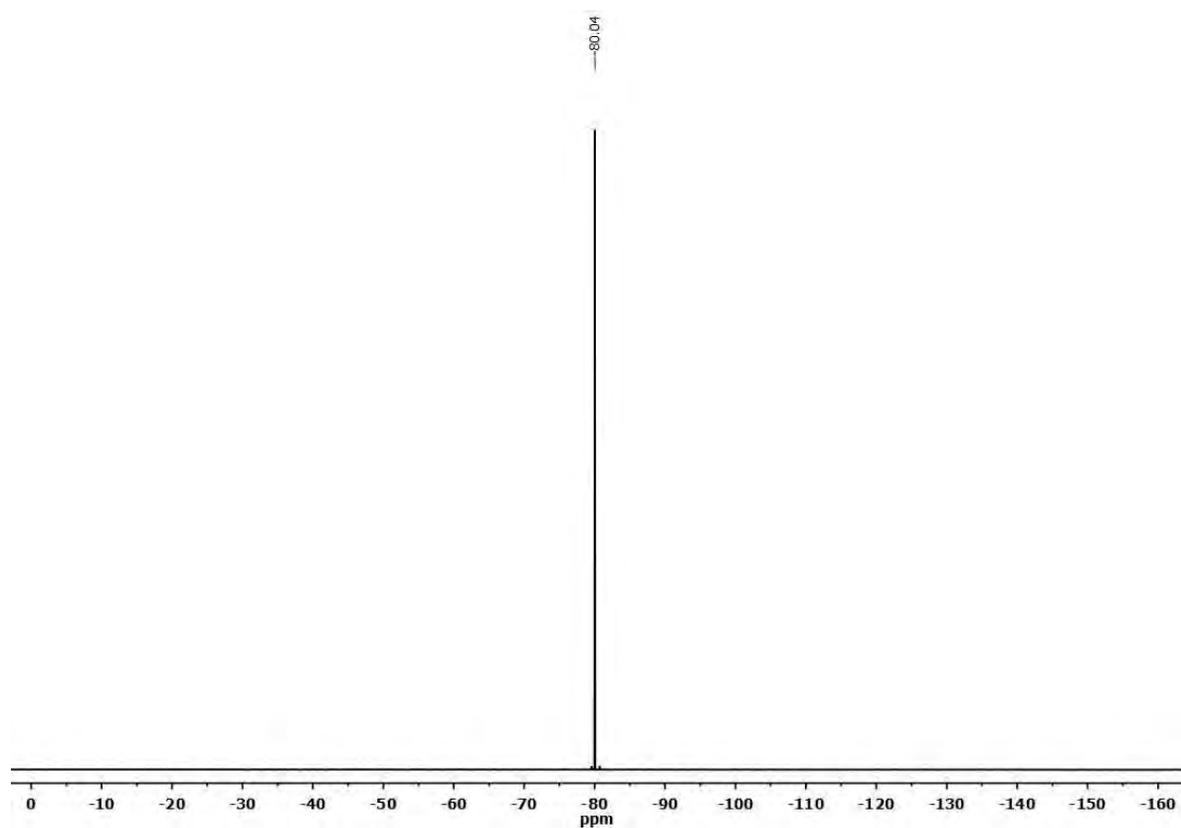
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
552.28775	10415.78	552.28757	0.18	0.33	¹² C ₃₅ ¹ H ₃₄ ¹⁴ N ₇	22.5

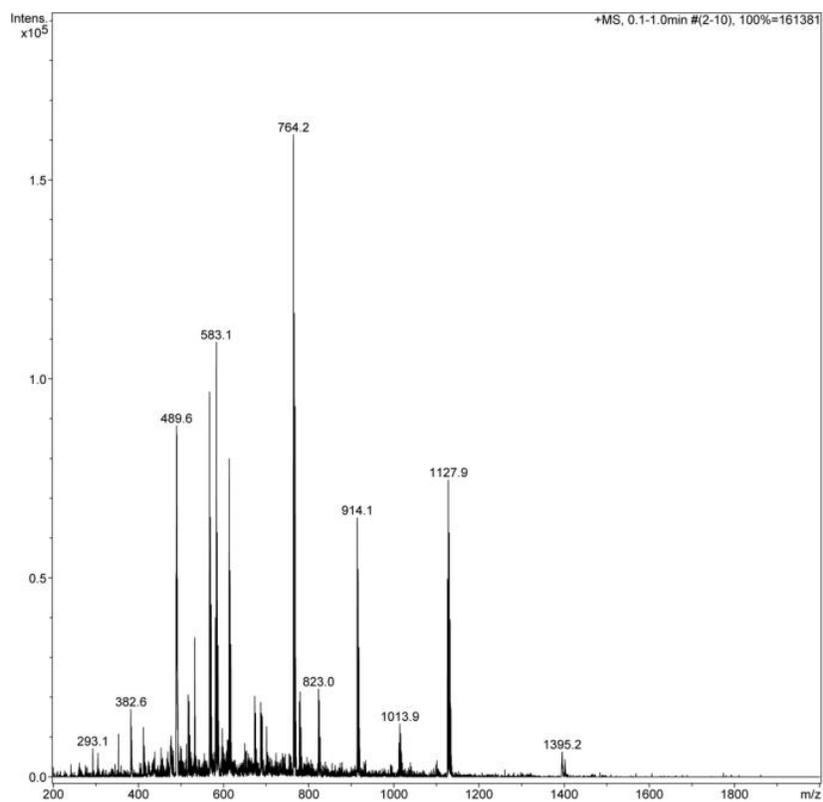
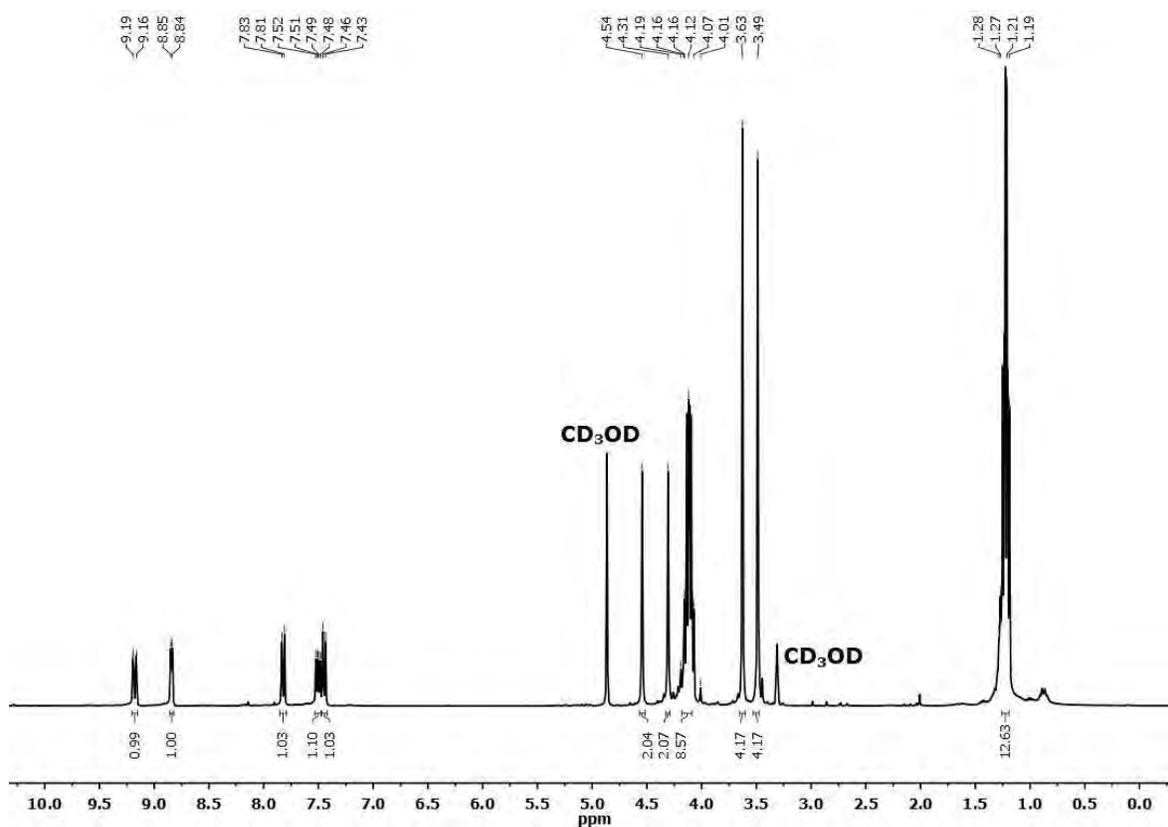
7. Espectro de Masas (DART⁺) de 5,8-Bis[N-(metil)di-(2-dipicolil)amino]quinolina, L1.

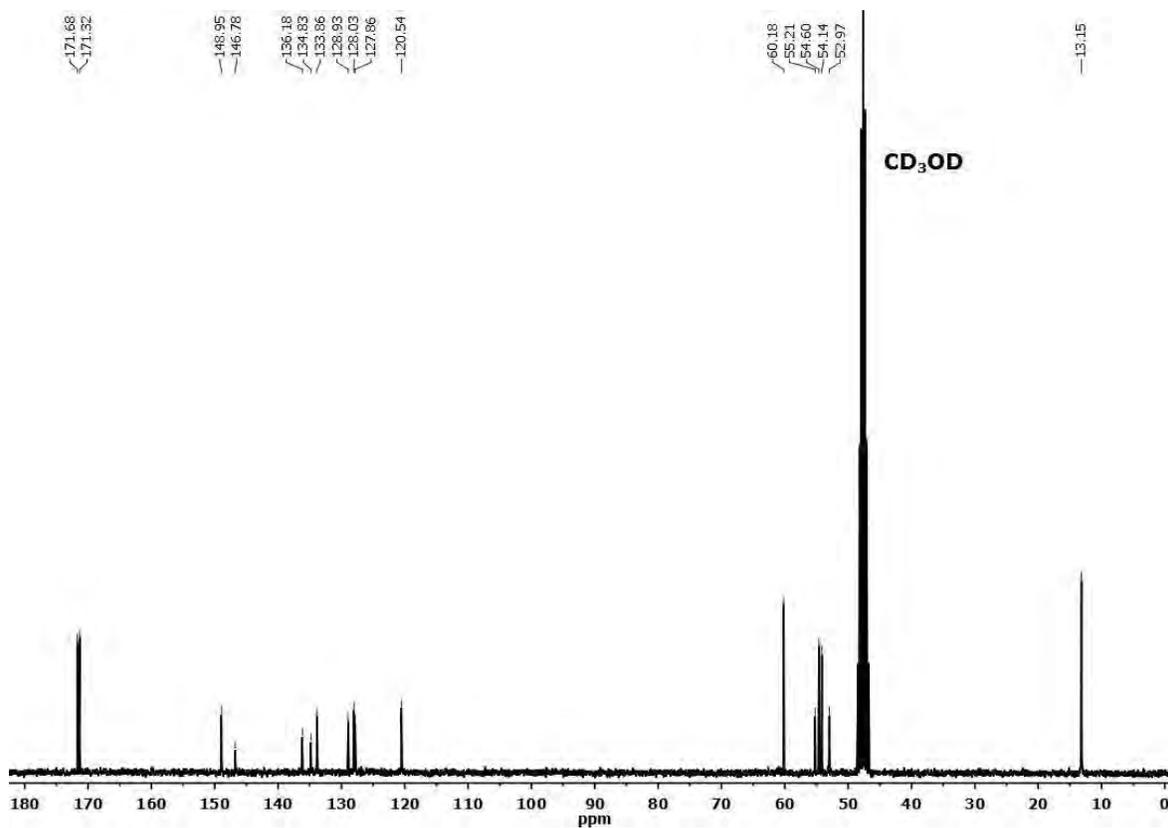


8. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) del Complejo Dinuclear 1.

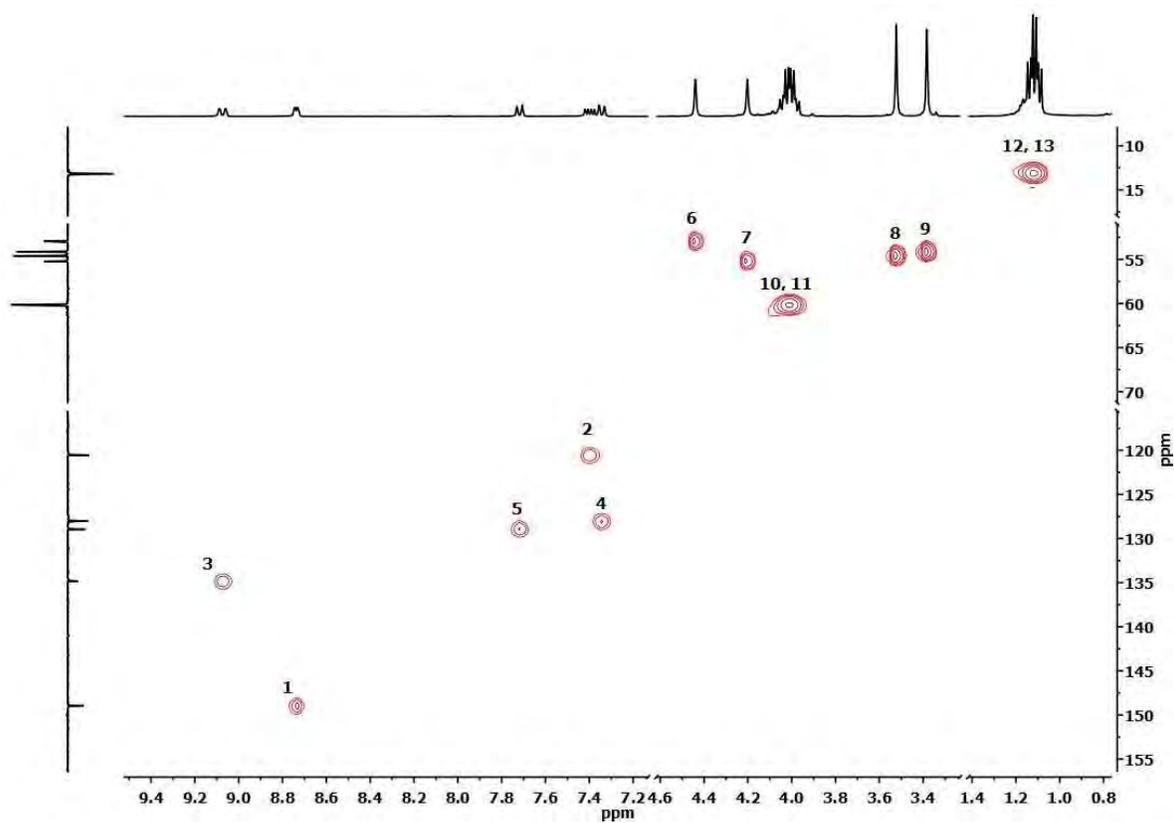
9. Espectro de ¹³C-RMN (300 MHz, CD₃OD) del Complejo Dinuclear 1.10. Espectro HSQC (300 MHz, CD₃OD) del complejo dinuclear 1.

11. Espectro DEPT (300 MHz, CD₃OD) del complejo dinuclear 1.12. Espectro de ¹⁹F-RMN (300 MHz, CD₃OD) del Complejo Dinuclear 1.

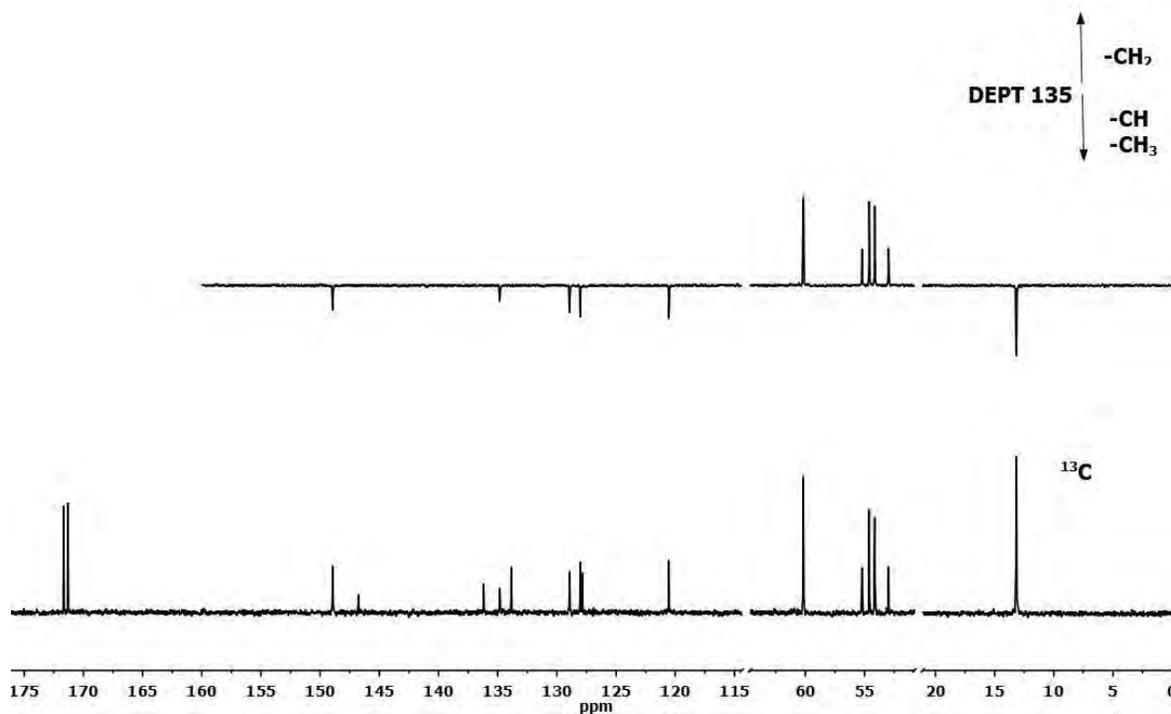
13. Espectro de Masas (ESI⁺) del Complejo Dinuclear 1.14. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) de 5,8-Bis[N-(metil)iminodiacetato]quinolina, L2.



15. Espectro de ¹³C-RMN (300 MHz, CD₃OD) de 5,8-Bis[N-(metil)iminodiacetato]quinolina, L2.



16. Espectro HSQC (300 MHz, CD₃OD) de 5,8-Bis[N-(metil)iminodiacetato]quinolina, L2.



17. Espectro DEPT (300 MHz, CD₃OD) de 5,8-Bis[N-(metil)iminodiacetato]quinolina, L2.

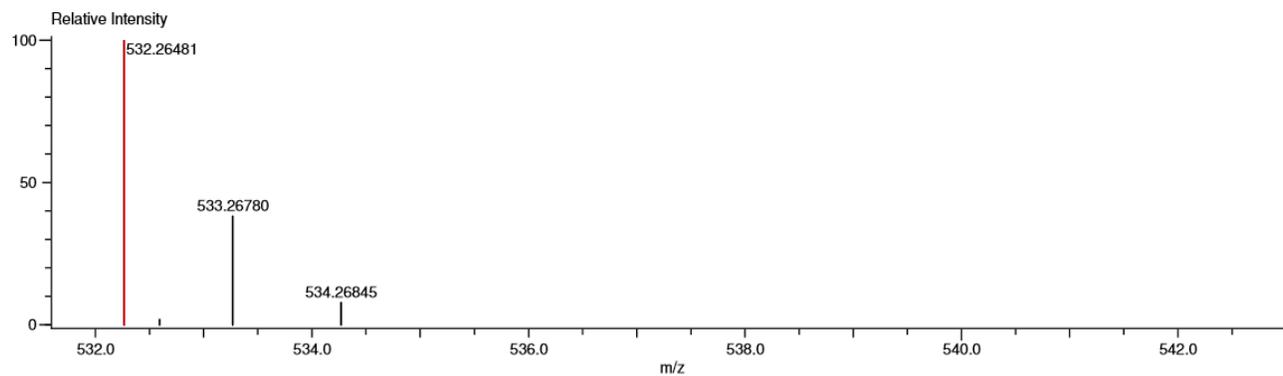
Data:2444 QDEAc
Sample Name:Dr Dorazco Alejandro

Acquired:6/22/2016 12:03:46 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal PEG 600
Created:12/9/2016 2:02:43 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1
Element:¹²C:0 .. 45, ¹H:0 .. 80, ¹⁴N:2 .. 5, ¹⁶O:0 .. 8

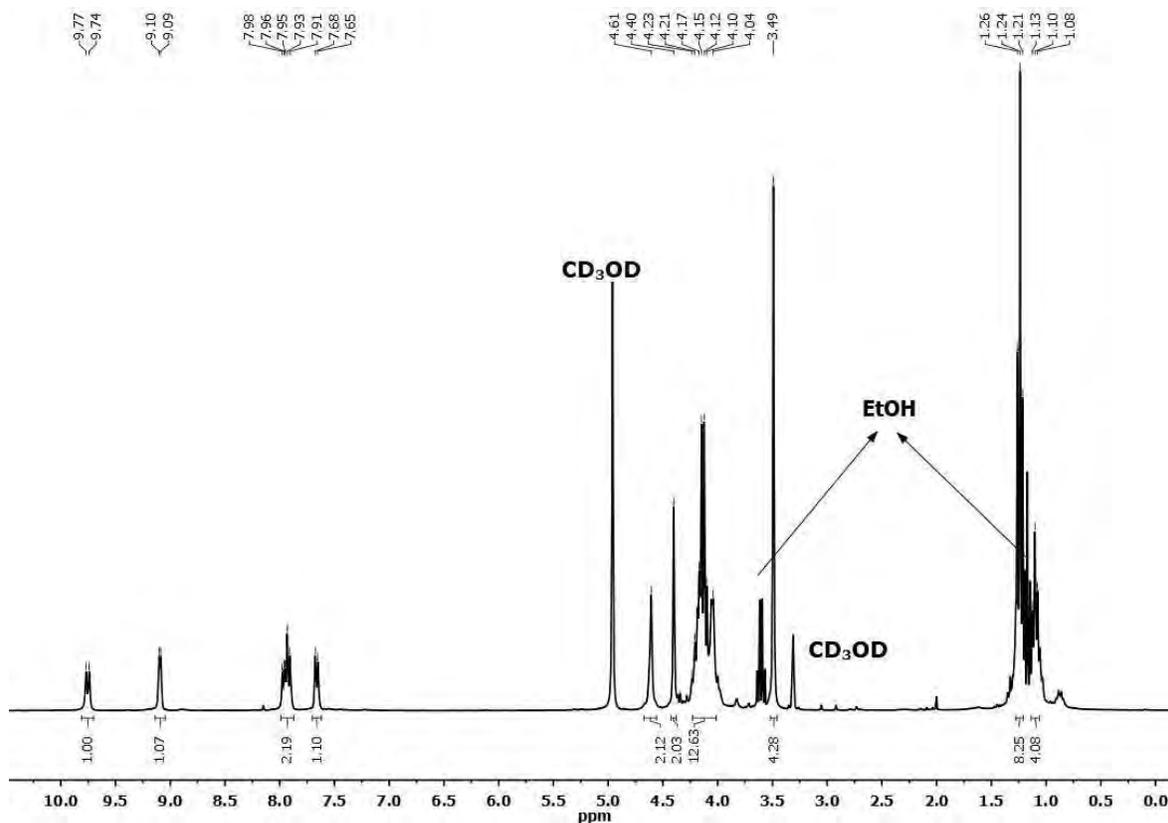
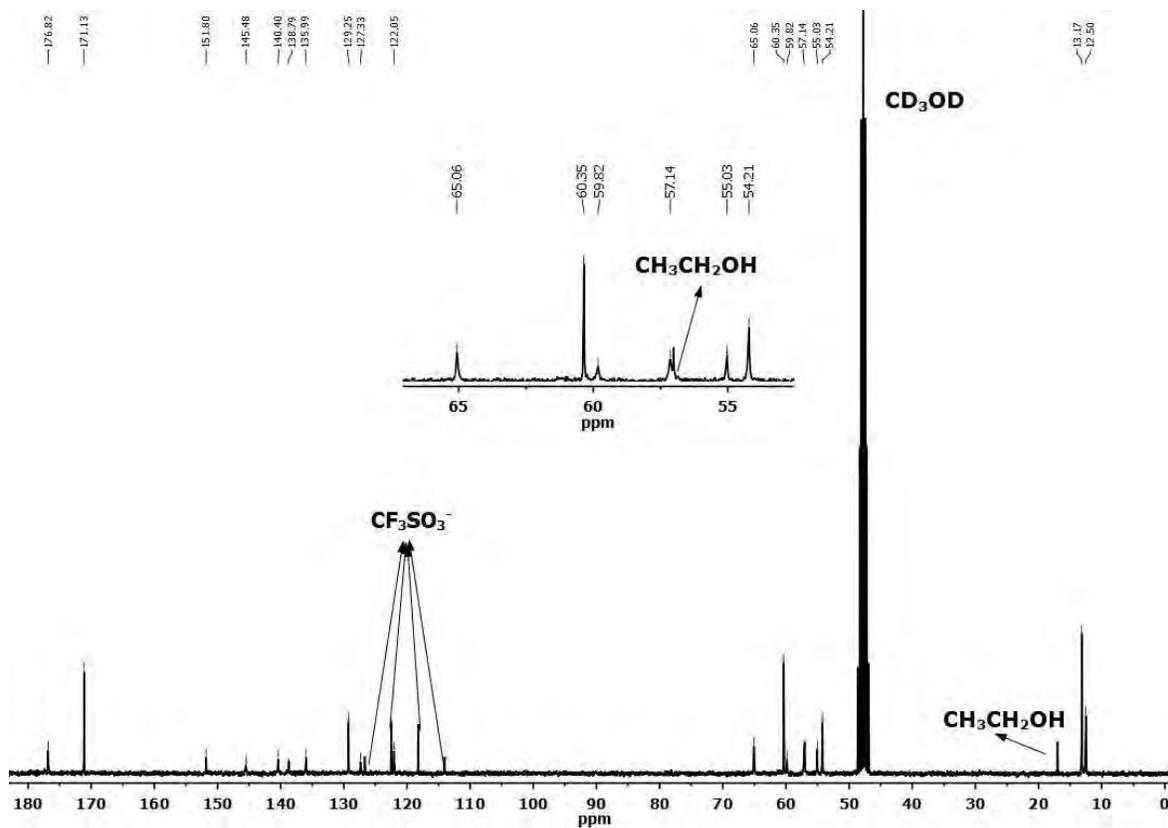
Tolerance:2.00(mmu)

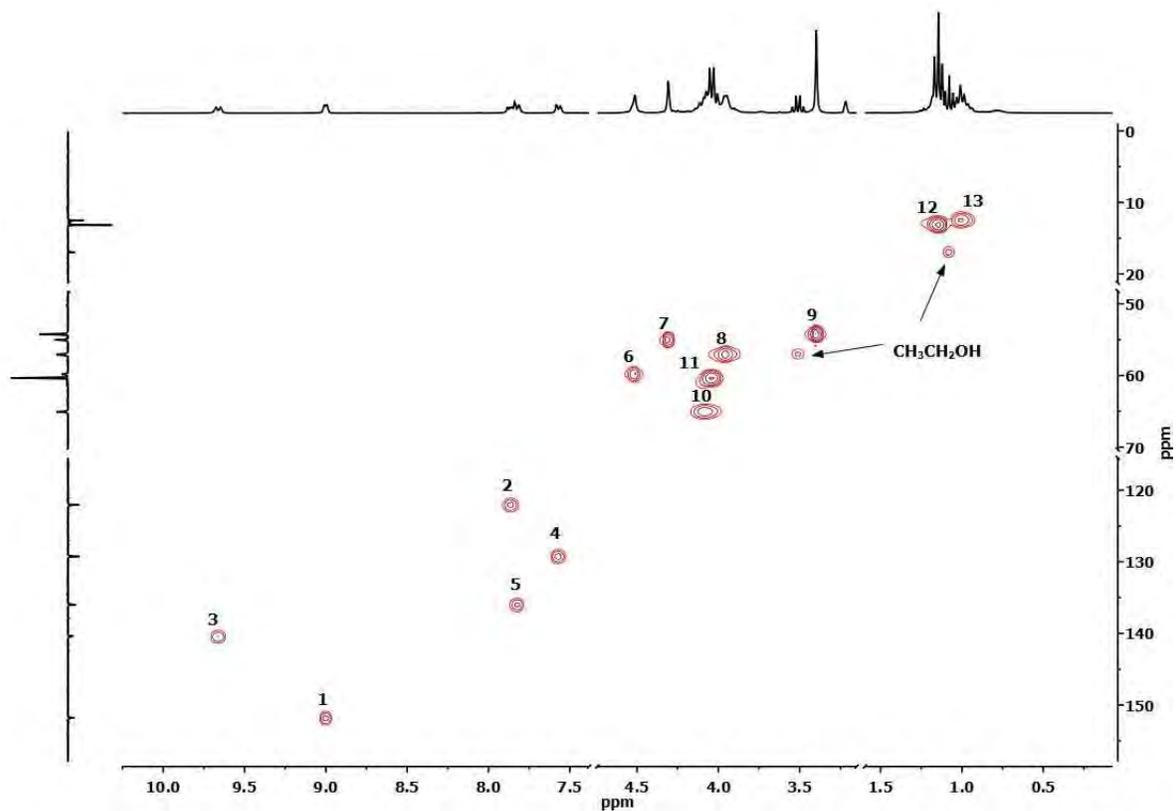
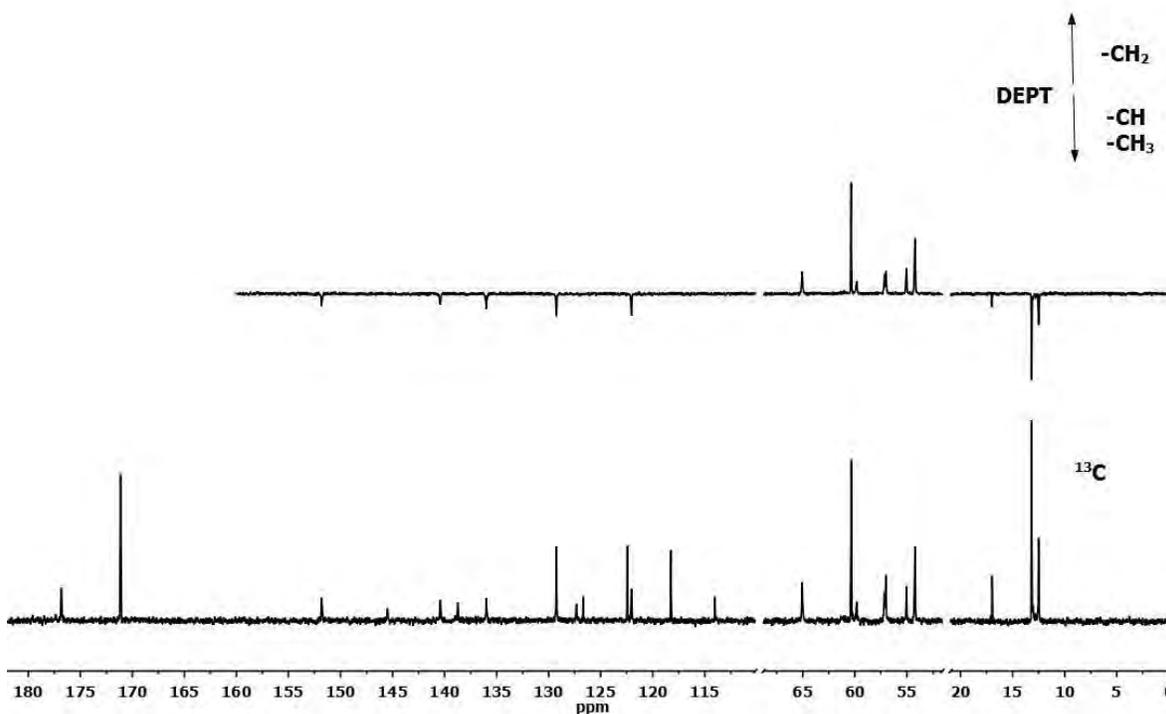
Unsaturation Number:3.0 .. 24.0 (Fraction:Both)

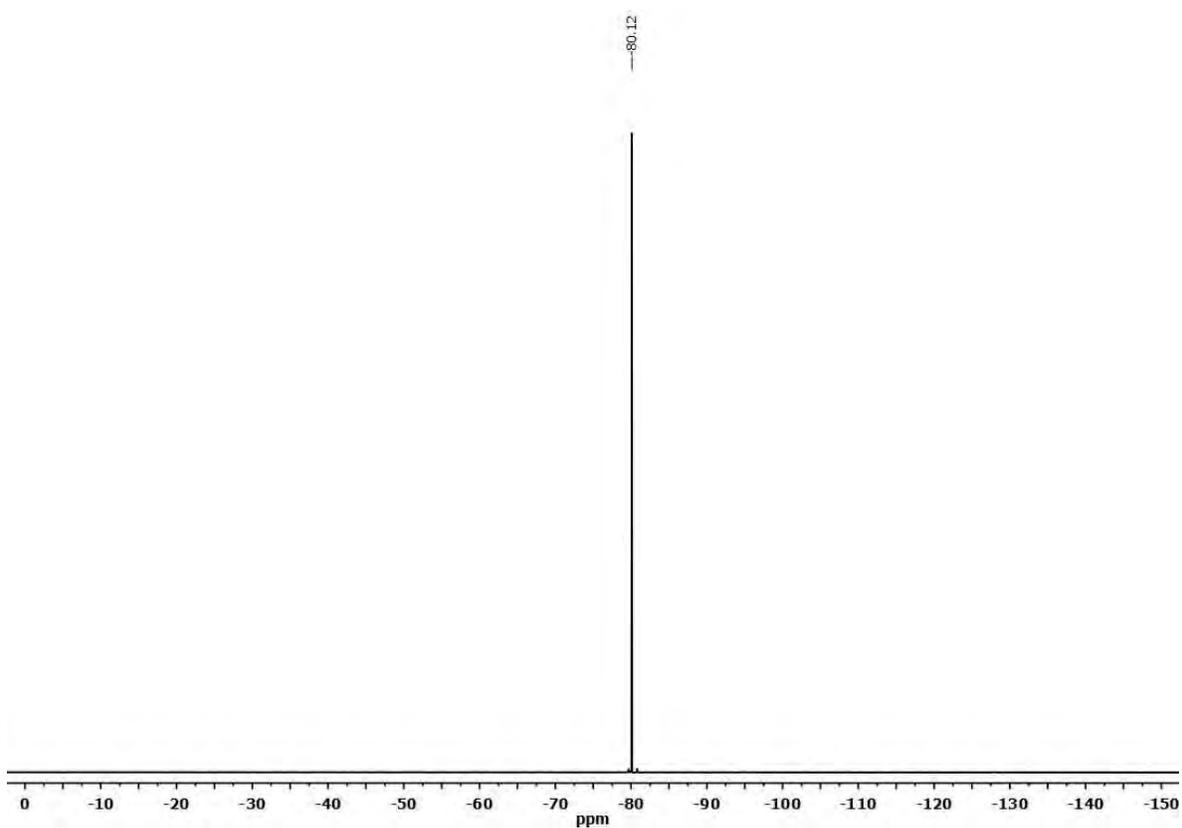
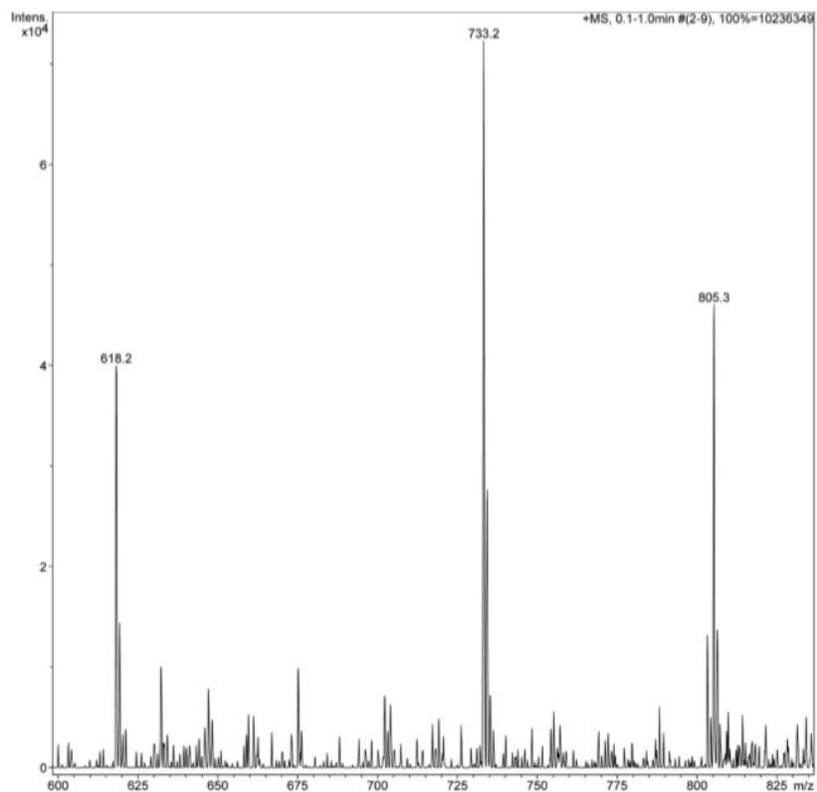


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
532.26481	20992.75	532.26589	-1.08	-2.03	¹² C ₂₇ ¹ H ₃₈ ¹⁴ N ₃ ¹⁶ O ₈	10.5

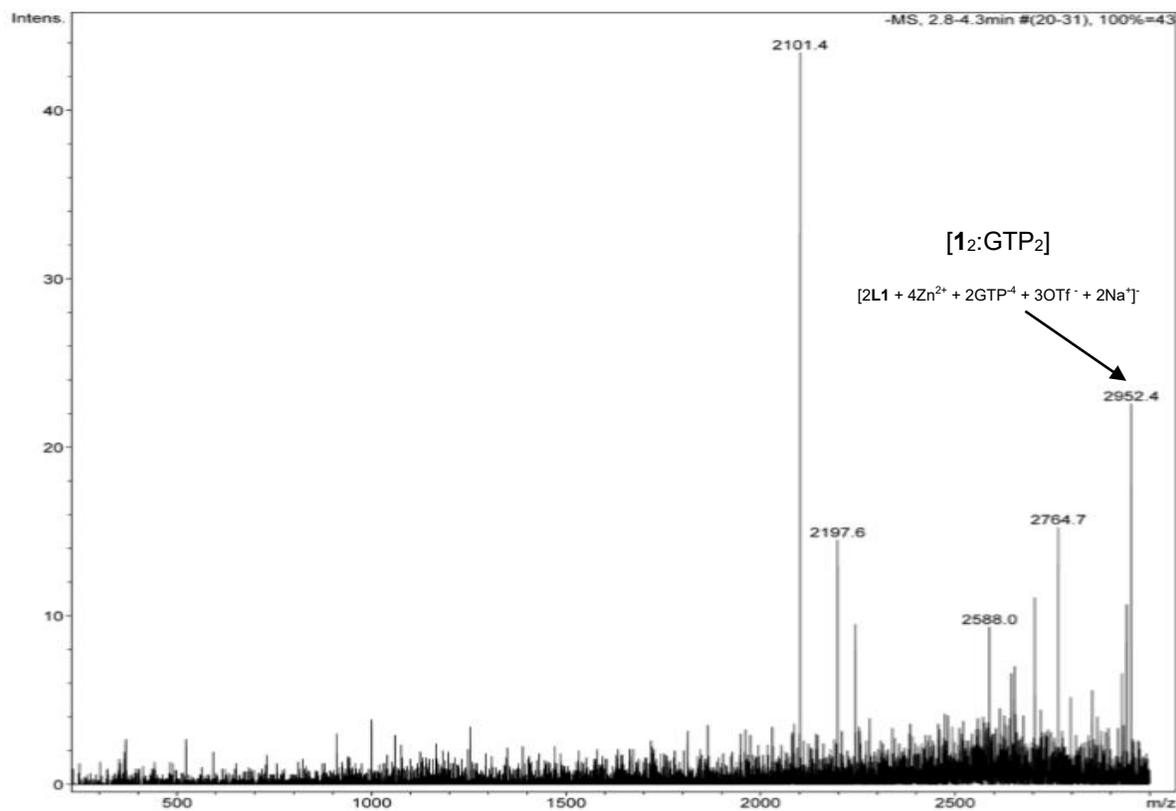
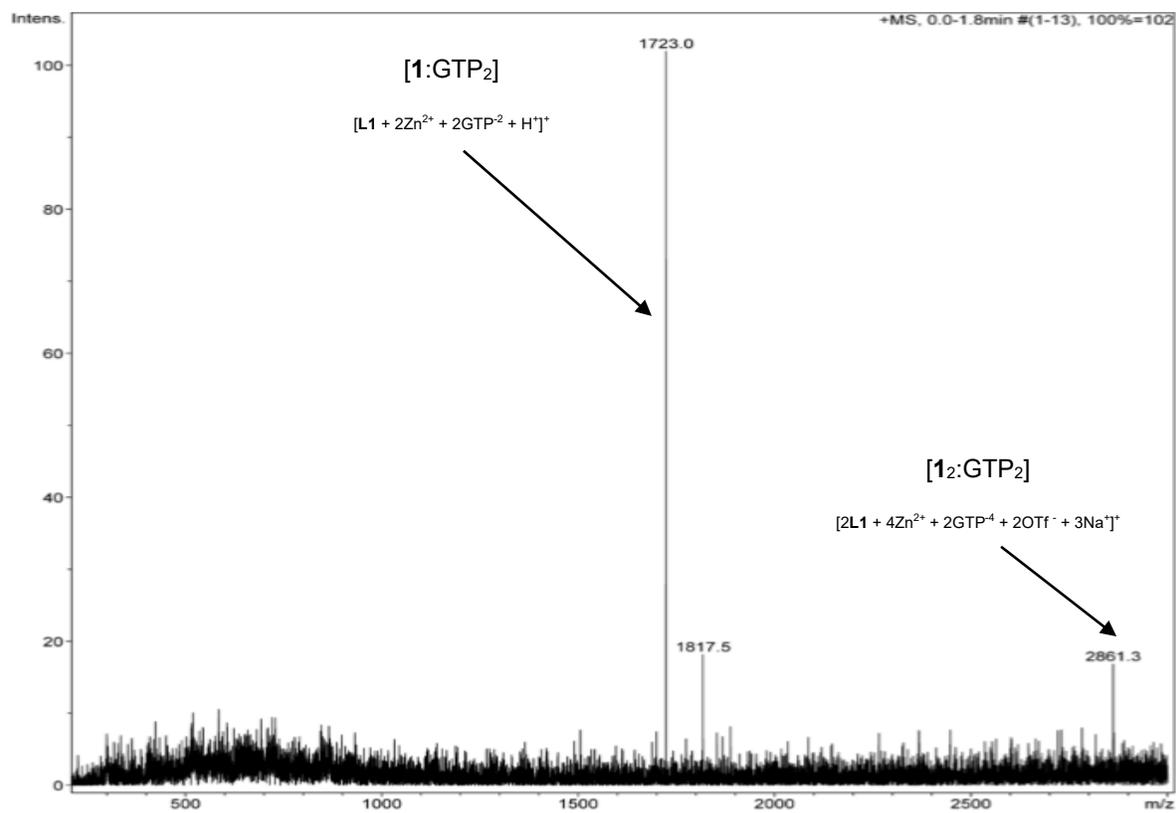
18. Espectro de Masas (DART⁺) de 5,8-Bis[N-(metil)iminodiacetato]quinolina, L2.

19. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) del Complejo Dinuclear 2.20. Espectro de ^{13}C -RMN (300 MHz, CD_3OD) del Complejo Dinuclear 2.

21. Espectro HSQC (300 MHz, CD₃OD) del Complejo Dinuclear 2.22. Espectro DEPT (300 MHz, CD₃OD) del Complejo Dinuclear 2.

23. Espectro de ^{19}F -RMN (300 MHz, CD_3OD) del Complejo Dinuclear 2.

24. Espectro de Masas (ESI) del Complejo Dinuclear 2.



25. Espectro de Masas (ESI[±]) del Complejo Supramolecular [1-GTP]= 25 μM en H₂O.