

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES

**Estudios de Reconocimiento Molecular de Aminoácidos Básicos
por Receptores Tipo Ciclofano Mediante Calorimetría de Titulación
Isotérmica y Resonancia Magnética Nuclear de Protón**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA DE MATERIALES

Presenta

ABIGAIL MIRANDA DE LA ROSA

Hermosillo, Sonora

Enero de 2010

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	vii
OBJETIVOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Interacciones No Covalentes.....	4
Interacciones Iónicas y Bipolares.....	4
Enlace de Hidrógeno.....	6
Interacciones π	12
Interacciones de van der Waals.....	14
Efecto Hidrofóbico.....	16
Receptores Moleculares Tipo Ciclofano y sus Aplicaciones.....	20
Reconocimiento y Transporte de Monómeros de Ácidos Nucleicos..	23
Ciclofanos como Análogos Sintéticos de Enzimas.....	24
Aminoácidos.....	25
Importancia de los Aminoácidos a Nivel Biológico.....	26
L-arginina.....	28
L-histidina.....	28
L-lisina.....	29
Reconocimiento Molecular de Aminoácidos	30

	Página
Actividad Digestiva de las Serinproteasas.....	31
Tripsina.....	33
Quimotripsina.....	33
Elastasa.....	33
Transmisión del Impulso Nervioso.....	33
Parámetros Termodinámicos y su Interpretación.....	35
Entalpía.....	36
Entropía.....	36
Energía libre de Gibbs.....	38
Análisis Calorimétrico.....	39
Calorímetro Adiabático.....	40
Calorímetro Isoperibol.....	40
Calorímetro Isotérmico.....	41
Calorímetro de Conducción de Calor.....	42
Titulación Termométrica.....	42
Entalpimetría de Inyección Directa.....	42
Entalpimetría de Flujo.....	42
Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).....	43
Fundamentos Teóricos.....	45
Instrumento.....	46
Parámetros Obtenidos en el Análisis Calorimétrico.....	49
Constante de Afinidad (K_a).....	49

	Página
Obtención de K_a en ITC.....	51
Valor de c	51
Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN 1H).....	55
Fundamentos Teóricos.....	56
Obtención de K_a por RMN 1H	58
PARTE EXPERIMENTAL.....	62
Diseño Experimental.....	62
Materiales.....	67
Métodos.....	69
Calorimetría de Titulación Isotérmica.....	69
Preparación y Tratamiento de las Soluciones.....	69
Solución de Aminoésteres.....	69
Solución de Ciclofano.....	71
Procedimiento Previo a la Titulación Calorimétrica.....	71
Titulación Calorimétrica.....	71
Modelos de Ajuste para la Obtención de K_a	72
Resonancia Magnética Nuclear de Protón RMN 1H	72
Preparación de las Soluciones de los Receptores.....	74
Preparación de las Soluciones de los Huéspedes.....	74
Titulación Mediante Espectrofotometría de RMN 1H	76
Experimento de Job.....	77
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	78

	Página
Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).....	78
Ciclofano PO.....	82
Ciclofano PC.....	85
Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN 1H).....	89
Ciclofano PO.....	92
Ciclofano PC.....	98
CONCLUSIONES.....	100
RECOMENDACIONES.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación de la interacción puente de hidrógeno.....	7
2. Geometrías de los puentes de hidrógeno.....	9
3. Puentes de hidrógeno presentes en el ADN.....	11
4. Interacción del ión potasio (K+) con agua y benceno.....	13
5. Geometrías de las interacciones $\pi-\pi$	13
6. Interacciones $\pi-\pi$ cara-cara que mantienen unidas a las capas de grafito.....	15
7. Representación del efecto hidrofóbico.....	17
8. Interacción de moléculas orgánicas en solución acuosa durante el efecto hidrofóbico.....	19
9. Estructura del para[5]ciclofano.....	21
10. Celda experimental y celda de referencia en un entorno adiabático.....	48
11. Termograma y curva de titulación típicos en un experimento de ITC.....	52
12. Variación en la forma de la curva de titulación conforme varía el valor de c.....	54
13. Orientación de los espines nucleares al azar y en presencia del campo magnético externo	57
14. Estructura de los receptores utilizados.....	63
15. Estructura y valores de pKa de los metil éster de aminoácidos indicados en cada grupo.....	66
16. Calorímetro de Titulación Isotérmica VP-ITC, Microcal, Inc.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
17.Programa VPViewer 2000 para el ajuste de variables en un experimento de ITC.....	73
18.Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear marca Bruker modelo AVANCE 400.....	75
19.Termogramas y curvas de titulación de los sistemas con PO.....	79
20. Termogramas y curvas de titulación de los sistemas con PC.....	80
21. Modelo de complejación PO-ArgMe.....	84
22.Estructura posible del complejo PO-ArgMe.....	86
23.Modelo de complejación PC-LeuMe.....	88
24.Estructura del ciclofano aniónico indicando con letras minúsculas los diferentes tipos de protones que componen al mismo.....	90
25. Curvas de titulación del receptor PO hacia Arg-OMe y Lys-OMe.....	91
26.Corriente de electrones de un anillo de benceno.....	95
27.Dependencia de la geometría de los anillos aromáticos en PO conforme varía el ángulo entre ellos.....	96
28.Gráfica correspondiente al experimento de job realizado para la determinación de la estequiometría del complejo PO-ArgMe.....	99

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Interacciones no covalentes.....	5
2. Puentes de hidrógeno y sus propiedades.....	9
3. Clasificación de aminoácidos en base a su solubilidad a pH = 7.....	27
4. Clasificación de los aminoácidos en base a su cadena lateral.....	27
5. Sustratos específicos de serinproteasas.....	32
6. Constantes de afinidad y parámetros termodinámicos obtenidos mediante ITC, de la interacción de PO y PC hacia los aminoésteres utilizados en este trabajo a pH = 6.0.....	81
7. Constantes de afinidad obtenidas para el protón “e” mediante RMN 1H, de la interacción de PO y PC hacia los aminoésteres a pD = 6.5 y 298 K.....	93

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las propiedades de reconocimiento molecular de los receptores artificiales PO y PC hacia los metil ésteres de los aminoácidos básicos L-arginina (ArgMe) y L-lisina (LisMe), mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar mediante ITC y RMN ^1H , las constantes de afinidad (K_a) de los complejos formados entre los receptores PO y PC y los huéspedes ArgM, LisMe y LeuMe.
- Obtener los parámetros termodinámicos ΔG , ΔH y ΔS de la formación de los complejos receptor – huésped mediante ITC.
- Definir los factores estructurales de los receptores PO y PC que influyen en la estabilidad de los complejos formados con aminoácidos básicos.

RESUMEN

El reconocimiento molecular hacia los ésteres de arginina y lisina por los receptores aniónicos tipo ciclofano PO y PC, ha sido estudiado mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) y Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ^1H). PO consiste de dos unidades fenileno-O-fenileno ligados a dos cadenas de EDTA y cuenta con cuatro grupos pendientes carboxilato; PC se compone de unidades fenileno- CH_2 -fenileno ubicados en lugar de las unidades fenileno-éter de PO.

Las constantes de asociación (K_a) obtenidas por ITC indican que PO no forma complejo con el éster monocatiónico de leucina y reconoce selectivamente a los ésteres dicatiónicos de arginina ($K_a = 743 \text{ M}^{-1}$) y Lisina ($K_a = 231 \text{ M}^{-1}$), mientras que PC reconoce a los ésteres de lisina ($K_a = 292 \text{ M}^{-1}$) y leucina ($K_a = 105 \text{ M}^{-1}$) y no reacciona con el éster de arginina.

Los complejos obtenidos reflejan procesos endotérmicos tanto para PO como para PC, de tal forma que la formación de complejos es dirigida entrópicamente. De acuerdo a estos resultados, la formación de los complejos se lleva a cabo por medio de interacción electrostática dual y el par iónico resultante se estabiliza por efecto de exclusión del solvente.

Los valores de las constantes obtenidas por titulación de RMN ^1H para los protones aromáticos del ciclofano PO son aproximadamente la mitad de los valores obtenidos mediante ITC, con los ésteres de arginina ($K_a = 410 \text{ M}^{-1}$) y lisina ($K_a = 110 \text{ M}^{-1}$), debido probablemente a las diferencias en las condiciones

experimentales, particularmente de la fuerza iónica y la diferencia entre pH y pD; sin embargo, los valores obtenidos para las K_a siguen la misma tendencia por ambas técnicas. PC no muestra cambios de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) en presencia de los huéspedes, lo cual se atribuye a la rigidez del esqueleto macrocíclico, el cual no sufre un rearrreglo conformacional durante la formación del complejo.

La diferencia en el reconocimiento molecular hacia los ésteres de aminoácidos básicos entre ambos receptores obedece a la rigidez de la estructura del ciclofano: PO es más flexible y puede adaptarse conformacionalmente para enlazar a los ésteres de arginina y lisina. PC posee una cavidad más rígida lo cual le impide llevar a cabo cambios conformacionales para complejar el éster de arginina; sin embargo ésta rigidez le permite formar un complejo de inclusión con el éster del monocatión de leucina, efecto que no se logra con PO.

Los efectos combinados de los sitios aniónicos múltiples y la rigidez molecular en los ciclofanos, son los responsables de las distintas capacidades de reconocimiento molecular.

INTRODUCCIÓN

El reconocimiento molecular es el fenómeno responsable de la alta especificidad con que funcionan los sistemas bioquímicos tales como las hormonas, neurotransmisores, sistemas enzima-sustrato y sistemas antígeno-anticuerpo, entre otros [47].

Las interacciones no covalentes son parte fundamental del proceso de reconocimiento molecular y las investigaciones en esta área motivaron en buena medida el nacimiento de la química supramolecular, que es la rama de la química encargada del estudio los complejos supramoleculares, los cuales son producto de la unión de dos especies químicas a través de interacciones no covalentes [47].

Desde el nacimiento de la química supramolecular, uno de los puntos de mayor atención es la síntesis de receptores específicos para sustratos de interés biológico. Diversos receptores sintéticos han funcionado como sistemas modelo de los procesos bioquímicos naturales y han proporcionado una idea clara y confiable de lo que sucede en dichos procesos [2, 4].

Una ventaja de los receptores artificiales es que se pueden diseñar de acuerdo a lo que se desee estudiar, es decir, es posible elegir el tipo de grupos funcionales que se introducirán para conferirles las características de asociación. Esto facilita los estudios de este tipo de fenómenos *in vitro* [10, 12].

Los receptores artificiales más utilizados como sistemas modelo para el reconocimiento molecular son los compuestos macrocíclicos, los cuales se caracterizan por contener una estructura cíclica con nueve o más átomos, que incluyen al menos tres heteroátomos [47].

Dentro de los compuestos macrocíclicos se encuentran los ciclofanos, los cuales se definen como compuestos cíclicos que contienen al menos una unidad aromática unida por uno o más puentes alifáticos. Son receptores capaces de enlazar especies iónicas y moléculas neutras, tanto inorgánicas como orgánicas.

Una clase de sustratos de mucho interés para los estudios de reconocimiento molecular por receptores artificiales son los aminoácidos, debido a la importancia que tienen a nivel biológico [9,14, 15, 16].

Los receptores artificiales hacia aminoácidos básicos y sus derivados han sido diseñados con el fin de imitar las funciones de los sistemas bioquímicos. Los principales sitios de reconocimiento molecular de los aminoácidos son los grupos amino y carboxilato del carbono alfa; sin embargo, el rol que juegan las cadenas laterales es especialmente importante en los aminoácidos básicos como arginina y lisina, cuyas cadenas laterales están positivamente cargadas a pH fisiológico. Cuando estos aminoácidos básicos constituyen una proteína, las cargas positivas de las cadenas laterales le confieren las características funcionales a la misma, tales como la capacidad de responder a ambientes iónicos y unirse a receptores aniónicos.

En un trabajo previo desarrollado por el Grupo de Química Supramolecular del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, los ciclofanos PO y PC han sido probados exitosamente como receptores de dopamina [13]. Estos ciclofanos tienen cuatro grupos carboxilo, la orientación de los cuales es definida por la rigidez moderada del esqueleto del macrocíclico, el cual está compuesto por grupos fenileno y amida; además los ciclofanos son altamente hidrofóbicos. Por estas características estructurales, ambos ciclofanos cumplen los prerrequisitos como receptores de aminoácidos dicatiónicos, tales como arginina y lisina.

Por lo descrito en las líneas anteriores, en este trabajo se pretende estudiar - mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹H) - las reacciones de formación de complejos supramoleculares entre los receptores PO y PC y los metil ésteres de arginina y lisina, con el fin de establecer la capacidad de los ciclofanos para enlazar y reconocer selectivamente aminoácidos básicos.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Interacciones No Covalentes

Las interacciones no covalentes representan la energía que mantiene unidas a las especies supramoleculares. Son considerablemente más débiles que los enlaces covalentes, cuya energía se ubica entre 150 – 450 kJ mol⁻¹ para enlaces sencillos. Las interacciones no covalentes se encuentran en el rango de 2 kJ mol⁻¹ para las fuerzas de dispersión, hasta 300 kJ mol⁻¹ para las interacciones iónicas. Sin embargo, cuando estas interacciones se presentan de manera cooperativa pueden existir complejos supramoleculares estables. El termino “no covalente” incluye un amplio rango de atracciones y repulsiones que se resumen en la Tabla 1 y se describen a continuación.

Interacciones Iónicas y Bipolares

Se dividen en tres categorías: 1) interacción ión-ión, 2) interacción ión-dipolo y 3) interacción dipolo-dipolo. Las tres están basadas en la atracción entre cargas opuestas expresada en la ley de Coulomb: "La magnitud de cada una de las fuerzas eléctricas con que interactúan dos cargas puntuales es directamente proporcional al producto de las cargas e inversamente proporcional al cuadrado de la distancia que las separa".

- 1) Interacción ión-ión: es la más fuerte de todas y puede compararse con el enlace covalente al tener una magnitud de fuerza de 300 kJ mol⁻¹. Este tipo de interacciones son no direccionales, lo cual significa que ocurren en cualquier orientación [24].

Tabla 1. Interacciones no covalentes.

Interacción	Fuerza (kJ mol⁻¹)	Ejemplo
ión-ión	200-300	Cloruro de tetrabutilamonio.
Ion-dipolo	50-200	Sal en agua
Dipolo-dipolo	5-50	Acetona
Enlace de hidrógeno	4-120	Agua, etanol.
$\pi-\pi$	0-50	Benceno y grafito
van der Waals	<5 (varía dependiendo del área)	Interacción de argón con HCl
Hidrofóbico	No existe un valor	Inclusión de compuestos en ciclodextrinas.

Fuente: [24].

- 2) Ión - dipolo: es de tipo direccional, es decir, se requiere que las moléculas se orienten entre sí, de tal manera que solo se presenta cuando ambas especies se encuentran en la dirección óptima. La energía resultante es entre los 50-200 kJ mol⁻¹.
- 3) Dipolo – dipolo: presenta dependencia de la orientación para que se lleve a cabo y es más débil que la interacción ión – dipolo ya que la densidad de carga en los iones es mayor que en los dipolos. A pesar de ser de las interacciones direccionales más débiles, son muy importantes porque proporcionan a las especies moleculares un determinado arreglo espacial. Dicha disposición geométrica es fundamental en los procesos biológicos.

Enlace de Hidrógeno

Es considerada la interacción no covalente de mayor importancia en la química supramolecular ya que se caracteriza por ser fuerte y de alto grado de direccionalidad. Es un tipo especial de interacción dipolo-dipolo entre un protón unido a un grupo donador (D) y un grupo aceptor (A) (Figura 1). Los donadores de enlace de hidrógeno son grupos con un átomo de hidrógeno unido a un átomo electronegativo, formando así un dipolo, en donde el átomo de hidrógeno tendrá carga positiva parcial.

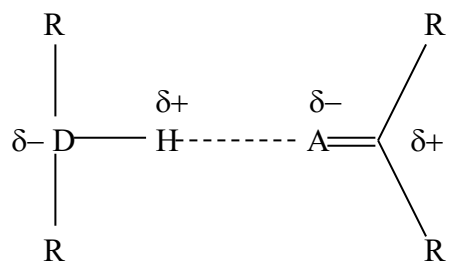


Figura 1. Representación de la interacción enlace de hidrógeno. El átomo aceptor es representado por la letra A y el donador por la letra D [24].

Los grupos aceptores de enlace de hidrógenos son dipolos con átomos que contienen electrones disponibles (no enlazantes), como por ejemplo el átomo de oxígeno en el grupo carbonilo, con los cuales puede interactuar el hidrógeno con carga parcial positiva.

En la naturaleza existen varios tipos de moléculas que forman las “unidades de construcción” de macromoléculas biológicamente importantes, que contienen varios grupos funcionales tanto aceptores como donadores de enlace de hidrógeno: aminoácidos, carbohidratos, nucleótidos, entre otros.

La energía de ésta interacción está en el intervalo de 4 - 120 kJ mol⁻¹, aunque la mayoría se ubica por debajo de los 60 kJ mol⁻¹.

La fuerza del enlace de hidrógeno difiere entre varios sistemas y no necesariamente esta correlacionada con la acidez de Brönsted del donador de protón. La fuerza de la interacción depende principalmente del tipo de átomo electronegativo unido al átomo de hidrógeno y a la geometría que adopta el enlace de hidrógeno en la estructura. Las diferentes geometrías de los enlaces de hidrógeno se muestran en la Figura 2.

La geometría de un enlace de hidrógeno y el tipo de grupo donador y aceptor determinan la longitud y fuerza de la interacción, ésta última se clasifica en tres categorías: fuerte, intermedia y débil (Tabla 2).

El enlace de hidrógeno fuerte tiene carácter similar al covalente (por ello se le conoce como enlace), en donde el átomo de hidrógeno esta cerca del punto central entre el átomo donador y aceptor.

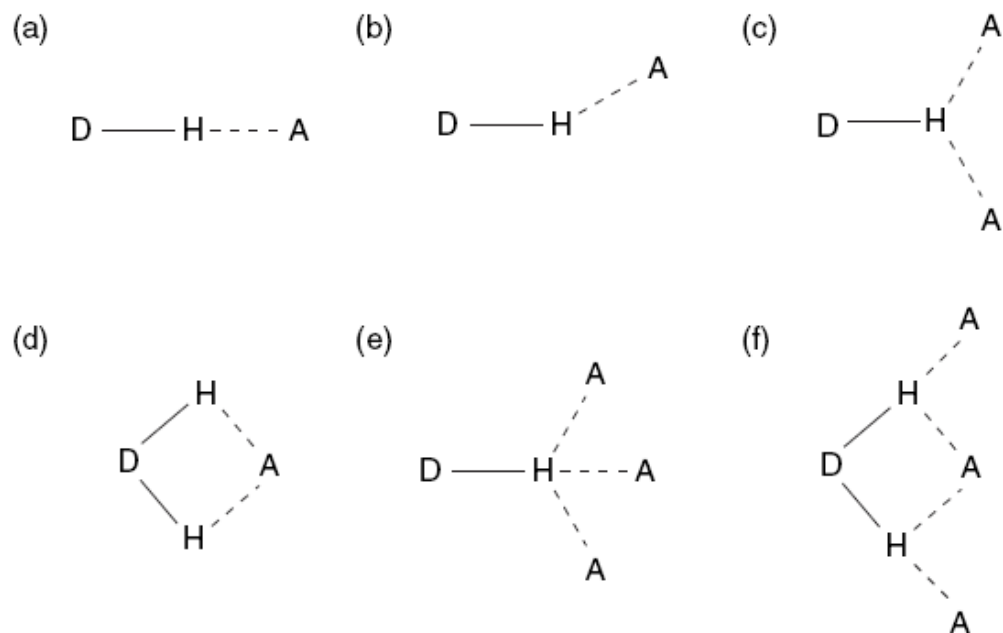


Figura 2. Geometrías de los puentes de hidrógeno: a) lineal; b) inclinado; c) donador bifurcado; d) aceptor bifurcado; e) trifurcado; f) tres centros bifurcados [24].

Tabla 2. Enlace de hidrógeno y sus propiedades (A, aceptor; D, donador).

<i>Interacción/propiedad</i>	<i>Fuerte</i>	<i>Moderado</i>	Débil
D-H...A	Principalmente covalente	Principalmente electrostático	electrostático
Energía de interacción (kJ mol ⁻¹)	60-120	16-60	<12
H...A	1.2-1.5	1.5-2.2	2.2-3.2
D...A	2.2-2.5	2.5-3.2	3.2-4.0
Ángulo de interacción	175-180	130-180	90-150

Fuente: [24].

Esta interacción es más intensa con el hidrógeno situado entre dos bases fuertes, por ejemplo en el ión HF₂⁻ que es prácticamente lineal con el átomo de hidrógeno entre los dos átomos de fluor (F⋯H⋯F)⁻ [24].

Se forman enlaces de hidrógeno de fuerza intermedia entre un donador y un aceptor neutros, vía pares de electrones no enlazantes, como sucede en la autoasociación de ácidos carboxílicos.

Este tipo de enlace no tiene geometría lineal sino que está ligeramente flexionado y su distribución angular esta influenciada por factores estadísticos.

Por último, el enlace de hidrógeno débil, es aún menos lineal y en algunos casos puede formar interacciones perpendiculares, por ejemplo la interacción CH⋯π entre anillos aromáticos cuando el enlace C-H se dirige directamente hacia el sistema conjugado.

La alta direccionalidad de los enlaces de hidrógeno ha demostrado ser de gran utilidad en el diseño de sistemas supramoleculares. Un ejemplo biológico sobresaliente es el ADN, en donde los numerosos enlaces de hidrógeno son los responsables de mantener unida la doble hélice de su estructura (Figura 3).

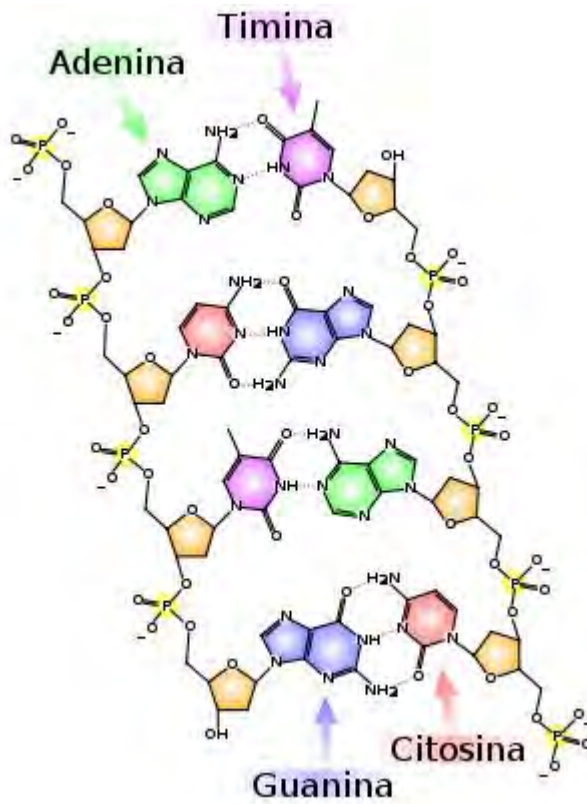


Figura 3. Enlaces de hidrógeno presentes en el ADN. Estos se representan con una línea punteada entre guanina y citosina y adenina y timina. Esta interacción existe a lo largo de toda la doble hélice del ADN.

Interacciones π

Existen dos tipos de interacciones π que se presentan en los sistemas supramoleculares: (i) interacción catión- π , e (ii) interacción π - π . La interacción catión- π es bien conocida en el campo de la química organometálica, en donde grupos olefínicos se enlazan a metales de transición, aunque en este caso no es considerada como interacción no covalente.

Sin embargo, los metales alcalinos y alcalinotérreos también pueden interactuar con sistemas que contienen dobles enlaces, con energías de enlace de 5 -89 kJ mol⁻¹, por ejemplo, la interacción de los iones potasio (K⁺) con benceno tiene una energía similar a la interacción K⁺- H₂O. Sin embargo, el catión potasio es más soluble en agua que en benceno debido a que no es estéricamente posible acomodar tantas moléculas de benceno como de agua alrededor del ión metálico como se muestra en la Figura 4.

Las interacciones π - π se presentan generalmente de dos formas. El primer tipo es la interacción cara-cara, en donde dos sistemas de anillos aromáticos paralelos, separados por una distancia 3.5 Å, se encuentran desplazadas uno del otro de tal manera que la interacción se da entre el centro de un anillo y la esquina del otro (Figura 5 a).

El segundo tipo es cuando hay un ordenamiento borde-cara, en donde un átomo de hidrógeno de uno de los anillos interactúa en orientación perpendicular con respecto al centro del otro anillo (Figura 5 b).

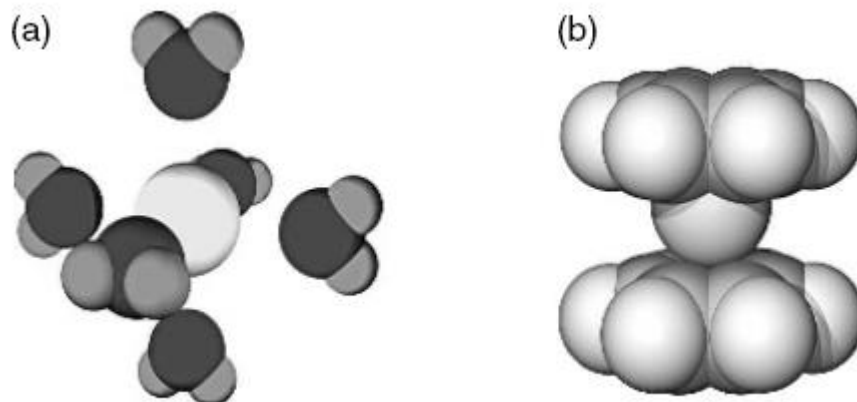


Figura 4. Interacción del ión potasio (K^+) con a) agua y b) benceno. Seis o más moléculas de agua pueden interactuar con K^+ mientras que sólo hay espacio para que dos moléculas de benceno interactúen con K^+ .

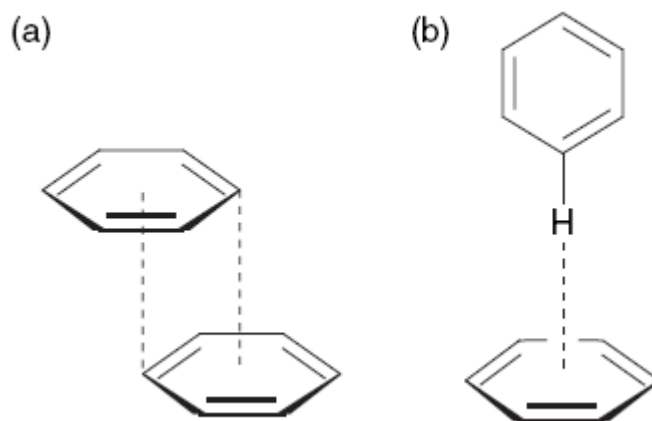


Figura 5. Geometrías de las interacciones π - π . a) Ordenamiento cara - cara y b) ordenamiento borde - cara.

La interacción $\pi-\pi$ surge de la atracción entre la carga negativa originada por la nube electrónica del sistema conjugado del anillo y la carga positiva del esqueleto de enlaces σ de una molécula vecina.

Las interacciones $\pi-\pi$ existen en la naturaleza y las podemos encontrar en la interacción cara-cara que se presenta entre las bases del ADN. Otro ejemplo es la estructura del grafito, que se mantiene unida mediante interacciones $\pi-\pi$ cara-cara (Figura 6), las cuales son débiles y por lo tanto las capas que conforman el grafito se deslizan fácilmente unas con respecto a otras. Es por el deslizamiento de estas capas que el grafito se emplea en lubricantes.

Interacciones de van der Waals

Las interacciones de van der Waals son efectos de dispersión que involucran dos componentes denominados *interacción de London* e *interacción de intercambio y repulsión*.

Las interacciones de van der Waals surgen de fluctuaciones de la distribución de electrones entre especies muy cercanas entre sí. La nube de electrones de una molécula es capaz de moverse de su ubicación momentánea en la molécula y con ello formar un dipolo instantáneo en la molécula. Este tipo de interacciones es no direccional [24].

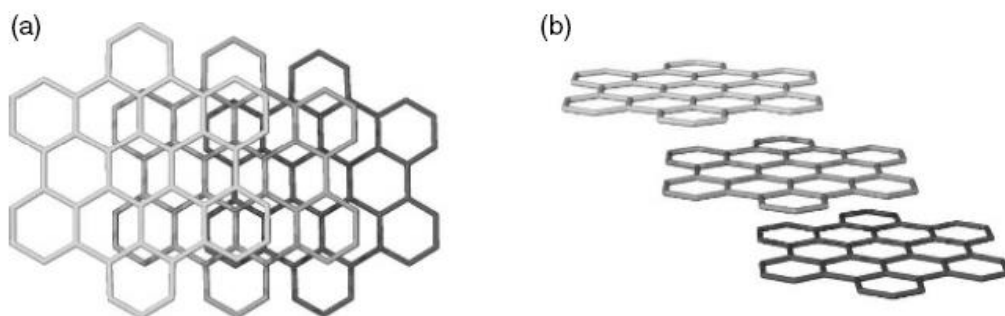


Figura 6. Interacciones π - π cara-cara que mantienen unidas a las capas de grafito. Representación de las capas a) con un enfoque desde arriba y b) con enfoque de lado.

Este desplazamiento en la distribución de electrones (o dipolo) entre dos especies adyacentes alineará a las moléculas de tal manera que la carga parcial positiva de una será atraída por la carga parcial negativa de otra y se producirá una interacción de London. La fuerza de éstas interacciones es dependiente de la polarizabilidad de la molécula; entre mayor sea ésta, mayor será la fuerza de interacción. La energía potencial de las interacciones de London decrece rápidamente conforme la distancia (r) entre las moléculas aumenta (depende del recíproco de la sexta potencia de la distancia; es decir, $1/r^6$).

Las interacciones de van der Waals son importantes en la formación de compuestos de inclusión o encapsulamiento de moléculas orgánicas pequeñas por cavidades moleculares [24].

Efecto Hidrofóbico

El efecto hidrofóbico surge de la exclusión de los grupos o moléculas no polares de una solución acuosa (Figura 7).

Ésta situación es energéticamente más estable porque las moléculas de agua interactúan más fuerte entre ellas o con otras moléculas polares que con las no polares.

Este efecto juega un papel importante en algunos sistemas supramoleculares, por ejemplo, en el reconocimiento molecular de moléculas orgánicas por ciclofanos o ciclodextrinas en agua.

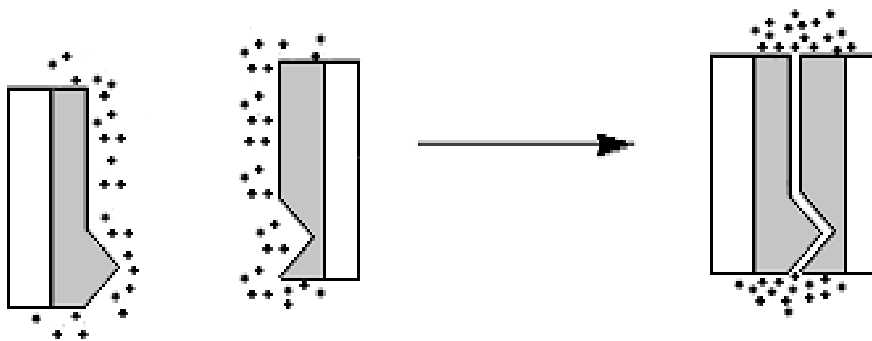


Figura 7. Representación del efecto hidrofóbico. Puede apreciarse el desplazamiento de las moléculas de agua (área punteada) de la superficie hidrofóbica (área gris) durante éste efecto.

Dicha interacción puede dividirse en dos componentes energéticos conocidos como efecto hidrofóbico entálpico y efecto hidrofóbico entrópico [24].

Las interacciones con efecto hidrofóbico entálpico se presentan cuando un huésped reemplaza el agua contenida en una cavidad.

Esto ocurre fácilmente ya que el agua no interactúa fuertemente con la cavidad hidrofóbica del receptor y la energía del sistema es alta. Una vez que el agua ha sido desplazada por el huésped, la energía del sistema disminuye por la interacción de las moléculas de agua excluidas de la cavidad con el resto del solvente.

En este caso también hay un factor entrópico, ya que el agua que previamente se encontraba ordenada dentro de la cavidad se desordena fuera de la misma.

Las interacciones que presentan efecto hidrofóbico entrópico se presentan cuando hay dos o más moléculas orgánicas en solución acuosa, en donde cada una de ellas, se encuentra rodeada de una capa ordenada de moléculas de agua con el fin de mantenerlas en solución. Al llevarse a cabo la combinación de las mismas, se da la formación de una nueva capa de agua que rodea al complejo supramolecular formado. Sucedido esto, la superficie orgánica que se desea mantener en solución disminuye, y con ello, la capa ordenada de moléculas de agua también será menor, hay menos interrupciones (un hueco en la fase acuosa en lugar múltiples huecos) y por lo tanto una ganancia entrópica y la energía libre del sistema disminuye [24] (Figura 8).

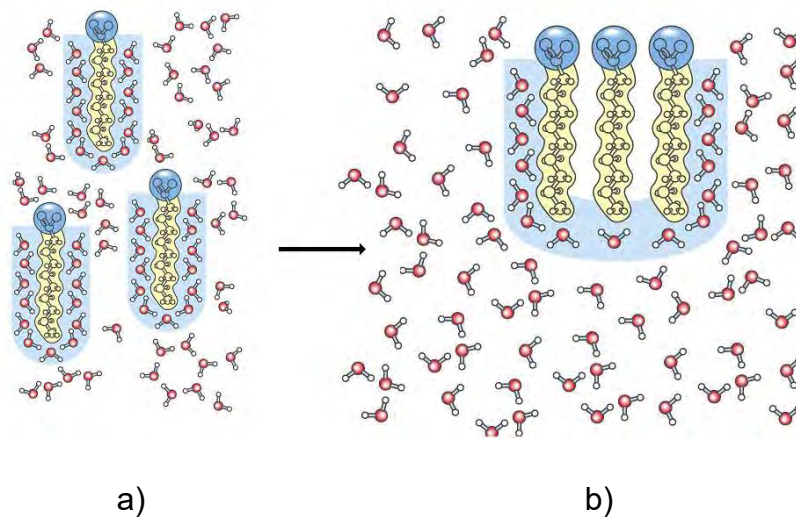


Figura 8. Interacción de moléculas orgánicas en solución acuosa durante el efecto hidrofóbico. a) Antes de interactuar, donde existe mayor número de huecos, b) Unión de grupos hidrofóbicos formando un solo hueco. El área azul representa la capa de agua ordenada rodeando los grupos hidrofóbicos (huecos).

Receptores Moleculares Tipo Ciclofano y sus Aplicaciones

En el desarrollo de la química supramolecular se han logrado sintetizar varios tipos de receptores. Entre estos se encuentran los compuestos macrocíclicos de los cuales destacan los calixarenos, las ciclodextrinas y los ciclofanos.

Existen muchos compuestos de este tipo que ya han sido estudiados y se diferencian por sus grupos funcionales, los cuales les confieren características de reconocimiento hacia sustratos afines a estos grupos, ya sean hidrofóbicos o hidrofílicos [2].

El reconocimiento molecular es un proceso que involucra tanto unión como selección de un sustrato por una molécula receptora [47], y este se lleva a cabo a nivel biológico y en experimentos *in vitro* que pueden llevarse a cabo por receptores artificiales.

Dado que en este trabajo se utilizan los receptores artificiales denominados ciclofanos el enfoque será dirigido hacia éstos últimos.

Un compuesto macrocíclico tipo ciclofano se define de manera concreta como una molécula cíclica que contenga al menos una unidad aromática unida al menos por un puente alifático [46] (Figura 9).

La presencia de anillos aromáticos le confiere a la molécula una estructura bien definida, con profundidad suficiente y la rigidez determinante para la organización de los sitios de enlace.

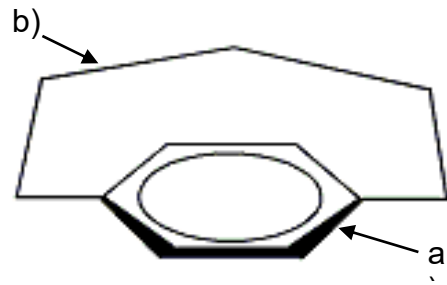


Figura 9. Estructura del para[5]ciclofano. a) unidad aromática y b) puente alifático.

Para lograr que un ciclofano adquiriera solubilidad en agua se introducen cierto número de grupos cargados ya sea en el borde de la cavidad o más cercanos a los sitios de enlace.

Otra característica de los ciclofanos es que pueden manejarse en disolventes orgánicos como receptores de compuestos orgánicos o iones metálicos [8].

El hecho de que los ciclofanos sean tan eficientes y utilizados para llevar a cabo el reconocimiento molecular, se debe a que cumplen con muchas de las características que deben satisfacer los receptores artificiales para realizar este fenómeno, los cuales son:

- 1 Deben ser sintetizados por métodos sencillos.
- 2 Manifestar selectividad en el reconocimiento de moléculas huésped en base a su constitución y configuración.
- 3 Ser químicamente estables.
- 4 Contar con sitios para la introducción de grupos catalíticos o sitios de reconocimientos adicionales.
- 5 Tener la posibilidad de unirse a compuestos poliméricos.

Se considera que son el centro de los receptores artificiales pues tienen una gran capacidad de complejación hacia sustratos de diferente naturaleza: compuestos orgánicos e inorgánicos, en forma de cationes o aniones e inclusive moléculas neutras.

Los ciclofanos han sido utilizados como modelos de diferentes procesos biológicos, en donde existe enantioselectividad y centros fotosintéticos [43, 44], así como también en donde existen propiedades enzimáticas, éste último es especialmente interesante para la construcción de enzimas artificiales donde la selectividad esta determinada por características estructurales. Cabe mencionar que éstas moléculas han sido empleadas como receptores artificiales que son capaces de proveer sitios de reconocimiento hidrofóbico y de formar agregados anfífilicos (tal como sucede en las micelas) [45].

Algunas de las aplicaciones de los ciclofanos como receptores artificiales son: emplear con ellos nuevas técnicas de separación, síntesis de nuevos polímeros con propiedades electro-ópticas, proporcionar nuevas herramientas para el mapeo del genoma humano y profundizar en investigaciones del plegamiento de las proteínas [10]. A continuación se presentan dos importantes ejemplos del posible uso de ciclofanos como receptores artificiales.

Reconocimiento y Transporte de Monómeros de Ácidos Nucleicos

Algunos compuestos análogos a los nucleósidos han logrado llamar fuertemente la atención debido al uso potencial de los mismos en la quimioterapia antiviral, en especial el 3-Azido-2,3-didesoxitimidina (AZT), que es un fármaco aprobado para el tratamiento contra el SIDA.

El mecanismo de acción propuesto para éste tipo de fármacos consiste en que al entrar éstas sustancias a la célula, son fosforiladas en el citoplasma y producen un nucleótido activo, éste último puede inhibir una enzima esencial

para el virus y con ello es capaz de acabar con el crecimiento de la cadena de ADN del mismo.

A partir del mecanismo descrito anteriormente se puede inferir que el requerimiento primordial para la actividad farmacológica es el transporte de estos análogos de nucleósidos hasta el interior celular, a través de una membrana celular lipofílica. Ciertos derivados fosforilados de nucleobases presentan actividad antiviral *in vitro*. Sin embargo debido que son compuestos hidrofílicos y poseen grupos cargados eléctricamente, tienen penetración celular pobre. Si se contara con transportadores selectivos de éste tipo de compuestos, pudieran ser utilizados para el aumento del ingreso de los fármacos dentro de la célula, elevando con esto último su efectividad. En este sentido, los ciclofanos son buenos candidatos para funcionar como moléculas acarreadoras de nucleósidos.

Actualmente se han realizado diversas investigaciones respecto a la obtención de moléculas acarreadoras que han logrado el éxito en el transporte de nucleótidos, nucleósidos y bases púricas y piridimínicas y con ello han contribuido al conocimiento del mecanismo del reconocimiento selectivo y el transporte celular de los mismos [42, 54].

Ciclofanos como Análogos Sintéticos de Enzimas

Los procesos biológicos han motivado la mayor parte de los estudios de reconocimiento molecular y uno de los objetivos principales de la síntesis de

receptores es que sean capaces de imitar además de la unión selectiva de un sustrato, la propiedad catalítica que tienen las enzimas.

Lo anterior puede ser logrado mediante la funcionalización de receptores artificiales, incorporando unidades biológicamente activas (coenzimas o análogos) en el esqueleto del macrociclo.

Los ciclofanos cumplen con ciertas funciones de las enzimas como por ejemplo: la encapsulación de un sustrato en su cavidad, la cual equivale al sitio activo; y la orientación del sustrato que puede favorecer la intervención de un grupo reactivo unido al receptor, siendo esto el equivalente al agente catalítico.

Actualmente, se ha logrado sintetizar receptores catalíticos utilizando coenzimas fijadas covalentemente a sitios específicos pero éstos sistemas artificiales no logran la eficiencia que poseen las enzimas naturales, sin embargo no requieren de condiciones tan específicas como: pH, temperatura, fuerza iónica y solubilidad que en éstas últimas son determinantes [4, 8, 54] y esto facilita la aplicación de los receptores catalíticos artificiales para diferentes sistemas.

Aminoácidos

Un aminoácido es una molécula que contiene un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH₂) libres. Los α -aminoácidos pueden representarse en general por NH₂-CHR-COOH, siendo R una cadena lateral característica de cada aminoácido la cual varía químicamente. Se conoce un gran número de

aminoácidos, pero solo veinte de ellos forman a las proteínas uniéndose mediante enlaces covalentes conocidos como peptídicos.

Las veinte aminoácidos suelen clasificarse en cuatro grupos en base a su solubilidad: aminoácidos con grupos R no polares o hidrofóbicos, aminoácidos con grupos R polares sin carga, aminoácidos cuyos grupos R están cargados positivamente y aquellos en los que se encuentran cargados negativamente.

Esta clasificación se observa en la Tabla 3. También se pueden clasificar en base a la naturaleza de su cadena lateral (Tabla 4).

En todos los aminoácidos que componen proteínas (excepto la glicina) el carbono α es un carbono asimétrico (el carbono α es el adyacente al grupo carboxilo y amino). De esta manera, los aminoácidos se encuentran en dos formas, una es la imagen espejo de la otra (formas D y L).

Debido a que la forma L se encuentra en los tejidos vivos animales y en las plantas, son consideradas como las más compatibles con el hombre y son importantes a nivel biológico ya que son necesarios para que ciertas vitaminas, minerales y enzimas sean de acción efectiva [6].

Importancia de los Aminoácidos a Nivel Biológico

Nuestro organismo no es capaz de sintetizar todos los aminoácidos que requiere, por ello se clasifican como esenciales y no esenciales, el primer grupo se refiere a aquellos aminoácidos que el cuerpo humano no es capaz de producir por lo tanto se deben suministrar a través de la dieta.

Tabla 3. Clasificación de aminoácidos en base a su solubilidad a pH = 7.

No polares	Polares	Cargados Positivamente	Cargados negativamente
Alanina	Glicina	Lisina	Ácido aspártico
Valina	Serina	Arginina	Ácido glutâmico
Leucina	Treonina	Histidina	
Isoleucina	Cisteina		
Prolina	Asparagina		
Metionina	Glutamina		
Fenilalanina	Tirosina		
Triptofano			

Tabla 4. Clasificación de los aminoácidos en base a su cadena lateral.

Alifáticos	Con Grupo hidroxil o sulfhidril	Cíclico	Aromáticos	Básicos	Ácidos y amidas
Glicina	Serina	Prolina	Fenilalanina	Histidina	Ácido aspártico
Alanina	Cisteína		Tirosina	Lisina	
Valina	Treonina		Triptófano	Arginina	
Leucina	Metionina				Ácido glutâmico
Isoleucina					
					Asparagina
					Glutamina

Por otro lado los aminoácidos no esenciales son aquellos que si pueden ser sintetizados por el organismo [6]. Dentro de los aminoácidos esenciales se encuentran los tres aminoácidos básicos (ó con carga positiva), y su importancia a nivel biológico se describirá a continuación.

L-arginina. Es un aminoácido precursor esencial para la síntesis de moléculas biológicas importantes: proteínas, ornitina, prolina, poliaminas, creatinina y óxido nítrico. Éste último es un factor de relajación derivado del endotelio, un neurotransmisor, mediador de respuestas inmunológicas y además puede funcionar como sensor molecular.

L-arginina juega un papel importante en la detoxificación de amonio mediante el ciclo de la urea y es un simulador potente de la secreción de insulina y la hormona del crecimiento. Estos dos últimos son reguladores importantes del metabolismo de nutrientes.

Por otro lado, puede ser sintetizada por la mayoría de los mamíferos, y es clasificado como un aminoácido nutricionalmente esencial en mamíferos jóvenes (niños) y en adultos sólo en casos de estrés o enfermedad. Por lo anterior, se considera que éste aminoácido es nutricional y fisiológicamente importante [14, 15].

L-histidina. El aminoácido histidina fue aceptado como esencial para humanos adultos por la FAO/WHO/UNU en 1985, a pesar de la controversia en cuanto a su esencialidad. Se encontró que histidina no era requerida para el balance del nitrógeno a corto plazo (6-8 días). Sin embargo no era claro si era

requerida para mantener el equilibrio del nitrógeno a largo plazo. Hasta el momento, no ha sido resuelto claramente si éste aminoácido es esencial en adultos sanos.

Los grandes depósitos de L-histidina en forma de hemoglobina y carnosina es la razón posible de la dificultad para establecer la esencialidad de éste aminoácido, sin embargo, dado que el término esencial se refiere a aquellos aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el hombre, consideraremos a L-histidina dentro de los esenciales, a pesar de la cantidad que el cuerpo humano es capaz de acumular pero no así de sintetizar.

Se ha observado que una dieta deficiente en L-histidina por un período prolongado, la concentración de hemoglobina disminuye. Por otro lado, el aminoácido L-histidina puede ser liberada del dipéptido carnosina (β -alanil-L-histidina) presente en grandes cantidades en el músculo esquelético. Así, durante el consumo de una dieta deficiente de éste aminoácido, la cantidad de carnosina en el tejido muscular es teóricamente capaz de proveer L-histidina suficiente y mantener el balance del nitrógeno en adultos sanos por varias semanas. Al no suceder así en infantes, ya que poseen una cantidad limitada de la enzima carnosinasa (la cual degrada al dipéptido carnosina), L-histidina es un aminoácido más esencial para ellos [16].

L-lisina. El rol principal de la L-lisina es la participación en la síntesis de proteínas, hormonas y anticuerpos. Es con frecuencia el aminoácido esencial más importante en dietas humanas relativamente altas en cereales ya que en

éstos últimos L-lisina es un aminoácido limitante [17]. Es importante para el crecimiento apropiado y juega un papel esencial en la producción de carnitina, compuesto responsable de convertir ácidos grasos en energía y ayudar a disminuir el colesterol. La L-lisina es capaz de ayudar al organismo en la absorción del calcio y esto juega un papel primordial en la formación de colágeno, sustancia importante para la construcción de huesos y tejido conectivo (piel, tendón y cartílago).

La deficiencia de éste aminoácido en la dieta, puede desarrollar problemas de lento crecimiento y anemia. Pero comúnmente sólo los vegetarianos que siguen una dieta macrobiótica están en peligro de deficiencia en L-lisina [9].

Debido a la importancia de los aminoácidos básicos se seleccionaron para el estudio de este trabajo.

Reconocimiento Molecular de Aminoácidos

Los aminoácidos están involucrados en procesos metabólicos diferentes de la síntesis de proteínas como los son la catálisis enzimática y transmisión de señales del sistema nervioso. En ambos procesos el reconocimiento molecular es fundamental para que éstos últimos se lleven a cabo. La capacidad que tenga un aminoácido para unirse a un determinado anfitrión, dependerá de los grupos presentes en el mismo, es decir, además de los grupos amino y carboxilo, la cadena lateral en algunos de los casos es determinante en el modo

de interacción, ya sea por la polaridad de la misma o bien, por los efectos estéricos que pudiera presentar en el sistema.

El conocer cómo se da el reconocimiento de una macromolécula (o receptor) hacia un aminoácido, ha despertado gran interés, para dilucidar estos procesos a nivel elemental, así como para la aplicación de éste en enfermedades como la epilepsia y el Alzheimer, lo cual permitiría en un futuro nuevas tácticas para su tratamiento [19, 20].

A continuación se resumirán dos ejemplos de procesos biológicos importantes, en donde el reconocimiento molecular de aminoácidos mostró ser una etapa fundamental.

Actividad Digestiva de las Serinproteasas. Las serinproteasas son enzimas que juegan un papel importante en muchos procesos entre los cuales destaca la digestión de proteínas. Dentro de las serinproteasas se incluyen a la tripsina, quimotripsina y elastasa [48]. Éstas enzimas son producidas como zimógenos inactivos y son activadas mediante el rompimiento del enlace peptídico formándose así la enzima activa.

Las enzimas enlazan a los sustratos mediante interacciones no covalentes y cada serinproteasa posee especificidad para ciertos aminoácidos la cual se resume en la Tabla 5.

Tabla 5. Sustratos específicos de serinproteasas.

Proteasa	Residuos de aminoácidos reconocidos
Tripsina	Arginina y lisina
Quimotripsina	Fenilalanina, tirosina y triptófano
Elastasa	Alanina y valina

Fuente: [48]

La naturaleza de la especificidad de éstas enzimas puede inferirse a partir de la estructura de la llamada bolsa de unión específica, la cual se encuentra adyacente a la triada catalítica en el sitio activo.

Los aminoácidos determinantes que conforman la bolsa de unión específica son los residuos 189, 216 y 226. Las especificidades de las enzimas tripsina, quimotripsina y elastasa se describirán a continuación.

Tripsina. Es la enzima proteolítica más discriminante la cual rompe específicamente un péptido después de arginina o lisina. Los residuos 216 y 226 son de glicina, de tal forma que aminoácidos con cadenas voluminosas pueden incluirse dentro de la bolsa. El sitio primario 189 es de aspartato el cual a pH fisiológico se encuentra cargado negativamente y es capaz de interactuar electrostáticamente con la carga positiva de arginina o lisina.

Quimotripsina. Ésta enzima hidroliza después de residuos aromáticos. Los residuos 216 y 226 son también de glicina mientras que el 189 es de serina, ésta permite que grupos aromáticos voluminosos interactúen primordialmente a través de fuerzas de van der Waals.

Elastasa. En ésta enzima los residuos 216 y 226 son valina y treonina respectivamente de tal forma que grupos voluminosos no son capaces de entrar en la bolsa de unión y por lo tanto solo reconoce a residuos no polares pequeños [48-50].

Transmisión del Impulso Nervioso. De manera muy resumida el sistema nervioso es el que se encarga de recibir señales internas y externas,

procesarlas y proporcionar una respuesta a ellas. Las neuronas son las células cerebrales más importantes y son capaces de percibir los cambios producidos en el medio ambiente, posteriormente comunican éstos cambios a otras neuronas y finalmente producen respuestas a éstos cambios.

El proceso de neurotransmisión está compuesto por dos factores esenciales: los neurotransmisores y los receptores específicos, éstos últimos son susceptibles a bloqueos por fármacos. En esta comunicación celular el reconocimiento molecular es fundamental.

Todas las sinapsis químicas están constituidas por tres elementos: 1) Elemento presináptico, 2) hendidura sináptica y 3) elemento postsináptico.

Tras la llegada del impulso nervioso, la membrana se despolariza y se da la liberación de neurotransmisores. Una vez liberados a la hendidura sináptica interactúan a nivel postsináptico con receptores específicos generando una señal celular.

Existen aminoácidos reconocidos como neurotransmisores y dentro de ellos se encuentran el ácido gama-aminobutírico (GABA), glicina, taurina, los cuales tienen efectos inhibitorios y el ácido glutámico y ácido aspártico que tienen propiedades excitatorias.

Las acciones fisiológicas que realizan los neurotransmisores son mediadas por su unión específica a dos tipos de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos.

Para explicar la interacción entre un neurotransmisor y su receptor se utiliza la hipótesis de llave-cerradura en donde el reconocimiento molecular es fundamental.

El conocimiento acerca de los neurotransmisores, sus receptores, su ubicación y la interacción entre ellos es de suma importancia para el diseño de fármacos en tratamientos de enfermedades mentales y trastornos cerebrales [51].

Parámetros Termodinámicos y su Interpretación

Los parámetros termodinámicos entalpía (ΔH), entropía (ΔS) y energía libre de Gibbs (ΔG) son valores que proporcionan información de gran utilidad para caracterizar un sistema.

En un sistema supramolecular la constante de afinidad (K_a) es el parámetro que proporciona la magnitud de la fuerza que une a un complejo supramolecular y es de suma importancia. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la interacción no se puede deducir a partir de su valor; sin embargo, la obtención de los parámetros termodinámicos ΔG , ΔH y ΔS hace posible conseguir la información que proporcione con certeza cuando un sistema liberó o absorbió calor, o bien, si durante el proceso se presentó el efecto hidrofóbico/solvatofóbico, de donde finalmente es posible determinar el parámetro termodinámico que dirige a dicha reacción.

Para poder entender mejor la caracterización termodinámica, debemos tener en claro el significado de cada uno de los parámetros, qué representan y

cuándo se consideran favorables o en su defecto, desfavorables, es por ello que se definen a continuación:

Entalpía

La entalpía es una función de estado que se representa en la Ecuación (1):

$$H = E + PV \quad (1)$$

Como toda función de estado, es más conveniente describirla en forma del cambio entre el estado inicial (H_i) y el final (H_f), ΔH queda de la siguiente forma:

$$\Delta H = H_i - H_f \quad (2)$$

A presión constante la entalpía es igual al calor q que involucra el sistema y se describe de la siguiente forma:

$$\Delta H = q_p \quad (3)$$

En donde q_p es el calor a presión constante.

La entalpía por lo tanto, determinará si una reacción es exo o endotérmica.

En términos básicos cuando una reacción libera calor, el signo de éste término es menor que cero y esto se considera favorable para una reacción, por el contrario, cuando absorbe calor, el valor es positivo (desfavorable).

Entropía

El cambio entropía (ΔS) es el grado de irreversibilidad que se alcanza después de un proceso dado en el que haya conversión de energía, o bien, se relaciona con la tendencia que tiene un sistema hacia el desorden.

Dicho esto, significa que las especies desordenadas deben ser más probables que las ordenadas considerando como universo el sistema total, en el cual si

bien la mayoría de las especies se encuentran en desorden, no quiere decir que no puedan existir algunas especies que posean arreglos casi perfectos, pero el desorden total o neto del sistema tiende al máximo y esto se refleja en una entropía del universo mayor de cero.

El cálculo de entropía para procesos reversibles puede definirse por la siguiente ecuación:

$$\Delta S = \Delta q_{rev}/T \quad (4)$$

Un proceso reversible es aquel en el que se puede hacer que el sistema vuelva a su estado original sin variación neta del sistema ni del medio externo, y se considera que esto ocurre cuando el cambio se lleva a cabo en pequeñas etapas, donde el cambio de dichas etapas sea despreciable. Sin embargo, hay que considerar que ningún proceso natural puede ser considerado reversible totalmente.

Con la ecuación anterior podemos decir, que la entropía será igual al calor reversible añadido al sistema, entre el valor de temperatura al que se encuentra el mismo.

En otras palabras, la interpretación del término entrópico de manera muy general es: cuando se obtiene un valor positivo, significa que durante el proceso hubo una ganancia entrópica y el desorden del sistema es mayor lo cual es favorable. En caso contrario, se dice que hay pérdida de entropía y que el sistema fue capaz de alcanzar un arreglo más ordenado, lo cual es desfavorable para la estabilidad de un sistema.

Energía libre de Gibbs

La energía libre de Gibbs (ΔG) es un término termodinámico que se caracteriza por dar la condición de equilibrio y de espontaneidad para una reacción a presión y temperatura constantes.

Dependiendo del valor y del signo de el ΔG de una reacción, se podrá establecer si un proceso es espontáneo o no, o bien si se encuentra en equilibrio. De acuerdo a esto es bien conocido que un $\Delta G < 0$ indica un proceso es espontáneo (favorable) mientras que un $\Delta G > 0$ es desfavorable para una reacción. Cuando $\Delta G = 0$ se dice que un sistema se encuentra en equilibrio, por lo tanto, no hay cambio.

La energía libre de Gibbs es directamente proporcional a la magnitud de la constante de afinidad (K_a) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (5)$$

En donde R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta.

La ecuación (5) concuerda bien con los términos de equilibrio y espontaneidad mencionados anteriormente, ya que si el valor de K_a de un sistema es muy alto, quiere decir que el sistema es muy afín y por lo tanto espontáneo. Por otro lado, de acuerdo al producto de esta ecuación el resultado de un valor alto de K_a arrojaría un valor de ΔG muy negativo y en consecuencia muy favorable lo cual es concordante por ambas explicaciones.

Otra manera de expresar ΔG es:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

De acuerdo a la ecuación (6) un valor negativo en la entalpía y positivo en la entropía será favorable e ideal para una reacción y el proceso es dirigido tanto entálpica como entrópicamente si los valores absolutos de los mismos son muy parecidos. Cuando los dos términos son favorables, pero uno de ellos es mucho más favorable que el otro, se dice que el parámetro que dirige la reacción, es el que posee el valor absoluto más alto. En algunos casos, la energía libre de Gibbs es favorable, pero uno de los dos parámetros involucrados en la ecuación es desfavorable (entalpía positiva o entropía negativa).

Cuando el signo negativo de ΔG se debe al valor de ΔH , se dice que el proceso es dirigido entálpicamente; de lo contrario, si el signo negativo se debe al término $T\Delta S$, se dice que es dirigido entrópicamente [7].

Análisis Calorimétrico

Un análisis calorimétrico, es aquel que se fundamenta en la medición del calor de un proceso bajo estudio. Se basa principalmente en que cualquier reacción libera o absorbe calor. Se considera una técnica universal ya que la medición de calor se puede aplicar a todo sistema.

Dependiendo de la cantidad de calor involucrado durante la reacción o el proceso se clasifican las técnicas para éste tipo de análisis. Si el calor de reacción es muy grande, como sucede en los sistemas de la química covalente,

dicho sistema debe estudiarse con un equipo que sea capaz de detectar grandes cantidades de calor de reacción y a esta técnica se le llama calorimetría.

En cambio en reacciones que involucran interacciones no covalentes, las cuales involucran cantidades pequeñas de calor, se utilizan técnicas microcalorimétricas. En este tipo de técnicas los calores que pueden ser detectados son pequeños y de ahí el prefijo *micro*.

A continuación se describen los tipos de microcalorímetros los cuales se emplean en química supramolecular.

Calorímetro Adiabático

El término menos controversial es el calorímetro adiabático, en el cual q es igual a cero o muy pequeño. El calor generado por la transformación es contenido dentro del calorímetro y la pequeña o nula transferencia de calor ocurre entre la celda (unidad que contiene a la mezcla de reactantes) y los alrededores. Para una reacción exotérmica la situación ideal ($q = 0$) se aproxima por la activación de una celda adiabática calentada eléctricamente que nulifica la diferencia de temperatura entre la celda y los alrededores. Para este tipo de calorímetros no se han encontrado aplicaciones químicas analíticas.

Calorímetro Isoperibol

La calorimetría es una variable importante del principio adiabático. Los instrumentos adiabáticos e isoperibol son muy diferentes y pueden ser definidos

claramente por la temperatura del ambiente inmediato que envuelve a la celda, la cual permanece constante en el primero y es la misma que el contenido de la celda en el segundo. Algunas ambigüedades han surgido ya que la palabra isoperibol se deriva de “ambiente constante (de temperatura)” la cual es también una característica de algunos instrumentos (de conducción de calor) no adiabáticos pero Hansen y Eatough remediaron lo anterior clasificando la calorimetría, primeramente de acuerdo al modo en que se mide el calor.

Consecuentemente los instrumentos adiabáticos/isoperibol pueden definirse como dispositivos que miden el cambio de temperatura en la solución reaccionante a diferencia de los calorímetros de conducción de calor que miden el voltaje de salida en un transductor termoeléctrico entre el calorímetro y el disipador de calor. En ausencia de una alternativa aceptable éste término fue adoptado, aceptando la falla que la palabra isoperibol no denota: el elemento de medición de temperatura.

Los términos entalpimetría y análisis entalpimétricos, se usan en la literatura para describir mediciones isoperibólicas de diferentes grados de sofisticación.

Calorímetro Isotérmico. Los calorímetros operan en el principio de que la temperatura de la solución reactante esencialmente permanece constante a lo largo del experimento. Este término es usualmente reservado para calorímetros que operan en el principio de compensación de calor, el cual se describirá de

manera más detallada en la parte de calorimetría de titulación isotérmica en la sección correspondiente al instrumento.

Calorímetro de Conducción de Calor

Éste término se aplica cuando se trabaja a condiciones *quasi* isotérmicas mediante el intercambio rápido de calor entre la celda y el disipador de calor que lo rodea.

Una vez clasificados los tipos de calorímetros se pueden identificar tres formas de mezclado de reactantes para cada uno de ellos, éstas son: titulación, inyección directa y de flujo.

Titulación Termométrica. Se utiliza para designar una titulación adiabática, resultante de un conjunto de inyecciones obteniendo finalmente una gráfica de temperatura contra volumen de titulante. Este término es apropiado para aquellos experimentos de titulación en donde no existe ningún intento de determinar el cambio de calor asociado con la reacción analítica.

Entalpimetría de Inyección Directa. Consiste en el mezclado de un volumen total de ambos reactantes en una sola operación, obtenida mediante una jeringa de eyección.

Entalpimetría de Flujo. Los calorímetros de flujo más convencionales son diseñados de tal manera que dos corrientes de reactantes fluyendo se mezclan en una zona de reacción para formar una corriente de producto [38].

Con lo anterior podemos darnos una idea de cómo funcionan los calorímetros más utilizados y entender mejor las diferencias que existen entre

cada uno de ellos, para así, poder elegir cual de ellos es el más adecuado para un determinado análisis.

Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

Las interacciones intermoleculares están involucradas en formaciones reversibles de sistemas artificiales receptor-huésped. El calor liberado o absorbido de este sistema es el resultado obtenido de varios eventos simultáneos que conducen a una respuesta global de interacción [21].

La ITC pone de manifiesto interacciones intermoleculares de indudable interés bioquímico como las asociaciones proteína-ligante, proteína-proteína y proteína-ADN/ARN.

Si el efecto térmico neto de la interacción es lo suficientemente grande se puede determinar inequívocamente la caracterización termodinámica de un proceso de complejación [5].

Cada palabra en el nombre de la técnica, indica sus características. *Calorimetría*: debido a que el equipo mide directamente el calor de interacción liberado o absorbido. *Titulación*: indica que el experimento se obtiene llevando a cabo una serie de inyecciones de alícuotas de solución de sustrato a un volumen constante de solución de receptor. *Isotérmica*: ya que cada vez que una alícuota es inyectada y se da la interacción, se manifiesta un cambio de temperatura; cuando se llega al equilibrio de la interacción el equipo vuelve a su temperatura inicial.

La titulación calorimétrica se aplica al estudio de muchos sistemas supramoleculares. Su principal ventaja es que permite la determinación simultánea de los cambios ΔH , ΔG , ΔS , K_a y la estequiometría (n) a una temperatura fija [5].

Un experimento convencional en ITC consiste en colocar un determinado volumen de solución de receptor en la celda de reacción y agregar una serie de inyecciones de solución de sustrato, separada cada una por un intervalo de tiempo suficiente para llegar al equilibrio y asegurar que se ha transferido o compensado todo el calor liberado o absorbido.

La solución del receptor se agita permanentemente a velocidad constante girando la jeringa cuya punta posee una paleta especial que permite la mezcla de las soluciones. Al acercarse a la saturación, la señal del calor disminuye hasta que solo se observa el fondo del calor de dilución [5].

Además es posible obtener el cambio de capacidad calorífica (ΔC_p) llevando a cabo el experimento a diferentes temperaturas [25].

Sin embargo dada la inespecificidad intrínseca en la determinación del efecto térmico y la incapacidad de la titulación calorimétrica para identificar el tipo de interacción que origina el cambio de temperatura, es necesaria la comparación de los resultados de ITC con los obtenidos mediante otras técnicas, como lo es RMN H1, para la interpretación de los valores termodinámicos en términos moleculares.

Si la medición se lleva a cabo en solventes orgánicos, ésta suele complicarse debido a que la velocidad de intercambio de calor de los disolventes distintos al agua es mucho menor [5, 25].

Fundamentos Teóricos

El hecho de que esta técnica sea tan útil y exitosa, se debe principalmente a que cualquier interacción libera o absorbe calor [5]. El calorímetro trabaja a presión constante, por lo que, en esta técnica se obtiene directamente la entalpía de la reacción.

El calor liberado o absorbido es proporcional a la afinidad de la interacción y se manifiesta en la intensidad de la señal de calor que depende específicamente de ΔH del complejo formado.

Por otra parte, la energía libre de Gibbs (ΔG) de la formación del complejo puede calcularse de acuerdo a la ecuación (5).

A partir de estos datos también es posible determinar el ΔS del proceso, despejando ΔS de la ecuación (6).

De ésta forma podemos obtener la caracterización termodinámica completa de una reacción mediante esta técnica, siendo la única que permite calcular simultáneamente la estequiometría y los parámetros termodinámicos de una reacción en un experimento sencillo. [5, 27]

Cuando los procesos son dirigidos entrópicamente pueden no ser detectados por el equipo si no son lo suficientemente endotérmicos [25].

Instrumento

Cuando se trata de medir calores sumamente pequeños es necesario emplear calorímetros muy sensibles, los cuales se denominan *microcalorímetros*. El prefijo *micro* se refiere a la cantidad de calor y no a las dimensiones físicas del instrumento, incluso algunos equipos son de gran tamaño [31]. Existen microcalorímetros que detectan un mínimo de calor de 0.5 ncal [32].

El diseño de nuevos calorímetros capaces de operar con pequeños volúmenes de muestra y el hecho de que la microcalorimetría detecte calores de reacción muy pequeños hace que ésta técnica sea cada vez más utilizada para la determinación de constantes de asociación.

En ITC, existen dos principios para determinar el calor de una interacción. El primero es mediante un calorímetro de elevada capacidad calorífica basado en la conducción de calor y el segundo funciona por compensación del efecto térmico en un entorno adiabático.

Debido a que en éste trabajo se utilizó el calorímetro adiabático se describirá a continuación:

Es un calorímetro diferencial que posee una celda de referencia y una celda experimental. Durante el experimento, una pequeña potencia constante, inferior a un milivatio, se disipa en la termolamina de la celda de referencia y activa el sistema de compensación que iguala las temperaturas de las dos celdas y produce la línea base experimental. Un efecto exotérmico o

endotérmico, producto de la interacción receptor – sustrato, modifica transitoriamente la potencia de compensación de calor y se produce un pico característico sobre la línea base de cuya integración se extrae el calor involucrado en el sistema.

Las celdas están suspendidas mediante largos tubos de acceso en el interior de un cilindro (Figura 10); con objeto de crear un entorno adiabático para las celdas, la temperatura del cilindro se mantiene tan próxima como sea posible a la temperatura de las celdas. Para ello una termopila mide continuamente la variación de temperatura celdas-cilindro y un sistema de control actúa sobre una termolámina distribuida uniformemente en la superficie del cilindro.

El subsistema de inyección - agitación es una de las partes más críticas del instrumento porque del buen funcionamiento del mismo dependen, tanto la fiabilidad de los volúmenes de inyección de las alícuotas como la eficacia de la homogeneización de la mezcla de reacción y un bajo nivel de ruido (normalmente pocas decenas de microcalorías).

La jeringa de inyección es de vidrio, de alta precisión, con volúmenes entre 250 y 500 μL , provistas de largas agujas de acero inoxidable y en su extremo posee una paleta para la agitación.

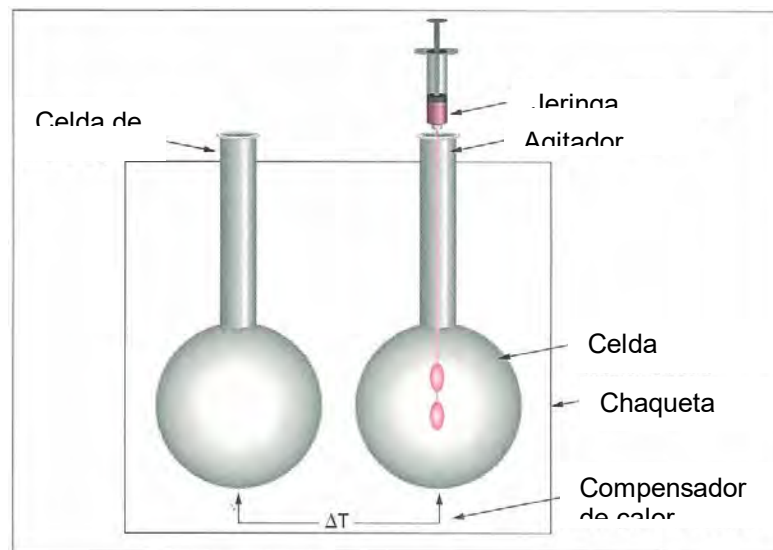


Figura 10. Celda experimental (derecha) y celda de referencia (izquierda) en un entorno adiabático.

La jeringa se fija firmemente sobre un dispositivo de rodamiento de muy baja fricción que incluye una rueda estroboscópica usada para mantener constante la velocidad de agitación y la velocidad de rotación [5].

Parámetros Obtenidos en el Análisis Calorimétrico

Constante de Afinidad (K_a). La determinación de constantes de afinidad en el reconocimiento molecular, se basa en que las constantes son específicas para cada reacción y nos proporcionan directamente la estabilidad del complejo resultante. Todo esto depende principalmente del tipo y número de interacciones intermoleculares que se presenten en el mismo.

Entre mayor sea el valor de K_a , mejores son los resultados esperados en el estudio ya que nos indica una mayor afinidad entre los dos compuestos relacionados (Receptor - Huésped).

Al igual que los receptores biológicos, los receptores artificiales se comportan de diferente manera de acuerdo a las condiciones en que se encuentren (presencia de metales, protones, medio alcalino, temperatura, entre otros). A partir de estas variaciones se establecen las condiciones óptimas de reconocimiento molecular, determinando las constantes de afinidad (asociación o disociación) [5].

De manera muy general, para la determinación de K_a , debe de existir un sistema de equilibrio común, como se indica en la Ecuación (7), de la cual se obtiene K_a mediante la Ecuación (8).



$$K_a = \frac{[HR]}{[R][H]} \quad (8)$$

$$[R]_0 = [R] + [HR] \quad (9)$$

$$[H]_0 = [H] + [HR] \quad (10)$$

R: Receptor; H: Huésped; RH: Complejo (R-H)

$[R]_0$: Concentración inicial del receptor.

$[H]_0$: Concentración inicial del huésped.

$[R]$, $[H]$, $[RH]$: Concentración del receptor, huésped y el complejo respectivamente.

La ecuación 11 se obtiene despejando $[R]$ y $[H]$ de las Ecuaciones (9) y (10) y sustituyendo en la Ecuación (8).

$$K_a = \frac{[HR]}{([R]_0 - [HR])([H]_0 - [HR])} \quad (11)$$

K_a : Constante de afinidad

$[R]_0$, $[H]_0$: Variables que pueden ser tomadas como condiciones iniciales.

$[R]$, $[H]$, $[HR]$: Variables dependientes en el equilibrio.

De la ecuación (11) podemos determinar K_a a las condiciones experimentales: $[R]_0$ y $[H]_0$. $[HR]$ es obtenida en el equilibrio.

Obtención de K_a en ITC. Experimentalmente, durante la titulación se obtienen las señales correspondientes al calor liberado o absorbido de la interacción y la integración de las mismas se grafican contra la relación molar del compuesto inyectante, dando como resultado una curva de forma característica.

En el caso de la Figura 11 la apariencia de la curva de titulación es sigmoideal, de la cual pueden obtenerse los valores de entalpía molar (ΔH), estequiometría (n) y la constante de afinidad (K_a).

El ΔH se obtiene midiendo la altura de la curva sobre el eje "y" (indica las cal mol⁻¹). Por otro lado la estequiometría (n) la proporciona el valor que indica el punto de inflexión sobre el eje "x" (relación molar).

Finalmente la constante de asociación (K_a) se obtiene directamente con el valor de la pendiente en el punto de inflexión de la curva [22].

En los casos en donde la curva de titulación no posee una forma sigmoideal, los valores ya mencionados se obtienen mediante un programa de ajuste de valores automático (ORIGIN Versión 7.0 de MicroCal Inc) el cual utiliza modelos matemáticos para dicha obtención.

Valor de c . La obtención de datos de buena calidad depende de una correcta selección de las concentraciones de receptor y el sustrato, para lo cual es importante conocer el valor de c , que es una constante adimensional conocida como parámetro de Wiseman.

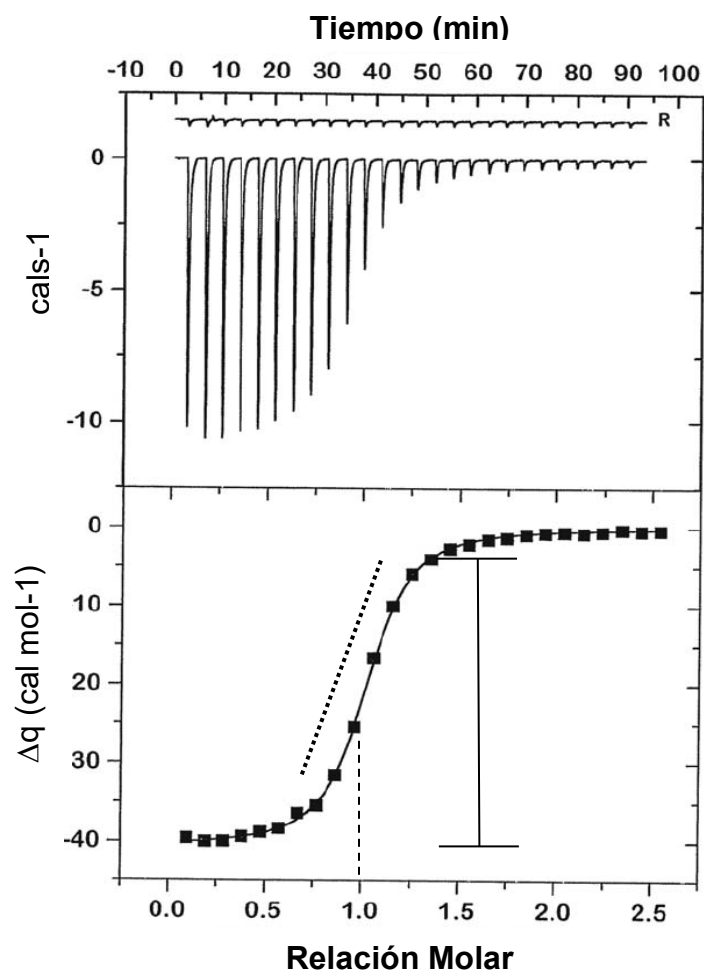


Figura 11. Termograma (arriba) y curva de titulación (abajo) típicos en un experimento de ITC. De la curva de titulación se pueden obtener: ΔH (—), n (---) y K_a (···).

El valor de c se obtiene multiplicando el valor de la constante de asociación (K_a) por la concentración molar (M) del receptor y la estequiometría (n) de la interacción como se muestra en la Ecuación (12).

$$C = (K_a)(M)(n) \quad (12)$$

En general el valor de c debe ubicarse en el rango 10 – 500, con lo cual se logra obtener una curva de titulación claramente sigmoideal (Figura 12), que es lo más recomendable para el cálculo de ΔH , K_a y n .

Estos valores de c restringen el uso de esta técnica para sistemas de alta afinidad ($K_a > 10\,000\text{ M}^{-1}$), ya que en virtud de los bajos valores de K_a para sistemas de baja afinidad se requerirían concentraciones muy altas de receptor.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que es posible estudiar sistemas de baja afinidad mediante ITC si se cumple con lo siguiente [26]:

- 1 Una fracción suficientemente grande de la isoterma es utilizada para el análisis.
- 2 La estequiometría de enlace es conocida.
- 3 Se conocen con exactitud las concentraciones de receptor y huésped.
- 4 El nivel de relación señal/ruido de los datos es adecuado.

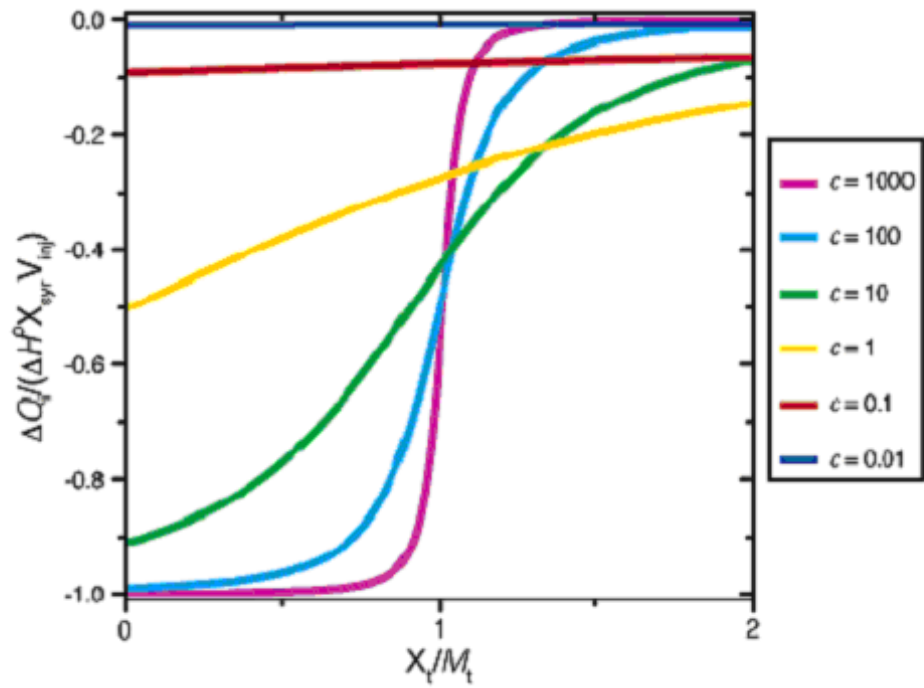


Figura 12. Variación en la forma de la curva de titulación conforme varía el valor de c [26].

Resonancia Magnética Nuclear de Protón (H1 RMN)

El fenómeno de resonancia magnética nuclear fue reportado en 1946. A partir de esa época RMN se ha convertido en una de las herramientas más poderosas en el mundo de la química orgánica, ya que con la información que proporciona es posible la obtención inequívoca de la estructura de un compuesto. Puede utilizarse únicamente para el estudio de núcleos con número atómico impar, ésta situación se da en átomos como: ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P entre otros.

En química supramolecular, la RMN es capaz de revelar el sitio de interacción de un complejo supramolecular, así como la magnitud con la cual se encuentran unidas dos o más moléculas (con la obtención de K_a).

Las características principales de ésta técnica se indican en su nombre: *resonancia*: éste término se refiere a la igualación de la frecuencia precesional del protón con la radiofrecuencia proveída por el instrumento de RMN, lo cual provoca que el protón cambie su espín y vaya de un nivel bajo a un nivel alto de energía; *magnética*: ya que se utiliza un campo magnético externo para orientar los núcleos bajo estudio, ya sea a favor o en contra de éste. Por último el término *nuclear*: se debe a que en ésta técnica se analizan a los núcleos que posean número atómico impar los cuales son capaces de presentar el fenómeno de resonancia.

Fundamentos Teóricos

Los núcleos con número atómico impar, son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos, al tener carga positiva, poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes.

En ausencia de campo magnético, los espines nucleares son orientados al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, tal y como se muestra en la Figura 13, los núcleos con espín positivo se orientan en dirección al campo, en un estado de mínima energía denominado estado espín α , mientras que los núcleos con espín contrario se orientan en dirección opuesta al campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β .

Existen más núcleos en el estado espín α que en espín β y aunque la diferencia de población no es muy grande es lo suficientemente diferente para establecer las bases de la espectroscopia de RMN.

Los experimentos que se realizan mediante RMN se llevan a cabo tomando lectura de una muestra contenida en un tubo la cual se coloca dentro del equipo haciéndose girar, en consecuencia se crea un campo magnético inducido (inducido B_i) de los protones llamado momento magnético. Al aplicar un campo magnético externo (B_0) se provocará la alineación de los diferentes protones ya sea a favor o en contra de B_0 . Dependiendo del ambiente químico de cada protón éstos absorberán a campo bajo o campo alto, esto dependerá

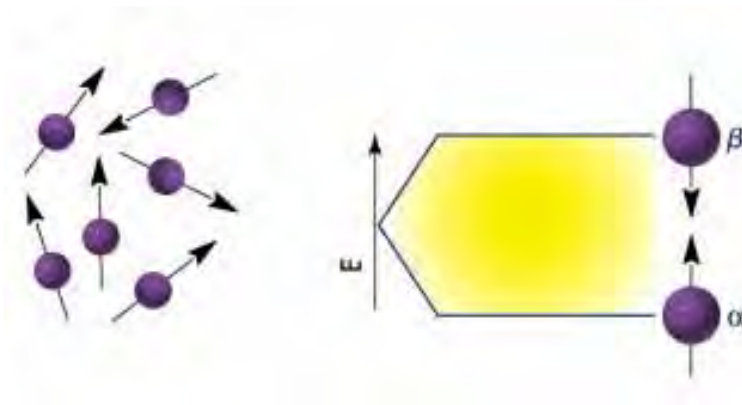


Figura 13. Orientación de los espines nucleares al azar (izquierda) y en presencia del campo magnético externo (derecha).

del apantallamiento de los mismos. Entre más apantallado se encuentre un protón, absorberá a campo más alto y viceversa, los valores a los cuales absorben se denominan desplazamientos químicos (δ) y son los que se registran en la pantalla del equipo para posteriormente interpretarlos.

La diferencia de energía de los estados paralelo y antiparalelo depende de la fuerza del campo aplicado B_0 , cuanto mayor sea éste existirá mayor diferencia energética entre los dos estados de espín.

Cuando una muestra es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β . Esta radiación se encuentra en la región de las radiofrecuencias (rf) del espectro electromagnético. Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN.

Obtención de K_a por RMN H1

Éstos estudios se basan en que al menos un protón del sitio de unión de un complejo, se debe reflejar un desplazamiento químico que presente diferencia significativa de su valor en forma libre. Dicha diferencia proporciona la magnitud y la fuerza de unión de un complejo así como la estructura del mismo.

El cambio en el desplazamiento químico (δ) en las señales de los protones se debe a que en el complejo, la distancia que separa al receptor y al

huésped es lo suficientemente pequeña para que su ambiente químico sea diferente y con ello también lo sea el valor de δ .

Si la velocidad de intercambio entre las formas libre y complejada del receptor es lo suficientemente lenta en la escala de tiempo en el que transcurre el fenómeno de resonancia, se logran observar diferentes señales (δ_R y δ_{RH}) para cada una de las formas del receptor. En éste caso, la fracción molar (n) del complejo (HG) puede calcularse partiendo de las intensidades relativas de las señales del complejo y receptor en forma libre.

$$\frac{I_{RH}}{I_{RH} + I_R} = n_{RH} \quad (13)$$

como:

$$[RH] = n_{RH}[H]_0 \quad (14)$$

sustituyendo ésta expresión en la Ecuación (11) se obtiene:

$$K_a = \frac{n_{RH}/[R]_0}{(1 - n_{RH}) ([H]_0/[R]_0 - n_{RH})} \quad (15)$$

Los parámetros de la ecuación 15 pueden obtenerse experimentalmente y con ello es posible calcular K_a .

El otro caso, cuando la velocidad de intercambio entre la forma libre y complejada es muy rápida, se registra una sola señal en el espectro, a un valor de desplazamiento químico promedio:

$$\delta = n_R \delta_R + n_{RH} \delta_{RH} \quad (16)$$

El cambio en la señal del protón del receptor con respecto a la posición del mismo en ausencia del sustrato, es proporcional al porcentaje de receptor que

se encuentra en forma de complejo. Por lo tanto si las condiciones del experimento entran en éste caso, la constante de formación del complejo se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{\max} [RH]/[R]_0 \quad (17)$$

En donde $\Delta\delta_{\max}$ viene siendo la diferencia de desplazamiento químico máximo del protón del receptor utilizado para el monitoreo de la titulación espectroscópica, es decir cuando la totalidad del receptor se encuentra como complejo. Lo anterior sucede cuando las concentraciones de sustrato son suficientemente elevadas $[H]_0/[R]_0 \rightarrow \infty$.

$[RH]$ puede ser sustituido por los valores de $\Delta\delta$ obtenidos de una titulación y despejando éste término de la ecuación (17) se obtiene:

$$[RH] = \frac{\Delta\delta_i}{\Delta\delta_{\max}} [R]_0 \quad (18)$$

Con lo anterior puede calcularse K_a de la forma:

$$K_a = \frac{\Delta\delta_i/\Delta\delta_{\max} [R]_0}{([H]_{0,i} - \Delta\delta_i/\Delta\delta_{\max} [R]_0) ([R]_0 - \Delta\delta_i/\Delta\delta_{\max} [R]_0)} \quad (19)$$

$[H]_0$ de la ecuación (15) se sustituyó por $[H]_{0,i}$ como se muestra en la Ecuación (19) lo cual se refiere a que la concentración del sustrato es diferente en cada solución que se utiliza en la titulación.

La ecuación 20 es resultado de la linearización de la Ecuación (19) y es una de las formas en que se expresa la Ecuación de Lang:

$$[H]_{0,i}/\Delta\delta_i = ([H]_{0,i} + [R]_0 - \Delta\delta_i/\Delta\delta_{\max} \cdot [R]_0) (1/\Delta\delta_{\max} + 1/K_a \cdot 1/\Delta\delta_{\max}) \quad (20)$$

La expresión anterior puede aplicarse cuando se obtienen diferentes valores de $\Delta\delta_i$ para diferentes concentraciones de $[H]_{0,i}$, al graficar $[H]_{0,i}/\Delta\delta_i$ contra $[R]_{0,i} + [R]_0 - (\Delta\delta_i/\Delta\delta_{\max})[R]_0$ se obtiene una recta cuya pendiente será igual al valor de $1/\Delta\delta_{\max}$ y en donde la intersección es interpretada como $1/(K_a\Delta\delta_{\max})$. Una vez obtenidos estos datos es posible calcular el valor de K_a de un sistema supramolecular [39].

PARTE EXPERIMENTAL

Diseño Experimental

En este trabajo se seleccionaron como receptores los macrociclos tipo ciclofano 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,-octaaza-17,40-dioxa [10.1.10.1.] paraciclofano (PO) y 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,33-octaaza [10.1.10.1.] paraciclofano (PC) (Figura 14) sintetizados de acuerdo al método establecido por Inoue y colaboradores [28].

Los ciclofanos PO y PC presentan características químicas y estructurales que les confieren capacidades para funcionar adecuadamente como receptores supramoleculares: los anillos aromáticos ofrecen una cavidad hidrofóbica y un sitio potencial para interacciones π - π y/o catión- π , mientras que los grupos amino, amida y carboxilato que contienen, son sitios potenciales para la formación de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Además, son solubles en agua por la presencia de los carboxilatos como brazos pendientes, lo que es deseable si se desean utilizar como modelos para el entendimiento que operan en los sistemas biológicos.

Las diferencias entre estos dos receptores es que PC, al tener un grupo metileno (-CH₂-) en su cavidad en lugar del grupo eter (-O-) presente en PO, posee mayor rigidez que éste último [40].

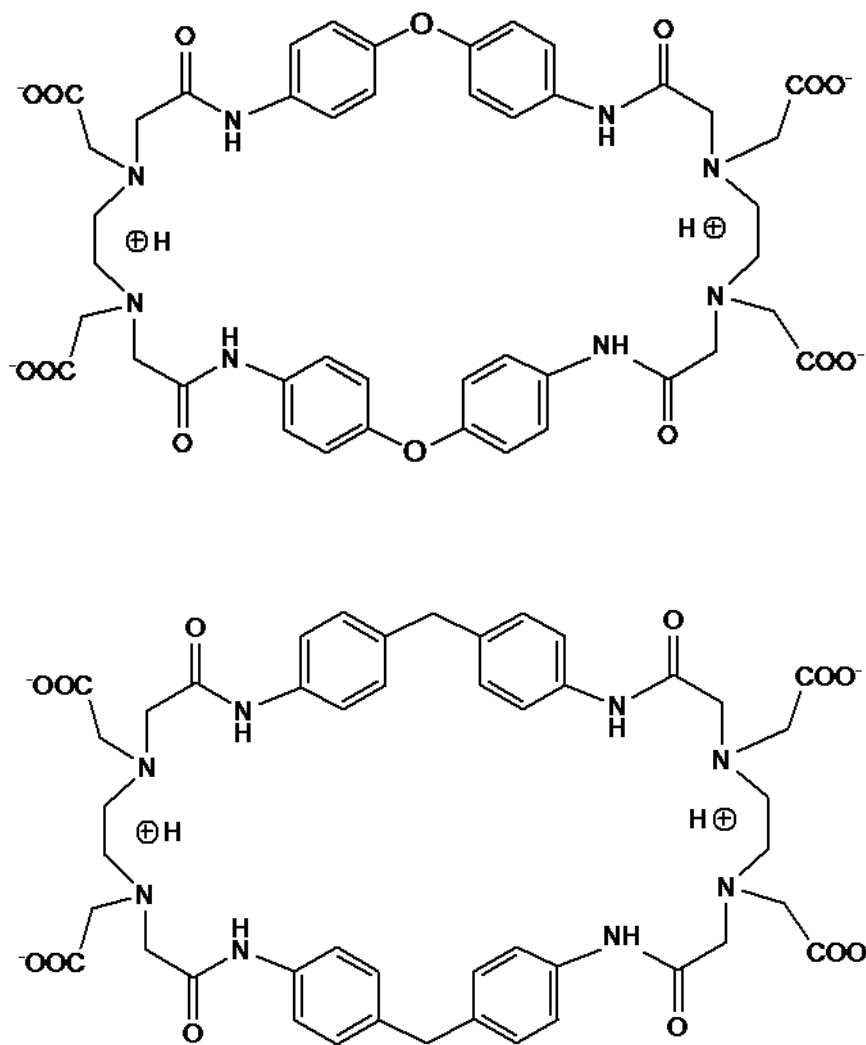


Figura 14. Estructura de los receptores PO (molécula de la parte superior) y PC (molécula de la parte inferior) en su forma dianiónica.

El interés en utilizar como huéspedes los metil ésteres de aminoácidos de cadena básica, L-arginina (ArgMe) y L-lisina (LysMe) (Figura 15) es debido a la importancia de dichos aminoácidos en diversos procesos de interés bioquímico, los cuales se mencionaron en la sección de Antecedentes. Además, dada la(s) carga(s) positiva(s) en la cadena lateral, son buenos candidatos para interactuar con la parte aniónica de los receptores.

La razón por la cual se optó por trabajar con la forma metil éster de los aminoácidos, fue para evitar la repulsión entre los grupos carboxilato de los brazos pendientes del receptor y de los aminoácidos, ya que de ésta forma se elimina la carga negativa en el grupo carboxilo del aminoácido. Por otra parte, es posible que a pH 6.0 la protonación de los nitrógenos amina del esqueleto macrocíclico de los ciclofanos origine repulsión con los grupos amino cargados positivamente de los huéspedes, por lo que difícilmente pudieran formarse complejos de inclusión de los huéspedes dicatiónicos; sin embargo, no es posible evitar este efecto en virtud del valor de pKa de los grupos amino de los ciclofanos (pKa = 8 para ambos ciclofanos).

La utilización de sales de hidrocloreuro es para aumentar la solubilidad en agua de los huéspedes.

La selección de los valores de pH, 6.0 y 9.0, fue para estudiar la complejación tanto de la especie monocatiónica como de la especie dicatiónica de los huéspedes como se explica a continuación.

A pH 6.0, los grupos amino de los aminoésteres, tanto del carbono α ($pK_a \geq 7.3$) como de la cadena lateral ($pK_a \geq 10.46$), se encuentran cargados positivamente (Figura 15) ya que este es un valor de pH inferior a los valores de pK_a de estos grupos. De ésta manera, los huéspedes ArgMe y LisMe se encuentran en su forma dicatiónica.

A pH 9, los grupos amino del carbono α se encuentran desprotonados, mientras que el grupo amino de la cadena lateral de ArgMe y LisMe están protonados, por lo que ambos presentan su forma monocatiónica.

El receptor, al contar con grupos carboxilo con pK_a inferior a 3.0, se encuentra cargado negativamente a pH 6.0, con la posibilidad de interactuar electrostáticamente con las cargas positivas de los huéspedes básicos. Además, dos de los cuatro grupos amino de la cavidad del ciclofano se encuentran protonados a este valor de pH, tal como se indica en la Figura 14.

Existen varios métodos para determinar la constante de asociación (K_a), pero dentro de ellos sobresalen las técnicas de Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), las cuales fueron utilizadas en éste trabajo para realizar los estudios de reconocimiento molecular.

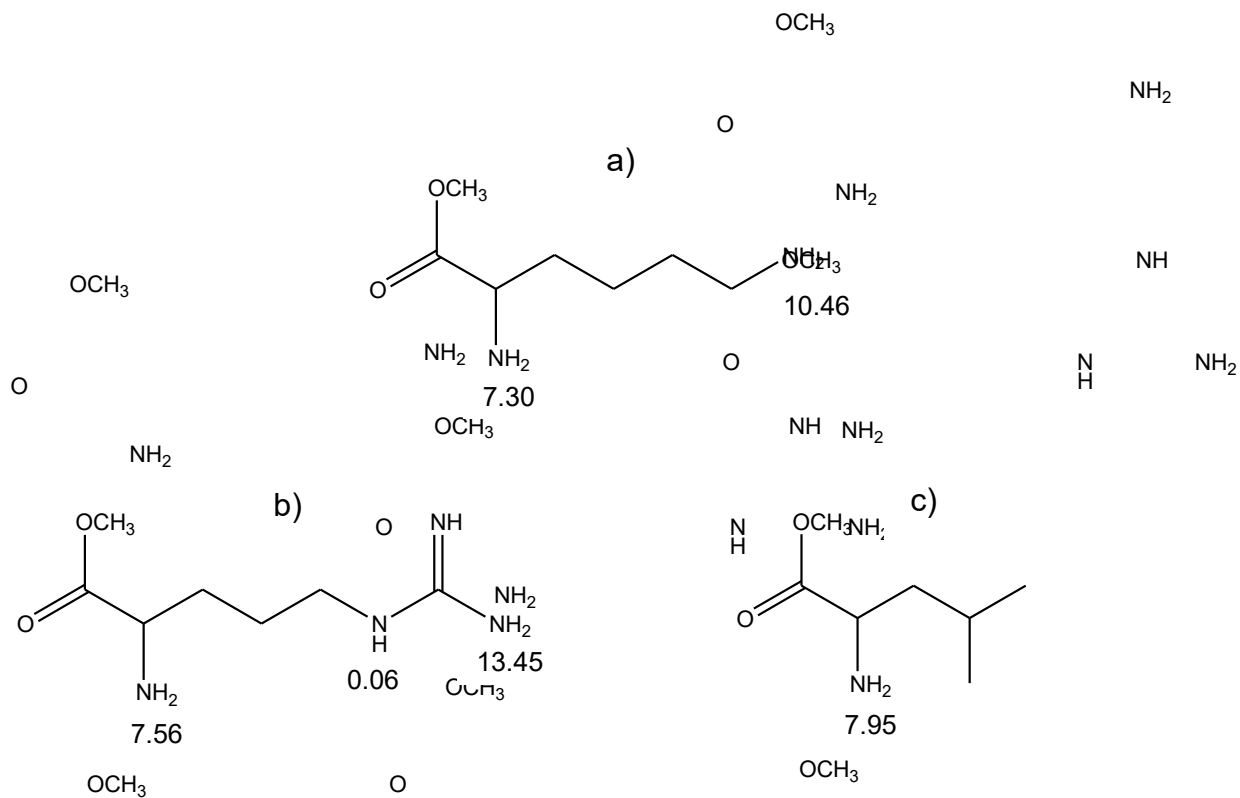
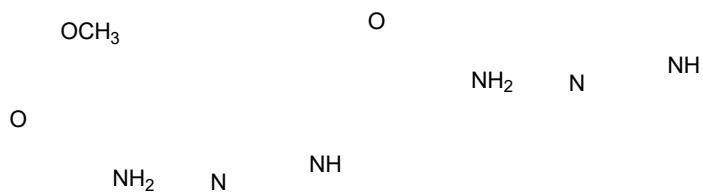


Figura 15. Estructura y valores de pKa de los metil éster de aminoácidos indicados en cada grupo: a) LysMe, b) ArgMe y c) LeuMe.



La **Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)** es capaz de proporcionar una ruta directa y precisa para la obtención de una caracterización termodinámica completa (ΔH , ΔS y ΔG así como K_a) en un tiempo mucho más corto que mediante otros métodos. Se ha convertido en una técnica de alta sensibilidad capaz de medir la interacción que se da entre biomoléculas en solución.

Esta técnica es de amplia utilidad, pero una de sus desventajas es que no proporciona los sitios de unión del receptor con el sustrato, por lo que es importante combinarla con otras técnicas biofísicas como lo es **Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN 1H)**.

La RMN 1H representa una de los instrumentos más poderosos para la descripción de ensamblajes supramoleculares en solución. La información que proporciona esta herramienta es fiable y precisa e incluye: la confirmación de la formación del complejo, la estequiometría y la constante de estabilidad del mismo así como la orientación de un sustrato unido con un determinado receptor [37].

Materiales

Los ciclofanos PO y PC fueron sintetizados de acuerdo al método establecido por Inoue y colaboradores [28].

Para los estudios de complejación se utilizaron los huéspedes tal y como se obtuvieron de fábrica:

1. L-Arginina metil éster dihidrocloruro ($C_7H_{11}N_3O_2 \cdot 2HCl$) 97% ALDRICH

2. L-Lisina metil éster dihidrocloruro ($C_7H_{16}N_2O_2 \cdot 2HCl$) 98%ALDRICH
3. L-Leucina metil éster hidrocloreuro ($C_7H_{15}NO_2 \cdot HCl$) 98% ALDRICH

Para el ajuste de pH y preparación de las soluciones se utilizaron:

1. HCl 37% FERMONT
2. NaOH 99.5% MERCK
3. NaCl 99.8% FERMONT
4. D_2O 99.9% ALDRICH (con DSS como referencia)
5. $NaCO_3$ 99.9% MERK
6. DCI 99% ALDRICH

Métodos

Calorimetría de Titulación Isotérmica

Los análisis se realizaron en un calorímetro de titulación isotérmica de alta precisión modelo VP-ITC, Microcal, Inc (Figura 16).

Preparación y tratamiento de las soluciones. El experimento se llevó a cabo en solución acuosa, para ello se prepararon soluciones de pH= 6.0 y 9.0 del receptor y del huésped por separado. Los valores de pKa de los huéspedes fueron calculados con el programa Advanced Chemistry Development, Inc. ACD/pKa DB, Versión 3.0. [30] y los del receptor se tomaron de la literatura [28].

Se prepararon soluciones de HCl, NaOH y NaCl, todas de concentración 0.2 M. Para preparar la solución de HCl se tomó una alícuota de 1.65 mL de HCl 37% y se aforó a 100 mL. Para las soluciones de NaOH y NaCl se pesó 0.8 y 1.17 g respectivamente y se aforaron a 100 mL. Para los tres casos se utilizó agua mQ.

Solución de Aminoésteres. Se utilizaron sales hidrocioruro de ésteres de aminoácidos básicos. Se pesaron 0.759, 0.679 y 0.528 g de ArgMe, LysMe y LeuMe respectivamente para preparar 5 mL de solución 58 mM, se disolvió en agua mQ y se ajustó al valor de pH deseado con solución de hidróxido de sodio 0.2 M para después aforar.



Figura 16. Calorímetro de Titulación Isotérmica VP-ITC, Microcal, Inc.

Solución de Ciclofano. El ajuste del pH de la solución del hidrocloreuro del éster de aminoácido con solución de NaOH origina una alta concentración de NaCl, lo que provoca que durante la titulación los calores de dilución sean muy grandes. Para minimizar éste efecto, el ciclofano se preparó en solución de NaCl 0.2 M. Además de esta forma se asegura mantener constante la fuerza iónica de la solución durante el experimento.

Se pesaron 7.54 mg de la forma ácida del receptor para obtener 25 mL de solución 0.33 mM, se suspendió en un poco de agua y se agregó NaOH 0.2 M para disolver, se ajustó al valor de pH deseado y se aforó con solución de NaCl 0.2 M.

Procedimiento previo a la titulación calorimétrica. Todas las soluciones fueron desgasificadas con vacío durante 1 hora a 20°C. La solución del receptor se colocó lentamente en la celda del equipo, cuidando de no formar burbujas. La jeringa titulante se cargó con solución de aminoácido y se purgó tres veces para eliminar cualquier burbuja formada.

Titulación Calorimétrica. Se inyectaron 25 alícuotas de solución de aminoácido de 10 µL durante 20 s cada 300 s, a una agitación de 394 rpm como se indica en la Figura 17 para cada experimento.

El resto de las variables experimentales dependientes del instrumento: temperatura, número de inyecciones, volumen por inyección, velocidad de rotación del agitador, tiempo entre inyecciones, entre otros, se programan

desde el inicio en el programa VP-Viewer 2000 que incluye el instrumento (Figura 17) y el experimento se realiza de forma completamente automática [5].

En vista de que el microcalorímetro solo mide el calor liberado o absorbido durante el proceso, debe tomarse en cuenta que no es capaz de distinguir entre el calor de asociación y el calor de la dilución que se genera en cada inyección. Por esto es que se realizó también una corrida en donde se inyectó la misma cantidad y tamaño de alícuota de cada aminoácido a la celda, conteniendo únicamente solución de NaCl al pH correspondiente y los datos obtenidos se restaron de los datos experimentales [25].

Cada titulación se realizó por duplicado obteniendo buena repetibilidad en los datos.

Modelos de Ajuste para la Obtención de K_a . Para obtener la constante de afinidad, se elige el modelo que más se adecue a los puntos obtenidos ya sea de uno o dos sitios, o bien, de sitios secuenciales, los cuales se incluyen en el programa Origin 7 de la versión Microcal.

Resonancia Magnética Nuclear de Protón RMN H^1

Se utilizó un espectrómetro modelo Bruker AVANCE 400 (Figura 18) a una temperatura fija de 298 K, utilizando como referencia interna 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio (DSS).

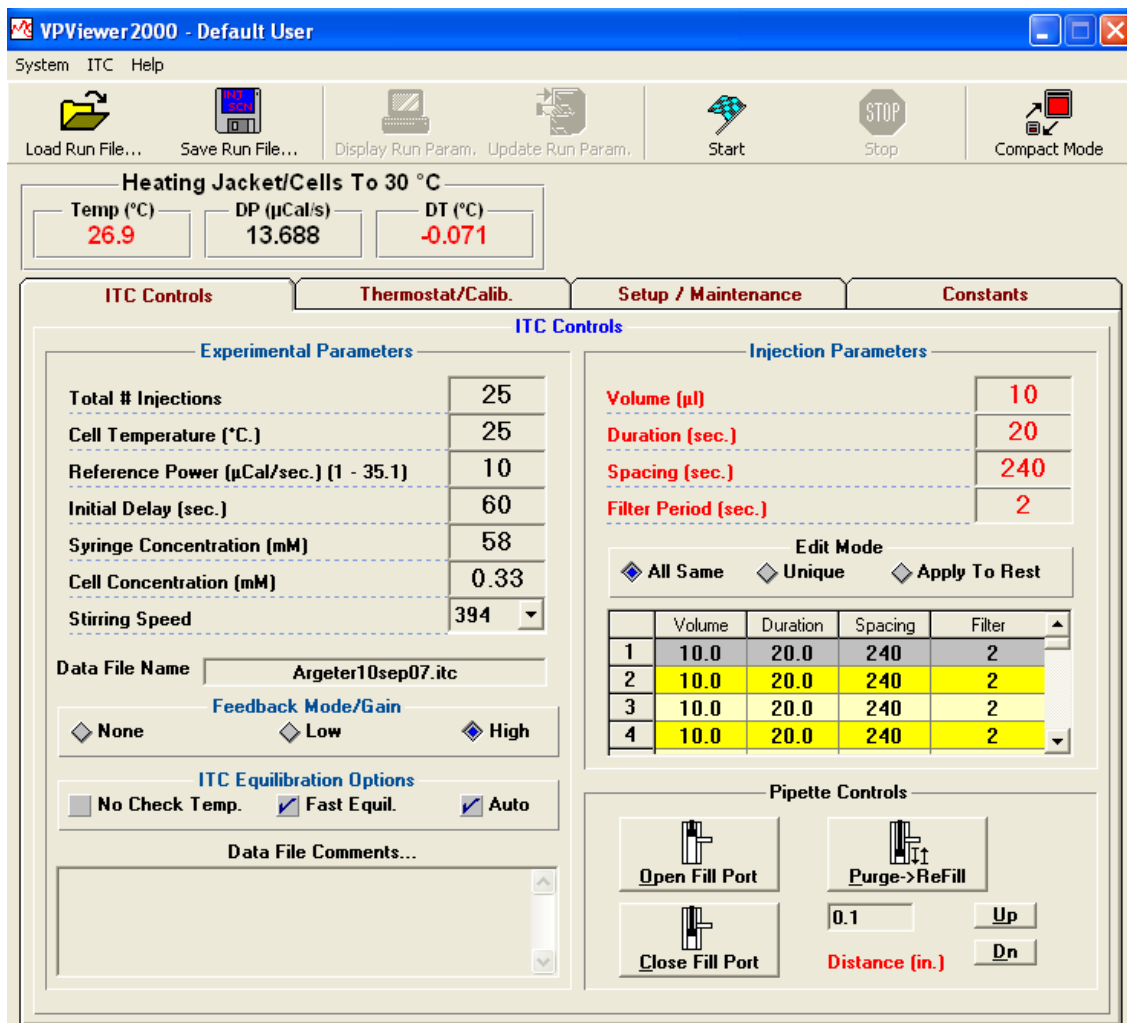


Figura 17. Programa VPViewer 2000 para el ajuste de variables en un experimento de ITC. Enseguida de cada parámetro existe un recuadro en donde se escribe el dato al que se desee llevar a cabo el experimento.

Preparación de las Soluciones de los Receptores. Se pesaron 0.03782g de PO y 0.00189g de PC agregando 0.00625g y 0.00042g de Na_2CO_3 respectivamente, cantidad necesaria para lograr disolver cada receptor. Posteriormente se ajustó el valor de $\text{pD} = 6.5 \pm 0.05$ con DCl diluido y se aforó a un volumen final de 3 y 2 mL para PO y PC respectivamente logrando una concentración de 0.01 M para PO y 0.001 M para PC.

Preparación de las Soluciones de los Huéspedes. Las soluciones de los huéspedes utilizados para PO, ArgMe y LysMe, se prepararon pesando en un matraz de 2mL 0.05250g y 0.04644g respectivamente, para obtener una concentración final de 0.1 M. Por otro lado para las soluciones de los huéspedes utilizados para los experimentos con PC, LysMe y LeuMe, se prepararon pesando 0.00232g, y 0.00181g respectivamente en un matraz de 1mL para obtener una concentración final de 0.01 M.

Se utilizó D_2O como disolvente para todas las soluciones anteriores la cual contiene DSS para la señal de referencia.

Antes de aforar, se ajusto el valor de pD de cada solución de huésped agregando Na_2CO_3 hasta alcanzar un valor de 6.5 ± 0.05 .



Figura 18. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear modelo Bruker AVANCE 400.

Posteriormente se obtuvieron 5 diferentes mezclas de las soluciones de los receptores (PO y PC respectivamente) y del huésped entre las relaciones molares 1:1 – 1:10, pesando directamente en los tubos, las cantidades correspondientes de la solución de receptor, del huésped y D₂O, aforando a un peso final de 0.5g de mezcla manteniendo una concentración constante de 5 mM para PO y 0.5 mM para PC. Previamente a la toma de lectura del espectro, se ajustó el valor de pD de cada uno de los tubos agregando la cantidad justa de NaCO₃, para subir el pD o bien, DCl diluido para bajarlo, hasta llegar a un valor de 6.5 ± 0.05 . También se tomó lectura del espectro correspondiente al receptor sin huésped y al huésped sin receptor.

Titulación Mediante Espectrofotometría de RMN ¹H. Este punto consiste en la toma de la lectura de cada uno de los tubos preparados con diferentes relaciones molares de receptor-huésped, en los cuales se observan los valores correspondientes a los desplazamientos químicos de los protones del sistema. Si existe interacción entre los dos compuestos, se observarán diferencias en los desplazamientos químicos de los protones que estén más fuertemente involucrados, ya sea que se desplacen a campo alto o bien, a campo bajo. Conforme aumenta el valor de la relación molar del sistema, éste se encontrará más cercano a la saturación, por lo que el cambio en los desplazamientos químicos será cada vez menor.

Una vez alcanzada la saturación la constante de formación del complejo formado entre los reactantes, puede determinarse mediante la ecuación (19) de intercambio rápido descrita en la sección de antecedentes.

El ajuste de mínimos cuadrados de las curvas de los $\Delta\delta$ observados contra $[am]_t$ con la ecuación (19) da los valores correspondientes a las constantes de afinidad y los valores de $\Delta\delta_c$.

Experimento de Job. Para corroborar la estequiometría del complejo PO-ArgMe se realizó un experimento de job. Para ello se realizaron 7 diferentes mezclas con el fin de obtener diferentes fracciones molares entre 0 y 1. Los valores de δ de los protones del compuesto tomado como referencia (PO) de las diferentes mezclas se grafican contra el valor de la fracción molar. El punto mínimo de ésta gráfica proporciona la información para la obtención de la estequiometría de la reacción PO-ArgMe.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

Los termogramas y curvas de titulación de los estudios de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de la interacción en solución acuosa de los receptores tipo ciclofano, PO y PC, con los ésteres metílicos de los aminoácidos básicos L-arginina (ArgMe) y L-lisina (LisMe), así como para L-leucina (LeuMe) que fue utilizado como referencia, se muestran en las Figuras 19 y 20.

Las curvas de titulación dan evidencia de la formación de complejos receptor-huésped a pH= 6.0 entre el ciclofano PO y los aminoésteres ArgMe y LisMe, mientras que para LeuMe solo se observa el calor de dilución. PC forma complejos estables con LisMe y LeuMe y no reconoce a ArgMe.

Los valores de las constantes de asociación (K_a) obtenidas a partir de las curvas de titulación, así como los parámetros termodinámicos de energía libre de Gibbs (ΔG), entalpía (ΔH), entropía (ΔS) para las interacciones receptor huésped de los ciclofanos PO y PC con los tres aminoésteres a pH= 6.0 se indican en la Tabla 6.

Los aspectos más sobresalientes de estos resultados para ambos receptores se presentan a continuación.

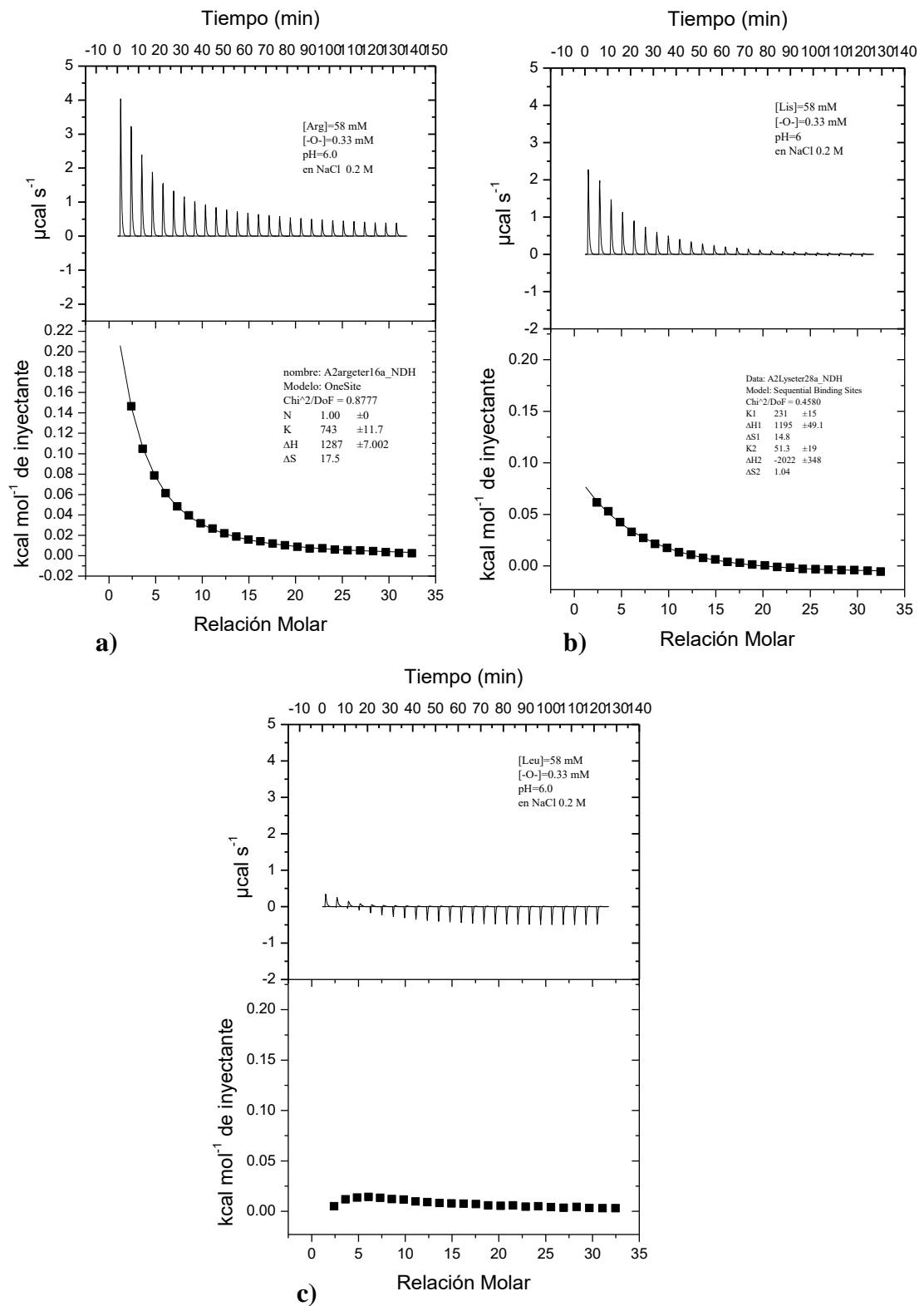


Figura 19. Termogramas y curvas de titulación de los sistemas con PO. a) ArgMe, b) LisMe y c) LeuMe a pH= 6.0.

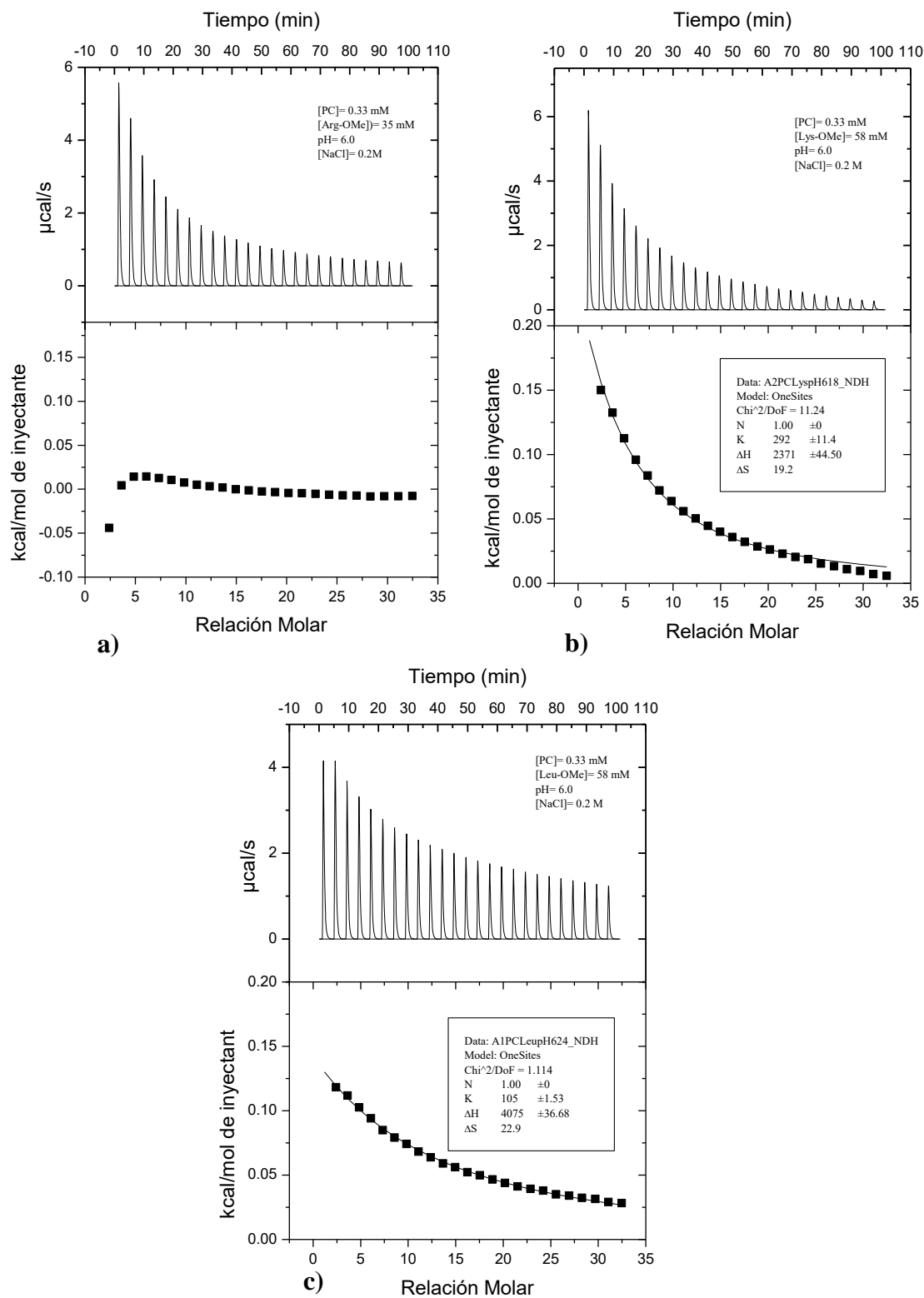


Figura 20. Termogramas y curvas de titulación de los sistemas con PC. a) ArgM, b) LisMe y c) LeuMe a pH= 6.0.

Tabla 6. Constantes de afinidad y parámetros termodinámicos obtenidos mediante ITC, de la interacción de PO y PC hacia ArgMe, LisMe y LeuMe a pH=6.0.

aaMe	PO				PC			
	K_a (M ⁻¹)	ΔG (cal/mol)	ΔH° (cal/mol)	$T\Delta S^\circ$ (cal/mol)	K_a (M ⁻¹)	ΔG (cal/mol)	ΔH° (cal/mol)	$T\Delta S^\circ$ (cal/mol)
ArgMe	743	-3930	1287	5215	Efecto pequeño casi igual al calor de dilución			
LisMe	231	-3277	1195	4470	292	-3350	2371	5721
LeuMe	Efecto pequeño casi igual al calor de dilución				105	-2749	4075	6824

Ciclofano PO

PO forma complejos estables con los ésteres de arginina y lisina a pH= 6.0. En virtud de que tanto las moléculas del receptor como de los huéspedes están en forma di-iónica a éste valor de pH, la formación de los complejos se atribuye a la interacción electrostática entre dos de los grupos carboxilato del receptor y los dos grupo amino cargados positivamente en los ésteres de aminoácidos. Esta doble interacción electrostática se confirmó con las titulaciones de ITC a pH 9: a este valor de pH, los esterres existen como iones monocatiónicos y no muestran interacción con el ciclofano bi-aniónico. Evidencia adicional de la doble interacción electrostática es el hecho de que PO no reconoce el éster de leucina, el cual a pH = 6 está en la forma monocatiónica. Estas observaciones indican que la interacción en solo uno de los sitios catiónicos de los huéspedes no es suficiente para formar un par iónico estable con PO.

La estabilidad del complejo PO-ArgMe ($K_a = 743 \text{ M}^{-1}$) es significativamente mayor que para el complejo PO-LisMe ($K_a = 231 \text{ M}^{-1}$), probablemente por una mejor complementariedad geométrica receptor-huésped. Éste control geométrico es un factor esencial para la formación de pares iónicos, tal como se ha señalado anteriormente para varios complejos supramoleculares [52, 53].

A fin de visualizar el modo de interacción electrostática de PO-ArgMe se realizó un modelaje por mecánica molecular MM+ calculado por el Dr. Motomichi Inoue. Una de las posibles estructuras es la mostrada en la Figura 21.

En cualquiera de las estructuras posibles, la molécula de ArgMe se ubica sobre el esqueleto del macrociclo de forma paralela al mismo, con los grupos amino catiónicos orientados hacia los grupos carboxilatos que se encuentran del mismo lado del plano del anillo del ciclofano.

La interacción electrostática debiera conducir a una complejación atribuible al cambio de entalpía (ΔH). Sin embargo, el ΔH de la formación de los complejos es positivo tanto para PO-ArgMe ($\Delta H = 1287 \text{ cal mol}^{-1}$) como para PO-LisMe ($\Delta H = 1195 \text{ cal mol}^{-1}$), y es el término entrópico el que gobierna la formación de los complejos ($T\Delta S = 5215 \text{ cal mol}^{-1}$ para PO-ArgMe y $T\Delta S = 4470 \text{ cal mol}^{-1}$ para PO-LisMe).

La fuerza entrópica más común responsable de la formación de complejos receptor-huésped es el efecto hidrofóbico. Para la formación de los complejos de PO con los ésteres de arginina y lisina, la interacción hidrofóbica no puede ser por sí misma la fuerza responsable de la complejación debido a la baja hidrofobicidad de los ésteres iónicos, pero si puede contribuir a la estabilización de los complejos de la forma que se explica a continuación: en la primera etapa de la complejación, la doble interacción electrostática provoca

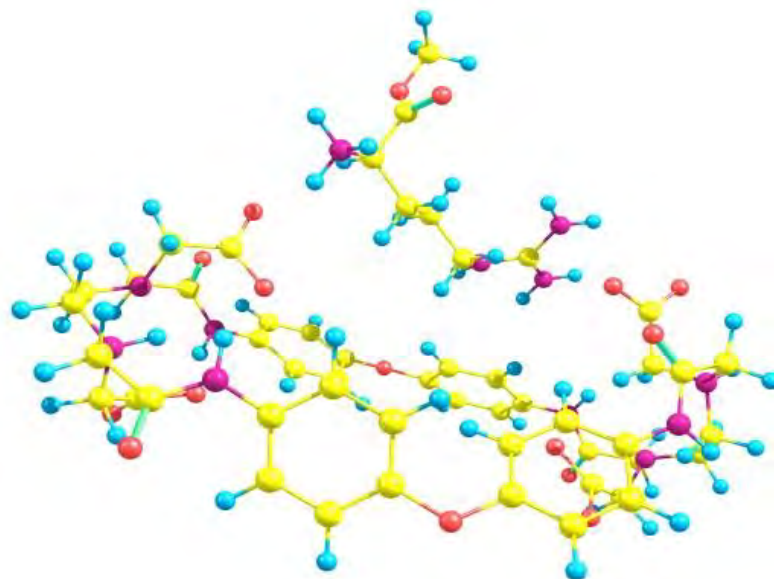


Figura 21. Modelo de complejación PO-ArgMe. Calculado mediante mecánica molecular MM⁺ en el programa HyperChem.

que el di-catión del éster de aminoácido y el ciclofano aniónico se acerquen uno al otro.

Conforme se aproximan entre ellos, moléculas del solvente son expelidas de las capas de solvatación del huésped y receptor, para finalmente formarse el complejo supramolecular que se presenta en la figura 22.

Este fenómeno de exclusión del solvente provoca un cambio de entropía positivo, que estabiliza al par iónico receptor – huésped formado.

Ciclofano PC

Los valores de K_a obtenidos por ITC muestran que las propiedades de reconocimiento molecular de PC hacia los ésteres de aminoácidos son diferentes a las exhibidas por PO, a pesar de que la única diferencia entre ambos receptores es el grupo que conecta los anillos fenileno del esqueleto macrocíclico.

Las diferencias más notables son que PC no reconoce al éster de arginina y, en cambio, si forma un complejo estable con el éster de leucina, el cual no es reconocido por PO.

La ausencia de interacción entre PC y el éster de arginina puede atribuirse a que no hay complementariedad geométrica receptor–huésped. La distancia entre los sitios catiónicos en ArgMe es de aproximadamente 7.8-8.5 Å, mientras que en LisMe es de ~ 7.6 Å. Probablemente la distancia entre dos de los grupos carboxilato de PC es demasiado corta para que se presente la

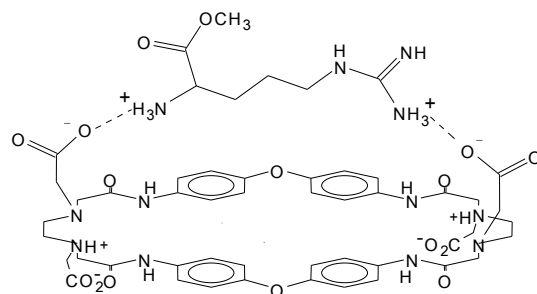


Figura 22. Estructura posible del complejo PO-ArgMe. Ilustración esquemática de la estructura para localizar los sitios de interacción electrostática.

doble interacción electrostática con los dos sitios catiónicos de ArgMe, además, la alta rigidez de PC no permite el rearrreglo del esqueleto macrocíclico para ajustar las distancias de los grupos carboxilatos a fin de establecer la doble interacción electrostática con ArgMe.

El reconocimiento de LeuMe por PC se debe al alto valor del factor entrópico $T\Delta S$ ($6824 \text{ cal mol}^{-1}$), el cual es el mayor valor obtenido para todas las titulaciones receptor–huésped, y puede atribuirse a la encapsulación parcial de la cadena lateral hidrofóbica del huésped.

En el modelaje por mecánica molecular calculado por el Dr. Motomichi Inoue se observa que el grupo isobutil de la cadena lateral de LeuMe penetra en la cavidad del ciclofano y la deformación del esqueleto macrocíclico es muy pequeña en este proceso (Figura 23); en consecuencia, la contribución del efecto hidrofóbico es alta y proporciona la estabilidad del complejo PC-LeuMe. En el caso de PO, dada la menor rigidez del esqueleto macrocíclico, la pérdida entrópica por el rearrreglo conformacional durante la posible complejación de LeuMe evita la formación de dicho complejo.

Los valores de K_a para los complejos PO-LisMe y PC-LisMe son muy similares ($K_a = 231 \text{ M}^{-1}$, $K_a = 292 \text{ M}^{-1}$ respectivamente), aunque las contribuciones de los factores entálpico ($\Delta H = 1195 \text{ cal mol}^{-1}$ para PO-LisMe y $\Delta H = 2371 \text{ cal mol}^{-1}$ para PC-LisMe) y entrópico ($T\Delta S = 4470 \text{ cal mol}^{-1}$ para PO-LisMe y $T\Delta S = 5721 \text{ cal mol}^{-1}$ para PC-LisMe) son algo diferentes.

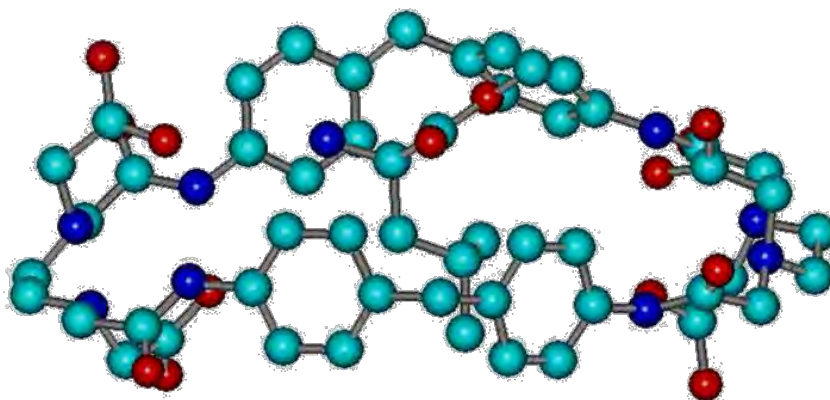


Figura 23. Modelo de complejación PC-LeuMe. Calculado mediante mecánica molecular MM⁺ en el programa HyperChem.

En este caso la probabilidad de formación de un complejo de inclusión para PC es baja debido a que el grupo NH_3^+ de la cadena lateral disminuye la hidrofobicidad de la molécula, por lo que el mayor valor de ΔS pudiera explicarse en términos del menor cambio conformacional de PC durante la complejación, debido a la mayor rigidez este receptor.

Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ^1H)

Las titulaciones de RMN se llevaron a cabo a $\text{pD} = 6.5$, al cual cada reactante forma una sola especie iónica, debido a que los valores de pK_a de los ácidos débiles en D_2O es 0.4-0.8 mayor que los correspondientes valores de pH en H_2O [41, 42]. Las señales en los espectros de RMN de los protones alifáticos de PO se traslapan con los protones de los ésteres de aminoácidos, por lo que solo pueden observarse sin interferencia los protones aromáticos de los receptores.

Los protones aromáticos etiquetados como “*e*” en la Figura 24, sufren un desplazamiento hacia campo alto en presencia de ArgMe y LisMe, mientras que los protones “*d*” muestran un desplazamiento no significativo, menor a 0.02 ppm.

Las curvas de titulación de los estudios por RMN ^1H en solución acuosa de la interacción de PO con ArgMe y LisMe, así como para LeuMe que fue utilizado como referencia, se muestran en la Figura 25, en la cual se presentan las graficas del cambio en desplazamiento químico ($\Delta\delta$) de los protones

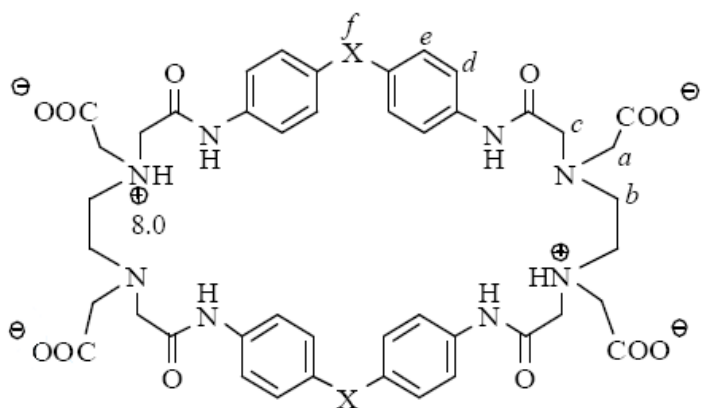


Figura 24. Estructura del ciclofano aniónico indicando con letras minúsculas (*a*, *b*, *c*, *d*, *e* y *f*) los diferentes tipos de protones que componen al mismo.

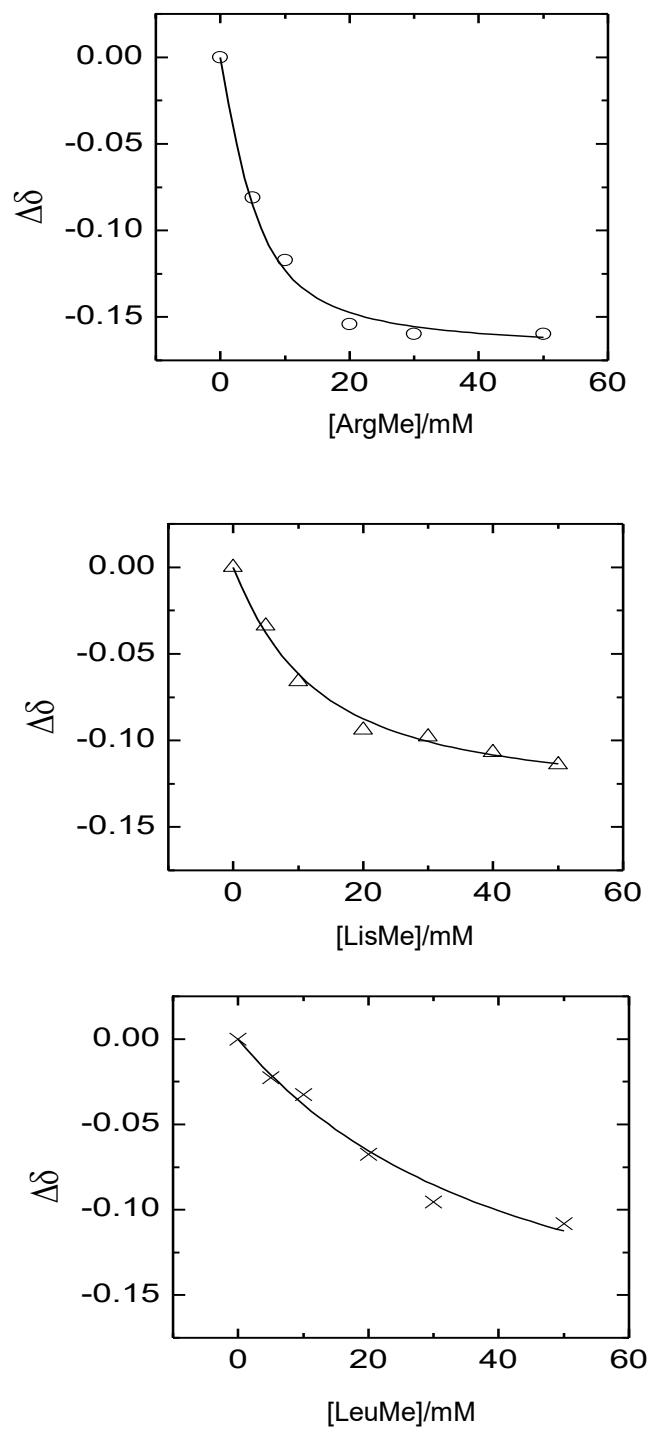


Figura 25. Curvas de titulación del receptor PO hacia ArgMe (arriba), LisMe (centro) y LeuMe (abajo).

aromáticos “e” de PO con referencia al desplazamiento químico en ausencia del huésped ($\Delta\delta = \delta(\text{para una concentración del huésped}) - \delta(\text{ausencia del huésped})$), en función de la concentración del éster de aminoácido.

Las curvas de saturación obtenidas por RMN son evidencia de la formación de los complejos receptor – huésped entre PO y los ésteres de arginina y lisina.

Los valores de la constante de asociación (K_a), del cambio en el desplazamiento químico para una relación de concentraciones receptor – huésped de 1:10 ($\Delta\delta$) y del cambio máximo de desplazamiento químico ($\Delta\delta_c$), obtenidos a partir de las curvas de titulación se presentan en la Tabla 7.

Ciclofano PO

En presencia del éster de leucina, el $\Delta\delta$ del protón “e” de PO fue muy pequeño ($|\Delta\delta| < 0.02$) y no se observó una curva de saturación definida, por lo que se concluye que no hay formación de complejo, mismo resultado que por ITC.

Los valores de K_a obtenidos para los complejos de PO con los ésteres de arginina y lisina ($K_a = 410$ y 110 M^{-1} , respectivamente) son aproximadamente la mitad a los correspondientes valores encontrados por ITC. Las discrepancias entre ambas técnicas pueden deberse a las diferentes condiciones experimentales, en particular en la fuerza iónica y las diferencias entre pH y pD. De todas formas, tanto por ITC como por RMN las estabilidades obtenidas muestran la misma tendencia.

Tabla 7. Constantes de afinidad obtenidas para el protón “e” mediante RMN ^1H , de la interacción de PO y PC hacia los aminoésteres a pD=6.5 y 298 K. De izquierda a derecha: cambio en el desplazamiento químico ($\Delta\delta$) en presencia del aminoéster catiónico, constante de afinidad (K_a) y $\Delta\delta$ de los complejos $\Delta\delta_c$.

	$\Delta\delta^a$ (ppm)	K_a (M^{-1})	$\Delta\delta_c$ (ppm)
PO			
ArgMe	-0.160	410 ± 100	-0.17
LisMe	-0.114	110 ± 100	0.14
LeuMe	$\Delta\delta$ <0.02; no se observó curva de saturación		
PC			
Todos los ésteres	$\Delta\delta$ <0.02		

^a $\Delta\delta = \delta([\text{huésped}]_t) - \delta(0)$: para PO, $[\text{PO}]_t = 5\text{mM}$ y $[\text{huésped}]_t = 50\text{mM}$; para PC, $[\text{PC}]_t = 0.5\text{mM}$ y $[\text{huésped}]_t = 5\text{mM}$.

^b $\Delta\delta = \delta([\text{huésped}]_{t=\infty}) - \delta(0)$.

Las interacciones electrostáticas y el efecto hidrofóbico no influyen en la estructura electrónica de los grupos fenilo de PO, por lo que los efectos inductivos no son los responsables de los desplazamientos químicos presentados por los protones aromáticos “e” del receptor en presencia de los huéspedes. Sin embargo, cuando se da la complejación del huésped, es probable que se modifique la relación geométrica mutua entre los anillos fenileno vecinos de la molécula de PO y, en consecuencia, los protones aromáticos mostraran un desplazamiento en el espectro RMN debido al efecto de las corrientes de anillo de los grupos fenileno, aún y cuando dichos grupos aromáticos no se encuentre en interacción directa con el huésped.

La corriente de electrones de un anillo de benceno induce un campo magnético a su alrededor (Figura 26) el cual provoca un cambio en el valor de δ de los protones unidos al anillo o de un protón que se encuentre cercano a él.

La magnitud del cambio es dependiente del ángulo en que se encuentre el protón, de acuerdo a la ecuación:

$$\delta_{rc} = 27.6(1-3\cos^2\theta)r^3 \quad (21)$$

Donde r es la distancia (en Å) entre el protón de referencia y el centro del anillo del grupo fenilo y θ es el ángulo entre el vector r y la normal para el centro del anillo (figura 27).

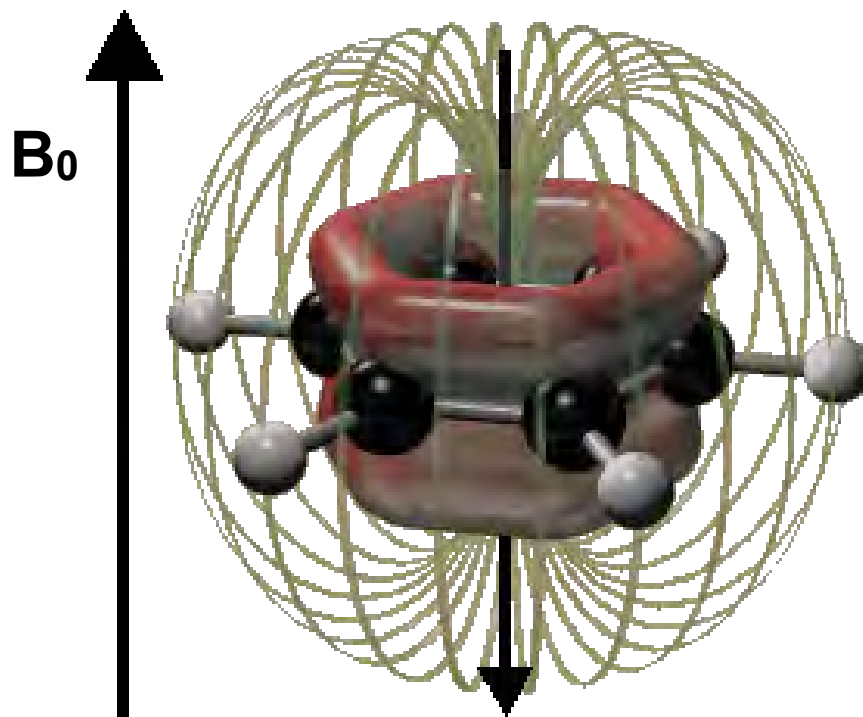


Figura 26. Corriente de electrones de un anillo de benceno. Ésta corriente genera un campo magnético entorno a él y se representa por las líneas que salen del centro de la molécula.

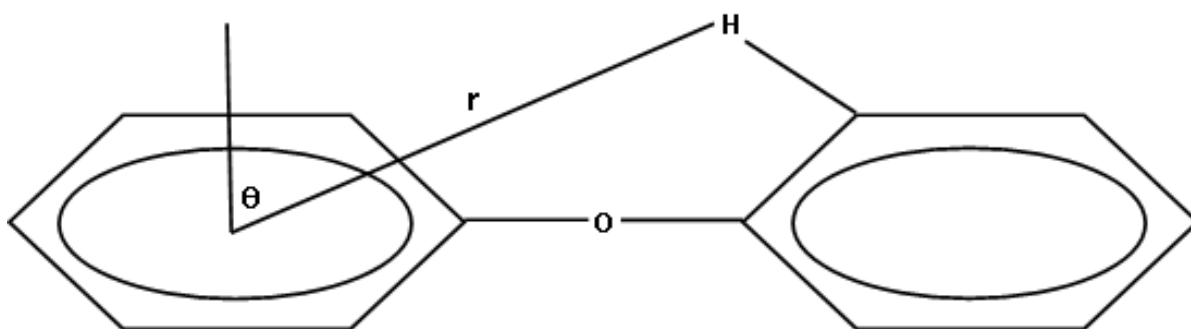


Figura 27. Dependencia de la geometría de los anillos aromáticos en PO conforme varia el ángulo entre ellos.

Este efecto de la corriente en el anillo proporciona información sobre la geometría del ciclofano de acuerdo a la orientación de los anillos aromáticos en su estructura en donde la superficie nodal del campo inducido (μ_0) cero se encuentra alrededor de los 35° del plano molecular (55° de la normal del centro del anillo).

Cuando uno de los anillos fenilo del enlace fenileno-O-fenileno rota 90° en el eje C-O, la ecuación (27) indica que el cambio en δ_{rc} del protón 'e' puede ser hasta de 0.25 ppm. Cuando se compara éste valor de la máxima variación esperada con los valores de $\Delta\delta_c$ obtenidos en los complejos son razonables (0.14 ppm para el éster de lisina y 0.17 ppm para el de arginina). De esta manera, se puede interpretar que los desplazamientos químicos observados para el protón 'e' se deben al cambio en la relación geométrica entre los grupos fenileno de una molécula de PO, lo cual sugiere que los grupos fenileno rotan alrededor del eje C-O cuando se da la formación del complejo. Se supone que esta reorientación ocurre de tal manera que los brazos pendientes carboxilo se orientan favorablemente para la interacción electrostática dual con los huéspedes. Esta rotación origina un incremento en la entalpía del enlace, pero se ve compensada por la fuerza de las interacciones electrostáticas que se forman y, con mayor efectividad, por el fenómeno de exclusión de solvente que acompaña la formación del complejo, lo cual origina que la estabilidad del complejo tenga su origen en la entropía.

La estequiometría para el complejo PO-ArgMe es 1:1, tal como se demuestra en la gráfica de Job (Figura 28), en donde el punto mínimo para la fracción molar es 0.5.

Ciclofano PC

Los cambios en el desplazamiento químico, $\Delta\delta$, de los protones aromáticos de PC en presencia de los huéspedes fueron insignificantes ($|\Delta\delta| < 0.02$ ppm) y no se observaron curvas de saturación, a pesar que las determinaciones por ITC indican la formación de complejos estables de PC con los ésteres de lisina y leucina.

Esta observación sugiere que la relación geométrica entre los grupos fenileno de PC permanece prácticamente sin cambio cuando se da la formación del complejo, a diferencia de lo que sucede con PO, debido a la rigidez de la cavidad de PC proporcionada por el grupo $-\text{CH}_2-$ que une ambos grupos fenileno. Como se indicó anteriormente, en el modelaje por mecánica molecular del complejo PC-LeuMe se observa que el grupo isobutil de la cadena lateral de LeuMe penetra en la cavidad del ciclofano, pero origina una deformación muy pequeña del esqueleto macrocíclico, lo cual explica que las señales de los protones aromáticos permanezcan sin cambio en el espectro de RMN.

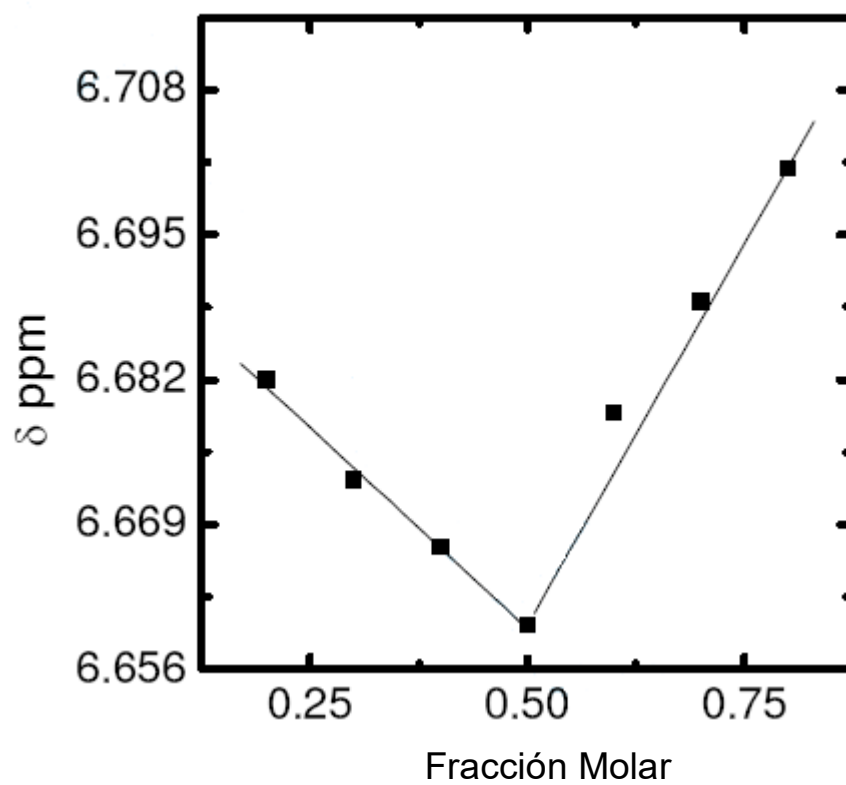


Figura 28. Gráfica correspondiente al experimento de job realizado para la determinación de la estequiometría del complejo PO-ArgMe.

CONCLUSIONES

Los ciclofanos aniónicos PO y PC tienen capacidades selectivas de reconocimiento molecular hacia los ésteres de aminoácidos básicos de arginina y lisina en solución acuosa a pH 6.0, como resultado del efecto combinado de los sitios aniónicos múltiples y la rigidez molecular de los receptores.

Los complejos obtenidos reflejan procesos endotérmicos tanto para PO como para PC, de tal forma que la formación de complejos es dirigida entrópicamente. De esta manera, la formación de los complejos se lleva a cabo por medio de doble interacción electrostática entre los brazos carboxilato de los receptores y las cargas positivas de ArgMe y LisMe, y el par iónico resultante se estabiliza por efecto de exclusión del solvente.

La moderada flexibilidad del cuerpo macrocíclico de PO, puede ajustarse a la forma molecular de ArgMe, así como para LisMe formando pares iónicos con ambos huéspedes, pero no es capaz de formar un complejo de inclusión con LeuMe por la falta de preorganización de su cavidad. Por otro lado, la alta rigidez de la cavidad de PC, resulta en dos características: encapsular los grupos hidrofóbicos de LeuMe sin ser deformada de gran manera y la capacidad de discriminar entre LisMe y ArgMe.

Éste hallazgo es un buen ejemplo de la importancia de la rigidez molecular de los receptores artificiales aniónicos en el apareamiento iónico selectivo de huéspedes catiónicos.

RECOMENDACIONES

Realizar experimentos a diferentes temperaturas con el fin de completar la caracterización termodinámica obteniendo el valor de C_p de los complejos formados.

Comparar la interacción de los receptores hacia los sustratos en diferentes solventes, para determinar el tipo de interacción que predomina en cada uno de los complejos supramoleculares en medios orgánicos.

Llevar a cabo el reconocimiento molecular hacia otro tipo de aminoácidos como lo son los aminoácidos aromáticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dodziuk H. 2002. *Introduction to Supramolecular Chemistry*. Kubler Academic Publishers ed. 1° Ed. USA. p1-4.
2. Cram D. J. and Cram J. M., 1997. *Container molecules and their guest*. *Angewandte Chemie*. 34:2563-2564.
3. Hamilton A. D. 1990. Design and synthesis of artificial receptors employing directed hydrogen bonding interaction. *J. Chem. Educ.* 678 (10):321.
4. Diederich F. 1990. "Molecular Recognition in Aqueous Solution Supramolecular complexation and catalysis". *J. Chem. Educ.* 67(10):813.
5. <http://www.ugr.es/~qmfisica/espanol/QFciencias/Docencia/Ficheros/Doctorado/Microcalorimetria/ITC/FundamentosITC.PDF> (Diciembre del 2007).
6. Mathews C. K, van Holde K. E., Ahern K. G. 1990. *Biochemistry*. Person Education ed. 3° Ed. p83-91.
7. Maron S. H. y Pruton C. F. 1982. *Fundamentos de Fisicoquímica*. Limusa ed. 1° Ed. México. p143-218.
8. Diederich F. 1991. *Cyclophanes*. The royal society of chemistry ed. 1° Ed. Cambridge.
9. Flodin N.W. 1997. *The metabolic roles, pharmacology, and toxicology of lysine*. *J Am Coll Nutr.* 16:7–21.
10. Lindoy L. F. 1989. *The chemistry of macrocyclic ligand complexes*. Cambridge University Press ed. 1° Ed. New York. p1, 160-183.
11. M. B. Inoue, I.C. Muñoz, Machi L., Inoue M., Fernando Q.. 2000. Structural and spectroscopic studies of Binuclear Cu⁺² and Co⁺² complexes with an amide-based naphthalenophane. *Inorg. Chem. Acta.* 311, 50-56.
12. M. B. Inoue, E. F. Velazquez, M. Inoue, Q. Fernando. 1997. Molecular recognition of phenethylamine, tiramine and dopamine with new anionic cyclophanes in aqueous media. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2113-2118.

13. Inoue M. B., Velázquez E. F., Inoue M. y Fernando Q. "Molecular Recognition of Phenethylamine, Tyramine and Dopamine with new Anionic Cyclophanes in Aqueous Media". *J. Chem. Soc. Perkins Trans. 2*, (1997)2113-2118.
14. Wu G., and Meininger C. J. 2000. Arginine Nutrition and Cardiovascular Function. *J. Nutr.* 130:2626-2629.
15. Wu G., Davis P. K., Flynn N. E., Knabe D. A., Davidson J. T.. 1997. Endogenous Synthesis of Arginine Plays an Important Role in Maintaining Arginine Homeostasis in Postweaning Growing Pigs. *J. Nutr.* 127 (12) pp. 2342-2349.
16. Kriengsinyos W., Rafii M., Wykes L. J., Ball R. O., Pencharz P. B.. 2002. Long-Term Effects of Histidine Depletion on Whole-Body Protein Metabolism in Healthy Adults. *J. Nutr.* 132:3340-3348
17. Blemings K. P., Crenshaw T. D., Benevenga N. J.. 1998. Mitochondrial Lysine Uptake Limits Hepatic Lysine Oxidation in Rats Fed Diets Containing 5, 20 or 60% Casein. *J. Nutr.* 128 (12):2427-2434
18. http://es.encarta.msn.com/encyclopedia_961543740/Leucina.html (Septiembre 2007)
19. Malandro, MS., Kilberg, MS. 1996. Molecular biology of mammalian aminoacid transporters. *Annu Ver Biochem*, 65: 305-36.
20. Medina, A. Escobar, M. 2002. Sistema Glutamatérgico, Primera parte: Sinaptología, Homeostasis y Muerte Celular. *Revista Colombiana de Psiquiatría*. XXXI (3):187-212.
21. Schmidtchen F.P. 2005. *Calorimetry: An Indispensible Tool In The Design of Molecular Hosts, in Macrocyclic Chemistry. Current Trends and Future Perspectives*. Springer ed. p291-302.
22. Schmidtchen F.P. 2007. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*. Wiley-VCH ed. p55-77
23. Wojciech Z., Agniaszka M., sergey C., Vitaly K., Jaroslaw P. 2006. Phosphorylated Calixarenes as Receptors of L-Amino Acids and Dipeptides: Calorimetric Determination of Gibbs Energy, Enthalpy and Entropy of Complexation. *Supramol. Chem.* p167-176

24. Steed J. W., Turner D. R., Wallace K. J. 2007. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*. Wiley ed. 1° Ed. Great Britain. p30, 17-26.
25. Schneider H., Yatsimirsky A. 2000. *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*. Wiley ed. 1° Ed.
26. Bruce W., Daranas A. 2003. On the Value of c: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry?. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (48):14859-14866.
27. Castellan G. W. 1998. *Fisicoquímica*. México. Person Education ed. 2° Ed. p107-229.
28. Inoue M. B., Velazquez E. F., Inoue M., Quintus F. 1997. "Molecular Recognition of Phenethylamine, Tyramine and Dopamine with New Anionic Cyclophanes in Aqueous Media". *J. Chem. Soc.*
29. Santacruz, H. 2007. "*Síntesis y Caracterización Espectroscópica de Agentes Quelantes Fluorescentes y sus Compuestos Metálicos*". Tesis Doctorado DIPM. Universidad de Sonora. p12-16.
30. Advanced Chemistry Development. 1994. Inc. ACD/pKa DB, Versión 3.0. Toronto ON, Canadá, www.acdlabs.com.
31. Laidler K. J., Meiser J. H. 1997. *Fisicoquímica*. CECSA ed. 1° Ed. México. p63.
32. *VP-ITC MicroCalorimeter User's Manual*. pv.
33. Grawe T., Schrader T., Finocchiaro P., Consiglio G., Failla, S. 2001. "A New Receptor for Lysine and Histidine in Water: Strong Binding of Basic Amino Acid Esteres by a Macrocyclic Host". *Org. Lett.*, 3 (11):1597-1600.
34. You, J., X., Zhang, G., Xiang, Q., Lan, J., Xie, R., 2001. "Novel Chiral Imidazol Cyclophanes Receptors: Synthesis and Enantioselective Recognition for Amino Acid Derivates". *Chem. Commun.*, 1816-1817.
35. Mutihac L., Buschmann H.J., Tudorescu A. 2003. "Some Aspects of Extrability and Transport of Amino Acid Esteres by Calixarenes". *J. Incl. Phenom. Macro.* 47: 123-128.

36. Velázquez C.A., Freire E. 2005. "ITC in the Post-Genomic Era...? Priceless". *Biophysical Chemistry*. (115):115-124.
37. Sun D., Li L., Qiu X., Liu M., Yin B. 2006. "Cyclodextrins Binding to Paeonol and Two of Its Isomers in Aqueous Solution. Isothermal Titration Calorimetry and ¹H NMR investigations of Molecular Recognition". *J Solution Chem*. (35): 1537-1549.
38. Grime K. 1995. *Analytical Solution Calorimetry*. Universidad de California. J. Wiley ed. 1° Ed. p 1-12.
39. Velazquez E.F. 2000. Síntesis de [10.1.10.1] *Paraciclofanos Funcionalizados y Estudio de sus Propiedades de Complejación y Reconocimiento Molecular*. Tesis Doctorado DIPM. Universidad de Sonora.
40. Bates R.G. 1968. "Standardization of Acidity Measurements". *Anal. Chem*. 40(6), 28A-37A.
41. Inoue M.B., Machi L., Muñoz I.C., Rojas-Rivas S., Inoue M. y Fernando Q. "Metal Ligand Interactions in Benzodioxotetraaza-Macrocyclic Metal Quilates", *Inorg. Chim. Acta*. 324(2001)73-80.
42. Furuta H., Furuta K., Sessler J. L. 1991 "Enhanced Transport of Nucleosides and Analogues with Complementary Base-Pairing Agent". *J. Am. Chem. Soc.* (113): 4706-4707.
43. Overfield R. E., Scherz A., Kaufmann K. J., Wasielewski M. R. 1983. "Photophysics of Bis(chlorophyll1)cyclophanes: Models of Photosynthetic Reaction Centers" *J. Am. Chem. Soc.* (105): 4256-4260.
44. Tanaka K., Sagae H., Toyoda K., Noguchi K., Hirano M. 2007. "Enantioselective Synthesis of Planar-Chiral Metacyclophanes through Rhodium-Catalyzed Alkyne Cyclotrimerization". *J. Am. Chem. Soc.* (129): 1522-1523..
45. Murakami Y., Kikuchi J., Ohno T., Hayashida O., Kojima M. 1990. "Syntheses of Macrocyclic Enzyme Models. 7.t Octopus Cyclophanes Having L-Aspartate Residues as Novel Water-Soluble Hosts. Aggregation Behavior and Induced-Fit Molecular Recognition". *J. Am. Chem. Soc.* (112): 7672-7681.

46. Ariga K., Kunitake T. 2006. *Supramolecular Chemistry – Fundamentals and Applications*. Berlin Heidelberg. Springer-Verlag Heidelberg ed. 2° Ed. p- 8, 28.
47. Lehn J. M. 1987. *Supramolecular chemistry– scope and perspectives molecules–supermolecules–molecular devices*. Louis Pasteur university France. p- 446.
48. Garcilazo J. R. 1997. *Bioquímica Descriptiva*. Universidad de Sonora. 1° Ed.
49. Roskoski R. JR. 1997. *Bioquímica*. México. McGraw-Hill Interamericana ed. p- 40-56, 62, 63, 225-227.
50. Lehninger A. L. 1995. *Bioquímica*. Barcelona, España. Omega ed. p- 117-123.
51. Perez Llanes C. M. 2006. *Reconocimiento Molecular de Aminoácidos Básicos por Receptores Macrocíclicos Sintéticos*. Tesis Licenciatura. Universidad de Sonora.
52. Linton, B.; Hamilton, A.D., **1999**, *Tetrahedron* **55**, 6027–6038.
53. Schmidtchen, F.P. Ency. *Supramol. Chem.* DOI: 10.1081/E-ESMC-120041528.
54. Félix Calderón J. 1999. *Evaluación de la Capacidad de Transporte de Sustratos Aromáticos a Través de Soluciones Acuósas de un Nuevo Receptor Macrocíclico Tipo Ciclofano*. Tesis Licenciatura. Universidad de Sonora.

ANEXO

Publicaciones relacionadas con este trabajo de tesis:

Selective ion-pair formation between cationic amino acid esters and anionic cyclophanes: isothermal calorimetry and ^1H NMR.

Autores:

Sugich-Miranda, Velazquez, Enrique; Miranda-de la Rosa, Abigail; Sotelo-Mundo, Rogerio, Inoue, Motomichi.

Revista: Supramolecular Chemistry

-----Mensaje original-----

De: onbehalfof@scholarone.com [mailto:onbehalfof@scholarone.com] En nombre de suprachem@mail.cm.utexas.edu

Enviado el: martes, 02 de diciembre de 2008 09:08 a.m.

Para: evlzqz@guaymas.uson.mx

Asunto: Supramolecular Chemistry - Manuscript ID GSCH-2008-0168

02-Dec-2008

Dear Dr. Velazquez:

Your manuscript entitled "Selective ion-pair formation between cationic amino acid esters and anionic cyclophanes: isothermal calorimetry and ^1H NMR" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Supramolecular Chemistry.

Your manuscript ID is GSCH-2008-0168.

Please be so kind as to double check that in submitting you manuscript you remembered to suggest the names, addresses and e-mail addresses of at least 5 potential reviewers who are not affiliated with you, your institution(s), and the particular body of work described in your submission. Your manuscript will not be processed until this information is received.

Submission to Supramolecular Chemistry implies association with the broader molecular recognition, the support of which is the goal of the journal. Maintaining the standards and quality of this community is a shared commitment of all of its members. Therefore, it is my assumption as editor that you will be willing to act as a reviewer when called upon to do so. While it is not a quid pro quo for the handling of this specific paper. Those authors who do not do their share when called upon will be "flagged" in our database such we can avoid a situation where authors submit to, but don't review for, the journal.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/gsch> and edit your user information as appropriate.

Finally, please make a note now that if your submission is accepted for publication, you will receive proofs that contain both the text and the supplementary material (to the extent any is provided). Please do not be alarmed, this is the standard policy of the publisher and does not imply that the printed version will contain the supporting information; it won't.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/gsch> .

Thank you for submitting your manuscript to Supramolecular Chemistry.
Sincerely,
Supramolecular Chemistry Editorial Office

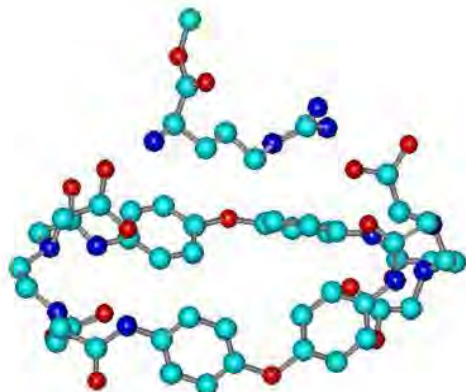


Selective ion-pair formation between cationic amino acid esters and anionic cyclophanes: isothermal calorimetry and ¹H NMR

Journal:	<i>Supramolecular Chemistry</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Sugich-Miranda, Rocio; Universidad de Sonora, Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales Velazquez, Enrique; Universidad de Sonora, Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales Miranda-de la Rosa, Abigail; Universidad de Sonora, Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales Sotelo-Mundo, Rogerio; Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Laboratorio de biología molecular de organismos acuáticos Inoue, Motomichi; Universidad de Sonora, Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales
Keywords:	amino acids, calorimetry, cyclophanes, ion pairs, molecular recognition



1
2
3
4 [Graphical Abstract]
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22



23 **Selective ion-pair formation between cationic amino acid esters and anionic cyclophanes:**
24 **isothermal calorimetry and ^1H NMR**
25
26

27 Rocio Sugich-Miranda^a, Enrique F. Velazquez^{a*}, Abigail Miranda-de la Rosa^a, Rogerio Sotelo-
28 Mundo^b, and Motomichi Inoue^a
29

30
31
32 ^a*Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Apartado*
33 *Postal 130, Hermosillo, Sonora 83000, México.*
34

35
36
37 ^b*Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, Centro de Investigación en*
38 *Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora 83000, México.*
39
40
41

42
43
44
45 Anionic cyclophanes having four carboxylate groups selectively form ion pairs with the methyl
46 ester cations of arginine and lysine in a parallel-stack manner, and an accompanying solvent-
47 exclusion effect stabilizes the ion pairs. The selectivity originates from the arrangement of the
48 anionic sites and the molecular rigidity.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 **Selective ion-pair formation between cationic amino acid esters and anionic cyclophanes:**
5
6 **isothermal calorimetry and ^1H NMR**
7

8
9 Rocio Sugich-Miranda^a, Enrique F. Velazquez^{a*}, Abigail Miranda-de la Rosa^a, Rogerio Sotelo-
10
11 Mundo^b, and Motomichi Inoue^a
12

13
14 ^a*Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Apartado*
15
16 *Postal 130, Hermosillo, Sonora 83000, México.*
17

18
19 ^b*Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, Centro de Investigación en*
20
21 *Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora 83000, México.*
22

23
24 -----
25
26 *Corresponding author. E-mail: evlzqz@guaymas.uson.mx
27
28
29
30 -----
31

32
33 **[Abstract]**
34

35
36 Molecular recognition toward arginine and lysine methyl esters, which have two cationic
37
38 ammonium sites at pH 6, was studied by isothermal titration calorimetry (ITC) and ^1H NMR. As
39
40 receptors anionic cyclophanes, cy1 and cy2, were employed: cy1 consists of two phenylene–O–
41
42 phenylene units linked by two EDTA chains, and carries four pendant carboxylate groups; cy2 is
43
44 composed of phenylene–CH₂–phenylene in place of the ether units. Cy1 underwent endothermic
45
46 reaction to yield complexes with arginine ester (formation constant, $K=740\text{ M}^{-1}$) and lysine ester
47
48 ($K=230\text{ M}^{-1}$); cy2 did not react with arginine ester although it formed a complex with lysine
49
50 ester ($K=290\text{ M}^{-1}$). The complex formation is driven by dual electrostatic interaction, and the
51
52 resulting ion-pairs are stabilized by a solvent-exclusion effect. The selectivity is related to the
53
54 rigidity of the cyclophane frameworks: cy1 is more flexible to adapt to both esters; cy2 with
55
56
57
58
59
60

1
2
3 higher rigidity fits only lysine ester. The cavity of cy2 is so well-organized that it forms an
4 inclusion complex with uni-cationic leucine ester ($K=105 \text{ M}^{-1}$) whereas cy1 does not. The
5 combined effects of multiple anionic sites and molecular rigidity in the cyclophanes lead to their
6 distinct molecular recognition capabilities.
7
8
9
10
11
12
13
14

15 Keywords: amino acids, calorimetry, cyclophanes, ion pairs, molecular recognition
16
17
18
19

20 Introduction

21
22 Artificial receptors toward amino acids and their derivatives have been designed to aim at
23 mimicking biological functions in aqueous systems [1–4]. The main molecular recognition sites
24 of amino acids are ammonium and carboxylate groups. Additional binding sites are provided by
25 a various types of side chains, which define affinity with specific receptors. The role of the side
26 chains is especially important in the so-called basic amino acids including lysine (abbreviated as
27 ly) and arginine (ar), the side chains of which are positively charged at physiological pH. When
28 these basic amino acids are involved in a protein as constituents, the positively charged side
29 chains endow the protein with various functions such as response to ionic environment and
30 binding to anionic receptors [5]. In the present work, as model compounds for studying the
31 functions of the amino acid residues are chosen methyl esters of the basic amino acids. These
32 esters carry two cationic sites and no longer take a zwitterion form in neutral and acid media as
33 shown in Figure 1; abbreviation $(\text{amMe})\text{H}_2^{2+}$ is used in which ‘am’ stands for the parental amino
34 acids. The bi-cationic esters are expected to form ion pairs selectively with well-designed
35 anionic receptors. Studies of various ion pairs by thermodynamic and spectroscopic techniques
36 have demonstrated that an ion pair formed by electrostatic interaction at two binding sites has a
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60