



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y
APLICADAS**

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Síntesis y Reconocimiento Molecular de Aniones
Fosfatados por Nuevos Derivados de Espiramicina”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

M. en C. KARLA ISABEL RIVERA MÁRQUEZ

Director de tesis:

Dr. Felipe Medrano Valenzuela

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO 2018

JURADO REVISOR

Presidente	Dr. Anatoli Yatsimirski	FQ – UNAM
Secretario	Dra. Carolina Godoy Alcántar	CIQ - UAEM
Vocal	Dra. Lorena Machi Lara	UNISON
Vocal	Dr. Ismael León Rivera	CIQ – UAEM
Vocal	Dr. Herbert Höpfl Bachner	CIQ – UAEM
Suplente	Dr. Felipe Medrano Valenzuela	CIQ - UAEM
Suplente	Dr. Miguel Ángel Muñoz Hernández	CIQ - UAEM

Sitio donde se realizó la tesis:

Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio 307 de Química Analítica Supramolecular del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del estado de Morelos, bajo la dirección del Dr. Felipe Medrano Valenzuela.

Becas

Beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con No. de becario **241469**.

Apoyo financiero para la realización de la tesis con el proyecto de CONACYT **49938-Q**.

Los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear se llevaron a cabo en el LANEM-UAEM.

Parte de los resultados de este proyecto de tesis fueron publicados en la siguiente revista:

Karla Isabel Rivera-Márquez, Carolina Godoy-Alcántar, Miguel Ángel Claudio-Catalán, Felipe Medrano. *Adenine nucleotide recognition by spiramycin and some of its aromatic derivatives. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2016**, *86*, 211-219.

Parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en los siguientes congresos:

“Síntesis y Caracterización de Derivados de Espiramicina”. Karla Isabel Rivera Márquez, Felipe Medrano Valenzuela. 48° Congreso Mexicano de Química celebrado en Guanajuato, Guanajuato del 31 de agosto al 4 de septiembre de 2013.

“Reconocimiento Molecular de Aniones por Derivados de Espiramicina”. Karla Isabel Rivera Márquez, Felipe Medrano Valenzuela. II Simposio Mexicano de Química Supramolecular celebrado en Puente de Ixtla, Morelos del 25 al 27 de agosto de 2014.

“Síntesis y Reconocimiento Molecular de ATP por Derivados de Espiramicina”. Karla Isabel Rivera Márquez, Felipe Medrano Valenzuela, Miguel Ángel Claudio Catalán. III Simposio Mexicano de Química Supramolecular celebrado en San Carlos, Nuevo Guaymas, Sonora del 27 al 29 de octubre de 2016.

Cada palabra, cada ecuación, cada cálculo es parte de ti, de tu esencia y de lo que compartirás con el mundo para que sea mejor.

Anónimo

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios Jehová por guiar y bendecir mis pasos y permitirme llegar a este punto de mi carrera académica. Gracias Dios por darme la fortaleza y la entereza necesarias para llevar a cabo este proyecto y por siempre estar a mi lado. Gracias por llenarme de tu amor incondicional que me ha funcionado como motor en cada día de mi vida. Gracias por bendecirme con la compañía de mi familia, profesores y amigos.

A mis padres Carlos e Isabel por su amor y el apoyo incondicional que siempre me han dado. Sin duda son la base de mi formación como persona gracias a sus consejos y su guía. Gracias por enseñarme que los problemas que a veces me aquejan no son nada en comparación a los sacrificios que ustedes hacen por mí y por mis hermanos. Los amo.

A mis hermanos Carlos y Mayi, gracias por el cariño, la compañía y los momentos divertidos que siempre comparten conmigo.

A Arleth, gracias por tu apoyo y cariño y por enseñarme que una amiga siempre puede ser una hermana más.

A Claudio. Eres parte importante en la realización de este trabajo, es por eso que te agradezco el apoyo que siempre me has brindado, gracias por ayudarme en los tiempos críticos de esta etapa y también en los buenos. Gracias por haber sido parte de mi vida académica y por brindarme tus consejos de forma oportuna. El cariño y respeto que nos tenemos es recíproco, es por eso que te agradezco de mil maneras los buenos momentos que siempre has compartido conmigo y la ayuda incondicional que siempre me has brindado.

Al Doctor Felipe Medrano, por ser parte importante de este proyecto, por sus enseñanzas, la paciencia y comprensión que me ha tenido durante todos estos años. Gracias por los conocimientos que me ha transmitido para fortalecer mi formación como profesionalista y gracias por brindarme su apoyo incondicional y oportuno siempre que lo necesito.

A la Doctora Carolina Godoy le agradezco el apoyo incondicional, la paciencia y los consejos que me brindaba cada que lo requería. Gracias por haberme permitido trabajar en algunos de sus proyectos ya que esto me ha ayudado en mi formación. Gracias por su valiosa contribución en la discusión de este trabajo.

Al Doctor Anatoli Yatsimirsky y al Doctor Miguel Muñoz por ser parte de mi comité tutorial y por sus valiosas aportaciones en el desarrollo de esta tesis.

A los miembros del jurado revisor, gracias a sus aportaciones y observaciones mejoraron el contenido y realzaron la calidad de esta tesis.

A mis amigos por su valiosa amistad, por todos los momentos que hemos compartido juntos. Les agradezco el haberme acompañado durante la realización de este proyecto: Nadia, Josué, Cuco, Ulises, Diego, Daniela, Aldo, Jesús Silva, Jesús Barrera, Charlie, Montse, Sam, Ximena y Dra. Ma. Luisa Betancourt.

A mis amigos del CIQ.

A mis amigos de muchos años de convivencia, que, aunque no todos son químicos, siempre me brindan su amistad, ánimo para seguir con mis proyectos, además de compartirme sus consejos sin condiciones: Zuly, Oziel, Viridiana H., Edelmira y Mary Carmen F.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE COMPUESTOS.....	ii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1. Características y propiedades de los aniones.....	8
2.3. Diseño de receptores para aniones.....	9
2.4. Reconocimiento de fosfatos en la naturaleza.....	9
2.5. Importancia del reconocimiento de los nucleótidos y el ATP.....	10
2.6. Características de un receptor adecuado para nucleótidos.....	12
2.7. Receptores sintéticos para aniones fosfatados.....	13
2.8. Receptores para nucleótidos de fosfato.....	21
2.9. Receptores naturales y semisintéticos para aniones fosfatados.....	28
2.10. Definición de macrólidos.....	32
2.10.1. Mecanismo de acción de los macrólidos.....	33
2.10.2. Fundamento molecular del modo de acción de los antibióticos del tipo macrólido.....	34
2.10.3. Uso de los macrólidos en el reconocimiento molecular.....	36
2.11. Espiramicina.....	38
2.11.1. Estructura química.....	38
2.11.2. Determinación de los valores de pK_a de espiramicina en solución acuosa.....	43
2.11.3. Estudios de reconocimiento molecular de espiramicina con aniones.....	44
3. JUSTIFICACIÓN.....	47
5. HIPÓTESIS.....	49
4. OBJETIVO GENERAL.....	51
4.1. Objetivos específicos.....	51
6. METODOLOGÍA.....	53

6.1. Materiales.....	53
6.1.1. Reactivos.....	53
6.1.2. Instrumentación.....	54
6.1.3. Programas para realizar cálculos y ajustes.....	56
6.2. Metodología sintética	57
6.2.1. Síntesis de los derivados de espiramicina.....	57
6.3. Estudios por potenciometría	57
6.3.1. Determinación de los valores de pK_a de los derivados de espiramicina	58
6.3.2. Determinación de los logaritmos de las constantes de asociación de los complejos anfitrión-huésped.....	59
6.3.3. Tratamiento de datos obtenidos de las titulaciones potenciométricas.....	59
6.3.4. Ecuaciones para la determinación de las constantes de protonación (pK_a 's) de los derivados de espiramicina y de los huéspedes.....	67
6.3.5. Ecuaciones para la determinación de las constantes de asociación ($\log K$) de los complejos anfitrión-huésped.....	69
6.3.5. Ecuaciones para la obtención de la constante efectiva (K_{eff}).....	70
6.4. Estudios por Resonancia Magnética Nuclear.....	71
6.4.1. Determinación de los valores de pK_a de 2-picolilespiramicina 1b	71
Obtención de las constantes de protonación de 2-picolil espiramicina 1b en RMN....	72
Obtención del pK_a en D_2O	72
6.4.2. Estudios de reconocimiento molecular de 1b hacia ATP y ADP mediante titulaciones por RMN 1H y ^{31}P	73
6.5. Estudios por modelado computacional	74
6.6. Estudios de titulación isotérmica por calorimetría (ITC)	75
6.6.1. Preparación de las muestras.....	76
6.6.2. Ecuaciones para obtener los parámetros termodinámicos.....	79
6.6.3. Obtención de la ecuación de ajuste para un sitio de interacción	79
6.6.4. Tratamiento de los datos	80
6.7. Estudios por UV-visible	82
6.7.1. Determinación de los coeficientes de absorptividad molar (ϵ) de los derivados de 1a-d (Linealizaciones).....	82

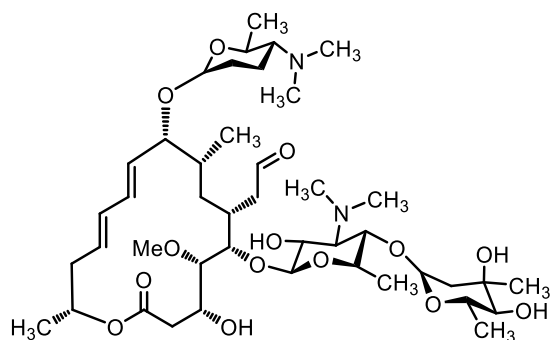
6.7.2. Ley de Lambert – Beer para la obtención de ϵ	83
6.7.3. Determinación de los valores de pK_a de Naftil espiramicina 1c	83
6.7.4. Tratamiento de los datos obtenidos de la titulación	84
6.7.5. Ecuación de ajuste para obtener las constantes de protonación de los derivados 1a-d	85
6.7.6. Reconocimiento molecular de Naftil espiramicina 1c y Pirenil espiramicina 1d	85
6.7.7. Tratamiento de datos obtenidos de titulaciones anfitrión-huésped	87
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
7.1. Síntesis de los derivados	90
7.2. Caracterización de los derivados por RMN 1H y ^{13}C	92
7.3. Estudios por potenciometría	95
7.3.1. Determinación de constantes de protonación (pK_a 's) de los derivados 1a-c	95
7.3.2. Estudios de reconocimiento molecular de los derivados 1a-c con aniones.....	107
7.4. Estudios por Resonancia Magnética Nuclear.....	120
7.4.1. Obtención de constantes de protonación (pK_a 's) de 2-Picolil espiramicina 1b en D_2O	120
7.4.2. Estudios de reconocimiento molecular de 1b con ATP y ADP por RMN 1H y ^{31}P	126
7.5. Estudios por modelado molecular	136
7.6. Estudios por calorimetría de titulación isotérmica.....	141
7.7. Estudios por espectroscopía UV-Visible.....	146
7.7.1. Obtención de los coeficientes de absorptividad molar (ϵ) de los derivados 1a-d	146
7.7.2. Determinación de las constantes de protonación de Naftil espiramicina 1c	146
7.7.3. Estudios de reconocimiento molecular por Naftil espiramicina 1c y Pirenil espiramicina 1d hacia ATP, ADP y AMP.....	148
7.8. Discusión integrada de constantes de protonación y constantes de asociación	154
7.8.1. Constantes de protonación de los derivados 1a-c con espiramicina.....	154
7.8.2. Logaritmos de constantes de asociación de los nucleótidos de adenina con diferentes receptores.	156

7.8.3. Logaritmos de constantes de asociación de ácidos dicarboxílicos con espiramicina y sus derivados 1a-b	160
8. CONCLUSIONES.....	164
9. PERSPECTIVAS.....	168
10. APÉNDICES	170
APÉNDICE A: Parte experimental.....	170
APÉNDICE B: Preparación de NaOH estandarizado.....	170
APÉNDICE C: Diagramas de formación de especies de los complejos en potenciometría	170
APÉNDICE D. Linealizaciones de los derivados 1a-d en UV-Visible. (Obtención de epsilon)	179
APÉNDICE E. Titulaciones de Naftil espiramicina 1c y Pirenil espiramicina 1d con AMP, ADP y ATP en UV-visible.....	186
APÉNDICE F. Espectros de las titulaciones realizadas por Resonancia Magnética Nuclear.	193
APÉNDICE G: Espectros de RMN (¹ H, ¹³ C, COSY, HSQC) y masas de los derivados de espiramicina.....	199
APÉNDICE H. Artículo publicado como parte de los resultados de esta tesis.....	214

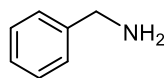
LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Ángstrom
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
β	Constante acumulativa
<i>BencilSpy</i>	Bencil espiramicina
CIS	Desplazamiento Inducido por Complejación (Complexation Induced Shifts por sus siglas en inglés)
δ	Desplazamiento químico
DMSO	Dimetil sulfóxido
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
ITC	Titulación por Calorimetría Isotérmica (Isothermal Titration Calorimetry por sus siglas en inglés)
K	Constante de asociación
K_{eff}	Constante efectiva
$\log K$	Logaritmo de la constante de asociación
$\log K_{eff}$	Logaritmo de la constante efectiva
M	Molar
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanesulfónico
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
<i>NaftilSpy</i>	Naftil metil espiramicina
pH	Potencial de hidrógeno
<i>PirenilSpy</i>	Pirenil metil espiramicina
pK_a	Cologaritmo de la constante de acidez
pK_w	Cologaritmo de la constante del producto iónico del agua
PPi	Pirofosfato
ppm	Partes por millón
RMN 1H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN ^{31}P	Resonancia Magnética Nuclear de fósforo
<i>Spy</i>	Espiramicina
<i>Sypic</i>	2- Picolil espiramicina
μL	Microlitros
UV-Vis	Ultravioleta Visible

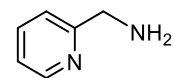
ÍNDICE DE COMPUESTOS



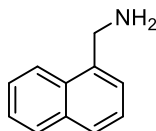
Espiramicina



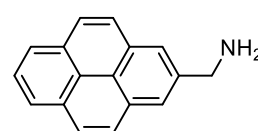
Bencilamina



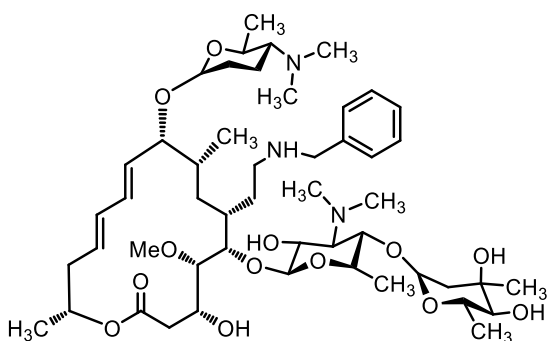
2-Picolilamina



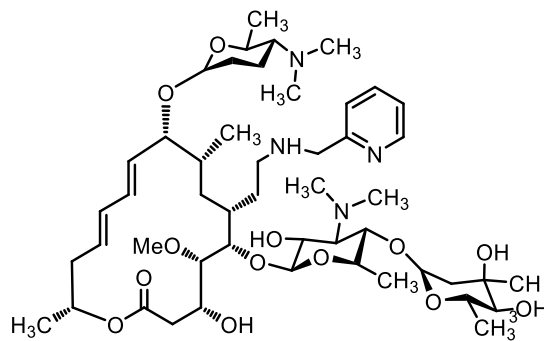
Naftilamina



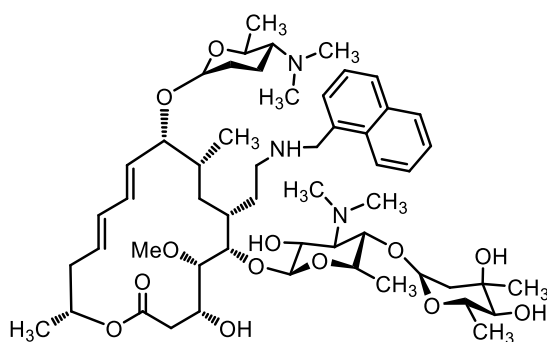
Pirenilamina



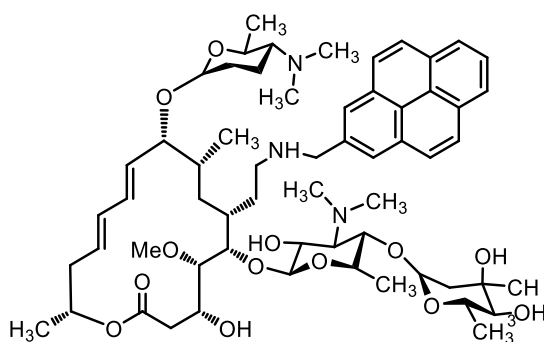
Bencil Espiramicina, **1a**



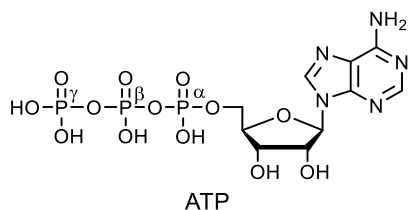
2-Picolil Espiramicina, **1b**



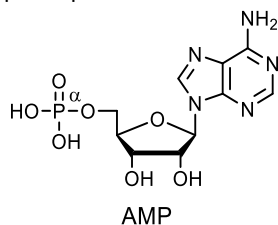
Naftil Espiramicina, **1c**



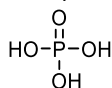
Pirenil Espiramicina, **1d**



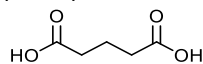
pK_a en H_2O : 6.50, 4.09
 pK_a en H_2O - MeOH 9:1: 6.90, 3.98
 pK_a reportado: 6.50, 4.02¹



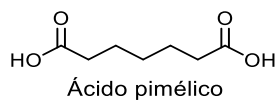
pK_a en H_2O : 6.36, 3.90
 pK_a en H_2O - MeOH 9:1: 6.54, 3.99
 pK_a reportado: 6.21, 3.80²



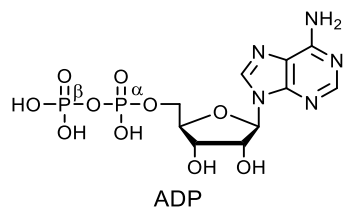
pK_a en H_2O : 12.3, 7.22
 pK_a en H_2O - MeOH 9:1: 12.70, 7.10
 pK_a reportado: 12.38, 6.82⁴



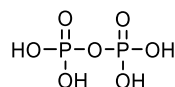
pK_a en H_2O : 5.07, 4.08
 pK_a en H_2O - MeOH 9:1: 5.07, 4.08
 pK_a reportado: 5.01, 4.14²



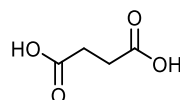
pK_a en H_2O : 5.11, 4.35
 pK_a en H_2O - MeOH 9:1: 5.33, 4.58
 pK_a reportado: 5.42, 4.48⁵



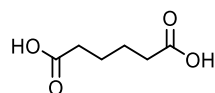
pK_a en H_2O : 6.48, 3.97
 pK_a en H_2O - MeOH 9:1: 6.82, 3.85
 pK_a reportado: 6.31, 3.94²



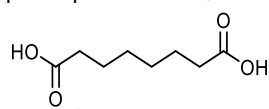
pK_a en H_2O : 8.47, 6.07
 pK_a en H_2O - MeOH 9:1: 8.46, 5.95
 pK_a reportado: 8.77, 6.18³



pK_a en H_2O : 5.26, 4.21
 pK_a reportado: 5.21, 4.0²



pK_a en H_2O : 5.04, 4.24
 pK_a en H_2O - MeOH 9:1: 5.30, 4.17
 pK_a reportado: 5.0, 4.28²



pK_a en H_2O : 5.13, 4.38
 pK_a en H_2O - MeOH 9:1: 5.38, 4.67
 pK_a reportado: 5.40, 4.52⁵

¹ Smith, R.M., Martell, A.E., Chen, Y. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 1015–1080.

² Yasuda, M., Yamasaki, K., Ohtaki, H. *Bull. Chem. Soc. Japan.* **1960**, *23*, 1067–1070.

³ Daniele, P.G., Rigano, C., Sammartano, S. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2956–2960.

⁴ Banerjee, D., Kaden, A.T., Sigel, H. *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 2586–2590.

⁵ Brown, H.C., McDaniel, D.H., Hafliker, O. *Determination of Organic Structures by Physical Methods*, Academic Press New York, **1955**.

RESUMEN

En este proyecto de tesis se presenta el estudio de reconocimiento molecular de aniones por nuevos derivados aromáticos del antibiótico natural espiramicina, que es un compuesto perteneciente a la familia de los macrólidos y que presenta muchas de las características adecuadas para funcionar como un buen receptor de aniones, ya que posee dos aminoazúcares cargados positivamente en pH ácido, así como grupos hidrofóbicos e hidrofílicos y una gran cantidad de centros quirales. Sin embargo, carece de grupos aromáticos que le confieran propiedades fotofísicas de absorción y que pudieran favorecer interacciones π - π con las unidades aromáticas de los aniones estudiados AMP, ADP y ATP. Se llevó a cabo la síntesis de cuatro nuevos derivados de espiramicina **1a-d** introduciendo aminas con fragmentos aromáticos tales como: bencilo (**1a**), 2-metil-piridina (**1b**), 1-metil-natftilo (**1c**) y 1-metil-pirenilo (**1d**) mediante reacción de aminación reductiva del grupo aldehído de la espiramicina. Los derivados fueron completamente caracterizados mediante RMN (^1H , ^{13}C) y espectrometría de masas (HRMS). La adición de fragmentos aromáticos a la espiramicina se hizo con la finalidad de estudiar las propiedades fotofísicas de los nuevos derivados por la técnica espectrofotométrica UV-visible.

Posteriormente, se llevaron a cabo estudios para la determinación de las constantes de protonación ($\text{p}K_a$'s) de los derivados **1a-c** por la técnica de potenciometría. Adicionalmente, las constantes de protonación calculadas para el derivado **1b** fueron asignadas mediante titulación potenciométrica seguida por RMN ^1H en D_2O .

Se realizaron estudios de reconocimiento molecular por potenciometría para la determinación de las constantes de asociación de **1a-c** con huéspedes aniónicos de estructura diversa; en donde, el compuesto **1a** reconoció selectivamente a los aniones fosfatados en el siguiente orden $\text{ADP} > \text{ATP} > \text{AMP} > \text{pirofosfato} > \text{fosfato}$, con constantes de magnitud $\log K = 4.82 - 3.34$. Por otro lado, también se observó la asociación de **1a** con dicarboxilatos, observándose una mayor afinidad por pimelato sobre adipato ($\log K = 4.80$

y 4.56, respectivamente). La tendencia de selectividad para los complejos formados por **1b** con la misma serie de aniones fue: pirofosfato > fosfato > ATP > AMP > ADP ($\log K = 4.16 - 2.67$); mientras que con la serie de ácidos dicarboxílicos la selectividad fue: succinato > adipato > pimelato > suberato ($\log K = 3.27 - 3.03$). Finalmente, para el receptor **1c** sólo se estudió la serie de nucleótidos de adenina, cuya tendencia para la complejación fue: ATP > ADP > AMP ($\log K = 6.40 - 4.10$). Adicionalmente, por ITC se determinaron los parámetros termodinámicos para la formación del complejo **1b**-ATP. No obstante, por medio de UV-visible no fue posible determinar las constantes de asociación entre los derivados **1c-d** con los nucleótidos de adenina.

Se llevaron a cabo titulaciones por RMN ^1H y ^{31}P en D_2O entre el derivado **1b** con los aniones ATP y ADP con el fin de conocer los sitios de interacción en los complejos formados. Los valores de CIS calculados indicaron que dichos complejos se forman principalmente por interacciones de puente de hidrógeno entre los grupos amino protonados del receptor y los grupos fosfato de los nucleótidos, lo cual fue confirmado mediante estudios de química computacional a nivel de mecánica molecular.

De este trabajo se concluye que el derivado bencil espiramicina **1a**, mostró mayor afinidad hacia ATP y pirofosfato; mientras que el derivado 2-picolil espiramicina **1b** mejoró su capacidad en el reconocimiento molecular únicamente hacia el pirofosfato y el derivado naftil espiramicina **1c** potencializó su afinidad hacia ATP, todas ellas en comparación con las reportadas por espiramicina. El derivado **1a** también mostró constantes de asociación más altas hacia los aniones dicarboxilato, como adipato y pimelato en comparación con las obtenidas por espiramicina. Cabe destacar que estas constantes se obtuvieron mediante la técnica de potenciometría, la cual nos permitió trabajar con mezclas acuosas para disolver mejor los derivados, arrojando valores de constantes más confiables. La técnica de ITC únicamente permitió trabajar con compuestos solubles en agua, por lo cual el derivado **1b** fue el único que se estudió bajo esta técnica, determinándose los valores termodinámicos para el complejo **1b** - ATP. Finalmente, por espectrofotometría con la técnica de UV-visible sólo fue posible trabajar con los derivados **1c-d**, los cuales presentaron absorbancias significativas debido a la presencia de grandes grupos aromáticos.

ABSTRACT

In this work, the study of the anion molecular recognition by new derivatives of spiramycin is presented. Spiramycin is a natural antibiotic of the macrolide family and has many of the adequate characteristics to work as an efficient receptor for anions, including two aminosugar moieties with a positive charge at acidic pH, hydrophobic and hydrophilic groups as well as several chiral centers. However, spiramycin lacks aromatic groups that can confer photophysical properties of light emission/absorption or the ability to establish π - π interactions with anions such as AMP, ADP or ATP.

The synthesis of four new derivatives **1a-d** was carried out by reductive amination of the spiramycin aldehyde group to link aromatic moieties, such as benzyl (**1a**), 2-methyl-pyridyl (**1b**), 1-methyl-naphthyl (**1c**) and 1-methyl-pyrenyl (**1d**). The compounds **1a-d** were fully characterized by ^1H , and ^{13}C NMR and mass spectrometry (HRMS). The aim of introducing aromatic fragments into the structure of spiramycin was to study the photophysical properties of the new derivatives by UV-vis spectrophotometry.

Later, studies for the determination of protonation constants ($\text{p}K_a$'s) of the derivatives by potentiometry were carried out. Additionally, the determined protonation constants for **1b** were assigned unequivocally by ^1H NMR titrations in D_2O .

Molecular recognition studies to determine the association constants between **1a-c** with diverse anionic guests were carried out by potentiometry. Compound **1a** selectively recognized phosphate anions in the order $\text{ADP} > \text{ATP} > \text{AMP} > \text{pyrophosphate}$, phosphate with association constant in the range $\log K = 4.82 - 3.34$. In another side, the association of **1a** with dicarboxylates also was observed, in this case a higher affinity for pimelate over adipate ($\log K = 4.80$ and 4.56 , respectively) was observed.

The selectivity trend for the complexes formed between **1b** and the same anion series was: $\text{pyrophosphate} > \text{phosphate} > \text{ATP} > \text{ADP} > \text{AMP}$ ($\log K = 4.16 - 2.67$); while with the studied dicarboxylates the selectivity followed the order: $\text{succinate} > \text{adipate} > \text{pimelate} > \text{suberate}$ ($\log K = 3.27 - 3.03$). Finally, receptor **1c** was only studied with adenine nucleotides, which

form complexes in the affinity trend: ATP > ADP > AMP ($\log K = 6.40 - 4.10$). Besides, the thermodynamic parameters of the association between **1b**-ATP were determined by ITC. The determination of association constants between the receptors **1c-d** and nucleotides was not possible by UV-vis spectroscopy.

In order to determine the interaction sites in the structure complexes formed between **1b** derivative with ATP and ADP nucleotides, some ^1H and ^{31}P NMR titrations were performed. The calculated CIS values indicated that these complexes are formed by hydrogen bonds between the protonated amino groups of the receptor and phosphate moieties of the nucleotides, which was confirmed by molecular mechanic computational studies.

In conclusion, compared with spiramycin, the benzyl spiramycin derivative **1a**, has the highest affinity toward ATP and pyrophosphate; while 2-picolyl spiramycin, **1b** improved its molecular recognition ability towards pyrophosphate and naphthyl spiramycin derivative **1c** showed a higher affinity for ATP. Derivative **1a** also showed higher association constants with dicarboxylates as pimelate and adipate in comparison with spiramycin. It's essential to remark that constants obtained by potentiometry in aqueous solution in this study are trustworthy. Because of the ITC equipment only allows to work with substances totally dissolved in water; just the derivative **1b** was studied by this technique, where the thermodynamic parameters for the **1b**-ATP complex were determined. Finally, complexes with the derivatives **1c-d** were analyzed by UV-Vis spectrophotometry due to the strong absorption of the aromatic groups present in the structure of the derivatives.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Siendo la *química supramolecular* el área principal de esta tesis, se hará una descripción de su concepto enfocándose específicamente a una de las ramas de esta área que es el *reconocimiento molecular*, dentro de ésta se nombrarán las características y propiedades de los aniones que deben de tomarse en cuenta para el diseño adecuado de receptores.

La *Química Supramolecular* definida por Jean Marie Lehn, como “la química del ensamble molecular y del enlace intermolecular”, empezó con el enlace selectivo a cationes metálicos alcalinos por éteres corona; y posteriormente, amplió su campo de aplicación al reconocimiento molecular.⁶

El *Reconocimiento Molecular* se puede definir como la capacidad de una molécula de discriminar entre huéspedes con diferentes estructuras, lo cual implica que se debe tener complementariedad geométrica y de interacciones entre las especies que se asocian. Para lograr un elevado reconocimiento es necesario que el *huésped* y el *anfitrión* tengan complementariedad molecular. Esto ocurrirá cuando el anfitrión sea capaz de envolver al huésped estableciendo numerosas interacciones no-covalentes.

Los conceptos y lenguaje de esta disciplina, los cuales en parte son tomados de la biología y la química de coordinación, pueden ser mayormente atribuidos a la creatividad científica de Lehn. El reconocimiento, la translocación, la catálisis y la auto-organización son consideradas las cuatro piedras angulares de la Química Supramolecular. El reconocimiento no sólo contempla los bien conocidos metales de transición (química de coordinación clásica) sino también iones metálicos, cationes orgánicos y especies neutras y aniónicas. Los aniones tienen gran relevancia desde el punto de vista biológico ya que el 70% de los cofactores y sustratos involucrados en la biología son de naturaleza aniónica.

El nacimiento del primer receptor sintético reconocido de haluros ocurrió prácticamente al mismo tiempo que el descubrimiento de Charles Pedersen sobre los éteres corona. Mientras Pedersen publicó su primer artículo sobre éteres corona en abril de 1967 con el título “Cyclic

⁶ Lehn, J. M. *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, **1995**.

Polyamines and their Complexes with Metal Salts” en la revista *Journal of the American Chemical Society*;⁷ Park y Simmons, quienes trabajaban en la misma compañía que Pedersen, enviaron su primer artículo sobre los complejos formados por receptores bicíclicos de diamonio con cloruro titulado “Macrobicyclic Amines. III. Encapsulation of Halide ions by in-1, (k+2)-diazabicyclo[k.l.m]alkane ammonium ions” a la misma revista en noviembre del mismo año.⁸ Este tipo de receptores jaula fueron llamados catapinados tomados del término griego que describe el encapsulamiento de las especies aniónicas al interior de la cavidad macrocíclica. Sin embargo, las investigaciones sobre los éteres corona avanzaron rápidamente y su química fue ampliamente explorada, mientras que los estudios de la química de coordinación aniónica permanecieron en su etapa inicial y no fueron desarrollados hasta que Jean Marie Lehn y sus colaboradores retomaron este punto a finales de los 70s y comienzos de los 80s.⁹ Estas iniciativas fueron seguidas por un reducido número de grupos.¹⁰ Actualmente, se ha incrementado el número de grupos de investigación y los artículos científicos que realizan estudios en relación a los aniones.¹¹

Dentro del reconocimiento molecular, la detección de aniones fosfatados tales como los nucleótidos de adenina (AMP, ADP, ATP), fosfato y pirofosfato, así como los dicarboxilatos, ha cobrado gran interés en la comunidad científica durante los últimos 30 años debido a su importancia en los sistemas biológicos. En este sentido, en la sección de *Antecedentes*, se

⁷ Pedersen, C.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017-7036.

⁸ Park, C.H., Simmons, H.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2431-2432.

⁹ a) Graf, E., Lehn, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 6403-6405. b) Lehn, J.-M., Sonveaux, E., Willard, A.K. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4914-4916. c) Dietrich, B., Hosseini, M.W., Lehn, J.-M., Sessions, R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1282-1283. d) Peter, F., Gross, M., Hosseini, M.W., Lehn, J.-M., Sessions, R.B. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, *20*, 1067-1069. e) Hosseini, M.W., Lehn, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3525-3527. f) Kintzinger, J.-P., Lehn, J.-M., Kauffman, E., Dye, J.L., Popov, A.I. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7549-7553. g) Peter, F., Gross, M., Hosseini, M.W., Lehn, J.-M., *J. Electroanal. Chem.* **1983**, *144*, 279-292.

¹⁰ a) Schmidtchen, F. P., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl. Engl.* **1977**, *16*, 720-721. b) Kimura, E., Sakonaka, A., Yatsunami, T., Kodama, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3041-3045. c) Kimura, E., *Top. Curr. Chem.* **128**, **1985**, 113-141. d) Schmidtchen, F.P., Muller, G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, *16*, 1115.

¹¹ a) Seel, C., Galan, A., De Mendoza, J. *Top. Curr. Chem.* **1995**, *175*, 101. b) Gale, P.A., *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *213*, 79. c) Beer, P.D., Hayes, E.J. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 167. d) Vilar, R., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 1460. e) Llinares, J.M., Powel, D. I., Bowman-James, K. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 57. f) Kubik, S., Reyheller, C., St̄uwe, S. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **2005**, *52*, 137. g) *Top. Curr. Chem.* **2005**, *255* (special issue in anion sensing).

darán ejemplos de receptores sintéticos, naturales y semisintéticos reportados para el reconocimiento molecular de aniones fosfatados.

El uso de compuestos naturales como receptores en el reconocimiento molecular tiene la ventaja de evitar procedimientos sintéticos muy laboriosos para su diseño. Previamente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que algunos compuestos naturales tales como los alcaloides de isoquinolina,¹² antibióticos peptídicos¹³ y aminoglucósidos¹⁴ pueden ser exitosamente empleados para el reconocimiento molecular de huéspedes de bajo peso molecular y biológicamente importantes. Posteriormente, se emprendió el estudio de las propiedades de reconocimiento molecular de algunos miembros de la familia de los macrólidos.

Los macrólidos (*macro*: grande y *olido*: lactona) son una amplia familia de antibióticos naturales y semisintéticos que se obtienen de diferentes cepas de *Streptomyces*. Los macrólidos cuentan con la presencia de un anillo de lactona macrocíclico de 12 a 16 miembros como núcleo principal de su estructura química. El anillo de lactona se encuentra unido mediante enlaces glucosídicos a desoxiazúcares aminados. La espiramicina es un macrólido natural de 16 miembros que contiene dos aminoazúcares llamados forosamina y micaminosa que funcionan como aminas protonadas, brindándole a la molécula carácter catiónico. Estas características convierten a la espiramicina en un posible receptor de aniones. Cabe destacar que después de un análisis bibliográfico no se hallaron investigaciones previas o artículos reportados sobre la utilización de los macrólidos como receptores en el campo del reconocimiento molecular.

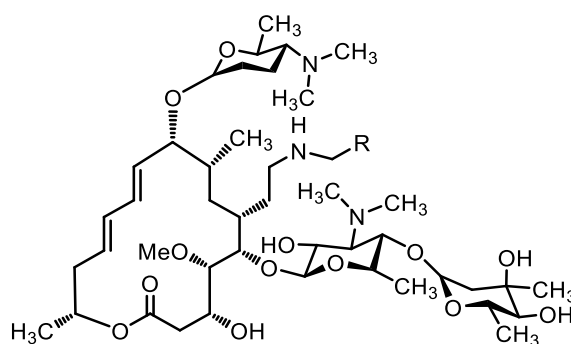
Bajo este contexto, dentro de nuestro grupo de investigación se reportó el estudio de reconocimiento molecular de espiramicina por aniones tales como los nucleótidos de

¹² Ochoa Lara, K., Godoy-Alcántar, C., Eliseev, A.V., Yatsimirsky, A.K. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1712–1718.

¹³ Godoy-Alcántar, C., León Rivera, I., Yatsimirsky, A.K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 651–654.

¹⁴ Fuentes-Martínez, J.P., Gutiérrez-Rodríguez, D., Rogel-García, E., Rivera-Márquez, K. I., Medrano, F., Torres-Ángeles, O., Castillo-Vargas, E., Duque-Montaño, B. E., Godoy-Alcántar, C. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 1449–1455.

adenina (AMP, ADP y ATP) y ácidos dicarboxílicos usando la técnica de potenciometría.¹⁵ Las constantes de asociación determinadas para los complejos de espiramicina con los nucleótidos de adenina fueron similares y en algunos casos mejores a las reportadas en el 2011 por Bianchi y col.¹⁶ en donde reportan un receptor sintético que forma complejos con los mismos nucleótidos de adenina también por potenciometría. Sin embargo, la estructura de la espiramicina carece de grupos aromáticos que le ayuden a ser estudiada mediante otras técnicas espectrofotométricas, como UV-visible, además de que dichos grupos aromáticos podrían favorecer las interacciones π - π con las unidades aromáticas presentes en los aniones antes estudiados: AMP, ADP y ATP. Para ello, se planteó que el grupo aldehído que contiene la macrolactona podría funcionar como un sitio de unión para introducir una serie de aminas aromáticas a la molécula. Bajo esta idea, se encontró que, mediante una reacción *tricomponente* de aminación reductiva entre el grupo aldehído de la espiramicina, una amina alquil aromática y triacetoxiborohidruro de sodio como agente reductor fue posible la obtención de una nueva serie de derivados de espiramicina (**Esquema 1.1**).



1a-d

- 1a:** R= Fenil
- 1b:** R= 2-Picolil
- 1c:** R= Naftil
- 1d:** R= Pirenil

Esquema 1.1. Estructuras de los receptores sintetizados en este trabajo

¹⁵ Rivera-Márquez, K. I. Tesis de maestría: *Reconocimiento Molecular de Aniones por Espiramicina*. CIQ-UAEM, Cuernavaca, Morelos, México, **2012**.

¹⁶ Arranz-Mascarós, P.; Bazzicalupi, C.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Godino-Salido, M. L.; Gutiérrez-Valero, M. D.; López-Garzón, R.; Valtancoli, B., *New J. Chem.* **2011**, *35*, 1883-1891.

En este sentido y continuando con la misma línea de investigación, en este proyecto de tesis se presenta la síntesis de los receptores **1a-d**, su caracterización completa y su aplicación en la detección de aniones de interés biológico, tales como los nucleótidos de adenina, fosfato y pirofosfato, así como algunos ácidos dicarboxílicos. Los estudios de reconocimiento molecular se realizaron utilizando diferentes técnicas como potenciometría, RMN (^1H y ^{31}P), UV-visible y calorimetría de titulación isotérmica (ITC), así como estudios de modelado computacional que soportan los resultados experimentalmente obtenidos.

Antecedentes

2. ANTECEDENTES

2.1. Características y propiedades de los aniones

Los aniones presentan características que tienen que tomarse en cuenta para preparar receptores adecuados. Primero, los aniones son grandes en comparación con los iones metálicos. Por ejemplo, F^- que es el anión más pequeño muestra un radio iónico ($r_{F^-} = 135$ pm) cercano al potasio ($r_{K^+} = 133$ pm), el cual puede ser considerado como un catión de tamaño mediano. El segundo aspecto se refiere a la variedad de formas de los aniones: esféricas (F^- , Cl^- , etc.), triangular (NO_3^- , HCO_3^- , etc.) tetraédricos (SO_4^{2-} , fosfato, ReO_4^{2-}), cuadrado plano ($PdCl_4^{2-}$, $[Pt(CN)_4]^{2-}$), octaédricos (PF_6^- , $[Fe(CN)_6]^{4-}$) o incluso formas más complejas como policarboxilatos (citrato, malonato, succinato, etc.), nucleótidos (AMP, ADP y ATP) y dinucleótidos (NAD^+ , $NADH$).

La tercera particularidad de los aniones contempla la alta energía de hidratación en comparación con los iones metálicos de densidad de carga similar. Esta característica se relaciona con su habilidad para formar puentes de hidrógeno, haciendo energéticamente más demandante su complejación en agua en relación a los iones metálicos esféricos.

Otra característica de los aniones es el intervalo de pH limitado en el que existen muchos aniones. Si los aniones son bases conjugadas de ácidos próticos, producirían procesos de protonación y sus cargas negativas dependerán de sus constantes de basicidad. Un ejemplo muy simple es proporcionado por el fosfato el cuál presenta constantes secuenciales de 11.5, 7.7 y 2.1 para su primer, segundo y tercer paso de protonación, respectivamente. Sin embargo, el fosfato solo existe como anión trivalente en un intervalo de pH muy básico mientras que a pH neutro es una mezcla de las formas divalente y monovalente. Esta propiedad puede ser utilizada ventajosamente para discriminar entre aniones de diferente basicidad.

Una última característica de interés en cuanto al diseño de receptores para aniones, es el hecho de que los aniones son especies que se coordinan fácilmente. Entonces, solo interacciones del tipo carga - carga o las fuerzas intermoleculares más o menos débiles

como los puentes de hidrógeno, apilamiento $\pi-\pi$ o los efectos hidrofóbicos pueden utilizarse para el reconocimiento de aniones.

2.3. Diseño de receptores para aniones

Para diseñar un receptor de aniones es necesario considerar que estas especies son de tamaño grande y altamente polarizables, lo cual significa que las fuerzas no direccionales tales como las interacciones de dispersión, juegan un papel significativo en el reconocimiento de aniones. Los aniones son capaces de unirse aún a moléculas neutras debido a la diferencia de carga entre el anión y el receptor. En este sentido, el receptor completo es el sitio de unión, aunque algunas de sus regiones experimenten interacciones más fuertes con el anión. Los aniones son especies coordinativamente saturadas y carecen de funcionalidades capaces de formar interacciones altamente direccionales como el puente de hidrógeno (con excepción de H_2PO_4^-). En conclusión, para diseñar un buen receptor para un grupo específico de aniones es necesario que tenga el tamaño y forma adecuado, con grupos funcionales cargados positivamente presentes en un arreglo convergente en torno al anión, complementados con grupos formadores de puente de hidrógeno que pueden proporcionar direccionalidad a la interacción y grupos capaces de establecer interacciones de tipo van der Waals que pueden envolver o encapsular al anión.

En la literatura se han reportado muchos receptores para aniones siguiendo algunos de los principios arriba enunciados. Sería imposible enumerar todos los sistemas reportados hasta la fecha y, por lo tanto, sólo se hará mención de ejemplos de receptores sintéticos, semisintéticos y naturales específicos para el reconocimiento molecular de los aniones fosfato y pirofosfato, nucleótidos de adenina y ácidos dicarboxílicos de cadena abierta.

2.4. Reconocimiento de fosfatos en la naturaleza

Los principios que se usan en el diseño de receptores sintéticos para fosfatos se derivan del análisis de lo que ocurre en los receptores naturales de fosfatos. Cerca de la mitad de todas las proteínas en los sistemas vivos están diseñadas para enlazar huéspedes fosforilados,

particularmente las proteínas kinasas y fosfatasa que regulan un amplio intervalo de procesos de señalización inter- e intracelulares.

Recientemente, Diederich y colaboradores examinaron el banco de datos de proteínas en donde identificaron cerca de 3000 estructuras de proteína que enlazan fosfatos inorgánicos y otras moléculas fosforiladas.¹⁷ Casi todos los sitios de enlace de las proteínas contienen un gran número de residuos de glicina localizadas en los fragmentos loop que permiten que el huésped fosfato esté rodeado de grupos electrostáticos y puentes de hidrógeno. Cerca de un tercio de las estructuras proteínicas estudiadas se basan principalmente en estas interacciones (sin la asistencia de quelatación metálica).

2.5. Importancia del reconocimiento de los nucleótidos y el ATP

Los nucleótidos fueron una de las primeras clases de sustratos aniónicos que fueron investigados por los pioneros del campo de la química supramolecular.¹⁸ Esto es entendible debido a la gran cantidad de implicaciones biológicas de estas moléculas. Como se sabe, los nucleótidos son los bloques de construcción del ADN y de los biopolímeros del ARN, los cuales almacenan la información genética de los organismos y permiten la construcción de las proteínas.¹⁹ El enlace de las proteínas con el trifosfato de adenosina (ATP), la unidad de cambio de la energía biológica, es uno de los eventos de reconocimiento más importantes en la naturaleza.²⁰ El ATP juega roles importantes en la transducción de la energía en los organismos y controla varios procesos metabólicos incluyendo la síntesis del ciclo del monofosfato de adenosina.

El nucleótido ATP se encuentra en todos los tipos celulares en concentraciones que varían entre 1 a 5×10^{-3} M. Es una molécula altamente cargada (a pH > 8), la estructura lineal del trifosfato le confiere cuatro cargas negativas.

¹⁷ Hirsch, A. K. H., Fischer, F. R. y Diederich, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 338.

¹⁸ a) Dietrich, B., Hosseini, M. W., y Lehn, J. -M., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1282-1283. b) Kimura, E., Kodama, M., y Yatsunami, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3182-3187.

¹⁹ Berg, J. M., Tymoczko, J. L. y Stryer, L. *Biochemistry*, W. F. Freeman and Company, 2002.

²⁰ Lipscom, W. N. y Strater, N. *Chem. Rev.*, 1996, *96*, 2375-2433.

El ATP es una molécula rica en energía porque su unidad trifosfato contiene dos enlaces fosfoanhídros. Una gran cantidad de energía se libera cuando el ATP se hidroliza a ADP y monofosfato, o cuando el ATP se hidroliza a Adenosina-Monofosfato (AMP) y pirofosfato.



El ΔG° para estas reacciones depende de la fuerza iónica del medio, así como de las concentraciones y otros iones. En el caso de las concentraciones celulares típicas, el ΔG° para esas reacciones de hidrólisis es de aproximadamente $-12 \text{ kcal mol}^{-1}$.

La energía libre generada en la hidrólisis del ATP se utiliza para que se lleven a cabo reacciones que requieren de energía libre, tal como la contracción muscular. A su vez, el ATP se forma a partir de ADP y Pi cuando las moléculas almacenadoras de energía se oxidan en los organismos quimiótrofos o cuando la luz es atrapada por los fotótrofos. Este ciclo ATP-ADP es el mecanismo fundamental de intercambio de energía en los sistemas biológicos.

La síntesis de ATP se obtiene por la fosforilación del ADP en la reacción:



La discriminación entre ATP y ADP es importante para las aplicaciones de sensores porque permite la detección de todos los procesos independientes del ATP. La detección de ADP puede utilizarse para monitorear el progreso de numerosas reacciones, incluyendo las de las ATP sintasas que producen ADP y Pi.

El complejo ATP sintasa es una enzima transmembranal que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP, un grupo fosfato y la energía suministrada por un flujo de protones (H^+). La ATP sintasa se puede imaginar como un motor molecular que produce una gran cantidad de ATP cuando los protones fluyen a través de ella. La tasa de síntesis es grande, el organismo humano en fase de reposo puede formar unas 10^{21} moléculas de ATP por segundo.

El ATP también se incorpora en los ácidos nucleicos por polimerasas en el proceso de replicación y transcripción de ADN. El ATP es el principal transportador de energía en la célula. Además, dos transportadores de electrones importantes, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y flavina adenina dinucleótido (FAD), se derivan del ATP. Por tanto, es claro que el papel del ATP en el metabolismo intermedio es fundamental.

2.6. Características de un receptor adecuado para nucleótidos

La mayoría de los receptores enlazan a los nucleótidos mediante interacciones electrostáticas entre los sitios catiónicos (grupos amonio o complejos metálicos) del receptor y los grupos polifosfatados cargados negativamente.

Considerando que la fuerza de atracción electrostática es dominante en estos complejos, es predecible que tales sensores tengan una afinidad más alta con los nucleótidos trifosfato que con los nucleótidos difosfatados, nucleótidos monofosfatados y otros aniones fosfatados tales como pirofosfato. Sin embargo, la interacción electrostática ion-ion no es direccional y adicionalmente, esta disminuye en medios con alta constante dieléctrica como el caso del agua. Por esta razón, para lograr un mejor reconocimiento del nucleótido, se debe construir un receptor multifuncional. Además de los sitios de enlace aniónico, los receptores necesitan contener otros sitios de enlace capaces de interactuar con las nucleobases y los fragmentos de azúcares.

Las interacciones con la nucleobase pueden lograrse por apilamiento π , en los cuales la distinción entre diferentes nucleobases radica en la diferencia de las energías de apilamiento o por los sitios que son capaces de formar patrones de puente de hidrógeno complementarios, los cuales favorecen el reconocimiento molecular entre las nucleobases.

2.7. Receptores sintéticos para aniones fosfatados

Los primeros receptores para fosfatos descritos en la literatura fueron los receptores macrocíclicos poliamina. El primero se reportó hace más de 30 años²¹ y su eficacia se debe en gran medida a las fuertes interacciones electrostáticas formadas entre los fosfatos negativamente cargados y los sistemas poliamonio protonados a un pH casi neutro.

Cuando las poliaminas macrocíclicas están protonadas, se enlazan fuerte y selectivamente a nucleótidos vía interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno entre los sitios de enlace catiónicos (grupos amonio) del receptor y los grupos polifosfatados del sustrato cargados negativamente.²² En consecuencia, se han reportado otros receptores sintéticos basados en grupos amonio, actuando como ácidos de Lewis por el enlace de cadenas de nucleótidos polifosfatados mediante interacciones carga-carga y de puente de hidrógeno, evolucionando a receptores más sofisticados que contienen fragmentos aromáticos que incrementan sus características de selectividad de enlace.²³

Las fuerzas electrostáticas (y de superficie - π en receptores con fragmentos aromáticos) han mostrado ser la principal contribución a la estabilidad de los complejos formados por aniones de nucleótidos con receptores sintéticos positivamente cargados, en acuerdo con la ley de Coulomb. La selectividad en el enlace del nucleótido de adenina por receptores de poliamonio en agua ha mostrado invariablemente que ocurre en el orden $ATP^{4-} > ADP^{3-} > AMP^{2-}$.²⁴ La naturaleza, sin embargo, es capaz de establecer mecanismos de reconocimiento con nucleótidos ignorando el orden establecido por la ley de Coulomb.²⁵

Adicional al importante papel de las interacciones electrostáticas, el puente de hidrógeno de las aminas también afecta a la estabilidad del complejo y su selectividad. Otros factores relevantes incluyen la forma y el tamaño del macrociclo, la metilación del nitrógeno y la coordinación metálica. La adición de fragmentos al receptor, tales como anillos aromáticos

²¹ Kimura, E., Sakonaka, A., Yatsunami, T., Kodama, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 3041–3045.

²² Marecek, J. F., Fisher, P. A. y Burrows, C. J. *Tet. Lett.* **1988**, *29*, 6231–6234.

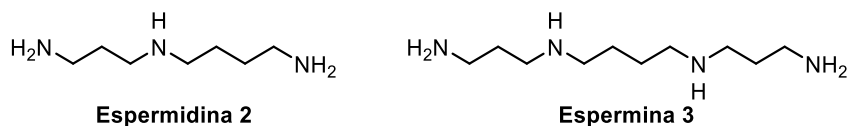
²³ Bazzicalupi, C., Bencini, A., Lippolis, V. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3709–3728.

²⁴ Kimura, E., Kodama, M., Yatsunami, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3182–3187.

²⁵ Wang, H., Oster, G. *Nature*, **1998**, *396*, 279–282.

y grupos amida, puede seguir incrementando la selectividad entre varias especies fosforiladas.

Los primeros receptores sintéticos para fosfato descritos en la literatura fueron cationes poliazas macrociclos. Los estudios en la complejación de aniones usando este tipo de compuestos poliazas fueron inspirados en las propiedades de reconocimiento de aniones de algunas poliaminas presentes en la naturaleza, tales como la espermidina **2** y la espermina **3** (**Esquema 2.1**).²⁶ Estos compuestos precipitan el ADN y protegen este polianión de la desnaturalización por calor o daño por corte; los efectos estabilizadores se atribuyen a la neutralización de las cargas negativas en los grupos fosfato del ADN por las formas policatiónicas de los compuestos poliazas. En este sentido, la ventaja de los átomos de nitrógeno en los macrociclos de poliazas es su capacidad para actuar como donadores o aceptores de enlaces de hidrógeno dependiendo de si están protonados o no.

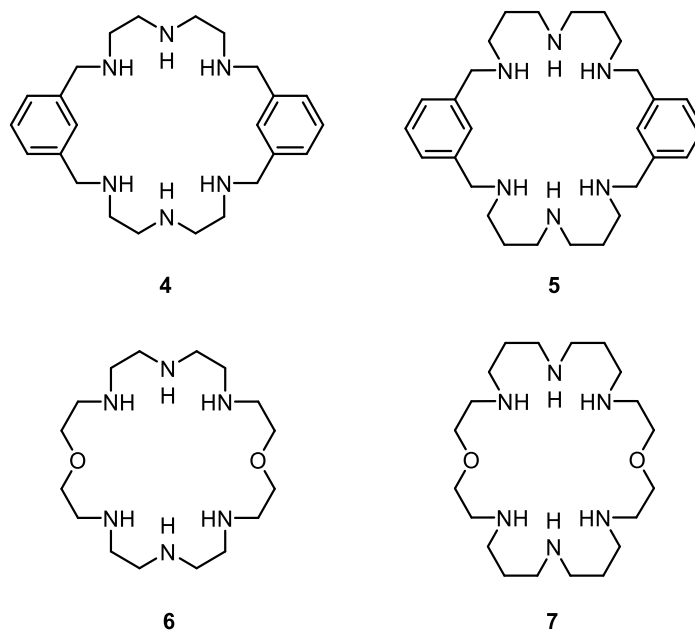


Esquema 2.1. Estructuras de poliaminas naturales.²⁶

Se han sido descritos numerosos macrociclos de tipo poliazas que muestran afinidad por los fosfatos inorgánicos, algunos ejemplos representativos de ellos son los compuestos **4-7** (**Esquema 2.2**).²⁷

²⁶ (a) Lahti, R.; Hannukainen, R.; Lonnberg, H. *Biochem. J.* **1989**, *259*, 55-59. (b) Kubik, S. en: Bowman-James, K.; Bianchi, A.; García-España, E. (Eds.), *Anion Coordination Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2012**, p. 363.

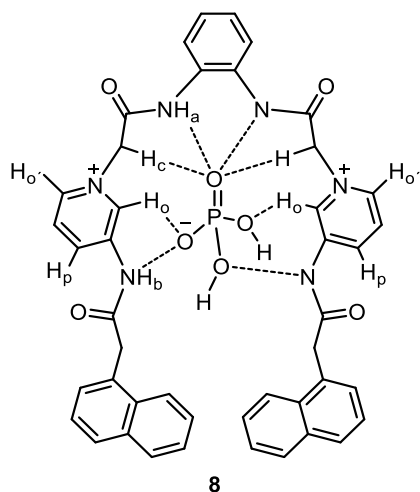
²⁷ García-España, E.; Díaz, P.; Llinares, J. M.; Bianchi, A. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2952-2986.



Esquema 2.2. Ejemplos de compuestos poliaza macrocíclicos.²⁷

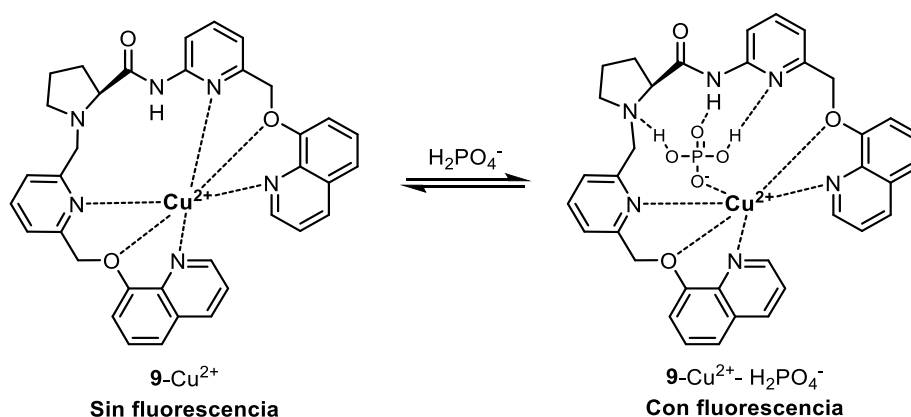
Por otra parte, Ghosh y col. recientemente reportaron la *bis*-amida **8** con fragmentos piridinio en su estructura capaz de reconocer el anión dihidrógenofosfato (H_2PO_4^-) utilizando una mezcla H_2O - MeCN (1:1), formando interacciones de tipo carga-carga y de puente de hidrógeno, así como interacciones $\pi - \pi$ entre los grupos naftilo presentes en el receptor.²⁸ El valor del logaritmo de la constante de asociación ($\log K_a$) calculada fue de 3.96 tomando en cuenta la adición de dos equivalentes del anión al receptor **8**. Adicionalmente, a partir de un estudio de titulación por RMN ^1H (DMSO) se propone que la unión entre el receptor **8** con el anión H_2PO_4^- ocurre como se muestra en el **Esquema 2.3**, lo cual se respalda por los desplazamientos a campo bajo de los protones H_a , H_b , H_c , H_o , H_o' y H_p , indicando que el anión se encuentra interaccionando en la cavidad formada entre la *o*-fenilendiamina y los fragmentos piridinio.

²⁸ Ghosh, K.; Saha, I. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 1397-1402.



Esquema 2.3. Especie propuesta para la interacción entre el receptor **8** con H_2PO_4^- .²⁸

Por otro lado, Goswami y col. utilizaron el complejo quiral **9**- Cu^{2+} como quimiosensor fluorescente selectivo para la detección de H_2PO_4^- .²⁹ Mediante estudios por fluorescencia se observó que el espectro de emisión (a 398 nm) del receptor **9**- Cu^{2+} aumenta drásticamente en presencia de H_2PO_4^- mientras que con otros aniones (I^- , Br^- , Cl^- , F^- , AcO^- , PO_4^{3-} , NO_3^-) no se observa un cambio notable, determinándose un $\log K_a = 4.52$ para el complejo **9**- Cu^{2+} - H_2PO_4^- . La notable selectividad del receptor **9** hacia H_2PO_4^- en fluorescencia se debe a una propuesta de encapsulación del anión dentro de la cavidad creada en el receptor macrocíclico preorganizado (**Esquema 2.4**).

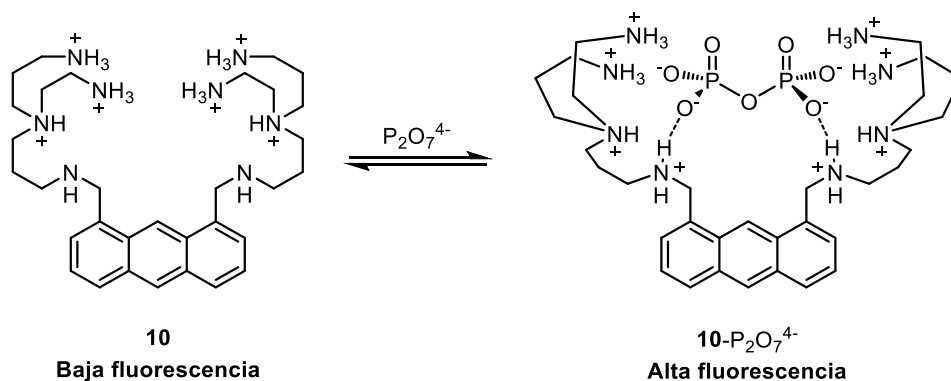


Esquema 2.4. Estructura propuesta para el complejo **9**- Cu^{2+} - H_2PO_4^- .²⁹

²⁹ Goswami, S.; Sen, D.; Das, N. K. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6707-6710.

Entre los aniones fosfatados, el pirofosfato ($\text{PPi} = \text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) es un anión tetrabásico biológicamente importante porque no sólo es el producto de la hidrólisis del ATP bajo condiciones celulares, sino también porque participa en la secuenciación/replicación del ADN en tiempo real.³⁰ Su detección está siendo investigada para el tratamiento del cáncer,³¹ y en pacientes con cristales de pirofosfato de calcio deshidratado (CPPD)³² y condrocalcinosis por su alto nivel de PPi en el líquido sinovial.³³ En este sentido, la detección y discriminación de este importante anión en un medio acuoso o semiacuoso requiere el diseño adecuado de un receptor.

Entre los diferentes métodos para la detección de PPi, el diseño de quimiosensores fluorescentes, así como sensores colorimétricos han atraído considerable atención durante los últimos 15 años.³⁴ Uno de los trabajos pioneros en la detección de PPi fue en 1994 reportado por Czarnik y col. El receptor **10** basado en un antraceno con grupos poliamina se evaluó como quimiosensor para PPi en medio acuoso 100%. Su interacción con PPi se dio con un aumento en la fluorescencia y una complejación 1:1 con una afinidad $\log K_a = 5.53$ a pH 7.0 (HEPES 0.05 M), mostrando una selectividad pirofosfato/fosfato de 2200 veces al mismo pH (**Esquema 2.5**).³⁵



Esquema 2.5. Esquema de representación del receptor **10** con PPi.³⁵

³⁰ Lee, D.-H.; Hong, J.-I. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2008**, *29*, 497-498.

³¹ Xu, S.; He, M.; Yu, H.; Cai, X.; Tan, X.; Lu, B.; Shu, B. *Anal. Biochem.* **2001**, *299*, 188-193.

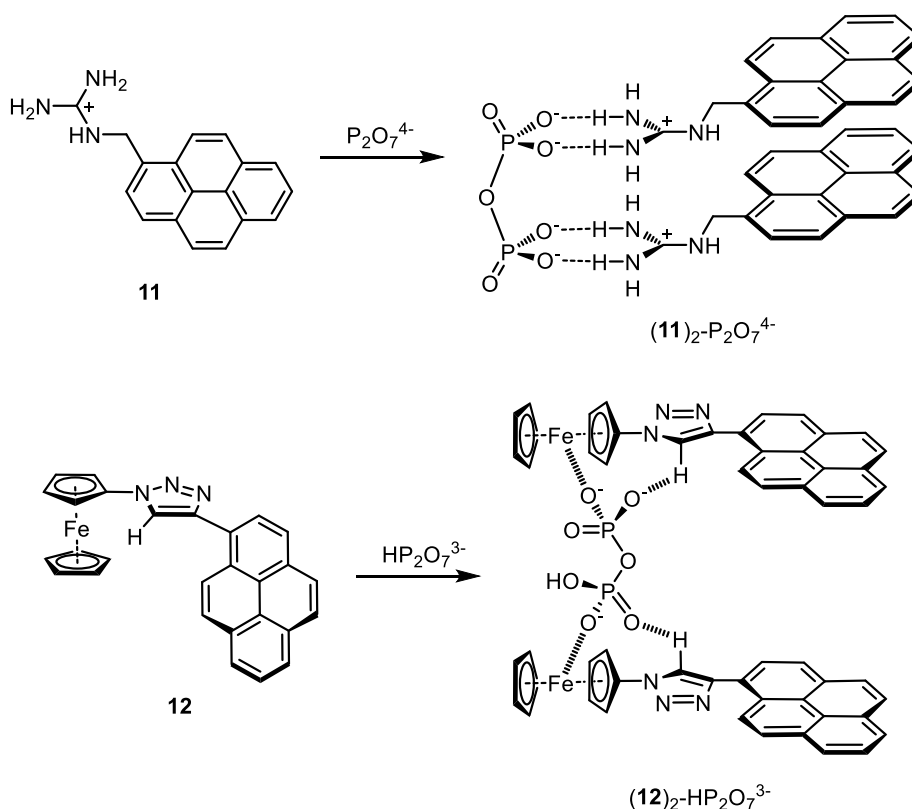
³² Doherty, M.; Becher, C.; Regan, M.; Jones, A.; Ledingham, J. *Ann. Rheum. Dis.* **1996**, *66*, 432-436.

³³ Timms, A. E.; Zhang, Y.; Russell, R. G.; Brown, M. A. *Rheumatology* **2002**, *41*, 725-729.

³⁴ Kim, S. K.; Lee, D. H.; Hong, J.-I.; Yoon, J. *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 23-31.

³⁵ Vance, D. H.; Czarnik, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9397-9398.

Otro tipo de receptores con sitios de enlace de hidrógeno para detectar PPI se han basado en estructuras de tipo calix-pirroles con grupos tiourea,³⁶ dipirrolil quinoxalinas,³⁷ o quimiosensores basados en unidades de pireno.³⁸ Por ejemplo, el compuesto **11** que incorpora una unidad de pireno con grupos guanidinio, mediante estudios de RMN ¹H (CD₃OD) muestra una selectividad por PPI con un log $K_a = 4.11$ formando el complejo **(11)**₂•P₂O₇⁴⁻,³⁹ mientras que el receptor **12**, con subunidades de pireno y ferrocenilo conectadas por un 1,2,3-triazol, forma el complejo **(12)**₂•HP₂O₇³⁻ con un logaritmo de la constante de asociación de log $K_a = 8.74$ mediante estudios de UV-vis en CH₂Cl₂ (**Esquema 2.6**).⁴⁰



Esquema 2.6. Interacción de receptores basados en pireno con PPI.^{39, 40}

³⁶ Anzenbacher, P., Jr.; Jursikova, K.; Sessler, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9350-9351.

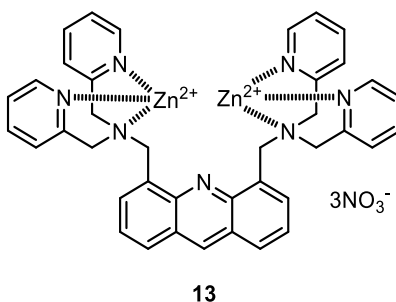
³⁷ Aldakov, D.; Palacios, M. A.; Anzenbacher, P., Jr. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 5238-5241.

³⁸ Karuppannan, S.; Chambron, J.-C. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 964-984.

³⁹ Nishizawa, S.; Kato, Y.; Teramae, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9463-9464.

⁴⁰ Romero, T.; Caballero, A.; Tarraga, A.; Molina, P. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3466-3469.

Entre varios diseños, los complejos de iones metálicos también se han establecido como sitios de unión ideales para el reconocimiento de PPI en solución acuosa.⁴¹ Entre ellos, los complejos de Zn^{2+} que incorporan unidades de Dpa (dipicolilamina) son conocidos por mostrar una fuerte afinidad de unión por aniones fosfatados en solución acuosa.⁴² Por ejemplo, el receptor **13** derivado de acridina dio logaritmos de constantes de asociación de $\log K_a = 7.68$ para PPI y un $\log K_a = 4.97$ para fosfato, mediante un apagamiento y un incremento en la fluorescencia, respectivamente (**Esquema 2.7**).⁴³



Esquema 2.7. Estructura del receptor **13**.⁴³

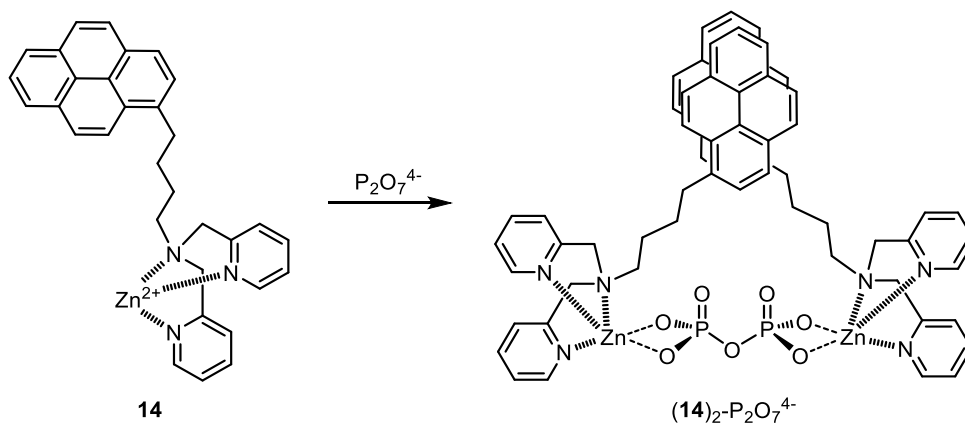
Por otra parte, una de las características más interesantes de los derivados de pireno es su capacidad para formar excímeros y su habilidad para producir fluorescencia dual de monómero-excímero. Por ejemplo, Hong y col. reportaron que la interacción del compuesto **14**, basado en una estructura de tipo pireno-Zn (Dpa), con PPI dio un logaritmo de la constante de asociación $\log K_a = 5$ en solución acuosa a pH 7.4 (buffer HEPES 0.01 M), exhibiendo un fuerte y selectivo excímero formando el complejo $(\mathbf{14})_2\text{-P}_2\text{O}_7^{4-}$ en una relación 2:1 (**Esquema 2.8**) de acuerdo con el gráfico de Job.⁴⁴

⁴¹ (a) Lee, D. H.; Im, J. H.; Son, S. U.; Chung, Y. K.; Hong, J.-I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7752-7753. (b) Mesquita, L. M.; André, V.; Esteves, C. V.; Palmeira, T.; Berberan-Santos, M. N.; Mateus, P.; Delgado, R. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 2212-2219. (c) Liu, X.; Smith, D. G.; Jolliffe, K. A. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 8463-8466. (d) Lee, D. H.; Im, J. H.; Son, S. U.; Chung, Y. K.; Hong, J.-I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7752-7753. (e) Datta, B. K.; Mukherjee, S.; Kar, C.; Ramesh, A.; Das, G. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8369-8375. (f) Jang, Y. J.; Jun, E. J.; Lee, Y. J.; Kim, Y. S.; Kim, J. S.; Yoon, J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9603-9606.

⁴² (a) Tamaru, S.-i.; Hamachi, I. *Struct. Bond.* **2008**, *129*, 95-125. (b) Ojida, A.; Mitooka, Y.; Inoue, M.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6256-6258.

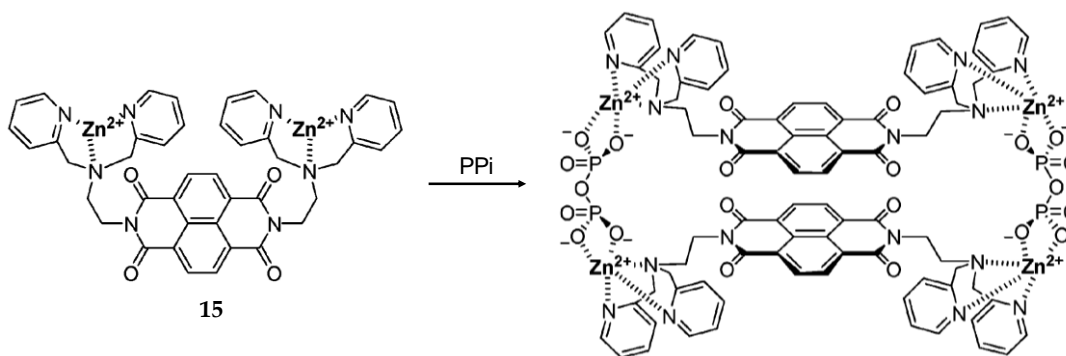
⁴³ Lee, H. N.; Swamy, K. M. K.; Kim, S. K.; Kwon, J.-Y.; Kim, Y.; Kim, S.-J.; Yoon, Y. J.; Yoon, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 243-246.

⁴⁴ Cho, H. K.; Lee, D. H.; Hong, J.-I. *Chem. Commun.* **2005**, 1690-1692.



Esquema 2.8. Interacción del receptor **14** con $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ en solución acuosa.⁴⁴

Posteriormente, Yoon y col. extrapolaron la misma técnica empleando el derivado de naftalendiimida **15** como quimiosensor para PPI en solución acuosa al 100%, en donde mediante cambios en la emisión de fluorescencia del complejo **15** por la interacción con el anión PPI a pH 7.4 (HEPES 0.01 M) se determinó un $\log K_a = 5.61$. Este quimiosensor mostró un pico excimérico a 490 nm únicamente en presencia de PPI. La detección hacia PPI por este receptor fue selectiva sobre ATP o PO_4^{3-} . La interacción de PPI con cuatro sitios de zinc, así como interacciones de tipo $\pi-\pi$ entre dos unidades naftalendiimida, inducen a la formación del excímero de tipo 2 + 2 mostrado en el **Esquema 2.9**.⁴⁵



Esquema 2.9. Propuesta de la unión entre el complejo **15** con PPI.⁴⁵

⁴⁵ Lee, H. N.; Xu, Z.; Kim, S. K.; Swamy, K. M. K.; Kim, Y.; Kim, S.-J.; Yoon, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3828–3829.

2.8. Receptores para nucleótidos de fosfato

Los nucleótidos son los bloques de construcción del ADN y biopolímeros de ARN, los cuales almacenan la información genética de los organismos y proporcionan el modelo de construcción para proteínas.⁴⁶ La unión de ATP por proteínas es uno de los eventos de reconocimiento más importantes en la naturaleza. El ATP juega un papel importante en la transducción de energía en organismos y controla varios procesos metabólicos incluyendo la síntesis de monofosfato de adenosina cíclico.⁴⁷ Además, el ATP es incorporado a los ácidos nucleicos por polimerasas en los procesos de replicación y transcripción del ADN.⁴⁸ Dada la importancia biológica de estas moléculas, no es de sorprenderse que los nucleótidos hayan sido de las primeras clases de sustratos aniónicos investigados por los pioneros de la química supramolecular.⁴⁹

Desde un punto de vista histórico, las poliaminas protonadas fueron la primera clase de receptores utilizados para la unión con nucleótidos. Los grupos de Lehn⁵⁰ y Kimura⁵¹ proporcionaron evidencias iniciales de la fuerte interacción que se produce entre los receptores de poliamonio y los nucleótidos ATP, ADP y AMP. Adicionalmente, en el diseño de nuevos receptores para el reconocimiento de aniones de fosfato, se ha explorado ampliamente el uso de grupos funcionales tales como ureas, tioureas, amidas y unidades de pirrol.

Por ejemplo, Gunnlaugsson y col. reportaron, mediante espectros de absorbancia, que la *bis*-amidotiourea **16** es capaz de reconocer ADP sobre ATP en DMSO-H₂O (4:1), presentando un $\log K_{ADP} = 3.77$, mientras que para el AMP no fue posible obtener una constante a partir del ajuste de regresión lineal y el ATP no presentó interacción favorable. Por otro lado, el

⁴⁶ Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*, W. F. Freeman & Company, **2002**.

⁴⁷ Le, D. H.; Kim, S. Y.; Hong, J.-I. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4777-4780.

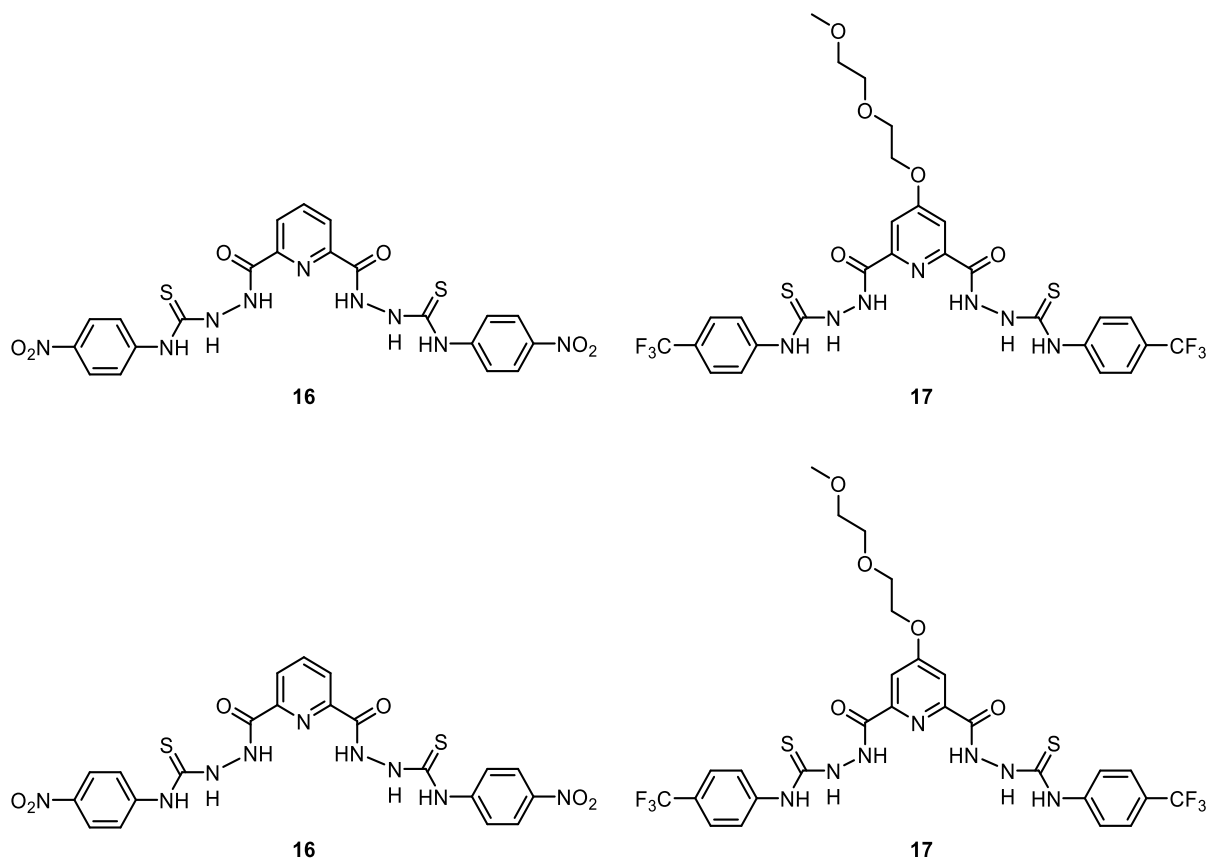
⁴⁸ a) Kornberg, A. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1-4. b) Shen, X.; Mizuguchi, G.; Hamiche, A.; Wu, C. *Nature* **2000**, *406*, 541-544.

⁴⁹ García-España, E.; Belda, R.; González, J.; Pitarch, J.; Bianchi, A. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, John Wiley & Sons, Ltd., **2012**.

⁵⁰ Dietrich, B.; Hosseini, M. W.; Lehn, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1282-1283.

⁵¹ Kimura, E.; Kodama, M.; Yatsunami, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3182-3187.

receptor **17** de estructura muy similar es capaz de reconocer AMP sobre ADP en EtOH-H₂O (1:1) con valores de $\log K_{AMP}=4.02$ y $\log K_{ADP}=3.63$ (**Esquema 2.10**).⁵²



Esquema 2.10. Receptores de tipo *bis*-amidotiourea como receptores para AMP.⁵²

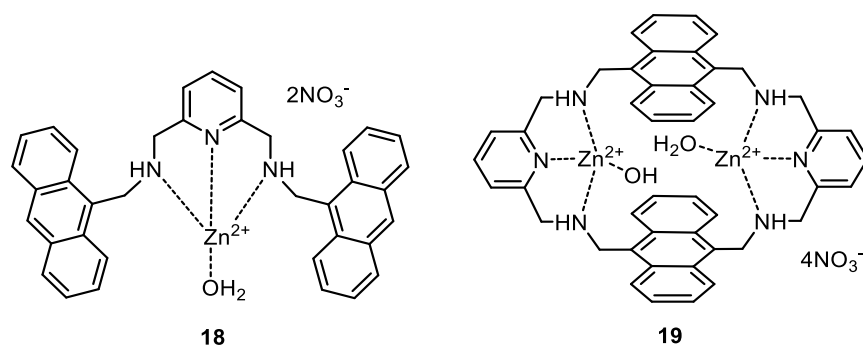
La discriminación entre ADP y ATP es importante porque permite la detección de todos los procesos biológicos dependientes del ATP. Por ejemplo, la detección de ADP podría usarse para controlar el progreso de numerosas reacciones, incluidas las de las ATPasas que producen ADP y Pi, y quinasas que producen ADP y un producto fosforilado.⁵³

Bajo este contexto, Feng y col. reportaron en 2013 el complejo mononuclear de Zn²⁺ **18** con dos unidades de antraceno, el cual resultó ser selectivo para la detección de ADP, discriminando otros aniones como ATP, AMP y PPI. Su interacción con ADP dio un $\log K =$

⁵² (a) Duke, R. M.; O'Brien, J. E.; McCabe, T.; Gunnlaugsson, T. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4089-4092. (b) Duke, R. M.; McCabe, T.; Schmitt, W.; Gunnlaugsson, T. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 3115-3126.

⁵³ Xu, Z.; Spring, D. R.; Yoon, J. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2114-2122.

6.04 en solución acuosa H₂O-DMSO (75:25) a pH 7.2 (HEPES 0.01 M).⁵⁴ Posteriormente, el mismo grupo describió el complejo macrocíclico dinuclear de Zn²⁺ **19** y evaluaron su capacidad en el reconocimiento de aniones como ATP, ADP, AMP, PPi y fosfato, entre otros. Entre ellos, se encontró que el ADP indujo el más grande cambio en la fluorescencia del complejo, mientras que el ATP mostró la constante de afinidad más fuerte. El ciclofano **19** mostró la selectividad ATP>ADP>PPi>AMP >>fosfato en solución acuosa a pH a pH 7.2 (HEPES 0.01 M). Los logaritmos de las constantes de asociación (log K_a) calculadas para los distintos aniones fueron de 6.30 (ATP), 5.59 (ADP), 4.95 (PPi) y 6.5 (AMP) (**Esquema 2.11**).⁵⁵



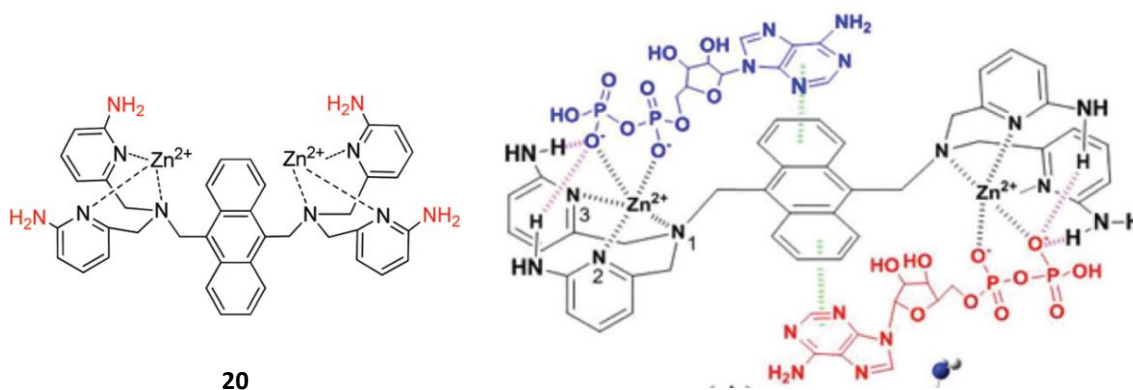
Esquema 2.11. Receptores para nucleótidos de adenina basados en antraceno.^{54, 55}

Continuando con el uso de complejos metálicos de Zn²⁺, recientemente Feng y col. reportaron el compuesto **20** como el primer complejo de *bis*-(Zn-Dpa) selectivo para ADP con un log K_a = 6.60. La capacidad de detección del complejo **20** fue investigada en solución acuosa al 100% a pH 7.2 (HEPES 0.01 M). Su interacción con ADP resultó en una mejora en la fluorescencia 133 veces mayor con respecto a la del complejo, mientras que con ATP sólo se incrementó 56 veces. El patrón de unión del compuesto **20** con ADP se investigó mediante un gráfico de Job el cual arrojó una estequiometría 2:1 (**Esquema 2.12**), formando el complejo **20**•(ADP)₂.⁵⁶

⁵⁴ Shi, L.; Hu, P.; Ren, Y.; Feng, G. *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 11704-11706.

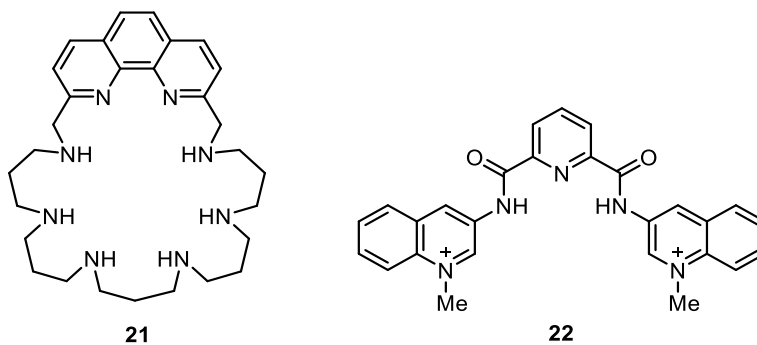
⁵⁵ Hu, P.; Yang, S.; Feng, G. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3701-3706.

⁵⁶ Huang, F.; Hao, G.; Wu, F.; Feng, G. *Analyst* **2015**, *140*, 5873-5876.



Esquema 2.12. Modo de interacción del complejo **20** con ADP.⁵⁶

En particular, el reconocimiento y la detección de ATP por fluorescencia han llamado mucho la atención en los últimos años. En este sentido, Bencini y col. reportaron el compuesto **21** basado en fenantrolina con grupos poliamonio como un receptor capaz de detectar ATP sobre otros nucleótidos trifosfatados (CTP, GTP, TTP) en medio acuoso a pH 6 mediante un efecto de apagamiento de la fluorescencia.⁵⁷ Mientras que el receptor de tipo *bis*-quinolinio-piridin-2,6-dicarboxamida **22** también es capaz de reconocer el anión ATP en solución acuosa a pH 6.5 (MOPS 0.01 M) con una afinidad de $\log K_a = 3.73$ (**Esquema 2.13**).⁵⁸



Esquema 2.13. Receptores aromáticos para el reconocimiento de ATP.^{57, 58}

⁵⁷ Bazzicalupi, C.; Biagini, S.; Bencini, A.; Faggi, E.; Giorgi, C.; Matera, I.; Valtancoli, B. *Chem. Commun.* **2006**, 4087–4089.

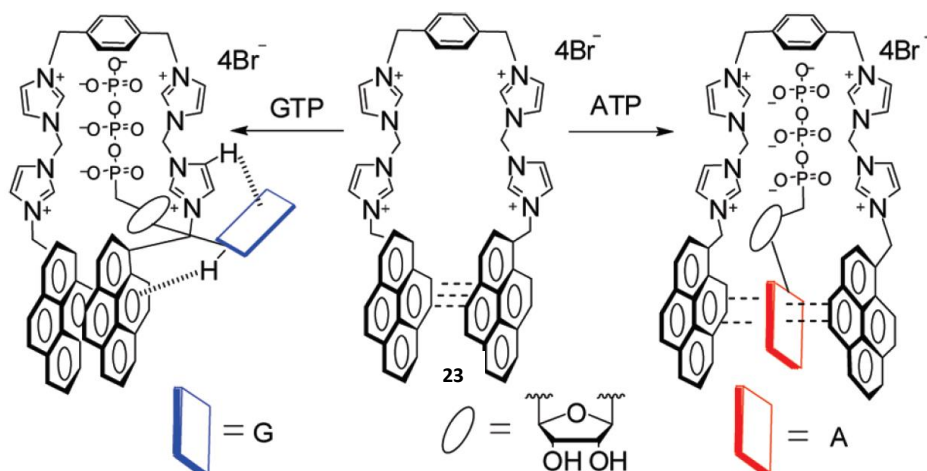
⁵⁸ Dorazco-González, A.; Flores Alamo, M.; Godoy-Alcántar, C.; Höpfl, H.; Yatsimirsky, A. K. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 455–466.

Por otro lado, la visualización por imágenes de ATP puede ofrecer información útil sobre la producción y el consumo de ATP en tiempo real en las células.⁵⁹ Yoon y col. reportaron que la disociación del excímero formado por el compuesto **23**, es la responsable del reconocimiento molecular de ATP sobre otros nucleótidos trifosfatados en buffer HEPES a pH 7.4.⁶⁰ Los autores sostienen que la selectividad del receptor **23** por ATP sobre GTP, CTP y UTP depende del hecho de que la guanina, citosina, o uracilo interactúan con el exterior del dímero ya estabilizado, por interacciones $\pi - \pi$ (pireno-pireno), provocando que se apague la fluorescencia, mientras que la adenina puede insertarse entre las dos unidades de pireno, permitiendo así un aumento en la fluorescencia (**Esquema 2.14**). A partir de los experimentos de titulación por fluorescencia, se calculó que el logaritmo de la constante de asociación por ATP es de $\log K_a = 4.01$. Además, se propone que la selectividad por ATP en comparación con ADP o AMP se atribuye a la diferencia en las interacciones electrostáticas, así como al apilamiento del anillo de adenina por parte del ATP con las unidades de pireno.

No se detectó interacción del receptor con ADP y AMP ya que los autores mencionan que la razón por la cual no establecen interacciones fuertes es por el número de grupos fosfato presentes los cuales no contribuyen del mismo modo que ATP en tamaño y carga aniónica total. El ATP con sus 3 grupos fosfato se acopla fácilmente a los grupos imidazolio mientras que ADP y AMP no lo hacen.

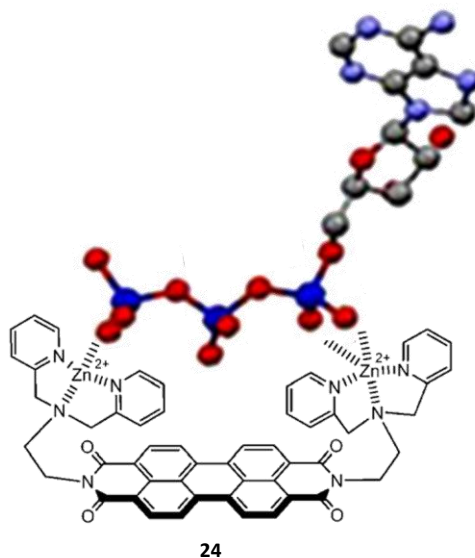
⁵⁹ (a) Berg, J.; Hung, Y. P.; Yellen, G. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 161-166. (b) Amabilino, D. B. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 275-277.

⁶⁰ Xu, Z.; Singh, N. J.; Lim, J.; Pan, J.; Ha, N. K.; Park, S.; Kim, K. S.; Yoon, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15528–15533.



Esquema 2.14. Modo de unión entre el receptor **23** con nucleótidos trifosfatados.⁶⁰

Finalmente, Yan y col. desarrollaron un nuevo quimiosensor fluorescente basado en una diimida de perileno **24** para la detección selectiva de ATP sobre otros aniones fosfatados (GTP, CTP, UTP, ADP, AMP, entre otros) en solución acuosa a pH 7.4 (HEPES 0.01 M). Mediante un gráfico de relación molar por fluorescencia combinado con un experimento por masas (ESI-TOF) se determinó una estequiometría 1:1 entre el complejo **24** y ATP (**Esquema 2.15**).⁶¹

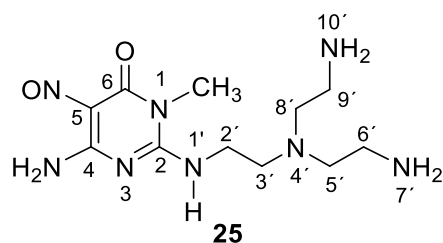


Esquema 2.15. Propuesta de interacción entre el quimiosensor **24** con ATP.⁶¹

⁶¹ Yan, L.; Ye, Z.; Peng, C.; Zhang, S. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2725-2727.

A pesar de que se han reportado varios receptores sintéticos para el reconocimiento molecular de aniones fosfatados, las desventajas de su diseño y síntesis son sus altos costos de producción debido al uso de reactivos químicos económicamente caros requiriendo de varios pasos de reacción, así como también la implicación de tiempos largos de reacción. Es por ello, que otra alternativa de receptores que no requieren de altos costos o tiempos largos para su obtención, es el uso de receptores naturales, los cuales debido a su estructura presentan los grupos químicos o el arreglo necesarios para llevar a cabo un reconocimiento molecular.

Recientemente el grupo de Bianchi y colaboradores reportaron el enlace del ATP y ADP a un ligando polifuncional **25** constituido por una molécula tren (tris(2-aminoetil)amina) funcionalizada con un residuo de pirimidina (**Esquema 2.16**) en solución acuosa mediante potenciometría, mostrando que la acción sinérgica de los diferentes grupos enlazantes de este ligando prefiere la interacción con ADP sobre ATP en agua. Se demostró que la interacción apilamiento- π entre el residuo de pirimidina del ligando y el grupo purina del nucleótido contribuye significativamente a este particular proceso de reconocimiento.⁶²



Esquema 2.16. Receptor sintético **25** para la interacción de nucleótidos de purina.⁶²

Se estudió la interacción de **25** con ATP, ADP y AMP al igual que los aniones pirofosfato ($P_2O_7^{4-}$) y fosfato (PO_4^{3-}). Los logaritmos de K_a de la forma tetraprotonada del receptor fueron de 3.84 (ATP), 5.70 (ADP), 2.39 (AMP), 4.93 (PO_4^{3-}) y finalmente para $P_2O_7^{4-}$ con la forma triprotonada del receptor de 5.6.

⁶² Mascaros, P. A., Bazzicalupi, C., Bianchi, A., Giorgi, C., Gutiérrez-Valero, M.D., López-Garzón, R., Godino-Salido, M.L., Valatancoli, B. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2814-2816.

Es de esperarse que el enlace de aniones por las cargas positivas de los receptores sea controlado por las fuerzas electrostáticas. Sin embargo, el resultado más llamativo de la interacción con las formas protonadas de **25** con los tres nucleótidos es la evidente habilidad del receptor para reconocer ADP^{3-} sobre AMP^{2-} y ATP^{4-} . Este es el primer receptor sintético capaz de realizar una fuerte discriminación en el enlazamiento de ADP^{3-} sobre ATP^{4-} .

2.9. Receptores naturales y semisintéticos para aniones fosfatados

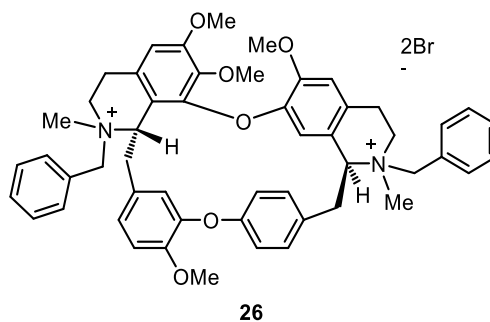
La naturaleza nos provee de una gran cantidad de compuestos bioactivos, que a menudo se producen en mezclas complejas. La química supramolecular puede ayudar a analizar y clasificar estos compuestos, usándolos de forma adecuada en distintas aplicaciones medicinales. La complejación de compuestos naturales puede proporcionar una idea de los mecanismos de interacción importantes de los sistemas biológicos.⁶³ En este sentido, el uso de compuestos naturales y sus derivados como receptores sintéticos es muy prometedor en el reconocimiento molecular de aniones de interés biológico, tales como los nucleótidos de adenina, carboxilatos u otra clase de aniones quirales como aminoácidos.⁶⁴

Con el propósito de mostrar una alternativa accesible a los receptores sintéticos, en 2001 Yatsimirsky y col. utilizaron el macrociclo natural tetrandrina, la cual modificaron cuaternizando los átomos de nitrógeno para obtener el receptor dicatiónico dibencilado **26**, el cual se empleó como receptor para nucleótidos de adenina (**Esquema 2.17**).⁶⁵

⁶³ Schneider, H.-J.; Agrawal, P.; Yatsimirsky, A. K. *Chem.Soc. Rev.* **2013**, 42, 6777-6800.

⁶⁴ Steed, J. W., Atwood, J. L.; Gale, P. A., *Definition and Emergence of Supramolecular Chemistry- Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, John Wiley & Sons, Ltd., **2012**.

⁶⁵ Ochoa-Lara, K.; Godoy-Alcántar, C.; León-Rivera, I.; Eliseev, A. V.; Yatsimirsky; A. K. *J. Phys. Org. Chem.* **2001**, 14, 453-462.



Esquema 2.17. Estructura de la tetrandrina dibencilada **26**.⁶⁵

Los experimentos de reconocimiento de aniones se hicieron mediante titulaciones por RMN ^1H en D_2O , determinándose un desplazamiento a campo alto de las señales de **26** inducido por la adición de los aniones. Las constantes de asociación muestran una dependencia irregular con respecto a la carga de los huéspedes, observándose una disminución en el valor de K de AMP a ADP, y posteriormente un incremento, hacia ATP. Los valores de K_1 y K_2 de AMP son muy grandes para ser interacciones puramente electrostáticas de un dianión a un monocatión. Los valores típicos de las constantes de asociación para tales pares iónicos son de 10 M^{-1} con $I = 0 \text{ M}$.⁶⁶ Las constantes de asociación más grandes para AMP indican una contribución de interacciones de apilamiento, las cuales probablemente son menos significativas para los nucleótidos que poseen cargas negativas más grandes.

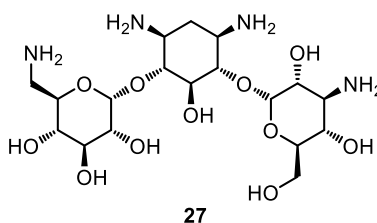
Considerando la formación de los complejos 1:1 y 1:2 entre **26** y AMP, en donde el dianión aparentemente se enlaza solo a uno de los anfitriones amonio, se asume también que tanto el ADP como el ATP se enlazan sólo a uno de los grupos amonio, pero la formación de complejos 1:2 para estos aniones es desfavorable debido a la repulsión mutua de huéspedes altamente cargados. En la **Tabla 2.1** se muestran los valores de las constantes de enlace de **26** hacia los nucleótidos.

⁶⁶ Cascio, S.; De Robertis, A.; De Stefano, C.; Foti, C.; Gianguzza, A.; Sammartano, S. *J. Chem. Eng. Data*, **2000**, *45*, 717.

Tabla 2.1. Constantes de enlace de **26** con nucleótidos de adenina.⁶⁵

Anión	log <i>K</i>
AMP²⁻	1.68 ± 0.84
	1.74 ± 1.0
ADP³⁻	1.60 ± 0.55
ATP⁴⁻	2.04 ± 0.92

Posteriormente, en el 2010, nuestro grupo de investigación demostró que la kanamicina A **27**, una poliamina natural, enlaza aniones fosfatados y puede discriminar entre nucleótidos de trifosfato con diferentes nucleobases (**Esquema 2.18**).⁶⁷

**Esquema 2.18.** Estructura química de la Kanamicina A **27**.⁶⁷

La **Tabla 2.2** muestra los logaritmos de las constantes de asociación de la kanamicina A tetraprotonada con la forma aniónica de los diferentes aniones fosfatados. Se puede resaltar que el pirofosfato presenta mayores constantes de asociación incluso que ATP cuando la kanamicina A se encuentra en los grados de protonación más altos. Las interacciones con ADP³⁻ y ATP⁴⁻ son progresivamente fuertes en relación al aumento de la carga negativa del huésped.

Tabla 2.2. Logaritmos de la constante de asociación de nucleótidos y PPI con kanamicina A, 25°C en NaCl 0.1 M.⁶⁷

Anión	log <i>K</i>
Pirofosfato	5.30 ± 0.09
ATP⁴⁻	4.15 ± 0.05
ADP³⁻	3.41 ± 0.05
AMP²⁻	2.47 ± 0.05

⁶⁷ Fuentes-Martínez, Y.; Godoy-Álcanzar, C.; Medrano, F.; Dikiy, A.; Yatsimirsky, A. *Supramol. Chem.* **2010**, *22*, 212-220.

La discriminación entre ATP^{4-} , ADP^{3-} y AMP^{2-} es principalmente por cargas y el fuerte enlace de ATP^{4-} en comparación con el pirofosfato puede ser atribuido a la interacción con la nucleobase.

Más recientemente, en nuestro grupo de investigación se llevó a cabo la síntesis de cinco derivados hidrazona del aminoglucósido estreptomicina **28a-e**. Mediante estudios por potenciometría en solución acuosa a pH 7.0 y fuerza iónica 0.1 M, se encontró que el derivado **28b** presenta una mayor afinidad por AMP sobre ATP y ADP; mientras que el derivado **28c** muestra una mejor selectividad por ATP sobre ADP y AMP. Los logaritmos de las constantes de formación entre los derivados **28b-c** se resumen en la **Tabla 2.3**.⁶⁸

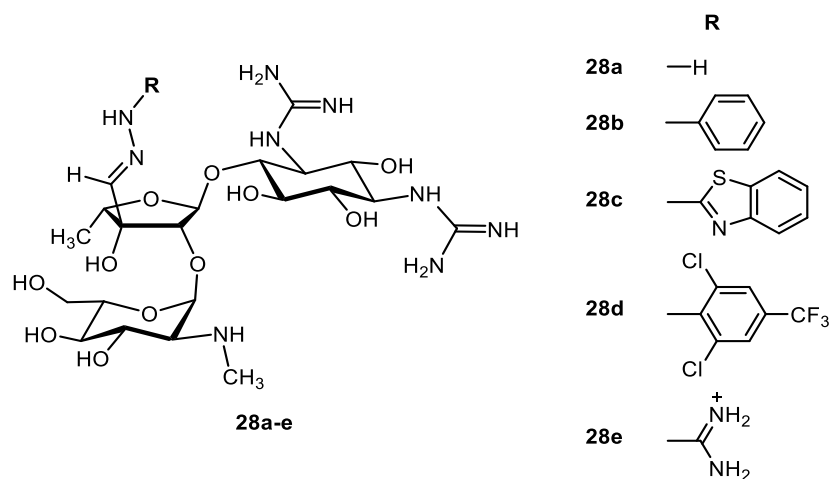


Tabla 2.3. Logaritmos de constantes de formación ($\log K$) de los derivados de estreptomicina por los nucleótidos de adenina a 25 °C y $I = 0.1 \text{ M}$.⁶⁸

Especie	$\log K$ 28b			$\log K$ 28c		
	ATP	ADP	AMP	ATP	ADP	AMP
LA^a	3.81	2.85	2.54	4.17	4.64	3.63
LHA	4.57	3.52	3.62	4.09	4.31	3.28
LH₂A	3.37	2.53	2.77	4.58	4.20	3.27
LH₃A	-	-	-	3.32	2.86	^b

^a Cargas omitidas para claridad. ^b No fue posible calcular.

⁶⁸ Fuentes-Martínez, J. P.; Gutiérrez-Rodríguez, D.; Rogel García, E.; Rivera-Márquez, K. I.; Medrano, F.; Torres-Ángeles, O.; Castillo-Vargas, E.; Duque Montaña, B. E.; Godoy-Álcantar, C. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 1449-1455.

2.10. Definición de macrólidos

Los macrólidos representan un grupo de antibióticos, los cuales son caracterizados por la presencia de un anillo de lactona macrocíclico como núcleo en su estructura química. Son agentes bacteriostáticos, aunque en determinados casos pueden tener acción bactericida actuando sobre la subunidad ribosomal 50s, interfiriendo con la síntesis proteica. Presentan buena actividad frente a cocos aerobios grampositivos y micoplasmas, algunos aerobios gramnegativos (generalmente presentan resistencia frente a éstos) y ciertos microorganismos anaerobios (su actividad se considera de favorable a buena).⁶⁹

Los macrólidos son moléculas lipofílicas que poseen como centro de su estructura un anillo de lactona de 12 a 16 átomos, pocas o ninguna ligadura doble y carecen de átomos de nitrógeno. El anillo de lactona se encuentra unido mediante enlaces glucosídicos a desoxiazúcares aminados ya sean neutros o básicos. Los compuestos con máximo potencial son aquellos con anillos de 14-, 15-, y 16 miembros, la mayoría de los cuales derivan de la eritromicina.

Se les clasifica de acuerdo al número de átomos de carbono que conforman el anillo macrocíclico, y cada grupo dentro de la familia posee características químicas y biológicas diferentes. A su vez, pueden catalogarse según su origen en naturales y semisintéticos. De acuerdo a las 2 clasificaciones mencionadas, se les agrupa como se indica en la **Tabla 2.4**.⁷⁰

⁶⁹ (a) Dámaso, D. *Macrólidos. Lincosamidas. Antibacterianos*, Ed. Marketing Pharm, S.A. Madrid, **1991**, 375-416.

⁷⁰ (a) Omura, S., Tanaka, H. *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology and Practice*, Academic Press, Orlando, **1984**.

(b) Brittain, D. *Clin. Med. Nort. Am.* **1987**, *6*, 1213-1218.

Tabla 2.4. Clasificación de los macrólidos.⁷⁰

Macrólidos		
Naturales		
14-miembros	16-miembros	
Eritromicina	Espiramicina	
Oleandomicina	Midecamicina	
Ketolida (Telitromicina, Cetromicina)	Tilosina	
Troleandomicina	Mitomicina	
	Josamicina	
	Leucomicina	
	Kitasamicina	
Semisintéticos		
14-miembros	15-miembros	16-miembros
Claritromicina	Azitromicina (azólido)	Rokitamicina
Roxitromicina	Tulatromicina (triamilida)	Miocamicina (derivado de midecamicina)
Diritromicina		Tilmicosina (derivado de tilosina)
Fluritromicina		

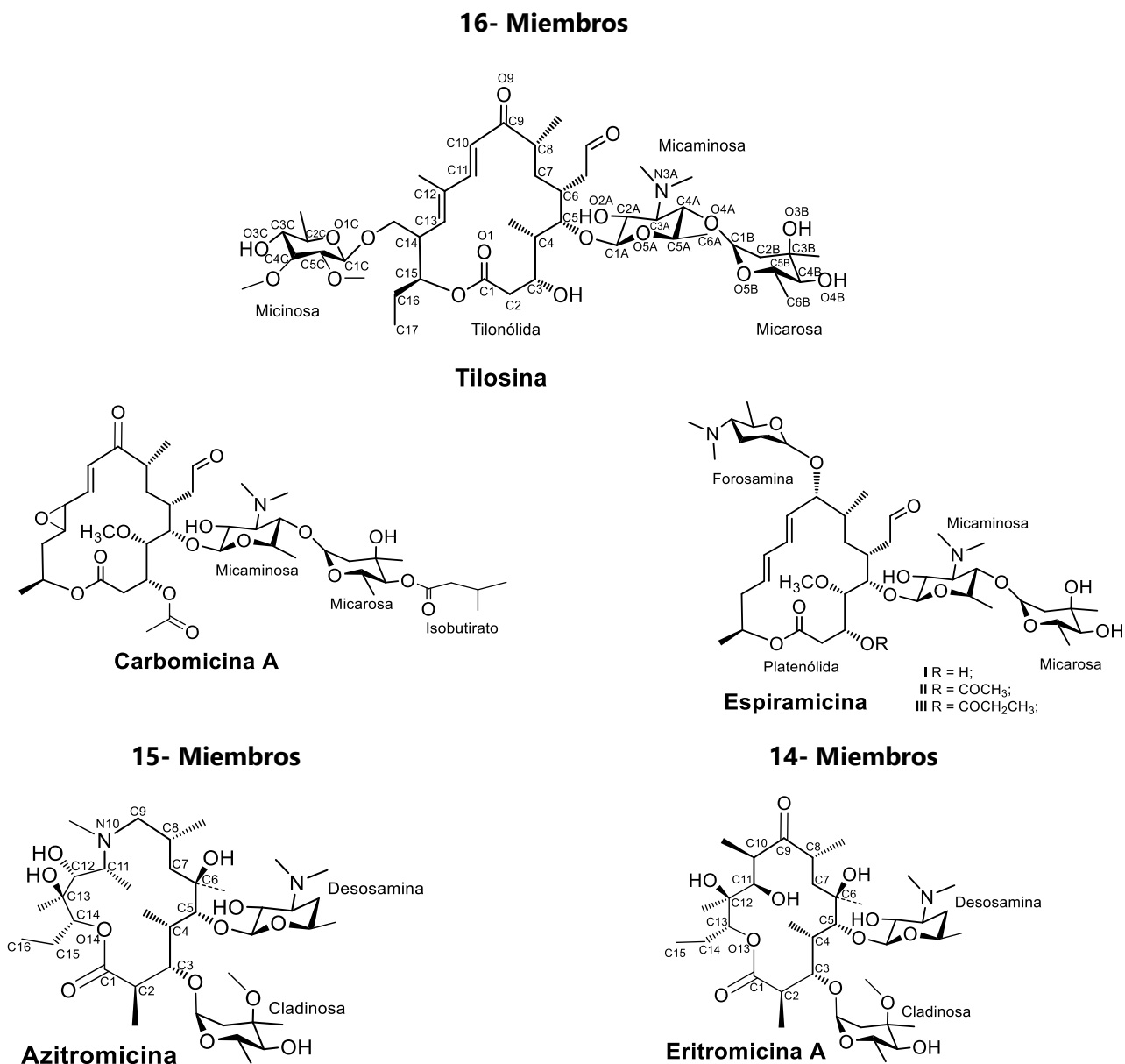
2.10.1. Mecanismo de acción de los macrólidos

Su mecanismo de acción consiste en unirse a la subunidad 50S del ARN ribosómico en forma reversible. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr. Esto provoca un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y traslocación. Los macrólidos ejercen su actividad antimicrobiana al obstaculizar la síntesis de proteínas en la bacteria a nivel ribosómico, se fijan a la unidad 50 S del mismo, e impiden la reacción de translocación en la cual la cadena del péptido en crecimiento se desplaza del sitio aceptor al donador, por esta particularidad se preescribe su combinación con otros fármacos que compitan con un sitio similar de fijación en el ribosoma, por ejemplo, con la clindamicina y el cloranfenicol. Su efecto bactericida o bacteriostático depende de su concentración, del microorganismo, del inóculo, su sensibilidad y de la fase de proliferación en que se encuentren.⁷¹

⁷¹A) Goodman, L.; Gilman, A. *The pharmacological basis of therapeutics*, 8 ed. New York: Pergamon, **1990**, 1197-1202. B) Kirst, H. A., Sides, G. D. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1983**, *33*, 1419-1422.

2.10.2. Fundamento molecular del modo de acción de los antibióticos del tipo macrólido

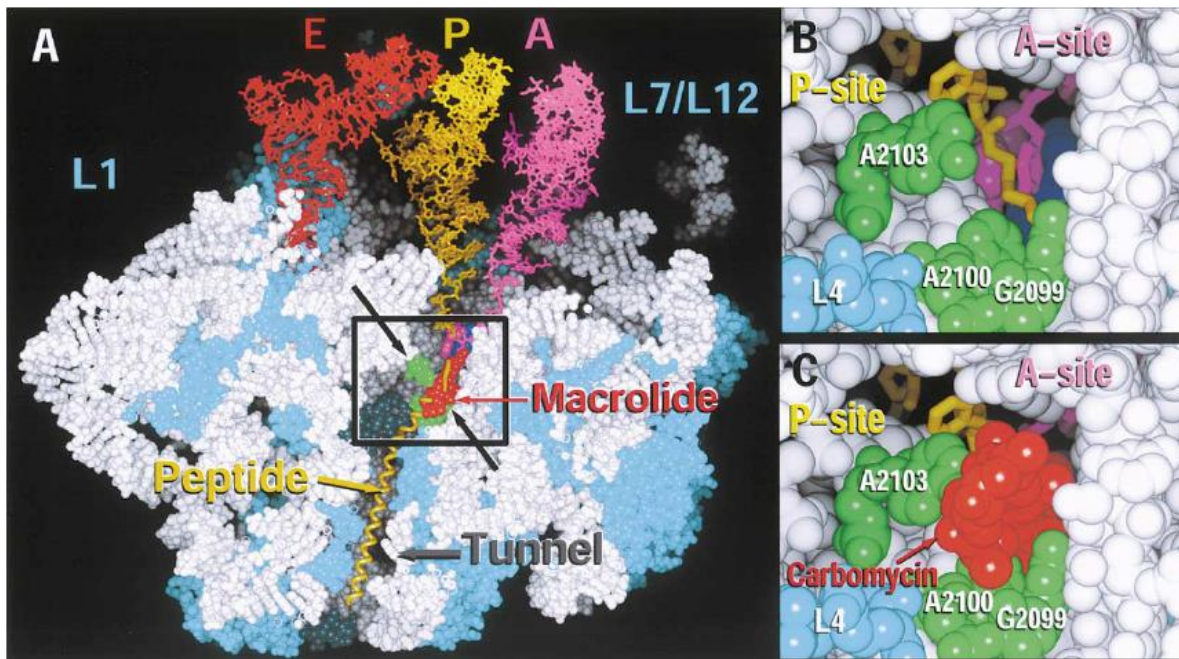
El grupo de Steitz reportó las estructuras de cristales de la subunidad ribosomal de *Haloarcula marismortui* complejada con antibióticos de 16 miembros: carbomicina A, espiramicina y tilosina y un macrólido de 15 miembros: azitromicina (**Esquema 2.19**).⁷²



Esquema 2.19. Estructuras de los macrólidos.⁷²

⁷² Hansen, J. L., Ippolito, J.A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B., Steitz, T. A. *Molecular Cell*. **2002**, *10*, 117-128.

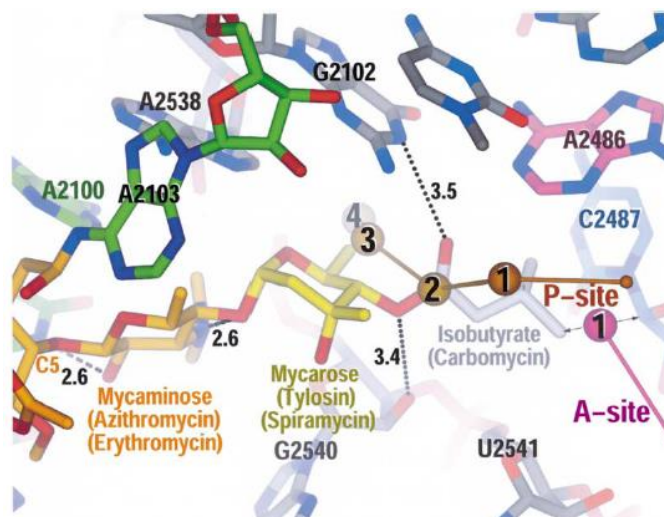
El sitio activo de estos macrólidos sugiere que inhiben la síntesis proteica mediante el bloqueo del túnel donde pasa el péptido de la unidad ribosomal, se observa que la rama del disacárido (micaminosa-micarosa) adyacente al C5 de los macrólidos estudiados se extiende en este mismo túnel a través del centro de transferasa peptídico (**Figuras A y C del Esquema 2.20**). Las interacciones de esta rama con el ribosoma son principalmente hidrofóbicas y son facilitadas por su complementariedad en forma en el sitio de enlace. Adicionalmente, cada azúcar forma puentes de hidrógeno con el ribosoma.



Esquema 2.20. Aquí se puede apreciar la vista general en que el macrólido Carbomicina bloquea la salida del túnel peptídico. (**Figura A**) Sitio de enlace del macrólido: se puede observar el túnel del péptido (gris) con el péptido modelado (lazo amarillo). El ARN ribosomal es blanco y las proteínas ribosomales son azul claro. Las flechas negras apuntan a la apertura entre el centro peptídico transferasa y el túnel de salida del péptido en donde se enlazan los macrólidos (rojo). Los átomos en verde son bases que interactúan con los macrólidos. (**Figura B**) Constricción. A través del sitio de constricción se muestran los sustratos del sitio P (bastones amarillos) y el sitio A (bastones morados) enlazados en el sitio activo. (**Figura C**) Bloqueo. La apertura mostrada en (**B**) es obstruida tanto por la presencia del macrólido (rojo) como por la conformación extendida de A2103 (verde).⁷²

El grupo acetaldehído de la posición C6 de cada anillo de lactona de 16 miembros forman un enlace covalente con el N6 del componente ribosomal A2103 (A2062, *E. coli*). La inhibición de la síntesis proteica por los macrólidos tiene dos características distintivas: primero, los macrólidos estén o no enlazados, inhiben la actividad de formación del enlace

peptídico. Los autores proponen que las bases nitrogenadas de adenina y guanosa interactúan con los grupos de la micaminosa de tilosina y espiramicina formando interacciones cercanas con el hidroxilo de la posición 2' y los grupos metilo sustituyentes del nitrógeno de la amina (**Esquema 2.21**). Se propone que cada azúcar forma un puente de hidrógeno con el ribosoma y de esta manera interrumpen la transcripción del ARN en el ribosoma.



Esquema 2.21. Correlación entre las estructuras de los macrólidos y su mecanismo de acción antibacteriana.⁷²

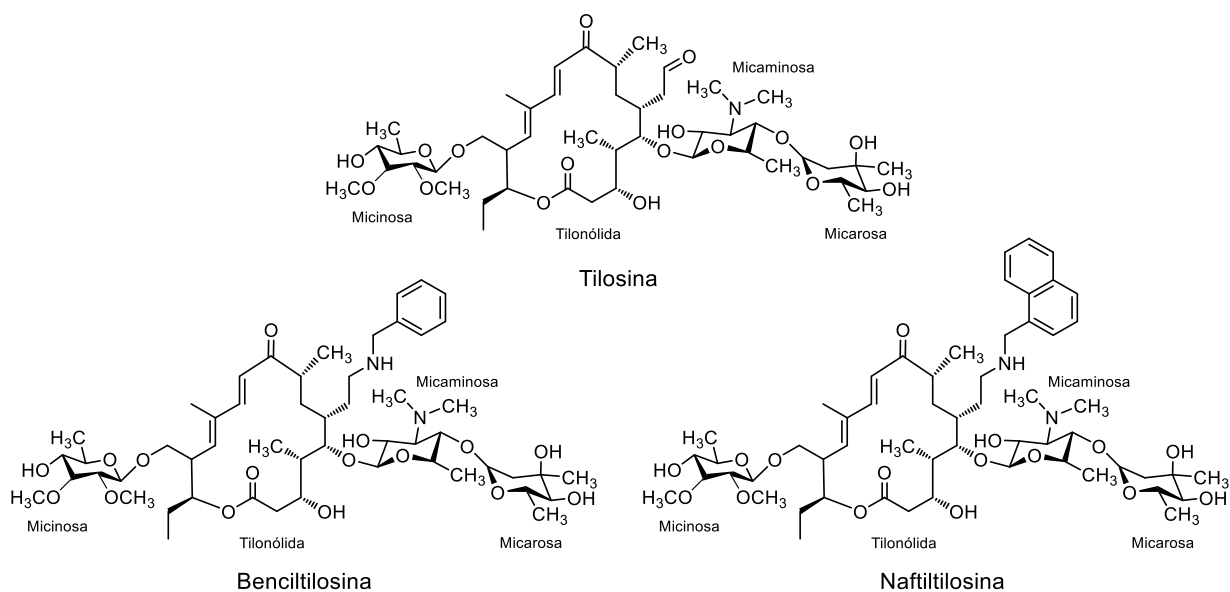
2.10.3. Uso de los macrólidos en el reconocimiento molecular

Los macrólidos poseen en su estructura características adecuadas para actuar como receptores para aniones y otras moléculas de interés biológico o farmacológico.⁷³ Sin embargo, tras realizar una búsqueda bibliográfica previa no se encontró información reportada acerca del empleo de los macrólidos como receptores moleculares.

Por esta razón, en nuestro grupo de investigación se estudió el macrólido tilosina que es un macrólido de 16 miembros, compuesto por una lactona sustituida (tilonólida), un amino azúcar (micaminosa) y dos azúcares neutros (micinosa y micarosa). La tilosina se empleó como receptor de aniones y se encontró que es capaz de discriminar a nucleótidos de

⁷³ Omura, S. *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology, and Practice*. Second Edition. Academic Press. San Diego, California, USA. **2002**.

adenina en función de la carga.⁷⁴ Los derivados benciltilosina y naftiltilosina se obtuvieron por aminación reductiva del grupo aldehído de la tilosina con bencilmetilamina y con 1-naftilmetilamina, respectivamente (**Esquema 2.22**). Los productos fueron caracterizados por espectrometría de masas FAB⁺, análisis elemental y espectroscopia de RMN de ¹H y ¹³C.



Posteriormente se realizaron estudios de complejación por potenciometría de la tilosina y sus derivados con los nucleótidos AMP²⁻, ADP³⁻ y ATP⁴⁻. También se realizaron estudios por fluorescencia para el derivado naftilado. Dichos experimentos permitieron determinar las constantes de asociación de los complejos que se resumen en la **Tabla 2.5**.

Tabla 2.5. Constantes de asociación para la tilosina con nucleótidos de adenina.⁷⁴

Receptor	log K		
	AMP	ADP	ATP
Tilosina ^a	3.05 ± 0.02	5.58 ± 0.02	3.09 ± 0.02
Benciltilosina ^a	c	3.56 ± 0.02	c
Naftiltilosina ^b	3.60 ± 2.0	3.36 ± 1.70	3.45 ± 1.54

^a Constantes calculadas por potenciometría. ^b Constantes calculadas por fluorescencia. ^c No se pudieron calcular las constantes por potenciometría.

⁷⁴ Copalcua Rosales, A. Tesis de licenciatura: *Síntesis y Propiedades de Reconocimiento Molecular de Ciclofanos Derivados de Tilosina*, CIQ-UAEM, Cuernavaca, Morelos, México, **2010**.

2.11. Espiramicina

La espiramicina es un antibiótico compuesto por un anillo macrólido de 16 miembros que fue descubierto en 1952 como un producto de la bacteria *Streptomyces ambofaciens*. Este compuesto presenta actividad antibacteriana gram-positiva, así como actividad antimicrobiana contra *Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium*, dos protozoarios los cuales pueden resultar en infecciones potencialmente fatales asociadas con el SIDA. Ha sido usado clínicamente en Europa, Canadá y México y es considerado un medicamento experimental en los Estados Unidos. En Europa se usa desde el año 2000 bajo el nombre comercial "Rovamicina" producida por Rhone-Poulenc y Famar Lyon en Francia y Eczacibasi Ilae en Turquía.⁷⁵

Es un antibiótico bacteriostático, que actúa mediante la inhibición de la síntesis proteica y por tanto del crecimiento celular en bacterias; solo en altas concentraciones es bactericida. Posee ocho precursores para su biosíntesis: cinco grupos acetatos, un propionato, un butirato y otros precursores de dos carbonos no identificados.⁷⁶

2.11.1. Estructura química

La espiramicina posee dos aminoazúcares, (micaminosa y forosamina), un azúcar neutro (micarosa) y un anillo de macrolactona (platenólida). Tanto el metoxi carbono de la aglicona, como el amino carbono y el metil carbono 3 (C-3) de la micaminosa, son derivados de la metionina.⁷⁷ Existen tres componentes de la espiramicina denominados *espiramicina I*, que posee un grupo hidroxilo en el C-3 de la aglicona, la *espiramicina II*, en la cual el grupo hidroxilo está acetilado, y la *espiramicina III*, en la cual esta misma posición está propionilada (**Esquema 2.23**).⁷⁸

⁷⁵ Professional Drug Information Spiramycin <http://www.drugs.com/cons/spiramycin-oral-injection-rectal.html>.

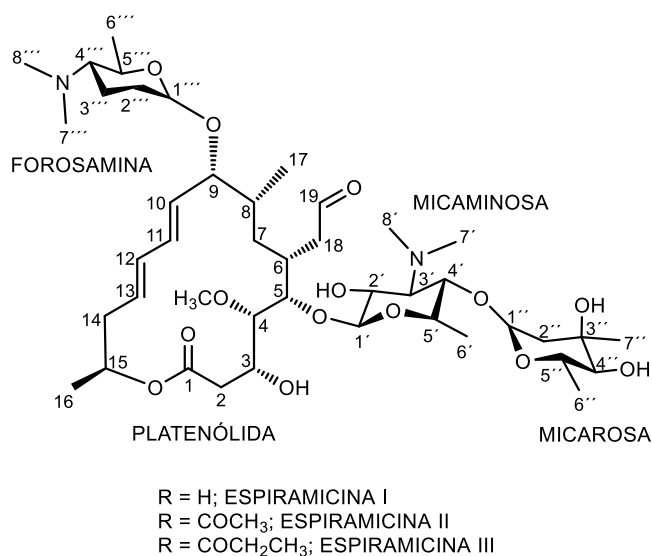
⁷⁶ Ramu, K., Shringarpure, S., Cooperwood, S., Beale, J. M., Williamson, J. S. *Pharmaceutical Research* **1994**, *11*, 3, 458-465.

⁷⁷ Inoue, A., Deguchi, T. *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 8, 1998-2004.

⁷⁸ Omura, S., Ikeda, H., Kitao, C. *J. Biochem.* **1979**, *86*, 1753-1758.

Alam y colaboradores reportaron la asignación completa de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de la espiramicina en CDCl_3 y D_2O a pH 7.6.⁷⁹ Por otro lado, el grupo de Kumar Ramu reportó la asignación de ^1H y ^{13}C de la espiramicina I y III en CDCl_3 y C_6D_6 .⁸⁰

En un trabajo anterior realizado en nuestro grupo de investigación, reportamos los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de espiramicina los cuales se obtuvieron en el equipo de 700 MHz en CDCl_3 y se muestran en las **Figuras 2.1** y **2.2** respectivamente. La asignación de las señales de ^1H y ^{13}C y las constantes de acoplamiento se muestran en la **Tabla 2.6** y se hicieron en base a lo reportado por Alam y colaboradores.⁸¹



Esquema 2.23. Estructura de la espiramicina y sus tres componentes.⁷⁸

⁷⁹ Alam, P., Barber, J., Brennan, R.J., Kennedy, K., Tehrani, M.H.H. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **1995**, *33*, 3, 228-231.

⁸⁰Ramu, K., Shringarpure, S., Williamson, J. S. *Pharm. Res.*, **1995**, *12*, 621-629.

⁸¹ Rivera-Márquez, K. I. Tesis de maestría: *Reconocimiento Molecular de Aniones por Espiramicina*. CIQ-UAEM, Cuernavaca, Morelos, México, **2012**.

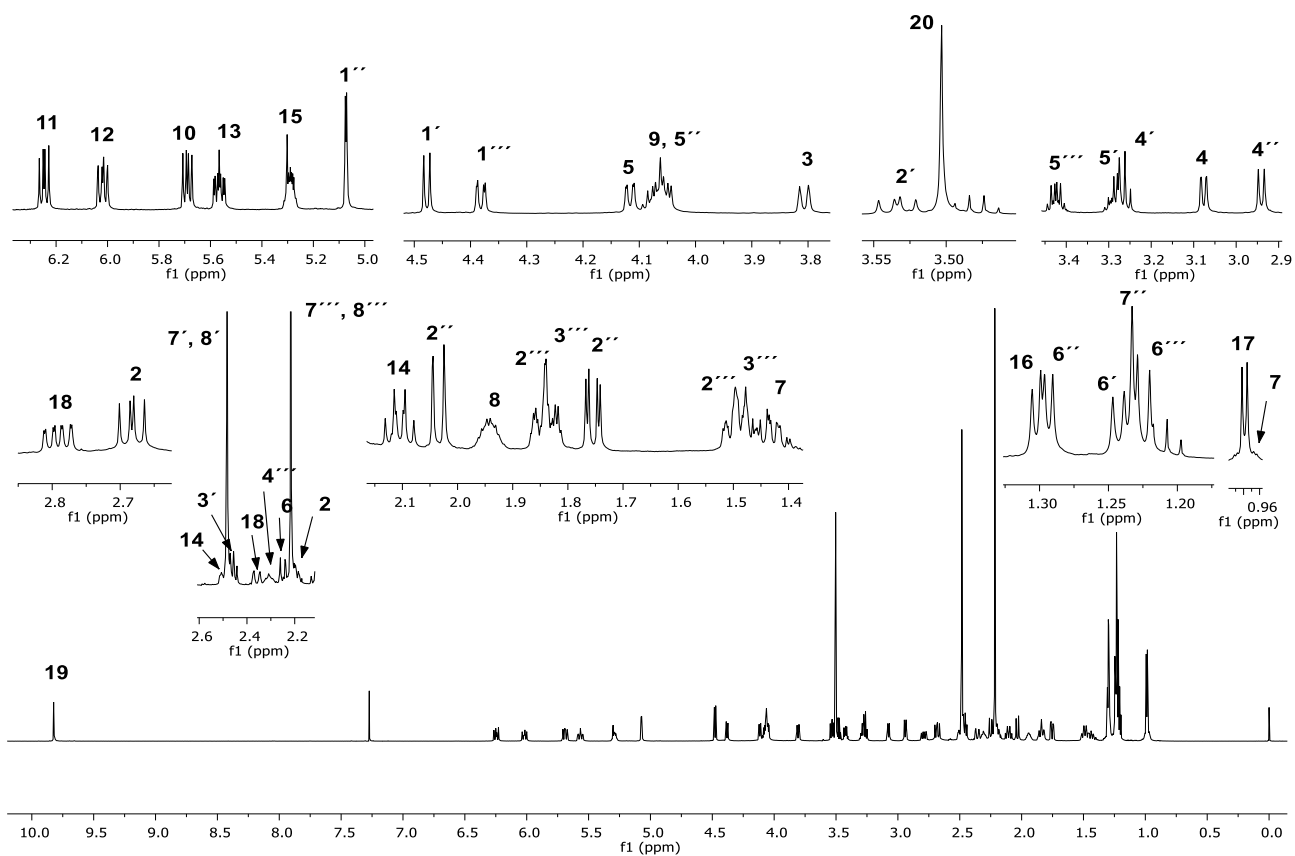


Figura 2.1. Espectro de espiramicina obtenido en RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3 , 25 °C).⁸¹

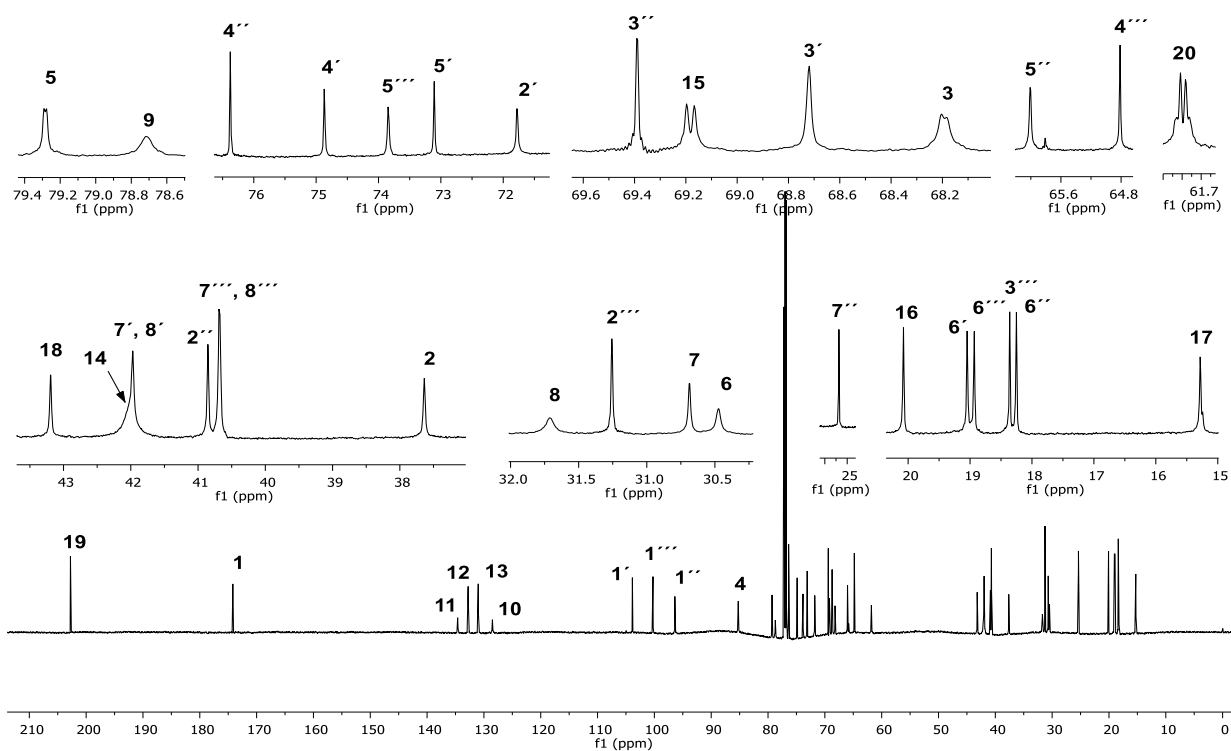


Figura 2.2. Espectro de espíramicina obtenido en RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3 , 25 °C).⁸¹

Tabla 2.6. Asignación de las señales de ^1H y ^{13}C de Espiramicina en CDCl_3 .⁸¹

Sitio	δ ^1H (ppm)	$J(^1\text{H } ^1\text{H})$ (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	-	174.2
2	2.68 dd,	14.7, 11.2	37.6
3	3.80 d	11.2	68.2
4	3.07 dd	9.1, 1.4	85.2
5	4.11 dd	8.4, 1.4	79.3
6	2.30 m	-	30.5
7	1.49 m, 0.99 m	-	30.7
8	1.94 m	-	31.7
9	4.06 m	-	78.7
10	5.69 dd	14.7, 9.1	128.5
11	6.24 dd	14.7, 10.5	134.6
12	6.02 dd	14.7, 10.5	132.8
13	5.56 ddd	15.4, 11.2, 4.2	131
14	2.45 m,	-	41.9
15	5.29 m	-	69.2
16	1.29 d	-	20.1
17	0.99 d	7 Hz	15.3
18	2.79 ddd,	1.4, 11.2, 17.5	43.2
19	9.82 s	-	202.7
20	3.50 s	-	61.8
1'	4.47 d	7.7	103.9
2'	3.53 m	10.5, 7.7	71.8
3'	2.46 m	-	68.7
4'	3.26 m	-	74.8
5'	3.27 m	-	73.1
6'	1.23 m	-	19.04
7', 8'	2.48 s	-	42.1
1''	5.07 d	3.5	96.4
2''	2.03 d,	14	40.8
3''	-	-	69.4
4''	2.94 d	9.8	76.4
5''	4.06 m	-	66
6''	1.29 m	-	18.2
7''	1.22 s	-	25.4
1'''	4.38 dd	8.4, 1.4	100.2
2'''	1.86 m, 1.51 m	-	31.2
3'''	1.84 m, 1.48 m	-	18.4
4'''	2.31 m	-	64.8
5'''	3.43 m	-	73.8
6'''	1.22 m	-	18.9
7''', 8'''	2.22 s	14.7, 11.2	40.7

2.11.2. Determinación de los valores de pK_a de espiramicina en solución acuosa

En un trabajo previo realizado en nuestro grupo de investigación se realizó la determinación de las constantes de protonación (pK_a) de la espiramicina por medio de titulaciones potenciométricas en solución acuosa (25 °C, 0.1 M de NaCl). El ajuste de los datos con el programa HYPERQUAD arrojó dos constantes de protonación (pK_a): 8.44 ± 0.006 y 7.49 ± 0.009 . Para asignar las constantes de protonación (pK_a) detectadas en potenciometría, se realizó un experimento de RMN ^1H en función del pH. Las señales que sufrieron los mayores cambios fueron las que corresponden a los protones de los grupos dimetilamino sustituyentes de la forosamina y la micaminosa identificados como 7''', 8''' para forosamina y 7', 8' para micaminosa que se desplazaron a campo alto conforme el pH aumenta. Las constantes de protonación calculadas a partir de potenciometría y de RMN ^1H coincidieron razonablemente, y las diferencias observadas se pueden deber a las diferencias en las condiciones de medición y es mayormente atribuido al disolvente, en el caso de potenciometría se empleó agua mientras que en RMN ^1H se empleó D_2O (**Tabla 2.7**).⁸¹

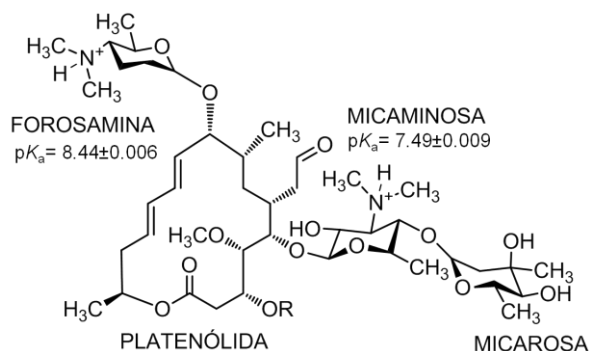


Tabla 2.7. Comparación de las constantes de protonación de la espiramicina obtenidas por potenciometría y RMN ^1H .⁸¹

Sitio	Potenciometría	RMN ^1H
Forosamina	8.44 ± 0.006	8.42 ± 0.019
Micaminosa	7.49 ± 0.009	7.88 ± 0.013

2.11.3. Estudios de reconocimiento molecular de espiramicina con aniones

Por otra parte, se llevó a cabo el estudio de reconocimiento molecular de los aniones AMP, ADP, ATP y ácidos dicarboxílicos (succínico, glutárico, adípico, pimélico y subérico) por espiramicina. En ese trabajo, se reportó la determinación de las constantes de protonación (pK_a) de la espiramicina por medio de titulaciones potenciométricas en solución acuosa en atmósfera inerte de nitrógeno a temperatura constante (25 °C), con una concentración 1 mM de la espiramicina, fuerza iónica 0.1 M de NaCl, así como también mediante titulaciones por RMN ^1H , obteniendo los valores de $pK_{a1} = 8.44 \pm 0.006$ (para la forosamina) y $pK_{a2} = 7.49 \pm 0.009$ (para la micaminosa).

Posteriormente se determinaron las constantes de asociación de la espiramicina con nucleótidos de adenina y con ácidos dicarboxílicos por medio de potenciometría en solución acuosa y titulaciones por RMN ^1H . Los resultados mostraron que la espiramicina presenta afinidad por aniones de la serie de los nucleótidos de adenina mostrando preferencia por ADP sobre AMP y ATP (**Tabla 2.8**).⁸¹

Tabla 2.8. Logaritmos de K de asociación de la espiramicina con diferentes nucleótidos de adenina.⁸¹

ESPECIES	Log K			
	AMP ²⁻	ADP ³⁻	ATP ⁴⁻	[P ₂ O ₇] ⁴⁻
LH + A = (LH)(A) ^a	3.11 ± 0.020	3.24 ± 0.160	3.18 ± 0.018	ND
LH ₂ + A = (LH ₂)(A)	3.64 ± 0.012	3.80 ± 0.009	3.65 ± 0.011	3.78 ± 0.03
LH ₂ + AH = (LH ₂)(AH)	3.73 ± 0.015	4.19 ± 0.010	3.70 ± 0.012	2.93 ± 0.02
LH ₂ + AH ₂ = (LH ₂)(AH ₂)	4.48 ± 0.039	5.77 ± 0.016	3.14 ± 0.017	2.65 ± 0.051
LH ₂ + AH ₃ = (LH ₂)(AH ₃)	ND	ND	ND	2.40 ± 0.09

^a Cargas omitidas para simplicidad, HL = Espiramicina monoprotonada, H₂L = Espiramicina diprotonada, A = Anión, ND = No detectable

Adicionalmente, la espiramicina mostró capacidad para unirse a dicarboxilatos alifáticos con un número de carbonos mayor a cuatro, siendo la máxima afinidad con los aniones pimelato y suberato (**Tabla 2.9**).

Tabla 2.9. Logaritmos de las constantes de asociación de la espiramicina con los ácidos dicarboxílicos.⁸¹

ESPECIES	Log <i>K</i>				
	Succinato	Glutarato	Adipato	Pimelato	Suberato
$LH^+ + A^{2-} = [(LH)(A)]^{1-}$	ND	ND	ND	2.92 ± 0.017	2.88 ± 0.008
$LH_2^{2+} + A^{2-} = [(LH_2)(A)]^0$	ND	ND	3.03 ± 0.028	3.40 ± 0.009	3.38 ± 0.005
$LH_2^{2+} + AH^- = [(LH_2)(AH)]^{1+}$	ND	ND	2.85 ± 0.041	3.30 ± 0.014	3.27 ± 0.058
$LH_2^{2+} + AH_2 = [(LH_2)(AH_2)]^{2+}$	ND	ND	ND	2.78 ± 0.024	3.20 ± 0.007

HL = Espiramicina monoprotonada, H₂L = Espiramicina diprotonada A = Ácido dicarboxílico, ND = No detectable

Justificación

3. JUSTIFICACIÓN

Los antibióticos de 16 miembros de la familia de los macrólidos, tales como la espiramicina y la tilosina, reúnen muchas de las características adecuadas para funcionar como receptores de aniones. Poseen aminoazúcares cargados positivamente en pH ácido, así como grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, y una gran cantidad de centros quirales.

Como se ha demostrado en los antecedentes, algunos macrólidos que se han estudiado como receptores para aniones en nuestro grupo de investigación han sido la espiramicina y la tilosina. En particular, la espiramicina presenta propiedades muy interesantes en el reconocimiento molecular de distintos aniones biológicamente importantes, tales como, nucleótidos de adenina y ácidos dicarboxílicos. Sin embargo, dicha molécula carece de grupos funcionales que le permitan señalar los eventos de reconocimiento molecular como cambios de color o emisión de luz. En este sentido, las únicas técnicas que se han podido emplear para estos estudios son la resonancia magnética nuclear y la potenciometría.

Por ello, en este trabajo se pretende realizar la modificación estructural de la espiramicina mediante la introducción de unidades aromáticas a la molécula de tipo fenilo, piridina, naftilo y pireno. Se propone que la presencia de estos grupos aromáticos podría mejorar la capacidad de reconocimiento molecular de los receptores estableciendo interacciones de tipo $\pi - \pi$ con los fragmentos aromáticos de los nucleótidos de adenina (AMP, ADP y ATP). Adicionalmente, se espera que estos cambios les permitan a los nuevos derivados semisintéticos de espiramicina mejorar sus propiedades fotofísicas de absorción y que además les confieran la posibilidad de realizar los estudios de reconocimiento molecular mediante técnicas como UV-visible.

Hipótesis

5. HIPÓTESIS

- Se sintetizarán nuevos derivados semisintéticos de espiramicina los cuales presentarán unidades de bencilo, metil-piridilo, metil-naftilo y metil-pirenilo. La presencia de estos grupos aromáticos en los derivados presentará una mejor selectividad por el establecimiento de interacciones del tipo $\pi - \pi$ o $\text{CH} \cdots \pi$, las cuales son importantes para el reconocimiento molecular en solución de huéspedes aniónicos con unidades aromáticas tales como AMP, ADP y ATP que serán detectados por medio de titulaciones en potenciometría, ITC, y RMN.
- Los estudios de modelado molecular, empleando la información de RMN, nos permitirán proponer una estructura probable de los complejos anfitrión-huésped formados por los derivados de espiramicina con los nucleótidos de adenina.
- Con esta modificación los derivados mejoraran su señalización en los estudios de reconocimiento por medio de la técnica espectrofotométrica UV-visible.
- Se propone que la presencia de estos grupos aromáticos introducirá superficies hidrofóbicas que serán capaces de establecer interacciones de tipo $\pi - \pi$ convirtiéndolos en moléculas anfitrionas prometedoras

Objetivos

4. OBJETIVO GENERAL

Realizar la síntesis de nuevos derivados semisintéticos de espiramicina y evaluar su capacidad en el reconocimiento molecular de aniones tales como los nucleótidos de adenina AMP, ADP y ATP, fosfato, pirofosfato y los ácidos dicarboxílicos de cadena abierta.

Para cumplir con este objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

4.1. Objetivos específicos

1. Modificar sintéticamente a la espiramicina mediante la introducción de grupos aromáticos, tales como bencilo, metil-piridilo, metil-naftilo y metil-pirenilo, mediante aminación reductiva del grupo aldehído de la espiramicina con el fin de mejorar sus propiedades fotofísicas y de reconocimiento molecular.
2. Determinar y asignar las constantes de protonación de los derivados en solución acuosa o mezcla agua-metanol por medio de potenciometría, resonancia magnética nuclear y espectroscopía UV-visible.
3. Realizar estudios de reconocimiento molecular de los derivados de espiramicina con aniones fosfatados y los nucleótidos de adenina ATP, ADP y AMP y ácidos dicarboxílicos de cadena abierta: ácido succínico, glutárico, adípico, pimélico y subérico, empleando las técnicas de potenciometría, calorimetría de titulación isotérmica (ITC), RMN y UV-visible con el fin de emplear los datos obtenidos en el cálculo de constantes de asociación con los aniones.
4. Realizar estudios de modelado molecular de la formación de los complejos con el fin de proponer las estructuras probables para los complejos formados por los derivados de espiramicina con los diferentes huéspedes.

Metodología

6. METODOLOGÍA

A continuación, se enlistan los reactivos, equipos empleados y se describe la metodología de síntesis para los derivados de Espiramicina. Así mismo se presentan los estudios ácido-base para cada derivado y los estudios de reconocimiento molecular de aniones fosfatados y dicarboxilatos. La manera de cuantificar y determinar las interacciones intermoleculares entre los receptores y los aniones también es de suma importancia, es por eso que también se hablará sobre las *titulaciones espectrométricas*, describiendo como se deben de hacer las titulaciones con diferentes técnicas tales como potenciometría, resonancia magnética nuclear, UV-visible y calorimetría de titulación isotérmica, que fueron las técnicas utilizadas en este proyecto. Se incluyen ejemplos de los procedimientos seguidos para el análisis de los datos obtenidos de las diferentes titulaciones.

6.1. Materiales

6.1.1. Reactivos

Los reactivos utilizados eran de grado analítico y fueron utilizados sin previa purificación. Las moléculas que se emplearon como materia prima fueron: espiramicina (96% de pureza), 1-naftilmetilamina (97% de pureza), clorhidrato de 1-pirenmetilamina (95% de pureza), 2-piridilmetilamina (99% de pureza), bencilamina (99% de pureza), etilendiamina (99% de pureza) y cloruro de dansilo (99% de pureza) todos comprados a *Sigma-Aldrich*. Como moléculas huésped fueron empleados los nucleótidos de adenosina: 5'-monofosfato de adenosina monohidratada (97% de pureza), sal de adenosin-5'-difosfato de sodio (95% de pureza) y la sal de adenosin-5'-trifosfato dibásica de sodio (99% de pureza) todos comprados a *Sigma-Aldrich*. El pirofosfato decahidratado (99% de pureza) y el fosfato disódico (99.2% de pureza) fueron comprados a la empresa *J.T. Baker*.

Los ácidos dicarboxílicos que fueron empleados también como huéspedes se adquirieron en *Sigma Aldrich*: ácido succínico (99% de pureza), ácido glutárico (99% de pureza), ácido adípico (99% de pureza), ácido pimélico (98% de pureza) y ácido subérico (98% de pureza).

Para mantener las muestras a pH constante se utilizó la solución amortiguadora MES (Ácido 2-[N-morfolin] etansulfónico) (95.5% de pureza) de la empresa *Sigma-Aldrich*. Para la fuerza iónica se utilizó cloruro de sodio cristal de la empresa *J.T. Baker*. Para los estudios de potenciometría se utilizó hidróxido de sodio (95% de pureza) de *Sigma-Aldrich*. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada obtenida del equipo NANOpure Ultrapure Water System (*Barnstead*). Para los estudios de RMN se utilizaron los siguientes disolventes: Agua deuterada (D_2O), cloroformo deuterado ($CDCl_3$) y las soluciones de deuteróxido de sodio ($NaOD$, 40% en D_2O) y cloruro de deuterio (DCl , 35% en D_2O) todos comprados a *Sigma-Aldrich*.

6.1.2. Instrumentación

Síntesis: El avance de las reacciones se llevó a cabo por cromatografía en capa fina sobre cromatofolios 60 F254 de Merck, y como agentes reveladores se utilizaron luz ultravioleta, vapores de I_2 , disoluciones de ninhidrina y anisaldehído en etanol. La purificación de los compuestos obtenidos se realizó por cromatografía utilizando sílica gel 60[®] de 230-400 mesh.

Resonancia magnética Nuclear: Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrómetro Varian INOVA a 400 MHz Multinuclear y un equipo Varian modelo *VNMRS* a 700 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) con respecto a la referencia interna de tetrametilsilano (TMS) y son positivos cuando la señal se desplaza a frecuencia más alta que el estándar. Para la obtención de los espectros de los derivados se utilizó el disolvente deuterado $CDCl_3$. La multiplicidad de las señales se denotó con las siguientes abreviaturas: s (señal simple), d (señal doble), t (señal triple), c (señal cuádruple), sa (señal ancha), m (multiplete), empleando en ocasiones combinaciones de ellas. Las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hz.

La determinación de las constantes de protonación de 2-picolil espiramicina **1b** en RMN, se hizo en D_2O a diferentes pH's. Se utilizó un electrodo de vidrio ORION ROSS y soluciones de

los estándares de pH convencionales. Las titulaciones de este mismo receptor con los nucleótidos de adenina se hicieron con D₂O a pH 7.

Los análisis de **masas de alta resolución (HRMS)** se obtuvieron en un equipo JEOL HRM Station JHRMS-700. Las **rotaciones ópticas** se determinaron en un polarímetro Anton Paar MCP 300. Los **puntos de fusión** se determinaron en un aparato Fischer-Johns utilizando cubreobjetos y no están corregidos.

Potenciometría: Los estudios de potenciometría se realizaron con un pHmetro Hanna Instruments modelo HI 4221 equipado con un electrodo de combinación Hanna Instruments HI 1093. Se utilizó como titulante NaOH libre de CO₂, valorado con biftalato de potasio, la solución titulante fue adicionada con un titulador automático marca Schott TITRONIC Basic con capacidad para 20 mL, con válvulas de 2/3 vías controladas por motor y resolución de volumen hasta 0.01 mL. El volumen se adicionó en porciones de 20 µL. El pH se registró a los tres minutos posteriores a cada adición. Durante las valoraciones se controló la temperatura a 25 ± 0.1 °C por medio de un baño termostatado. Asimismo, se mantuvo una agitación constante mediante la propela del titulador automático y con atmósfera de nitrógeno saturado con agua a fin de evitar la incorporación de CO₂ en la solución y la evaporación del sistema.

Titulación de calorimetría isotérmica: Las titulaciones calorimétricas se llevaron a cabo con un calorímetro de titulación isotérmica modelo MicroCal™VP-ITC de General Electric. Con un intervalo de temperatura de 2 a 80 °C, un volumen de celda muestra de 2 mL, volumen de celda de 1400 µL y un error de 0.2 ncal/s.

Fuerza iónica: En los estudios por potenciometría e ITC la fuerza iónica de las soluciones se mantuvo fija en 0.1 M con NaCl.

Espectroscopía UV-Vis: Para registrar los espectros de absorbancia de las moléculas anfitrión y de la mezcla anfitrión-huésped, se utilizó el espectrofotómetro ultravioleta-visible de arreglo de diodos HP 8452A (190 a 1100 nm y una resolución de 1 nm), con una precisión

de longitud de onda $< \pm 0.5$ nm y una precisión fotométrica $< \pm 0.005$ Å. Se usaron celdas de cuarzo de paso óptico de 1 cm con capacidad para 3 mL.

6.1.3. Programas para realizar cálculos y ajustes

Todos los cálculos y ajustes de regresión lineal y no lineal requeridos en este trabajo se llevaron a cabo con el programa Microcal Origin versión 6.0 (para el análisis de las titulaciones potenciométricas y de las espectroscopías por UV-Vis) y la versión 7.0 (para el análisis de las titulaciones calorimétricas) de Microcal Software Inc. (confiabilidad del 95%), tomando como criterio el mejor ajuste que reproduzca parámetros físicamente congruentes con las observaciones experimentales y modelos empleados. El programa de Origin usa el algoritmo Levenberg-Marquardt⁸² y el método simplex⁸³ para el ajuste no lineal de mínimos cuadrados. Este método está entre los más empleados en la estimación de parámetros ya que encuentra los parámetros de los modelos especificado por minimización de los valores de chi cuadrada (χ^2)⁸⁴, para hacer el proceso de ajuste más estable incluyendo restricciones lineales basadas en un método de programación cuadrático.⁸⁵

Para la determinación de las constantes de protonación y asociación de las titulaciones potenciométricas se utilizó el programa HYPERQUAD 2013.⁸⁶ Para minimizar la función que incluye a la propiedad medida, se utiliza el método Gauss-Newton-Marquardt y las ecuaciones de balance de masa se resuelven con el método Newton-Raphson. El programa HYPERQUAD ha sido empleado para calcular constantes de estabilidad en diferentes sistemas. El programa *HYSS 2009* se utilizó para la generación de los diagramas de especies y el cálculo de las constantes efectivas (K_{eff}).

⁸² Press, C.J., Flannery, B.P., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T. *Numerical Recipe in C. The art of scientific computing*. Cambridge University Press, New York, **1988**, 801-806.

⁸³ Nelder, J.A., Mead, R.A. *Computer Journal*, **1965**, 7, 308.

⁸⁴ Microcal Software, Inc. Origin 3.0: Reference Manual (114-117) and Supplement (35-37, 39-53 y 79-86), Technical Graphics and Data Analysis in Windows, **1993**.

⁸⁵ Shragar, R.I. *Communication of the ACM*, **1972**, 15, 41-45.

⁸⁶ a) Gans, P., Sabatini A., Vacca, A. *Talanta*. **1996**, 43, 1739-1753. b) Para mayor información consultar la página: <http://www.hyperquad.co.uk/applications.html>.

6.2. Metodología sintética

6.2.1. Síntesis de los derivados de espiramicina

En un matraz de 50 mL se disolvió espiramicina (1.0 equiv.) en una mezcla cloroformo-ácido acético (10 mL : 1 mL). A temperatura ambiente se adicionó lentamente una amina (1.3 equiv.) y después de 10 min se agregó el triacetoxiborohidruro de sodio (1.5 equiv.). La mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 24 h bajo una atmósfera inerte de nitrógeno. Pasado el tiempo de reacción, en este punto, el producto se encuentra en forma de sal disuelto en la fase acuosa debido a la protonación de los grupos amino del derivado y la fase orgánica se extrajo con diclorometano (2 x 20 mL), con lo cual se consigue remover la cantidad de amina en exceso empleada de acuerdo con el procedimiento. Posteriormente la fase acuosa se trató con una solución de NaOH 1 M hasta alcanzar un $\text{pH} \geq 9$, obteniendo de este modo el derivado de espiramicina en su forma neutra, el cual se extrajo de la solución acuosa con diclorometano (3 x 30 mL). Finalmente, en la fase acuosa se eliminaron las sales formadas del agente reductor y la fase orgánica conteniendo el producto esperado se separó, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida, aislando así los derivados de espiramicina **1a-d** con altos rendimientos químicos y mediante un proceso libre de purificación por cromatografía en columna.

6.3. Estudios por potenciometría

Los macrólidos tienen grupos ionizables y por lo tanto son susceptibles de estudiarse mediante potenciometría. De esta forma, los estudios de potenciometría permitieron determinar las constantes de protonación de los derivados de espiramicina y de las moléculas huésped, así como sus constantes de asociación.

Todos los experimentos realizados con esta técnica se hicieron por duplicado. Cada muestra se colocó en agitación a temperatura constante, 25 °C, con flujo de nitrógeno (para prevenir la formación de CO₂ que interfiere con la medición) y se midió el pH inicial para posteriormente hacer adiciones de 0.01 mL de NaOH estandarizado (ver **Apéndice B: Preparación de NaOH estandarizado**) con el titulador automático.

6.3.1. Determinación de los valores de pK_a de los derivados de espiramicina

A continuación, se presenta la metodología experimental para el cálculo de los valores de pK_a (o de protonación) de los derivados: Bencil espiramicina **1a**, 2-Picolil espiramicina **1b** y Naftil espiramicina **1c** y de las moléculas huésped utilizadas en este trabajo.

Para las muestras que se usaron en la titulación potenciométrica, se realizaron soluciones que fueron aforadas a 25 mL con la concentración y con el sistema de solubilidad que se indica en la **Tabla 6.1** para cada derivado; de éstas se tomaron dos alícuotas de 10 mL y cada alícuota se tituló con el NaOH estandarizado registrando el pH después de cada adición del titulante hasta llegar a un pH básico. En esta misma tabla se describen las condiciones de trabajo para las titulaciones de cada derivado y el intervalo de pH en el cuál se hizo la titulación.

Tabla 6.1. Condiciones de trabajo para las titulaciones de obtención de pK_a s en potenciometría de los derivados de Espiramicina.

Derivado	Concentración (M)	Sistema	Ácido agregado	Intervalo de titulación
Bencil espiramicina 1a	5×10^{-4}	H ₂ O-MeOH (9:1 V/V) con fuerza iónica 0.1 M de NaCl.	3 equiv. de HCl 1 M	3.0-11
2-Picolil espiramicina 1b	2×10^{-3}	Acuoso con fuerza iónica 0.1 M de NaCl.	4 equiv. de HCl 1 M	2.3 - 11
Naftil espiramicina 1c	5×10^{-4}	H ₂ O-MeOH (9.5:0.5 V/V) con fuerza iónica 0.1 M de NaCl.	3 equiv. de HCl 1 M	3.0 - 8.5

La determinación de pK_a de los huéspedes (nucleótidos de adenina y los ácidos dicarboxílicos) se hizo con la misma metodología descrita anteriormente. Se obtuvieron las constantes de protonación para medio acuoso y para las mezclas agua-MeOH 9:1 y 9.5:0.5 con una concentración 5×10^{-4} M y fuerza iónica 0.1 M de NaCl.

6.3.2. Determinación de los logaritmos de las constantes de asociación de los complejos anfitrión-huésped

A continuación, se describe el procedimiento para la obtención de las constantes de asociación de los complejos huésped-anfitrión. Para la realización de las muestras que se utilizaron durante la titulación potenciométrica, se realizaron soluciones que fueron aforadas a 25 mL con la concentración y con el sistema de solubilidad que se indica en la **Tabla 6.2**, para cada mezcla anfitrión-huésped; de éstas se tomaron dos alícuotas de 10 mL, posteriormente se agregan los equivalentes de HCl 1 M (con la cantidad que se muestra en la columna "ácido agregado" de la tabla) para protonar el receptor. Cada alícuota se tituló con el NaOH estandarizado registrando el pH después de cada adición del titulante hasta llegar a un pH básico. La relación estequiométrica anfitrión-huésped fue de 1:1 para todas las titulaciones.

Tabla 6.2. Condiciones de titulación para la obtención de las constantes de asociación de los complejos anfitrión-huésped.

Derivado	Conc. [M]	Sistema	Ácido agregado	Intervalo de titulación	Aniones utilizados
1a	5×10^{-4}	H ₂ O-MeOH (9:1 V/V), fuerza iónica 0.1 M NaCl	3 equiv. de HCl 1.0 M	3.2-11	ATP, ADP, AMP, Pi, PPI, glutarato, adipato y pimelato
1b	2×10^{-3}	Solución acuosa, fuerza iónica 0.1 M NaCl	4 equiv. de HCl 1.0 M	2.5-11	ATP, ADP, AMP, Pi, PPI, succínico, adipato, pimelato y suberato
1c	5×10^{-4}	H ₂ O-MeOH (9.5:0.5 V/V) fuerza iónica 0.1 M NaCl	3 equiv. de HCl 1.0 M	3.5-8.5	ATP, ADP y AMP

6.3.3. Tratamiento de datos obtenidos de las titulaciones potenciométricas

Para la obtención de los valores de las constantes de protonación (pK_a s) de los receptores: bencil espiramicina **1a**, 2-picolil espiramicina **1b** y naftil espiramicina **1c**, se graficaron los datos de pH obtenidos experimentalmente durante las titulaciones potenciométricas vs el volumen de NaOH agregado en el programa ORIGIN 6.0. Se muestra como ejemplo la titulación del derivado 2-picolil espiramicina **1b** (**Figura 6.1**).

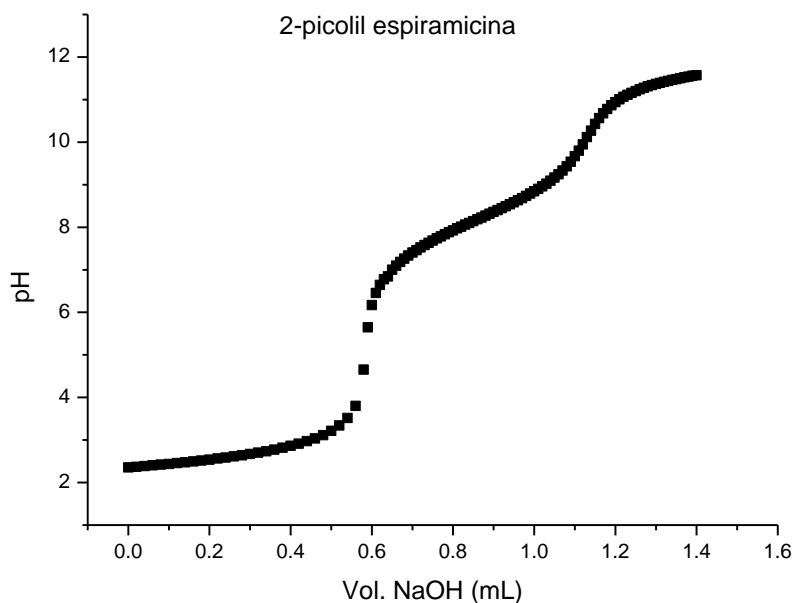


Figura 6.1. Ejemplo de curva de titulación de 2-Picolil espiramicina **1b** (2×10^{-3} M), solución acuosa, 25 °C y 0.1 M de NaCl.

Posteriormente estos datos se exportan al programa HYPERQUAD 2013 para calcular las constantes de protonación de los receptores **1a-c** (**Figura 6.2**).

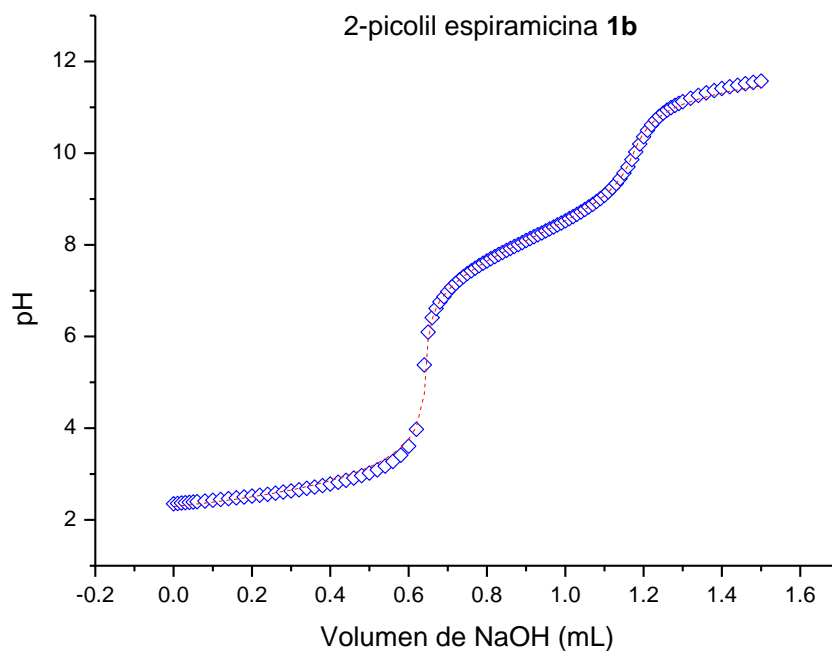


Figura 6.2. Curva de titulación de 2-picolil espiramicina **1b** (2×10^{-3} M) en HYPERQUAD 2013. Los datos experimentales (\diamond) y la curva generada (---). En el recuadro inferior aparece la desviación estándar de los datos experimentales.

Para la obtención de las constantes de asociación de los complejos formados entre los derivados de espiramicina y los aniones utilizados en este trabajo, se grafican los valores de pH obtenidos contra el volumen de NaOH agregado. En la **Figura 6.3** se muestra como ejemplo la gráfica obtenida de la titulación de 2-picolil espiramicina **1b** con ATP realizada en ORIGIN 6.0.

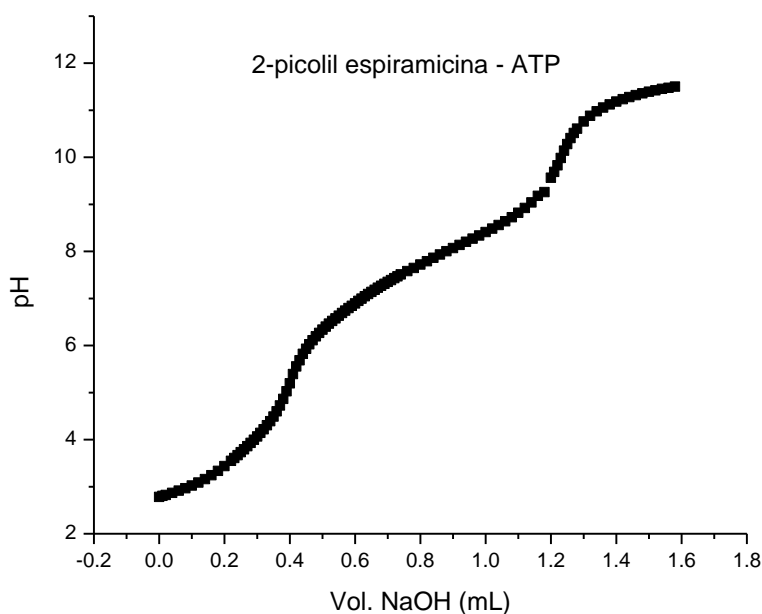


Figura 6.3. Ejemplo de curva de titulación de **1b** con ATP relación molar 1:1 (2×10^{-3} M), en solución acuosa a 25 °C y 0.1 M de NaCl.

A continuación, se muestra el tratamiento de los datos obtenidos en las titulaciones para ajustar las curvas experimentales a las curvas teóricas que se generan con el programa HYPERQUAD, en el cual se calculan los valores de logaritmos de β que finalmente se transforman en logaritmos de las constantes de asociación ($\log K$).

1. Para crear un nuevo archivo en HYPERQUAD 2013 se debe dar clic en la pestaña "Data" en donde se selecciona los datos obtenidos previamente en la titulación por potenciometría, los cuales son fácilmente extraídos de un blog de notas con la extensión .txt que anteriormente se copian del archivo de Origin y son importados al programa HYPERQUAD 2013 (**Figura 6.4**).

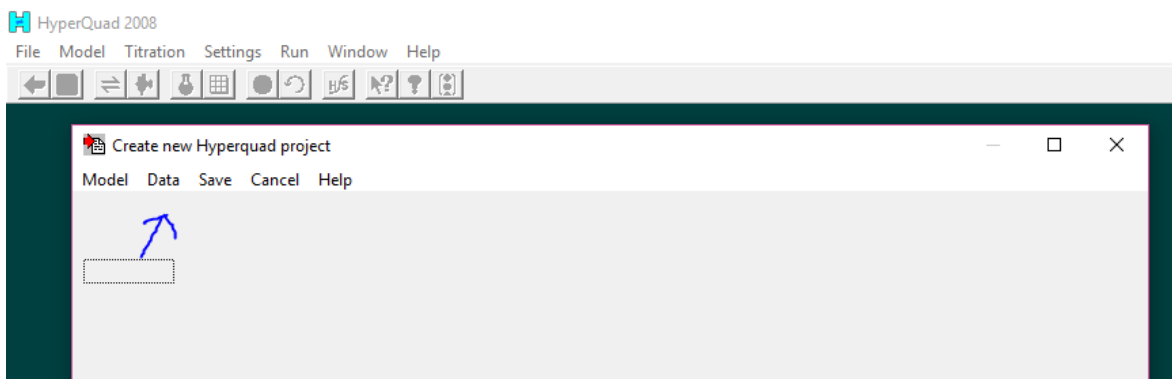


Figura 6.4. Ventana para crear un nuevo documento de Hyperquad. Pestaña "Data".

2. Al crear el modelo de titulación se elige el número de especies participantes, es decir, si sólo se titula el anfitrión son 2 especies (anfitrión y protón) pero si se titula el complejo se trata de 3 especies (anfitrión, huésped y protón). También existe la opción de abrir un modelo previamente guardado que contenga los datos de las especies y de los logaritmos de β que necesitamos para realizar el ajuste de datos. Se guarda el archivo con la extensión *.HQP (**Figura 6.5**).

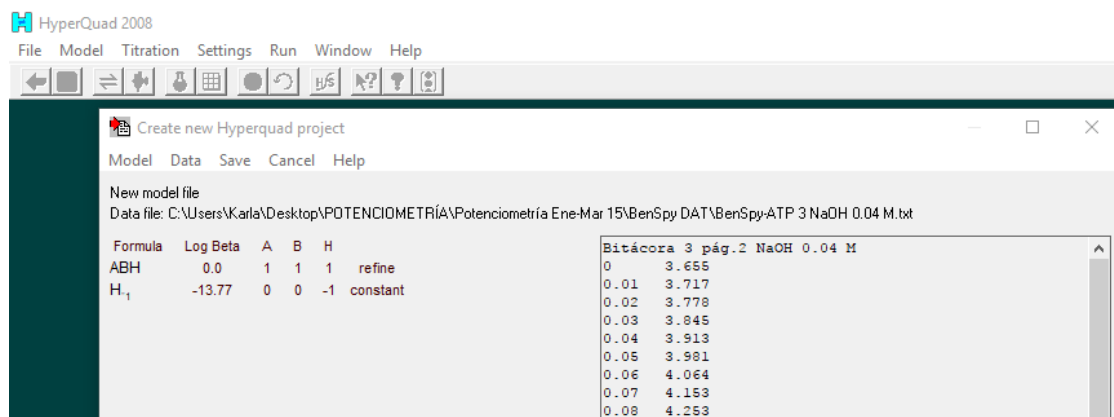


Figura 6.5. Ventana para crear el modelo de titulación.

3. Una vez guardado el archivo, aparece una ventana llamada "Revisión de condiciones" indicando las condiciones que faltan por completar antes de realizar el llenado de constantes y los cálculos de refinamiento (**Figura 6.6**).

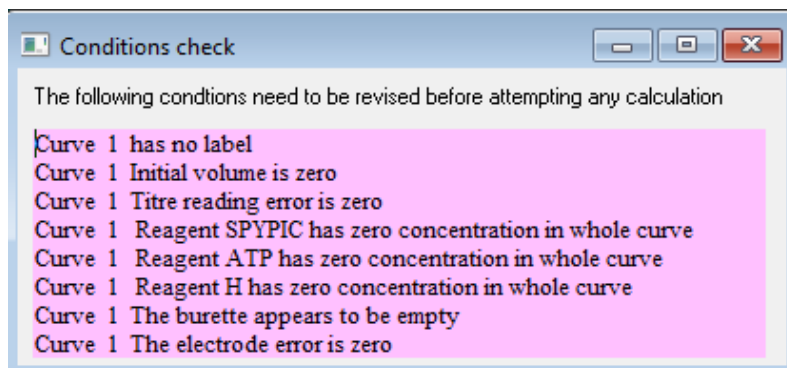


Figura 6.6. Ventana de "Revisión de condiciones"

Una vez que se meten los datos faltantes se prosigue con el llenado de las ventanas: "Datos del modelo" y "Datos experimentales".

4. La ventana "Datos del modelo" se llena con los logaritmos de β (**Figura 6.7**). En la primera fila se escribe el pK_w del agua, en las siguientes filas se indican como "constantes" los valores de β obtenidos para el anfitrión y del huésped. En las filas posteriores se escriben las β de los complejos que se forman entre el anfitrión y el huésped y el número de protones involucrados y se indican como "refinar".

Formula	Log Beta	SPYPIC	ATP	H	
H_2O	-14.05	0	0	-1	constant
SPYPICH	8.78	1	0	1	constant
SPYPICH ₂	16.97	1	0	2	constant
SPYPICH ₃	24.34	1	0	3	constant
ATPH	6.52	0	1	1	constant
ATPH ₂	11.4	0	1	2	constant
SPYPICATPH	11.3	1	1	1	refine
SPYPICATPH ₂	19.3186	1	1	2	refine
SPYPICATPH ₃	27.1598	1	1	3	refine
SPYPICATPH ₄	33.924	1	1	4	refine

Figura 6.7. Ventana: "Datos del modelo"

5. Se llena la ventana de "Datos experimentales" con las condiciones experimentales de nuestra titulación (**Figura 6.8**). En la primera pestaña: "Concentraciones" se escribe el nombre de la curva, el volumen inicial de la muestra, el error del volumen (en este caso es el error de la bureta que es de 0.02% y la resolución es de 0.01 mL). A continuación, se agregan las concentraciones en la columna "milimoles totales iniciales", se incluyen las

condiciones de titulación: los milimoles del anfitrión, milimoles del huésped, milimoles de ácido totales presentes en la muestra. En la columna "concentración de la bureta / M" se escribe únicamente la concentración de NaOH estandarizado que se utilizó.

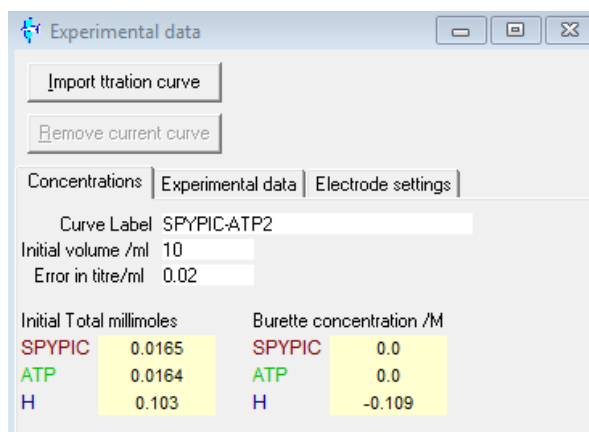


Figura 6.8. Ventana: "Datos experimentales", pestaña "Concentraciones".

En la segunda pestaña: "Datos experimentales" se debe asegurar que se encuentren incluidos los datos de volumen y pH obtenidos de la titulación (**Figura 6.9**).

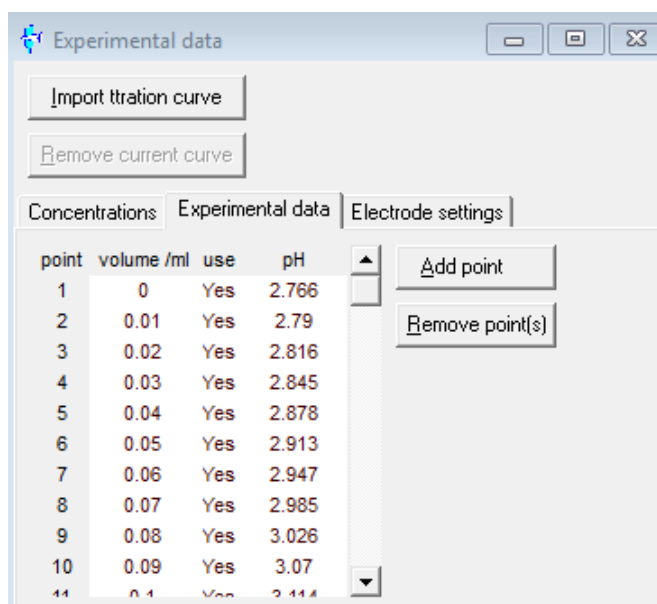


Figura 6.9. Ventana: "Datos experimentales", pestaña "Datos experimentales"

En la tercera pestaña: "Ajustes del electrodo" se indica el tipo de electrodo utilizado y el error de lectura de pH (**Figura 6.10**).

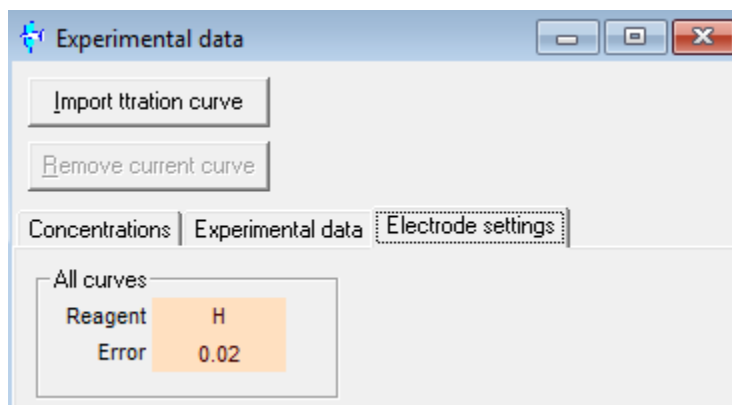


Figura 6.10. Ventana: "Datos experimentales", pestaña "Ajustes del electrodo"

6. Una vez llenas todas las ventanas con los datos, se procede a crear la gráfica en la que observaremos si nuestros datos experimentales se ajustan al modelo teórico que da el programa y que a su vez fue alimentado con las β que se introducen al inicio (**Figura 6.11**).

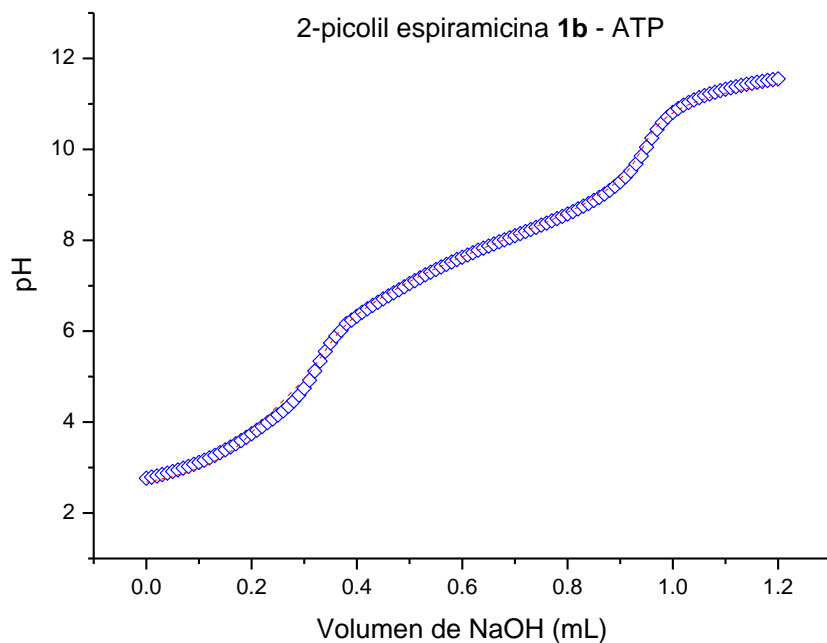


Figura 6.11. Ejemplo de curva de titulación de la 2-picolil espiramicina – ATP (1:1, 2×10^{-3} M) en HYPERQUAD 2013. Los datos experimentales (\diamond) y la curva generada (---).

7. Finalmente se refinan las constantes de estabilidad, obteniendo los resultados con un 95% de confianza. Los valores de las constantes se obtienen como logaritmos de β , con el error correspondiente (**Figura 6.12**).

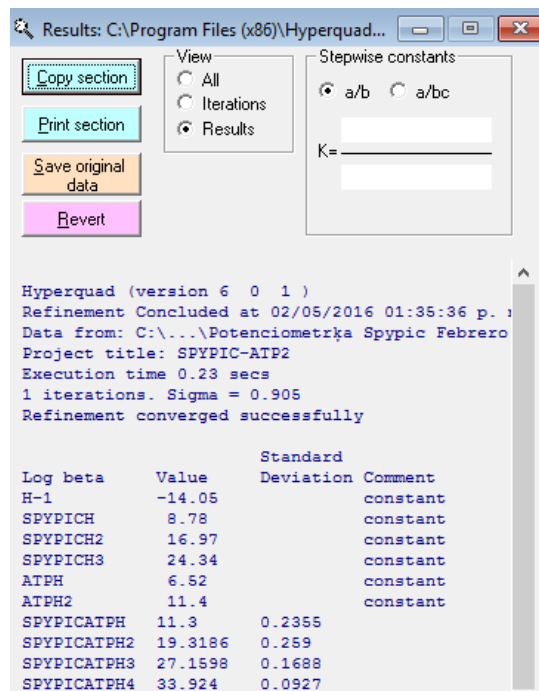


Figura 6.12. Ventana de refinamiento de las constantes.

Con el programa HySS 2009 se hace un diagrama de especies (tomando en cuenta los valores de β 's obtenidos en HYPERQUAD) donde se grafica el porcentaje de formación de las especies vs el pH (**Figura 6.13**).

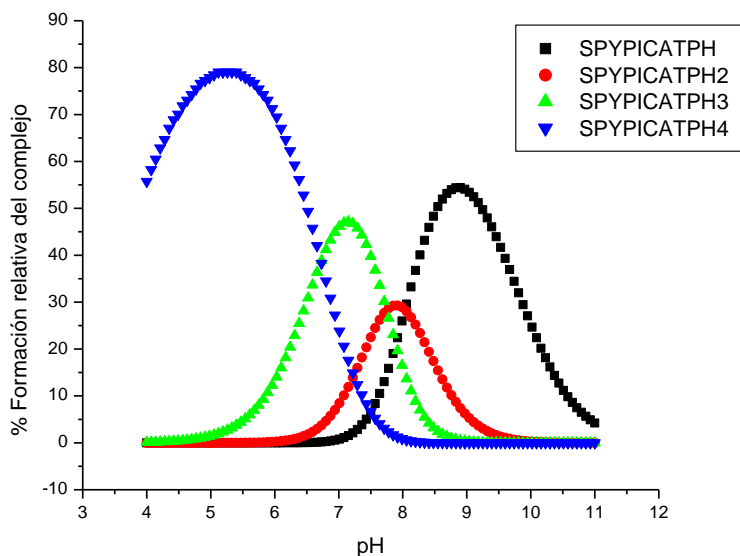
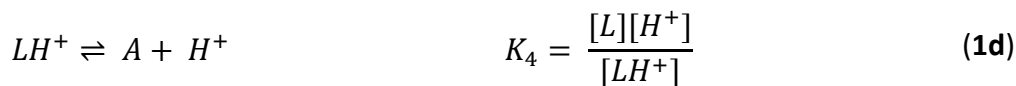
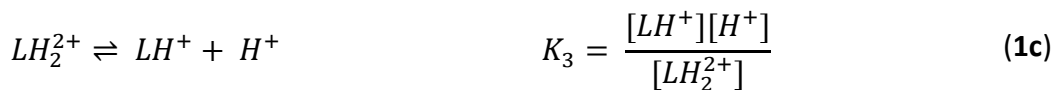
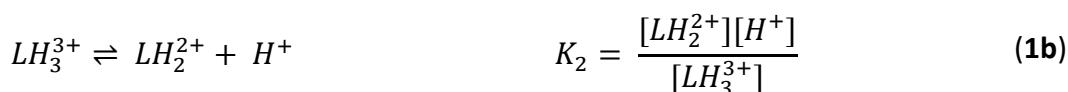
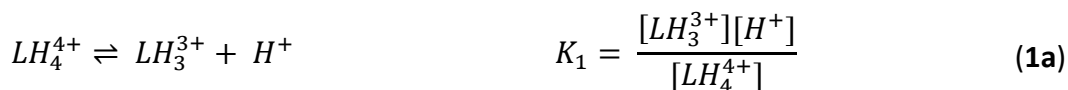


Figura 6.13. Diagrama de abundancia de especies del complejo 2-picolil espiramicina **1b** con ATP (2×10^{-3} M, relación molar 1:1).

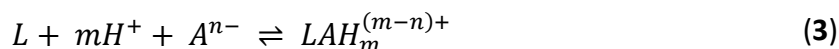
6.3.4. Ecuaciones para la determinación de las constantes de protonación (pK_a 's) de los derivados de espiramicina y de los huéspedes

A continuación, se presentan las ecuaciones (**1a-d**) para la determinación de los pK_a s de los derivados preparados por titulación potenciométrica.



El ajuste de las curvas de titulación para el caso de la formación de complejos, permite la determinación de las constantes acumulativas definidas por la ecuación **2**, la cual corresponde a la reacción **3**:

$$\beta = \frac{[LAH_m]}{[L][A^{n-}][H^+]^m} \quad (2)$$



En donde β es la constante acumulativa o global de formación, L el receptor, A es el anión y H^+ es el protón, m es el número de protones que forman el complejo.

La constante de asociación K_{ij} que corresponde a la formación del complejo entre las formas protonadas del receptor (LH_i) y el anión (AH_j), donde $i + j = n$, y puede calcularse de los valores de β_{11n} con constantes de protonación conocidas de ambos reactantes. Para aplicar esta definición, se asume que la complejación del anión no cambia el patrón de protonación del receptor y el huésped. La localización de los protones en los complejos se asume que sea regulada por la basicidad de las especies que interactúan.

Las constantes acumulativas o globales de protonación o asociación β , involucran el producto de las constantes de protonación paso a paso: $K_1, K_2 \dots K_n$ de acuerdo a la ecuación **4**:

$$\beta = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \dots K_n \quad (4)$$

Para el cálculo de los pK_a del anfitrión (molécula de 2 especies), se toma la primera β como el primer pK_a del compuesto, y para las siguientes se hace una resta como se muestra en la ecuación **5**:

$$\beta_n - \beta_{n-1} = pK_{a_n} \quad (5)$$

Donde n es mayor que $n - 1$. Se restan los valores de β obtenidos para el complejo menos el valor de β del derivado solo, correspondiente a cada especie generada. Así, si queremos el valor de pK_{a3} se resta al valor de β_3 obtenido para el complejo el valor de β_3 del derivado solo. De manera desarrollada los pK_a s de los derivados de espiramicina y de los huéspedes utilizados se pueden obtener como se muestra a continuación (se muestra un ejemplo de la obtención de los pK_a s de 2-picolil espiramicina **1b** que tiene 4 sitios de protonación en las ecuaciones **6a-d**):

$$\beta_1 = \frac{[LH]}{[L][H]} \quad pK_{a1} \text{ de Sustrato} = \log \beta_1 \quad (6a)$$

$$\beta_2 = \frac{[LH_2]}{[L][H]^2} \quad pK_{a2} \text{ de Sustrato} = \log \beta_2 - pK_{a1} \quad (6b)$$

$$\beta_3 = \frac{[LH_3]}{[L][H]^3} \quad pK_{a3} \text{ de Sustrato} = \log \beta_3 - pK_{a1} - pK_{a2} \quad (6c)$$

$$\beta_4 = \frac{[LH_4]}{[L][H]^4} \quad pK_{a4} \text{ de Sustrato} = \log \beta_4 - pK_{a1} - pK_{a2} - pK_{a3} \quad (6d)$$

6.3.5. Ecuaciones para la determinación de las constantes de asociación ($\log K$) de los complejos anfitrión-huésped

Para la determinación de las constantes de estabilidad de los complejos, que son sistemas de 3 especies (anfitrión-huésped-protón), se restan las betas calculadas. Se muestra como ejemplo el 2-picolil espiramicina **1b** (4 sitios de protonación) y un anión con dos cargas negativas (un dicarboxilato) (Ecuaciones **7a-f**):

$$\beta_{111} = \frac{[LAH]}{[L][A][H]} \quad \log K_{111} = \log \beta_{111} - pK_{a1} \quad (7a)$$

$$\beta_{112} = \frac{[LAH_2]}{[L][A][H]^2} \quad \log K_{112} = \log \beta_{112} - pK_{a1} - pK_{a2} \quad (7b)$$

$$\beta_{113} = \frac{[LAH_3]}{[L][A][H]^3} \quad \log K_{113} = \log \beta_{113} - pK_{a1} - pK_{a2} - pK_{a3} \quad (7c)$$

$$\beta_{114} = \frac{[LAH_4]}{[L][A][H]^4} \quad \log K_{114} = \log \beta_{114} - pK_{a1} - pK_{a2} - pK_{a3} - pK_{a4} \quad (7d)$$

$$\beta_{115} = \frac{[LAH_5]}{[L][A][H]^5} \quad \log K_{115} = \log \beta_{115} - pK_{a1} - pK_{a2} - pK_{a3} - pK_{a4} - pK_{a5} \quad (7e)$$

$$\beta_{116} = \frac{[LAH_6]}{[L][A][H]^6} \quad \log K_{116} = \log \beta_{116} - pK_{a1} - pK_{a2} - pK_{a3} - pK_{a4} - pK_{a5} - pK_{a6} \quad (7f)$$

6.3.5. Ecuaciones para la obtención de la constante efectiva (K_{eff})

Es difícil establecer el orden de selectividad a partir de las constantes de asociación debido a que varios equilibrios de protonación que se encuentran presentes en la solución están traslapados. Una mejor alternativa es el uso de la constante de estabilidad efectiva, K_{eff} , definida a cierto valor de pH, de acuerdo con la ecuación **8** (se omitieron las cargas):

$$K_{eff} = \frac{\sum([LAH_{i+j}])}{(\sum[LH_i])(\sum[AH_j])} \quad (8)$$

Teniendo el diagrama de especies, se puede calcular la constante efectiva del complejo en el mismo programa. La ecuación **9** es utilizada por *HySS*:

$$K_{eff} = \frac{\sum[\text{Anfitrión}] \text{ unido a Huésped}}{\sum[\text{Huésped}] \text{ no unido al Anfitrión} * \sum[\text{Anfitrión}] \text{ no unido al Huésped}} \quad (9)$$

Se divide la concentración del complejo formado, entre la multiplicación de la concentración del huésped libre por la concentración del anfitrión en su forma libre.

6.4. Estudios por Resonancia Magnética Nuclear

El parámetro más importante en este tipo de espectroscopía es el desplazamiento químico (δ), el cual está asociado a una frecuencia de resonancia relativa de un protón tomando como referencia la frecuencia de resonancia de los protones del tetrametil silano y expresado en partes por millón (ppm). El δ es sensible a la estructura electrónica del átomo al cual está enlazado (depende de la hibridación del carbono y los efectos de los sustituyentes unidos a ese carbono) y de las interacciones que presenta el protón con el resto de los átomos de la molécula y con las moléculas vecinas. Esta última característica permite el empleo de esta espectroscopía para detectar la formación de complejos no covalentes del tipo anfitrión-huésped.

Con la instrumentación de RMN es posible obtener espectros de buena calidad con concentraciones sub-milimolares (usualmente tan bajas como 10^{-4} M), sugiriendo que RMN puede ser adecuado para obtener K_a hasta y por encima de 10^6 M $^{-1}$. Dicho esto, muchas referencias en la literatura establecen que la concentración 10^{-5} M $^{-1}$ es el límite mínimo para los experimentos de titulaciones en RMN.⁸⁷

6.4.1. Determinación de los valores de pK_a de 2-picolilespiramicina **1b**

Para asignar los sitios de protonación de 2-picolilespiramicina **1b** se realizó un estudio de dependencia del pH sobre el desplazamiento químico de los protones. Se preparó una solución 5 mM en un volumen de 500 μ L de D₂O y se le agregó suficiente ácido acético deuterado para obtener un pH de 1.33. La muestra se tituló agregando alícuotas de NaOD 0.08 M para aumentar el pH de la solución hasta llegar a 9.26 y registrando el espectro de ¹H después de cada adición.

⁸⁷ Nelissen, H. F. M., Smith, D. K. *Chem. Commun.* **2007**, 0, 3039-3041.

Obtención de las constantes de protonación de 2-picolil espiramicina 1b en RMN

Una vez concluida la titulación se graficaron los desplazamientos de RMN ^1H en función de los valores de pH en el programa ORIGIN y posteriormente se hizo el ajuste de los datos experimentales por la ecuación **10**.

$$\delta_{obs}([H^+]) = \frac{\delta_0 + \delta_1 K_1 10^{-pH} + \delta_2 K_2 10^{-2pH} + \dots}{1 + K_1 10^{-pH} + K_2 10^{-2pH} + \dots} \quad (10)$$

Las constantes de protonación se determinan por la curva de titulación ajustada por ésta ecuación. Los valores de δ_n se definen como: δ_0 que es el desplazamiento final en pH básico, δ_1 como el promedio del desplazamiento inicial y el final y δ_2 como el desplazamiento inicial en medio ácido. Los valores de K_1 y K_2 se proponen en el ajuste como los pK_a 's de la molécula.

Obtención del pK_a en D_2O

El grupo de Bal y colaboradores,⁸⁸ reportaron una fórmula que se deriva experimentalmente a partir de lecturas por medio del pH de soluciones equivalentes en H_2O y D_2O , las cuales proveen una herramienta precisa para convertir los valores de pK_a (determinados en H_2O) en aquellos que sean válidos para D_2O y viceversa.

La ecuación **11** tiene aplicaciones universales y su uso se puede considerar para facilitar la planeación de experimentos y para el análisis de resultados y ayuda a evitar errores y discrepancias.

$$pK_a = (0.929)(pK_D) + 0.42 \quad (11)$$

⁸⁸ Krezel, A., Bal, W. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 161-166.

6.4.2. Estudios de reconocimiento molecular de **1b** hacia ATP y ADP mediante titulaciones por RMN ^1H y ^{31}P

Se prepararon soluciones del derivado 2-picolil espiramicina **1b** con concentración 5 mM en un volumen de 550 μL de D_2O y se fijó el pH a 7 con DCI diluído. En el caso de los huéspedes ADP y ATP se prepararon las soluciones con concentración 55 mM en 500 μL . Al tubo que contenía la solución del derivado **1b** se le adicionaron cantidades equimolares del huésped para aumentar la concentración de este último durante la titulación. Se registró el espectro después de cada adición del huésped.

Debido a que los datos de las titulaciones de cada complejo no daban una curva con saturación suficiente para un ajuste, se optó por calcular los desplazamientos inducidos por complejación (Complexation Induced Shifts: CIS, por sus siglas en inglés) de las señales de los de los espectros de RMN de ^1H y de ^{31}P . Los valores de complejación inducida se calcularon con la fórmula:

$$(\delta_{obs} - \delta) \quad (12)$$

En donde δ_{obs} es el desplazamiento químico de una señal medida en soluciones de D_2O en las cuales se encuentra el receptor y el sustrato en la relación molar máxima (1 : 3.75 para el complejo **1b**-ATP y 1 : 2 para **1b**-ADP), δ es el desplazamiento químico de la señal que corresponde al receptor o al sustrato no complejados.⁸⁹

⁸⁹ Covington, A. K., Paabo, M., Robinson, R. A., Bates, R.G. *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 700.

6.5. Estudios por modelado computacional

Las estructuras iniciales de los anfitriones y las moléculas huésped se calcularon empleando la estructura de rayos X reportada por Steitz⁷¹ y fueron construidas en el programa Maestro.⁹⁰ Las estructuras fueron optimizadas empleando mecánica molecular con el campo de fuerza OPLS3⁹¹, tal como está implementado en el paquete computacional Macromodel de Schrodinger inc.⁹² En todos los casos el disolvente acuoso fue simulado con un modelo continuo de tipo Poisson-Boltzman⁹³. En todos los casos se realizó una búsqueda conformacional para encontrar la estructura de mínima energía empleando la rutina CofGen⁹⁴ incluida en Macromodel que utiliza un algoritmo de búsqueda conformacional que implica la rotación de fragmentos de la molécula. Una vez obtenida la estructura de mínima energía se realizó un refinado hasta 0.01 Kcal/mol con un algoritmo Polak-Ribière.⁹⁵

⁹⁰ Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2008** <https://www.schrodinger.com/maestro>

⁹¹ Harder, E.; Damm, W.; Maple, J.; Wu, C.; Reboul, M.; Xiang, J. Y.; Wang, L.; Lupyán, D.; Dahlgren, M. K.; Knight, J. L.; Kaus, J. W.; Cerutti, D.; Krilov, G.; Jorgensen, W. L.; Abel, R.; Friesner, R. A. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12*, 281-290.

⁹² MacroModel, versión 11.1. Schrödinger, LLC, New York, **2008** <https://www.schrodinger.com/citations/>

⁹³ Fixman, M. *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 4995

⁹⁴ Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1757-1768.

⁹⁵ Khoda, K. M.; Liu, Y.; Storey, C. *J Optim Theory Appl.* **1992**, *75*, 345-354.

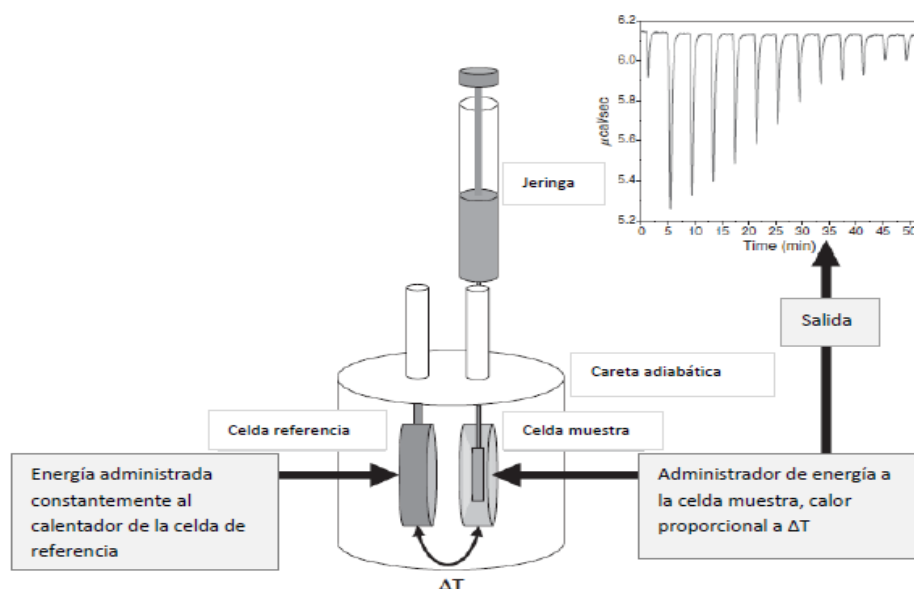
6.6. Estudios de titulación isotérmica por calorimetría (ITC)

En años recientes, la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) ha emergido como uno de los más poderosos métodos para el estudio de interacciones anión-receptor. ITC es especialmente atractiva porque provee acceso a los parámetros termodinámicos individuales correspondientes a las interacciones de enlace propuestas (p. ej. ΔG , ΔH y ΔS). También se pueden usar estudios dependientes de la temperatura (p. ej. RMN, UV-vis) para derivar estos mismos parámetros termodinámicos, tales análisis generalmente son laboriosos, insensitivos y propensos al error. ITC, por otro lado, permite la obtención de una alta energía de asociación dentro de sus componentes individuales entálpicos y entrópicos por medio de mediciones llevadas a cabo a una sola temperatura.

Un calorímetro es capaz de medir la cantidad de muestra que ha reaccionado, o la velocidad de ésta, esto lo hace por medio de la medición de la cantidad del calor absorbido (proceso endotérmico) o el calor generado (proceso exotérmico) en una reacción química, el cual es igual a la cantidad de muestra que reaccionó, n (en moles) y al cambio de entalpia en la reacción, ΔH (en cal/mol). La medición de la velocidad a la cual el calor es intercambiado con el medio es igual a la velocidad de la reacción.

Las mediciones calorimétricas se pueden realizar mediante el proceso de cambio de temperatura (proceso adiabático) y el proceso de compensación de energía (proceso isotérmico). En un instrumento de compensación de energía, la celda de medición del calorímetro está controlada a temperatura constante (isotérmico). Cuando se lleva a cabo una reacción química, el calor producido por la reacción es detectado y la energía aplicada al controlador disminuye para mantener la temperatura constante; es decir, el calor producido por la reacción es compensado por una disminución del calor generado por el controlador. La señal producida por el calorímetro, es la energía ($\mu\text{cal/sec}$) aplicada al controlador de calor para mantener la temperatura de la celda constante, como función del

tiempo; es decir, la energía de calentamiento por el tiempo de la medición (o el tiempo requerido por el controlador para regresar a la línea base (**Esquema 6.1**).⁹⁶



Esquema 6.1. Representación de un ITC de compensación de energía típico.⁹⁶

Sin embargo, ITC no provee información directa sobre la estructura química de los compuestos (como lo hace la espectroscopía de RMN) y requiere ajustar los datos a un modelo de enlace predicho. Las mediciones calorimétricas son importantes para encontrar y estudiar sistemas simples cuyas interacciones huésped-anfitrión puedan ser extrapoladas a sistemas más complejos.

6.6.1. Preparación de las muestras

Se realizaron los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) del derivado 2-picolilespiramicina **1b** con los nucleótidos de adenosina: ATP, ADP y AMP en solución acuosa con las siguientes condiciones: Temperatura 25 °C, Buffer MES 0.05 M, NaCl 0.1 M, pH 7. Las muestras se desgasificaron a vacío durante 5 min previo a cada experimento. Para realizar la titulación, primero se colocó en la celda muestra (dentro del calorímetro), la

⁹⁶ Freyes, M. W., Lewis, E. A. *Methods in Cell Biology*, **2008**, *84*, 79-113.

solución de **1b** (~1.54 mL), y en la jeringa del equipo la solución del huésped (nucleótido de adenosina) (~ 270 µL) que sería el titulante. Se hicieron 29 adiciones, la primera de 1 µL y las siguientes de 10 µL cada una con un tiempo de espaciado de 300 entre cada adición. Se variaron las concentraciones entre el huésped y el anfitrión (las cuales se colocan en la celda y en la jeringa de adición del equipo de ITC respectivamente) y se resumen en la **Tabla 6.3**. Para restar el calor de dilución del buffer se realizó el blanco correspondiente colocando únicamente el huésped en la jeringa y el buffer MES en la celda de trabajo.

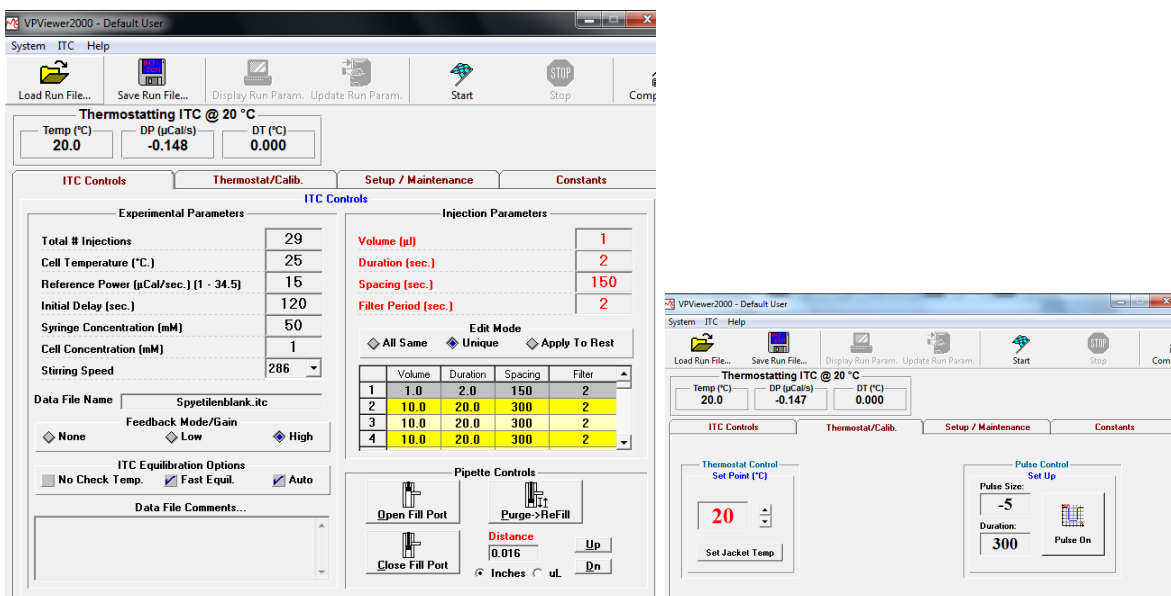
Se obtuvieron las isothermas las cuales fueron ajustadas con la ecuación predeterminada del equipo para un sitio de interacción. Los experimentos señalados en negritas en la **Tabla 6.3**, fueron los que mostraron un comportamiento adecuado para calcular los parámetros del complejo anfitrión-huésped, las curvas de titulación de éstos junto con los ajustes correspondientes se mostrarán en la *sección 7.6 de Resultados y Discusión*.

Tabla 6.3. Condiciones para obtener la *K* de asociación, número de sitios de interacción y las constantes termodinámicas entre el derivado 2-picolil espiramicina **1b** y los nucleótidos de adenosina.

Experimento	Celda	Jeringa
	[SpyPic]/mM	[Nucleótido]/ mM
SpyPic-ATP 1B	1	10
SpyPic-ATP 2B	1	10
<i>BlancoSpyPic-ATP 1B</i>		10
SpyPic-ATP 1C	2	20
SpyPic-ATP 2C	2	10
SpyPic-ATP 3C	2	30
SpyPic-ATP 4C	2.5	25
SpyPic-ATP 5C	1.5	15
SpyPic-ATP 1D, pH 4.5	1	30
<i>BlancoSpyPic-ATP 1D, pH 4.5</i>		30
SpyPic-ATP 2D, pH 4.5	1	10
<i>BlancoSpyPic-ATP 2D, pH 4.5</i>		10
SpyPic-ATP 1E, pH 7	1	10
SpyPic-ATP 2E, pH 7 Sin NaCl	1	10
<i>Buffer ATP 2E, pH 7 Sin NaCl</i>		10
SpyPic ADP 1B	1	10
<i>BlancoSpyPic ADP 1B</i>		10

SpyPic ADP 2B	1	10
SpyPic ADP 1C	2	20
SpyPic ADP 2C	1.5	30
SpyPic ADP 3C	1	30
<i>BlancoSpyPic ADP 3C</i>		30
SpyPic ADP 4C	2	10
SpyPic ADP 5C	1	30
SpyPic ADP 1D, pH 4.5	1	30
<i>Blanco SpyPic ADP 1D, pH 4.5</i>		30
SpyPic AMP 1B	1	10
<i>BlancoSpyPicAMP 1B</i>		10
SpyPic AMP 2B	1	10
SpyPic AMP 1C	1	30
<i>BlancoSpyPicAMP 1C</i>		30
SpyPic AMP 2C	1	20
SpyPic AMP 3C	1	30
SpyPic AMP 4C	1	30

Las especificaciones del experimento se muestran como en el programa MicroCallTC (Esquema 6.2).



Esquema 6.2. Ventana del programa MicroCallTC donde se muestran los parámetros usados durante el experimento.

6.6.2. Ecuaciones para obtener los parámetros termodinámicos

En la titulación calorimétrica o calorimetría de titulación isotérmica el gradiente de la curva se ajusta para determinar la constante de enlace y la integración del área total bajo la curva, da la entalpia de enlace ($\Delta H_{\text{complejo}}$), por lo que se puede calcular la energía libre y la entropía del sistema de las ecuaciones **13** y **14**:

$$\Delta G = -nRT \ln K \quad (13)$$

$$\Delta G_{\text{complejo}} = \Delta H_{\text{complejo}} - T \Delta S_{\text{complejo}} \quad (14)$$

6.6.3. Obtención de la ecuación de ajuste para un sitio de interacción

El calorímetro cuenta con 2 celdas en forma de paleta, la celda de referencia y la celda muestra con volumen V_0 , que contiene a la disolución de interés. El volumen de cada "i" adición es ΔV_i y el volumen total contenido en la celda muestra después de cada adición es ΔV , es decir, la suma total de las adiciones.

En los experimentos en ITC se asume que la concentración inicial de la muestra es M_t° y el ligante añadido (X) tiene una concentración inicial en la celda de cero.

Al inicio del experimento solo V_0 es percibido calorimétricamente; por la forma de la celda cada adición del ligante desplaza el volumen hacia el tubo inactivo ΔV , así la concentración de la muestra M en V no presenta cambios significativos ya que los moles iniciales de M en V, se distribuyen en un volumen mayor: $V_0 + \Delta V$.

La concentración de la muestra en ΔV , es el promedio de la concentración inicial M_t° y la concentración actual M_t en el volumen activo, por lo que se requiere conservar la masa:

$$M_t = M_t^\circ [(1 - \Delta V / 2V_0) / (1 + \Delta V / 2V_0)] \quad (15)$$

Usando un razonamiento similar, se muestra que la concentración actual del ligante (X_t) en V_0 , se relaciona con la concentración X_t° (asumiendo que todo el ligante adicionado permanece en V_0):

$$X_t = X_t^0 [1 / (1 + \Delta V / 2V_0)] \quad (16)$$

Las expresiones anteriores vienen contenidas en el programa Origin para corregir los errores por dilución que se puedan presentar en cada adición y con el que se realizan los ajustes de los datos experimentales obtenidos de la titulación calorimétrica.

6.6.4. Tratamiento de los datos

A partir de la isoterma obtenida del complejo se pueden calcular los parámetros termodinámicos de la reacción, ΔH , ΔS , ΔG , n y K , que se calculan con el programa Origin 7. Estos cálculos se hacen suponiendo que existe un conjunto único de sitios de enlace idénticos. Para esto se requiere de las siguientes ecuaciones en donde:

K es la constante de enlace

n es el número de sitios de enlace

V_0 es el volumen activo de la celda

M_t y $[M]$ son la concentración de la molécula del bulto y libre en V_0

X_t y $[X]$ son la concentración del ligante del bulto y libre

θ es la fracción de sitios ocupados por el ligante X

La ecuación para la constante de enlace es:

$$K = \theta / (1 - \theta) [X] \quad (17)$$

Al combinar las ecuaciones 15, 16 y 17:

$$\theta^2 - \theta [1 + (X_t/nM_t) + (1/nKM_t)] + X_t/nM_t = 0 \quad (18)$$

Para obtener la ecuación de ajuste para un sitio de interacción se tomó en cuenta el calor total Q de la disolución contenido en V_0 a la saturación fraccional θ que se describe:

$$Q = n \theta M_t \Delta H V_0 \quad (19)$$

Donde ΔH es el calor molar de enlace del ligante. Así se toma en cuenta el volumen desplazado por la adición i . La expresión correcta para el calor liberado ΔQ_i de la adición i es:

$$\Delta(i) = Q(i) + dV_i V_0 [Q(i) + Q(i-1)] - Q(i-1) \quad (20)$$

6.7. Estudios por UV-visible

La espectroscopia de Ultravioleta-Visible se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética (en el intervalo de longitudes de onda del ultravioleta y visible) que puede absorber o transmitir una muestra en función de la concentración del analito presente. Todas las técnicas de absorción suponen que cuando una radiación incide sobre una muestra se produce una absorción parcial de esta radiación, lo que hace que se produzca una transición entre los niveles energéticos de la sustancia: átomo, molécula o ion, X, pasando esta al estado excitado, X*, el resto de radiación es transmitida. Así analizando una u otra podemos relacionar la cantidad de especie activa presente en la muestra.

6.7.1. Determinación de los coeficientes de absortividad molar (ϵ) de los derivados de 1a-d (Linealizaciones)

Para obtener el parámetro de ϵ para cada derivado (**1a-d**), se realizaron los experimentos de UV-vis los cuáles se trabajaron con diferentes soluciones amortiguadoras debido a que los derivados presentan diferente solubilidad. Las condiciones para medir la absorción de la muestra a diferentes concentraciones de cada derivado se presentan en la **Tabla 6.4**. Para estos estudios no es necesario tener un blanco para corregir por dilución. Todos los experimentos se hicieron por duplicado. El volumen inicial de las muestras en la celda fue de 2500 μ L. Las adiciones se hicieron agregando cantidades equimolares de la solución madre [M] para obtener diferentes concentraciones de los derivados dentro de la celda.

Tabla 6.4. Condiciones de trabajo utilizadas para las mediciones del coeficiente a absorción molar de **1a-d**.

Derivado	[M]	Disolvente	Intervalo de [M] en la celda
1a	5×10^{-4} M	Solución amortiguadora MES 0.05 M, 0.1 M de NaCl, pH 6.5	1×10^{-7} M – 3.3×10^{-5} M
1b	2×10^{-3} M		4×10^{-6} M – 2.5×10^{-5} M
1c	5×10^{-4} M		4×10^{-6} M – 1.44×10^{-4} M
1d	1×10^{-3} M	DMSO	1×10^{-7} M – 2.3×10^{-5} M
1c	1×10^{-3} M	Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 3	9.9×10^{-6} M – 1.5×10^{-4} M
1d	1×10^{-3} M		3.99×10^{-7} M – 2.3×10^{-5} M

Para los experimentos posteriores de reconocimiento molecular con aniones se eligió la solución amortiguadora de fosfatos a pH 3 para disolver los derivados Naftil espiramicina **1c** y Pirenil espiramicina **1d**.

6.7.2. Ley de Lambert – Beer para la obtención de ϵ

La Ley de Lambert - Beer relaciona la energía radiante en un haz de radiación electromagnética, usualmente luz ordinaria, a la longitud del camino del haz en un medio de absorción y a la concentración de las especies de absorción. La ley combinada se enuncia en la ecuación **21**:

$$A = -\log_{10} \frac{P}{P_0} = \epsilon bc \quad (21)$$

En donde:

A = absorbancia o densidad óptica,

P_0 = intensidad de la luz incidente

P = intensidad de la luz transmitida

ϵ = absortividad o coeficiente de extinción ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

b = espesor del medio absorbente (cm)

c = concentración de las especies de absorción (M)

Es deseable que el huésped añadido no presente ninguna absorción en la región de interés ya que esto simplifica el sistema considerablemente. Esto es usual en el caso de sistemas supramoleculares simples (por ejemplo, en la adición de cationes o aniones que contengan estructuras cromofóricas). Es importante que la complejación cause un cambio notable en el espectro de UV-visible.

6.7.3. Determinación de los valores de pK_a de Naftil espiramicina **1c**

Para llevar a cabo la determinación de los valores de las constantes de protonación del derivado Naftil espiramicina **1c** empleando la técnica de UV-Visible, se preparó una solución madre con concentración 1×10^{-3} M (0.0129 mmol) del derivado y se disolvió en una mezcla 70:30 H_2O -MeOH con fuerza iónica 0.1 M de NaCl. A partir de esta muestra se preparó la dilución que se utilizó para la titulación, con concentración final de 1×10^{-4} M en un volumen

de 50 mL. Se utilizaron soluciones de HCl 1 M y NaOH 2 M estandarizadas para ajustar el pH de la muestra. La titulación se hizo desde pH ácido al básico (Intervalo de pH: 2.97 – 12.49).

La solución del derivado Naftil espiramicina **1c** se mantuvo en agitación mientras se titulaba con una solución estandarizada de NaOH 2 M, el cual se agregó en cantidades constantes de microlitros empleando una pipeta automática. La **Figura 6.14** muestra como ejemplo la titulación de Naftil espiramicina **1c** con NaOH 2 M para el cálculo de las constantes de protonación. El ajuste correspondiente para obtener los pK_a 's se encuentra en el apartado **7.7.2** de **Resultados y discusión**.

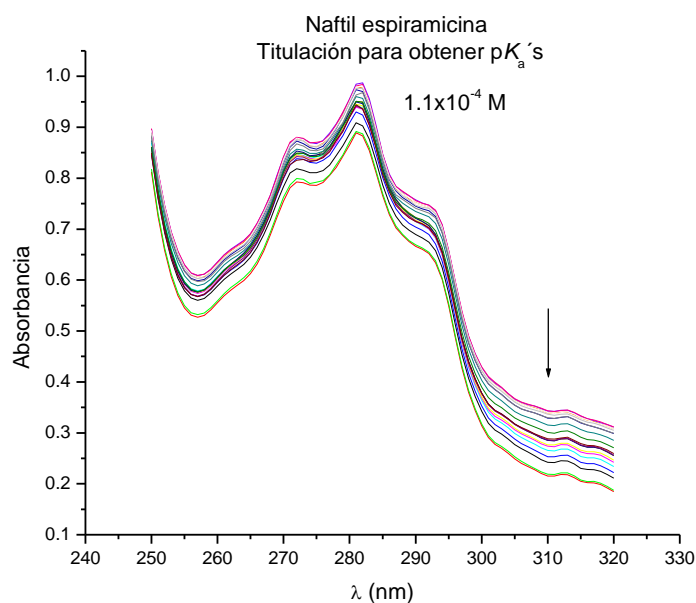


Figura 6.14. Titulación de Naftil espiramicina **1c** [1.1×10^{-4} M] con NaOH 2 M en el intervalo de pH de 2.97 – 12.49 para el cálculo de los pK_a 's.

6.7.4. Tratamiento de los datos obtenidos de la titulación

En el ejemplo mostrado en la **Figura 6.14** se empleó la longitud de onda de 310 nm, que presentó el mayor cambio en la absorbancia, para efectuar el cálculo de los pK_a 's de Naftil espiramicina. Los datos de absorción de esta longitud de onda se dividieron entre la concentración de la muestra (1×10^{-4} M) y se graficaron contra el pH de la titulación. El intervalo de pH graficado fue de 6.49 – 12.49 debido a que en esta zona se observa una mayor saturación.

6.7.5. Ecuación de ajuste para obtener las constantes de protonación de los derivados 1a-d

La gráfica obtenida de la titulación se ajustó con la ecuación **22**. El parámetro espectral A_{obs} se formula como una función de $[H^+]$:

$$A_{obs}([H^+]) = \frac{A_0 + A_1 K_1 10^{-pH} + A_2 K_2 10^{-2pH} + \dots}{1 + K_1 10^{-pH} + K_2 10^{-2pH} + \dots} \quad (22)$$

Los valores de A_n se definen como: A_0 que es la absorbancia final en pH básico, A_1 como el promedio de la absorbancia inicial y la final y A_2 como la absorbancia inicial en medio ácido. Los valores de K_1 y K_2 se proponen como los posibles pK_a 's de la molécula.

6.7.6. Reconocimiento molecular de Naftil espiramicina 1c y Pirenil espiramicina 1d

Para realizar las titulaciones de reconocimiento molecular de los derivados con los nucleótidos de adenina se buscó una solución amortiguadora que cubriera un intervalo de pH entre 3 y 5. A este pH los derivados se lograron disolver y no se degradaron ya que son muy estables en pH's ácidos. En cambio, a pH's mayores de 5 comienzan a precipitar. Se encontró que preparando una solución amortiguadora de fosfatos (tomando en cuenta su pK_a más bajo: 2.12) en medio acuoso y con pH ácido no iba a interferir con la absorbancia de los compuestos. Por lo tanto, se preparó la solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 3 con fuerza iónica 0.1 M de NaCl para disolver las muestras con los receptores y los nucleótidos.

Los espectros de absorción de las titulaciones anfitrión-huésped se obtuvieron preparando las soluciones que se muestran en la **Tabla 6.5**, todas las titulaciones se hicieron en solución acuosa a pH 3 en la solución amortiguadora de fosfatos a 25 °C con un volumen inicial de 2500 μ L del receptor en la celda. Se hicieron varias adiciones de 5 μ L de los nucleótidos con la concentración que se señala en la tabla, en donde al agregar 50 μ L del huésped equivalía a tener una relación anfitrión-huésped 1:1, hasta llegar a 2 equivalentes aproximadamente. Se usaron 2 celdas de trabajo, en una se colocó el receptor con la concentración que se indica y la segunda conteniendo únicamente la solución amortiguadora de fosfatos. A ambas

se les fue agregando la misma cantidad del huésped para posteriormente corregir los datos de absorbancia restando el blanco correspondiente.

Tabla 6.5. Condiciones de titulación en UV-vis para los experimentos de complejación de **1c-d** con los nucleótidos.

Condiciones de titulación	Receptores	
	Naftil espiramicina 1c	Pirenil espiramicina 1d
Concentración en la celda	1.22×10^{-4} M	2×10^{-5} M
Concentración de AMP, ADP y ATP	6.10×10^{-3} M	1×10^{-3} M
Disolvente	Solución amortiguadora de fosfatos pH 3	

En la **Figura 6.15** se puede observar el espectro de la titulación de Naftil espiramicina **1c** con AMP. El derivado **1c** presenta tres bandas de absorción características en $\lambda = 272$, 290 y una absorbancia máxima en $\lambda = 280$ nm. Por otra parte, los nucleótidos de adenina presentan bandas de absorción en 208 y 260 nm, debido a que existe interferencia en las bandas de ambas especies, se decidió analizar los datos de la longitud de onda de 290 nm. Los resultados de estas gráficas se encuentran en la *sección 7.7.3 del apartado: Resultados y Discusión*.

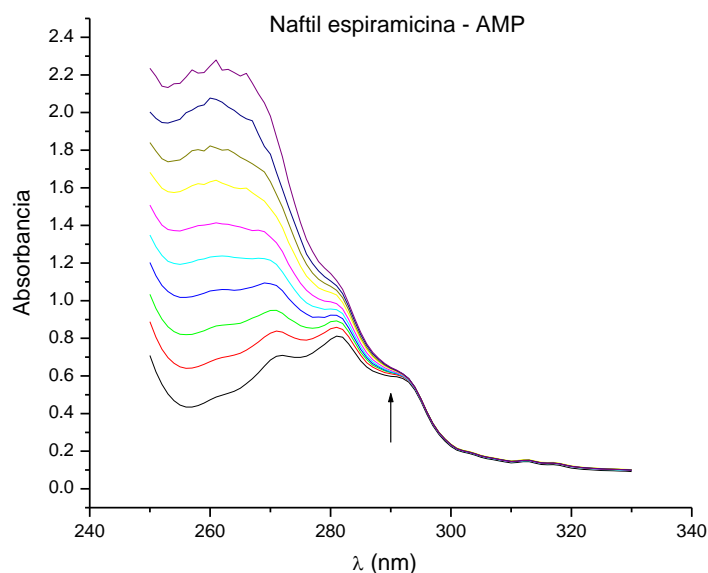


Figura 6.15. Titulación de la complejación entre Naftil espiramicina **1c** [1.22×10^{-4} M] con AMP [6.1×10^{-3} M] en solución amortiguadora de fosfatos a pH 3.

Por otro lado, en la **Figura 6.16** se muestra un ejemplo de la titulación de Pirenil espiramicina **1d** con AMP, en donde se pueden observar las bandas características de la unidad de pireno en 312, 326 y 342 nm. Para este espectro se eligieron las bandas de absorción en 326 y 342 nm para su análisis ya que son las bandas que no presentan interferencia con la absorción del blanco.

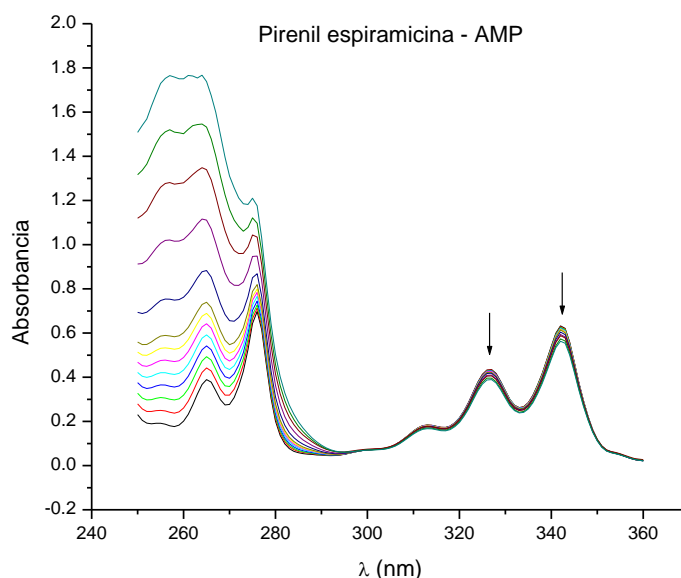


Figura 6.16. Titulación de la complejación entre Pirenil espiramicina **1d** [2×10^{-5} M] con AMP [1×10^{-3} M] en solución amortiguadora de fosfatos a pH 3.

6.7.7. Tratamiento de datos obtenidos de titulaciones anfitrión-huésped

Todos los datos y las gráficas obtenidas se hicieron en el programa Origin 6.0. Una vez que se obtiene el espectro de absorción, se eligen las bandas de longitud de onda que presentan mayor cambio al adicionar el huésped. Las bandas se corrigen por dilución con la ecuación **23** que se muestra a continuación, (A es absorbancia y V volumen):

$$A_{\text{corregida}} = \frac{[(A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}})(V_{\text{inicial en la celda}} + V_{\text{agregado}})]}{V_{\text{inicial en la celda}}} \quad (23)$$

Una vez hecho esto, se grafica la absorbancia corregida contra la concentración del huésped adicionado en la longitud de onda a analizar. El ajuste de estos datos se hace utilizando la ecuación **24** para considerar una estequiometría 1:1 entre el huésped y el anfitrión.

$$A_{obs} = \frac{A_0 + A_{\infty}K[H]_T}{1 + K[H]_T} \quad (24)$$

Donde A_{obs} es la absorbancia observada, A_0 es la absorbancia del receptor en ausencia del huésped, A_{∞} es el cambio máximo de la absorbancia inducido por la presencia del huésped, $[H]_T$ es la concentración total del huésped y K es la constante de asociación.⁹⁷

Con finalidad de poder realizar un mejor ajuste de los datos, éstos se transformaron en $-\log [X]$ y la absorbancia como ΔA para obtener un modelo sigmoidal que nos permitiera calcular la constante de asociación en la complejación, pero no fue posible encontrar un modelo de ajuste adecuado para este tipo de gráficas ya que el modelo sigmoidal implica un proceso más complejo que la asociación. En la *sección 7.7.3 del apartado: Resultados y Discusión* se muestran las gráficas obtenidas de esta transformación ($-\log [\text{Huésped}]$ contra ΔA) y las gráficas de $[\text{Huésped}]$ contra absorbancia corregida.

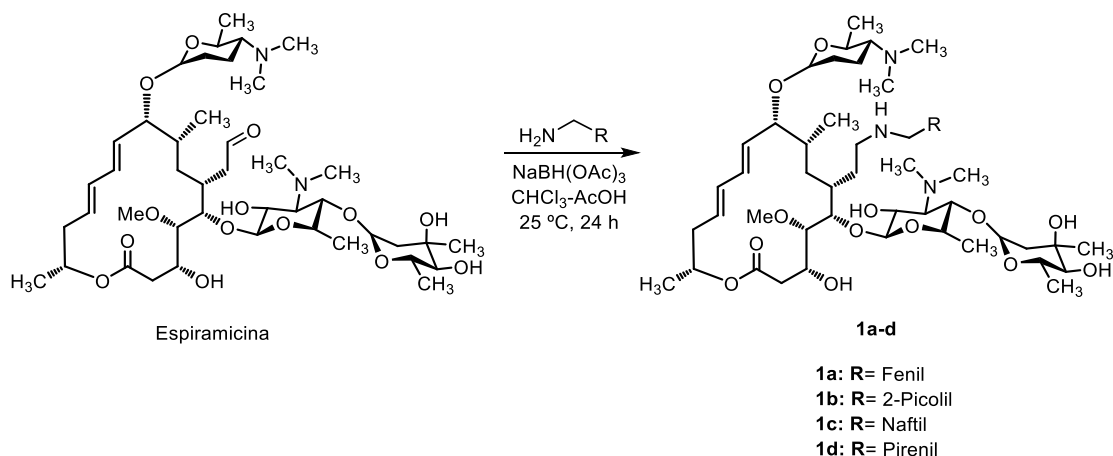
⁹⁷ H.-J. Schneider, A. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons: England, **2000**.

Resultados y discusión

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Síntesis de los derivados

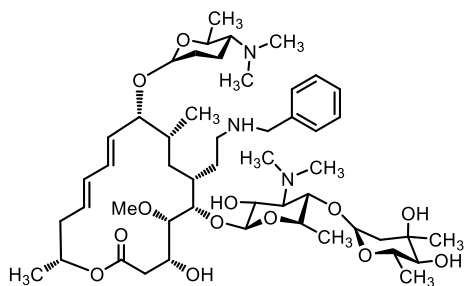
La modificación química de la espiramicina se hizo para obtener derivados con propiedades nuevas y atractivas. Especialmente para agregar grupos funcionales capaces de producir una señal analítica en la espectrometría UV-visible durante los fenómenos de reconocimiento molecular o mejorar la selectividad en agua por el establecimiento de interacciones del tipo $\pi - \pi$ o $\text{CH} \cdots \pi$ que involucran a grupos aromáticos. Para explorar estas hipótesis se planteó que la síntesis de los derivados de espiramicina se podría llevar a cabo mediante una reacción tricomponente de aminación reductiva entre el grupo aldehído de la espiramicina, una amina y triacetoxiborohidruro de sodio como agente reductor. La reacción se llevó a cabo empleando cloroformo como disolvente, ácido acético como catalizador y a temperatura ambiente durante 24 h (**Esquema 7.1**).



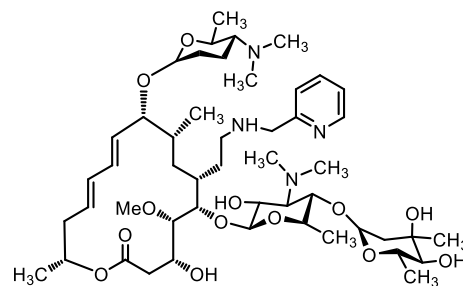
Esquema 7.1. Esquema de síntesis de los derivados de Espiramicina **1a-d**.

Mediante este método, primero se genera una imina a través de la reacción del aldehído de la espiramicina con la amina, liberando una molécula de agua, posteriormente el triacetoxiborohidruro de sodio reduce esta imina dando lugar a la amina secundaria en los derivados de espiramicina. A continuación, se muestran las estructuras de los derivados de espiramicina obtenidos y el rendimiento con el que se obtuvieron (**Esquema 7.2**). Tal como se pudo constatar a partir del rendimiento químico, el proceso de aminación reductiva

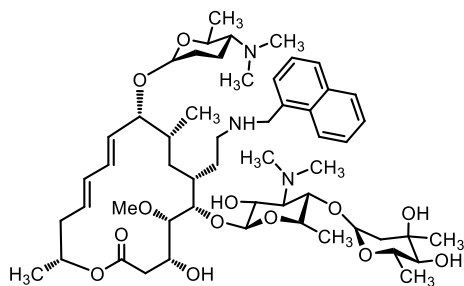
empleada para la obtención de los derivados de espiramicina es altamente eficiente. Los nombres correctos de cada derivado son: N-bencilamino-espiramicina **1a**, N-(2-piridil) metilamino-espiramicina **1b**, N-(1-naftil) metilamino-espiramicina **1c** y N-(2-pirenil) metilamino-espiramicina **1d**; en el **Esquema 7.2** se mencionan con los nombres cortos que se usaron durante todo el documento para mayor simplicidad.



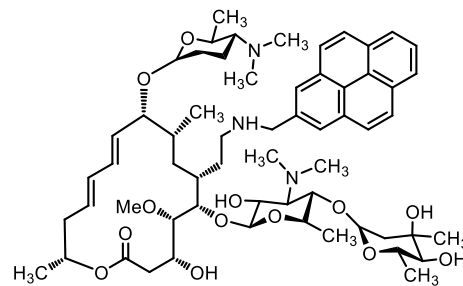
Bencil espiramicina, **1a**; 98%



2-Picolil espiramicina, **1b**; 96%



Naftil espiramicina, **1c**; 93%

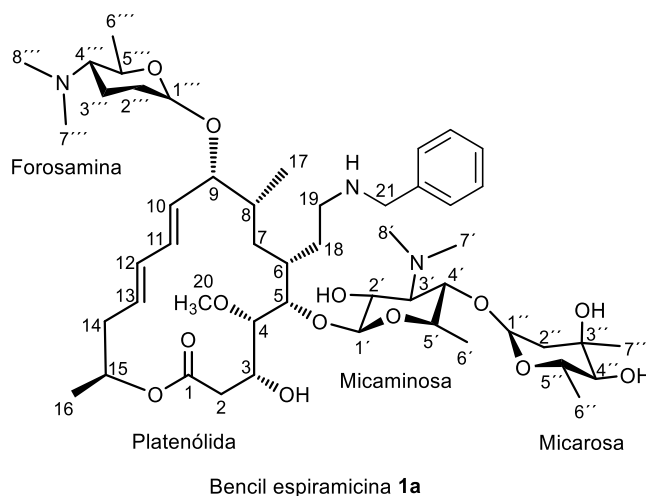


Pirenil espiramicina, **1d**; 91%

Esquema 7.2. Estructuras de los derivados de Espiramicina **1a-d**.

7.2. Caracterización de los derivados por RMN ^1H y ^{13}C

La obtención de todos los derivados se confirmó mediante las técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H , ^{13}C y espectrometría de masas. La caracterización se realizó por comparación de los espectros anteriormente asignados de la espiramicina y se encuentran en la sección **2.11.1 Estructura química de la espiramicina**. En el espectro de ^1H del primer derivado: Bencil espiramicina **1a**, como era de esperarse, ya no está presente la señal del grupo aldehído de la espiramicina (δ : 9.82). Las señales del metileno adyacente al grupo aldehído (CH_2CHO) ahora se observan como una señal ancha en δ : 1.64 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, 18H). Adicionalmente, el carbono del aldehído se convierte en un metileno (CH_2NH , 19H) y se observa como una señal triple ($J = 7.0$ Hz) en δ : 2.77. Finalmente, el metileno del grupo bencilo (CH_2Ph , 21H) se distingue como un sistema AB ($J = 12.6$ Hz) en δ : 3.79 (**Figura 7.1**).



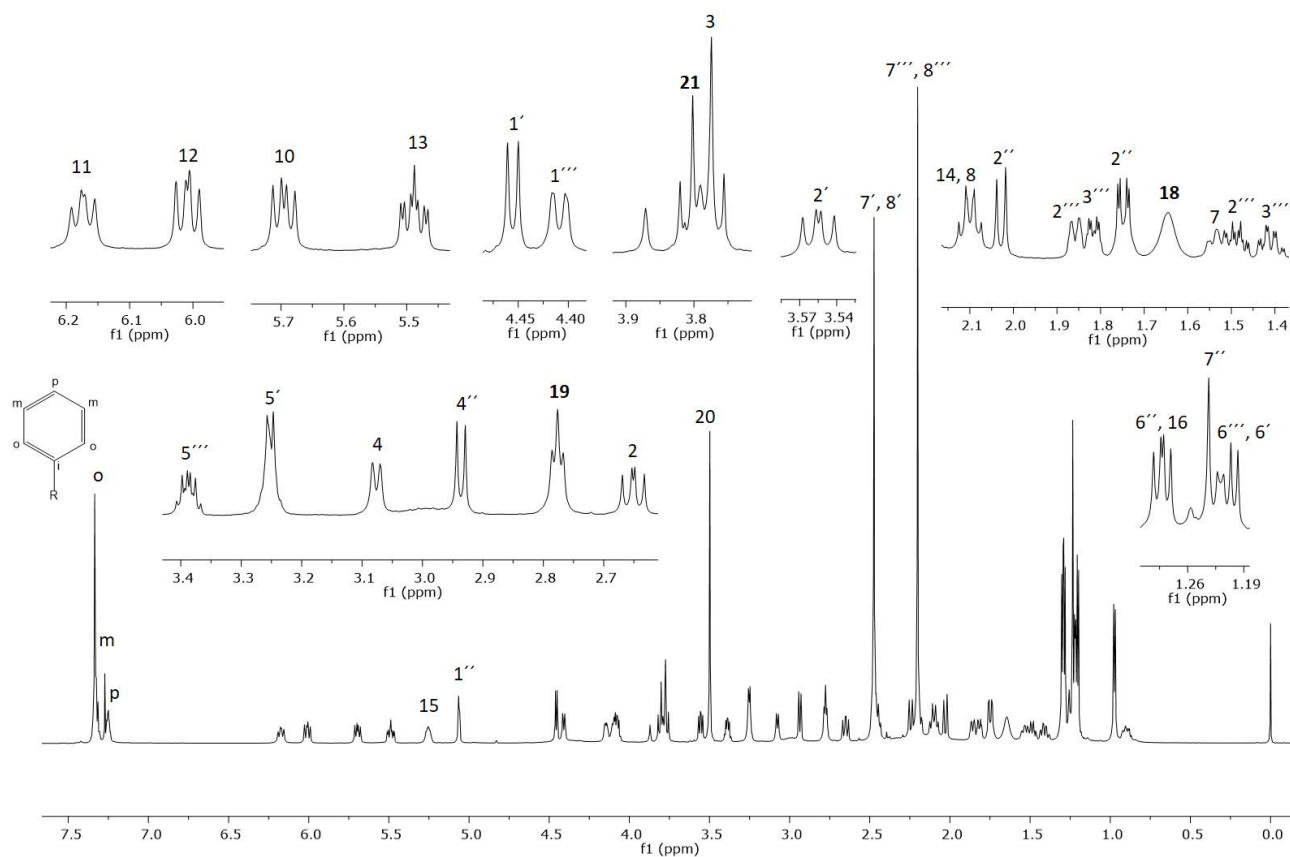


Figura 7.1. Espectro de RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) de Bencil espiramicina **1a**, 5×10^{-3} M.

Por otra parte, en el espectro de RMN ^{13}C también se puede ver claramente la desaparición del grupo aldehído de la espiramicina (δ : 202.8). El carbono adyacente al aldehído (CH_2CHO , δ : 43.2) se desplaza como ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, 18C) a δ : 27.4. Adicionalmente, la señal del metileno proveniente del grupo aldehído (CH_2CHO) cambia su ambiente químico (ahora CH_2NH , 19C) y muestra su desplazamiento en δ : 46.6. Finalmente, el carbono bencílico (CH_2Ph , 21C) aparece en un desplazamiento de δ : 54.2 (**Figura 7.2**).

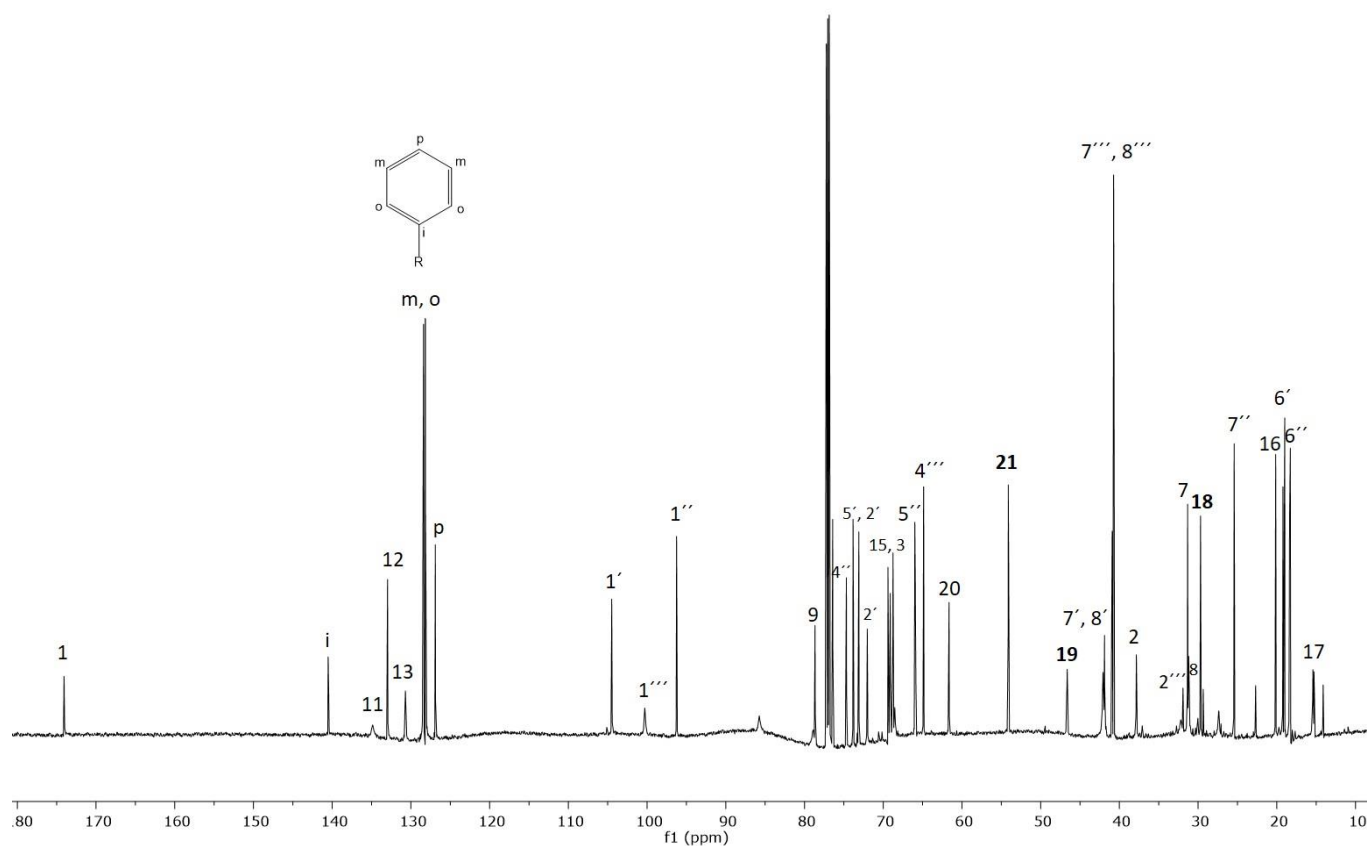


Figura 7.2. Espectro de RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) de Bencil espiramicina **1a**, 5×10^{-3} M.

En el **Apéndice G**: *Espectros de RMN (^1H , ^{31}C , COSY y HSQC) y masas*, se presentan todos los espectros (**Esquemas G.1 - G.18**) y la caracterización completa de los derivados **1a-d**.

7.3. Estudios por potenciometría

Se determinaron las constantes de protonación de los derivados **1a-c** en diferentes mezclas de disolventes de acuerdo a la solubilidad particular de cada compuesto: agua - metanol (9:1 V/V) para **1a**, solución acuosa para **1b** y agua - metanol (9.5:0.5 V/V) para **1c**, utilizando diferentes concentraciones de cada derivado.

7.3.1. Determinación de constantes de protonación (pK_a 's) de los derivados 1a-c

El conocimiento de las constantes de acidez de los receptores tipo poliamina es crítico para establecer las condiciones de pH bajo las cuales los compuestos se encuentran protonados en solución acuosa y si es capaz de unirse a los aniones. Además, los valores de pK_a son información absolutamente necesaria para determinar las constantes de afinidad de los derivados con las distintas moléculas huésped por medio de potenciometría. Por otro lado, en el caso de los fármacos, se requiere del conocimiento preciso de las constantes de acidez para comprender los patrones de solubilidad y transporte de las moléculas en los sistemas biológicos. La importancia de introducir otro átomo de nitrógeno a la estructura del macrólido radica en obtener moléculas tribásicas que puedan presentar una mayor carga catiónica que el precursor espiramicina. Con lo anterior en mente se llevaron a cabo estudios de titulación por potenciometría para determinar las constantes de protonación de los derivados Bencil espiramicina **1a**, 2-Picolil espiramicina **1b** y Naftil espiramicina **1c**.

Bencil espiramicina 1a

El derivado **1a** es muy poco soluble en agua; por lo tanto, los estudios por potenciometría se realizaron en una mezcla agua-metanol (9:1 V/V) con una concentración de 5×10^{-4} M del derivado. En la **Figura 7.3** se presenta la curva de titulación donde se muestra el pH vs el volumen agregado de NaOH. En la figura se aprecia una zona de amortiguamiento en el intervalo de pH de 5.5 – 9.7 que corresponde a la disociación reversible de tres protones ($H_3L = L + 3H^+$).

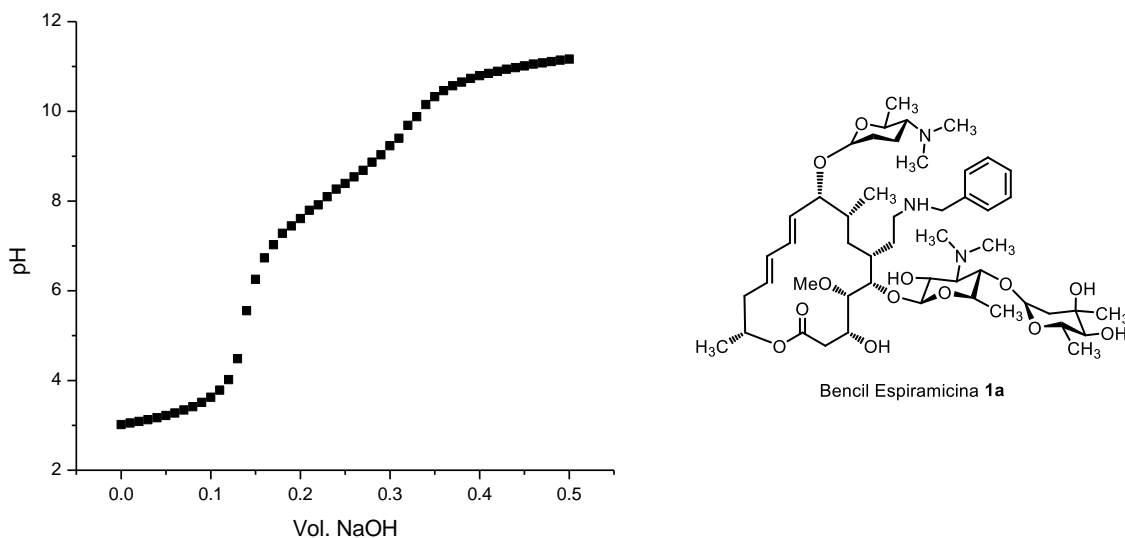


Figura 7.3. Curva de titulación de Bencil espiramicina **1a** (5×10^{-4} M) con NaOH valorado (0.0785 M), en atmósfera inerte de nitrógeno, a 25 °C y 0.1 M de NaCl. Se adicionaron 3 equivalentes de HCl 1 M con respecto al derivado.

El ajuste de los datos con el programa HYPERQUAD (**Figura 7.4**), permitió el cálculo de tres constantes de protonación (pK_a) las cuales fueron asignadas a los diferentes grupos amino protonables. Los valores de constantes de protonación para bencil espiramicina **1a** se asignaron de acuerdo a la basicidad de las aminas. Las aminas secundarias sustituidas (en este caso por el fragmento de bencilo) son bases fuertes, por lo tanto se le asignó el pK_a más alto a la amina secundaria adyacente al anillo aromático.⁹⁸ Para el caso de los aminoazúcares, se tomó en consideración un estudio previo realizado para su precursor espiramicina⁸⁰ en donde se determinaron sus constantes de protonación por potenciometría y por RMN ^1H en donde se confirmó que la forosamina tiene el pK_a más básico (8.44) y la micaminosa el menos básico (7.49), además, estructuralmente se debe tener en cuenta que la amina de la forosamina (**Tabla 7.1**).

⁹⁸ Droge, S. T. J., Hermens, J. L. M., Rabone, J., Gutsell, S., Hodges, G. *Environ. Sci.: Processes Impacts*, **2016**, *18*, 1011–1023.

Tabla 7.1. Valores de pK_a de Bencil espiramicina **1a**

Valor de pK_a	Posición del grupo
$pK_{a1} = 6.83 \pm 0.10$	Micaminosa
$pK_{a2} = 8.21 \pm 0.07$	Forosamina
$pK_{a3} = 8.99 \pm 0.09$	Amina secundaria

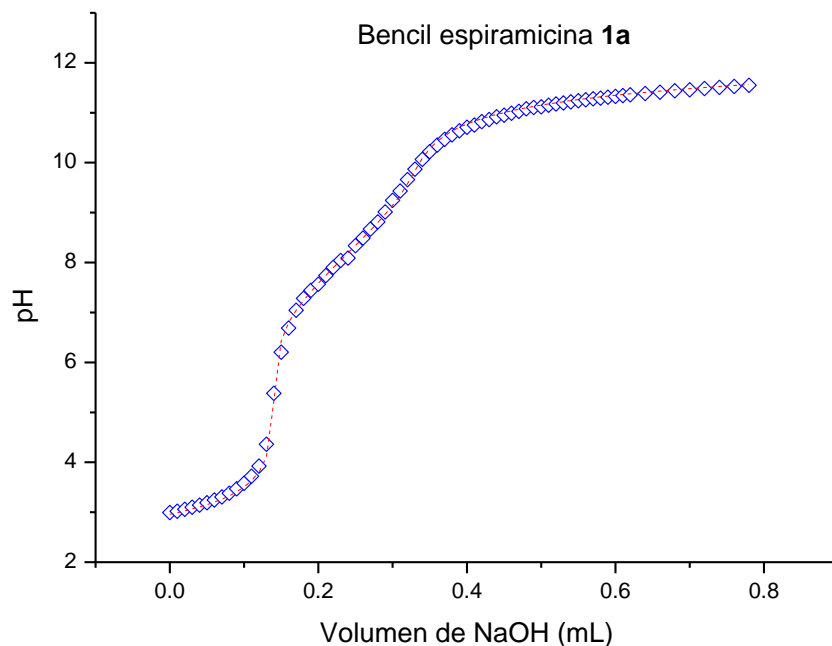


Figura 7.4. Curva de titulación de **1a** (5×10^{-4} M), 0.1 M de NaCl a 25 °C en HYPERQUAD. Los datos experimentales se indican con (\diamond) y la curva de las constantes de estabilidad acumulativas refinadas se indican como (---).

A partir de los valores de pK_a 's del derivado **1a**, se calculó el diagrama de abundancia de especies (utilizando el programa HYSS 2009), en el que se indica la proporción de cada especie presente en solución correspondiente a cada valor de pH (ver **Figura 7.5**).

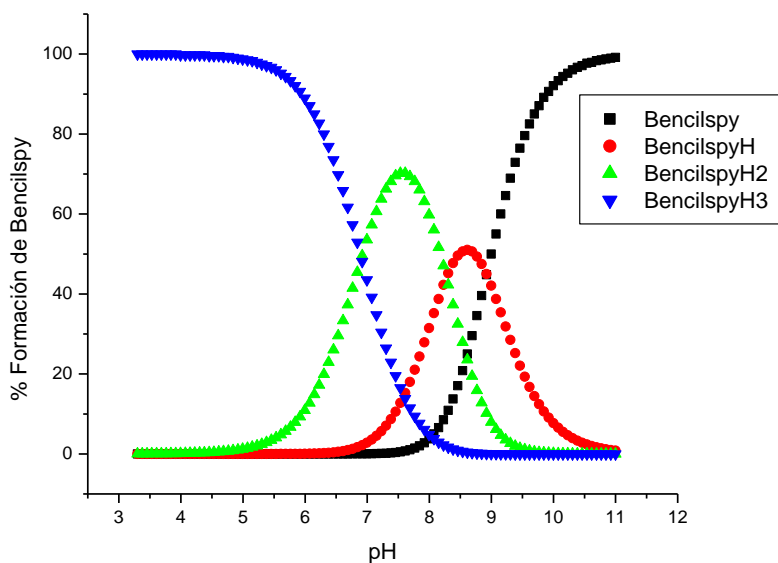


Figura 7.5. Diagrama de abundancia de especies para Bencil espiramicina **1a** (5×10^{-4} M), 0.1 M NaCl, 25 °C.

En el diagrama de especies se puede apreciar que en el intervalo de pH 7 - 8, la especie más abundante del derivado **1b** es la forma diprotonada con un 70% de formación a pH 7.5. Basándose en el diagrama anterior se obtuvo la **Tabla 7.2**, en la cual se muestra el porcentaje máximo de cada especie, el pH en el cual se encuentra ese máximo y el grupo al que pertenece cada especie.

Tabla 7.2. Resumen de los porcentajes de formación de las especies protonadas para **1a** a diferentes valores de pH. Valores obtenidos del diagrama de especies.

Especie	Posición de grupo	% de la especie	pH
LH₃	Micaminosa	99	4.6
LH₂	Forosamina	70	7.6
LH	Bencilamina	51	8.6
L	Especie libre	98	10.6

2-Picolil espiramicina 1b

El derivado **1b** fue soluble en agua, por lo tanto, fue más fácil determinar sus constantes de acidez por medio de potenciometría, logrando obtener incluso el pK_a más bajo que es el correspondiente al anillo de piridina. Las titulaciones se realizaron en atmósfera inerte de nitrógeno a temperatura constante (25 °C), con concentraciones de 2×10^{-3} M y fuerza iónica

0.1 de NaCl. Se agregaron 4 equivalentes de HCl 1 M. En la **Figura 7.6** se presenta la curva de titulación graficada contra el volumen agregado de NaOH con respecto al pH. Partiendo de la gráfica obtenida en Origin, se calculó el intervalo de pH de 0 – 5.6 en donde se observa la primera zona de amortiguamiento de la titulación en la cual existe la especie ($H_4L = H_3L + H^+$). La segunda zona de amortiguamiento se encuentra en el intervalo de pH 5.6 – 9.9 la cual corresponde a la disociación reversible de tres protones ($H_3L = L + 3H^+$).

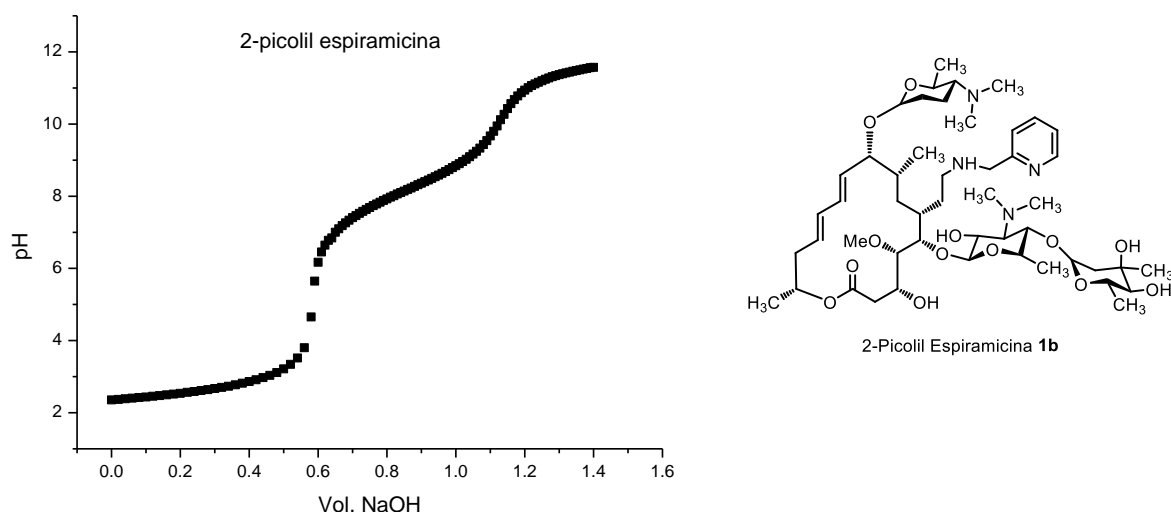


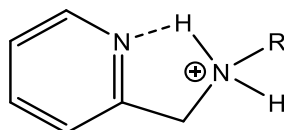
Figura 7.6. Curva de titulación de 2-Picolil espiramicina **1b**, (2×10^{-3} M) con NaOH valorado (0.0182 M), en atmósfera inerte de nitrógeno, a 25 °C y 0.1 M de NaCl. Se adicionaron 4 equivalentes de HCl 1 M con respecto al derivado.

El ajuste de los datos obtenidos en la titulación potenciométrica se realizó con el programa HYPERQUAD 2013 (**Figura 7.7**) obteniéndose cuatro constantes de protonación (pK_a) los cuales fueron asignados a los diferentes grupos amino protonables; en esta titulación se logró obtener el pK_a del fragmento de piridina (**Tabla 7.3**).

Tabla 7.3. Valores de pK_a de 2-picolil espiramicina **1b**.

Valor de pK_a	Posición del grupo
$pK_{aPy} = 2.78 \pm 0.20$	Piridina
$pK_{a1} = 7.37 \pm 0.05$	Micaminosa
$pK_{a2} = 8.19 \pm 0.04$	Forosamina
$pK_{a3} = 8.78 \pm 0.34$	Amina secundaria

El anillo del fragmento 2-piridilo en **1b** tiene un pK_a más bajo que su análogo piridina en forma libre ($pK_a = 5.17$);⁹⁹ este valor presenta una gran incertidumbre pero su inclusión en el modelo mejoró el ajuste de los datos experimentales (en HYPERQUAD) en la parte ácida de la curva de titulación. Ésto se pudo comprobar más adelante al observar el desplazamiento de las señales aromáticas en RMN 1H en dependencia con el pH. Probablemente la disminución de la basicidad del átomo de nitrógeno de la piridina se deba a la repulsión generada entre el grupo aminometil protonado y el anillo de piridina protonado. Por otro lado, la cercanía entre el grupo aminometil y el anillo piridina también puede generar un puente de hidrógeno intramolecular pudiendo reducir significativamente la basicidad del átomo de nitrógeno del anillo de piridina (**Esquema 7.3.**).



Esquema 7.3. Propuesta de puente de hidrógeno intramolecular en la 2-picolilamina.

Para asignar los valores de pK_a de 2-picolil espiramicina **1b**, se tomaron en cuenta los mismos principios anteriormente descritos, en donde la basicidad de las aminas secundarias que cuentan con un sustituyente es de suma importancia para la asignación del pK_a más básico. De igual manera, para la asignación de los pK_a 's de los aminoazúcares, se tomó en cuenta el antecedente previo de espiramicina en donde la micaminosa tiene el pK_a más bajo y la forosamina queda con un valor intermedio para el caso del derivado **1b**.

⁹⁹ A) Grandberg, I. I., Faizova, G. K., Kost, A. N. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1966**, 2, 561-566. B) Anderegg, G., Popov, K., Pregosin, P.S. *Helv. Chim. Acta*, **1986**, 69, 329-332.

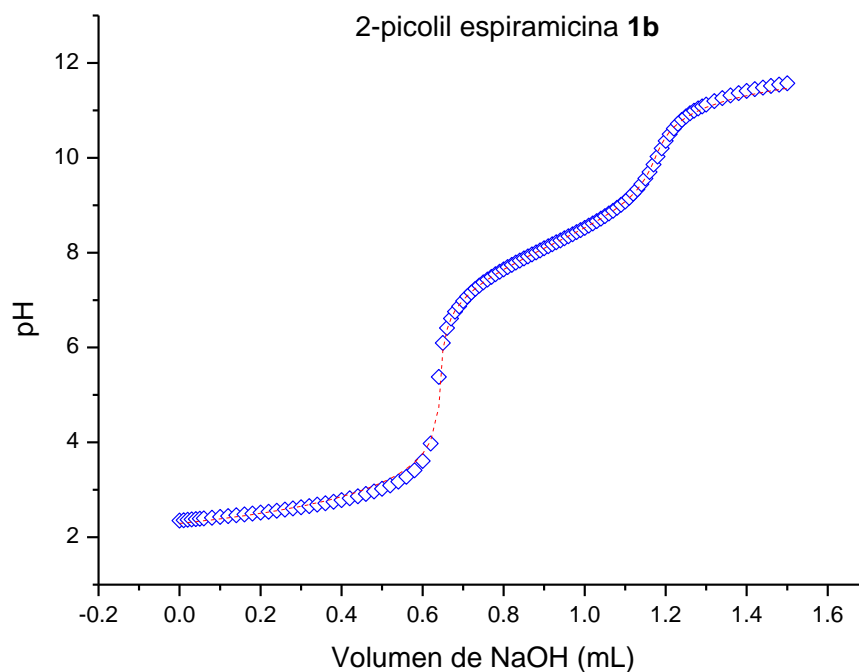


Figura 7.7. Curva de titulación de **1b** (2×10^{-3} M), 0.1 M de NaCl a 25 °C en HYPERQUAD. Datos experimentales se indican con (\diamond) y la curva de las constantes de estabilidad acumulativas refinadas se indican como (---).

A partir de los valores obtenidos de pK_a se calculó el diagrama de abundancia de especies (con el programa HySS 2009) que indica la proporción de cada especie presente en solución a cada valor de pH (ver **Figura 7.8**).

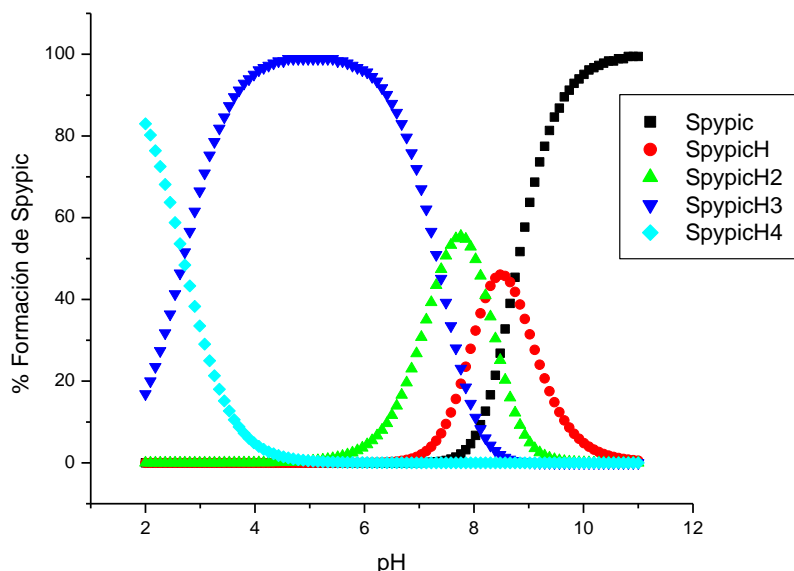


Figura 7.8. Diagrama de abundancia de especies para 2-Picolil espiramicina **1b** (2×10^{-3} M), 0.1 M NaCl.

En el diagrama de especies se puede apreciar que en el intervalo de pH 7 - 8, la especie más abundante del derivado **1b** es la forma diprotonada con un 55% de formación a pH 7.8. Con base en el diagrama anterior se obtuvo la **Tabla 7.4**, en la cual se muestra el porcentaje máximo de cada especie, el pH en el cual se encuentra ese máximo y el grupo al que pertenece cada especie.

Tabla 7.4. Resumen de los porcentajes de formación de las especies protonadas para **1b** a diferentes valores de pH. Valores obtenidos del diagrama de especies.

Especie	Posición de grupo	% de la especie	pH
LH₄	Anillo de piridina	82	2.0
LH₃	Micaminosa	99	5.0
LH₂	Forosamina	55	7.8
LH	2-picolil amina	46	8.5
L	Especie libre	99	10.7

Naftil espiramicina 1c

Con la finalidad de lograr la completa disolución del derivado **1c** en la mayor concentración de agua, se utilizó un sistema Agua-Metanol 9.5:0.5 V/V en el cual fue necesario agregar HCl

diluido, bajando el pH hasta 3.5, con una concentración 5×10^{-4} M. Las titulaciones se realizaron bajo las mismas condiciones que los derivados **1a** y **1b** (atmósfera inerte de nitrógeno, a 25 °C e $I = 0.1$ M de NaCl). En la **Figura 7.9** se presenta la curva de titulación graficada del pH contra el volumen agregado de NaOH. A partir de la gráfica obtenida en Origin, se obtuvo el intervalo de pH de 5.4 – 9.5 de la zona de amortiguamiento la cual corresponde a la disociación reversible de tres protones ($H_3L = L + 3H^+$).

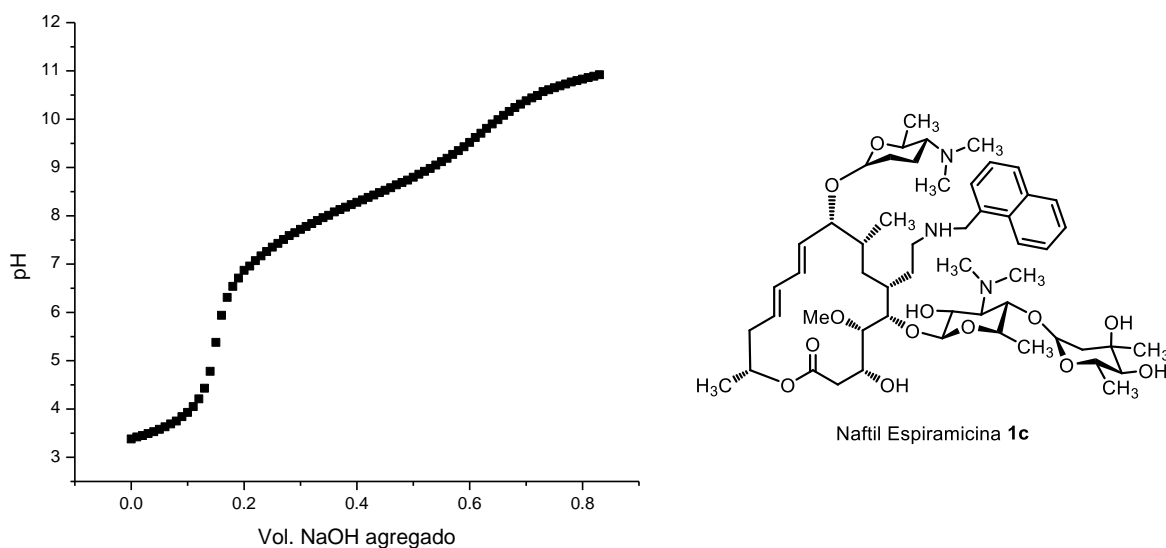


Figura 7.9. Curva de titulación de Naftil espiramicina **1c** (5×10^{-4} M) con NaOH valorado (0.03 M), con atmósfera inerte de nitrógeno, a 25 °C y 0.1 M de NaCl. Se adicionaron 3 equivalentes de HCl con respecto al derivado.

El ajuste de los datos con el programa HYPERQUAD (**Figura 7.10**) dio tres constantes de protonación (pK_a) las cuales fueron asignadas a los diferentes grupos amino protonables (**Tabla 7.5**). Como se hizo con los derivados anteriores (**1a-b**), los valores de pK_a de **1c** se asignaron de la misma manera, de acuerdo a la basicidad de la amina secundaria sustituida y a los antecedentes de la espiramicina. En donde, el pK_a más básico fue asignado para la amina secundaria correspondiente al fragmento de naftilo, el pK_a intermedio a la amina terciaria de la forosamina y el valor de pK_a menos básico se le asignó a la amina de la micaminosa.

Tabla 7.5. Valores de pK_a de Naftil espiramicina **1c**

Valor de pK_a	Posición del grupo
$pK_{a1} = 7.19 \pm 0.02$	Micaminosa
$pK_{a2} = 8.30 \pm 0.01$	Forosamina
$pK_{a3} = 8.98 \pm 0.02$	Amina secundaria

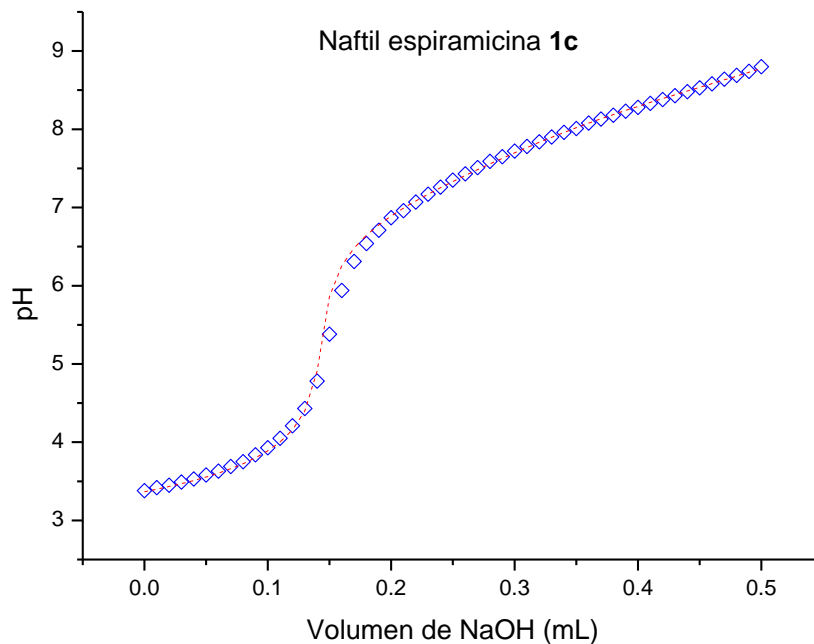


Figura 7.10. Curva de titulación de **1c** (5×10^{-4} M), 0.1 M de NaCl a 25 °C en HYPERQUAD. Datos experimentales se indican con (\diamond) y la curva de las constantes de estabilidad acumulativas refinadas se indican como (---).

Se calculó el diagrama de abundancia de especies (utilizando HYSS 2009) en cual se indica la proporción de cada especie presente en solución correspondiente a cada valor de pH (ver **Figura 7.11**).

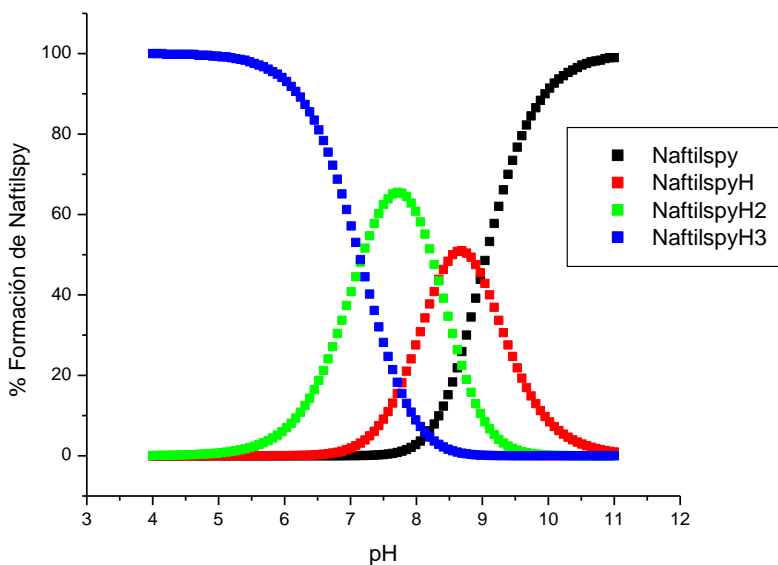


Figura 7.11. Diagrama de abundancia de especies para Naftil espiramicina **1c** (5×10^{-4} M), 0.1 M NaCl.

En el diagrama de especies se puede apreciar que en el intervalo de pH de 7 y 8, la especie más abundante del derivado **1c** es la forma diprotonada con un 65% de formación a pH 7.7. Con base en el diagrama anterior se obtuvo la **Tabla 7.6**, en la cual se muestra el porcentaje máximo de cada especie, el pH en el cual se encuentra ese máximo y el grupo al que pertenece cada especie.

Tabla 7.6. Resumen de los porcentajes de formación de las especies protonadas para Naftil espiramicina **1c** a diferentes valores de pH. Valores obtenidos del diagrama de especies.

Especie	Posición de grupo	% de la especie	pH
LH₃	Micaminosa	99	5.0
LH₂	Forosamina	65	7.7
LH	Naftil amina	51	8.7
L	Especie libre	97	10.5

Resumen de las constantes de protonación de los derivados 1a-c

En la **Tabla 7.7** se resumen las constantes de protonación de la espiramicina y sus derivados **1a-c** determinadas experimentalmente por potenciometría en diferentes sistemas de solubilidad. Los valores de pK_a más altos fueron asignados para las aminas secundarias, que se

convierten en bases más fuertes al estar sustituidas por fragmentos alquil aromáticos, los cuales por efecto inductivo le confieren un aumento a la basicidad de la amina. Por otro lado, los valores de pK_a reportados en la literatura para las aminas aromáticas son de 9.3 para bencilamina y de 9.7 para 1-naftilmetilamina.¹⁰⁰

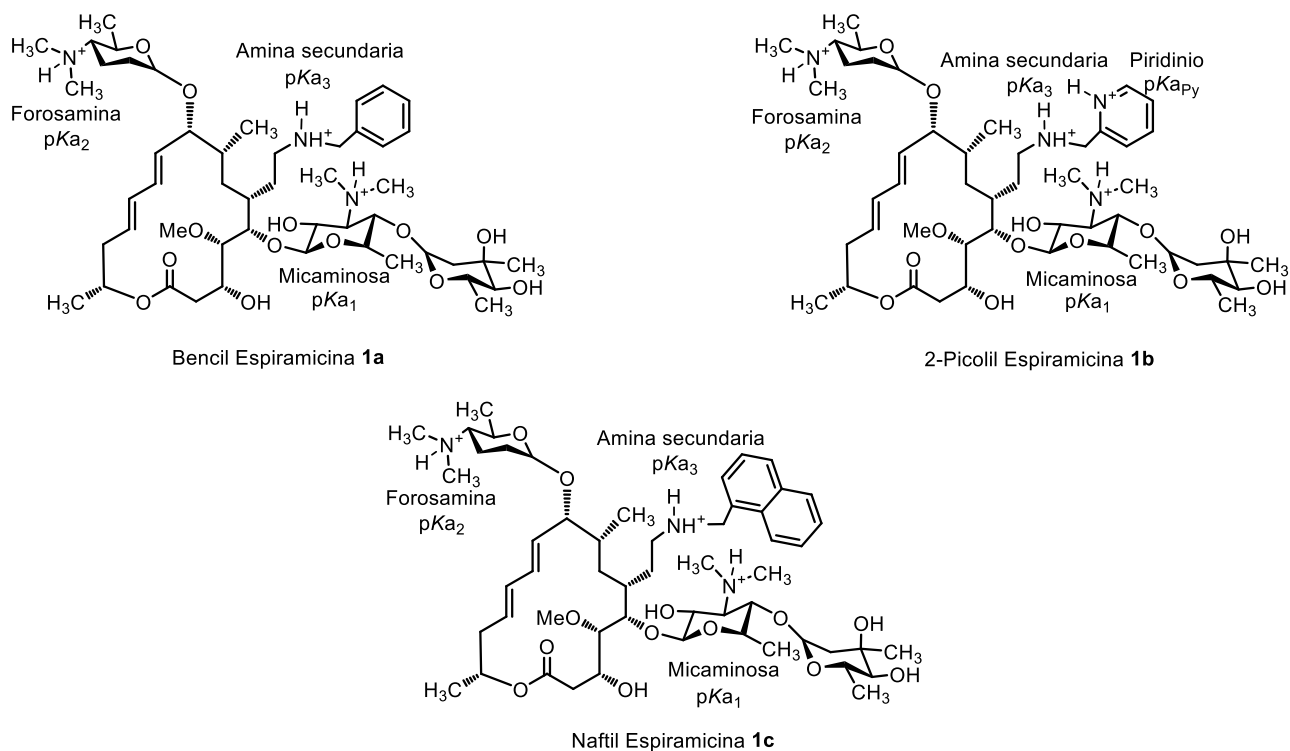
Los pK_a 's intermedios se asignaron con base en lo obtenido para el precursor espiramicina, en donde los sitios de protonación se comprobaron por el desplazamiento de las señales de los metilos de los aminoazúcares forosamina y micaminosa por RMN 1H , en donde las señales sufren un desplazamiento a campo bajo conforme el pH disminuye, la señal correspondiente a forosamina comienza su desplazamiento a un pH más alto que la micaminosa.

Tabla 7.7. Constantes de protonación de los derivados **1a-c** y espiramicina.

	Posición de grupo	Bencil espiramicina 1a	2-Picolil espiramicina 1b	Naftil espiramicina 1c	Espiramicina
		<i>H₂O-MeOH</i> 9:1 V/V	<i>H₂O</i>	<i>H₂O-MeOH</i> 9.5:0.5 V/V	<i>H₂O</i>
pK_{aPy}	Piridina	-	2.78 ± 0.20	-	-
pK_{a1}	Micaminosa	6.83 ± 0.10	7.37 ± 0.05	7.19 ± 0.02	7.49 ± 0.009
pK_{a2}	Forosamina	8.21 ± 0.07	8.19 ± 0.04	8.30 ± 0.01	8.44 ± 0.006
pK_{a3}	Amina secundaria	8.99 ± 0.09	8.78 ± 0.34	8.98 ± 0.02	-

En el **Esquema 7.4** se especifican los sitios de protonación correspondientes a cada valor de pK_a calculado. El derivado **1d** no se estudió por esta metodología debido a la baja solubilidad que presentó en agua. Se propone que esto se deba a la cantidad de fragmentos aromáticos que tiene este derivado en su estructura.

¹⁰⁰ Droge, S. T. J., Hermens, J. L. M., Rabone, J., Gutsell, S., Hodges, G. Environ. Sci.: Processes Impacts, 2016, 18, 1011–1023



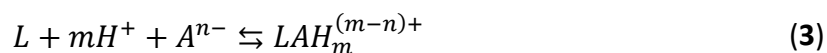
Esquema 7.4. Asignación de los sitios de protonación de los derivados **1a-c**.

7.3.2. Estudios de reconocimiento molecular de los derivados 1a-c con aniones

Las constantes de asociación entre los derivados de espiramicina y los aniones fueron determinadas mediante potenciometría, la cual ha sido ampliamente utilizada para investigar el reconocimiento molecular de las poliaminas con aniones de diferente naturaleza. El ajuste de las curvas de titulación proporciona las constantes de estabilidad totales (β) definidas de acuerdo con la ecuación 2 (L = receptor, A = huésped, H = protón agregado):

$$\beta = \frac{[LAH_m]}{[L][A^{n-}][H^+]^m} \quad (2)$$

Que corresponde a la reacción:



Este equilibrio es indicativo de la estequiometría del equilibrio de la complejación, pero no provee ninguna información sobre la localización de los protones m en los complejos de las especies. Las constantes por etapas de las que corresponden a la formación de complejos entre las formas individuales del receptor y el anión pueden calcularse a partir de los valores de β_{11n} con las constantes de protonación previamente determinadas para los aniones y los receptores individuales. Se asume que la formación de los complejos no modifica el patrón de protonación del receptor.¹⁰¹ En consecuencia, la localización de los protones en los complejos está regulada por la basicidad de las especies interactuantes; es decir que si el complejo involucra la presencia de uno o varios protones en su estructura estos se alojarán en los sitios más básicos del complejo en correspondencia con el pK_a de las especies individuales que lo forman.

Propiedades de Reconocimiento Molecular de Aniones por Bencil espiramicina 1a hacia aniones fosfatados, nucleótidos de adenina y dicarboxilatos

FOSFATOS

Se realizaron los estudios de bencil espiramicina **1a** en una mezcla H₂O-MeOH 9:1 V/V con los aniones fosfato y pirofosfato. En la **Tabla 7.8** se observa que la especie formada más estable es aquella en donde el receptor **1a** existe en forma desprotonada y el anión en forma monoprotonada con un $\log K = 3.34$. En tanto que la interacción más fuerte de **1a** hacia el anión pirofosfato es aquella en donde el receptor está en su forma triprotonada y el pirofosfato en su forma aniónica con un $\log K = 3.81$. Los diagramas de especies de los complejos formados por **1a** y los fosfatos se encuentran en los **Esquemas C.1 - C.2** del **Apéndice C**.

¹⁰¹ Arranz, P., Bianchi, A., Cuesta, R., Giorgi, C., Godino, M. L., Gutiérrez, M. D., López, R., Santiago, A. *Inorg. Chem.* 2010, 49, 9321-9332.

Tabla 7.8. Valores de log K de Bencil espiramicina **1a** con los aniones fosfato y pirofosfato en H₂O-MeOH (9:1 V/V).

Complejos	log K	Complejos	log K
	Fosfato		Pirofosfato
$L + AH^{2-} = [(L)(AH)]^{2-}$	3.34 ± 0.19	$LH_2^{2+} + A^{4-} = [(LH_2)(A)]^{2-}$	3.58 ± 0.08
$LH^+ + AH^{2-} = [(LH)(AH)]^-$	3.21 ± 0.20	$LH_3^{3+} + A^{4-} = [(LH_3)(A)]^-$	3.81 ± 0.54
$LH_2^{2+} + AH^{2-} = [(LH_2)(AH)]$	2.95 ± 0.28	$LH_3^{3+} + AH^{3-} = [(LH_3)(AH)]$	3.52 ± 0.07

L = Bencil espiramicina libre, LH = Bencil espiramicina monoprotionada, LH₂ = Bencil espiramicina diprotionada, LH₃ = Bencil espiramicina triprotionada A = Anión, AH = Anión monoprotionado.

En la **Figura 7.12** se observa que la afinidad por el anión fosfato va en aumento desde pH 5.5 hasta pH 10 conforme el complejo comienza a desprotonarse, presentando un valor máximo de log K_{eff} de 3.33 en pH's básicos. En cambio, el pirofosfato, presenta un efecto contrario, en donde los valores de K_{eff} van disminuyendo conforme se desprotona el complejo, le valor máximo que presenta es log K_{eff} de 3.27 a pH 6.4, que como se observa en el diagrama de abundancia de especies (**Esquema C.2** del **Apéndice C**), corresponde a la especie [(LH₃)(A)].

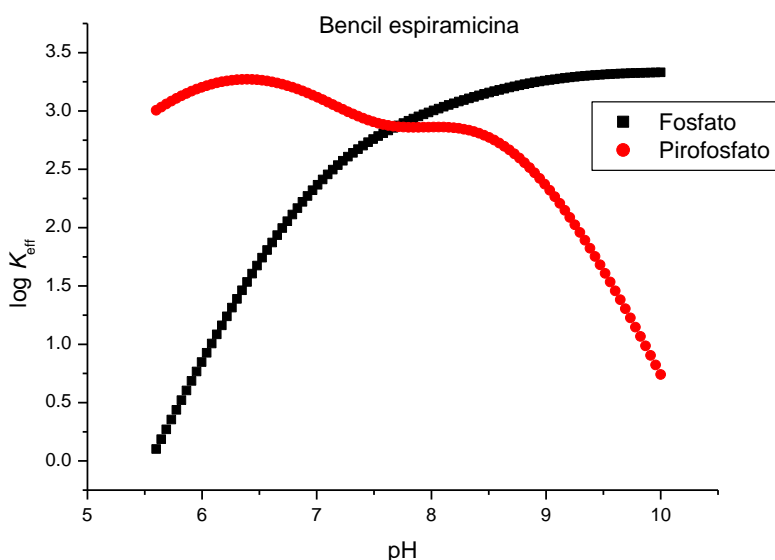


Figura 7.12. Logaritmo de la constante efectiva (log K_{eff}) en función del pH para fosfato y pirofosfato en el estudio de interacción con **1a**.

NUCLEÓTIDOS

Se hicieron los estudios de reconocimiento molecular con los nucleótidos de adenina. La constante de asociación mayor fue observada con el nucleótido ADP tal como se observa en la **Tabla 7.9**. La mayor interacción se da cuando el receptor **1a** está en su forma triprotonada y el huésped en su forma aniónica ($\log K = 4.82$), lo cual nos indica que es una interacción de tipo electrostática. El hecho de que exista una mayor interacción con el ADP que con el ATP nos dice que el tamaño del ADP se ajusta mejor a la forma del anfitrión. El ATP y el AMP mostraron sus máximos valores de $\log K$ en la misma especie que para ADP, $(LH_3)(A)$. Los diagramas de especies de los correspondientes complejos formados por **1a** con los nucleótidos de adenina se encuentran en los **Esquemas C.3 - C.5** del **Apéndice C**.

Tabla 7.9. Valores de $\log K$ de **1a** con los nucleótidos de adenina en H₂O-MeOH (9:1 V/V).

Complejos	log <i>K</i>		
	AMP	ADP	ATP
LH + A = (LH)(A)^a	ND	3.76 ± 0.07	3.08 ± 0.46
LH₂ + A = (LH₂)(A)	2.60 ± 0.21	3.92 ± 0.06	3.50 ± 0.31
LH₃ + A = (LH₃)(A)	3.95 ± 0.05	4.82 ± 0.07	4.50 ± 0.28
LH₃ + AH = (LH₃)(AH)	3.35 ± 0.05	3.66 ± 0.16	3.67 ± 0.13

^a Cargas omitidas por simplicidad, LH = Bencil espiramicina monoprotonada, LH₂ = Bencil espiramicina diprotonada, LH₃ = Bencil espiramicina triprotonada A = Nucleótido de adenina, AH = Nucleótido de adenina monoprotonado.

En la **Figura 7.13** se puede observar una mayor K_{eff} a pH 7 con la siguiente tendencia de afinidad: ADP > ATP > AMP. A este pH se puede observar que el receptor en su forma triprotonada forma los complejos más fuertes con los nucleótidos como es de esperarse en una molécula tricatiónica. La mayor interacción con el ADP es un resultado inesperado debido a que la máxima interacción debería de ser con la molécula con carga negativa mayor. Conforme los huéspedes se protonan, las constantes disminuyen y en todos los pH's el receptor muestra amplia preferencia por el ADP, esto es indicativo de que aparte de la interacción electrostática, operan otras fuerzas no covalentes que contribuyen a la estabilidad del complejo en forma similar a lo reportado por Bianchi y colaboradores para otro receptor que también muestra selectividad por ADP.⁶²

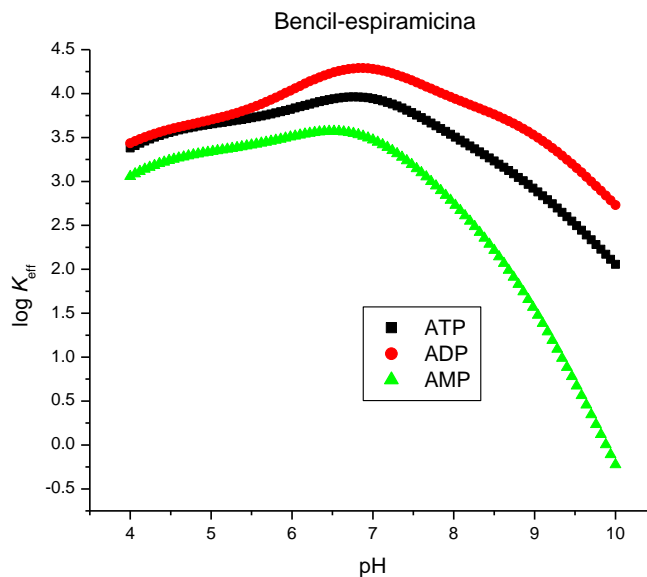


Figura 7.13. Logaritmo de la constante efectiva ($\log K_{\text{eff}}$) en función del pH para los nucleótidos de adenina en el estudio de interacción con **1a**.

DICARBOXILATOS

Se estudiaron los ácidos dicarboxílicos que son moléculas que funcionan como huéspedes dianiónicos. Las constantes de asociación (mostradas como $\log K$) se muestran en la **Tabla 7.10**. El glutarato no presentó interacción ya que es posible que su cadena (3 carbonos intermedios) sea muy pequeña para el tamaño de la cavidad del receptor. Sin embargo, como era de esperarse, el adipato y el pimelato mostraron mayores valores de las constantes de asociación ($\log K = 4.56$ y 4.80 , respectivamente). En ambos casos, los complejos más estables fueron aquellos donde el receptor **1a** se encuentra en su forma tricatiónica y los huéspedes en su forma dianiónica. Lo cual hace pensar que la naturaleza de las interacciones involucradas en la estabilidad del complejo es de tipo puramente electrostático y que se forman puentes salinos entre los grupos COO^- y el R_2NH^+ . Los datos de la tabla indican el derivado de espiramicina se une selectivamente a dicarboxilatos con cadenas 6 ó 7 carbonos los cuales se ajustan mejor a las dimensiones de la cavidad del receptor.

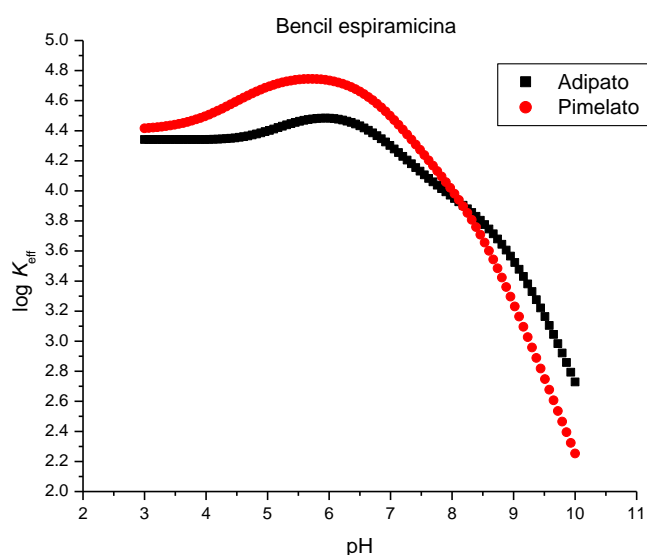
Los diagramas de especies de los correspondientes complejos formados por **1a** con los dicarboxilatos se encuentran en los **Esquemas C.6 - C.7** del **Apéndice C**.

Tabla 7.10. Valores de $\log K$ de **1a** con dicarboxilatos en H₂O-MeOH (9:1 V/V).

Complejos	log K		
	Glutarato	Adipato	Pimelato
$\text{LH}^+ + \text{A}^{2-} = [(\text{LH})(\text{A})]^-$	No detectado	3.76 ± 0.02	3.43 ± 0.08
$\text{LH}_2^{2+} + \text{A}^{2-} = [(\text{LH}_2)(\text{A})]$	No detectado	3.99 ± 0.02	4.21 ± 0.04
$\text{LH}_3^{3+} + \text{A}^{2-} = [(\text{LH}_3)(\text{A})]^+$	No detectado	4.56 ± 0.02	4.80 ± 0.04
$\text{LH}_3^{3+} + \text{AH}^- = [(\text{LH}_3)(\text{AH})]^{2+}$	No detectado	4.33 ± 0.03	4.72 ± 0.05
$\text{LH}_3^{3+} + \text{AH}_2 = [(\text{LH}_3)(\text{AH}_2)]^{3+}$	No detectado	4.30 ± 0.03	4.40 ± 0.05

LH = Bencil espiramicina monoprotonada, LH₂ = Bencil espiramicina diprotonada, LH₃ = Bencil espiramicina triprotonada A = Anión en su forma libre, AH = Anión monoprotonado, AH₂ = Huésped neutro.

En la **Figura 7.14** se aprecia la gráfica de constante efectiva de los complejos formados por **1a** con dicarboxilatos, mostrando la tendencia: pimelato > adipato. El adipato tiene un $\log K_{\text{eff}}$ máximo de 4.48 a pH 5.9 y el pimelato tiene un valor de $\log K_{\text{eff}}$ de 4.74 a pH 5.7. La constante efectiva va decayendo a pH básico en ambos casos. La molécula de pimelato tiene una cadena más larga que la del adipato, por esto es posible que el pimelato tenga más interacciones del tipo coulombicas con diferentes sitios del receptor **1a**, ya sea en la cavidad formada por el metilamino de la micaminosa y la bencilamina o entre el grupo metilamino de la forosamina con la bencilamina.

**Figura 7.14.** Logaritmo de la constante efectiva ($\log K_{\text{eff}}$) en función del pH para los ácidos dicarboxílicos en el estudio de interacción con **1a**.

Propiedades de Reconocimiento Molecular de Aniones por 2-Picolil espiramicina **1b hacia aniones fosfatados, nucleótidos y dicarboxilatos.**

FOSFATOS

Se realizaron los estudios de reconocimiento molecular de los complejos formados por 2-picolil espiramicina **1b** con los aniones fosfato y pirofosfato, en solución acuosa para determinar sus constantes de asociación ($\log K$). En la **Tabla 7.11** se observa que la mayor interacción del receptor **1b** con el anión fosfato se da entre la especie diprotonada de **1b** con el fosfato en su forma monoprotónada con un $\log K = 3.07$. En el caso del pirofosfato, la mayor interacción es cuando éste se encuentra en su forma aniónica y **1b** triprotonado con un $\log K = 4.16$. Los diagramas de especies de los complejos formados por **1b** y los fosfatos se encuentran en los **Esquemas C.8 - C.9** del **Apéndice C**.

Tabla 7.11. Valores de $\log K$ de 2-Picolil espiramicina **1b** con fosfato y pirofosfato en solución acuosa.

Complejos	$\log K$		
	Fosfato	Pirofosfato	
$L + AH^{2-} = [(L)(AH)]^{2-}$	2.57 ± 0.24	$LH^+ + A^{4-} = [(LH)(A)]^{3-}$	3.44 ± 0.03
$LH^+ + AH^{2-} = [(LH)(AH)]^-$	2.73 ± 0.14	$LH_2^{2+} + A^{4-} = [(LH_2)(A)]^{2-}$	3.45 ± 0.04
$LH_2^{2+} + AH^{2-} = [(LH_2)(AH)]$	3.07 ± 0.10	$LH_3^{3+} + A^{4-} = [(LH_3)(A)]^-$	4.16 ± 0.03
		$LH_3^{3+} + AH^{3-} = [(LH_3)(AH)]$	2.99 ± 0.03
		$LH_3^{3+} + AH_2^{2-} = [(LH_3)(AH_2)]^+$	3.20 ± 0.03

L = 2-Picolil-espiramicina libre, LH = 2-Picolil-espiramicina monoprotónada, LH₂ = 2-Picolil-espiramicina diprotónada, LH₃ = 2-Picolil-espiramicina triprotonada A = Anión, AH = Anión monoprotónado, AH₂ = Anión diprotónado.

En la **Figura 7.15** se muestra la gráfica obtenida en Origin para los valores de constante efectiva ($\log K_{\text{eff}}$) del complejo formado por **1b** con los fosfatos. Se observa un aumento de los logaritmos en el intervalo de pH de 5.8 – 8.2. El $\log K_{\text{eff}}$ del fosfato muestra un valor máximo de 2.74 a pH 8.24, se observa también que los valores de los logaritmos se mantienen constantes en el intervalo de pH de 8.29 - 11. En cambio, el pirofosfato tiene un comportamiento diferente. En el intervalo de pH de 5.8 – 8.2 los logaritmos se mantienen

constantes, el $\log K_{\text{eff}}$ máximo es de 3.08 a pH 8.45 y finalmente los valores de logaritmos disminuyen en el intervalo de pH de 8.50 - 11.

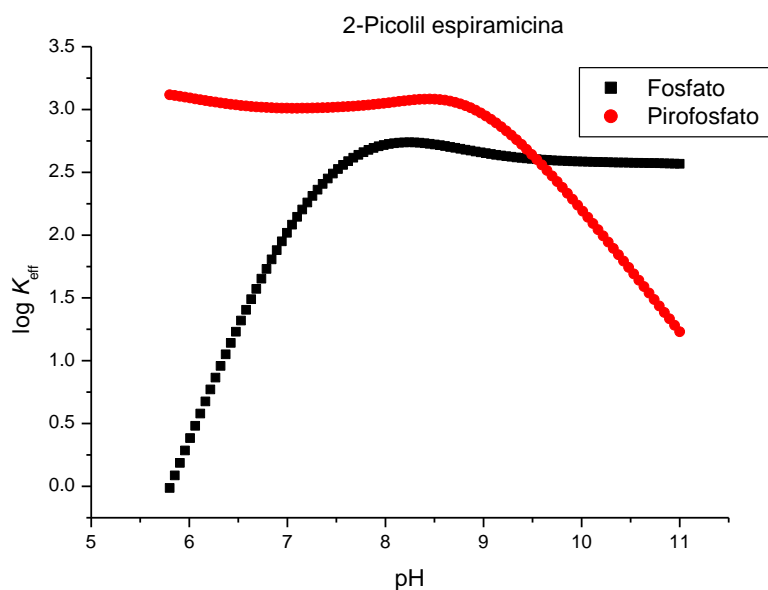


Figura 7.15. Logaritmo de la constante efectiva ($\log K_{\text{eff}}$) en función del pH para fosfato y pirofosfato en el estudio de interacción con **1b**.

Haciendo una comparación entre la gráfica de K_{eff} de **1b** con **1a** en su interacción con fosfato y pirofosfato, se observa un comportamiento similar en la tendencia de las gráficas, en donde para ambos derivados la interacción hacia el fosfato aumenta a pH básico y la interacción hacia el pirofosfato disminuye a pH básico. Además de los valores de las constantes para ambos derivados con estos aniones se encuentran en el mismo orden de magnitud (para fosfato de 2.50 – 3.34 y para pirofosfato de 3.45 – 4.16).

NUCLEÓTIDOS DE ADENINA

Se hicieron estudios con los nucleótidos de adenina. En la **Tabla 7.12** se observa que la interacción más fuerte del AMP con el receptor **1b** se da en la especie en donde el receptor está monoprotonado y el anión está en su forma libre con un $\log K = 2.67$. Para el ADP la interacción más fuerte se forma cuando el receptor se encuentra en su forma triprotonada y el anión en su forma libre con un $\log K = 2.48$. Por último, se puede observar que la

interacción más fuerte del receptor con el ATP se forma cuando el receptor se encuentra triprotonado y el anión monoprotonado con un $\log K = 3.04$. Los diagramas de especies de los complejos formados por **1b** y los nucleótidos de adenina se encuentran en los **Esquemas C.10 - C.12 del Apéndice C**.

Tabla 7.12. Valores de $\log K$ de **1b** con los nucleótidos de adenina AMP, ADP y ATP en solución acuosa.

Complejos	log K		
	AMP	ADP	ATP
LH + A = (LH)(A)^a	2.67 ± 0.03	2.31 ± 0.05	2.55 ± 0.04
LH₂ + A = (LH₂)(A)	2.47 ± 0.01	1.70 ± 0.11	2.39 ± 0.05
LH₃ + A = (LH₃)(A)	2.48 ± 0.07	2.48 ± 0.15	2.81 ± 0.01
LH₃ + AH = (LH₃)(AH)	No detectada	2.20 ± 0.33	3.04 ± 0.04

^a Cargas omitidas por simplicidad, LH = 2-Picolil-espíramicina monoprotonada, LH₂ = 2-Picolil-espíramicina diprotonada, LH₃ = 2-Picolil-espíramicina triprotonada A = Nucleótido de adenina en su forma libre, AH = Nucleótido de adenina monoprotonado.

En la **Figura 7.16** se observa la gráfica de constantes efectivas obtenidas en Origin de los complejos formados por **1b** con los nucleótidos. A pH 5.8, el ATP tiene un log de K_{eff} de 2.97. El ADP muestra un log de K_{eff} de 2.46 a pH 6.4 y por último el AMP da un log de K_{eff} de 2.71 a pH 8.1. El enlace más fuerte se observa con el ATP, el cual tiene una carga negativa más alta, y por tanto se espera un modelo puramente electrostático. Ésto se debe a un mejor arreglo en el complejo formado por el receptor **1b** con ATP, y por la presencia de puentes de hidrógeno adicionales establecidos entre la cadena de fosfatos de ATP y los sitios protonables del receptor (como se puede constatar más adelante con los experimentos de RMN y con los modelos computacionales obtenidos para el derivado hacia ATP y ADP). De la gráfica se puede deducir también que en el intervalo de pH 4.0 - 6.4 existe el receptor **1b** en forma tricatiónica y la tendencia de afinidad hacia los nucleótidos es de ATP>ADP>AMP. De forma interesante se observa que en el intervalo de pH 7.6 - 10.0, **1b** muestra una mayor afinidad por AMP sobre los demás nucleótidos.

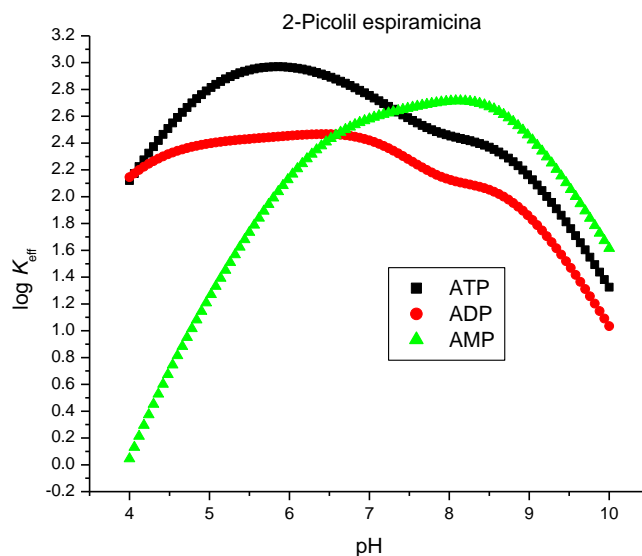


Figura 7.16. Logaritmo de la constante efectiva ($\log K_{\text{eff}}$) en función del pH para los nucleótidos de adenina en el estudio de interacción con **1b**.

DICARBOXILATOS

Adicionalmente, se llevó a cabo el estudio de reconocimiento molecular con diferentes ácidos dicarboxílicos, y en la **Tabla 7.13** se resumen los logaritmos de las constantes de asociación calculados. Se puede apreciar que el log de K va en aumento hasta llegar a un máximo en donde todas las especies se encuentran protonadas. Los diagramas de especies de los complejos formados por **1b** y los dicarboxilatos se encuentran en los **Esquemas C.13 - C.16** del **Apéndice C**.

Tabla 7.13. Logaritmo de las constantes de asociación ($\log K$) de 2-Picolil espiramicina **1b** y ácidos dicarboxílicos en solución acuosa.

Complejos	Log de K			
	Succinato	Adipato	Pimelato	Suberato
$\text{LH}^+ + \text{A}^{2-} = [(\text{LH})(\text{A})]^-$	2.63 ± 0.06	2.09 ± 0.11	No detectado	No detectado
$\text{LH}_2^{2+} + \text{A}^{2-} = [(\text{LH}_2)(\text{A})]$	2.15 ± 0.10	2.07 ± 0.08	1.56 ± 0.21	No detectado
$\text{LH}_3^{3+} + \text{A}^{2-} = [(\text{LH}_3)(\text{A})]^+$	2.78 ± 0.04	2.62 ± 0.04	2.39 ± 0.04	2.50 ± 0.08
$\text{LH}_3^{3+} + \text{AH}^- = [(\text{LH}_3)(\text{AH})]^{2+}$	3.22 ± 0.03	2.94 ± 0.05	2.43 ± 0.08	2.96 ± 0.09
$\text{LH}_3^{3+} + \text{AH}_2 = [(\text{LH}_3)(\text{AH}_2)]^{3+}$	3.27 ± 0.03	3.24 ± 0.03	3.04 ± 0.03	3.03 ± 0.08

LH = 2-Picolil espiramicina monoprotionada, LH₂ = 2-Picolil espiramicina diprotionada, LH₃ = 2-Picolil espiramicina triprotionada, LH₄ = 2-Picolil espiramicina tetraprotionada A = Anión en su forma libre, AH = Anión monoprotionado, AH₂ = huésped neutro.

En la **Figura 7.17** observamos que en el intervalo de pH de 3.0 - 4.5 todos los aniones muestran su mayor $\log K_{\text{eff}}$, en donde todas las especies se encuentran protonadas. Este hecho indica que el reconocimiento no está controlado únicamente por las interacciones coulómbicas, sino que se están estableciendo otro tipo de interacciones, probablemente entre la porción hidrofóbica de **1b** y las cadenas hidrocarbonadas de los dicarboxilatos. Los dicarboxilatos de cadena corta tales como el succinato y el adipato presentan una mayor afinidad con el receptor, posiblemente porque el tamaño de éstos aniones se ajusta mejor a la cavidad formada entre la amina protonada de la micaminosa y la amina secundaria perteneciente a la 2-picolil amina. Sin embargo, se observa que a medida que aumenta el pH, el $\log K_{\text{eff}}$ para todos los aniones también disminuye. La tendencia general de afinidad del receptor **1b** hacia estos aniones es: succinato > adipato > suberato > pimelato.

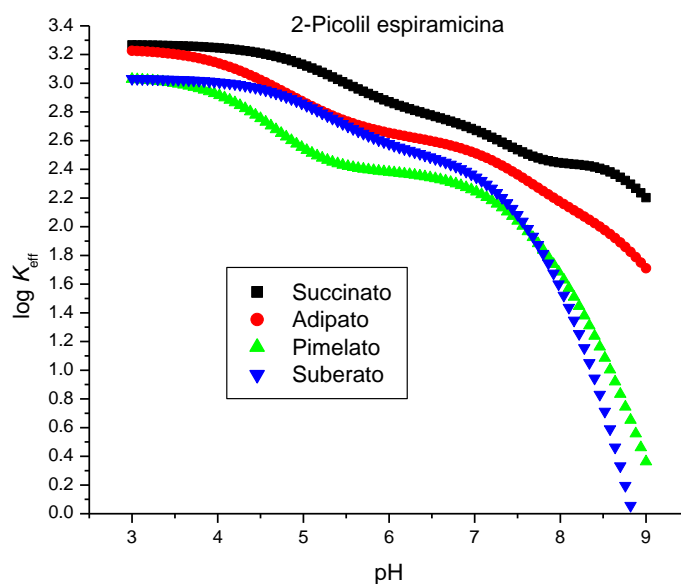


Figura 7.17. Logaritmo de la constante efectiva ($\log K_{\text{eff}}$) en función del pH para los ácidos dicarboxílicos en el estudio de interacción con **1b**.

Propiedades de Reconocimiento Molecular de Aniones por Naftil espiramicina 1c hacia los aniones nucleótidos de adenina

Se realizaron estudios de reconocimiento molecular de Naftil espiramicina **1c** con nucleótidos de adenina. En la **Tabla 7.14** se muestran los logaritmos de las constantes de

asociación obtenidas en las titulaciones potenciométricas y analizadas con el programa HYPERQUAD. Se puede observar el valor de constante más alto fue para ATP: $\log K = 6.40$ en la especie desprotonada del complejo: (L)(A), para esta misma especie, el AMP dio su valor de constante más alto: $\log K = 4.10$. Finalmente, el ADP muestra un valor de $\log K = 4.74$ en la especie diprotonada de **1c** y aniónica del huésped: (LH₂)(A). Los diagramas de especies de los complejos formados por **1c** y los nucleótidos de adenina se encuentran en los **Esquemas C.17 - C.19** del **Apéndice C**.

Tabla 7.14. Valores de $\log K$ de Naftil espiramicina **1c** con los nucleótidos en H₂O – MeOH (9.5:0.5 V/V).

Complejos	log <i>K</i>		
	AMP	ADP	ATP
L + A = (L)(A)	4.10 ± 0.06	4.43 ± 0.05	6.40 ± 0.05
LH + A = (LH)(A)	4.04 ± 0.05	4.54 ± 0.05	6.15 ± 0.05
LH₂ + A = (LH₂)(A)	3.94 ± 0.05	4.74 ± 0.04	6.03 ± 0.04
LH₂ + AH = (LH₂)(AH)	No detectado	3.17 ± 0.07	3.69 ± 0.08

L = Naftil espiramicina en forma libre, LH = Naftil espiramicina monoprotonada, LH₂ = Naftil espiramicina diprotonada, A = Nucleótido de adenina, AH = Nucleótido de adenina monoprotonado.

En la **Figura 7.18** se puede apreciar la ventaja del nucleótido ATP sobre los otros nucleótidos, el máximo $\log K_{\text{eff}}$ para ATP es de 6.20 a pH 8. En esta gráfica se puede distinguir un aumento del $\log K_{\text{eff}}$ de los tres aniones a partir de pH 7.0. Es evidente que las constantes se vuelven más estables a pH's básicos. La tendencia de afinidad es: ATP>ADP>AMP. Es posible que la interacción para los complejos formados de **1c** hacia los nucleótidos sea del tipo electrostático y por interacciones del tipo hidrofóbicas por parte del anillo de naftilamina con los anillos de adenina. Sin embargo, esto no se comprobó por resonancia magnética nuclear debido a la escasa solubilidad del receptor **1c** en D₂O.

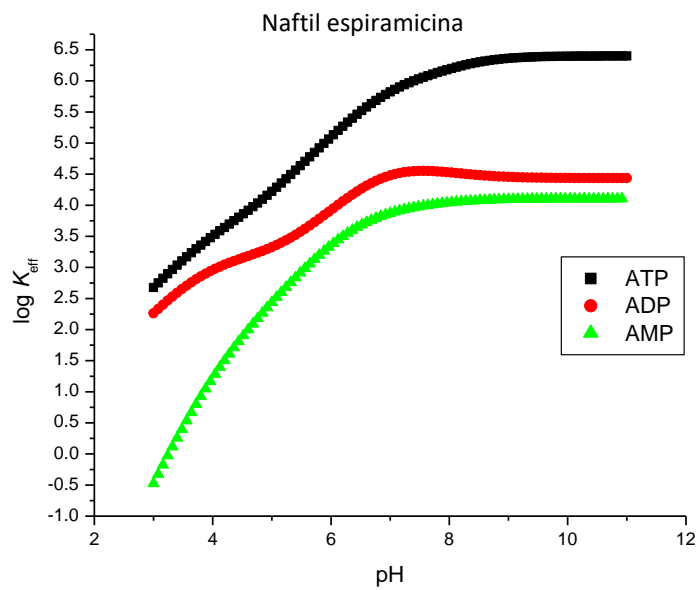
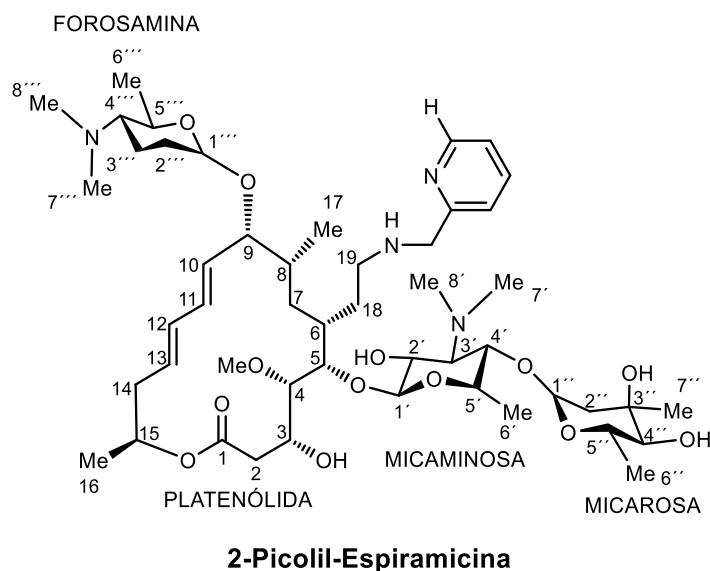


Figura 7.18. Logaritmo de la constante efectiva ($\log K_{\text{eff}}$) en función del pH para los nucleótidos de adenina en el estudio de interacción con **1c**.

7.4. Estudios por Resonancia Magnética Nuclear

7.4.1. Obtención de constantes de protonación (pK_a 's) de 2-Picolil espiramicina **1b** en D_2O

Las titulaciones potenciométricas nos proveen los valores de las constantes de protonación y la estequiometría del equilibrio involucrado, pero no proporcionan la locación específica del sitio de protonación en la estructura. Es por este motivo que para asignar los sitios de protonación de 2-picolilespiramicina **1b** se realizó un estudio de dependencia del pH sobre sus señales de RMN de 1H . El experimento se realizó en D_2O en un intervalo de pH de 1.33 – 9.27. Para incrementar el pH se utilizó una solución diluida de NaOD registrando el espectro de 1H por cada adición de pH (de acuerdo al experimento descrito en la sección **6.4.1** del apartado de *Metodología*) Los espectros de esta titulación se muestran en la **Figura 7.19**.



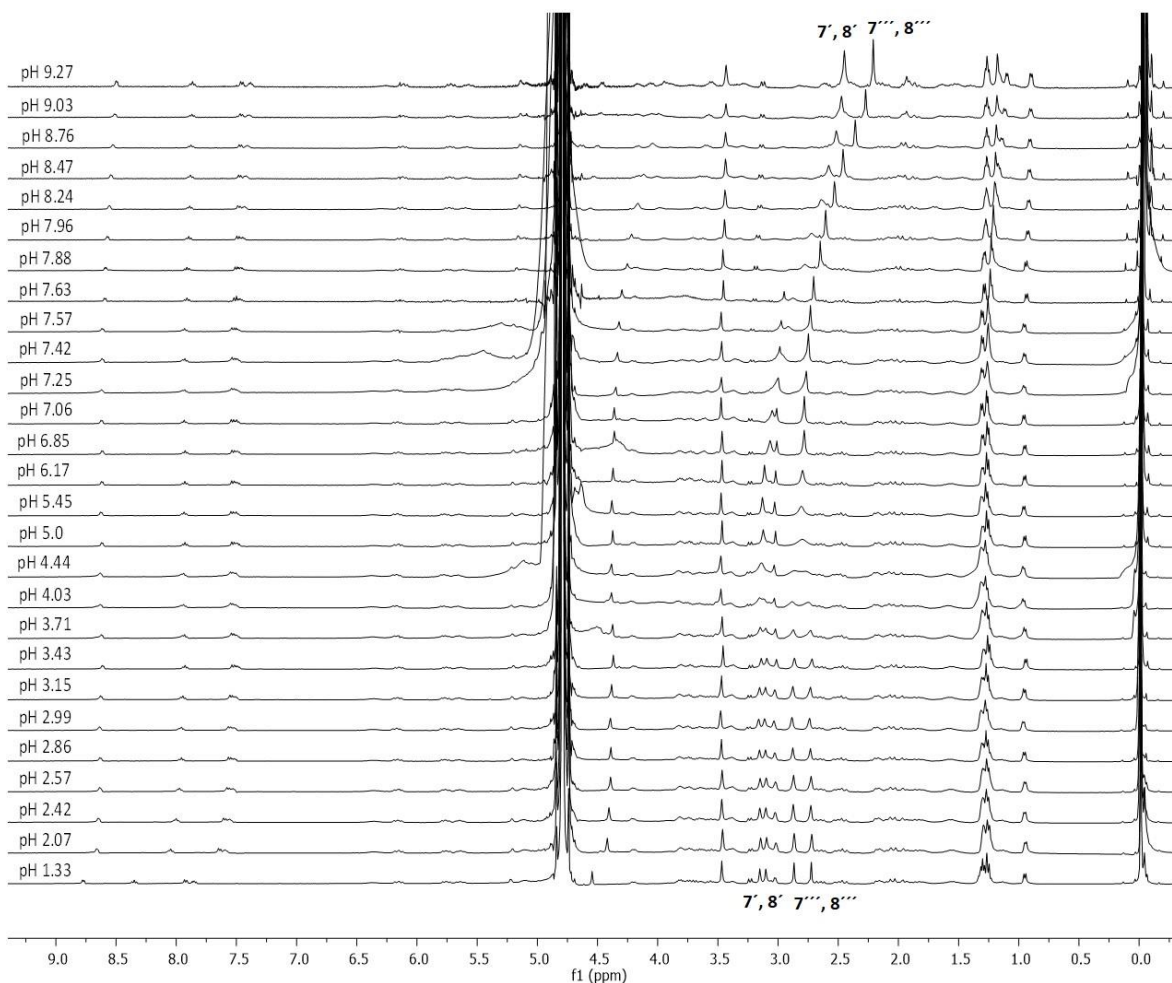


Figura 7.19. Espectros de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) del derivado 2-Picolil espiramicina **1b** (5×10^{-3} M) en el intervalo de pH: 1.33 – 9.27.

Los desplazamientos más notorios se observan para las señales de los protones de los aminometilos de la micaminosa ($7'$, $8'$) y forosamina ($7'''$, $8'''$). En el intervalo de pH 5 - 9, los átomos de hidrógeno de $-\text{CH}_3$ que están adyacentes al nitrógeno del grupo amino en la forosamina y micaminosa sufren un desplazamiento a campo alto conforme disminuye la protonación, esto ocurre casi simultáneamente al aumentar el pH. En la **Figura 7.20** se observa una expansión de la zona alifática.

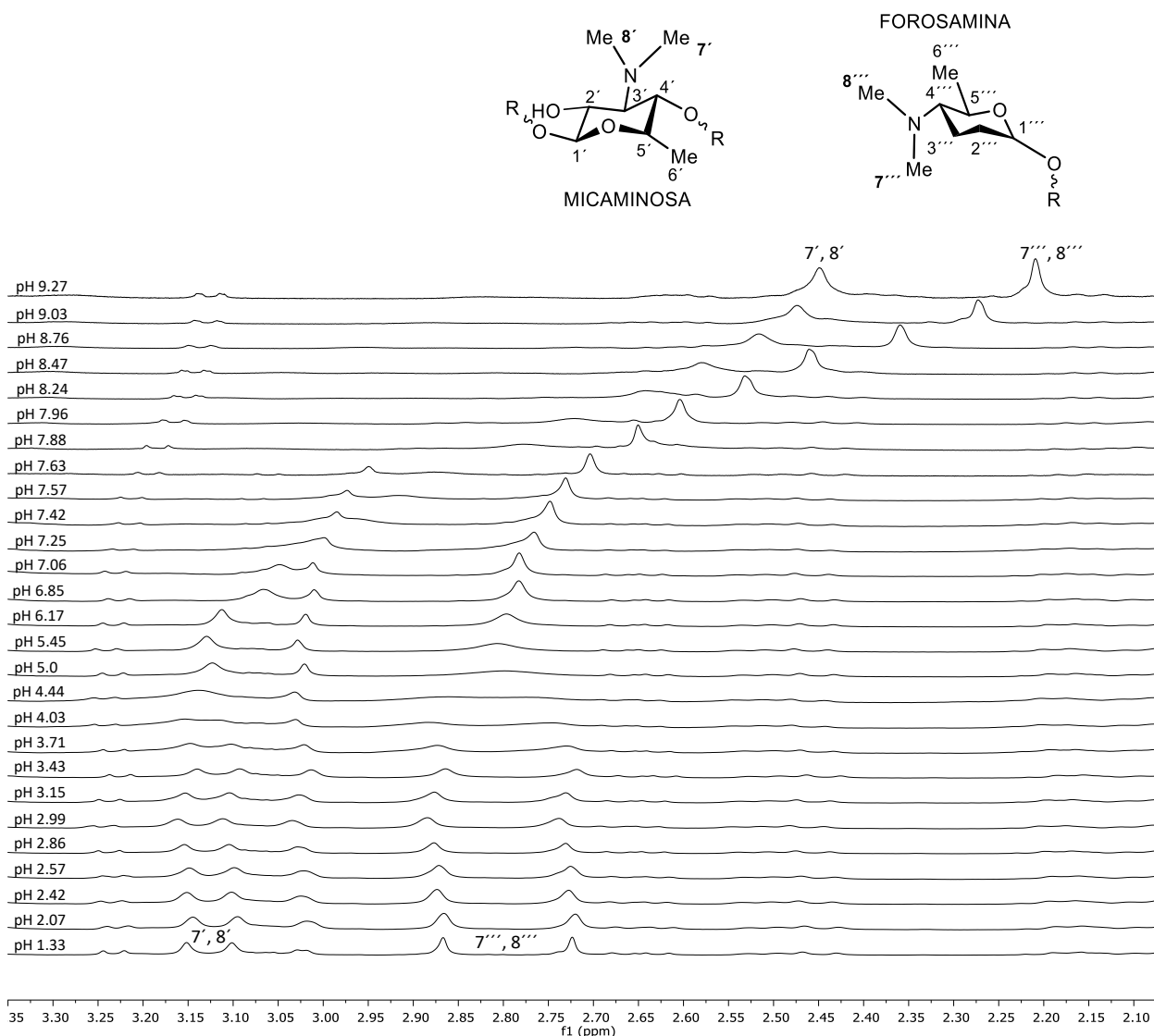


Figura 7.20. Espectros de RMN ¹H (400 MHz, D₂O) correspondientes a la zona alifática de **1b** (5×10^{-3} M) en el intervalo de pH 1.33 – 9.27. Se indican los desplazamientos químicos de las señales de los metilos de los aminoazúcares protonables: forosamina (7''', 8''') y micaminosa (7', 8').

Las gráficas obtenidas para las señales correspondientes a los desplazamientos de los metilos que pertenecen a los grupos aminos de los azúcares forosamina y micaminosa se muestran en la **Figura 7.21**.

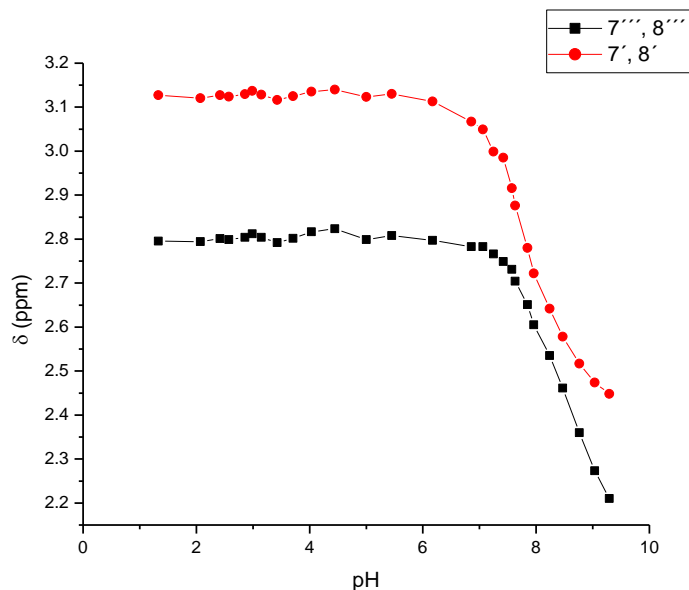


Figura 7.21. Curva de titulación de los desplazamientos químicos de las señales de los metilos de la forosamina (7'', 8'') y de los metilos de la micaminosa (7', 8') del derivado **1b** vs pH.

De forma cualitativa, la curva de protonación que se muestra en la figura de arriba muestra que las señales del grupo aminometilo de la forosamina (7'', 8'') empiezan a desplazarse desde un pH de 8.1 y las señales para la micaminosa a un pH de 7.7. Este comportamiento coincide con el reportado anteriormente para espiramicina en el que nos indicaba que las señales de forosamina se desplazan a un pH más alto.⁸⁰

El experimento solo alcanzó un valor a pH 9.2, el cual no es lo suficientemente alto para desprotonar por completo a los grupos amonio de la forosamina. En un segundo experimento se obtuvo el mismo espectro hasta pH 11. La gráfica que se obtuvo de este segundo experimento se muestra en la **Figura 7.22**. Los espectros de esta segunda titulación se muestran en el **Esquema F.1** del **Apéndice F**.

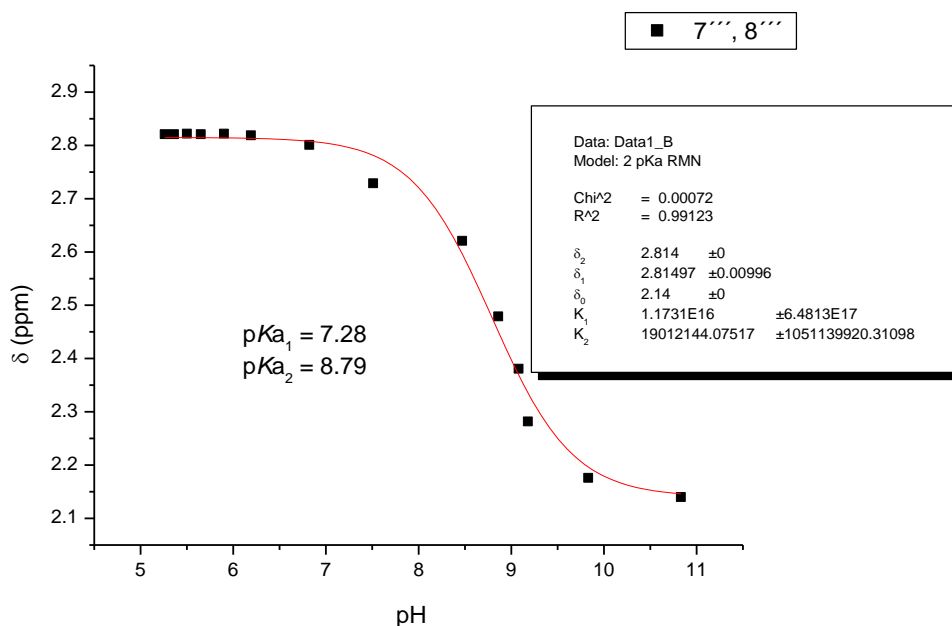


Figura 7.22. Obtención de la curva de titulación de los desplazamientos químicos de la señal de los metilos de la forosamina (7''', 8''') vs pH. Las líneas corresponden al ajuste de los datos con la ecuación **28**.

En la gráfica obtenida de la segunda titulación de **1b** en dependencia del pH (**Figura 7.22**) se observa la saturación de la señal 7''', 8''' correspondiente a los metilos del aminoazúcar forosamina. Al ajustar estos datos con la ecuación **10** para obtener 2 pK_D 's se pudieron obtener los valores de 7.28 que corresponde al grupo amino de la micaminosa y de 8.79 para el grupo amino de la forosamina.

$$\delta_{obs}([H^+]) = \frac{\delta_0 + \delta_1 K_{p1} 10^{-pH} + \delta_2 K_{p2} 10^{-2pH} + \dots}{1 + K_{p1} 10^{-pH} + K_{p2} 10^{-2pH} + \dots} \quad (10)$$

Para calcular los valores de pK_a a partir de los valores de pK_D obtenidos en el ajuste, se hizo la transformación de los valores utilizando la ecuación **11**:

$$pK_a = (0.929)(pK_D) + 0.42 \quad (11)$$

Los valores transformados de pK_a fueron de 7.18 para la micaminosa y de 8.58 para la forosamina. En comparación con los valores obtenidos en potenciometría (7.37 para

micaminosa y 8.19 para forosamina), estos valores son muy parecidos y nos arrojan evidencia sobre los sitios de protonación para el derivado **1b**.

Los protones aromáticos sufren un desplazamiento a campo alto conforme el pH aumenta, lo cual concuerda con la desprotonación del nitrógeno de la piridina que ocurre a un pH menor a 2.5 en conformidad con lo reportado en la literatura¹⁰² en donde se muestra que los derivados de 2-piridilo tienen una basicidad más baja que su análogo la piridina. En la **Figura 7.23** se muestra el desplazamiento de las señales aromáticas correspondientes al fragmento de piridina de **1b**, en donde se puede observar de forma cualitativa que el desplazamiento ocurre a pH 2.07. La gráfica que muestra los desplazamientos de estas señales se presentan en el **Esquema F.3** del **Apéndice F**.

¹⁰²A) Anderegg, G., Popov, K., Pregosin, P.S. *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 329–332. B) Romary, J.K., Barger, J., Bunds, J.E. *Inorg. Chem.* **1968**, *7*, 1142–1145.

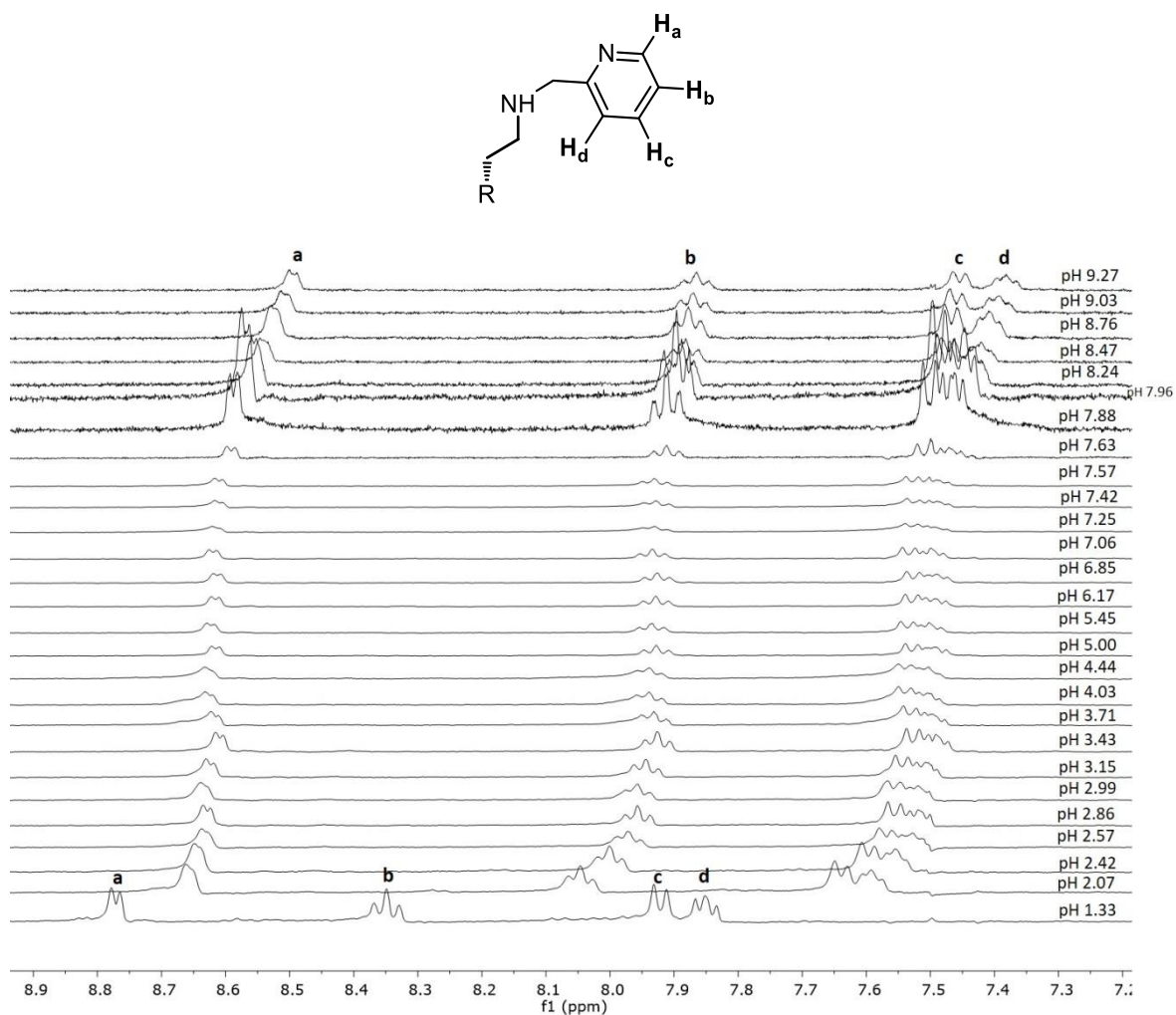


Figura 7.23. Espectros de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) correspondientes a la zona aromática de **1b** (5×10^{-3} M) en el intervalo de pH 1.33 – 9.27. Se indican los desplazamientos químicos de las señales de los protones de la piridina.

7.4.2. Estudios de reconocimiento molecular de **1b** con ATP y ADP por RMN ^1H y ^{31}P

Se realizaron las titulaciones en RMN de ^1H y ^{31}P de los complejos formados por 2-picolil espiramicina con ADP y ATP. Los experimentos de reconocimiento molecular se llevaron a cabo tal y como se muestra en la *sección 6.4.2* del apartado de *Metología*. Se eligió el pH 7 ya que en esta región la especie predominante según lo observado en potenciometría es: $[(\text{LH}_3) \text{ATP}]^-$, donde L (receptor) se encuentra en su forma triprotonada mientras que el nucleótido se mantiene en su forma aniónica. Tal y como se observa en la **Tabla 7.15** los

valores obtenidos para las señales de ^1H y ^{31}P de los desplazamientos de complejación inducida (Complexation Induced Shifts: CIS por sus siglas en inglés), son relativamente pequeños pero consistentes con los resultados reportados anteriormente para espiramicina. Los valores de complejación inducida se calcularon con la fórmula:

$$\text{CIS} = (\delta_{obs} - \delta) \quad (12)$$

En donde δ_{obs} es el desplazamiento químico de una señal medida en soluciones de D_2O en las cuales se encuentra el receptor y el sustrato en la relación molar máxima (1 : 3.75 para el complejo **1b**-ATP y 1 : 2 para **1b**-ADP), δ es el desplazamiento químico de la señal que corresponde al receptor o al sustrato no complejados en solución bajo las condiciones utilizadas para la obtención del espectro.¹⁰³

Tabla 7.15. Valores de los desplazamientos inducidos por complejación (CIS, ppm) observados para las señales ^1H y ^{31}P de los complejos **1b**-nucleótidos.

Señales de receptor						
	Protones aromáticos de Piridina				Micaminosa	Forosamina
Especie	a	b	c	d	7', 8'	7''', 8'''
1b – ATP	-0.052	-0.051	-0.033	-0.051	-0.062	-0.025
1b –ADP	-0.025	-0.024	-0.02	-0.03	-0.032	-0.01
Señales de los nucleótidos						
	Fosfatos			Adenina		
Especie	Pα	Pβ	Pγ	8	2	
1b – ATP	0.085	0.129	0.723	-0.002	-0.008	
1b –ADP	-0.115	0.167	No aplica	0	-0.01	

Formación del complejo de 2-Picolil espiramicina **1b con ATP**

En la **Figura 7.24** se muestra el espectro de la titulación del complejo **1b**-ATP. Se detecta un desplazamiento a campo alto de las señales de los metilos de la micaminosa y los de forosamina conforme aumenta la concentración de ATP. Como se indicó anteriormente, la especie involucrada en este experimento es $[(\text{LH}_3)\text{ATP}]^-$, en este caso **1b** está en forma triprotonada y ATP cargado negativamente. Los desplazamientos de estas señales se indican

¹⁰³ Covington, A. K., Paabo, M., Robinson, R. A., Bates, R.G. *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 700.

en la tabla anterior en donde los valores de la diferencia de desplazamiento son: $\Delta\delta ((\text{CH}_3)_2)_{\text{micaminosa}} = -0.062$ ppm y $\Delta\delta ((\text{CH}_3)_2)_{\text{forosamina}} = -0.025$ ppm. Los valores originales de los desplazamientos de las señales alifáticas y aromáticas de cada espectro se encuentran en la **Tabla F.3** del **Apéndice F**.

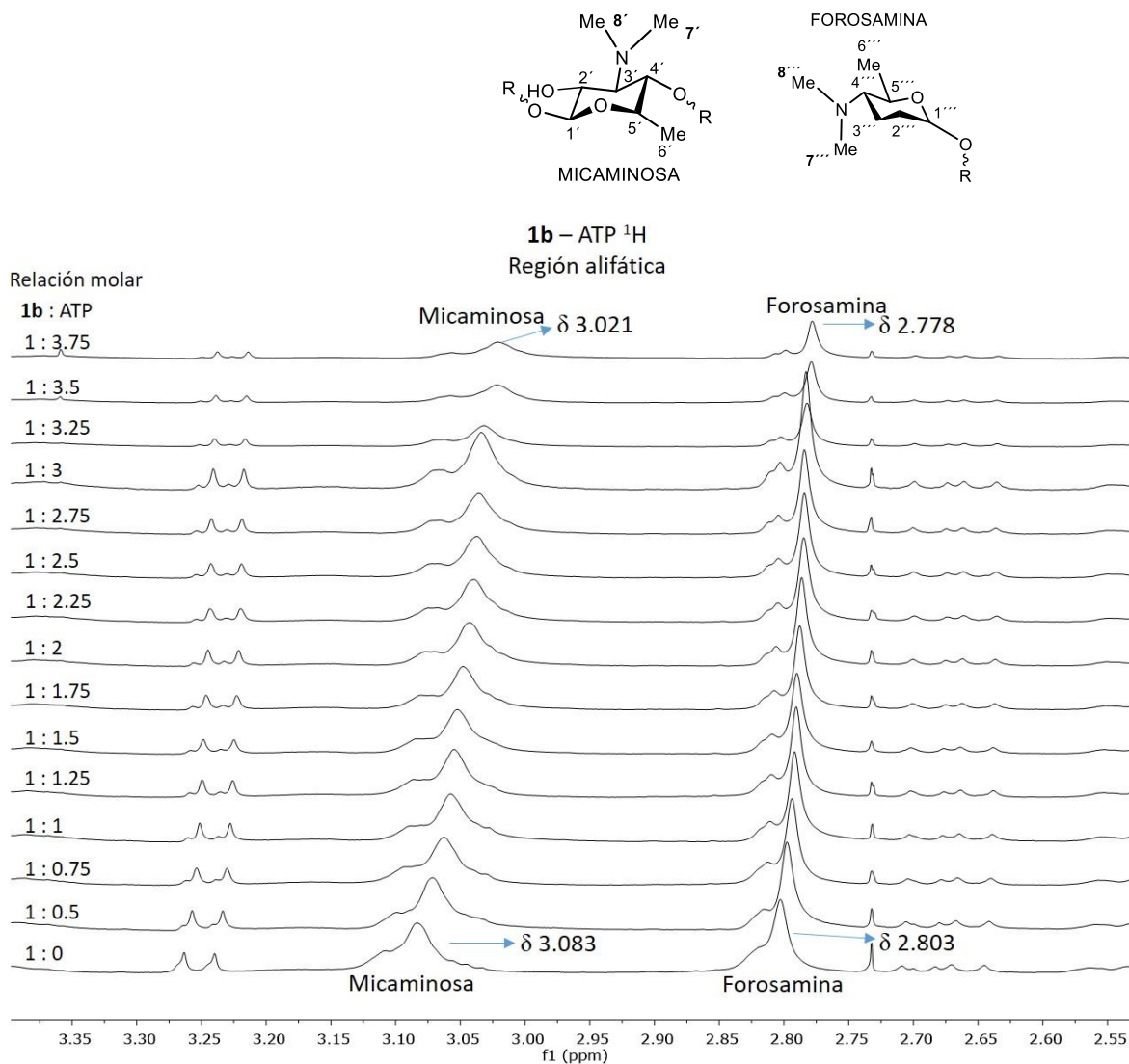
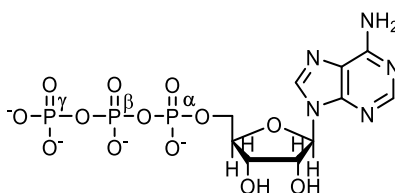


Figura 7.24. Espectros de RMN ¹H (400 MHz, D₂O) de la titulación que muestra la formación del complejo entre **1b** [5x10⁻³ M] con ATP [55x10⁻³ M]. Se muestran los desplazamientos de las señales de los metilos de forosamina (7''', 8''') y micaminosa (7', 8').

De esta misma titulación se obtuvieron los espectros de RMN ³¹P para observar los cambios de desplazamientos del ATP conforme aumentaba la concentración de este. En la **Figura 7.25** se observó un cambio importante en el desplazamiento a campo de bajo de la señal

de P_γ , con un valor de $\Delta\delta(P_\gamma) = 0.723$ ppm. Mientras que la señal del átomo de P_α permanece casi sin cambio en la complejación.



ATP

1b – ATP ^{31}P
Fósforos α y γ

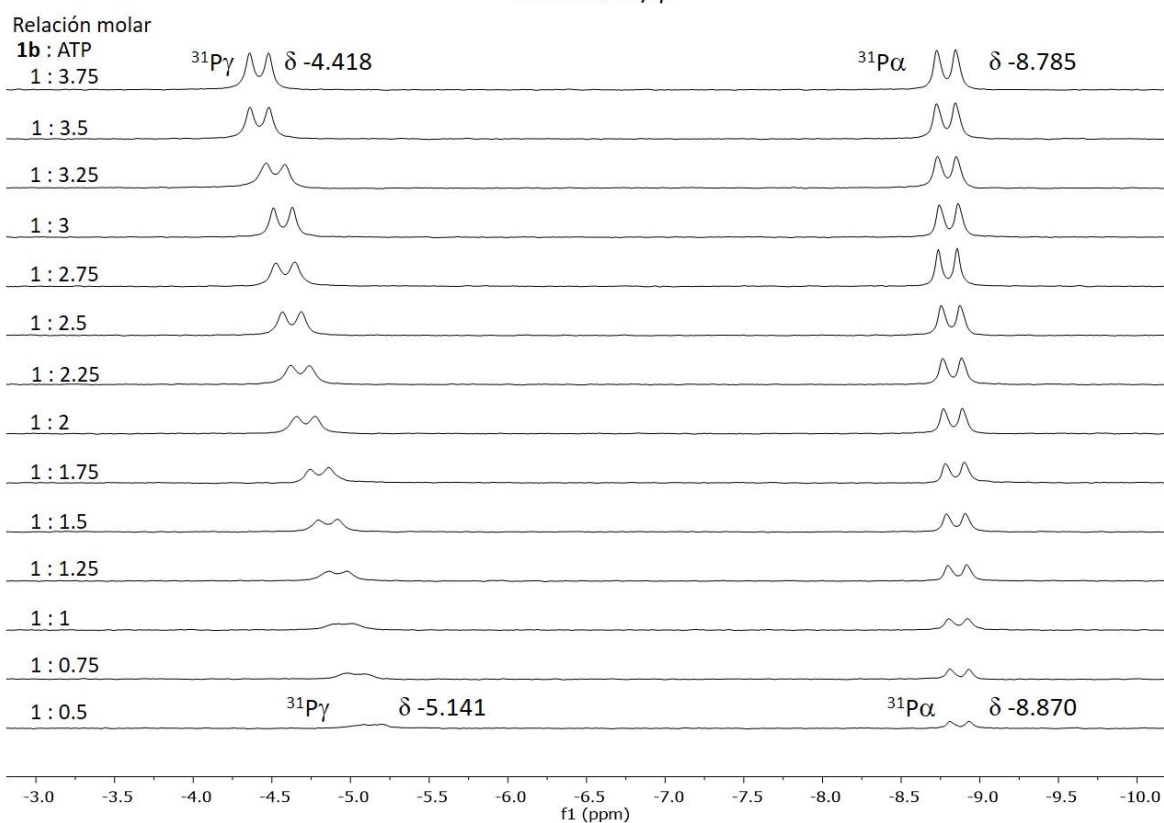


Figura 7.25. Espectros de RMN ^{31}P (162 MHz, D_2O) de la titulación que muestra la formación del complejo entre **1b** [5×10^{-3} M] con ATP [55×10^{-3} M]. Se muestran los desplazamientos de las señales de los fósforos α y γ correspondientes al ATP.

En la **Figura 7.26** se observa la señal del P_{β} la cual tuvo un desplazamiento a campo bajo de $\Delta\delta (P_{\beta}) = 0.129$ ppm. Lo anterior es un indicativo de que la interacción del ATP con el receptor afecta a los fosfatos terminales del ATP, este factor señala que las interacciones electrostáticas son importantes en la formación del complejo. Los valores originales de los desplazamientos de las señales de los fósforos α , β y γ de cada espectro se encuentran en la **Tabla F.4** del **Apéndice F**.

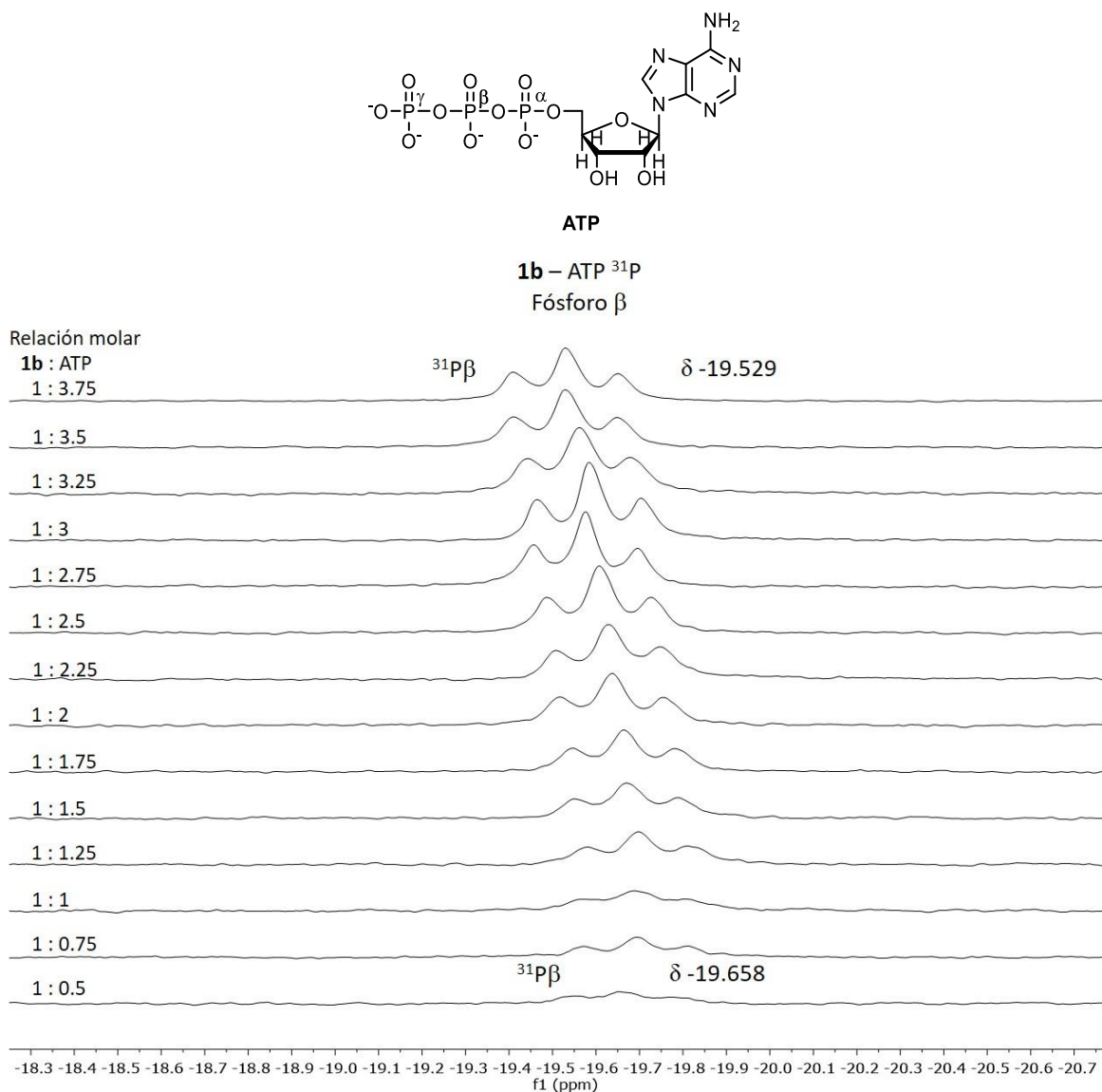


Figura 7.26. Espectros de RMN ^{31}P (162 MHz, D_2O) de la titulación que muestra la formación del complejo entre **1b** [5×10^{-3} M] con ATP [55×10^{-3} M]. Se muestra el desplazamiento de la señal del fósforo β correspondiente al ATP.

En la **Figura 7.27** se observa el desplazamiento a campo alto de las señales **a** - **d** de los protones aromáticos correspondientes a la fracción de piridilmetilo del receptor **1b**. Estos cambios son muy pequeños; sin embargo, nos dan una idea del tipo de interacción (tipo aromática) que puede estar involucrada en la formación del complejo **1b**-ATP.

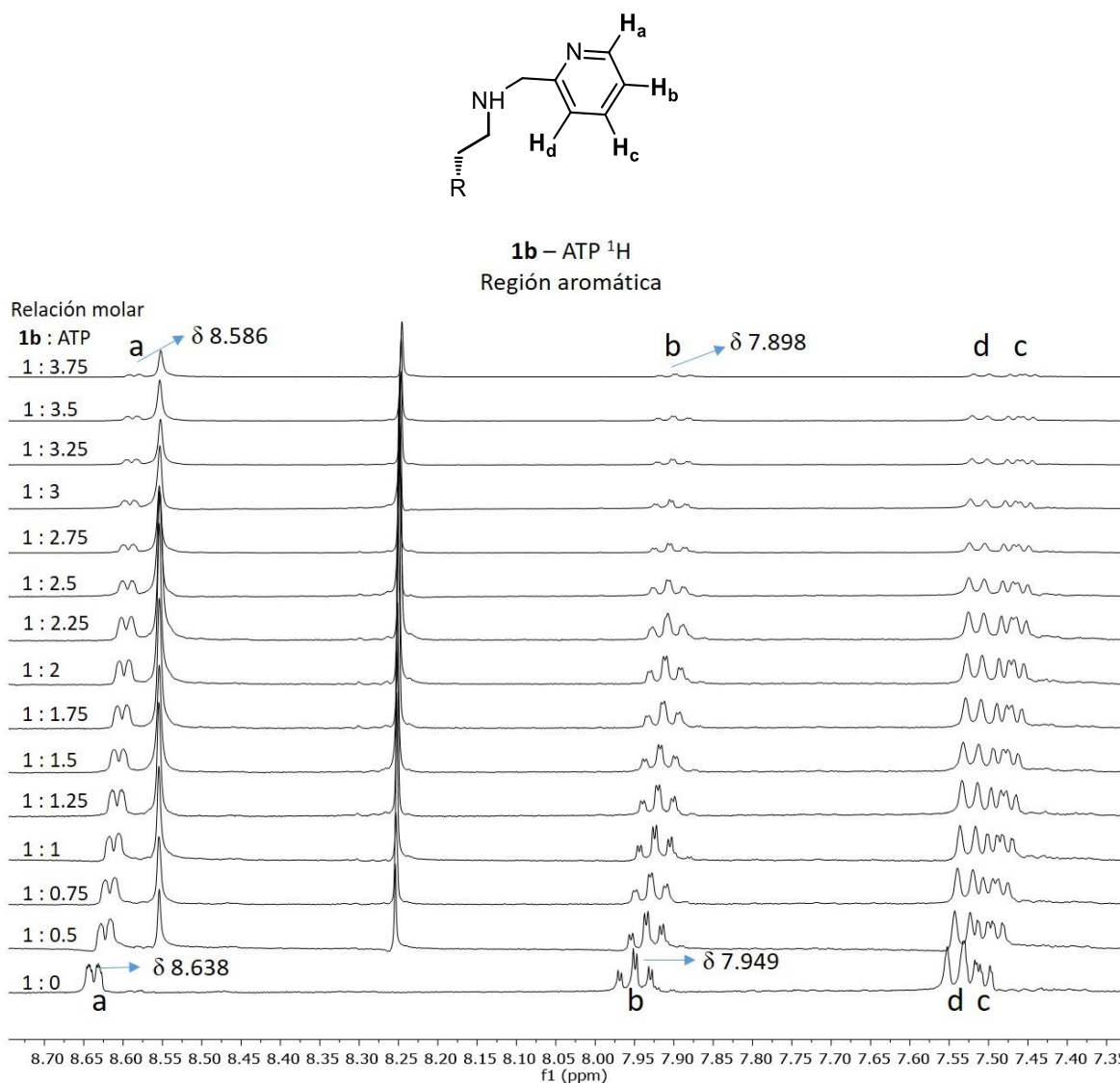


Figura 7.27. Espectros de RMN 1H (400 MHz, D_2O) de la formación del complejo formado entre 2-Picolil espipamicina **1b** con ATP. Se muestran los desplazamientos del fragmento de piridina.

Formación del complejo de 2-Picolil espiramicina 1b con ADP

En la **Tabla 7.15** se observaron pequeños desplazamientos observados para las señales del complejo **1b** – ADP. Las señales de los metilos del grupo amino de la micaminosa (**Figura 7.28**) y los protones aromáticos (el espectro se encuentra en el **Esquema F.2** del **Apéndice F**) sufrieron un desplazamiento a campo alto con el incremento de la concentración del nucleótido. A partir de estos datos, se sabe que la interacción entre los nucleótidos y 2-picolil espiramicina es principalmente de naturaleza electrostática y ocurre en los fragmentos de micaminosa y piridilmetilo. Los cambios en los desplazamientos observados para ATP son mayores que para el ADP de acuerdo con el orden de afinidad observado para **1b** en potenciometría. Los valores originales de los desplazamientos de la señal de micaminosa de cada espectro de la titulación se encuentran en la **Tabla F.5** del **Apéndice F**.

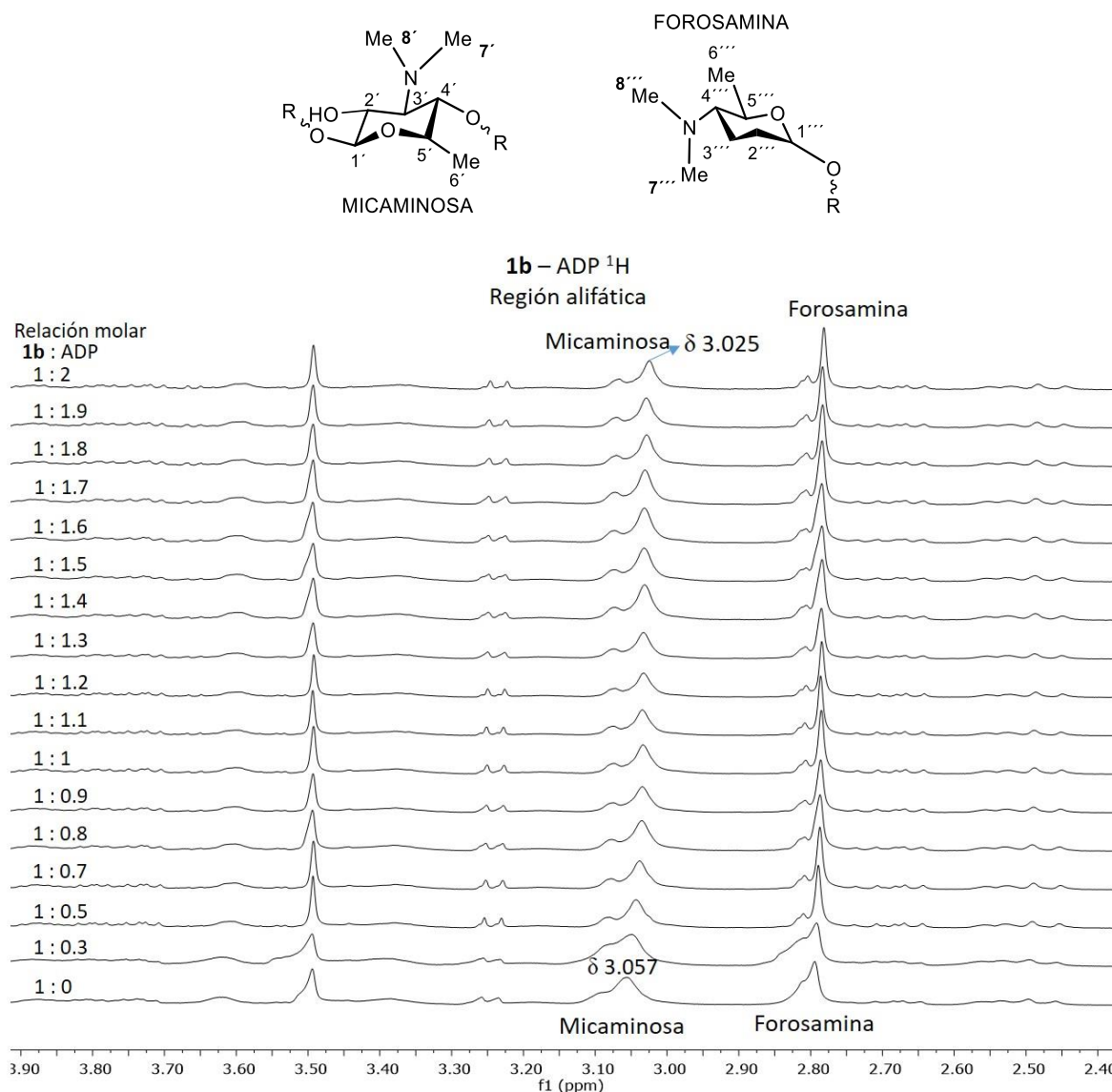


Figura 7.28. Espectros de RMN ¹H (400 MHz, D₂O) de la titulación que muestra la formación del complejo entre **1b** [5x10⁻³ M] con ADP [55x10⁻³ M]. Se muestran los desplazamientos de las señales de los metilos de forosamina (7''', 8''') y de micaminosa (7', 8').

En la **Figura 7.29** se observa el desplazamiento a campo bajo de $\Delta\delta_{P\beta}=0.167$ ppm lo cual nos indica que la interacción con el receptor **1b** afecta a este fósforo terminal del ADP. La señal de P_α muestra un desplazamiento de $\Delta\delta_{P\alpha}= -0.115$ ppm a campo alto. Posiblemente este efecto, contrario a la señal del P_β, se deba a que el P_α forme un enlace no covalente más estable y debido a esto se proteja. Los valores originales de los desplazamientos de la señal

de los fósforos α y β de cada espectro de la titulación se encuentran en la **Tabla F.6** del **Apéndice F**.

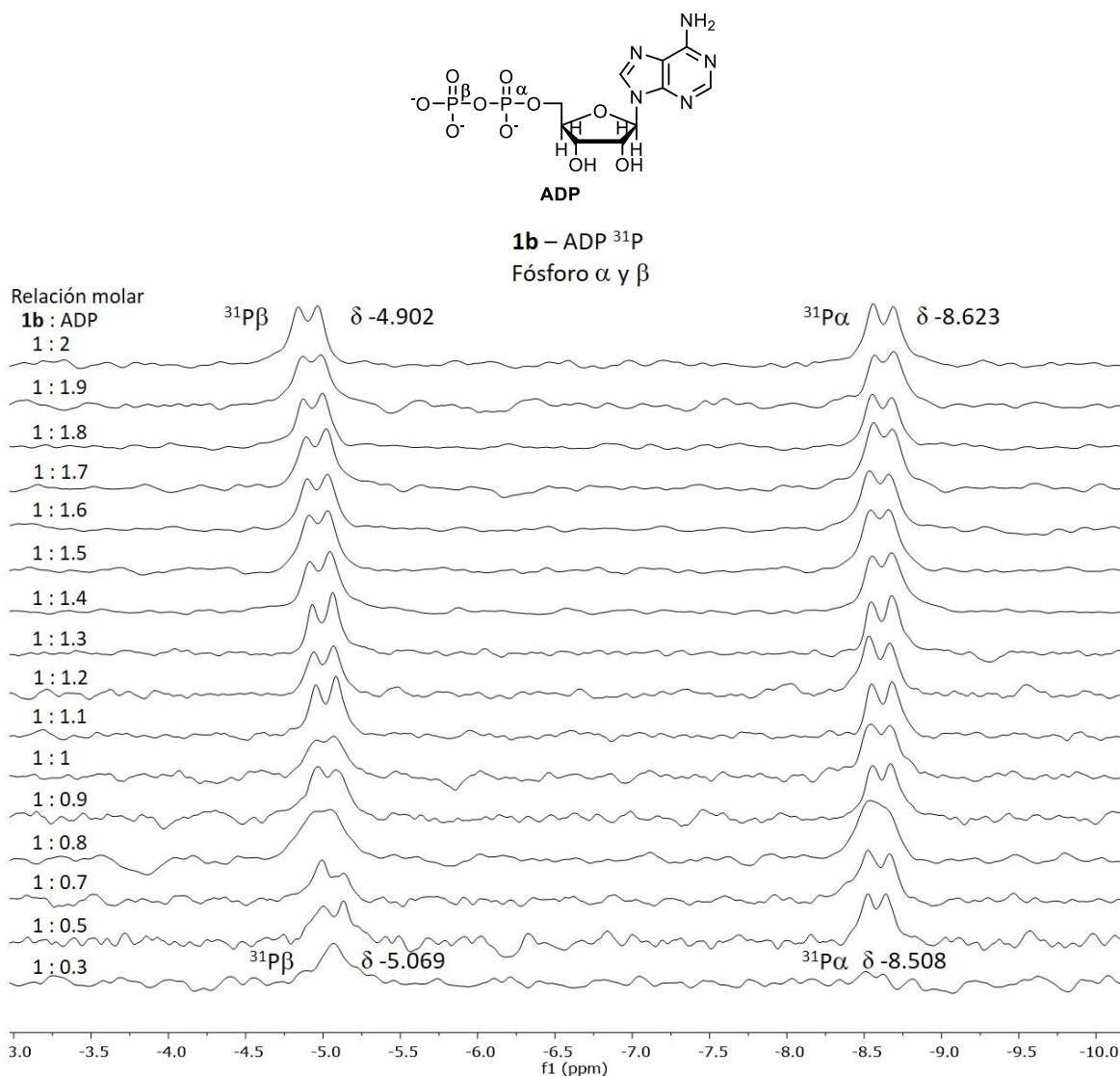


Figura 7.29. Espectros de RMN ^{31}P (162 MHz, D_2O) de la titulación que muestra la formación del complejo entre **1b** [5×10^{-3} M] con ADP [55×10^{-3} M]. Se muestran los desplazamientos de las señales de los fósforos α y β correspondientes al ADP.

La tendencia de afinidad obtenida en los experimentos por potenciometría en la formación de los complejos **1b**-Nucleótidos para la especie [(LH₃) A] fue: ATP>ADP>AMP. Los experimentos de titulación de estos complejos por RMN de ^1H y ^{31}P nos ayudaron a confirmar esta tendencia, mediante los cambios de desplazamiento inducido se pudieron

observar cualitativamente las tendencias de interacción entre el receptor y los aniones, en donde, los mayores cambios de desplazamiento se encuentran en el complejo **1b**-ATP. No se pudieron obtener ajustes apropiados para estas gráficas debido a que no se alcanzó un punto de saturación y los desplazamientos no presentaban una curva adecuada para realizar el ajuste para obtener la constante de asociación.

El derivado 2-picolil espiramicina **1b**, fue el único derivado que presentó una alta solubilidad en D₂O, por lo tanto, se hizo el estudio correspondiente para determinar sus constantes de protonación y el estudio de reconocimiento molecular con ATP y ADP. No se realizaron los estudios con AMP debido a que los desplazamientos que presentó el complejo **1b** - ADP no presentaron suficiente cambio.

7.5. Estudios por modelado molecular

Se realizaron los modelos moleculares para determinar los sitios de interacción presentados por ATP con los receptores Bencil espiramicina **1a** y 2-picolil espiramicina **1b**. Debido al número de átomos involucrados en estos complejos, no fue posible calcularlos con métodos cuánticos tales como AB INITIO o DFT debido al costo computacional involucrado. Por esta razón se realizaron cálculos empleando mecánica molecular usando un campo de fuerza OPLS-2005¹⁰⁴ y un esquema de minimización de gradiente conjugado Polak-Ribière.⁹⁵ Los cálculos se simularon en agua usando un modelo general Born/ área continua de solvatación¹⁰⁵ que está implementado en MACROMODEL versión 11.1,¹⁰⁶ el cuál ha sido empleado anteriormente para la interacción de la espiramicina con diversos aniones.⁸¹ El modelo computacional nos permite dar una explicación cualitativa de la posible estructura de los complejos. La estructura de los complejos fue obtenida por medio de un algoritmo de búsqueda conformacional CofGen⁹⁴ para generar las estructuras de mínima energía dentro de una hipersuperficie de potencial. Las estructuras obtenidas son al menos mínimos locales en todos los casos.

En el **Esquema 7.5** se puede observar los valores de las distancias más cercanas entre el receptor **1b** y el anión ATP. El receptor **1b** adopta una conformación donde los carbohidratos (micaminosa y micarosa) y la cadena de la amina secundaria junto con la piridina, se organizan en forma de pinza entorno al anillo de platenólida, en medio de esta "pinza" se acomoda el ATP. Se observa también que el carbohidrato de forosamina no forma parte de la interacción.

De acuerdo a lo obtenido por los experimentos de titulación del complejo **1b**-ATP por RMN ¹H, los protones aromáticos de la piridina mostraron un desplazamiento hacia campo alto, al igual que los protones del fragmento de adenina del ATP (tal y como se muestra en los valores de CIS de la **Tabla 7.15**). Esto nos indica una protección de los protones aromáticos

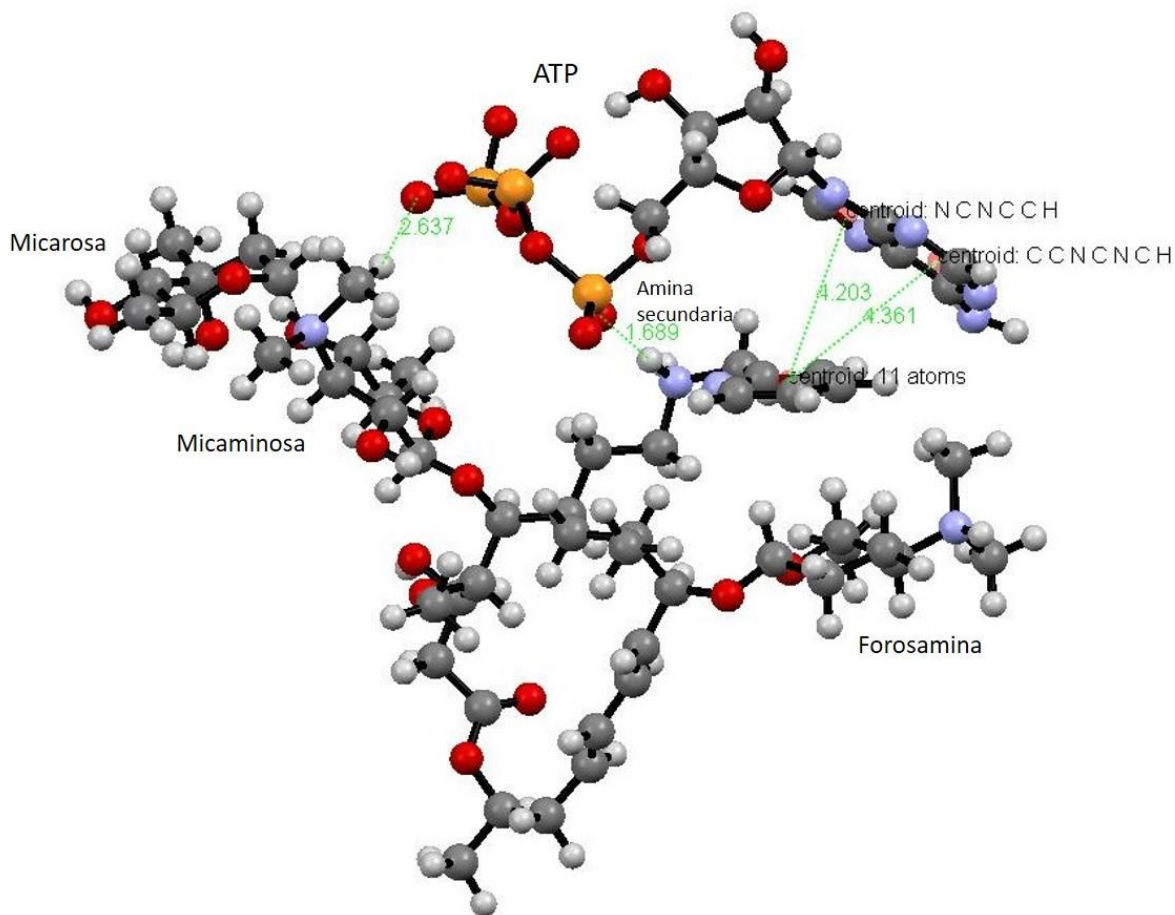
¹⁰⁴ Kaminski, G. A., Friesner, R. A., Triado-Rives, J., Jorgensen, W. L. *J. Phys. Chem. B.* **2001**, *105*, 6474-6487.

¹⁰⁵ Still, W. C., Tempezyk, A., Hawley, R. C., Hendrickson, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127-6129.

¹⁰⁶ MacroModel, versión 11.1. Schrödinger, LLC, New York, **2008** <https://www.schrodinger.com/citations/>

lo cual se ve reflejado en las interacciones stacking- π observadas en el modelo computacional que se analizará a continuación.

Para las señales de los fosfatos α , β y γ correspondientes al ATP se observó el cambio del desplazamiento hacia campo bajo. En el modelo computacional se observan acercamientos de los oxígenos de estos fosfatos con fragmentos del derivado **1b**, esto será analizado en los siguientes párrafos.



Esquema 7.5. Estructura del complejo **1b**-ATP en dónde se aprecian las distancias más cortas que se encontraron entre el receptor y el anión.

Se observa una interacción aromática π - π del modo cara-cara entre el anillo de la piridina y la base nitrogenada, adenina, del ATP. La distancia entre el centroide de la piridina y el centroide del anillo de 5 miembros de la adenina es de 4.20 Å, la distancia entre el centroide

de la piridina y el centroide del anillo de 6 miembros es de 4.36 Å. El grupo de Tosatto y colaboradores¹⁰⁷ identificaron 4 categorías con diferentes distribuciones de las interacciones stacking - π entre diferentes aminoácidos mediante el algoritmo RING (Residue Interaction Network Generator) que calcula las interacciones atómicas basadas en criterios geométricos con el fin de obtener una red de interacciones confiables de forma rápida. Dentro de éstas la interacción que nos interesa es la conformación "lateral" stacking - π en donde el pico máximo fue de 6.03 – 6.08 Å. Éste artículo indica que más allá de 7 Å una interacción π - π es inestable o poco confiable.

En este mismo esquema se pueden observar 2 interacciones que forman puentes de hidrógeno. La interacción 1 mostrada en la **Tabla 7.16**, corresponde al metilo del grupo amino de la micaminosa con el oxígeno del P $_{\gamma}$ del ATP. Los valores de las distancias y el ángulo formado en esta interacción indican que se trata de un puente de hidrógeno débil. La interacción 2 se da entre la amina secundaria del fragmento de la 2-picolilamina con el oxígeno del P $_{\alpha}$ del ATP, las distancias entre estos átomos son más cortas y el ángulo ligeramente más grande, indicando un puente de hidrógeno de fuerza moderada. Los ángulos y distancias se analizaron de acuerdo con lo reportado por Steed y Atwood como se muestra en la **Tabla 7.18**.¹⁰⁸

Tabla 7.16. Valores de las distancias de la interacción entre el receptor **1b** y el ATP.

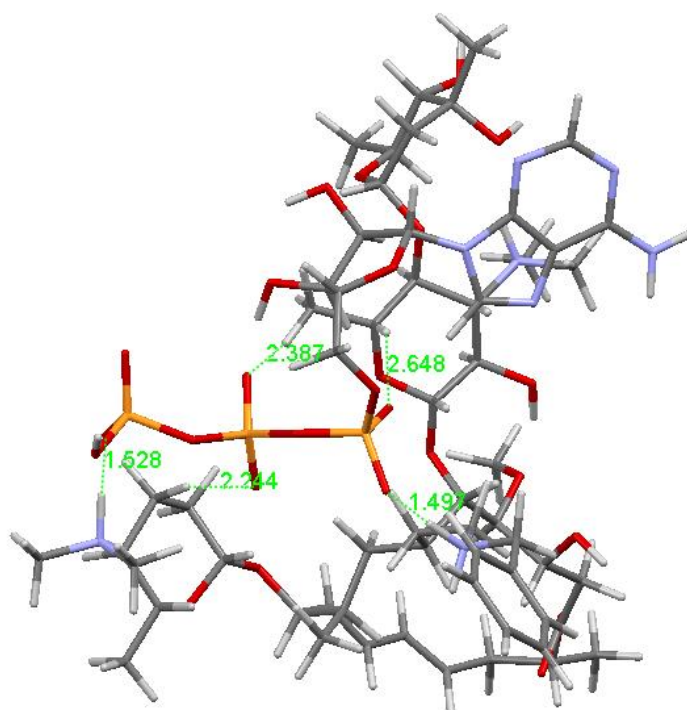
Interacción 1		Interacción 2	
Átomos	Distancias	Átomos	Distancias
C $_{7}$ -H \cdots O $^{-}$ -P $_{\gamma}$	2.64 Å	C $_{19}$ -N $^{+}$ -H \cdots O $^{-}$ -P $_{\alpha}$	1.69 Å
C \cdots O $^{-}$	3.70 Å	N $^{+}\cdots$ O $^{-}$	2.70 Å
Ángulo C-H \cdots O $^{-}$	162.9°	Ángulo N $^{+}$ -H \cdots O $^{-}$	165.3°
Puente de hidrógeno débil		Puente de hidrógeno moderado	

En el **Esquema 7.6** se aprecia un acercamiento de las cinco interacciones del tipo puente de hidrógeno más distinguibles del complejo formado por el derivado bencil espiramicina **1a** con ATP. También se muestra la conformación que adopta el receptor en donde el anillo de

¹⁰⁷ Piovesan, D.; Minervini, G.; Tosatto S. C. E. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W367-W374.

¹⁰⁸ Steed, J.W.; Atwood, J.L. *Supramolecular Chemistry*, 2da edición, John Wiley and Sons, **2009**, p. 30.

lactona queda abajo y tanto las cadenas de aminoazúcares (forosamina y micaminosa) y la de la amina aromática quedan en forma de pinza. En medio de las tres cadenas se observa cómo se acomoda el ATP, pero los fragmentos aromáticos de la adenina quedan muy lejos del fragmento de bencilo. Las interacciones que se señalan son entre la cadena fosfatada del ATP y varios sitios del receptor **1a**, las cuáles se describen a continuación.



Esquema 7.6. Estructura del complejo **1a** - ATP en dónde se aprecian las distancias más cortas que se encontraron entre el receptor y el anión.

La interacción 1 se da entre el oxígeno del fósforo α del ATP con un protón del nitrógeno de la amina secundaria correspondiente al fragmento de bencilo, aunque el valor de la distancia entre el protón y el oxígeno es muy corto, la distancia entre el átomo donador y el aceptor y el ángulo corresponden a un puente de hidrógeno con fuerza moderada. La interacción 2 también es entre el oxígeno de P_{α} y el protón del carbono 5' de la aminoazúcar de micaminosa, las distancias y el ángulo indican que se trata de un puente de hidrógeno débil. Las interacciones 3 y 4 se dan entre los oxígenos del P_{β} con un protón del carbono 3'''

de la forosamina y un protón del carbono 6' de la micaminosa, respectivamente. Ambas interacciones son puentes de hidrógeno débiles. La interacción 5 se da entre el oxígeno del P_γ con el protón de la amina de la forosamina, las distancias y el ángulo de esta interacción son características de un puente de hidrógeno de fuerza moderada. Los valores de distancias y ángulos de cada interacción se muestran en la **Tabla 7.17**, y están dentro del intervalo de los valores reportados por Steed y Atwood (**Tabla 7.18**).

Tabla 7.17. Valores de las distancias de la interacción entre el receptor **1a** y ATP.

Interacción 1		Interacción 2	
Átomos	Distancias	Átomos	Distancias
$C_{19}-N^+-H\cdots O^- -P_\alpha$	1.49 Å	$C_5'-H\cdots O^- -P_\alpha$	2.64 Å
$N^+\cdots O^-$	2.59 Å	$C\cdots O^-$	3.61 Å
Ángulo $C-H\cdots O^-$	174.28°	Ángulo $C-H\cdots O^-$	145.30°
Puente de hidrógeno moderado		Puente de hidrógeno débil	
Interacción 3		Interacción 4	
Átomos	Distancias	Átomos	Distancias
$C_3\cdots H\cdots O^- -P_\beta$	2.24 Å	$C_6'-H\cdots O^- -P_\beta$	2.38 Å
$C\cdots O^-$	3.32 Å	$C\cdots O^-$	3.32 Å
Ángulo $C-H\cdots O^-$	165.22°	Ángulo $C-H\cdots O^-$	141.72°
Puente de hidrógeno débil		Puente de hidrógeno débil	
Interacción 5			
Átomos	Distancias		
$N^+_{\text{Forosamina}}-H\cdots O^- -P_\gamma$	1.52 Å		
$N^+\cdots O^-$	3.13 Å		
Ángulo $N^+-H\cdots O$	169.76°		
Puente de hidrógeno moderado			

Tabla 7.18. Propiedades de las interacciones por puente de hidrógeno.¹⁰⁸

	Fuerte	Moderado	Débil
Distancias de los enlaces (Å)			
$H \cdots A$	1.2 – 1.5	1.5 – 2.2	2.2 – 3.2
$D \cdots A$	2.2 – 2.5	2.5 – 3.2	3.2 – 4.0
Ángulo de enlace (°)	175 – 180	130 – 180	90 – 150

D = Donador de H, A = Aceptor.

7.6. Estudios por calorimetría de titulación isotérmica

Se realizaron estudios de calorimetría de titulación isotérmica de la interacción en solución acuosa entre el derivado 2-picolil espiramicina **1b** y los nucleótidos de adenina ATP, ADP y AMP. Los isotermas y las curvas de titulación se muestran en las **Figuras 7.30 – 7.32**. La curva de titulación en la **Figura 7.30** da evidencia de la formación de complejo receptor-huésped a pH 7 entre **1b** y ATP.

Para todos los casos, se representan en la gráfica superior los datos que se obtuvieron directamente de la titulación y en la inferior, la integración de estos datos al restarle el respectivo blanco del experimento.

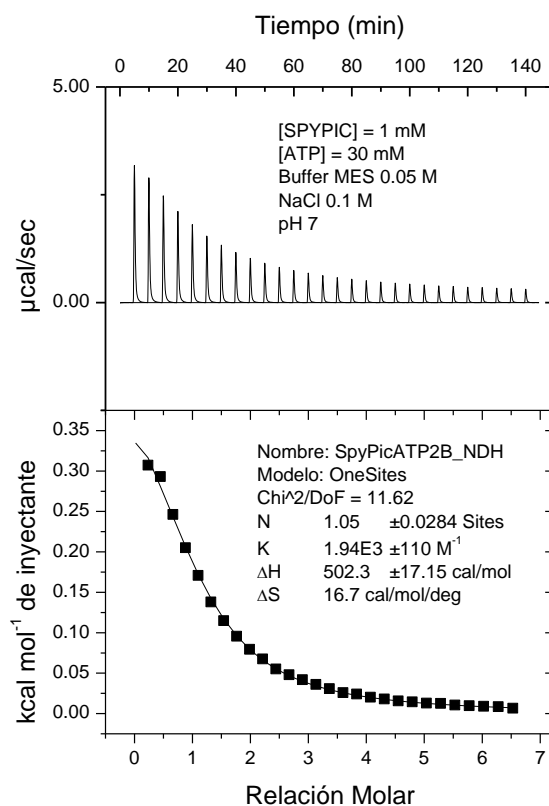


Figura 7.30. Isotherma y curva de la titulación del sistema de **1b** con ATP a pH 7, 25° C. Se presenta el ajuste para un sitio de interacción.

Para el caso de las titulaciones entre **1b** y los nucleótidos ADP y AMP (**Figura 7.31** y **7.32**, respectivamente). Se observa que las gráficas presentan una forma diferente a la esperada,

que es la sigmoideal. Se puede apreciar que el cambio en el calor absorbido en ambas titulaciones es despreciable en comparación con el calor absorbido para el complejo **1b** – ATP. Sin embargo, se logró hacer un ajuste para la obtención de los parámetros de ambas gráficas obtenidas.

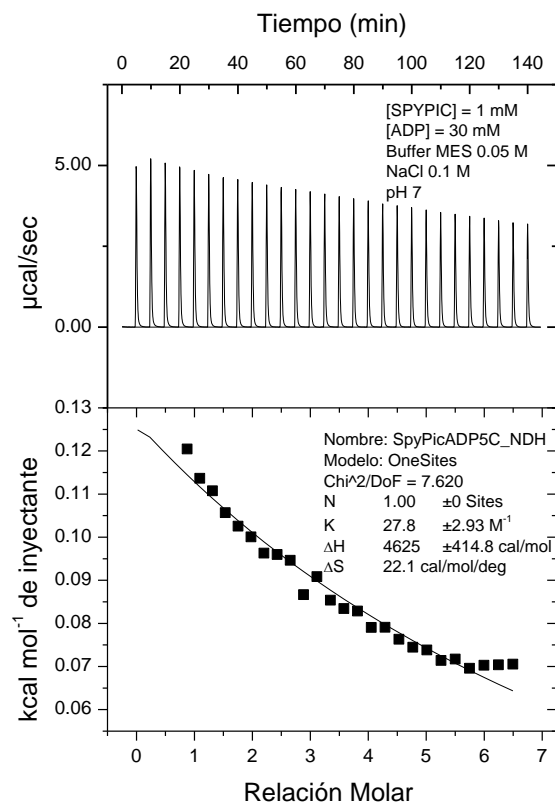


Figura 7.31. Isotherma y curva de la titulación del sistema de **1b** con ADP a pH 7, 25° C. Se presenta el ajuste para un sitio de interacción.

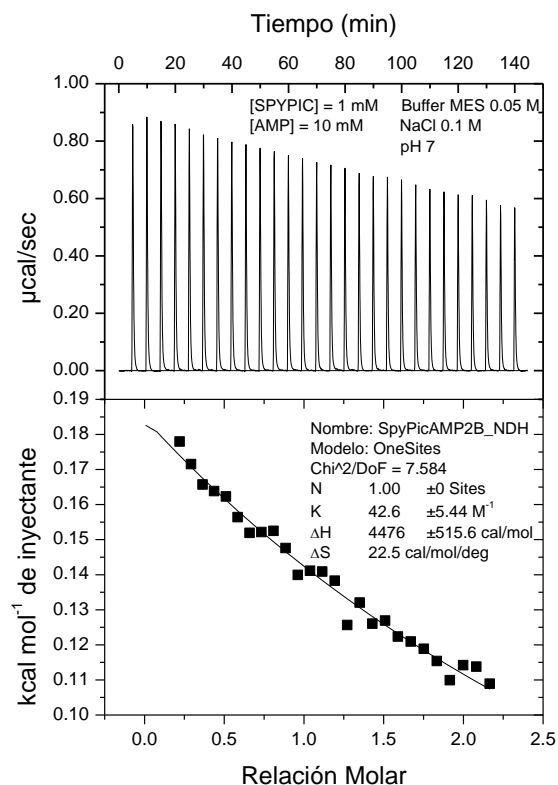


Figura 7.32. Isotherma y curva de la titulación del sistema de **1b** con AMP a pH 7, 25° C. Se presenta el ajuste para un sitio de interacción.

En la **Tabla 7.19** se muestran los valores de la constante 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) y entropía (ΔS) para las interacciones receptor-huésped de **1b** con los nucleótidos de adenina.

Tabla 7.19. Constantes de afinidad y parámetros termodinámicos obtenidos mediante ITC de **1b** hacia ATP, ADP y AMP a pH 7, 25° C.

	N (sitios)	Log K	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/mol·K)	ΔG (cal/mol)
SpyPic-ATP	1.05 ± 0.02	3.28 ± 2.52	502.3 ± 17	16.7	-4476.8
SpyPic-ADP	1 ± 0	1.44 ± 0.46	4625 ± 414	22.1	-1964.1
SpyPic-AMP	1 ± 0	1.63 ± 0.73	4476 ± 515	22.5	-2232.4

N = Sitios de interacción, K = Constante de asociación, ΔG = Energía de Gibbs, ΔH = Entalpía de enlace, ΔS = Entropía

Las mediciones calorimétricas proporcionan parámetros macroscópicos relacionados con los cambios de energía durante el proceso químico bajo observación. En este caso se estudia la formación de un complejo supramolecular entre una poliamina protonada y un polianión. Es de esperar que las moléculas cargadas estén fuertemente solvatadas en medios acuosos. Por lo tanto, la entalpía determinada por ITC indica que para lograr la unión entre el huésped y el anfitrión se requiere energía para romper los múltiples enlaces entre los poli-iones con el disolvente y dicha energía es muy superior a la que se puede liberar al formar los enlaces entre el huésped y el anfitrión.

Los datos de la titulación que se obtuvieron para el receptor 2-picolil espiramicina **1b** y ATP, ilustrados en la **Figura 7.30** muestran una absorción de calor más elevada que con los otros nucleótidos y su curva se ajustó al modelo de un sitio de interacción dando una constante más grande. Existe una compensación entre entalpía y entropía, es decir la entalpía es desfavorable mientras que la entropía favorable. Por tanto, la interacción del complejo **1b**-ATP es llevada entrópicamente.

El calor absorbido por la interacción del anfitrión con los nucleótidos AMP y ADP es mínimo, por lo tanto, fue difícil ajustar los datos con el modelo de un sitio de interacción debido a que el cambio es muy pequeño. Los valores de constante de asociación K_a y los valores termodinámicos que aparecen en la **Tabla 7.19**, no son confiables debido a la dispersión de los datos. En los tres casos existe una compensación de la entalpía desfavorable por un aumento significativo de la entropía. Este aumento de la entropía se debe al efecto de desolvatación de los compuestos al formar los complejos.

La constante obtenida para ATP es comparable con la obtenida en potenciometría que fue de 3.04, para la especie $(LH_3)(AH)$. Sin embargo, esta especie se forma a pH 5.5 con un 80% de formación; el experimento en ITC se realizó a pH 7, en el diagrama de especies se observa que en este pH existe la mezcla de dos especies: la especie $(LH_3)(A)$ con un 47% de formación y la especie $(LH_3)(AH)$ con un 25% de formación (**Esquema C.10** del **Apéndice C**). A pesar de ser una mezcla de dos especies, se logró obtener la constante de 3.28 que se encuentra en el intervalo de la constante obtenida por potenciometría. ITC nos ayudó a discriminar la

afinidad del derivado **1b** por ATP que por los demás nucleótidos ya que en potenciometría se obtuvieron constantes de asociación en el mismo intervalo en donde fue difícil determinar la tendencia de afinidad. En ITC se obtuvo una curva para el complejo **1b**-ATP que se pudo ajustar con el modelo predeterminado para un sitio de interacción arrojando una constante aceptable y que se pudo comparar con la mayor constante obtenida mediante potenciometría.

7.7. Estudios por espectroscopía UV-Visible

7.7.1. Obtención de los coeficientes de absortividad molar (ϵ) de los derivados 1a-d

En la **Tabla 7.20** se muestran los valores de absorbancia (ϵ) de los derivados de espiramicina **1a-d** en Buffer MES y Buffer de Fosfatos a diferentes valores de pH. Los espectros y los ajustes de las longitudes de onda se muestran en los **Esquemas D.1 – D.14** del **Apéndice D**. La descripción de la determinación de estos valores se describe en la *sección 6.7.1* del apartado: *Metodología y Materiales*.

Tabla 7.20. Condiciones empleadas para la obtención de ϵ de los derivados **1a-d**.

Derivado	Condiciones	Longitud de onda (λ)	ϵ^a
Bencil espiramicina 1a	Buffer MES 0.05 M, 0.1 M de NaCl, pH 6	230 nm	30852 \pm 361
2-picolil espiramicina 1b	Buffer MES 0.05 M, 0.1 M de NaCl, pH 6	259 nm	4586 \pm 29
Naftil espiramicina 1c	Buffer MES 0.05 M, pH 6.5	282 nm	7106 \pm 34
	Buffer de fosfatos 0.05 M, pH 3	282 nm	8571 \pm 19
Pirenil espiramicina 1d	DMSO	330 nm	31323 \pm 237
		346 nm	44231 \pm 459
	Buffer de fosfatos 0.05 M, pH 3	326 nm	32155 \pm 568
		342 nm	43502 \pm 481

^a Para su cálculo se consideró la longitud de onda más prominente

7.7.2. Determinación de las constantes de protonación de Naftil espiramicina 1c

Tal como se describe en el apartado **6.7.3** de la *Metodología*, se preparó el derivado **1c** con concentración 1.1×10^{-4} M en una mezcla H₂O-MeOH 70:30. Se tomó una alícuota de 3 mL para medir su espectro de absorbancia en UV-vis. La titulación se llevó a cabo en un intervalo de pH de 2.97 a 12.49. El espectro de la titulación se muestra en la **Figura 7.33**.

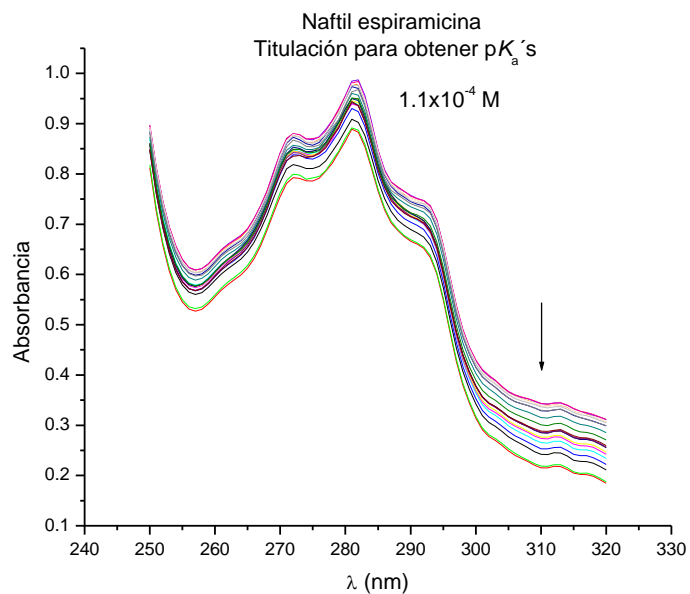


Figura 7.33. Espectros de la titulación en UV-Visible para la obtención de los pK_a 's de Naftil-espíramicina **1c** [1.1×10^{-4} M] en $H_2O - MeOH$ (7:3 V/V), 0.1 M de NaCl.

Del espectro anterior se construyó la gráfica de la **Figura 7.34**.

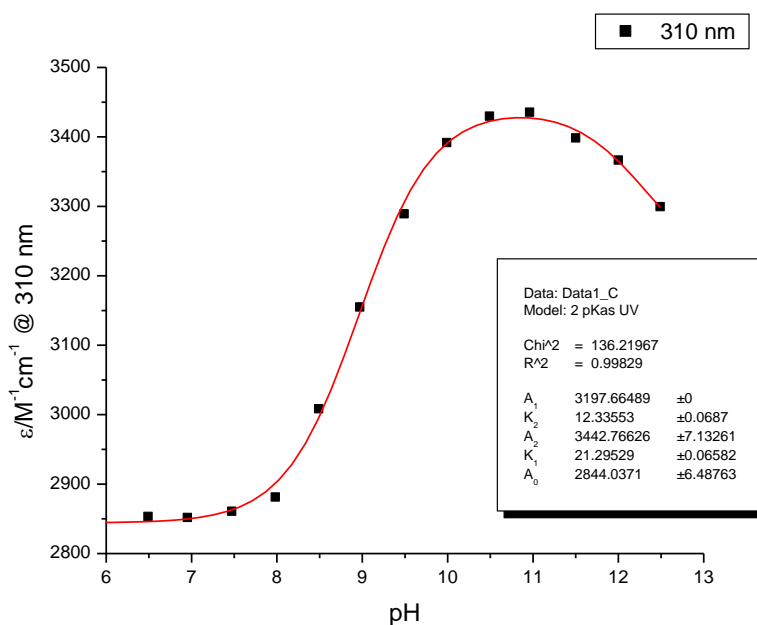


Figura 7.34. Gráfica de los datos obtenidos de la banda a 310 nm vs el pH de la titulación de Naftil-espíramicina **1c**. Las líneas corresponden al ajuste de los datos con la ecuación **25**.

Los valores de pK_a para **1c** se obtuvieron con la ecuación **25**. Se tomó únicamente el intervalo de pH de 6.5 – 12.5 en donde el ajuste dio 2 pK_a 's: 12.33 ± 0.07 y 8.96 ± 0.06 . El valor de 12.33 no es consistente con los valores obtenidos en potenciometría para **1c** (7.19, 8.30 y 8.98). Por lo tanto, es probable que la zona de 11-13 sea el carbonato absorbido por la atmósfera, ya que el experimento no se realizó en atmósfera inerte. El valor de 8.96 coincide con el valor de la amina secundaria que se obtuvo por potenciometría.

$$A_{obs}([H^+]) = \frac{A_0 + A_1 K_1 10^{-pH} + A_2 K_2 10^{-2pH} + \dots}{1 + K_1 10^{-pH} + K_2 10^{-2pH} + \dots} \quad (25)$$

7.7.3. Estudios de reconocimiento molecular por Naftil espiramicina **1c y Pirenil espiramicina **1d** hacia ATP, ADP y AMP**

Se hicieron los estudios de reconocimiento molecular de Naftil y Pirenil espiramicina **1c** y **1d**, respectivamente, en espectrofotometría UV-visible. Debido a su baja solubilidad en agua, los experimentos se realizaron en solución acuosa a pH 3.0 (buffer de fosfatos). La gran estabilidad de estos compuestos a pH bajo, permitió realizar los estudios bajo estas condiciones.

Las gráficas obtenidas de los complejos formados entre los receptores Naftil y Pirenil espiramicina con los nucleótidos de adenina no se pudieron ajustar con las ecuaciones clásicas para los procesos de equilibrio que involucran estequiometrías 1:1 o 1:2. Algunas de estas curvas presentan una marcada forma sigmoideal, tal como lo demuestra el ajuste de los datos al modelo matemático de una sigmoide. Este mismo comportamiento ha sido observado para otros sistemas.¹⁰⁹ Los autores señalan que este comportamiento involucra un esquema de equilibrio mas complejo donde se da la autoasociación del anfitrión antes de la unión con el huésped. Los grupos aromáticos grandes como el pireno tienden a la autoasociación y tiene sentido pensar que en este caso se presenta un fenómeno similar.

¹⁰⁹ a) Filby H., M., Dickson, S. J., Zaccheroni, N., Prodi, L., Bonacchi, S., Montalti, M., Paterson, M. J., Humphries, T. D., Chiorboli, C. y Steed, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4105-4113.

b) Barnard, A., Dickson, S. J., Paterson, M. J., Todd, A. M. y Steed, J. W. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1554–1561.

De manera cualitativa podemos deducir que el comportamiento de los datos obtenidos de la complejación del receptor **1c** con los nucleótidos (en donde se graficó la absorbancia corregida contra la concentración del huésped) no muestra datos que puedan ser ajustables con la ecuación para estequiometría 1:1 ya que existe mucha dispersión de los datos por tener un cambio de absorbancia muy pequeño.

Se optó por transformar los datos en ΔA y en $-\log [\text{Huésped}]$ para poder graficarlos, con estos cambios en los datos, algunas de las gráficas obtenidas presentaron un comportamiento sigmoideal. Sin embargo, no se encontró una ecuación adecuada para estos sistemas ya que implica un proceso más complejo que la simple asociación.

Naftil-espíramicina 1c con Nucleótidos de adenina

Se realizó la titulación del derivado Naftil espíramicina **1c** con AMP, ADP y ATP en UV-visible para observar la posible complejación huésped-anfitrión. En la **Figura 7.35** se observa el espectro de la titulación entre el receptor **1c** y AMP, los espectros y gráficas correspondientes a ADP y ATP se encuentran en los **Esquemas E.1 – E.4 del Apéndice E**.

Se aprecian 3 bandas principales, la banda más alta se ubica en una longitud de onda cercana a 280 nm, con una absorbancia inicial de 0.80. A lo largo de la titulación se observó un aumento en la banda de 258 nm, se debe tomar en cuenta que los nucleótidos de adenina cuentan con grupos aromáticos que absorben en 208 y 260 nm, por lo tanto es de esperar la interferencia de éstos cromóforos en el espectro de la titulación. Se trabajó con los datos de $\lambda = 290$ nm restándole el blanco correspondiente y corrigiendo por dilución, las gráficas de $\lambda = 272$ nm se encuentran en los **Esquemas E.5 – E.6 del Apéndice E**. El tratamiento de estos datos se menciona en la *sección 6.7.4 del apartado: Metodología*.

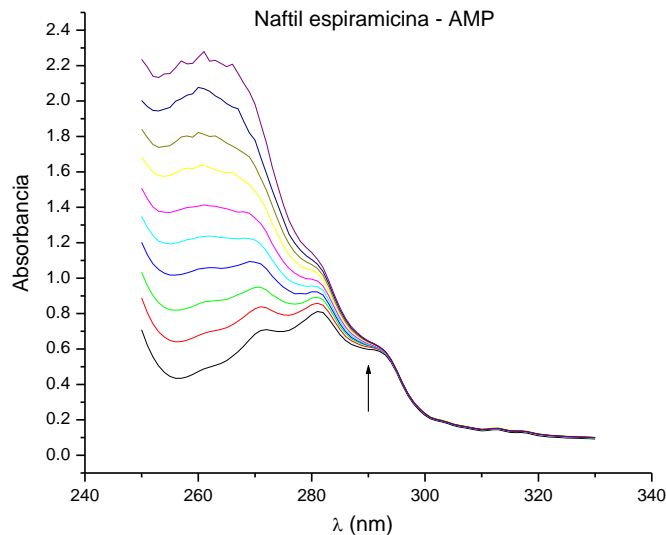


Figura 7.35. Espectros de absorción de la titulación de **1c** con la adición de AMP (6.1×10^{-3} M) hasta 1 equivalente.

A partir de esta titulación se obtuvo la gráfica que se presenta en la **Figura 7.36** en donde se grafica la absorbancia contra la concentración del huésped. Se intentó realizar el ajuste utilizando la ecuación para estequiometría 1:1 la cual dio un resultado que no es confiable y que presenta un error en el mismo orden de magnitud del logaritmo de la constante: $\log K = 4.9 \pm 4.34$.

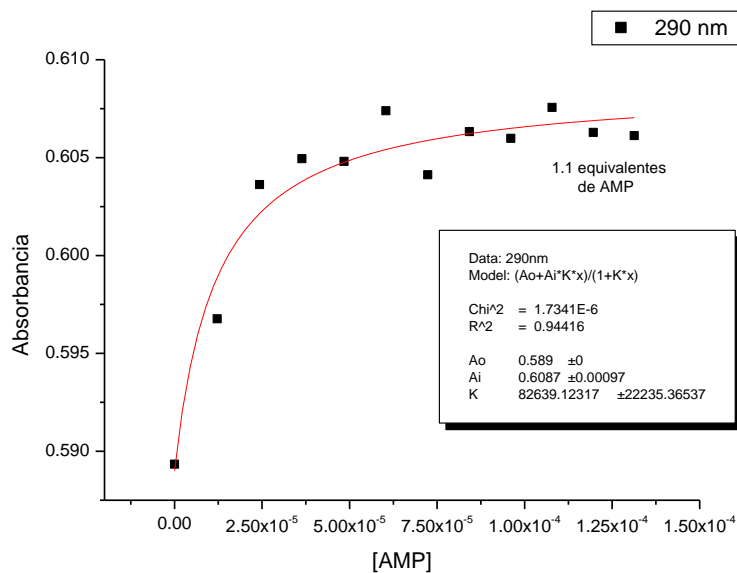


Figura 7.36. Gráfica de ajuste de la $\lambda = 290$ nm de la titulación de **1c** con AMP (6.1×10^{-3} M) con la ecuación que se muestra en el recuadro.

En la **Figura 7.37** se observa la gráfica con la transformación de los datos. Aquí se grafica ΔA contra el logaritmo negativo de la concentración de AMP. Los datos no se pudieron ajustar, ya que, como se puede apreciar, el cambio en la absorbancia es muy pequeño, por lo tanto, es difícil ajustar los datos porque muestran incertidumbre.

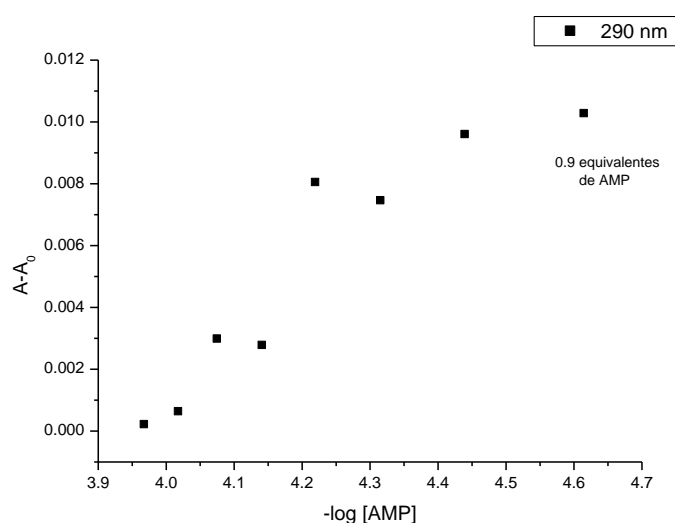


Figura 7.37. Gráfica con transformación de datos de la $\lambda = 290$ nm de la titulación de **1c** con AMP. No se encontró un modelo de ajuste adecuado.

Pirenil-espíramicina 1d con Nucleótidos de adenina

En el espectro de Pirenil espíramicina **1d** de la **Figura 7.38** se aprecia un incremento en las bandas en 265 y 278 nm, esto debido a la interferencia de los grupos aromáticos de los nucleótidos los cuales absorben en un rango de 200 a 300 nm.

En las tres titulaciones con AMP, ADP y ATP se observa un decremento muy pequeño en estas bandas indicando que la asociación es muy pequeña para observar algún proceso de complejación (los espectros y ajustes de estos experimentos se presentan en los **Esquemas E.7 – E.10 del Apéndice E**). Sin embargo, la adición de los nucleótidos no afecta las bandas del espectro del receptor **1d** ubicadas en 326 y 342 nm, las gráficas obtenidas para $\lambda = 342$ nm se encuentran en los **Esquemas E.11 – E.13 del Apéndice E**.

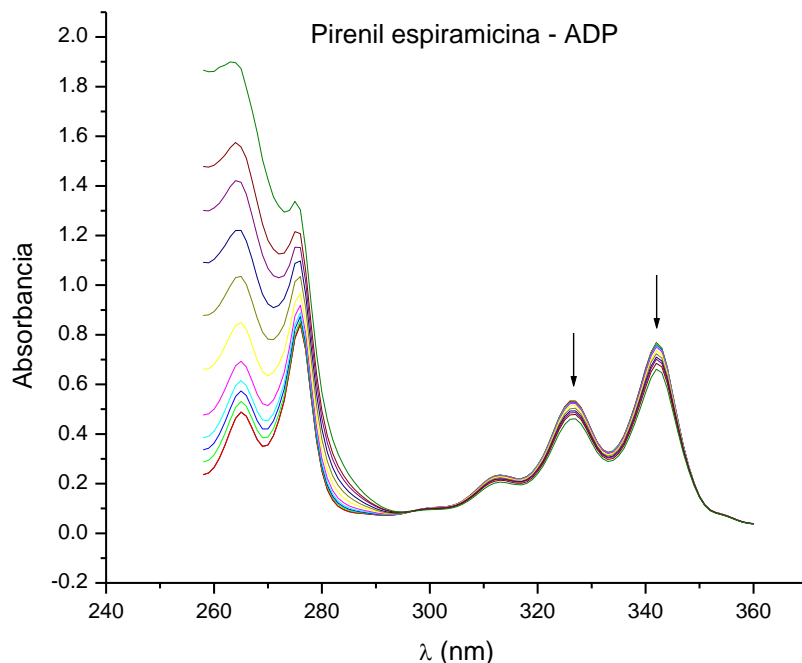


Figura 7.38. Espectro de absorción de la titulación de **1d** con la adición de ADP (1×10^{-3} M) hasta 1.3 equivalentes.

En la **Figura 7.39** se muestra la gráfica de la titulación de **1d**-ADP de la $\lambda = 326$ nm. Se dio el mismo tratamiento a los datos obtenidos que con el receptor **1d**, se hicieron las gráficas de absorbancia corregida por dilución contra la concentración del huésped, las cuáles no fue posible ajustar con el modelo para estequiometría 1:1.

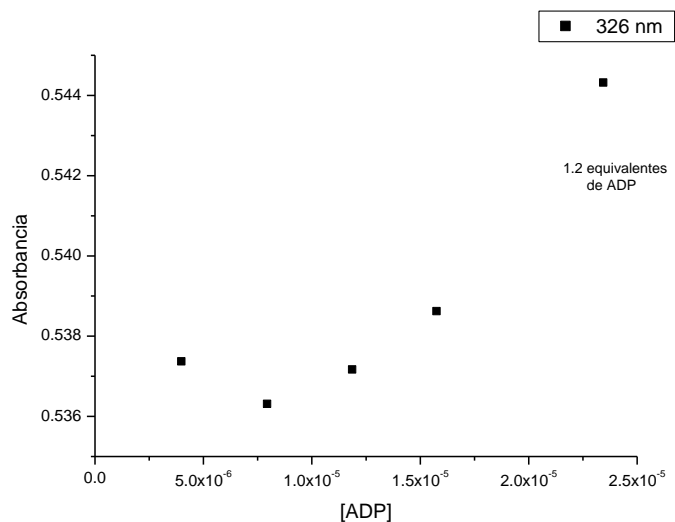


Figura 7.39. Gráfica de la $\lambda = 326$ nm de **1d** con ADP.

Por otro lado, en la **Figura 7.40** se observa las transformaciones de los datos en ΔA y $-\log$ [Huésped] obteniendo gráficas de tipo sigmoïdal para la complejación con los 3 nucleótidos. Los modelos sigmoïdales que se probaron dan un ajuste muy pobre particularmente en la región de baja concentración de los aniones.

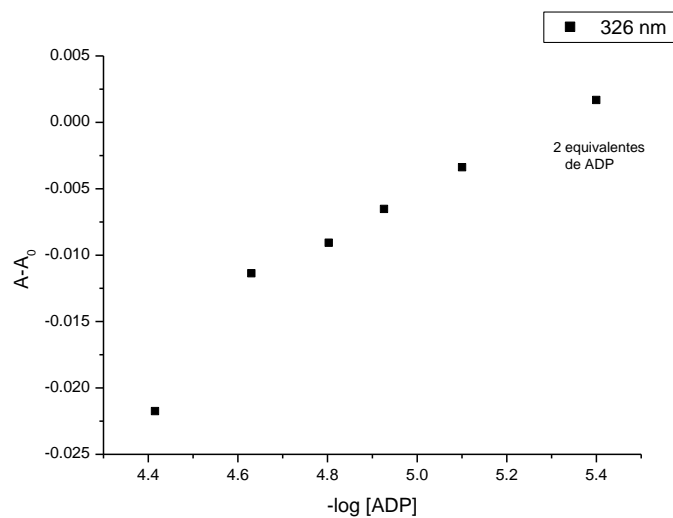


Figura 7.40. Gráfica de ajuste de la $\lambda = 326$ nm de **1d** con ADP.

7.8. Discusión integrada de constantes de protonación y constantes de asociación

En esta sección se hace la comparación mediante el formato de tablas de los valores de las constantes obtenidas en toda la tesis. En la **sección 7.8.1** se hace la comparación de las constantes de protonación de los derivados **1a-c** con la espiramicina mediante las técnicas de potenciometría, RMN ^1H y UV-visible. En la **sección 7.8.2** se hace una comparación de la selectividad y afinidad de estos mismos derivados y la espiramicina junto con receptores de origen natural, semisintético y sintético reportados en la literatura hacia los nucleótidos de adenina y los aniones fosfato y pirofosfato. Finalmente, en la **sección 7.8.3** se hace la comparación de la selectividad de los derivados **1a-b** y espiramicina hacia los aniones dicarboxilato.

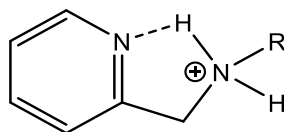
7.8.1. Constantes de protonación de los derivados 1a-c con espiramicina.

En la **Tabla 7.21** se presentan las constantes de protonación de la espiramicina y sus derivados **1a - c** que fueron determinadas experimentalmente por potenciometría en diferentes sistemas de solubilidad. Los valores de pK_a más altos fueron asignados para las aminas secundarias, que se convierten en bases más fuertes al estar sustituidas por fragmentos alquil aromáticos, los cuales por efecto inductivo le confieren un aumento a la basicidad de la amina. Los pK_a 's intermedios se asignaron con base en lo obtenido para el precursor espiramicina, en donde los sitios de protonación se comprobaron por el desplazamiento de las señales de los metilos de los aminoazúcares forosamina y micaminosa por RMN ^1H , cuyas señales sufren un desplazamiento a campo bajo conforme el pH aumenta, observándose que el desplazamiento correspondiente a la forosamina comienza a un pH más alto que la micaminosa.

El anillo del fragmento 2-piridilo en **1b** tiene un pK_a más bajo que su análogo piridina en forma libre ($pK_a = 5.17$);¹¹⁰ este valor presenta una gran incertidumbre pero su inclusión en el modelo mejoró el ajuste de los datos experimentales (en HYPERQUAD) en la parte ácida de la curva de titulación. Ésto se pudo comprobar más adelante al observar el

¹¹⁰ A) Grandberg, I. I., Faizova, G. K., Kost, A. N. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1966**, *2*, 561-566. B) Anderegg, G., Popov, K., Pregosin, P.S. *Helv. Chim. Acta*, **1986**, *69*, 329–332.

desplazamiento de las señales aromáticas en RMN ^1H en dependencia con el pH. Probablemente la disminución de la basicidad del átomo de nitrógeno de la piridina se deba a la repulsión generada entre el grupo aminometil protonado y el anillo de piridina protonado. Por otro lado, se puede proponer que la cercanía entre el grupo aminometil y el anillo piridina también puede generar un puente de hidrógeno intramolecular pudiendo reducir significativamente la basicidad del átomo de nitrógeno del anillo de piridina (**Esquema 7.7.**).



Esquema 7.7. Propuesta de puente de hidrógeno intramolecular en la 2-picolilamina.

Por otro lado, para el derivado **1b** se obtuvieron las constantes de protonación por la técnica de RMN ^1H . Los valores de pK_b obtenidos mediante el ajuste que se hizo a las gráficas de los desplazamientos de las señales de los metilos de la micaminosa y la forosamina fueron transformados a pK_a y fueron comparables con los obtenidos por potenciometría. Finalmente, para el derivado **1c** se obtuvo un valor de pK_a por la técnica de UV-visible que fue asignado a la amina secundaria, siendo el único valor de pK_a que fue obtenido del ajuste de los datos.

Al hacer una comparación *a lo largo* de la **Tabla 7.21**, podemos observar que los valores de pK_a de la micaminosa y la forosamina de los derivados son menores a los obtenidos para su precursor espiramicina. Por otra parte, descartando el derivado que contiene el heteroátomo 2-piridilo, podemos observar que los valores de pK_a de naftil espiramicina **1c**, son ligeramente mayores a los observados para bencil espiramicina **1a**, sin embargo, ambos valores siguen siendo menores a los pK_a 's de espiramicina para el mismo sitio de protonación. En cuanto a los valores de pK_a de las aminas secundarias podemos notar que son muy similares (a excepción del error) entre los derivados **1a** y **1c**; el derivado **1b** presenta un valor más bajo, tal vez por la influencia del posible puente intramolecular que ya se explicó anteriormente.

Tabla 7.21. Comparación de constantes de protonación de los derivados **1a-c** y espiramicina por potenciometría.

	Posición de grupo	Bencil Espiramicina 6a	2-Picolil espiramicina 6b	Naftil Espiramicina 6c	Espiramicina
		<i>H₂O-MeOH</i> <i>9:1 V/V</i>	<i>H₂O</i>	<i>H₂O-MeOH</i> <i>9.5:0.5 V/V</i>	<i>H₂O</i>
p <i>K</i> _{aPy}	Piridina	NA	2.78 ± 0.20	NA	NA
p <i>K</i> _{a1}	Micaminosa	6.83 ± 0.10	7.37 ± 0.05 7.18 ^a	7.19 ± 0.02	7.49 ± 0.009
p <i>K</i> _{a2}	Forosamina	8.21 ± 0.07	8.19 ± 0.04 8.58 ^a	8.30 ± 0.01	8.44 ± 0.006
p <i>K</i> _{a3}	Amina secundaria	8.99 ± 0.09	8.78 ± 0.34	8.98 ± 0.02 8.96 ^b ± 0.06	NA

^aConstantes obtenidas mediante RMN ¹H, ^bConstante obtenida mediante UV-visible, NA = No Aplica

7.8.2. Logaritmos de constantes de asociación de los nucleótidos de adenina con diferentes receptores.

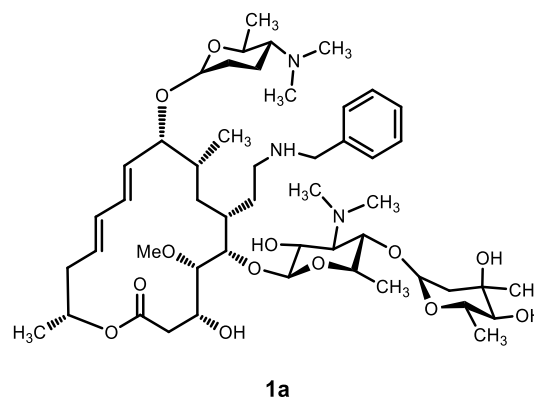
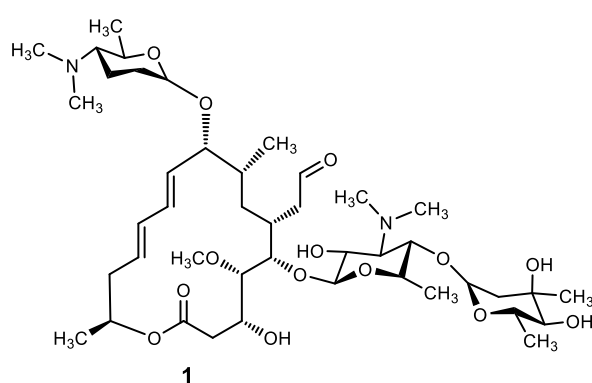
En la **Tabla 7.22** se resumen las constantes de asociación en términos de Log *K* de algunos receptores naturales y semisintéticos. Se puede apreciar que los receptores del tipo aminoglucósidos **3 – 5** presentan afinidad por el ATP, siendo la amikacina **4** quien presenta la mayor constante de afinidad (4.25). Los derivados de estreptomicina **5a** y **5b** que contienen fragmentos aromáticos en su estructura, presentaron una mejoría en la constante de afinidad hacia el ATP, sin embargo, el derivado **5b** mostró un cambio en la tendencia de afinidad, dando una constante mayor hacia el ADP (4.64) que por ATP (4.58). Los macrólidos tilosina **2** y espiramicina **1** presentaron mayor afinidad por el ADP con constantes en el mismo orden de magnitud (5.58 y 5.77, respectivamente) y mayores que las presentadas por el derivado de estreptomicina **5b** (4.64). Interesantemente, las constantes de afinidad obtenidas por espiramicina hacia ADP (5.77) y AMP (4.48) fueron más altas en comparación con las obtenidas por el receptor sintético **6** reportado por Bianchi y col., (5.70 y 2.93, respectivamente). Esto nos indica que la espiramicina es un buen receptor natural de nucleótidos; esta aportación es importante ya que los macrólidos utilizados como anfitriones en el reconocimiento molecular no se habían reportado en la literatura. La modificación de la tilosina, el derivado **2a**, no fortaleció la interacción en el reconocimiento molecular hacia

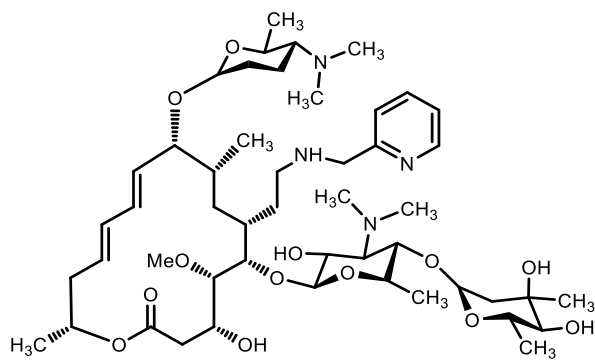
ADP (3.56). A pesar de que el derivado de espiramicina **1a**, mostró una mayor constante de asociación por el ADP (4.82), su interacción no fue tan alta como la observada con la espiramicina **1**. Por otra parte, el derivado **1b** mostró valores de constantes menores a las esperadas, y no superó las obtenidas por espiramicina. Mientras que el derivado **1c** mostró la tendencia normalmente esperada para los nucleótidos, siguiendo la ley de Coulomb, calculándose una constante de afinidad muy grande hacia el ATP (6.40), superando de este modo a los demás receptores, pero no lo hizo para el caso del ADP en donde se sigue observando una constante menor que la obtenida por espiramicina. En el estudio de los aniones fosfato y pirofosfato, el receptor de poliamonio **6** presentó constantes de afinidad (4.93 y 5.60, respectivamente) mejores que las obtenidas por espiramicina **1** y por sus derivados **1a** y **1b**. Aun así, el derivado **1b** presentó una constante de afinidad (4.16) más alta por el pirofosfato que la calculada por espiramicina (3.78). El receptor kanamicina **3** es el único compuesto natural que presenta una constante de afinidad hacia pirofosfato (5.3) similar a la observada por el receptor **6** (5.60). Las estructuras de todos estos receptores se muestran en el **Esquema 7.8**.

Tabla 7.22. Comparación de constantes de asociación obtenidas por diferentes receptores reportados en la literatura hacia aniones fosfatados por potenciometría en solución acuosa.

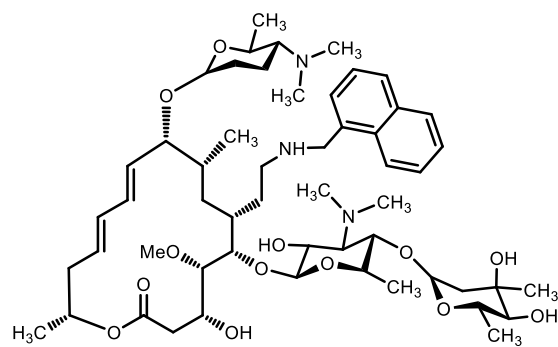
Log K						
Receptor	AMP	ADP	ATP	PO ₄ ³⁻	P ₂ O ₇ ⁴⁻	Referencia
Espiramicina ^a 1	4.48±0.04	5.77±0.01	3.70±0.01	ND	3.78±0.03	81
Bencil espiramicina ^{b,e} 1a	3.95±0.05	4.82±0.07	4.50±0.28	3.34±0.19	3.81±0.54	Este trabajo
2-picolil espiramicina ^b 1b	2.67±0.03	2.48±0.15	3.04±0.04	3.07±0.10	4.16±0.03	Este trabajo
Naftil espiramicina ^{b,f} 1c	4.10±0.06	4.74±0.04	6.40±0.05	ND	ND	Este trabajo
Tilosina ^a 2	3.05±0.02	5.58±0.02	3.09±0.02	ND	ND	74
Benciltilosina ^b 2a	ND	3.56±0.02	ND	ND	ND	74
Kanamicina ^c 3	2.47±0.05	3.40±0.05	4.15±0.05	ND	5.3±0.09	67
Amikacina ^c 4	ND	ND	4.25	ND	ND	67
Estreptomicina ^c 5	ND	ND	2.77	ND	ND	67
Derivado de estreptomicina ^b 5a	3.62	3.52	4.57	ND	ND	68
Derivado de estreptomicina ^b 5b	3.63	4.64	4.58	ND	ND	68
Poliamonio con fragmento de pirimidina ^d 6	2.93	5.70	3.97	4.93	5.60	62

^aReceptores de origen natural del grupo de los macrólidos, ^bReceptores semisintéticos, ^cReceptores de origen natural del grupo aminoglucósidos, ^dReceptor sintético, ^eEstudios realizados en Agua-MeOH 9:1 V/V, ^fEstudios realizados en Agua-MeOH 9.5-0.5 V/V, ND = No determinada

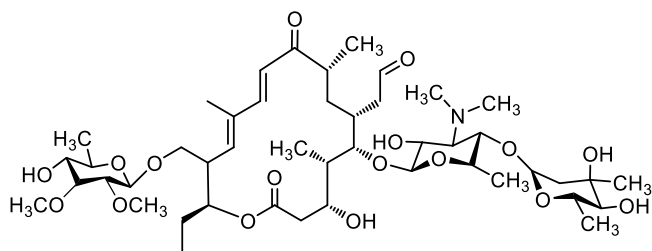




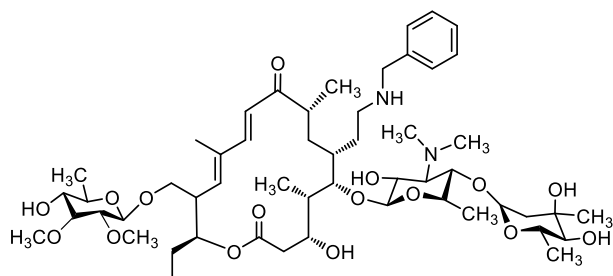
1b



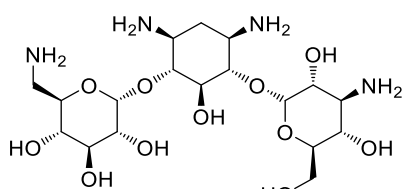
1c



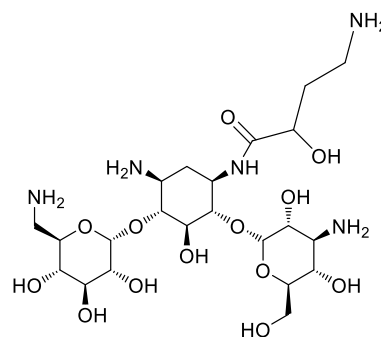
2



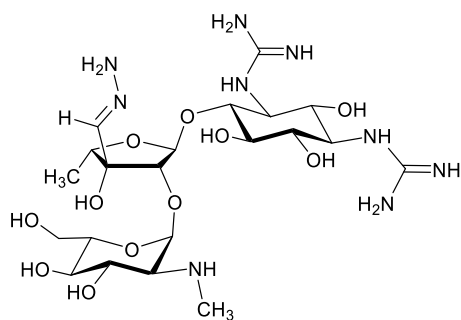
2a



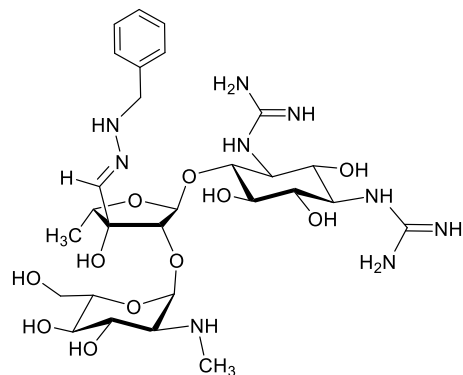
3



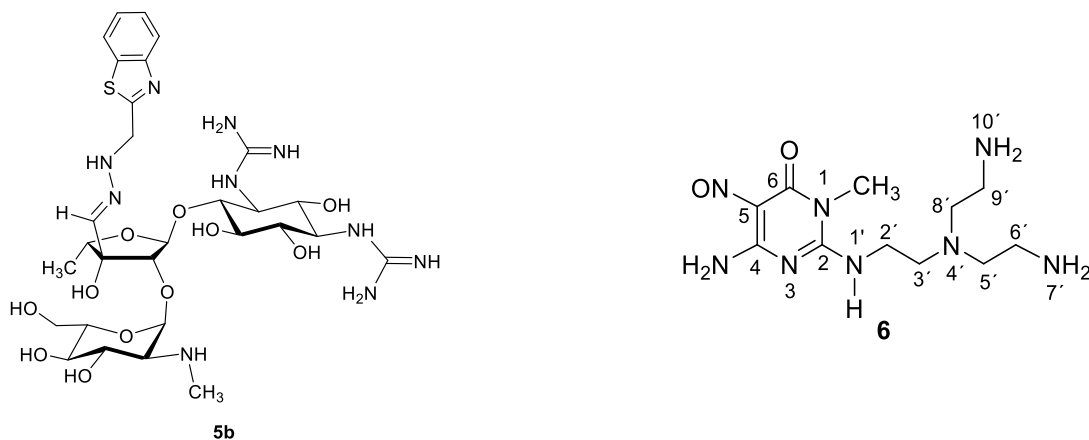
4



5



5a



Esquema 7.8. Estructuras de los receptores

7.8.3. Logaritmos de constantes de asociación de ácidos dicarboxílicos con espiramicina y sus derivados 1a-b.

En la **Tabla 7.23** se muestran los logaritmos de las constantes de asociación en términos de $\log K$ entre los aniones del tipo dicarboxilato con el receptor espiramicina **1** y los derivados **1a - b** reportados en este trabajo. Las constantes de afinidad del derivado **1a** calculadas hacia adipato y pimelato (4.56 y 4.80, respectivamente) fueron más altas que las obtenidas por espiramicina **1** (3.03 y 3.40, respectivamente), mientras que el derivado **1b** mostró una afinidad similar hacia el adipato (3.24) y el succinato (3.27) con un error muy similar, lo cual nos indica que no hay una discriminación del receptor por estos dicarboxilatos ni por la cadena más larga pimelato (3.04) y suberato (3.03). Las constantes de **1b** hacia los dicarboxilatos se encuentran en la misma orden de magnitud que los obtenidos para espiramicina.

A partir de modelos moleculares previos, se midió la distancia de la posible cavidad que pueda albergar a los ácidos dicarboxílicos. Por ejemplo, para la formación del complejo **1a** – pimelato ($\log K = 4.80$) la distancia entre uno de los protones de la amina secundaria y el hidrógeno de la amina de la micaminosa es de 9.75 Å y la distancia de la cadena del pimelato (entre los oxígenos terminales con carga negativa) tiene una distancia de 9.73 Å, la cual podría ajustarse perfectamente en esta cavidad. Por otra parte, para la formación del complejo **1b** – adipato ($\log K = 3.24$), la cavidad en donde pudiera ajustarse este

dicarboxilato de 8.29 Å sería entre el hidrógeno de la amina secundaria (de la picolilamina) con el hidrógeno de la amina de la micaminosa que tiene una distancia de 8.37 Å. La distancia entre los oxígenos terminales de carga negativa para el succinato es de 5.62 Å, al mostrar una constante muy parecida a la obtenida para el adipato (3.27) se puede deducir que el receptor **1b** tiene una cavidad flexible que se puede adaptar al tamaño de las cadenas de los dicarboxilatos.

Tabla 7.23. Comparación de constantes de asociación obtenidas por espiramicina y sus derivados **1a-b** por potenciometría en solución acuosa hacia ácidos dicarboxílicos.

Receptor	Log <i>K</i>				Referencia
	Succinato	Adipato	Pimelato	Suberato	
Distancias entre oxígenos terminales (Å)	5.62	8.29	9.73	10.11	82
Espiramicina 1	ND	3.03±0.03	3.40±0.009	3.38±0.005	82
Bencil espiramicina 1a	ND	4.56±0.02	4.80±0.04	ND	Este trabajo
2-picolil espiramicina 1b	3.27±0.03	3.24±0.03	3.04±0.03	3.03±0.08	Este trabajo

ND = No detectada

Conclusiones y perspectivas

8. CONCLUSIONES

Síntesis de los derivados y obtención de constantes de protonación

1. La introducción de aminas aromáticas en los nuevos derivados de espiramicina **1a-d** se logró mediante una síntesis eficaz de aminación reductiva, obteniéndose los productos con muy buenos rendimientos químicos: Bencil espiramicina **1a** 98%, 2-Picolil espiramicina **1b** 96%, Naftil espiramicina **1c** 93% y Pirenil espiramicina **1d** 91%. La caracterización se realizó por medio de las técnicas espectroscópicas de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HETCOR) y masas de alta resolución (HRMS).
2. La obtención de las constantes de protonación (pK_a) de los derivados **1a-c** se realizó mediante estudios por potenciometría en distintos medios acuosos: para **1a** $pK_{a1}= 6.83$, $pK_{a2}= 8.21$ y $pK_{a3}= 8.99$ (en H_2O -MeOH 9:1 V/V), para **1b** $pK_{Py}= 2.78$, $pK_{a1}= 7.37$, $pK_{a2}= 8.19$ y $pK_{a3}= 8.78$ (en H_2O) y para **1c** $pK_{a1}= 7.19$, $pK_{a2}= 8.30$ y $pK_{a3}= 8.98$ (en H_2O -MeOH 9.5:0.5 V/V). El valor de pK_{a3} se asignó a las aminas secundarias adyacentes al grupo aromático, las cuales al estar sustituidas con fragmentos alquil aromáticos son bases más fuertes. Los valores de pK_{a1} y pK_{a2} de las aminas protonables micaminosa y forosamina, respectivamente, fueron asignados de acuerdo a lo obtenido en trabajos previos con su precursor espiramicina.
3. El derivado **1b** fue el único compuesto soluble en D_2O y fue posible calcular sus valores de pK_a mediante titulación potenciométrica seguida por RMN ^1H ($pK_{a1}= 7.18$ y $pK_{a2}= 8.58$). Se determinaron dos valores de pK_D , los cuales al ser transformados a pK_a coinciden dentro de los límites del error experimental con los obtenidos por potenciometría para forosamina y micaminosa ($pK_{a1}= 7.37$, $pK_{a2}= 8.19$). Para el fragmento de piridina se observó un desplazamiento a campo bajo de las señales aromáticas cuando el pH de la solución fue menor a 2.07, lo cual también confirma el valor obtenido por potenciometría.

4. Con la metodología UV-visible, se hizo el estudio para obtener los valores de las constantes de protonación del derivado **1c**. Sin embargo, sólo fue posible calcular un valor de pK_a que se asignó a la amina secundaria adyacente al grupo naftilo ($pK_a = 8.96$).
5. Los valores de pK_a determinados para los grupos micaminosa (pK_{a1}) y forosamina (pK_{a2}) en los derivados **1a-c** fueron menores con respecto a los obtenidos para su precursor espiramicina. Se observó una similitud en los valores de pK_a de los derivados **1a** y **1c**, quienes presentan fragmentos aromáticos similares en sus estructuras (benceno y naftilo), mientras que dichos valores en el derivado **1b** son ligeramente diferentes por la presencia de un fragmento heteroaromático (piridina), siendo sus valores de pK_{a1} y pK_{a3} los más afectados posiblemente debido a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular propuesto en el **Esquema 7.7**. Los valores de pK_a de naftil espiramicina **6c**, son ligeramente mayores a los observados para bencil espiramicina **6a**, sin embargo, ambos valores siguen siendo menores a los pK_a 's de espiramicina para el mismo sitio de protonación.

Obtención de constantes de asociación, formación de complejos de los derivados con los aniones

6. De acuerdo con la hipótesis planteada, se esperaba que los fragmentos aromáticos presentes en los derivados **1a – c** podrían mejorar la afinidad hacia los aniones fosfatados. En este sentido, el derivado **1a** con un fragmento bencilo en su estructura ofreció constantes de afinidad hacia los aniones ATP y pirofosfato ($\log K = 4.50$ y 3.81 , respectivamente) más altas que las obtenidas por su precursor espiramicina **1** ($\log K = 3.70$ y 3.78 , respectivamente). Por otra parte, el derivado **1c** con un fragmento naftilo potencializó sus propiedades de reconocimiento molecular principalmente hacia ATP, calculándose una afinidad de $\log K = 6.40$; mientras que el derivado **1b** mostró una mayor constante de asociación hacia pirofosfato ($\log K = 4.16$), cuyas constantes superan las

calculadas por la espiramicina. Con lo cual se puede concluir que la hipótesis se cumplió satisfactoriamente.

7. En cuanto a los aniones de tipo dicarboxilato, el derivado **1a** también mejoró su capacidad de reconocimiento molecular hacia adipato y pimelato ($\log K = 4.56$ y 4.80 , respectivamente) en comparación con la espiramicina. Mientras que, el derivado **1b** produjo constantes de asociación similares en orden de magnitud a las presentadas por espiramicina **1**.
8. Con la técnica de RMN ^1H y ^{31}P se hicieron los estudios de reconocimiento molecular del derivado **1b** con ATP y ADP. Los valores de CIS para el complejo **1b**-ATP indican desplazamientos en las señales de forosamina y micaminosa a campo alto, y del P_γ del ATP a campo bajo, mientras que los fragmentos de piridina en **1b** y de adenina en el ATP sufren desplazamientos a campo alto. Para el complejo formado por **1b**-ADP, se observan cambios en el desplazamiento de las señales de los metilos de los aminoazúcares micaminosa y forosamina a campo alto, y de igual manera un desplazamiento a campo alto por parte de los protones aromáticos de la piridina, así como el desplazamiento a campo bajo de la señal correspondiente al P_β del ADP. Sin embargo, no se lograron observar desplazamientos para el fragmento de adenina del ADP.
9. Los estudios de modelado computacional, a nivel de mecánica molecular, indican que las interacciones para el complejo **1a** – ATP son del tipo puente de hidrógeno de fuerza moderada entre la amina secundaria y el P_α del ATP, así como una interacción aromática π - π entre el anillo de piridina del derivado y la base nitrogenada del ATP. Mientras que para el complejo **1b** – ATP se observan interacciones de puente de hidrógeno moderadas entre los oxígenos del P_α con la amina secundaria del fragmento de bencilo y el protón del C_5 de la micaminosa.
10. Con la técnica de ITC se estudió el derivado **1b** en solución acuosa, se hicieron experimentos para observar la complejación entre **1b** con ATP, ADP y AMP. La

mejor curva de titulación se obtuvo para el complejo **1b**-ATP, el ajuste de los datos termodinámicos indicó que el proceso es entálpicamente desfavorable pero la complejación está entrópicamente favorecida. La constante de asociación calculada fue del mismo orden de magnitud que la determinada por potenciometría. El cambio en la absorción de calor de **1b** con ADP y AMP fue muy pequeño, por lo tanto, los valores de constante de asociación y los datos termodinámicos obtenidos no fueron adecuados para obtener información cuantitativa.

11. Finalmente, por medio de la técnica de UV-visible fue posible determinar solamente un valor de pK_a para el derivado **1c**, el cual se asignó a la amina secundaria por comparación con los otros derivados. No obstante, también se realizaron experimentos para obtener los coeficientes de absorptividad molar de los derivados **1a-c** en buffer MES 0.05 M, pH 6. En cuanto al derivado **1d** se realizó los experimentos en DMSO debido a su baja solubilidad en agua. Se hizo el estudio de reconocimiento molecular de los derivados **1c** y **1d** con AMP, ADP y ATP en buffer de fosfatos 0.05 M. Los experimentos se realizaron a pH 3 debido a la poca solubilidad que presentaba el derivado **1d** a pH 7. Las gráficas obtenidas de estas titulaciones no se pudieron ajustar con modelos clásicos ya que presentaban dispersión debido a que el cambio en la absorbancia durante la complejación fue mínimo.

9. PERSPECTIVAS

1. Hacer estudios de reconocimiento molecular de Bencil espiramicina **1a** y 2-picolil espiramicina **1b** por RMN (^1H y ^{31}P) fijando los experimentos en diferentes valores de pH para observar el cambio en el desplazamiento de los sitios de interacción.
2. Realizar estudios de obtención de las constantes de protonación de los derivados Naftil espiramicina **1c** y Pirenil espiramicina **1d** y estudios de reconocimiento molecular con aniones por espectrofotometría de fluorescencia para observar el efecto de emisión de los fragmentos aromáticos de los derivados.
3. Realizar los estudios de reconocimiento molecular de los nucleótidos en presencia de iones Mg^{2+} que es el cofactor principal en las reacciones que involucran al ATP, ADP en los procesos biológicos.

Apéndices

10. APÉNDICES

APÉNDICE A: Parte experimental

Procedimiento General para la síntesis de los derivados de espiramicina 1a-d.

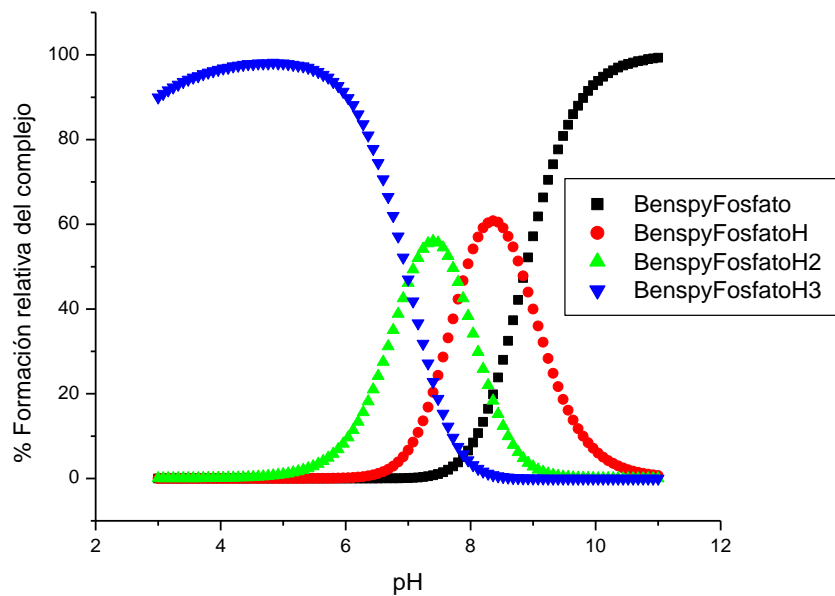
En un matraz de 50 mL se disolvió espiramicina (1.0 equiv.) en una mezcla cloroformo-ácido acético (10 mL: 1 mL). A temperatura ambiente se adicionó lentamente una amina (1.3 equiv.) y después de 10 min se agregó el triacetoxiborohidruro de sodio (1.5 equiv.). La mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 24 h bajo una atmósfera inerte de nitrógeno. Pasado este tiempo de reacción, la fase orgánica se extrajo con diclorometano (2×20 mL). La fase acuosa se trató con una solución de NaOH 1 M hasta alcanzar un pH>9 y el derivado de espiramicina puro se extrajo de la solución acuosa con diclorometano (3×30 mL). La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida, obteniendo los derivados de espiramicina **1a-d**.

APÉNDICE B: Preparación de NaOH estandarizado

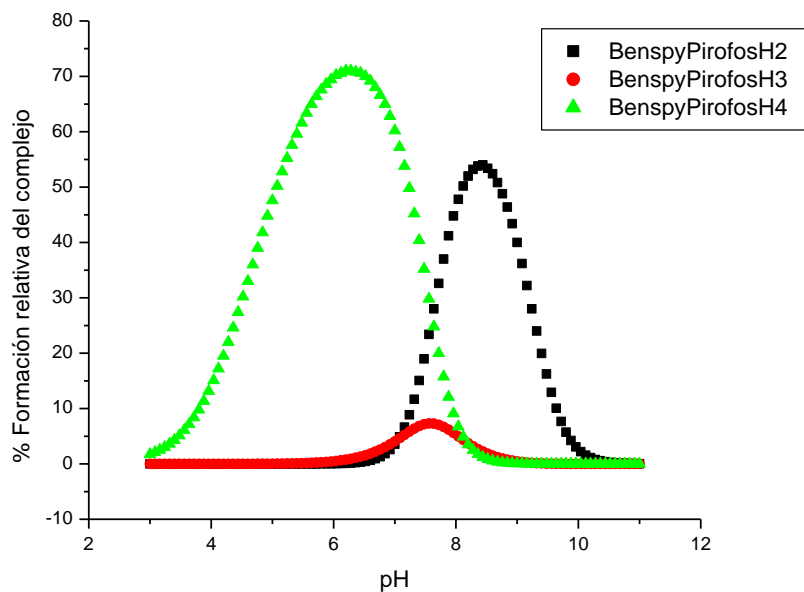
Primero se prepara una solución 50:50 de NaOH (5 g de NaOH en 5 mL de agua desionizada). Para preparar el NaOH estandarizado se calienta agua desionizada (~400 mL), cuando este en ebullición se agrega ~1 mL de la solución 50:50 de NaOH (con la finalidad de obtener una solución 0.07 M), una vez agregado esto se tapa el matraz y se deja enfriar mediante el burbujeo de N₂ unos 5-8 minutos, esto con el fin de eliminar los carbonatos, al mismo tiempo se purga con N₂ un frasco previamente lavado y seco. Pasado este tiempo se trasvasa la solución de NaOH al frasco purgado. No se debe quitar el flujo de nitrógeno de ninguno de los dos recipientes durante el trasvasado. Una vez colocado el NaOH en el frasco se continúa burbujando y se retira poco a poco el flujo de nitrógeno para cerrar bien el matraz y sellarlo con parafilm. Si el frasco es transparente se debe cubrir con aluminio, sino se puede usar un frasco ámbar sin necesidad de cubrirlo. Una vez fría la solución de NaOH se titula con biftalato de potasio para conocer la concentración real. Posteriormente se titula con una solución de HCl para conocer el pK_w del sistema. Se debe revisar la solución cada cierto tiempo para cerciorarse de la aparición de pequeños cristales, si ya los tiene es señal de desechar la solución.

APÉNDICE C: Diagramas de formación de especies de los complejos en potenciometría

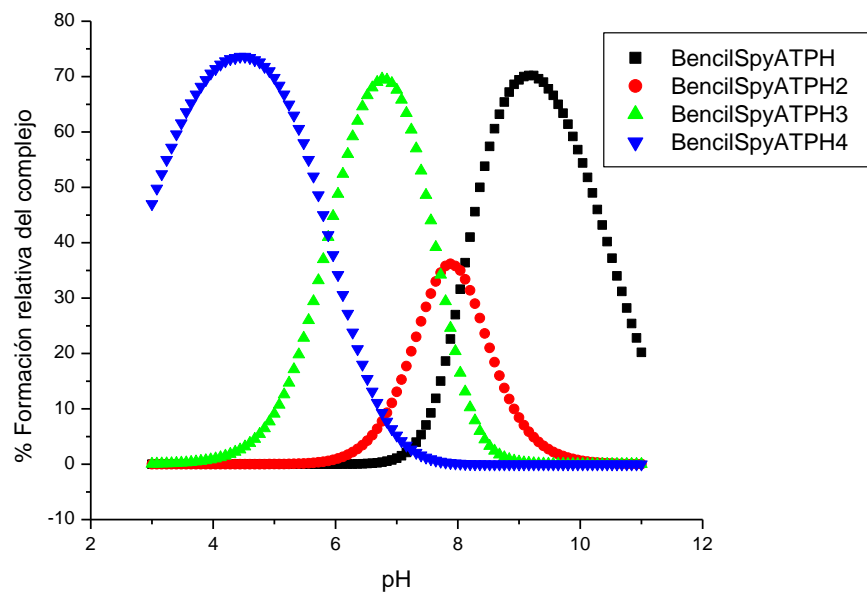
Bencil espiramicina 1a



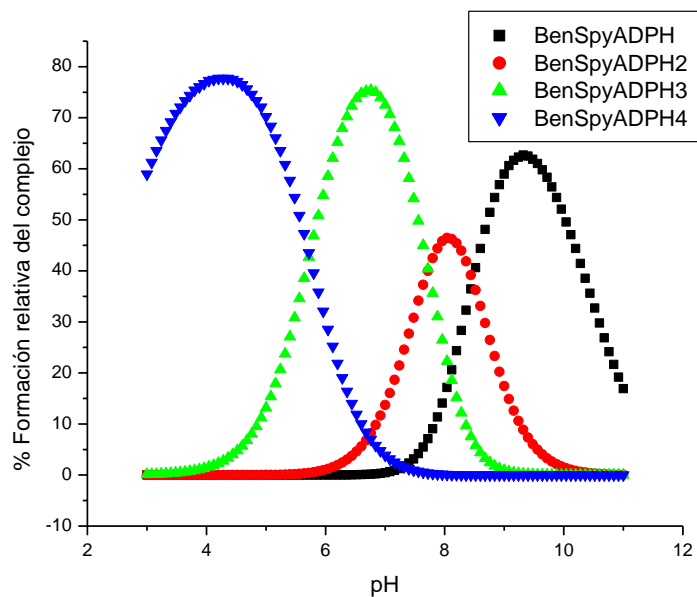
Esquema C.1. Diagrama de formación de especies del complejo: Bencil espiramicina – Fosfato 5×10^{-4} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C.



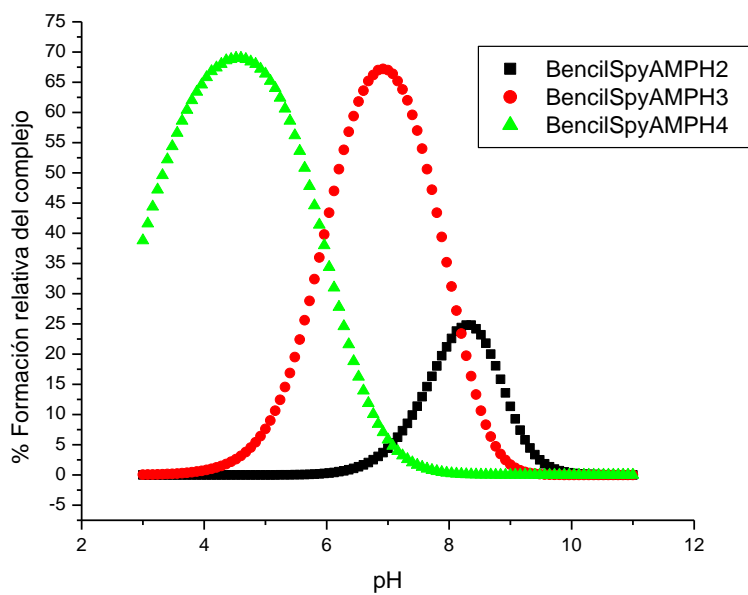
Esquema C.2. Diagrama de formación de especies del complejo: Bencil espiramicina – Pirofosfato 5×10^{-4} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C.



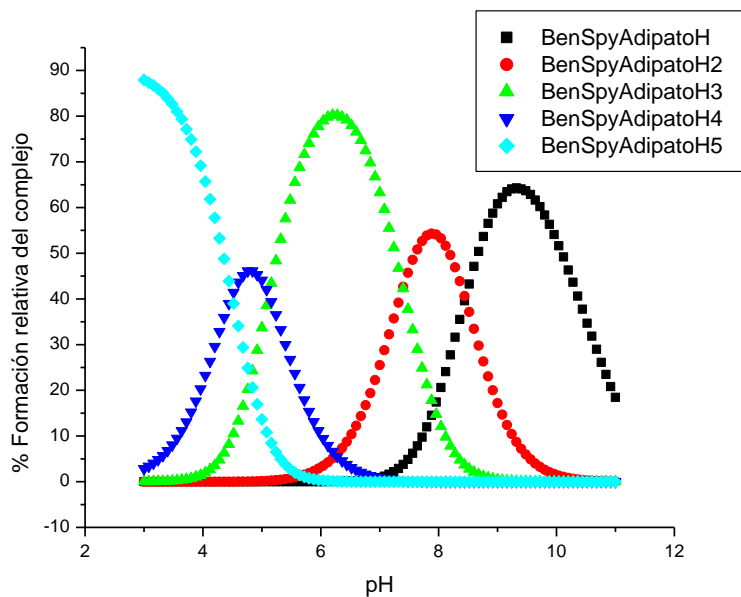
Esquema C.3. Diagrama de formación de especies del complejo: Bencil espiramicina – ATP 5×10^{-4} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .



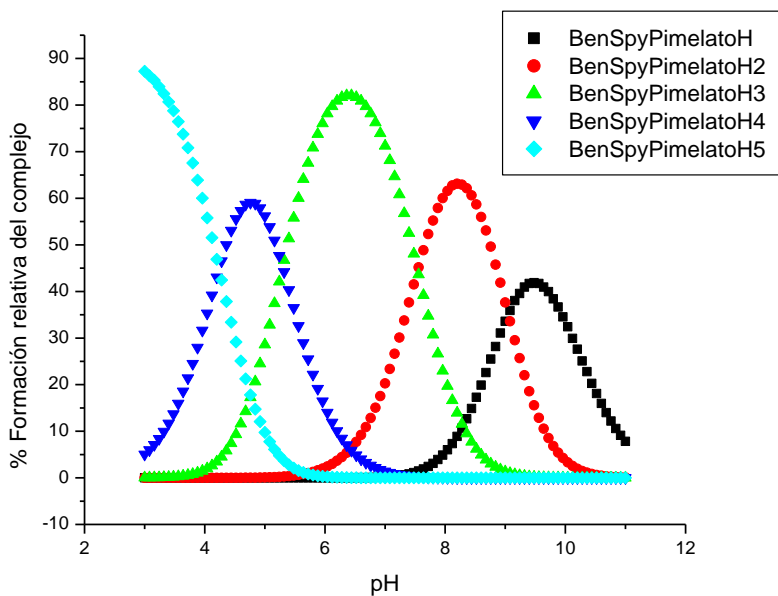
Esquema C.4. Diagrama de formación de especies del complejo: Bencil espiramicina – ADP 5×10^{-4} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .



Esquema C.5. Diagrama de formación de especies del complejo: Bencil espiramicina – AMP 5×10^{-4} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .

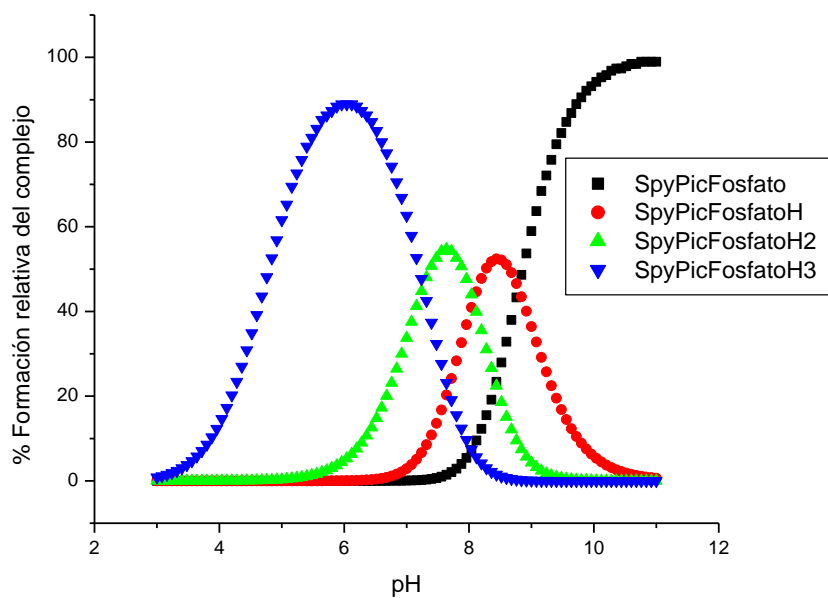


Esquema C.6. Diagrama de formación de especies del complejo: Bencil espiramicina – Adipato 5×10^{-4} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .

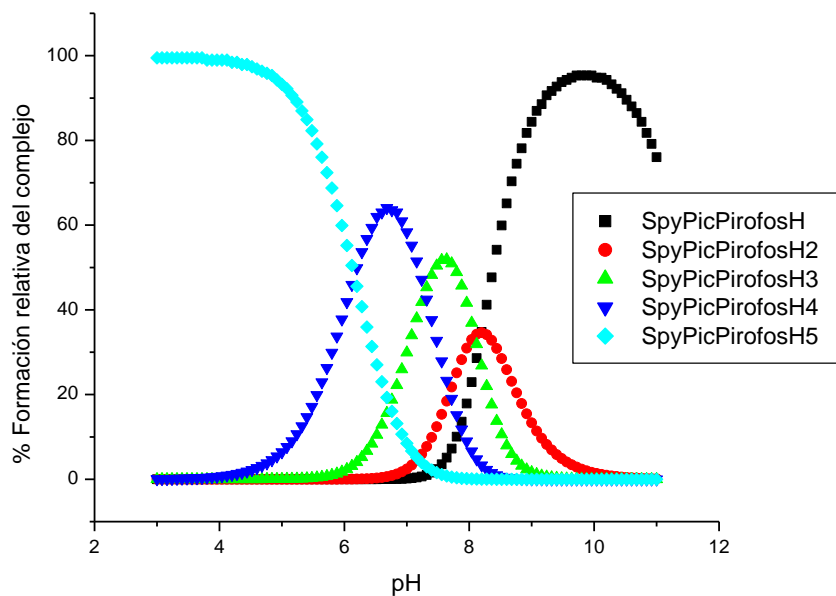


Esquema C.7. Diagrama de formación de especies del complejo: Bencil espiramicina – Pimelato 5×10^{-4} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .

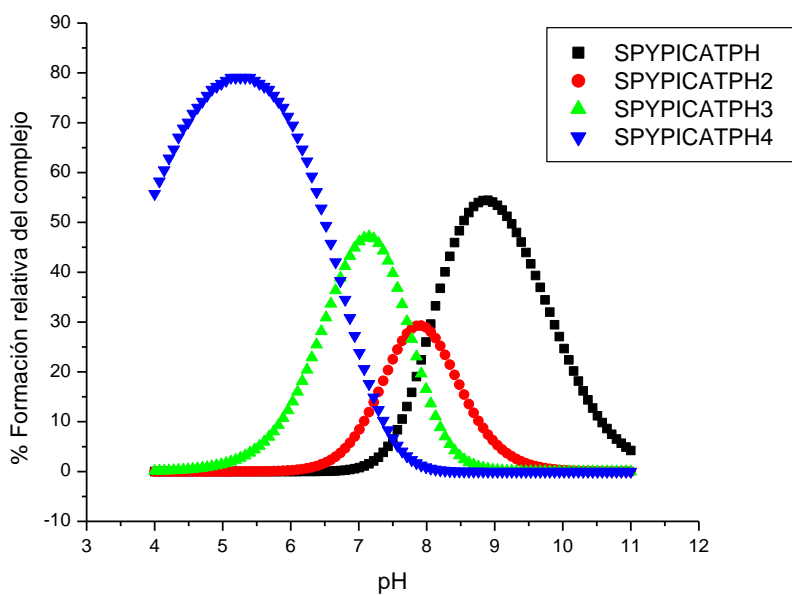
2-picolil espiramicina 1b



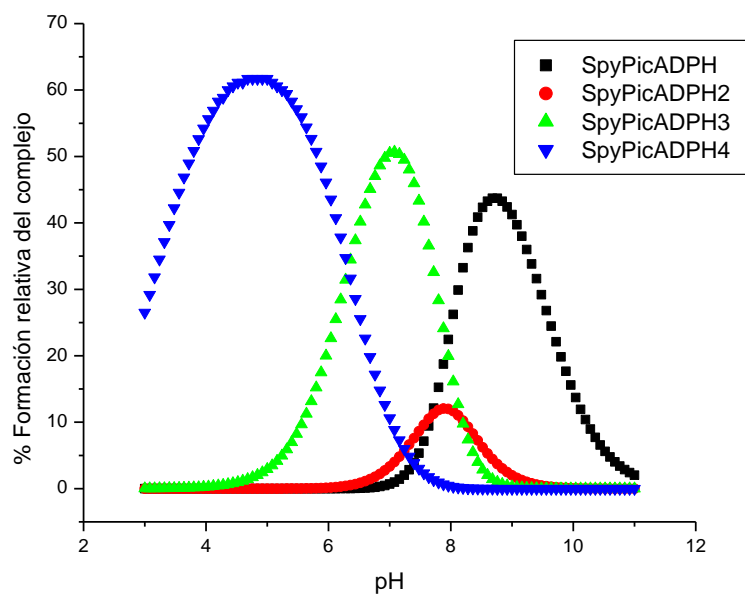
Esquema C.8. Diagrama de formación de especies del complejo: 2-picolil espiramicina – Fosfato 2×10^{-3} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .



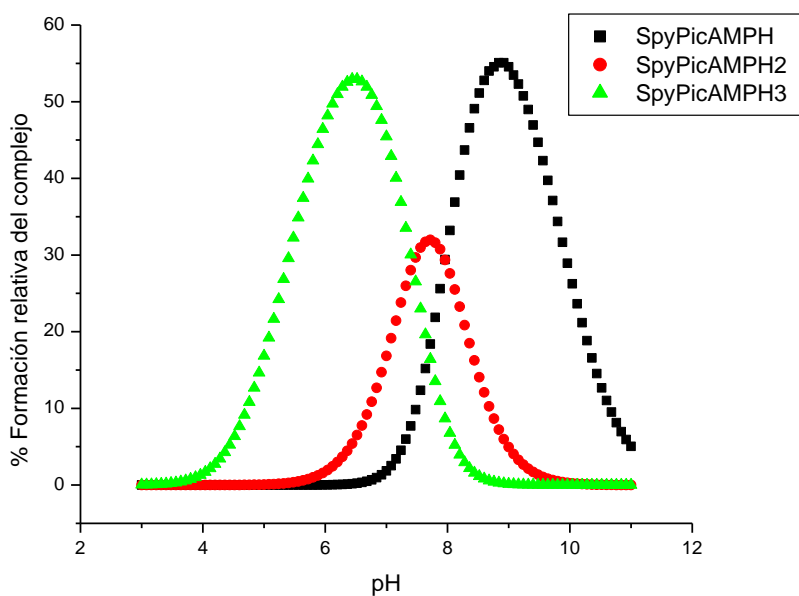
Esquema C.9. Diagrama de formación de especies del complejo: 2-picolil espiramicina-Pirofosfato 2×10^{-3} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .



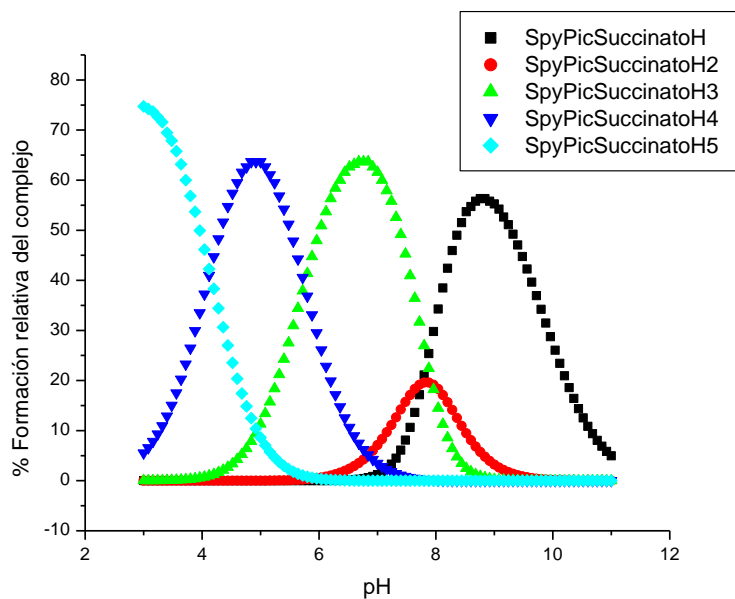
Esquema C.10. Diagrama de formación de especies del complejo: 2-picolil espiramicina – ATP 2×10^{-3} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .



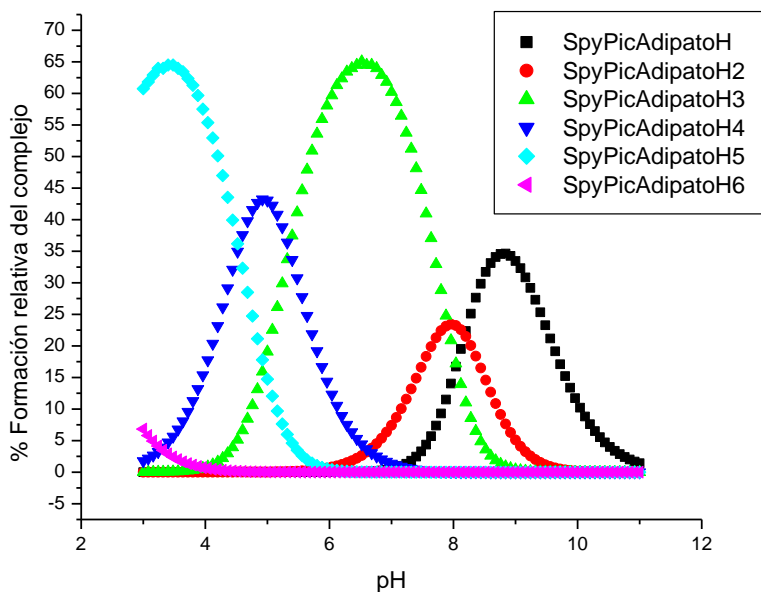
Esquema C.11. Diagrama de formación de especies del complejo: 2-picolil espiramicina – ADP 2×10^{-3} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .



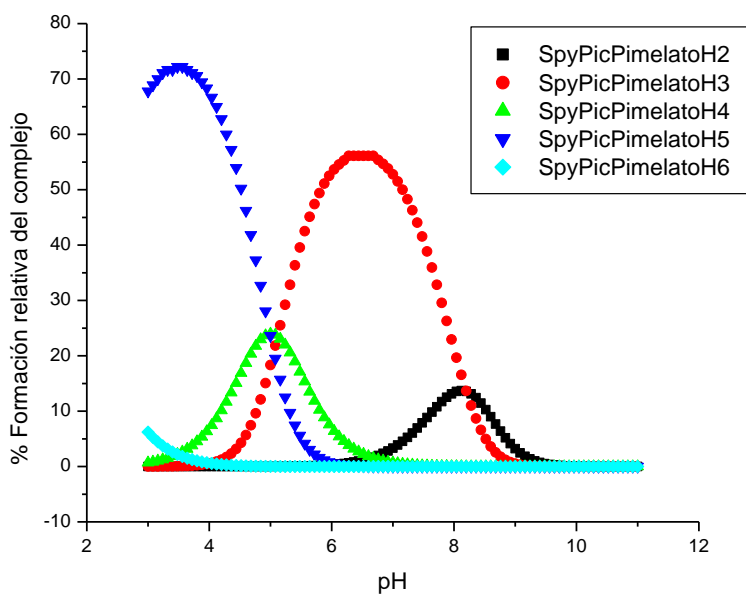
Esquema C.12. Diagrama de formación de especies del complejo: 2-picolil espiramicina – AMP 2×10^{-3} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .



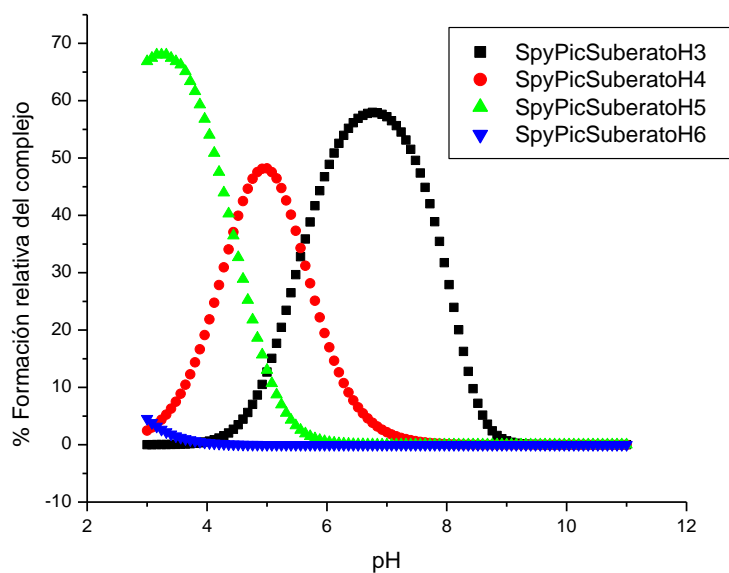
Esquema C.13. Diagrama de formación de especies del complejo: 2-picolil espiramicina-Succinato 2×10^{-3} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .



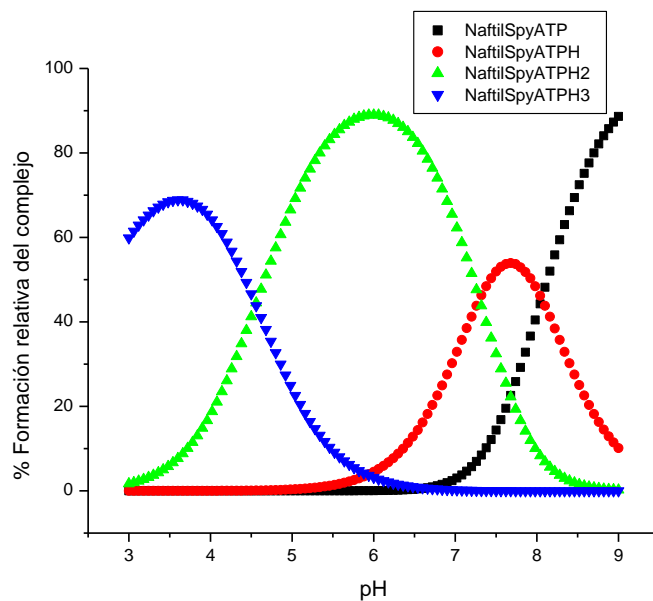
Esquema C.14. Diagrama de formación de especies del complejo: 2-picolil espiramicina-Adipato 2×10^{-3} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .



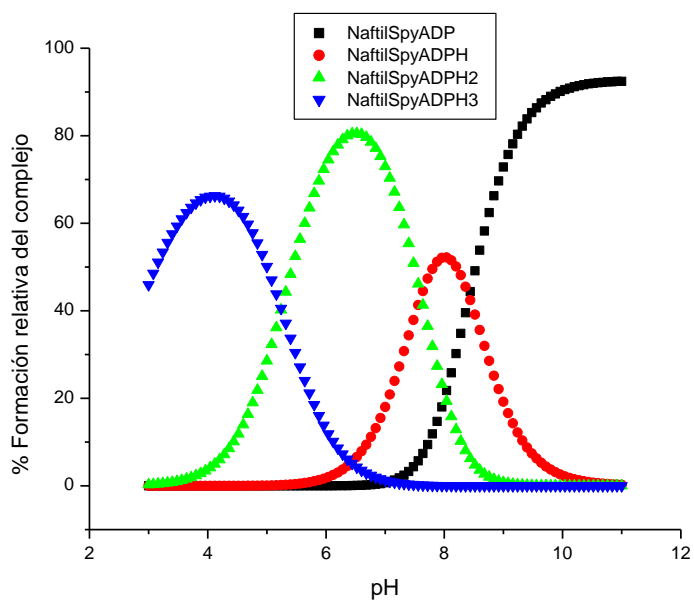
Esquema C.15. Diagrama de formación de especies del complejo: 2-picolil espiramicina-Pimelato 2×10^{-3} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .



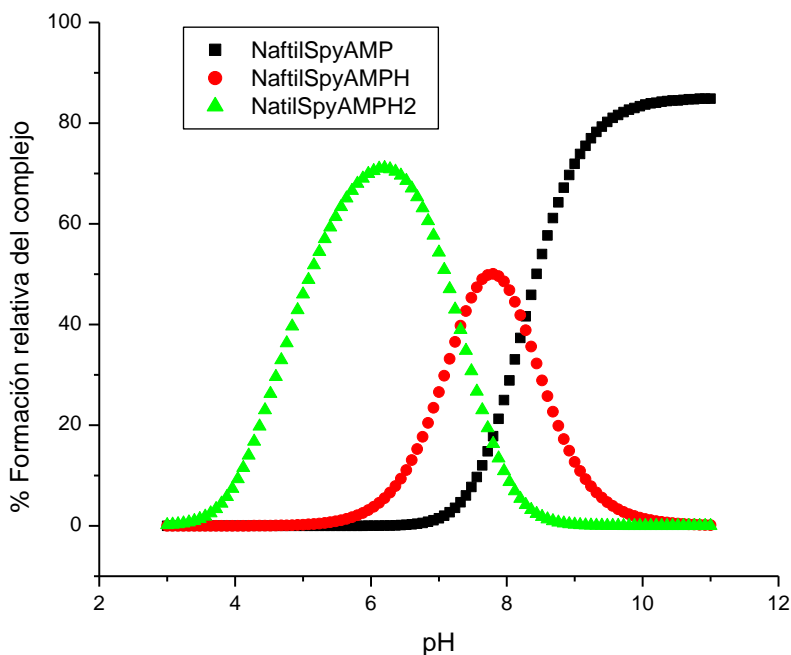
Esquema C.16. Diagrama de formación de especies del complejo: 2-picolil espiramicina-Suberato 2×10^{-3} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .

Naftil espiramicina **1c**

Esquema C.17. Diagrama de formación de especies del complejo: Naftil espiramicina – ATP 5×10^{-4} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .



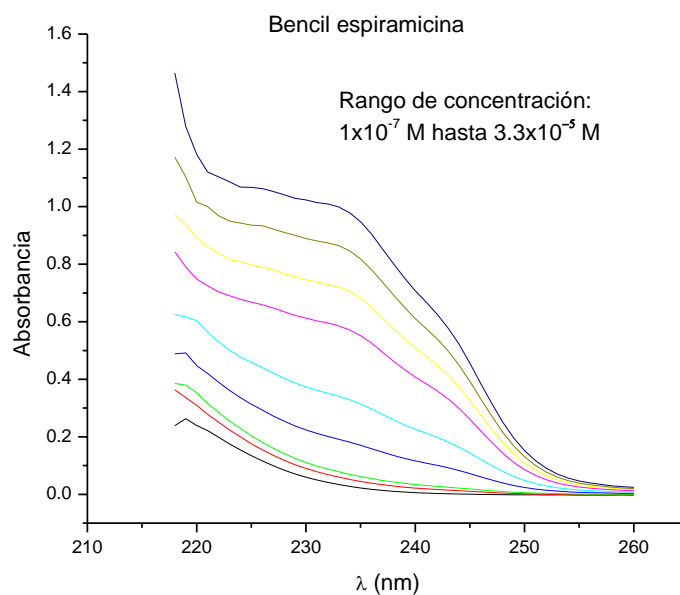
Esquema C.18. Diagrama de formación de especies del complejo: Naftil espiramicina – ADP 5×10^{-4} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .



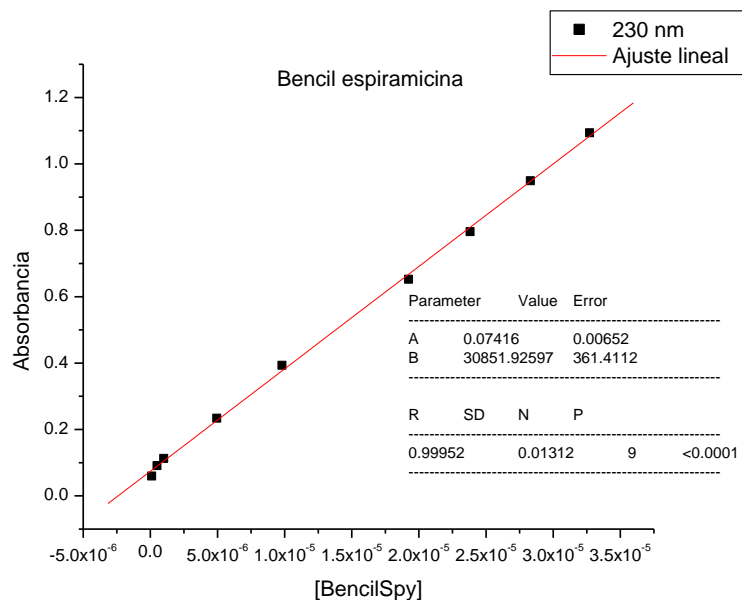
Esquema C.19. Diagrama de formación de especies del complejo: Naftil espiramicina – AMP 5×10^{-4} M, $I = 0.1$ M de NaCl, 25°C .

APÉNDICE D. Linealizaciones de los derivados 1a-d en UV-Visible. (Obtención de epsilon)

Bencil espiramicina 1a

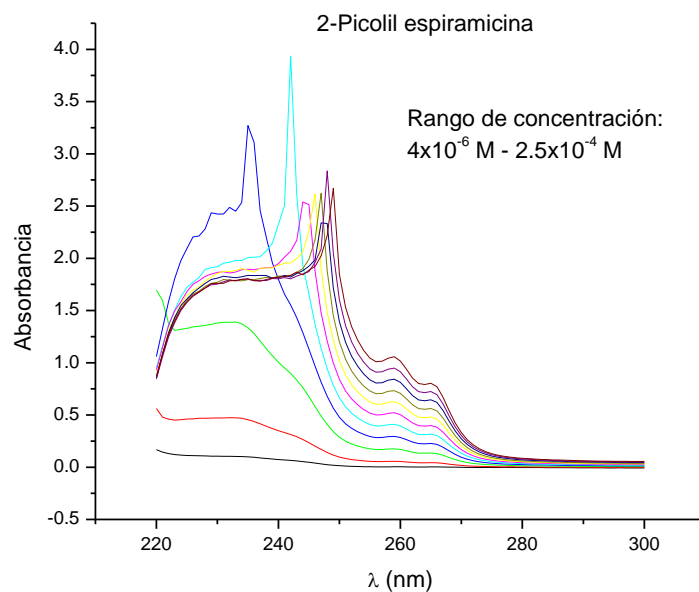


Esquema D.1. Espectro de linealización del derivado Bencil espiramicina **1a**, en buffer MES 0.05 M, $I = 0.1$ M de NaCl, pH 6.

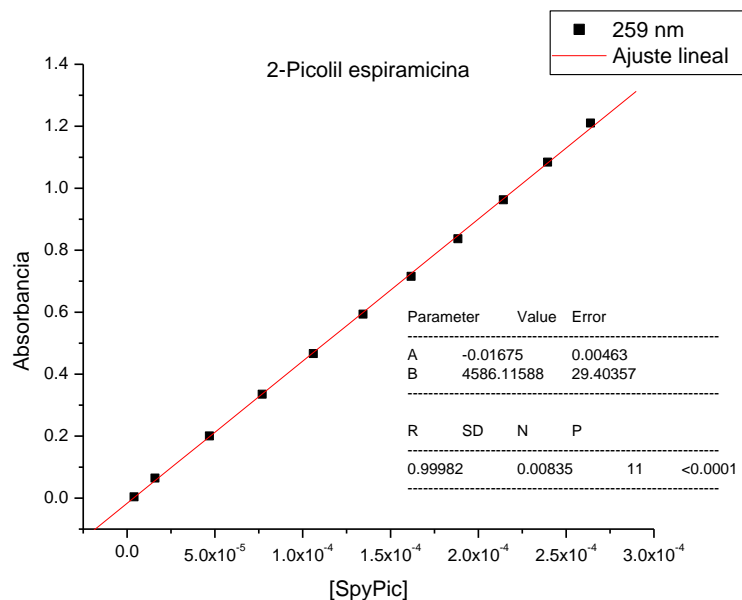


Esquema D.2. Gráfica obtenida a partir de los datos de la banda de absorción en 230 nm con ajuste lineal.

2-picolil espiramicina 1b

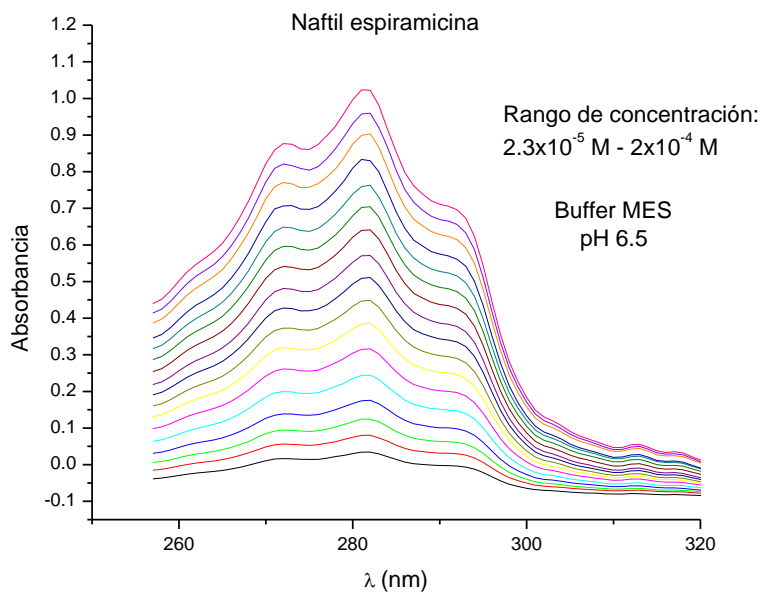


Esquema D.3. Espectro de linealización del derivado 2-picolil espiramicina **1b**, en buffer MES 0.05 M, $I = 0.1 \text{ M}$ de NaCl, pH 6.

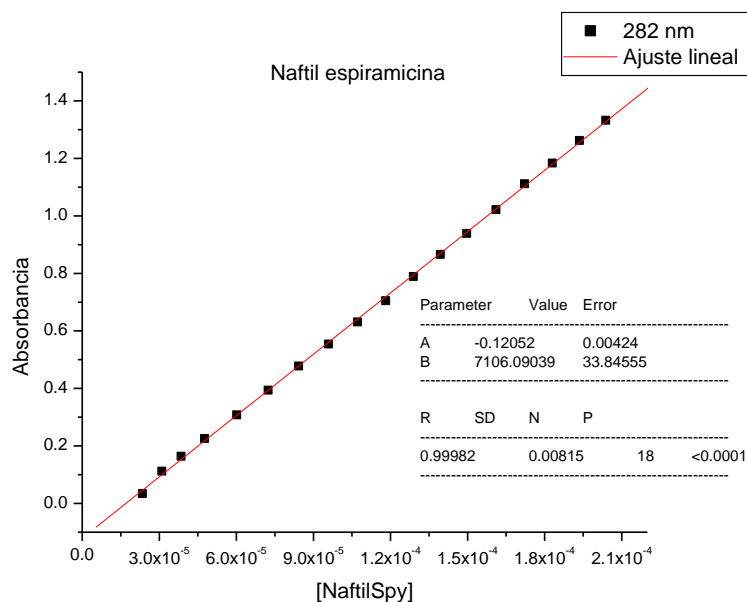


Esquema D.4. Gráfica obtenida a partir de los datos de la banda de absorción en 259 nm con ajuste lineal.

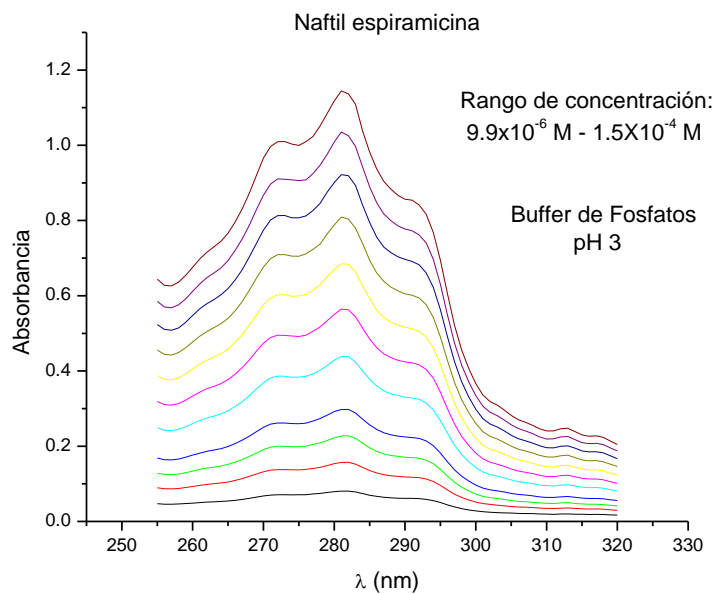
Naftil espiramicina 1c



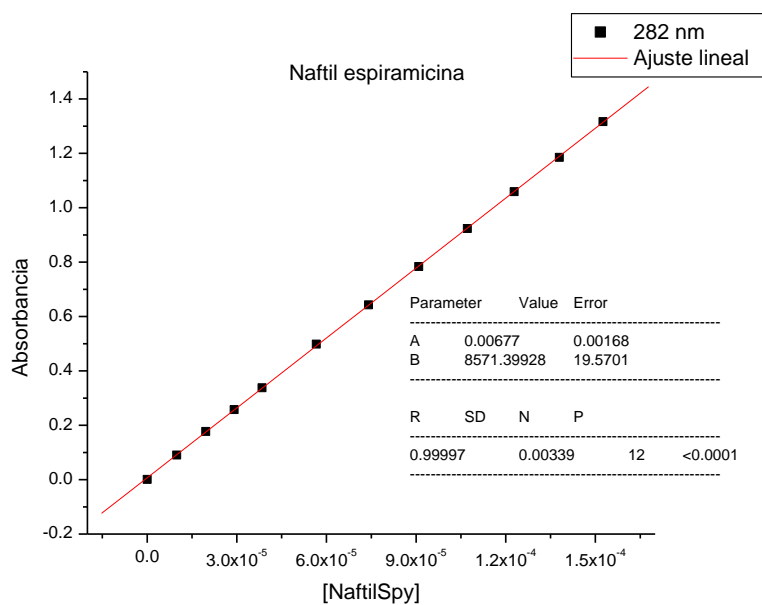
Esquema D.5. Espectro de linealización del derivado Naftil espiramicina **1c** en buffer MES 0.05 M, pH 6.5.



Esquema D.6. Gráfica obtenida a partir de los datos de la banda de absorción en 282 nm con ajuste lineal.

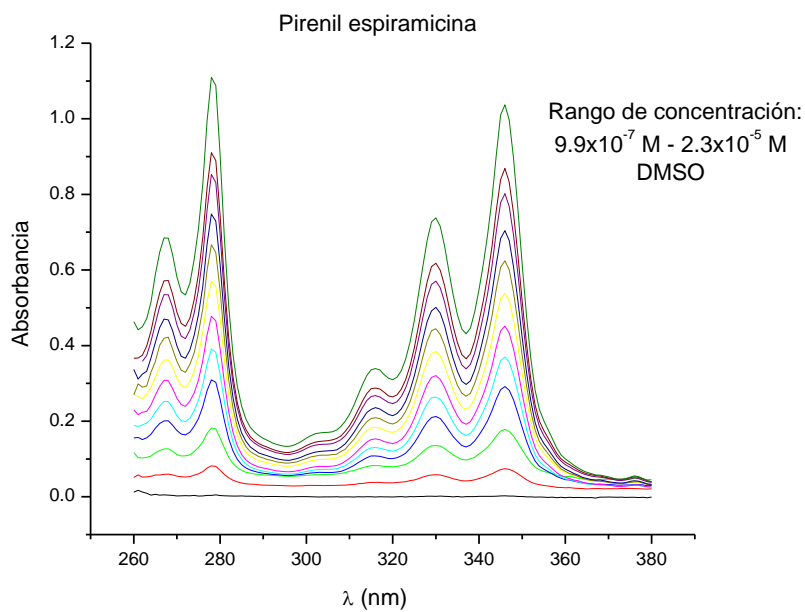


Esquema D.7. Espectro de linealización del derivado Naftil espiramicina **1c** en buffer de fosfatos 0.05 M, pH 3. Rango de concentración $9.9 \times 10^{-6} \text{ M} - 1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

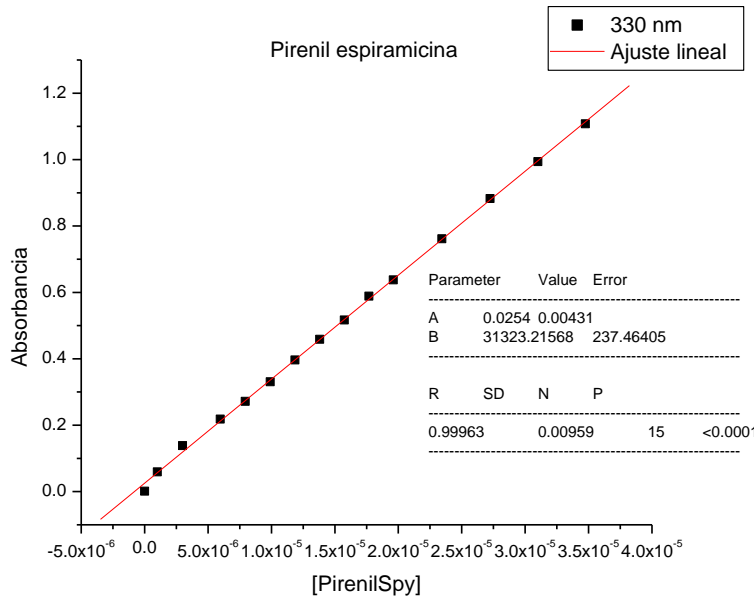


Esquema D.8. Gráfica obtenida a partir de los datos de la banda de absorción en 282 nm con ajuste lineal.

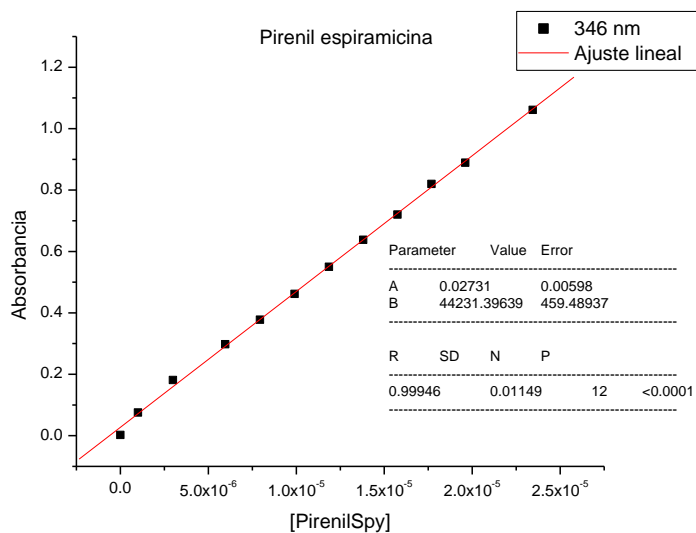
Pirenil espiramicina 1d



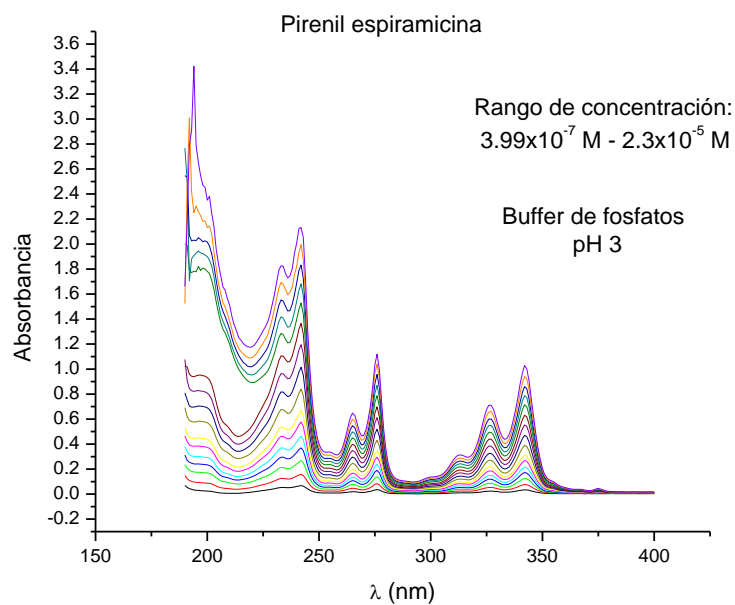
Esquema D.9. Espectro de linealización del derivado Pirenil espiramicina **1d** en DMSO.



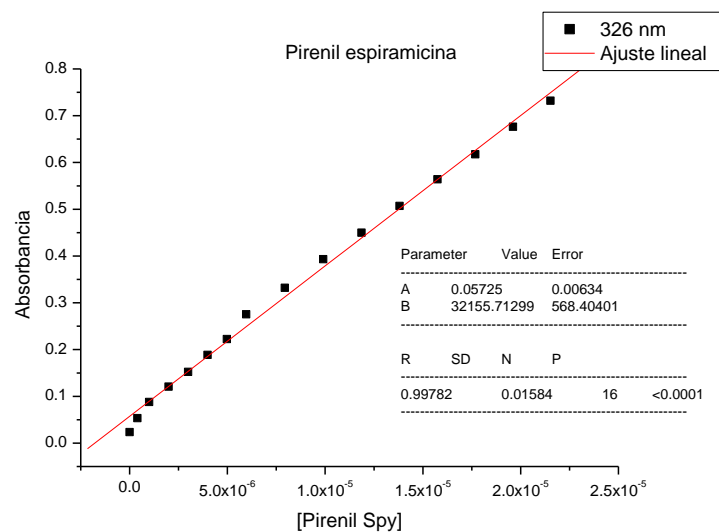
Esquema D.10. Gráfica obtenida a partir de los datos de la banda de absorción en 330 nm con ajuste lineal.



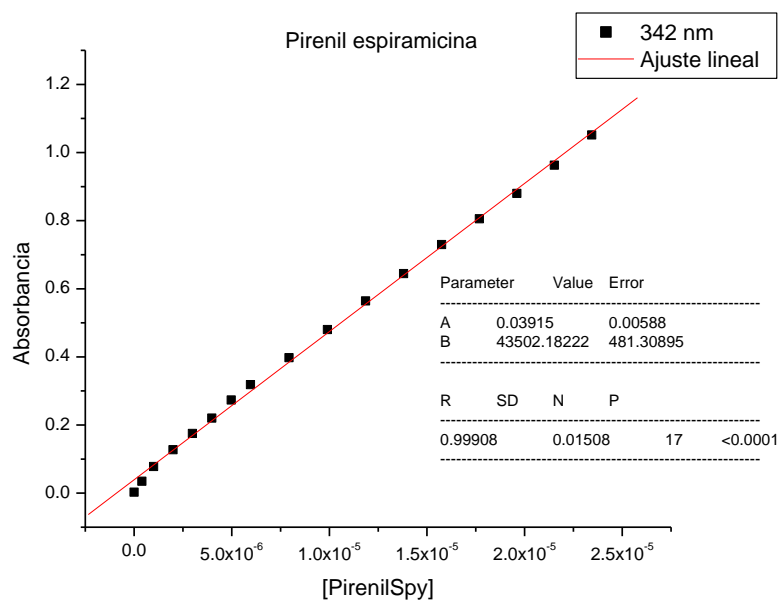
Esquema D.11. Gráfica obtenida a partir de los datos de la banda de absorción en 346 nm con ajuste lineal.



Esquema D.12. Espectro de linealización del derivado Pirenil espiramicina **1d** en buffer de fosfatos 0.05 M, pH 3.



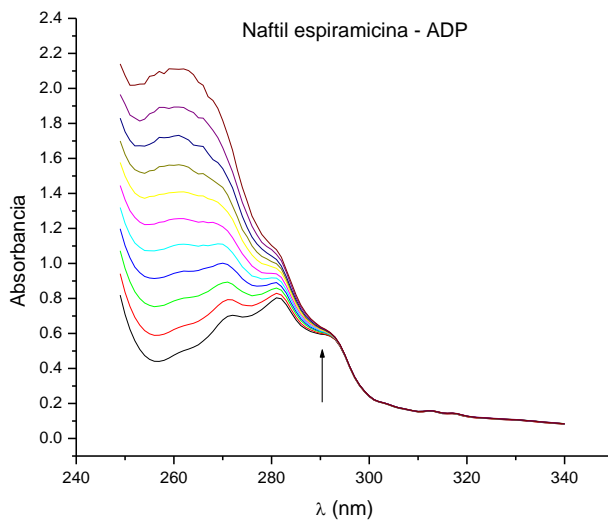
Esquema D.13. Gráfica obtenida a partir de los datos de la banda de absorción en 326 nm con ajuste lineal.



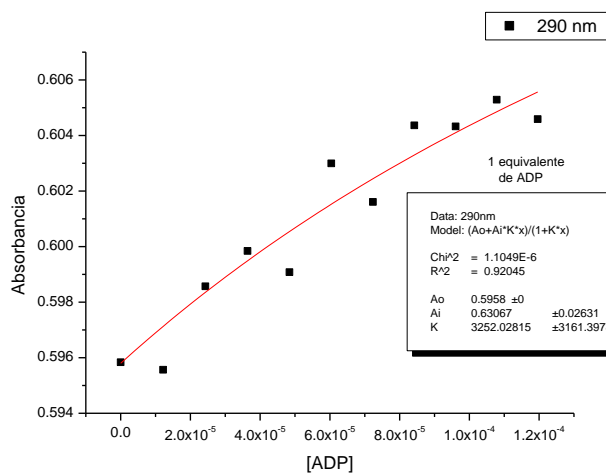
Esquema D.14. Gráfica obtenida a partir de los datos de la banda de absorción en 342 nm con ajuste lineal.

APÉNDICE E. Titulaciones de Naftil espiramicina 1c y Pirenil espiramicina 1d con AMP, ADP y ATP en UV-visible.

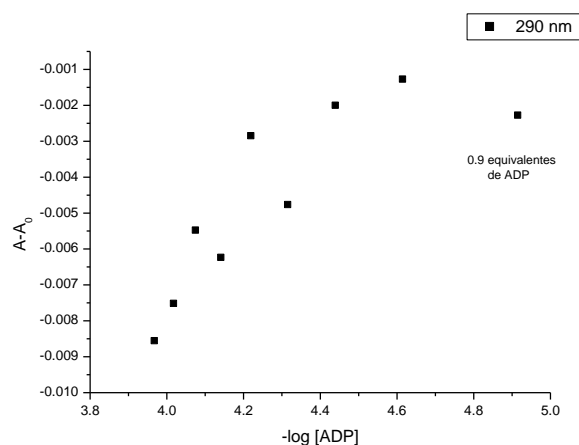
Naftil espiramicina 1c



Esquema E1. Espectro de absorción de la titulación de Naftil espiramicina **1c** con la adición de ADP (6.1×10^{-3} M) hasta 1 equivalente.

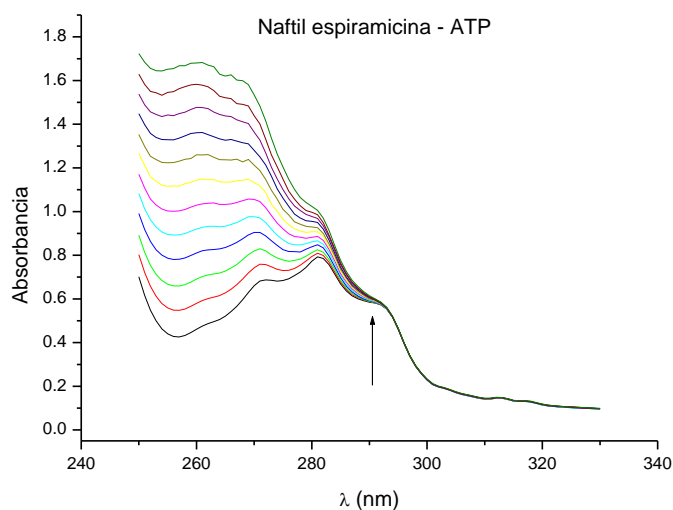


a)

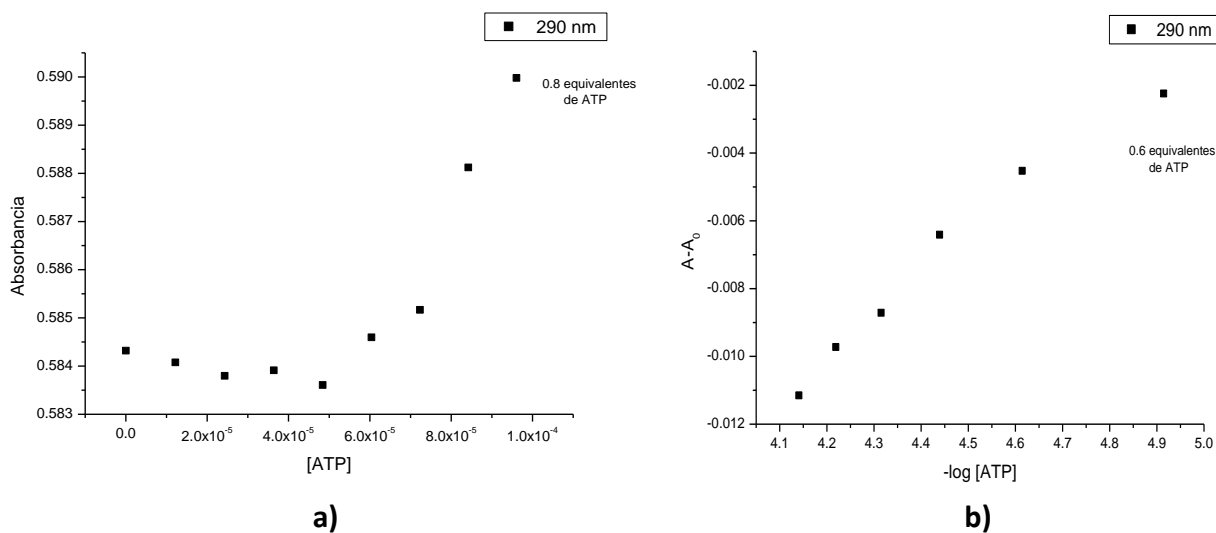


b)

Esquema E2. a) Gráfica de ajuste de la $\lambda = 290$ nm de la titulación de **1c** con ADP con la ecuación que se muestra en el recuadro, dando un $\log K = 3.51 \pm 3.40$ b) Gráfica con transformación de datos de la $\lambda = 290$ nm de la titulación de **1c** con ADP.

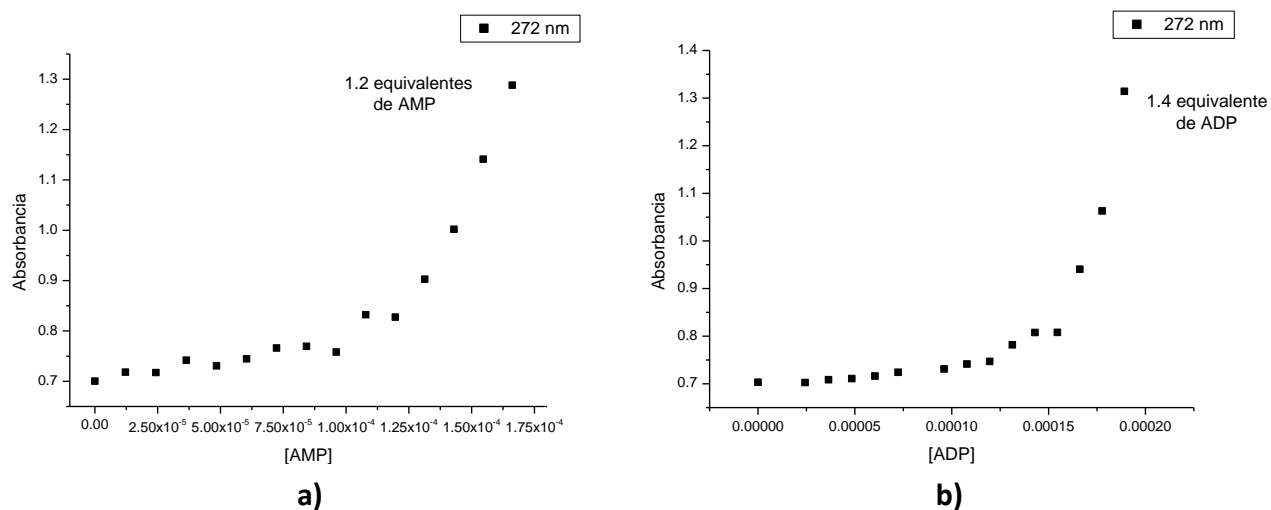


Esquema E.3. Espectro de absorción de la titulación de Naftil espiramicina **1c** con la adición de ATP (6.1×10^{-3} M) hasta 1 equivalente.

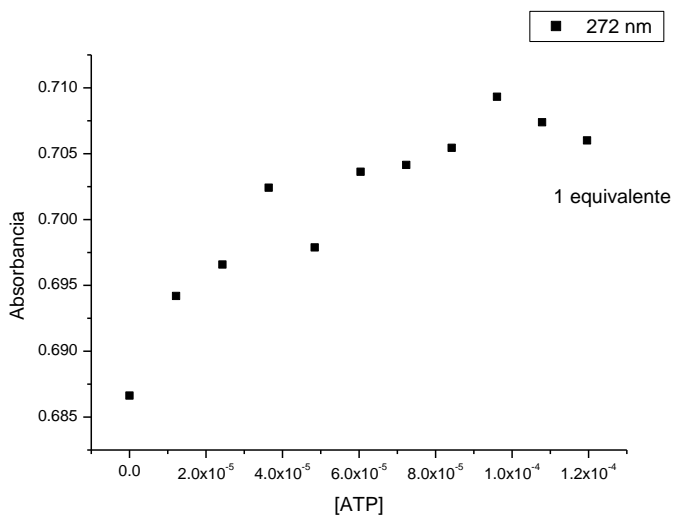


Esquema E.4. a) Gráfica de los datos de la $\lambda = 290$ nm de la titulación de **1c** con ATP b) Gráfica con transformación de datos de la $\lambda = 290$ nm de la titulación de **1c** con ADP.

Longitud de onda en 272 nm donde sólo se graficaron los datos como [Huésped] contra absorbancia corregida.

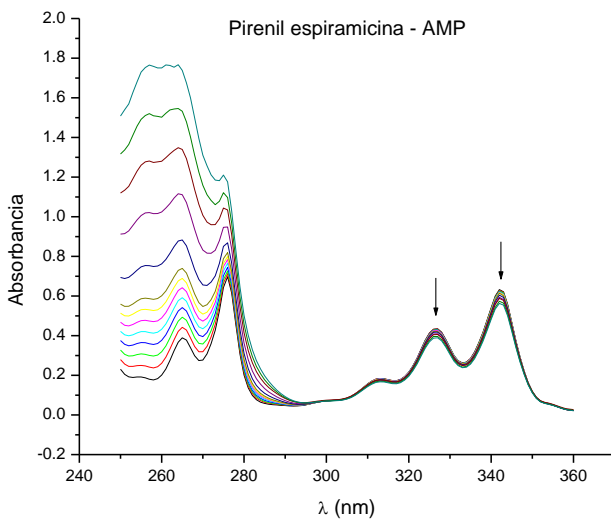


Esquema E.5. Gráfica de la $\lambda = 272$ nm de la titulación de a) Naftil espiramicina **1c** – AMP, b) Naftil espiramicina **1c** – ADP.

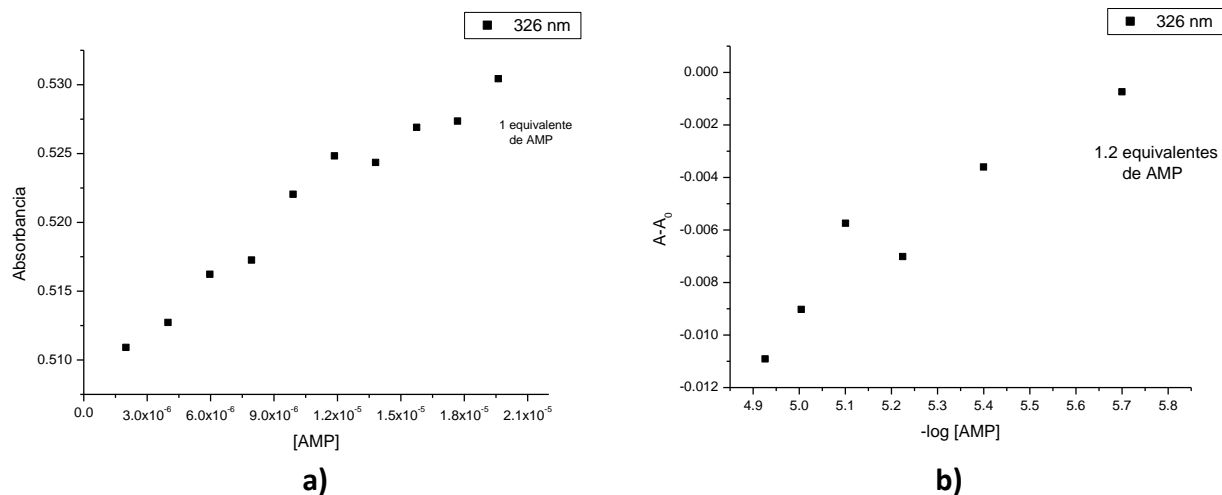


Esquema E.6. Gráfica de la $\lambda = 272$ nm de la titulación **1c** – ATP.

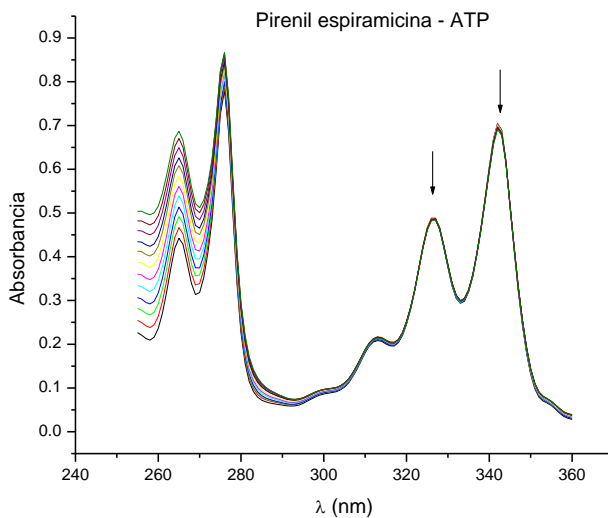
Pirenil espiramicina 1d



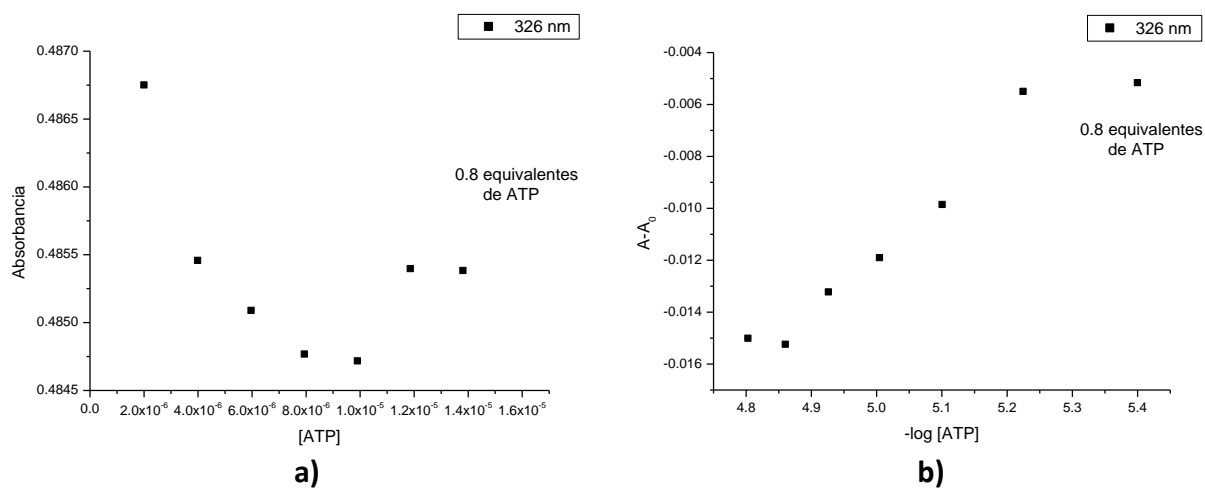
Esquema E.7. Espectro de absorción de la titulación de **1d** con la adición de AMP (1×10^{-3} M) hasta 1.3 equivalentes.



Esquema E.8. a) Gráfica de ajuste de la $\lambda = 326$ nm de **1d** con AMP b) Gráfica de tipo sigmoideal de la $\lambda = 326$ nm de **1d** con AMP

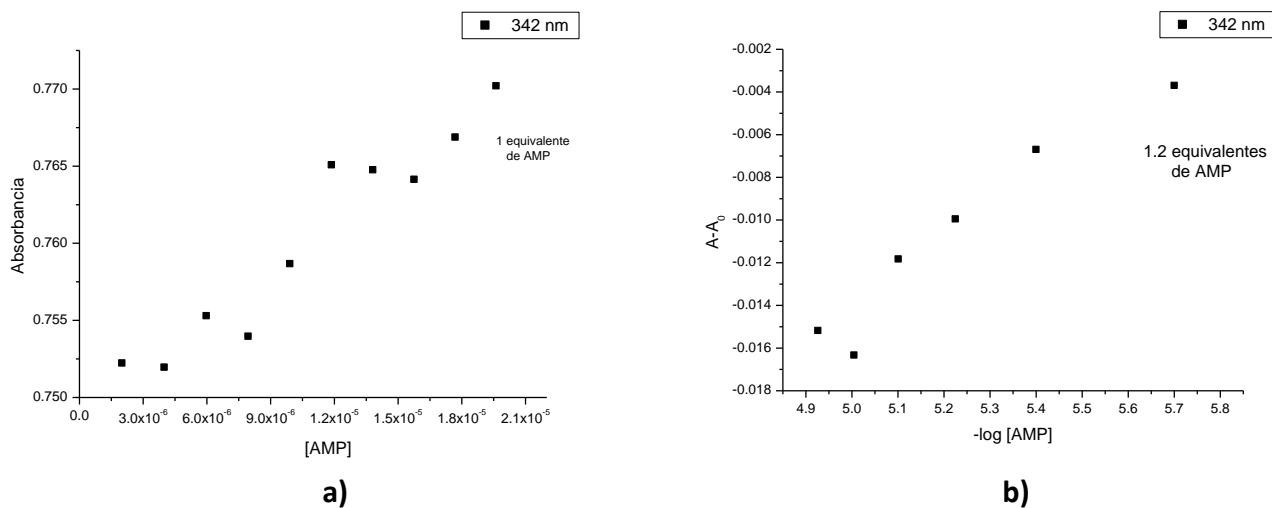


Esquema E.9. Espectro de absorción de la titulación de Pirenil espiramicina **1d** con la adición de ATP (1×10^{-3} M) hasta 1.2 equivalentes.

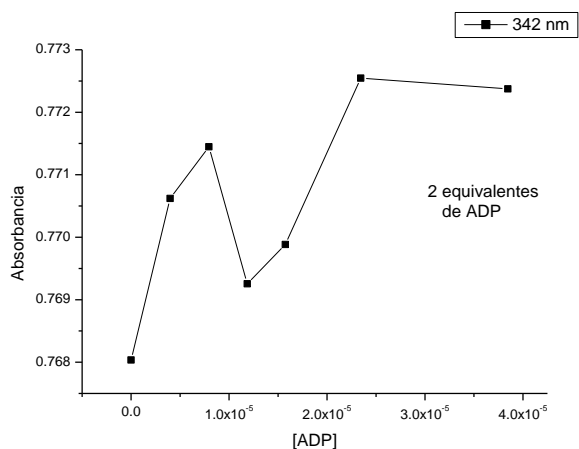


Esquema E.10. a) Gráfica de la $\lambda = 326$ nm de **1d** con ATP **b)** Gráfica de tipo sigmoidal de la $\lambda = 326$ nm de **1d** con ATP

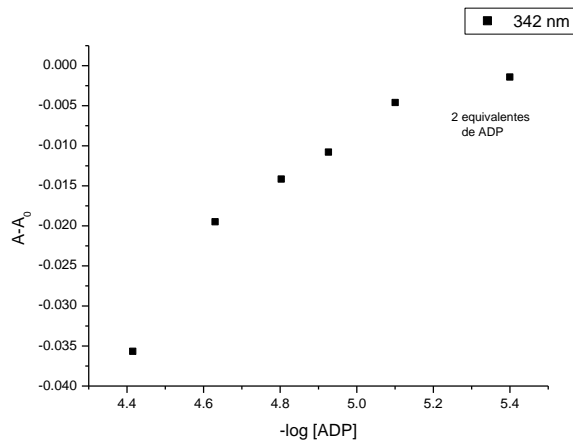
Longitud de onda en 342 nm, gráficas [H] contra Absorbancia corregida seguidas por su correspondiente transformación de datos a $-\log [H]$ contra ΔA



Esquema E.11. a) Gráfica de la $\lambda = 342$ nm de la titulación de **1d** - AMP **b)** Gráfica sigmoidal de la $\lambda = 342$ nm de la titulación de **1d** - AMP.

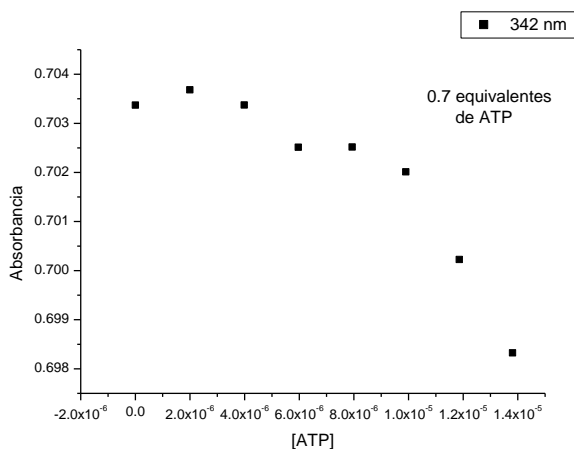


a)

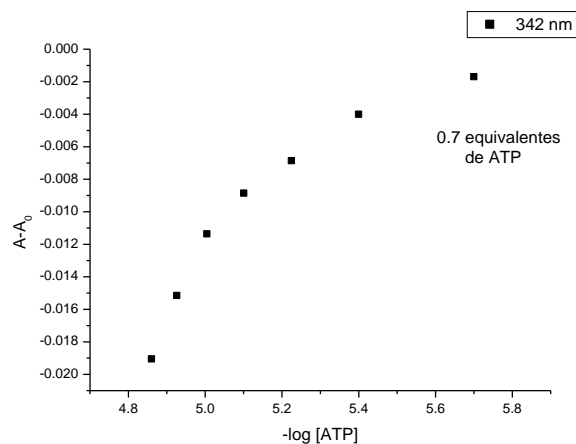


b)

Esquema E.12. a) Gráfica de la $\lambda = 342$ nm de la titulación de **1d** - ADP **b)** Gráfica sigmoide de la $\lambda = 342$ nm de la titulación de **1d** - ADP.



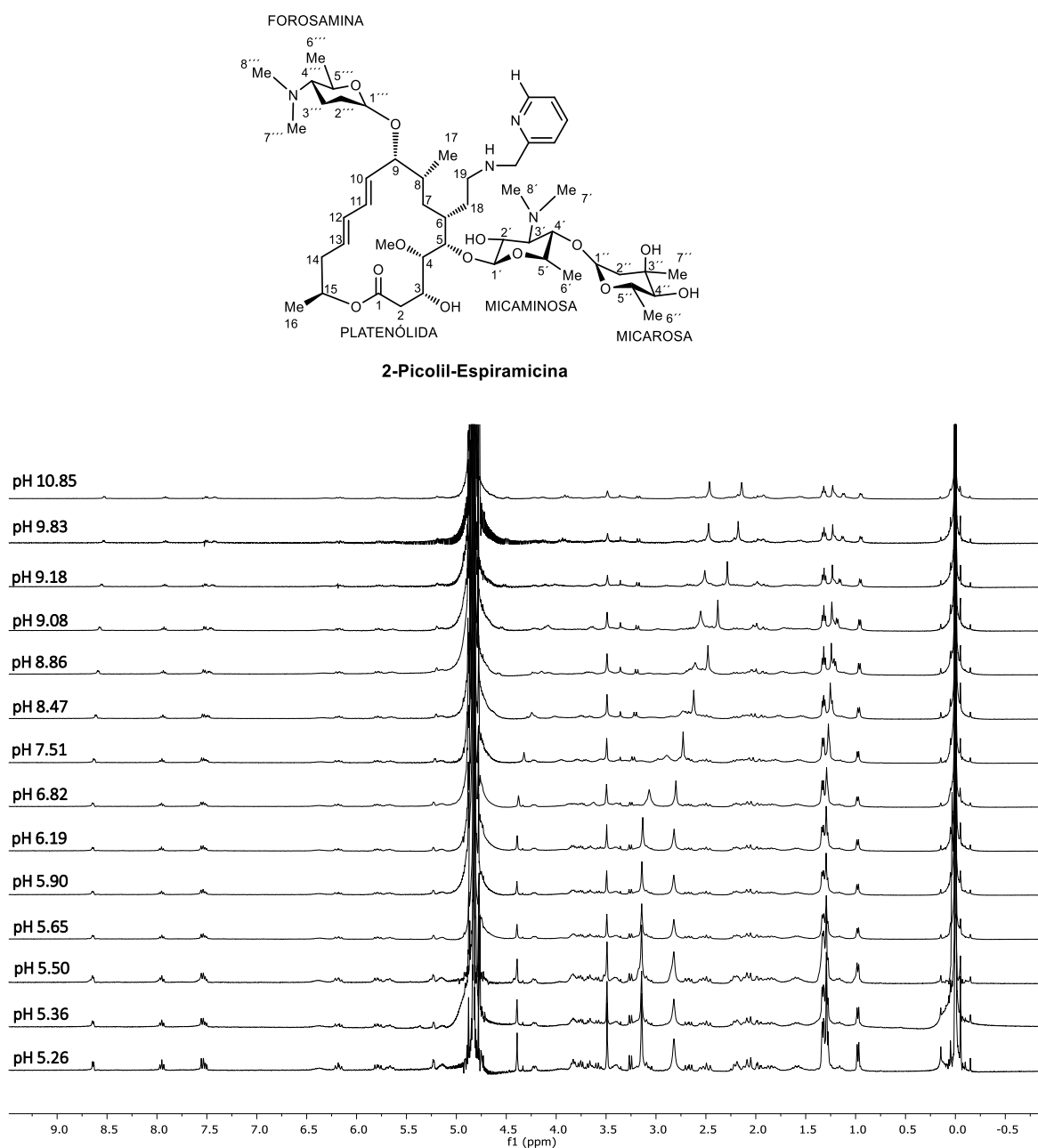
a)



b)

Esquema E.13. a) Gráfica de la $\lambda = 342$ nm de la titulación de **1d** - ATP **b)** Gráfica sigmoide de la $\lambda = 342$ nm de la titulación de **1d** - ATP.

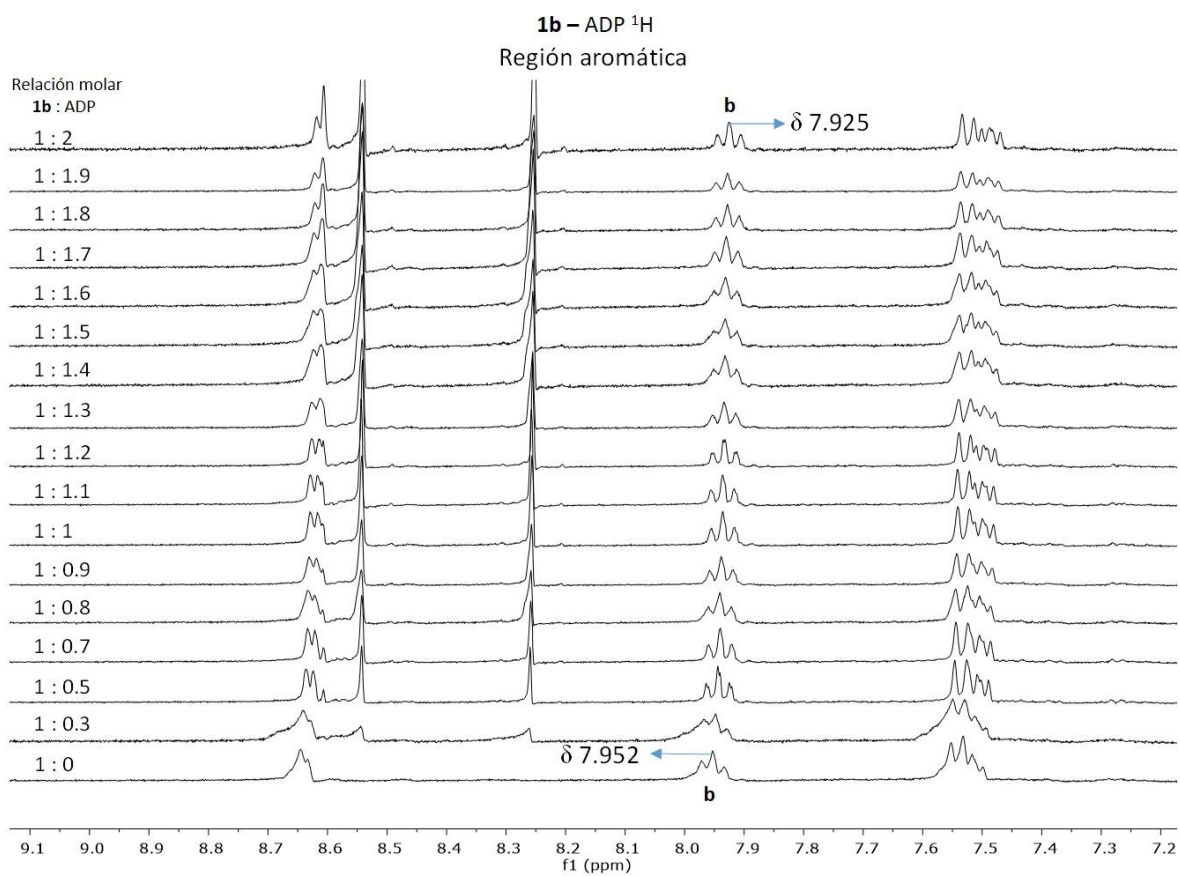
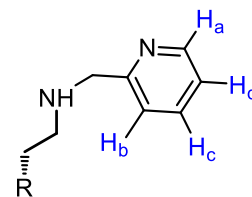
APÉNDICE F. Espectros de las titulaciones realizadas por Resonancia Magnética Nuclear.



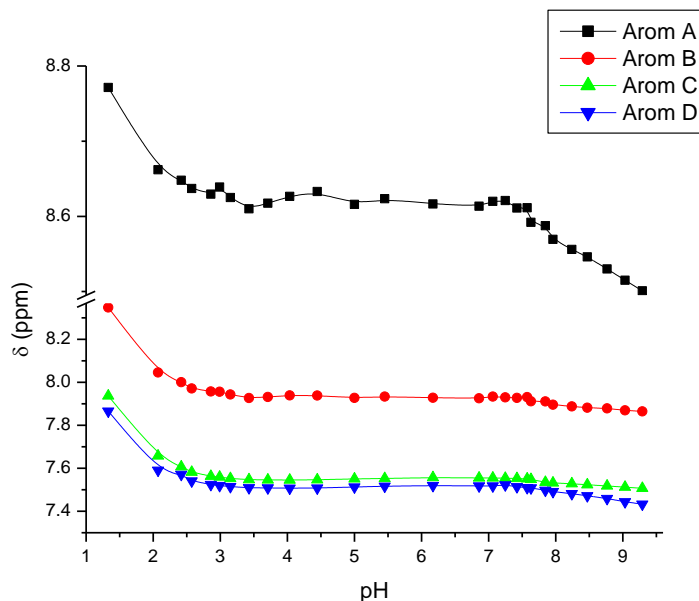
Esquema F.1. Segunda titulación realizada para observar el efecto del pH del derivado 2-picolil-espíramicina por RMN ^1H (400 MHz, D_2O). Intervalo de pH: 5.26 - 10.85.

Tabla F.1. Desplazamientos de las señales de los metilos de forosamina (7''', 8''') y de micaminosa (7', 8') obtenidos de la titulación de 2-picolil espiramicina **1b** en el intervalo de pH 5.26 - 10.85.

pH	7''', 8'''	7', 8'
5.26	2.821	3.144
5.36	2.821	3.144
5.5	2.822	3.144
5.65	2.821	3.143
5.9	2.822	3.141
6.19	2.819	3.132
6.82	2.801	3.068
7.51	2.729	3.494
8.47	2.621	3.491
8.86	2.479	3.489
9.08	2.381	3.489
9.18	2.282	3.483
9.83	2.176	3.487
10.83	2.14	3.484



Esquema F.2. Expansión de la zona aromática correspondiente a 2-picolil espiamicina **1b**.



Esquema F.3. Gráfica de los desplazamientos (ppm) de las señales del fragmento de piridina obtenidas por la titulación en RMN ^1H del derivado **1b** vs el pH.

Tabla F.2. Desplazamientos de la titulación de 2-picolil espiramicina **1b** en el intervalo de pH 1.33 - 9.3. Señales de los metilos de forosamina ($7'''$, $8'''$) y de micaminosa ($7'$, $8'$) y de los protones aromáticos de la piridina.

pH	Alifáticos		Aromáticos			
	$7'''$, $8'''$	$7'$, $8'$	a	b	c	d
1.33	2.7955	3.127	8.7715	8.34867	7.9365	7.866
2.073	2.794	3.1205	8.662	8.046	7.6575	7.591
2.418	2.801	3.127	8.648	8.00067	7.607	7.5715
2.575	2.799	3.124	8.637	7.97133	7.582	7.54067
2.86	2.804	3.1295	8.6295	7.95733	7.563	7.52433
2.99	2.812	3.137	8.639	7.95633	7.559	7.51967
3.15	2.804	3.1285	8.625	7.94367	7.5525	7.51467
3.428	2.792	3.1165	8.61	7.927	7.547	7.509
3.709	2.8015	3.125	8.6175	7.93167	7.546	7.50867
4.035	2.8165	3.135	8.6265	7.939	7.545	7.50767
4.445	2.8235	3.14	8.633	7.93867	7.5465	7.508
5.001	2.799	3.123	8.616	7.92767	7.5505	7.51267
5.451	2.808	3.13	8.6235	7.934	7.5525	7.51633
6.17	2.797	3.113	8.6165	7.92833	7.557	7.51967
6.857	2.783	3.067	8.6135	7.926	7.555	7.51767
7.063	2.783	3.049	8.62	7.934	7.555	7.518
7.249	2.766	2.999	8.621	7.93033	7.5535	7.5225
7.423	2.749	2.985	8.611	7.92767	7.5525	7.514
7.574	2.731	2.916	8.6115	7.93133	7.5505	7.51
7.631	2.704	2.876	8.592	7.912	7.5485	7.50833
7.846	2.651	2.78	8.5875	7.911	7.535	7.49767
7.96	2.605	2.722	8.5695	7.896	7.532	7.49133
8.24	2.535	2.642	8.556	7.888	7.528	7.48163

8.471	2.461	2.578	8.546	7.88167	7.523	7.472
8.766	2.36	2.517	8.53	7.87867	7.518	7.459
9.033	2.273	2.474	8.515	7.86967	7.512	7.444
9.292	2.21	2.448	8.501	7.865	7.5065	7.433

Tabla F.3. Desplazamientos de las señales correspondientes a forosamina (7''', 8''') y micaminosa (7', 8') y de los protones aromáticos de la piridina del complejo formado por 2-picolil espiramicina **1b** con ATP.

Equiv. de ATP	Alifáticos		Aromáticos	
	7''', 8'''	7', 8'	a	b
0	2.803	3.083	8.638	7.949
0.5	2.798	3.072	8.622	7.935
0.75	2.794	3.063	8.617	7.929
1	2.792	3.057	8.611	7.924
1.25	2.79	3.055	8.607	7.92
1.5	2.79	3.052	8.605	7.917
1.75	2.788	3.048	8.601	7.914
2	2.786	3.043	8.598	7.911
2.25	2.785	3.039	8.596	7.907
2.5	2.784	3.037	8.594	7.906
2.75	2.784	3.036	8.593	7.905
3	2.783	3.034	8.592	7.903
3.25	2.782	3.032	8.589	7.901
3.5	2.779	3.022	8.588	7.9
3.75	2.778	3.021	8.586	7.898

Tabla F.4. Desplazamientos de las señales correspondientes a los fosfatos a, b y g de ATP para el complejo formado por **1b**-ATP.

Equiv. de ATP	P _α	P _β	P _γ
0	0	0	0
0.5	-5.141	-8.87	-19.658
0.75	-5.032	-8.869	-19.692
1	-4.962	-8.862	-19.685
1.25	-4.921	-8.856	-19.696
1.5	-4.856	-8.846	-19.669
1.75	-4.802	-8.841	-19.664
2	-4.717	-8.829	-19.636
2.25	-4.679	-8.824	-19.628
2.5	-4.627	-8.814	-19.607
2.75	-4.585	-8.796	-19.576
3	-4.57	-8.801	-19.584
3.25	-4.523	-8.789	-19.561
3.5	-4.42	-8.784	-19.529
3.75	-4.418	-8.785	-19.529

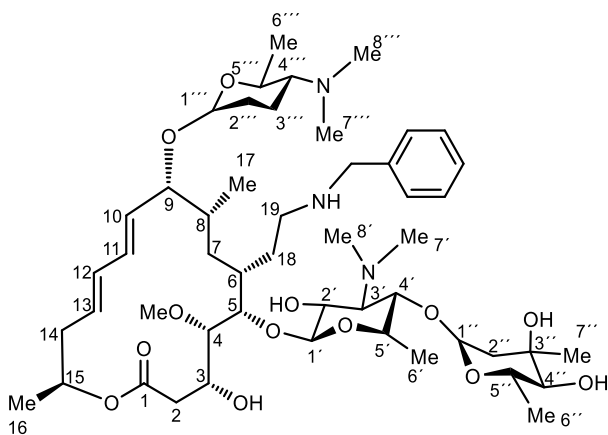
Tabla F.5. Desplazamiento de las señales correspondientes a micaminosa (7', 8') y del protón "b" aromático de la piridina del complejo formado por 2-picolil espiramicina **1b** con ADP.

	Alifáticos	Aromático
Equiv. de ADP	7', 8'	b
0	3.057	7.953
0.3	3.051	7.948
0.5	3.043	7.944
0.7	3.038	7.94
0.8	3.035	7.941
0.9	3.034	7.939
1	3.033	7.936
1.1	3.034	7.936
1.2	3.032	7.935
1.3	3.033	7.934
1.4	3.031	7.934
1.5	3.032	7.933
1.6	3.032	7.932
1.7	3.03	7.93
1.8	3.028	7.928
1.9	3.028	7.928
2	3.025	7.924

Tabla F.6. Desplazamiento de las señales correspondientes a los fósforos β y α correspondientes a ADP, del complejo formado por 2-picolil espiramicina **1b** con ADP.

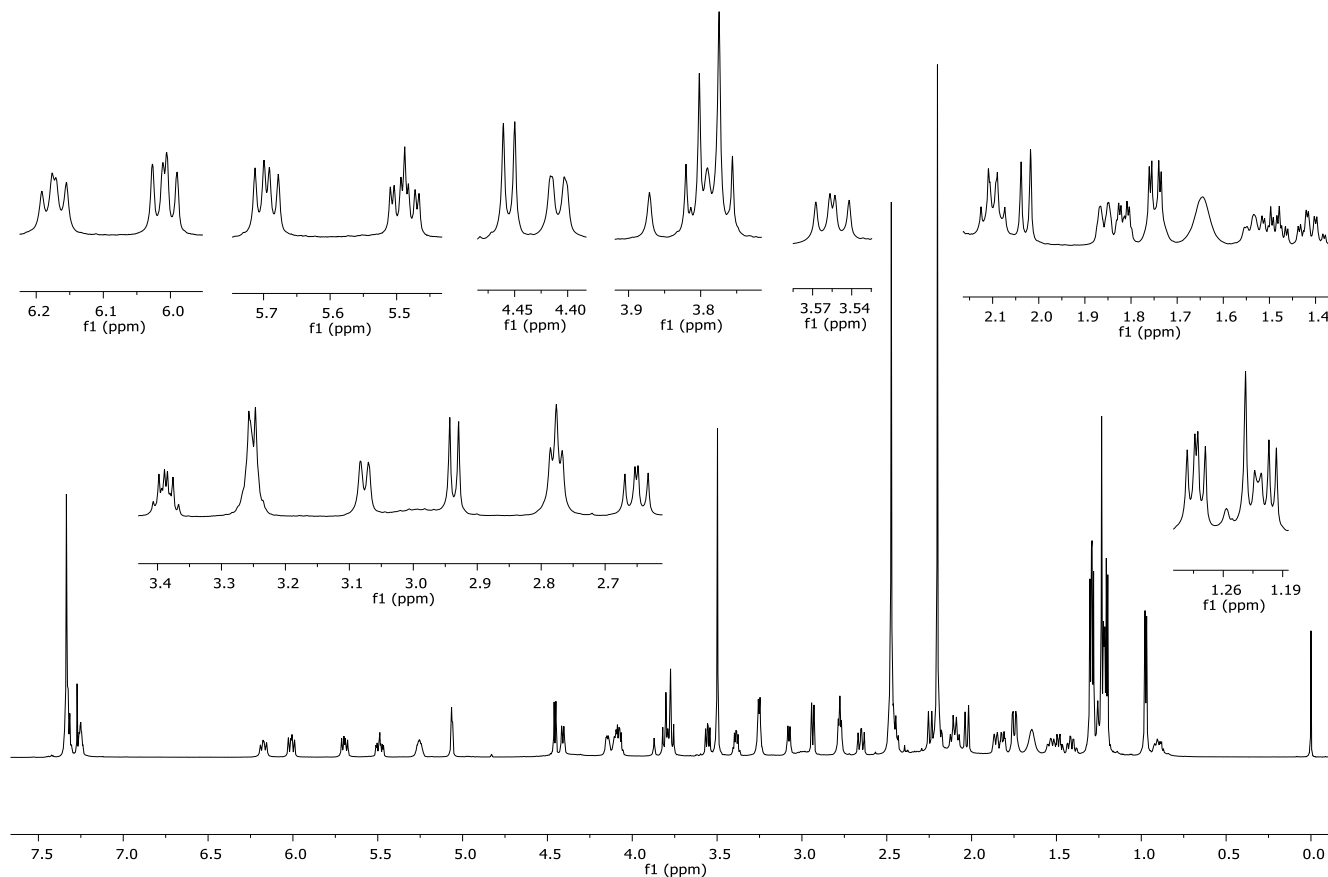
Equiv. de ADP	P_{β}	P_{α}
0	0	0
0.3	-5.069	-8.508
0.5	-5.066	-8.582
0.7	-5.063	-8.593
0.8	-5.004	-8.534
0.9	-5.025	-8.612
1	-5.014	-8.604
1.1	-5.019	-8.613
1.2	-5.004	-8.597
1.3	-4.997	-8.611
1.4	-4.979	-8.614
1.5	-4.970	-8.600
1.6	-4.963	-8.596
1.7	-4.956	-8.621
1.8	-4.934	-8.615
1.9	-4.927	-8.629
2	-4.902	-8.623

APÉNDICE G: Espectros de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC) y masas de los derivados de espiramicina.

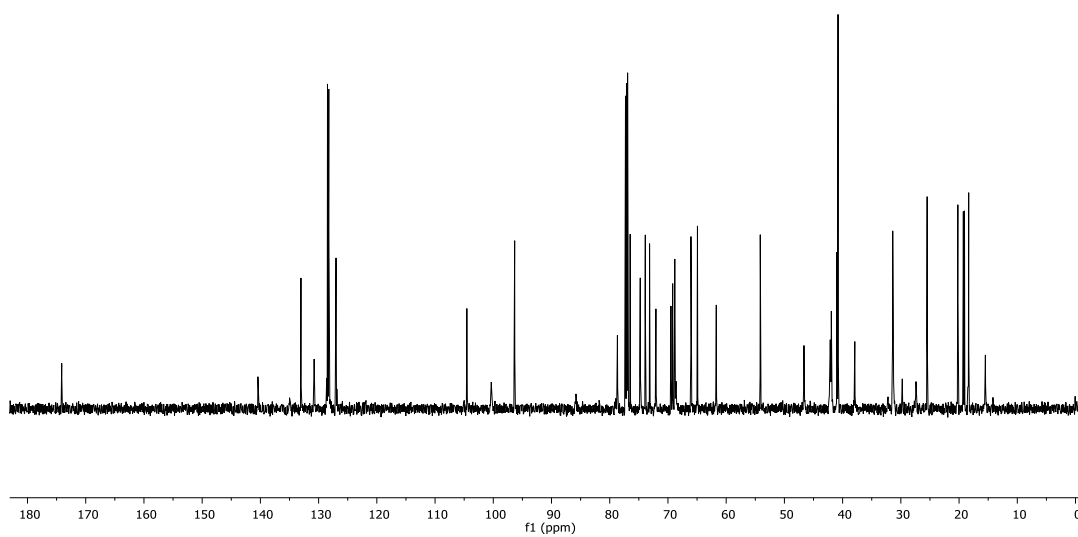


(4*R*, 5*S*, 6*S*, 7*R*, 9*R*, 10*R*, 11*E*, 13*E*, 16*R*)-7-(2-(bencilamin)etil)-6-(((2*S*, 4*R*, 5*S*, 6*S*)-(((4*R*, 5*S*, 6*S*)-4,5-dihidroxi-4,6-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4-(dimetilamin)-3-hidroxi-6-metil-tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-10-(((5*R*,6*S*)-5-(dimetilamin)-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4-hidroxi-5-metoxi-9,16-dimetiloxaciclohexadeca-11,13-dien-2-ona (Bencilespiramicina **1a). Sólido blanco. **Rdto.** 98%. **P.f.** 122-125 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -47.1$ (c 1.0, CHCl_3). **RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3)** δ : 0.88-0.92 (m, 1H, H7), 0.97 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H17), 1.20 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H6'''), 1.22 (d, $J = 5.6$ Hz, 3H, H6'), 1.23 (s, 3H, H7'''), 1.29 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H6''), 1.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H16), 1.41 (ddd, $J = 25.2, 12.5, 3.5$, 1H, H3'''), 1.46-1.51 (m, 1H, H2'''), 1.52-1.55 (m, 1H, H7), 1.64 (sa, 2H, H18), 1.73-1.75 (m, 1H, H6), 1.75 (dd, $J = 14.7, 4.2$ Hz, 1H, H2''), 1.82 (ddd, $J = 12.3, 7.0, 3.5$ Hz, 1H, H3'''), 1.84-1.87 (m, 1H, H2'''), 2.03 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, H2''), 2.10 (dd, $J = 25.2, 11.2$ Hz, 1H, H14), 2.10-2.12 (m, 1H, H8), 2.19-2.20 (m, 1H, H4'''), 2.20 (s, 6H, H7''', H8'''), 2.24 (dd, $J = 14.7, 1.4$ Hz, 1H, H2), 2.45-2.47 (m, 1H, H3'), 2.47 (s, 6H, H7', H8'), 2.47-2.49 (m, 1H, H14), 2.65 (dd, $J = 14.0, 11.2$ Hz, 1H, H2), 2.77 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H19), 2.94 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H4''), 3.08 (dd, $J = 8.4, 0.7$ Hz, 1H, H4), 3.24-3.27 (m, 2H, H4', H5'), 3.36-3.40 (m, 1H, H5'''), 3.50 (s, 3H, H20), 3.56 (dd, $J = 10.5, 7.7$ Hz, H2'), 3.71-3.76 (m, 1H, H3), 3.79 (Sistema AB, $J = 12.6$ Hz, 2H, H21), 4.06-4.11 (m, 2H, H5, H5''), 4.15 (dd, $J = 9.1$ Hz, 3.5 Hz, 1H, H9), 4.41 (dd, $J = 9.1, 0.7$ Hz, 1H, H1'''), 4.46 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H1'), 5.06 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H1''), 5.24-5.27 (m, 1H, H15), 5.49 (ddd, $J = 15.4, 11.2, 4.2$ Hz, 1H, H13), 5.70 (dd, 14.7, 9.1 Hz, 1H, H10), 6.01 (dd, $J = 14.7, 11.2$ Hz, 1H, H12), 6.17 (dd, $J = 14.7, 11.2$ Hz, 1H, H11), 7.24-7.26 (m, 1H, H_{aromático}), 7.32-7.34 (m, 4H, H_{aromático}). **RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3)** δ : 15.5 (sa, C17), 18.4 (C6''), 18.5 (C3'''), 19.1 (C6'), 19.3 (C6'''), 20.2 (C16), 25.5 (C7''), 27.4 (sa, C18), 31.2 (C8), 31.3 (C7), 31.4 (C2'''), 32.2 (sa, C6), 37.8 (C2), 40.8 (2C, C7''', C8'''), 41.0 (C2''), 41.9 (C14), 42.1 (sa, 2C, C7', C8'), 46.6 (C19), 54.1 (C21), 61.6 (C20), 64.9 (C4'''), 65.9 (C5''), 68.5 (sa, C3), 68.8 (C3'), 69.1 (C15), 69.4 (C3''), 72.0 (C2'), 73.1 (C5'), 73.8 (C5'''), 74.7 (C4'), 76.4 (C4''), 78.7 (C5), 78.9 (sa, C9), 85.7 (sa, C4), 96.3 (C1''), 100.3 (sa,**

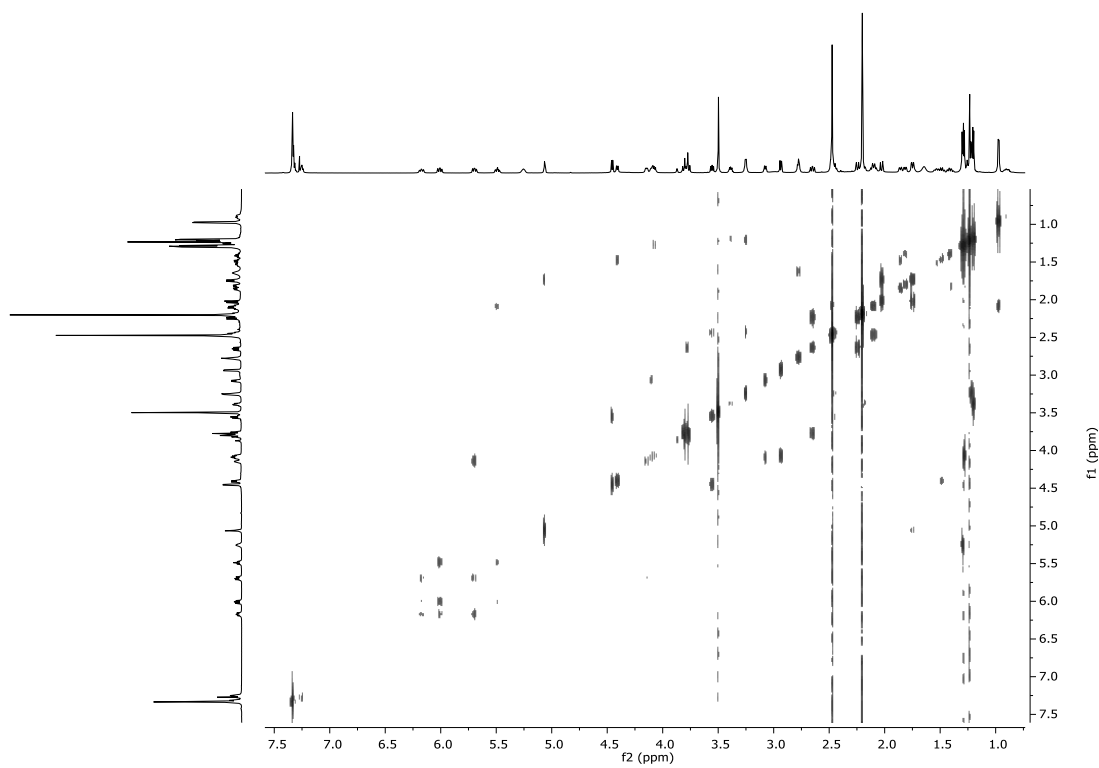
C1'''), 104.5 (C1'), 127.0 (CH_{aromático}), 128.3 (2C, CH_{aromático}), 128.5 (2C, CH_{aromático}), 130.8 (C13), 133.0 (C12), 135.0 (C11), 140.4 (C_{aromático}), 174.1 (C1). **HRMS (FAB⁺)**: Calculado para C₅₀H₈₅N₃O₁₃²⁺ [M+2H]²⁺, *m/z* 935.6071; encontrado *m/z* 935.6119.



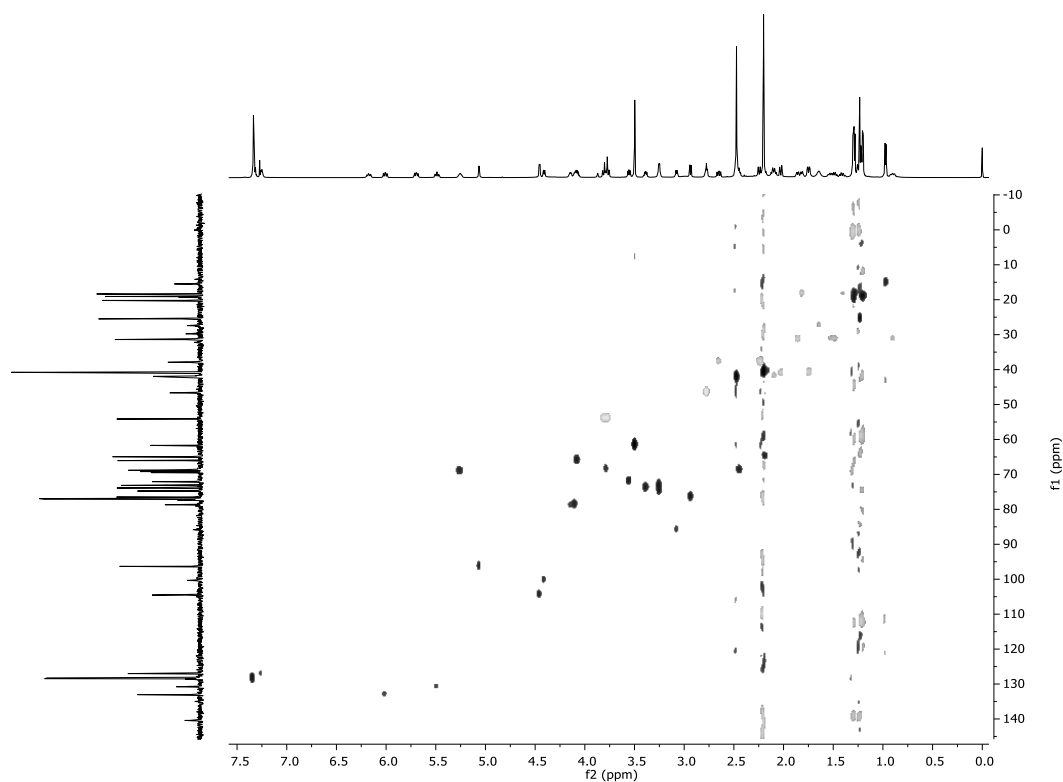
Esquema G.1. Espectro de RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) de Bencil espiramicina **1a**.



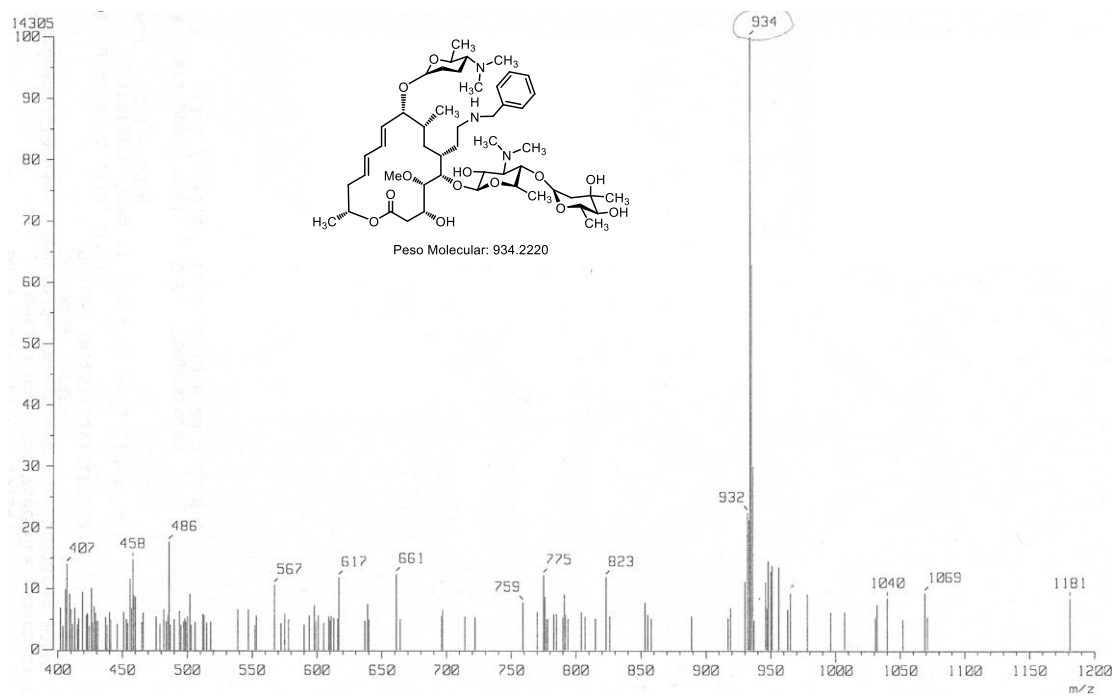
Esquema G.2. Espectro de RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) de Bencil espiramicina **1a**.



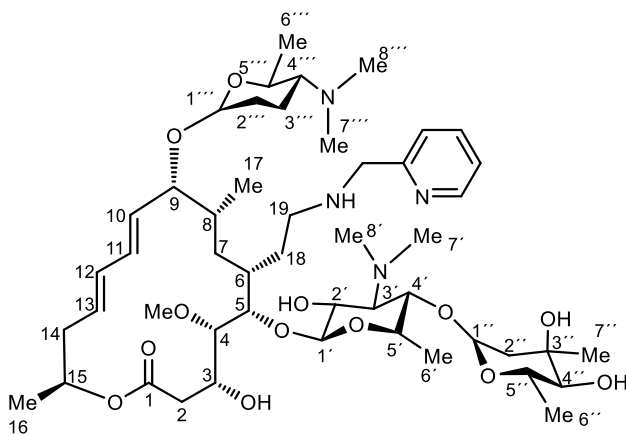
Esquema G.3. Espectro COSY (700 MHz, CDCl_3) de Bencil espiramicina **1a**.



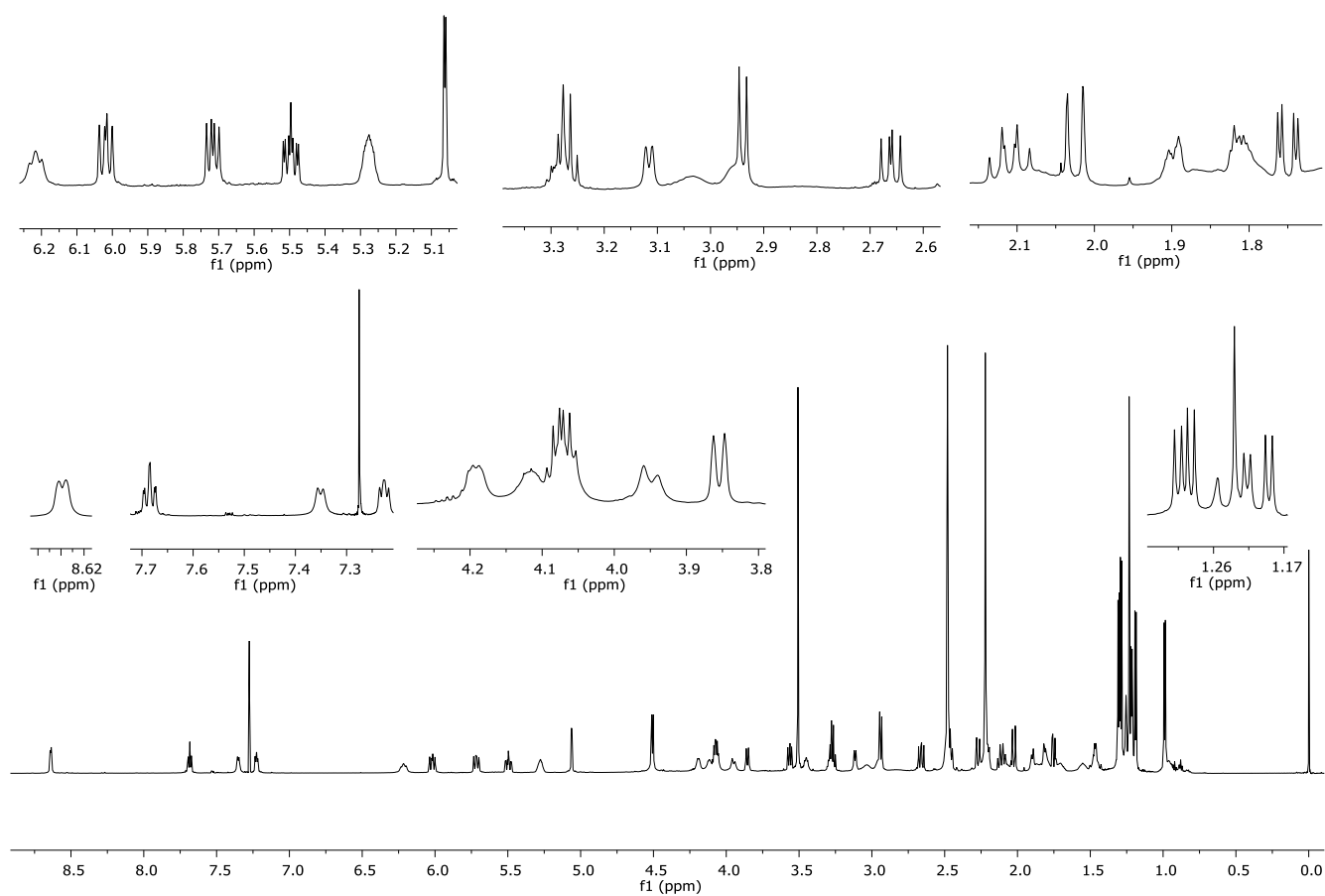
Esquema G.4. Espectro HSQC (700 MHz, CDCl_3) de Bencil espiramicina **1a**.



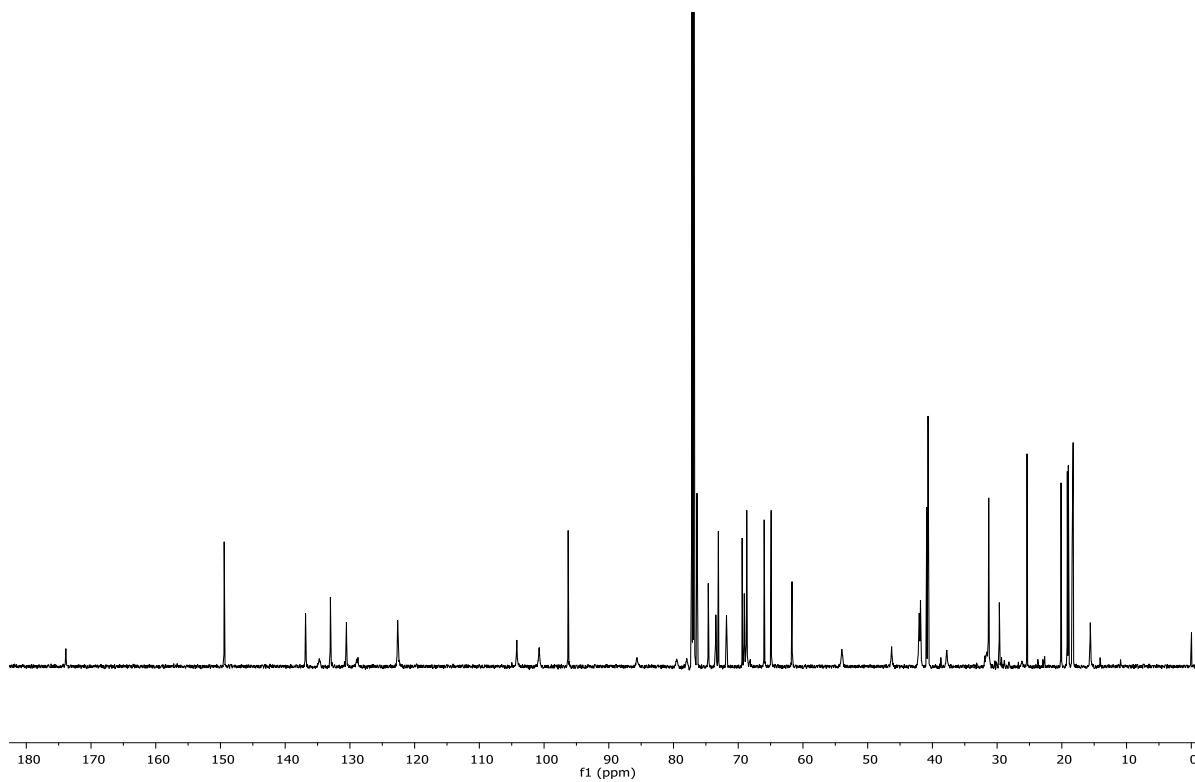
Esquema G.5. Espectro de masas (FAB^+) de Bencil espiramicina **1a**.



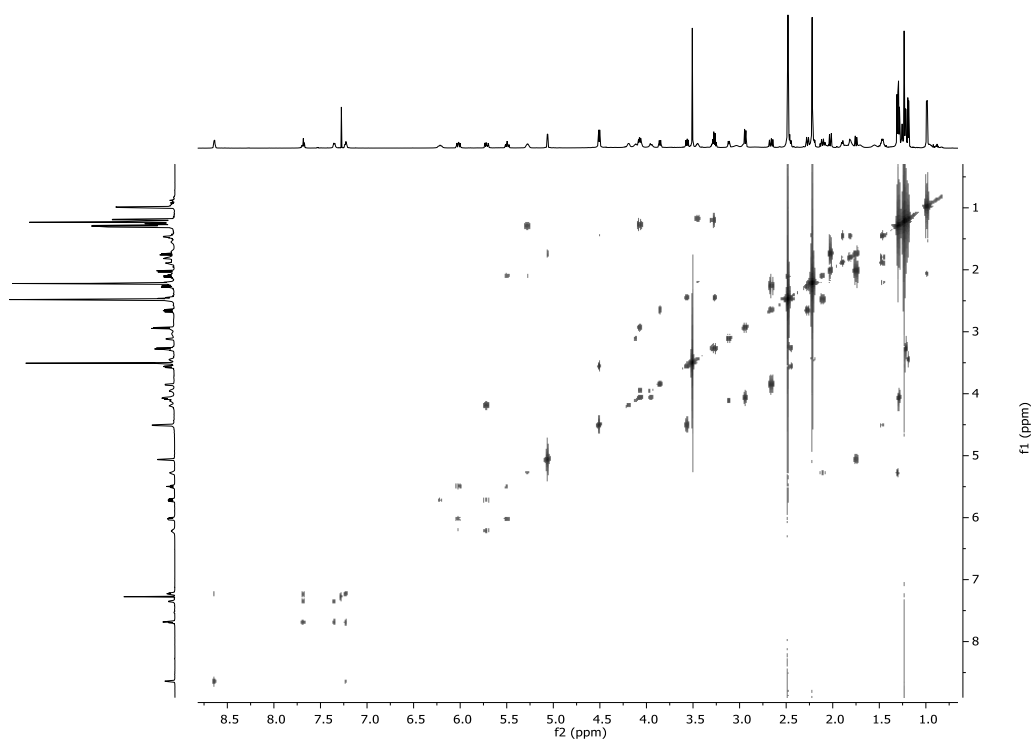
(4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*,10*R*,11*E*,13*E*,16*R*)-6-(((2*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-5-(((4*R*,5*S*,6*S*)-4,5-dihidroxi-4,6-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4-(dimetilamin)-3-hidroxi-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-10-(((5*R*,6*S*)-5-(dimetilamin)-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4-hidroxi-5-metoxi-9,16-dimetil-7-(2-((piridin-2-il)metilamin)etil)oxaciclohexadeca-11,13-dien-2-ona (2-Picolil espiramicina **1b). Sólido blanco. **Rdto.** 96%. **P.f.** 100-102. $[\alpha]_D^{25}$ = -51.5 (c 1.0, CHCl₃). **RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃)** δ : 0.93-0.96 (m, 1H, H7), 0.99 (d, J = 7 Hz, 3H, H17), 1.19 (d, J = 6.3 Hz, 3H, H6'''), 1.22 (d, J = 5.6 Hz, 3H, H6'), 1.23 (s, 3H, H7''), 1.25 (s, 1H, H6), 1.29 (d, J = 5.6 Hz, 3H, H6''), 1.3 (d, J = 6.3 Hz, 3H, H16), 1.44-1.56 (m, 2H, H2''', H3'''), 1.75 (dd, J = 3.5 Hz, 14.7 Hz, 1H, H2'), 1.80-1.86 (m, 1H, H3'''), 1.88-1.96 (m, 1H, H2''), 2.02 (d, J = 14 Hz, 2H, H2'), 2.08-2.14 (m, 2H, H14), 2.22 (s, 6H, H7''', H8'''), 2.27 (d, J = 14.7 Hz, 1H, H2), 2.48 (s, 6H, H7', H8'), 2.66 (dd, J = 11.2 Hz, 14.3 Hz, 1H, H2), 2.94 (d, J = 9.8 Hz, 1H, H4''), 3.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H4), 3.24-3.32 (m, 2H, H4', H5'), 3.41-3.48 (m, 1H, H5'''), 3.51 (s, 3H, H20), 3.56 (dd, J = 7.7 Hz, 10.5 Hz, 1H, H2'), 3.85 (d, J = 11.2 Hz, 1H, H3), 3.95 (d, J = 13.3, 1H, H21), 3.99-4.05 (m, 1H, H21), 4.07-4.10 (m, 1H, H5''), 4.12-4.16 (m, 1H, H5), 4.18-4.26 (m, 1H, H9), 4.51 (s, 1H, H1'), 4.51 (s, 1H, H1'''), 5.06 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H1''), 5.22-5.31 (m, 1H, H15), 5.50 (ddd, J = 4.2 Hz, 11.2 Hz, 15.4 Hz, 1H, H13), 5.72 (dd, J = 9.8 Hz, 15 Hz, 1H, H10), 6.02 (dd, J = 11.2 Hz, 14.7 Hz, 1H, H12), 6.22 (dd, J = 11.9 Hz, 12.2 Hz, 1H, H11), 7.23 (dd, J = 7.0, 4.9 Hz, 1H, H_{aromático}), 7.35 (d, J = 7.0 Hz, 1H, H_{aromático}), 7.69 (ddd, J = 9.1, 6.3, 1.4 Hz, 1H, H_{aromático}), 8.64 (d, J = 4.2 Hz, 1H, H_{aromático}). **RMN ¹³C (175 MHz, CDCl₃)** δ : 15.6 (sa, C17), 18.3 (C6''), 18.4 (C3'''), 19.0 (C6'), 19.2 (C6'''), 20.1 (C16), 25.4 (C7'), 29.7 (C6), 31.3 (C2'''), 31.6 (sa, C7), 37.8 (sa, C2), 40.7 (2C, C7''', 8'''), 40.9 (C2''), 41.9 (C14), 42.1 (sa, 2C, C7', 8'), 46.3 (C19), 54.03 (C21), 61.6 (C20), 64.9 (C4'''), 66.0 (C5''), 68.7 (2C, C3, C3'), 69.1 (C15), 69.4 (C3'), 71.8 (C2'), 73.1 (C5'), 73.5 (C5'''), 74.7 (C4'), 76.4 (C4'), 78.0 (sa, C5), 79.6 (sa, C9), 85.7 (sa, C4), 96.3 (C1''), 100.8 (sa, C1'''), 104.2 (sa, C1'), 122.6 (CH_{aromático}), 122.7 (CH_{aromático}), 128.9 (sa, C10), 130.6 (C13), 133.0 (C12), 134.7 (sa, C11), 136.9 (CH_{aromático}), 149.5 (2C, CH_{aromático}, C_{aromático}), 173.9 (C1). **HRMS (FAB⁺)**: Calculado para C₄₉H₈₄N₄O₁₃²⁺ [M+2H]²⁺, m/z 936. 6024; encontrado m/z 936.6317.**



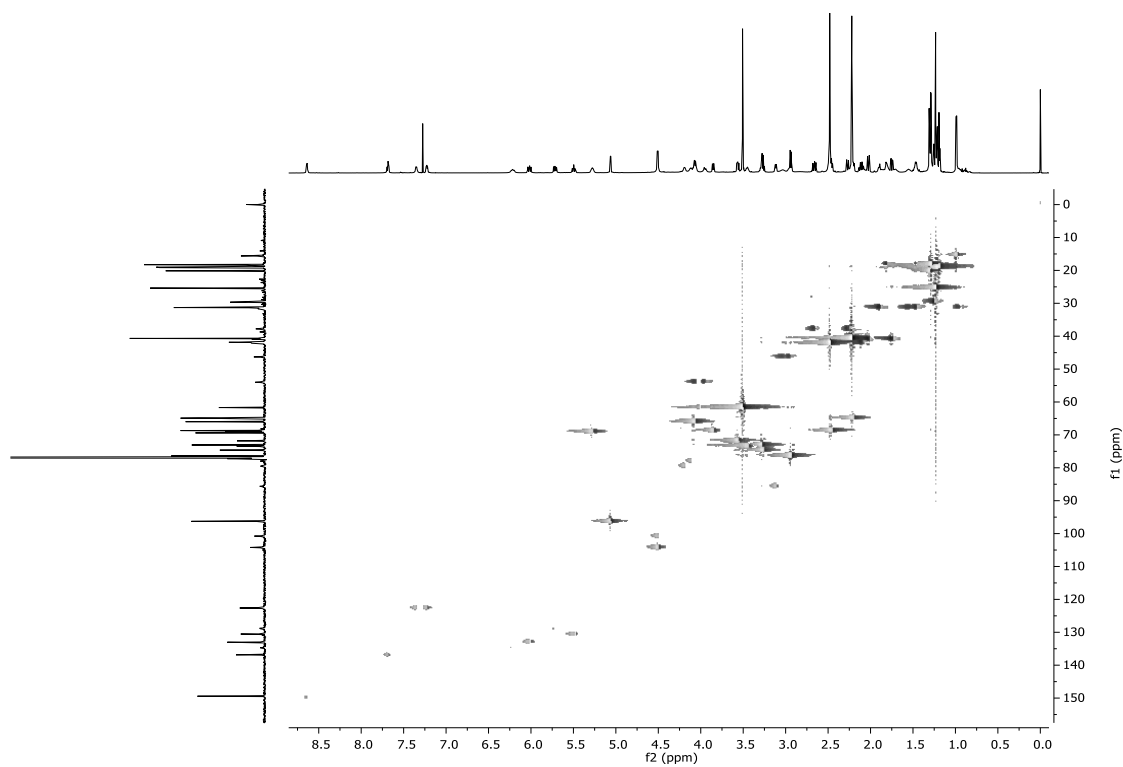
Esquema G.6. Espectro de RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) de 2-Picolil espiramicina **1b**.



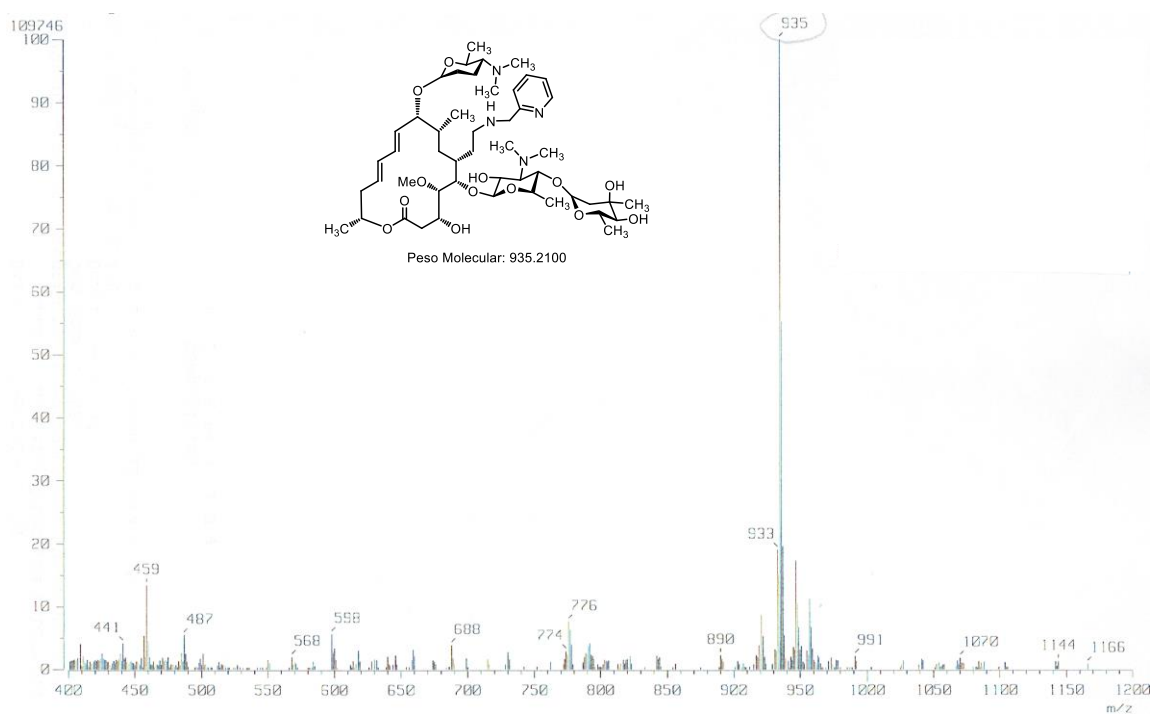
Esquema G.7. Espectro de RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) de 2-Picolil espiramicina **1b**.



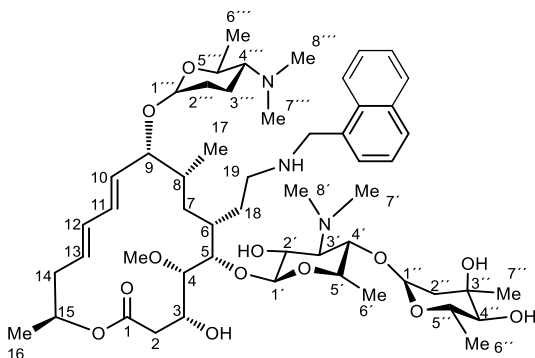
Esquema G.8. Espectro COSY (700 MHz, CDCl_3) de 2-Picolil espiramicina **1b**.



Esquema G.9. Espectro HSQC (700 MHz, CDCl_3) de 2-Picolil espiramicina **1b**.

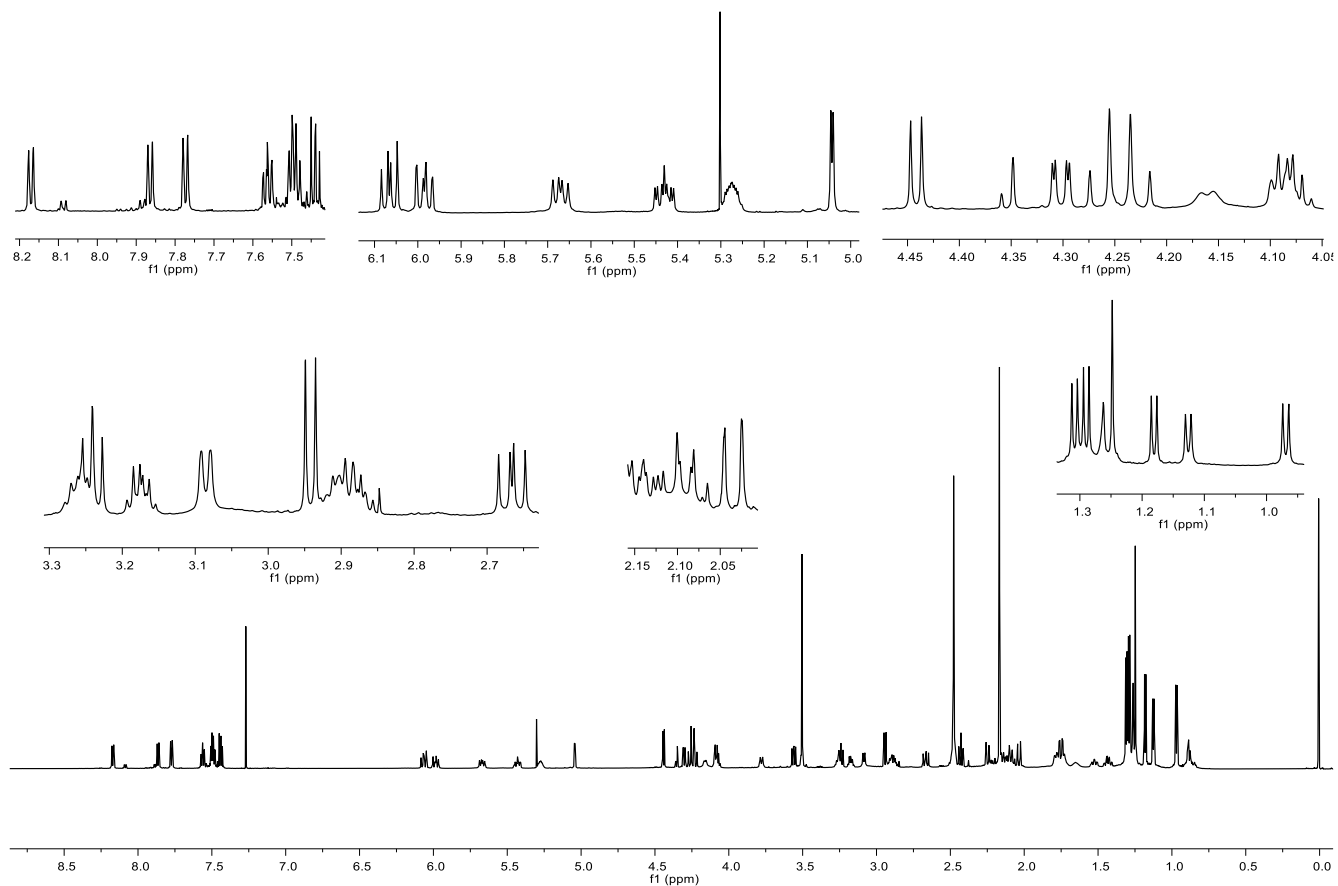


Esquema G.10. Espectro de masas (FAB^+) de 2-Picolil espiramicina **1b**.

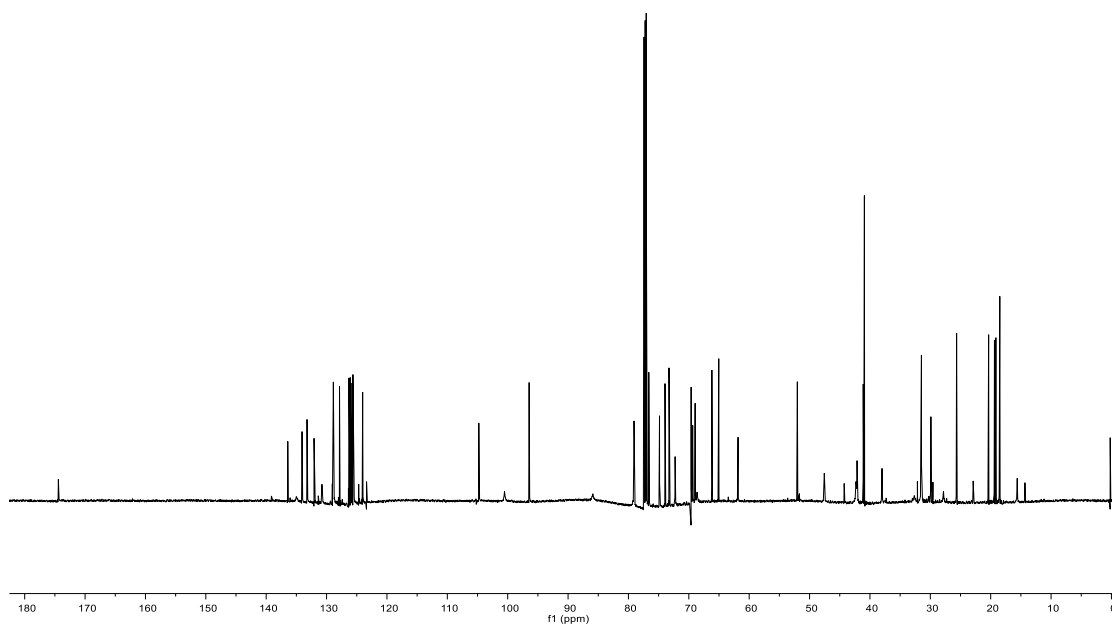


(4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*,10*R*,11*E*,13*E*,16*R*)-6-(((2*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-5-(((4*R*,5*S*,6*S*)-4,5-dihidroxi-4,6-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4-(dimetilamin)-3-hidroxi-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-10-(((5*R*,6*S*)-5-(dimetilamin)-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4-hidroxi-5-metoxi-9,16-dimetil-7-(2-((naftalen-1-il)metilamin)etil)oxaciclohexadeca-11,13-dien-2-ona (Naftil espiamicina **1c). Sólido blanco. **Rdto.** 93%. **P.f.** 151-153. $[\alpha]_D^{25} = -49.7$ (c 1.0, CHCl₃). **RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃)** δ : 0.85-0.89 (m, 1H, H7), 0.97 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H17), 1.13 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H6'''), 1.18 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H6'), 1.25 (s, 3H, H7''), 1.29 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H6''), 1.31 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H16), 1.40-1.46 (m, 1H, H3'''), 1.52 (ddd, $J = 4.9, 4.2, 2.8$ Hz, 1H, H7), 1.65 (sa, 2H, H18), 1.72-1.75 (m, 1H, H6), 1.74 (dd, $J = 14.7, 4.2$ Hz, 1H, H2''), 1.76-1.79 (m, 2H, H3''', H2'''), 2.03 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H, H2''), 2.09 (dd, $J = 24.5, 11.9$ Hz, 1H, H14), 2.10-2.13 (m, 1H, H8), 2.14-2.16 (m, 1H, H4'''), 2.17 (s, 6H, H7''', H8'''), 2.24 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, H2), 2.42 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H, H3'), 2.47 (s, 6H, H7', H8'), 2.48-2.50 (m, 1H, H14), 2.66 (dd, $J = 14.0, 11.9$ Hz, 1H, H2), 2.86-2.91 (m, 2H, H19), 2.94 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H4''), 3.08 (dd, $J = 8.4, 0.7$ Hz, 1H, H4), 3.16-3.19 (m, 2H, H4', H5'), 3.24 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, H5'''), 3.50 (s, 3H, H20), 3.56 (dd, $J = 11.2, 7.0$ Hz, H2'), 3.78 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, H3), 4.06-4.10 (m, 2H, H5, H5''), 4.16 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H9), 4.25 (Sistema AB, $J = 12.6$ Hz, 2H, H21), 4.30 (dd, $J = 9.1, 0.7$ Hz, 1H, H1'''), 4.44 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H1'), 5.04 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H1''), 5.26-5.29 (m, 1H, H15), 5.43 (ddd, $J = 15.4, 11.2, 4.2$ Hz, 1H, H13), 5.67 (dd, 14.7, 9.1 Hz, 1H, H10), 5.99 (dd, $J = 14.7, 9.1$ Hz, 1H, H12), 6.07 (dd, $J = 14.7, 10.5$ Hz, 1H, H11), 7.44 (dd, $J = 7.7, 7.0$ Hz, 1H, H_{aromático}), 7.48-7.51 (m, 2H, H_{aromático}), 7.56 (ddd, $J = 8.4, 7.0, 2.1$ Hz, 1H, H_{aromático}), 7.77 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H_{aromático}), 7.86 (dd, $J = 7.7, 0.7$ Hz, 1H, H_{aromático}), 8.17 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H_{aromático}). **RMN ¹³C (175 MHz, CDCl₃)** δ : 15.6 (C17), 18.4 (C6''), 19.1 (C3'''), 19.3 (C6'), 20.3 (C6'''), 22.8 (C16), 25.6 (C7'''), 27.7 (C18), 29.8 (C8), 31.4 (C7), 32.1 (C2'''), 32.6 (C6), 37.9 (C2), 40.8 (C7'', C8'''), 41.0 (C2''), 42.1 (C14), 42.2 (bs, 2C, C7', C8'), 47.5 (C19), 51.9 (C21), 61.8 (C20), 65.0 (C4'''), 66.1 (C5''), 68.6 (C3), 68.8 (C3'), 69.3 (C15), 69.5 (C3''), 72.2 (C2'), 73.2 (C5'), 73.9 (C5'''), 74.8 (C4'), 76.6 (C4''), 79.0 (C9), 85.8 (C4), 96.4 (C1''), 100.4 (C1'''), 104.7 (C1'), 123.9 (CH_{aromático}), 125.6 (CH_{aromático}), 125.7 (CH_{aromático}), 126.0 (CH_{aromático}), 126.2 (CH_{aromático}), 127.8 (CH_{aromático}), 128.8 (CH_{aromático}), 130.7 (C13), 132.0 (C12), 133.2 (C_{aromático}), 134.0 (C_{aromático}), 134.9**

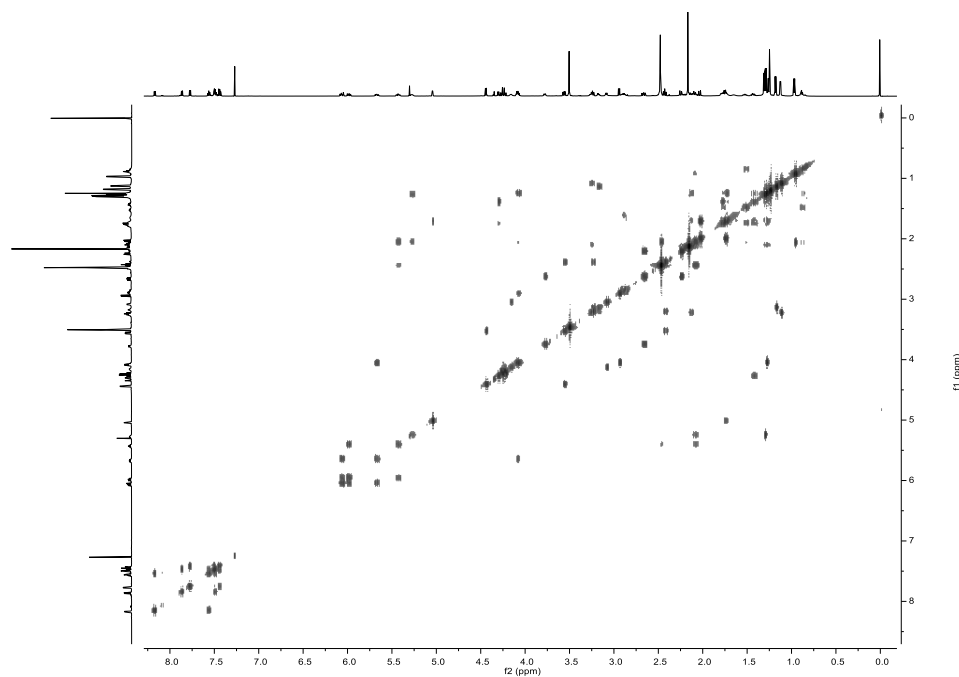
(C11), 136.3 (C_{aromático}), 174.3 (C1). **HRMS (FAB⁺)**: Calculado para C₅₄H₈₇N₃O₁₃²⁺ [M+2H]²⁺, *m/z* 985.6228; encontrado *m/z* 985.6612.



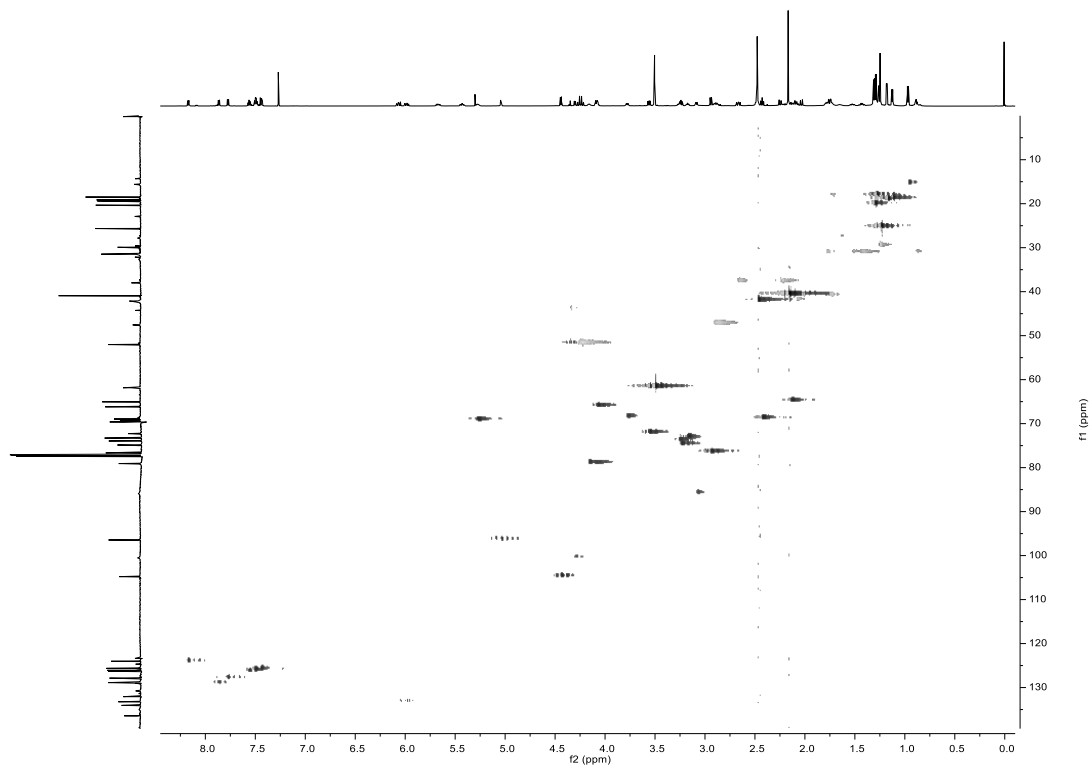
Esquema G.11. Espectro de RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) de Naftil espiramicina **1c**.



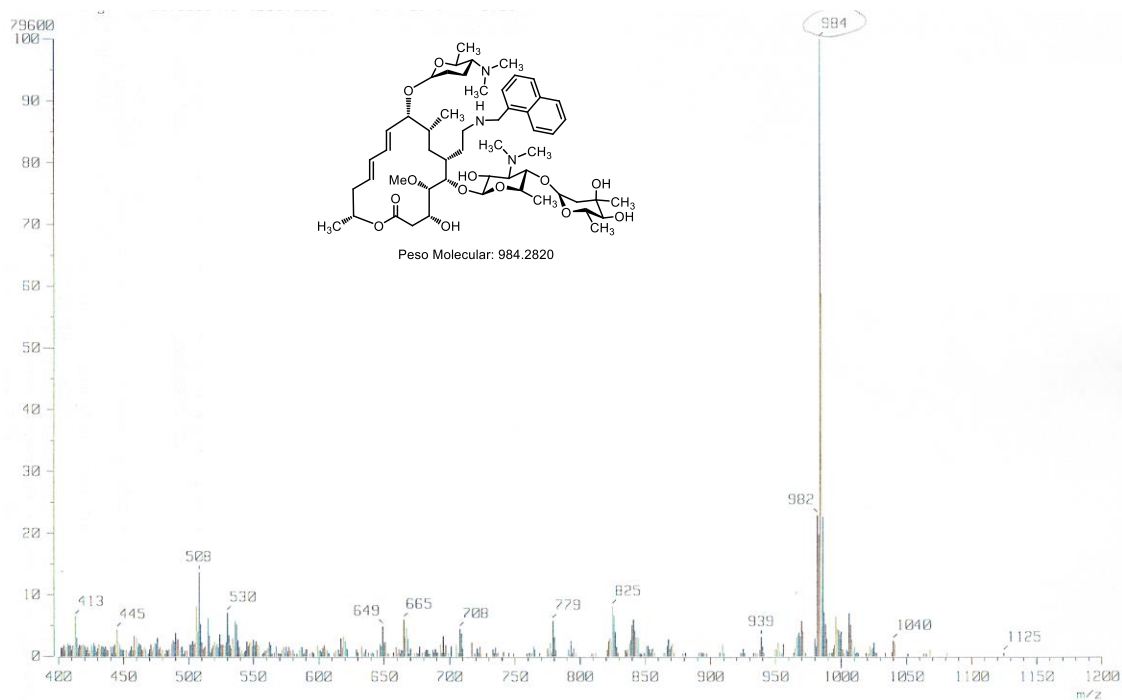
Esquema G.12. Espectro de RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) de Naftil espiamicina **1c**.



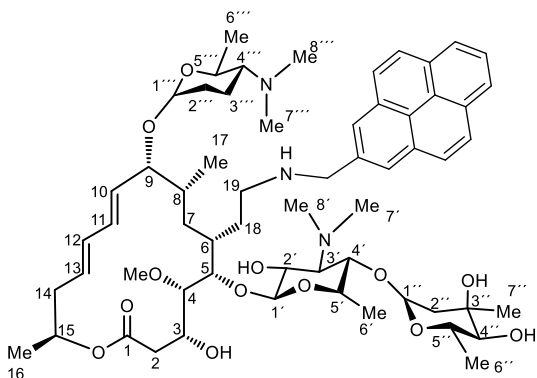
Esquema G.13. Espectro COSY (700 MHz, CDCl_3) del compuesto Naftil espiamicina **1c**.



Esquema G.14. Espectro HSQC (700 MHz, CDCl₃) de Naftil espiamicina **1c**.

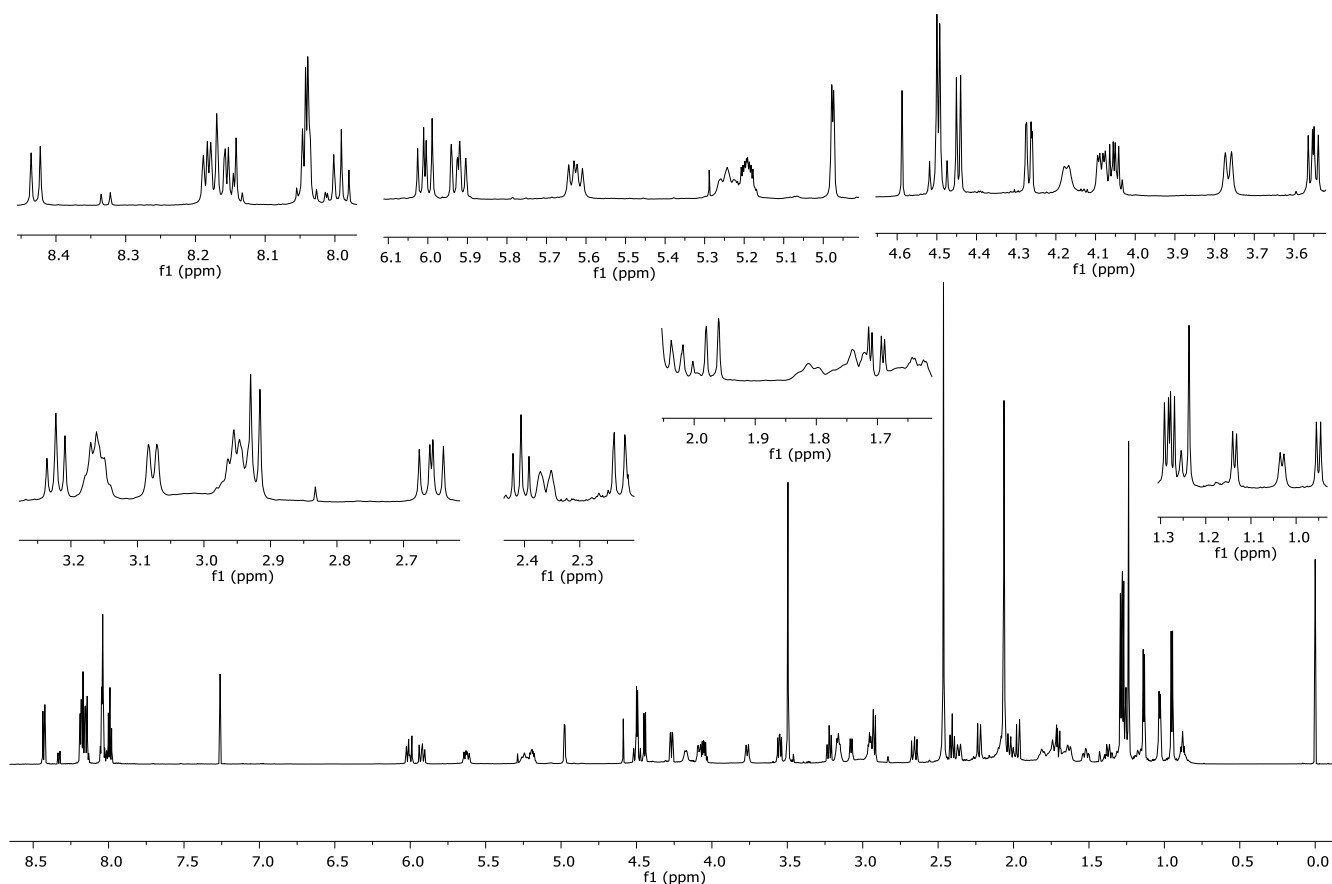


Esquema G.15. Espectro de masas (FAB⁺) de Naftil espiamicina **1c**.

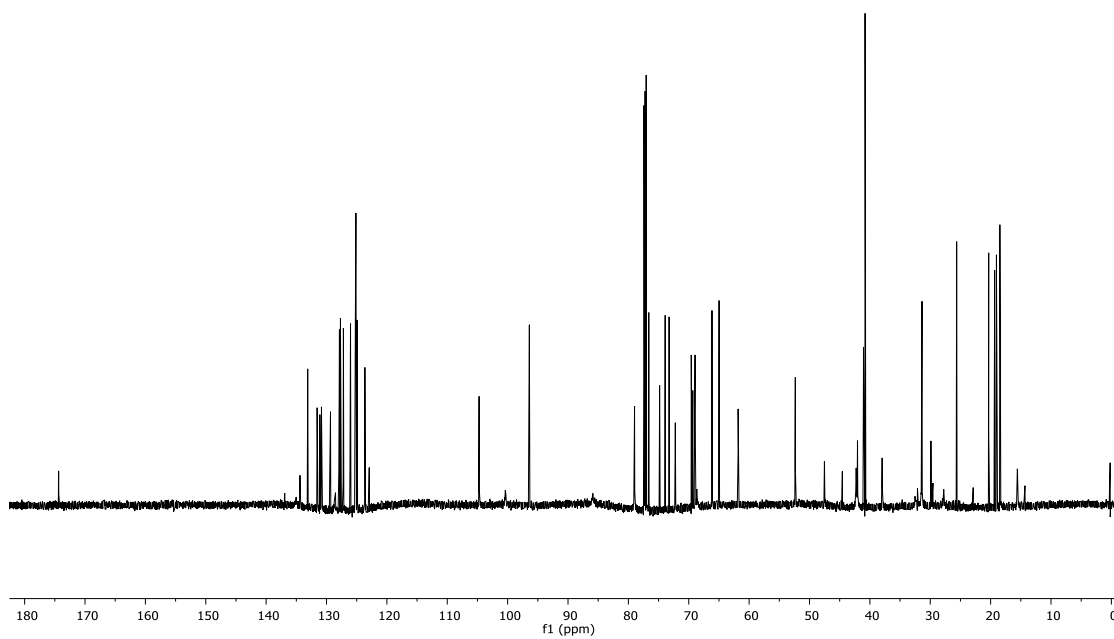


(4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*,10*R*,11*E*,13*E*,16*R*)-6-(((2*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-5-(((4*R*,5*S*,6*S*)-4,5-dihidroxi-4,6-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4-(dimetilamin)-3-hidroxi-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-10-(((5*R*,6*S*)-5-(dimetilamin)-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4-hidroxi-5-metoxi-9,16-dimetil-7-(2-((piren-1-il)metilamin)etil)oxaciclohexadeca-11,13-dien-2-ona (Pirenil espiramicina **1d). Sólido blanco. **Rdto.** 91%. **P.f.** 134-137. $[\alpha]_D^{25} = -52.3$ (c 1.0, CHCl₃). **RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃)** δ : 0.86-0.89 (m, 1H, H7), 0.95 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H17), 1.03 (d, $J = 5.6$ Hz, 3H, H6''), 1.14 (d, $J = 5.6$ Hz, 3H, H6'), 1.23 (s, 3H, H7'), 1.27 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H6''), 1.29 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H16), 1.35-1.40 (m, 1H, H3''), 1.50-1.54 (m, 1H, H7), 1.62-1.67 (m, 2H, H18, H6), 1.70 (dd, $J = 14.7, 4.2$ Hz, 1H, H2''), 1.72-1.75 (m, 1H, H2'''), 1.80-1.82 (m, 1H, H3'''), 1.97 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, H2''), 2.02 (dd, $J = 24.5, 11.2$ Hz, 1H, H14), 2.06 (s, 6H, H7''', H8'''), 2.07-2.09 (m, 1H, H8), 2.23 (d, $J = 14.0$ Hz, H2), 2.35-2.37 (m, 1H, H4'''), 2.40 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H, H3'), 2.46 (s, 6H, H7', H8'), 2.46-2.48 (m, 1H, H14), 2.66 (dd, $J = 14.0, 11.2$ Hz, 1H, H2), 2.92 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H4''), 2.94-2.96 (m, 2H, H19), 3.08 (dd, $J = 5.6, 0.7$ Hz, 1H, H4), 3.15-3.17 (m, 1H, H4', H5'), 3.22 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, H5'''), 3.50 (s, 3H, H20), 3.55 (dd, $J = 9.8, 7.0$ Hz, H2'), 3.76 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, H3), 4.05 (dd, $J = 9.1, 5.6$ Hz, 1H, H5''), 4.08 (dd, $J = 9.8, 4.2$ Hz, 1H, H5), 4.16-4.18 (m, 1H, H9), 4.27 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H, H1'''), 4.44 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H1'), 4.50 (Sistema AB, $J = 18.2, 13.3$ Hz, 2H, H21), 4.98 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H1''), 5.18-5.21 (m, 1H, H15), 5.22-5.26 (m, 1H, H13), 5.63 (dd, 14.7, 9.8 Hz, 1H, H10), 5.92 (dd, $J = 14.7, 10.5$ Hz, 1H, H12), 6.01 (dd, $J = 15.4, 10.5$ Hz, 1H, H11), 7.99 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H_{aromático}), 8.03-8.06 (m, 3H, H_{aromático}), 8.14-8.19 (m, 4H, H_{aromático}), 8.43 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H_{aromático}). **RMN ¹³C (175 MHz, CDCl₃)** δ : 15.5 (C17), 18.3 (C6''), 18.4 (C3'''), 19.0 (C6'), 19.3 (C6'''), 20.2 (C16), 25.5 (C7''), 27.7 (sa, C18), 29.8 (C8), 31.3 (C7), 32.4 (sa, C2'''), 32.6 (C6), 37.9 (C2), 40.7 (2C, C7''', C8'''), 41.0 (C2''), 42.0 (C14), 42.2 (sa, 2C, C7', C8'), 47.5 (C19), 52.3 (C21), 61.7 (C20), 64.9 (C4'''), 66.1 (C5''), 68.6 (sa, C3), 68.9 (C3'), 69.3 (C15), 69.5 (C3''), 72.2 (C2'), 73.2 (C5'), 73.8 (C5'''), 74.8 (C4'), 76.5 (C4''), 78.9 (C9), 85.8 (C4), 96.3 (C1''), 100.3 (C1'''), 104.6 (C1'), 122.8 (C_{aromático}), 123.6 (CH_{aromático}), 124.9 (CH_{aromático}), 125.0 (2C, CH_{aromático}), 125.1**

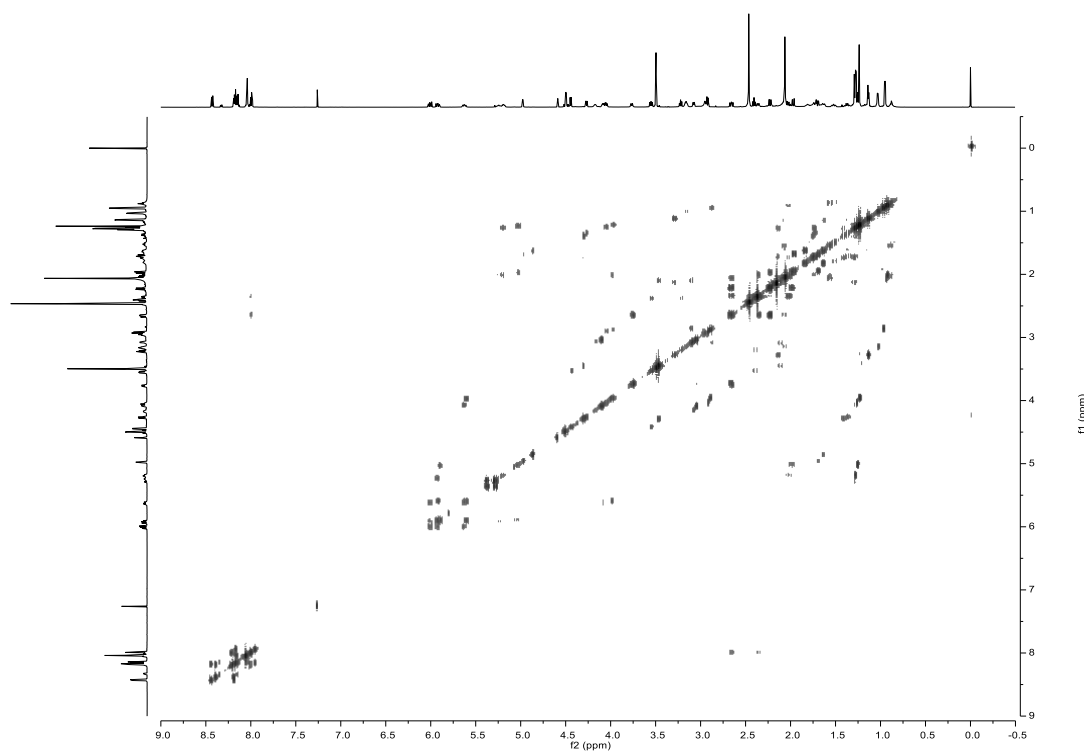
(CH_{aromático}), 125.9 (CH_{aromático}), 127.1 (CH_{aromático}), 127.2 (CH_{aromático}), 127.5 (C_{aromático}), 127.6 (CH_{aromático}), 127.8 (CH_{aromático}), 129.3 (C_{aromático}), 130.7 (C13), 130.8 (C_{aromático}), 131.0 (C_{aromático}), 131.5 (C_{aromático}), 133.0 (C12), 134.3 (C_{aromático}), 134.9 (C11), 174.3 (C1). **HRMS (FAB⁺)**: Calculado para C₆₀H₈₉N₃O₁₃²⁺ [M+2H]²⁺, *m/z* 1059.6384; encontrado *m/z* 1059.7166.



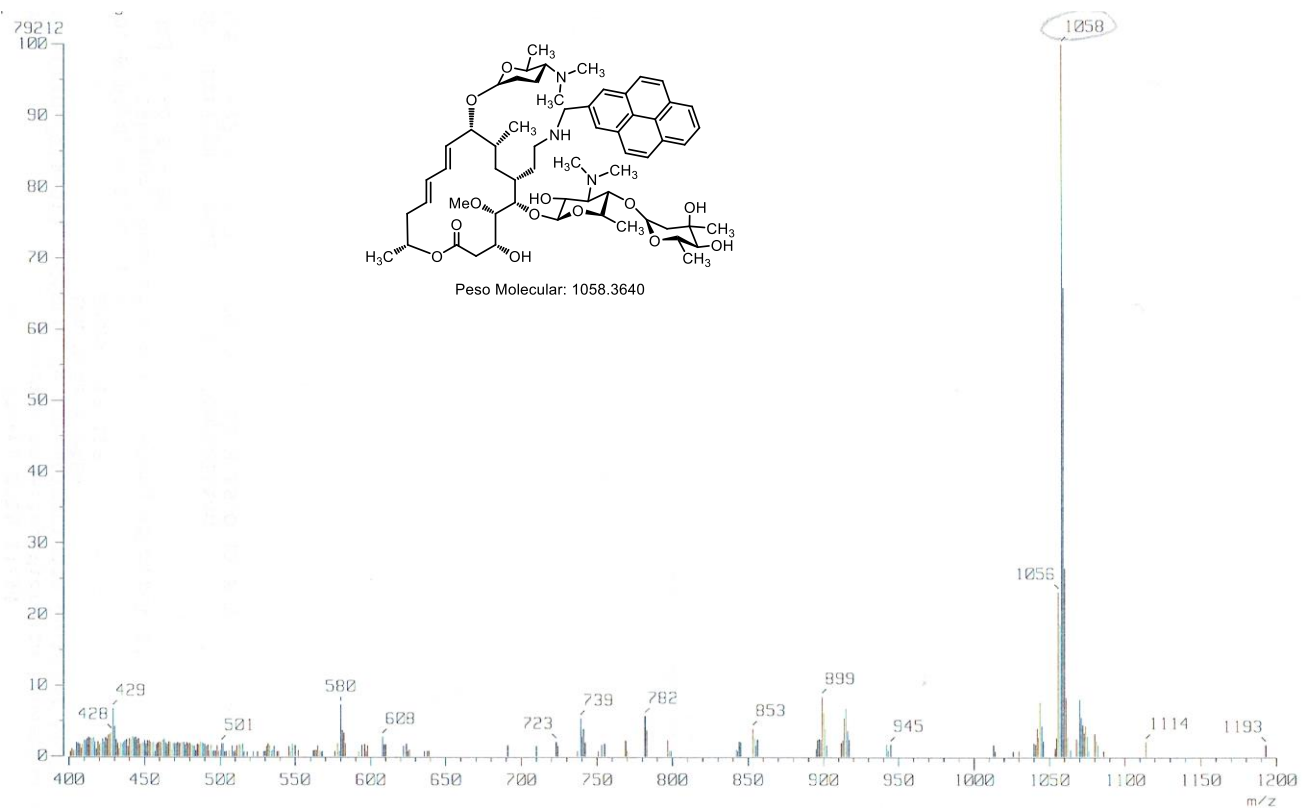
Esquema G.16. Espectro de RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) de Pirenil espiramicina **1d**.



Esquema G.17. Espectro de RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) de Pirenil espiramicina **1d**.



Esquema G.18. Espectro COSY (700 MHz, CDCl_3) del compuesto Pirenil espiramicina **1d**.



Esquema G.19. Espectro de masas (FAB⁺) de Naftil espiamicina **1d**.

APÉNDICE H. Artículo publicado como parte de los resultados de esta tesis.



Adenine nucleotide recognition by spiramycin and some of its aromatic derivatives

Karla Isabel Rivera-Márquez¹ · Carolina Godoy-Alcántar¹ · Miguel Ángel Claudio-Catalán¹ · Felipe Medrano¹

Received: 4 June 2016 / Accepted: 31 August 2016 / Published online: 8 September 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract Association of adenine nucleotides with the macrocyclic antibiotic Spiramycin and two of its aromatic derivatives was studied by potentiometric titrations, ¹H and ³¹P NMR spectrometry and molecular modelling. Spiramycin binds adenine nucleotides with $K \approx 10^3\text{--}10^4 \text{ M}^{-1}$ and selectivity for ADP over ATP or AMP. The introduction of aromatic moieties reduces the strength of the binding but, selectivity order changes to ATP > ADP > AMP. Molecular models showed that complexes are mainly stabilized by electrostatic interactions between the protonated amino groups of the receptors and the phosphate groups of the nucleotides.

Keywords Spiramycin · Nucleotide recognition · Macrolide

Introduction

Using of natural compounds as supramolecular receptors has the advantage of avoiding laborious synthetic procedures. Previously, our research group demonstrated that some natural compounds such as isoquinoline alkaloids [1], peptide antibiotics [2], ansamycins [3], and aminoglycosides [4] can be successfully employed for recognition of biologically important low molecular weight guests.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10847-016-0654-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Felipe Medrano
fmedrano@uaem.mx

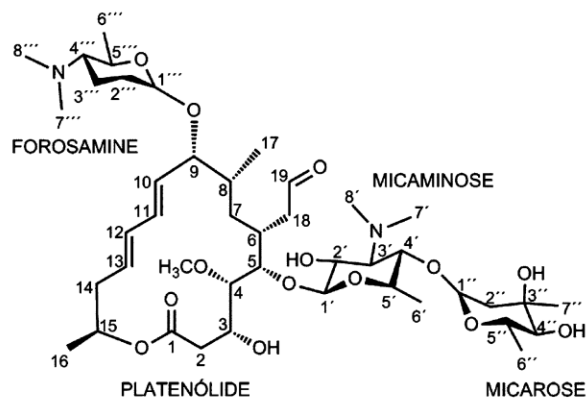
¹ Centro de Investigaciones Químicas, IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Ave. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

Continuing this line of research, we undertook a study of the molecular recognition properties of the macrolide antibiotic Spiramycin and some of its aromatic derivatives.

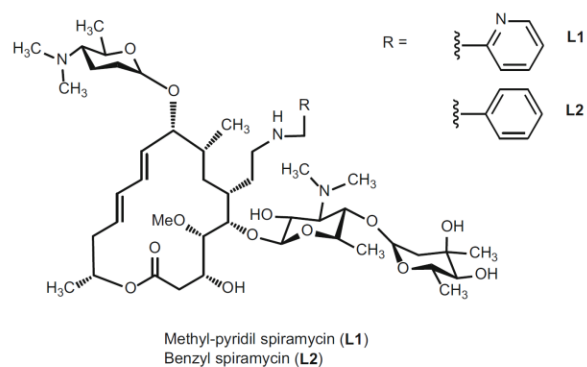
Macrolide antibiotics are an important family of antimicrobial agents [5]. Their structure consists of a macrocyclic lactone ring with several pendant carbohydrate moieties. Particularly, Spiramycin (L) (Scheme 1) is produced by *Streptomyces ambofaciens* and it has a polyketide lactone ring (platenolide) substituted with a disaccharide chain in position 5, composed of an aminosugar, D-mycaminose, and a neutral sugar, L-Mycarose. Also, D-forosamine (an amino sugar) is glycosidically linked to the aglicone in position 9. Spiramycin is a dibasic macrolide with two protonation sites located on the amino sugars. In aqueous solution, Spiramycin is neutral at pH above 9, monocationic in the 9–7 pH range, and dicationic at pH below 7. The acetaldehyde group at position 6 can be used as a reaction point to attach different functional groups. In this work, aromatic rings were linked to the lactone macrocyclic ring by reductive amination to obtain benzyl and methylpyridil derivatives (Scheme 2). The obtained products are tribasic molecules that can hold a higher cationic charge than the parent Spiramycin. Moreover, the presence of aromatic moieties introduces hydrophobic surfaces that are able of establishing additional interactions and signaling the recognition events, making them promising host molecules for the recognition of both anionic and neutral guests. In this work, we study the recognition of the adenine nucleotides (Scheme 3) by Spiramycin and the obtained derivatives.

Experimental

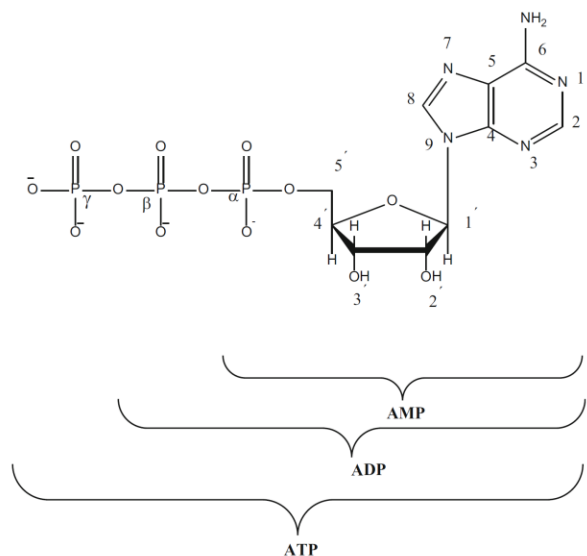
Spiramycin, Tylosin and adenine nucleotides were obtained from Sigma-Aldrich and were used as received without further purification.



Scheme 1 Chemical structure of Spiramycin with labels



Scheme 2 Chemical structure of obtained Spiramycin derivatives



Scheme 3 Chemical structure of the nucleotides used as a guests in this work

Synthesis of the derivatives

All the derivatives were obtained by reductive amination under nitrogen atmosphere at room temperature following the next procedure: In a typical experiment, 1 g of Spiramycin in the base form (1.186 mmol) was dissolved in 10 mL and poured in a 50 mL round-bottom flask. Subsequently, 1.5 mmol of amine were added slowly with stirring to the mixture followed by 1 mL of glacial acetic acid. After 10 min, 1.8 mmol of sodium triacetoxyborohydride were added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 24 h under nitrogen. At the end of this time, the mixture was transferred to a separation funnel and washed with 30 mL of distilled water to extract the salt of the antibiotic. Then the aqueous solution was extracted with 20 mL of dichloromethane for removing the excess of amine. The resulting aqueous phase was treated with NaOH 1 M reaching a pH >9 and extracted three times with 30 mL of CH₂Cl₂. The resulting organic solution was evaporated under reduced pressure to obtain a white solid which was dried under vacuum and fully characterized by spectroscopy.

Compound L1. White solid (yield 96 %), m.p. 93–96 °C [α]_D = −51.5° (c 1.0, CHCl₃). **NMR ¹H (700 MHz, CDCl₃)** δ = 0.99 (d, J = 7 Hz, 3H, CH₃CH (H17)), 1.19 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH₃CH (H6'')), 1.22 (d, J = 5.6 Hz, 3H, CH₃CH (H6')), 1.23 (s, 3H, CH₃C (H7')), 1.25 (s, 1H, CHCH (H6)), 1.29 (d, J = 5.6 Hz, 3H, CH₃CH (H6'')), 1.3 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH₃CH (H16)), 1.47 (m, 2H, CH₂CH₂ (H2'', H3'')), 1.75 (dd, J = 3.5 Hz, 14.7 Hz, 1H, CH₂CH (H2'')), 1.81 (m, 1H, CH₂CH₂ (H3'')), 1.9 (m, 1H, CH₂CH₂ (H2''')), 2.02 (d, J = 14 Hz, 2H, CH₂CH (H2'')), 2.11 (m, 2H, CH₂CH (H14)), 2.22 (s, 6H, (CH₃)₂N (H7'', H8'')), 2.27 (d, J = 14.7 Hz, 1H, CH₂CH (H2)), 2.48 (s, 6H—(CH₃)₂N (H7', H8')), 2.66 (dd, J = 11.2 Hz, 14.3 Hz, 1H, CH₂CH (H2)), 2.94 (d, J = 9.8 Hz, 1H, CHCH (H4'')), 3.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H, CHCH (H4)), 3.28 (m, 2H, CHCH (4', 5')), 3.45 (m, 1H, CHCH (5'')), 3.51 (s, 3H, OCH₃ (H20)), 3.56 (dd, J = 7.7 Hz, 10.5 Hz, 1H, CHCH (2')), 3.85 (d, J = 11.2 Hz, 1H, CH₂CH (H3)), 3.95 (d, J = 13.3, 1H, CH₂NH (H21)), 4.07 (m, 1H, CH₂NH (H21)), 4.07 (m, 1H, CHCH (H5'')), 4.12 (m, 1H, CHCH (H5)), 4.19 (m, 1H, CHCH (H9)), 4.51 (s, 1H, CHCH (H1')), 4.51 (s, 1H, CHCH₂ (H1'')), 5.06 (d, J = 2.8 Hz, 1H, CHCH (H1'')), 5.27 (m, 1H, CHCH₂ (H15)), 5.50 (ddd, J = 4.2 Hz, 11.2 Hz, 15.4 Hz, 1H, CHCH (H13)), 5.72 (dd, J = 9.8 Hz, 15 Hz, 1H, CHCH (H10)), 6.02 (dd, J = 11.2 Hz, 14.7 Hz, 1H, CHCH (H12)), 6.22 (dd, J = 11.9 Hz, 12.2 Hz, 1H, CHCH (H11)). **¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃)** δ = 15.63 (C17), 18.28 (C6''), 18.44 (C3''), 19.03 (C6''), 19.18 (C6'), 20.15 (C16), 25.41 (C7''), 29.70 (C6), 31.33 (C2''), 31.92 (C7), 37.77 (C2), 40.67 (2C, C7'', 8''), 40.91 (C2''), 41.85 (C14), 42.04 (2C, C7',

8'), 54.03 (C21), 66.02 (C5''), 68.71 (C3), 69.10 (C15), 69.42 (C3''), 71.84 (C2'), 73.10 (C5'), 73.49 (C5'''), 74.66 (C4'), 76.40 (C4''), 77.57 (C5), 78.79 (C9), 85.65 (C4), 96.31 (C1''), 100.79 (C1'''), 104.22 (C1'), 128.79 (C10), 130.56 (C13), 133.02 (C12), 134.75 (C11), 173.92 (C1). **HRMS (FAB⁺)**: Calculated for C₄₉H₈₄N₄O₁₃ [M + H]⁺, *m/z* 936.6034; found for [M + H]⁺, *m/z* 936.6317.

Compound L2. White solid (98 %). M.p. 122–125 °C. [α]_D = −47.1° (c 1.0, CHCl₃). **¹H NMR (700 MHz, CDCl₃)** δ: 0.88–0.92 (m, 1H, H7), 0.97 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H17), 1.20 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, H6'''), 1.22 (d, *J* = 5.6 Hz, 3H, H6'), 1.23 (s, 3H, H7''), 1.29 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, H6''), 1.30 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H16), 1.41 (ddd, *J* = 25.2, 12.5, 3.5, 1H, H3'''), 1.46–1.51 (m, 1H, H2'''), 1.52–1.55 (m, 1H, H7), 1.64 (sa, 2H, H18), 1.75 (m, 1H, H6), 1.75 (dd, *J* = 14.7, 4.2 Hz, 1H, H2''), 1.82 (ddd, *J* = 12.3, 7.0, 3.5 Hz, 1H, H3'''), 1.84–1.87 (m, 1H, H2''), 2.03 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H, H2''), 2.10 (dd, *J* = 25.2, 11.2 Hz, 1H, H14), 2.10 (m, 1H, H8), 2.19–2.20 (m, 1H, H4'''), 2.20 (s, 6H, H7''', H8'''), 2.24 (dd, *J* = 14.7, 1.4 Hz, 1H, H2), 2.45–2.47 (m, 1H, H3'), 2.47 (s, 6H, H7', H8'), 2.47–2.49 (m, 1H, H14), 2.65 (dd, *J* = 14.0, 11.2 Hz, 1H, H2), 2.77 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H19), 2.94 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H4''), 3.08 (dd, *J* = 8.4, 0.7 Hz, 1H, H4), 3.24–3.27 (m, 2H, H4' + H5'), 3.36–3.40 (m, 1H, H5'''), 3.50 (s, 3H, H20), 3.56 (dd, *J* = 10.5, 7.7 Hz, H2'), 3.78 (m, 1H, H3), 3.79 (AB system, *J* = 12.6 Hz, 2H, H21), 4.06–4.11 (m, 2H, 5'' + H5), 4.15 (dd, *J* = 9.1 Hz, 3.5 Hz, 1H, H9), 4.41 (dd, *J* = 9.1, 0.7 Hz, 1H, 1''), 4.46 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H1'), 5.06 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H1''), 5.24–5.27 (m, 1H, H15), 5.49 (ddd, *J* = 15.4, 11.2, 4.2 Hz, 1H, H13), 5.70 (dd, 14.7, 9.1 Hz, 1H, H10), 6.01 (dd, *J* = 14.7, 11.2 Hz, 1H, H12), 6.17 (dd, *J* = 14.7, 11.2 Hz, 1H, H11), 7.24–7.26 (m, 1H, H_{aromatic}), 7.32–7.34 (m, 4H, H_{aromatic}). **¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃)** δ: 15.5 (C17), 18.4 (C6''), 18.5 (C3'''), 19.1 (C6'), 19.3 (C6'''), 20.2 (C16), 25.5 (C7''), 27.4 (C18), 31.2 (C8), 31.3 (C7), 31.4 (C2'''), 32.2 (C6), 37.9 (C2), 40.8 (2C, C7''', C8'''), 41.0 (C2''), 41.9 (C14), 42.1 (bs, 2C, C7', C8'), 46.6 (C19), 54.2 (C21), 61.7 (C20), 64.9 (C4'''), 66.1 (C5''), 68.6 (C3), 68.8 (C3'), 69.2 (C15), 69.5 (C3''), 72.1 (C2'), 73.2 (C5'), 73.9 (C5'''), 74.8 (C4'), 76.5 (C4''), 78.7 (C5), 79.0 (C9), 85.8 (C4), 96.3 (C1''), 100.4 (C1'''), 104.5 (C1'), 127.0 (CH_{aromatic}), 128.3 (2C, CH_{aromatic}), 128.5 (2C, CH_{aromatic}), 130.8 (C13), 133.0 (C12), 135.0 (C11), 140.4 (ipso, C_{aromatic}), 174.1 (CO₂). **HRMS (FAB⁺)**: Calculated for C₅₀H₈₅N₃O₁₃ [M + H]⁺, *m/z* 935.5999; found for [M + H]⁺, *m/z* 935.6119.

Potentiometric titrations

Potentiometric titrations were performed in a 50 mL thermostated cell kept under nitrogen at desired temperature with 1–3 mM macrolide solution to which enough HCl was

added to produce a completely protonated form of the antibiotic at the start of titration. Measurements of pH were carried out using a Thermo Orion model 920Aplus pH-meter equipped with an Orion 8102U combination electrode while the titrant (CO₂ free NaOH) solution was added to the system in small increments with a piston type burette. The glass electrode was calibrated as a hydrogen-ion concentration probe by titration of previously standardized amounts of HCl with CO₂ free NaOH solutions. *K_w* and correction factor *f* were obtained from a non-linear least squares fitting of the Eq. 1 [6] using the Benkert and Franke free program SciDavis version 0.2.4 [7].

$$V = \frac{V_e C_b 10^{-pH} - V_o (f 10^{-pH} - K_w)}{C_b 10^{-pH} + f 10^{-pH} - K_w} \quad (1)$$

where *V_e* is the equivalence volume, *V_o* is the initial volume of the acid solution, *C_b* is the base concentration. Factor *f* is a correction factor of the pH measurement. The program HYPERQUAD 2013, version 6.0.1 [8], was used to calculate all equilibrium constants. The mean values of logarithms of protonation and association constants with standard errors were calculated by averaging the values obtained in at least three independent titration experiments. Errors in values of logarithms of constants as fitting parameters in each titration experiment were less than 0.01. Species distribution diagrams were calculated by using HYSS 2009 software [9].

NMR measurements

NMR spectra were registered in a Varian VNMRS 700 MHz and Varian INOVA 400 MHz spectrometers.

Molecular modelling

The structures of receptor–nucleotide complexes were calculated by molecular mechanics with the OPLS-2005 force field [10] and Polak–Ribiere conjugate gradient minimisation scheme. All calculations were performed in water using a generalized Born/surface area continuum solvation model [11] as implemented in MACROMODEL ver. 11.1 [12].

Results and discussion

Reductive amination reaction is a highly efficient method to attach aromatic groups to the platenolide macrocyclic ring. From a biological point of view, antibiotic activity tests revealed that the aromatic derivatives obtained in this study are inactive against common strains of gram-positive or gram-negative bacteria. These results are consistent with those reported in the literature [13] which points that

aldehyde group is an important factor involved in the antibiotic activity. However, the aromatic derivatives have better signaling properties and different affinity or selectivity than the parent Spiramycin.

Protonation constants of receptors

Potentiometry has proven to be a very useful technique for the determination of affinity constants of polyamine-anion complexes [14]. To determinate the association constants of the complexes both precise and exact pKa values of the receptors and the guests are needed. In a literature survey, we detect that the reported pKa values of Spiramycin and other macrolides are not consistent, or were reported without specifying the experimental conditions of the measurement [15, 16], or were measured in non-aqueous solution media [17]. For this reason, the protonation constants of **L** and its derivatives were determined in water at $T = 298.2\text{ K}$ and $I = 0.1\text{ M}$ (NaCl) by potentiometric titration. Also, the pKa value of the close related macrolide Tylosin was determined for comparison.

The protonation curve (Fig. 1) of **L** shown a large buffer zone located in 6.5–9.5 pH range. The fitting of these data performed with Hyperquad gave two pKa values ($\text{pKa}_1 = 8.44$ and $\text{pKa}_2 = 7.49$). Potentiometric titration provides us with the protonation constants and the stoichiometry of the involved equilibrium but does not give the specific location of the protonation site in the structure. Conversely, information about the sites which protons bind to the antibiotic was obtained studying the pH dependence of the ^1H NMR signals (Fig. 1). The highest shifts were observed for the aminomethyl groups of micaminoxide (signals labeled 7', 8') and forosamine (7''', 8'''). In the 6–9

pH range, the $-\text{CH}_3$ hydrogen atoms that are adjacent to the amino nitrogen in forosamine and micaminoxide undergo a large downfield shift caused by the deshielding effect upon protonation. The studied signals shift to a lower field almost simultaneously as the pH decreases. But forosamine aminomethyl group signals start to shift at higher pH indicating that $\text{pKa} = 8.44$ corresponds to forosamine group, while $\text{pKa} = 7.49$ correspond to micaminoxide. The close related macrolide antibiotic Tylosin is titrated under the same conditions for comparison. Tylosin has a measured $\text{pKa} = 7.42$ and considering that only micaminoxide is present in its structure we consider that the assignment discussed before is correct.

Titration curve of **L1** is shown in Fig. 2. The first buffer zone was observed from $a = 0$ to $a = 3$ (added base equivalents), where the free hydrochloric acid is neutralized as the titration curve almost coincides with the neutralization of the curve of identical concentration in 0.0115 M HCl. The second buffer zone, located between $a = 3$ and $a = 6$, correspond to the reversible dissociation of three protons ($\text{H}_3\text{L} = \text{L} + 3\text{H}^+$). Fitting of the titration curve gave 4 protonation values (pKa): 8.83, 8.20, 7.32 and 2.62. The last protonation constant value has the highest uncertainty, but its inclusion in the model improved the fitting of the experimental data in the acidic portion of the titration curve and was assigned to pyridine nitrogen based on the pH dependence of aromatic ^1H NMR signals (Supplementary material). The aromatic protons suffer a low field shift as pH decreases, which agree with the protonation of the pyridine nitrogen that occurred at pH below 2.5 in agreement with reported pKa data [18, 19] that showed that 2-pyridil derived ligands has a lower basicity than the parent pyridine.

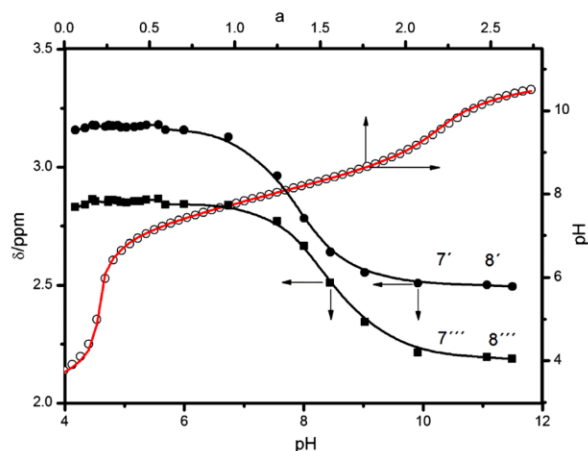


Fig. 1 pH dependence of the aminomethyl ^1H NMR signals of spiramycin, the experimental and calculated potentiometric titration plots are showed

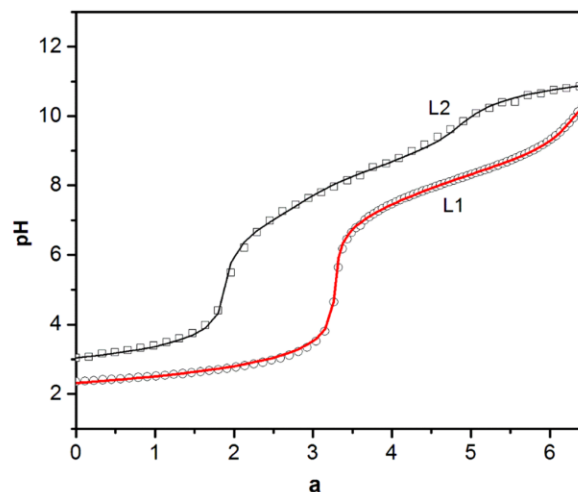


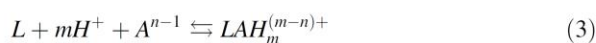
Fig. 2 Titration curves of aromatic derivatives L1 and L2, experiment carried out at 298 K in 0.1 NaCl as supporting electrolyte

Benzyl Spiramycin derivative (**L2**) was slightly soluble in water, so potentiometric experiments were performed in a 90:10 methanol–water mixture. The titration curve (Fig. 2) showed a buffer region between a = 2 and a = 5 that corresponds to the consumption of three protons. Adjusting this curve in hyperquad gives three pKa values: 8.98, 8.25 and 6.98.

Nucleotide recognition studies of spiramycin

The association constants of anions with differently protonated forms of Spiramycin derivatives were determined by potentiometric titrations of their mixtures (typically 2 mM) and sodium salts of anions applied in the range 2–6 mM in the presence of 0.1 M NaCl as a background electrolyte. The fitting of the titration curves allows the determination of the overall stability constants defined by Eq. (2), which correspond to reaction (3):

$$\beta = \frac{[LAH_m]}{[L][A^-]^n[H^+]^m} \quad (2)$$



The stepwise constants K_{ij} which correspond to the complex formation between individual forms of the receptor (LH_i) and the anion (AH_j), where $i + j = n$, can be calculated from β_{11n} values with known protonation constants of both reactants. To apply this definition, we assumed that the anion complexation does not change the protonation pattern of the host or guest. Accordingly, the location of the protons in the complexes was assumed to be regulated by the basicity of the interacting species.

Stepwise association constants are collected in Table 1. For pyrophosphate $[P_2O_5]^{4-}$, affinity constants for complexes formed between the diprotonated Spiramycin, $[H_2L]^{2+}$, with AH^{3-} , AH_2^{2-} , AH_3^{-} species of the anion were determined. The highest affinity constant was observed for the complex formed between the dicationic Spiramycin with the deprotonated form of the anion (A^{4-}), then the stability constants values decrease with the reduction of the anion's total charge as would be expected for an interaction of electrostatic nature.

Examination of the complex stability constants listed in Table 1 reveals that both HL^+ and H_2L^{2+} interact with ATP^{4-} , ADP^{3-} and AMP^{2-} . The complexes formed with H_2L^{2+} has a slightly higher stability constant due the increase of positive charge over the receptor. However, neither HL^+ or H_2L^{2+} show selectivity for any of the studied nucleotides. In contrast, different trends are observed for the protonated forms of anions. In particular, while protonation of ATP^{4-} produces a slight reduction of the stability constant, a 10-fold and 100-fold increase of the stability constant are observed for complexes that involve H_2AMP and H_2ADP^- , respectively. According to the literature [20], the first protonation of the nucleotides occurs on the terminal phosphate group, while the second protonation occurs on the adenine ring. Then, is reasonable to think that the formation of P-OH groups increases the complex stability due its capacity to establish hydrogen bonds, as it has been observed for other receptors [21].

From the stepwise constants, it is difficult to establish the selectivity order due to several-overlapped protonation equilibria present in the solution. A better alternative is the use of the classical conditional effective stability constants [22], defined, at a certain pH value, according to Eq. 4 (charges omitted):

$$K_{eff} = \frac{\sum([LAH_{i+j}])}{(\sum[LH_i])(\sum[AH_j])} \quad (4)$$

where $\Sigma[AH_j]$ is the summation of the concentrations of the free substrate of all species present in solution at a certain pH value, $\Sigma[LH_i]$ is the summation of the concentration of all species of free receptor at a certain pH value, and $\Sigma[LAH_{i+j}]$ is the summation of the concentration of all species of the adduct at a certain pH value. The conditional constants were calculated with HySS 2009 free software.

Figure 3 shows the logarithms of the effective constant as a function of pH for the association between Spiramycin with the adenine nucleotides and pyrophosphate. Compared with other natural or artificial polyamine receptors, Spiramycin binds nucleotide at strength similar to that reported for linear or macrocyclic polyamines [23]. The typical selectivity trend is $ATP > ADP > AMP$ in almost all the reported receptors. However, our data show that

Table 1 Logarithms of the stepwise association constants of anions (A) with Spiramycin (**L**) at 298 K in 0.1 M NaCl

Reaction	AMP ²⁻	ADP ³⁻	ATP ⁴⁻	[P ₂ O ₇] ⁴⁻
HL ⁺ + A ⁿ⁻	3.11 ± 0.01	3.24 ± 0.160	3.18 ± 0.018	ND
[H ₂ L] ²⁺ + A ⁿ⁻	3.64 ± 0.012	3.80 ± 0.009	3.65 ± 0.001	3.78 ± 0.033
[H ₂ L] ²⁺ + [AH] ⁿ⁻¹	3.73 ± 0.015	4.19 ± 0.010	3.70 ± 0.012	2.93 ± 0.024
[H ₂ L] ²⁺ + [AH ₂] ⁿ⁻²	4.48 ± 0.039	5.77 ± 0.016	3.14 ± 0.017	2.65 ± 0.051
[H ₂ L] ²⁺ + [AH ₃] ⁿ⁻³	ND	ND	ND	2.40 ± 0.097

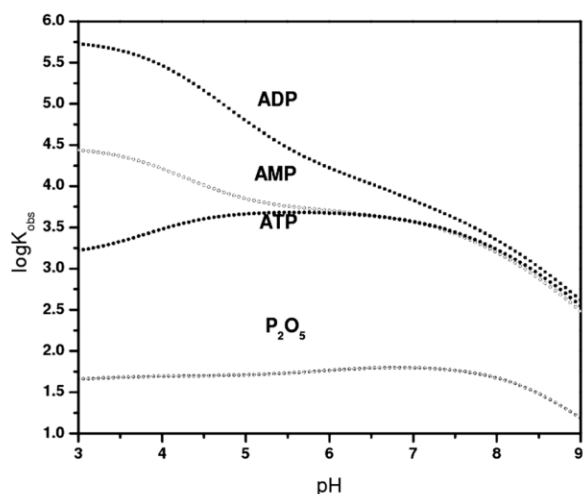


Fig. 3 Logarithms of effective stability constants (K_{obs}) for the interaction of **L** with the studied anionic guests calculated as a function of pH

Spiramycin has higher affinity by ADP over ATP and AMP with a selectivity constant ($K_{\text{ADP}}/K_{\text{ATP}} \approx 100$ and ($K_{\text{ADP}}/K_{\text{AMP}} \approx 10$ in the 3–6 pH range. This phenomenon has been observed previously by Bianchi and coworkers [24] who reported a pyrimidine derived polyammonium receptor that selectively binds to ADP over ATP and AMP in acidic media. These authors attributed the observed selectivity to the number and the organization of binding contacts in the complexes. In the same sense, our research group reported a semisynthetic receptor derived from Streptomycin that has a slight selectivity for AMP over ATP and ADP [25].

Aromatic derivatives **L1** and **L2**

Table 2 shown the stepwise association constants between adenine nucleotides and the aromatic derivatives **L1** and **L2**. For **L1**, the attachment of the pyridylmethyl group to Spiramycin structure introduces two protonatable nitrogen atoms that increase the total charge of the receptor in acidic media: **L1** is a tricationic molecule in the 3.0–6.5 pH range, while its tetracationic species exist only at pH below 3. As can be observed, the association constants between **L1** and the nucleotides are one order of magnitude smaller the those observed for Spiramycin. Figure 4 show that **L1** has a preference for ATP over ADP and AMP with selectivity constants ($K_{\text{ADP}}/K_{\text{ATP}} \approx 3$ and ($K_{\text{ADP}}/K_{\text{AMP}} \approx 4$, i.e. the strongest binding is observed with a molecule that has the higher negative charge as is expected from a pure electrostatic model. Especially for ATP^{3-} , the protonation of the nucleotide increases ~ 4 times the affinity constant of the complex formed with H_3L^{3+} . This finding

Table 2 Logarithms of the stepwise association constants of adenine nucleotide (**A**) with Pyridylmethylspiramycin (**L1**) and Benzylspiramycin (**L2**) at 298 K in 0.1 M NaCl

Reaction	AMP^{2-}	ADP^{3-}	ATP^{4-}
L1			
$\text{HL}^+ + \text{A}^{n-}$	2.67 ± 0.03	2.31 ± 0.05	2.55 ± 0.04
$[\text{H}_2\text{L}]^{2+} + \text{A}^{n-}$	2.47 ± 0.01	1.7 ± 0.11	2.39 ± 0.05
$[\text{H}_3\text{L}]^{3+} + \text{A}^{n-}$	2.48 ± 0.07	2.48 ± 0.15	2.81 ± 0.01
$[\text{H}_3\text{L}]^{3+} + \text{AH}^{n-1}$	ND ^a	2.20 ± 0.33	3.04 ± 0.04
L2^b			
$\text{HL}^+ + \text{A}^{n-}$	ND	3.76 ± 0.07	3.08 ± 0.46
$[\text{H}_2\text{L}]^{2+} + \text{A}^{n-}$	2.60 ± 0.21	3.92 ± 0.06	3.50 ± 0.31
$[\text{H}_3\text{L}]^{3+} + \text{A}^{n-}$	3.95 ± 0.05	4.82 ± 0.07	4.50 ± 0.28
$[\text{H}_3\text{L}]^{3+} + \text{AH}^{n-1}$	3.35 ± 0.05	3.66 ± 0.16	3.67 ± 0.13

^a Not detected

^b Measured in 90:10 water–methanol mixture

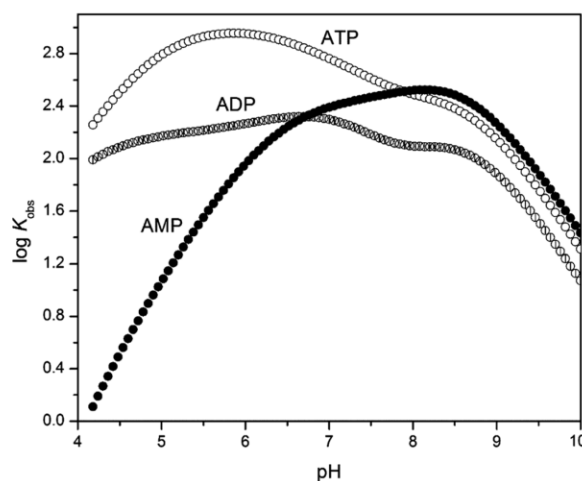


Fig. 4 Logarithms of effective stability constants (K_{obs}) for the interaction of **L1** with the studied anionic guests calculated as a function of pH

can be due a better arrangement of the anion and the receptor in the complex and due the presence of additional hydrogen bonds established between protonated phosphate group and the host molecule.

On the other hand, the observed stepwise association constants between **L2** and the nucleotides are higher than those measured for **L1** and similar to those observed for **L**. In this case, one important factor to be considered is the nature of the solvent used in the experiments with **L2**. The presence of methanol in the reaction media enhances the electrostatic interactions between **L2** and the anions due the reduction of the dielectric constant which is around 74 for a mixture of 10 % methanol in water at 298.15 K [26].

However, this factor is not sufficient to explain the observed affinity.

Figure 5 present the pH dependence of calculated K_{eff} for **L2**. This Figure shows that this receptor has a preference by ADP over ATP and AMP with selectivity constants of $(K_{\text{ADP}}/K_{\text{ATP}}) \approx 2$ and $(K_{\text{ADP}}/K_{\text{AMP}}) \approx 4$ at neutral pH.

NMR and molecular modelling studies

^1H and ^{31}P NMR experiments were conducted to determine the specific groups involved in the complex formation between the receptor and the studied nucleotides. In a typical experiment, a 5 mM solution of ADP was titrated with a concentrated solution of Spiramycin at pH 7.00. We selected ADP because its complex with Spiramycin showed the highest stability constant. In this experiment, ADP phosphorus atoms suffered a downfield shift ($\Delta\delta(\text{P}\alpha) = 0.233$ ppm, $\Delta\delta(\text{P}\beta) = 0.564$ ppm) upon interaction with the positively charged Spiramycin. This fact indicates the presence of an electrostatic interaction in the nucleotide-receptor complex formation. This effect is originated by the reduction of electronic density over the P atoms upon the interaction of the ADP pyrophosphate moiety with the protonated amino-methyl groups of the receptor. Additionally, ADP ^1H NMR signals are slightly shifted upon complexation with Spiramycin (Fig. 6). Signal shifts were small, but similar observation has been reported in the NMR studies of the interaction between nucleotides and polyamines [24]. As Fig. 6 shows, ribose signals shifted downfield while adenine signals shifted upfield. The higher observed spectral changes are for the

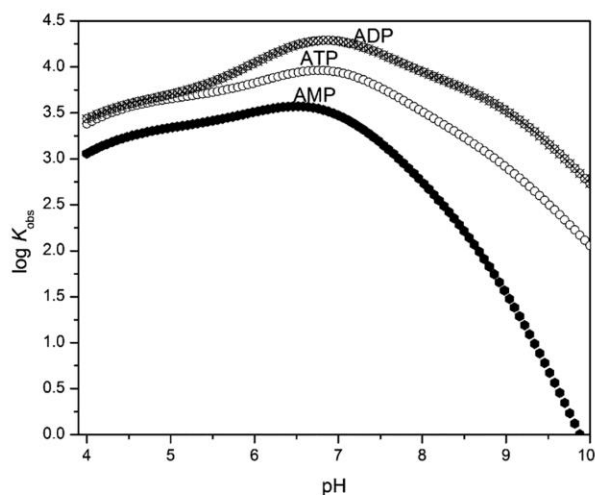


Fig. 5 Logarithms of effective stability constants (K_{obs}) for the interaction of **L2** with the studied anionic guests calculated as a function of pH

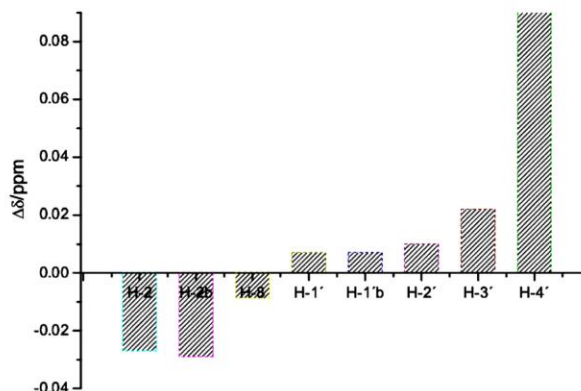


Fig. 6 Complexation Induced Shifts (CIS) observed for the signals of ADP titrated with Spiramycin. Data obtained en D_2O at pH 7.00

ribose proton located at position 4' which is close to the pyrophosphate moiety. Adenine protons suffer a small but measurable shift that indicates that moiety is also involved in the formation of the complex.

To get further information on the **L**-ADP complex, we studied its structure by molecular modelling employing OPLS3 force field as implemented in MacroModel. Calculated structure (Fig. 7b) show that the complex is formed mainly by the electrostatic interaction between the anionic phosphate moiety and the protonated aminomethyl group of forosamine. Also, a weak interaction is established by the adenine aromatic ring and the micarose structure.

The molecular model shows that ADP has the adequate molecular size to fit in the space defined by the two cationic pendent carbohydrates of Spiramycin. On the other hand, AMP is too short to fit between the carbohydrate moieties of **L** (Fig. 7a) and ATP is too long to establish enough interactions with the receptor (not shown). These observations can explain the selective binding of Spiramycin by ADP.

^1H and ^{31}P NMR titrations of **L1** with ADP and ATP were performed at pH 7.00 in D_2O to gain insight into the structure of complexes. In both cases, moderate signal shifts were observed for the terminal phosphate signals (Table 3 and supplementary material), while $\text{P}\alpha$ atoms signals remain almost without change upon complexation. As in the case of **L**, this fact indicates that electrostatic interactions are important in the formation of the complexes.

Small shifts were observed for the ^1H signals of **L1**: micaminose dimethylamine signals and aromatic protons suffer a downfield shift with the increase of nucleotide concentration, while very small changes are observed for the adenine protons signals. From this data, we realize that the interaction between the nucleotides and **L1** is mainly of electrostatic nature and occurs on micaminose and pyridilmethyl moieties. Observed chemical shifts for ATP

Fig. 7 OPLS molecular mechanics calculated structures of the complexes (a) L-AMP y (b) L-ADP. Short distances are showed. Solvent was simulated as continuum using a Poisson-Boltzmann algorithm

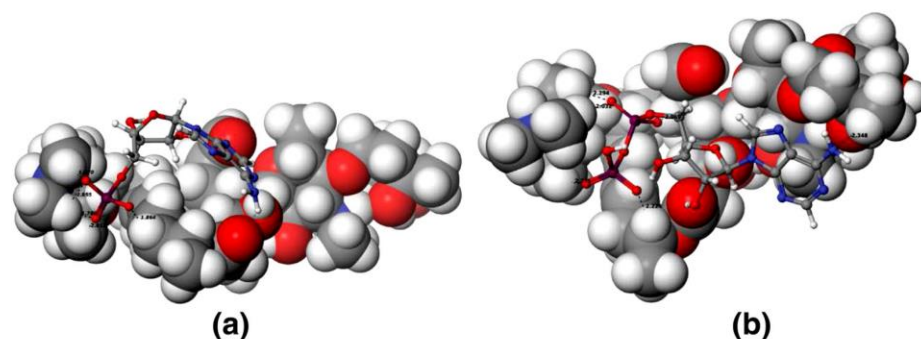
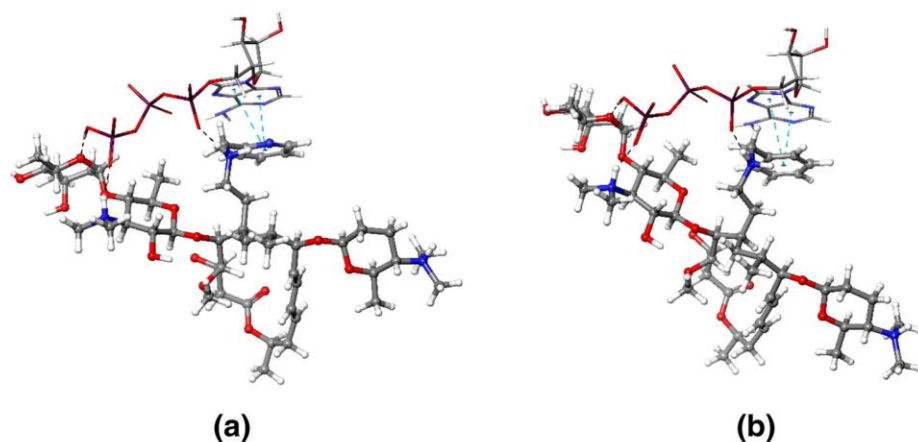


Table 3 Complexation Induced Shifts (CIS) observed for selected ^1H and ^{31}P signals of the L1-nucleotide complexes

Receptor signals						
	Aromatic protons				Micaminose	Forosamine
Labels	a	b	c	d	7', 8'	7, 8''
L1-ATP	-0.046	-0.051	-0.029	-0.051	-0.062	-0.025
L1-ADP	-0.025	-0.024	-0.02	-0.03	-0.032	-0.01
Nucleotide signals						
	Phosphate			Adenine		
Label	P α	P β	P γ	8	2	
L1-ATP	0.085	0.129	0.723	-0.002	-0.008	
L1-ADP	0.13	0.29	-	0	-0.01	

Fig. 8 Calculated structures of the complexes of ATP with (a) L1 and (b) L2. Structure were refined with OPLS3 as implemented in MacroModel



are larger than ADP in agreement with the affinity order observed for L1.

Molecular models of the complexes of L1 and L2 with ATP are presented in Fig. 8. In contrast with Spiramycin, L1 and L2 interact with the nucleotides in a different fashion. As can be observed, nucleotide phosphate moieties interact with the protonated amino groups of pyridil-methylamino and micaminose. Also, weak interactions are established between the adenine ring and the receptor aromatic groups.

Conclusions

The interaction between Spiramycin and adenine nucleotides was studied. Spiramycin binds adenine nucleotides with affinity constants of in the order of 10^3 – 10^4 and has selectivity by ADP over ATP or AMP. Spiramycin was easily modified by reductive amination to obtain tri-cationic molecules with hydrophobic surfaces. The obtained derivatives L1 and L2 showed a different selectivity pattern. ^1H and ^{31}P NMR and molecular modelling studies

show that the complexes are formed by electrostatic and hydrophobic interactions between the receptors and the studied nucleotides.

Acknowledgments K.I. Rivera Márquez glad CONACyT for her doctoral fellowship. We acknowledge LANEM by the use of the spectrometric instrumentation.

References

1. Lara, K.O., Godoy-Alcántar, C., Rivera, I.L., Eliseev, A.V., Yatsimirsky, A.K.: Complexation of dicarboxylates and phosphates by a semisynthetic alkaloid-based cyclophane in water. *J. Phys. Org. Chem.* **14**, 453–462 (2001)
2. Godoy-Alcántar, C., Rivera, I.L., Yatsimirsky, A.K.: Anion recognition by thioestrepton. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 651–654 (2001)
3. Godoy-Alcántar, C., Medrano, F., Yatsimirsky, A.K.: Affinity and enantioselectivity of Rifamycin SV towards low molecular weight compounds. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **63**, 347–354 (2009)
4. Fuentes-Martínez, Y., Godoy-Alcántar, C., Medrano, F., Dikiy, A., Yatsimirsky, A.K.: Nucleotide recognition by protonated aminoglycosides. *Supramol. Chem.* **22**, 212–220 (2010)
5. Omura, S.: *Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice*. Academic press, Cambridge (2002)
6. Johansson, A.: Automatic titration by stepwise addition of equal volumes of titrant. Part I. Basic principles. *Analyst.* **95**, 535–540 (1970)
7. Benkert, T., Franke, K.: SciDAVis Version 0.2.4. <http://scidavis.sourceforge.net>
8. Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A.: Investigation of equilibria in solution. determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta* **43**, 1739–1753 (1996)
9. Alderighi, L., Gans, P., Ienco, A., Peters, D., Sabatini, A., Vacca, A.: Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coord. Chem. Rev.* **184**, 311–318 (1999)
10. Kaminski, G.A., Friesner, R.A., Tirado-Rives, J., Jorgensen, W.L.: Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *J. Phys. Chem. B* **105**, 6474–6487 (2001)
11. Still, W.C., Tempczyk, A., Hawley, R.C., Hendrickson, T.: Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6127–6129 (1990)
12. MacroModel, version 11.1 Schrödinger, LLC: New York. <https://www.schrodinger.com/citations/> (2008)
13. Mutak, S., Marvsic, N., Kramaric, M.D., Pavlovic, D.: Semisynthetic macrolide antibacterials derived from tylosin. synthesis and structure-activity relationships of novel desmycosin analogues. *J. Med. Chem.* **47**, 411–431 (2004)
14. Bazzicalupi, C., Biagini, S., Bianchi, A., Faggi, E., Gratteri, P., Mariani, P., Pina, F., Valtancoli, B.: Binding of H⁺ and Zn (II) ions with a new fluorescent macrocyclic phenanthrolinephane. *Dalton Trans.* **39**, 10128–10136 (2010)
15. Qiang, Z., Adams, C.: Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res.* **38**, 2874–2890 (2004)
16. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients: Babic, S., Horvat, A.J., Pavlović, D.M., Kavstelan-Macan, M. *TrAC Trends Anal. Chem.* **26**, 1043–1061 (2007)
17. Sanli, S., Sanli, N., Alsancak, G.: Spectrophotometric determination of acidity constants of some macrolides in acetonitrile-water binary mixtures. *Acta Chim. Slov.* **57**, 980–987 (2010)
18. Anderegg, G., Popov, K., Pregosin, P.S.: Nitrogen-NMR Studies on the Protonation of 2-(Aminomethyl) pyridine and Tris [(2-pyridyl) methyl] amine. *Helv. Chim. Acta* **69**, 329–332 (1986)
19. Romary, J.K., Barger, J., Bunds, J.E.: New multidentate. alpha-pyridyl ligand. Coordination of bis (2-pyridylmethyl) amine with transition metal ions. *Inorg. Chem.* **7**, 1142–1145 (1968)
20. Major, D.T., Laxer, A., Fischer, B.: Protonation studies of modified adenine and adenine nucleotides by theoretical calculations and ¹⁵N NMR. *J. Org. Chem.* **67**, 790–802 (2002)
21. Albelda, M.T., Frías, J.C., García-España, E., Luis, S.V.: Studies on the interaction of phosphate anions with N-functionalised polyaza [n] paracyclophanes: the role of N-methylation. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 816–820 (2004)
22. Aguilar, J.A., Celda, B., Fusi, V., García-España, E., Luis, S.V., Martínez, M.C., Ramírez, J.A., Soriano, C., Tejero, R.: Structural characterization in solution of multifunctional nucleotide coordination systems. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**, 1323–1328 (2000)
23. Kubik, S., Reyheller, C., Stüwe, S.: Recognition of anions by synthetic receptors in aqueous solution. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **52**, 137–187 (2005)
24. Arranz-Mascarós, P., Bazzicalupi, C., Bianchi, A., Giorgi, C., Godino-Salido, M.L., Gutiérrez-Valero, M.D., Lopez-Garzón, R., Valtancoli, B.: Binding and recognition of AMP, ADP, ATP and related inorganic phosphate anions by a tren-based ligand containing a pyrimidine functionality. *New J. Chem.* **35**, 1883–1891 (2011)
25. Fuentes-Martínez, J., Gutiérrez-Rodríguez, D., García, E., Rivera-Márquez, K., Medrano, F., Torres-Angeles, O., Castillo-Vargas, E., Duque, M.B., Godoy-Alcántar, C.: Streptomycin hydrazone derivatives: synthesis and molecular recognition in aqueous solution. *Nat. Prod. Commun.* **9**, 1449–1455 (2014)
26. Albright, P.S., Gosting, L.J.: Dielectric constants of the methanol-water system from 5 to 55° I. *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 1061–1063 (1946)