



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
Facultade de Ciencias

## Grao en Química

### Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Receptores macrocíclicos orgánicos  
con resposta a estímulos para  
aplicacións biomédicas I**

**Receptores macrocíclicos orgánicos  
con resposta a estímulos para  
aplicacións biomédicas I**

**Stimuli-responsive organic  
macrocyclic receptors for biomedical  
applications I**

**Mauro Díaz Abellás**

**Curso: 2020 - 2021.**

**Convocatoria: Xullo**

*Director 1: Marcos D. García Romero*

*Director 2: Carlos Peinador Veira*

## **AGRADECIMENTOS**

En primeiro lugar, quixera comezar agradecendo aos meus directores, o Dr. Marcos D. García Romero e o Dr. Carlos Peinador Veira, por posibilitarme traballar nun proxecto tan interesante e por guiarme e axudarme no desenvolvemento deste traballo. Ademais, tamén agradecer aos integrantes do grupo QUIMOLMAT5 do CICA por facilitarme a miña iniciación no mundo da investigación. En especial, a Lili e Iago por todo o seu apoio, paciencia e axuda durante todo o traballo, e por facer que desfrutara moito do tempo pasado no laboratorio. A Alex pola súa compañía e polos bos momentos nos laboratorios do CICA.

Por outro lado, quero agradecer á miña familia por todo o seu apoio ao longo da miña vida académica. Aos meus pais e aos meus avós, por ser un exemplo para min e polo seu amor incondicional. A Antía por estar sempre nos bos e malos momentos, e por toda a axuda e cariño durante esta etapa da miña vida.

Por último, quero dar as grazas as miñas compañeiras e compañeiros por todo o vivido nestes 6 longos anos de carreira.



## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS

<b>8MPS</b>	8-metoxipsoraleno
<b>Bu<sub>4</sub>NCI</b>	Cloruro de tetrabutilamonio
<b>cat</b>	Cantidad catalítica
<b>CDC</b>	<i>Constitutional Dynamic Chemistry</i> (Química Dinámica Constitucional)
<b>COSY</b>	<i>COrrrelation SpectroscopY</i> (Espectroscopía de Correlación)
<b>δ</b>	Desplazamiento químico
<b>d</b>	Dobrete
<b>dd</b>	Dobre dobrete
<b>DA</b>	Dialdehido
<b>DCvC</b>	<i>Dynamic Covalent Chemistry</i> (Química Covalente Dinámica)
<b>DEPT</b>	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (Mellora sen Distorsión por Transferencia de Polarización)
<b>DH</b>	Dihidrazona
<b>DH<sub>p</sub></b>	Dihidrazona protexida
<b>eq</b>	Número de equivalentes
<b>EXSY</b>	<i>Exchange spectroscopY</i> (Espectroscopía de intercambio)
<b>ΔG</b>	Variación na Enerxía libre de Gibbs
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Correlación Heteronuclear de Enlace Múltiple)
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia)
<b>HPLC-MS</b>	" – <i>Mass Spectrometry</i> (" – Espectrometría de Masas)
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> (Correlación Heteronuclear dun Único Cuanto)
<b>HR-ESI-MS</b>	<i>High Resolution ElectroSpray Ionization Mass Spectroscopy</i> (Espectroscopía de masas de alta resolución con ionización por electrospray)
<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>K<sub>a</sub></b>	Constante de acidez
<b>m</b>	Multiplete
<b>MIMs</b>	<i>Mechanically Interlocked Molecules</i> (Moléculas Enlazadas Mecanicamente)
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de Masas)
<b>m/z</b>	Relación masa/carga
<b>NOESY</b>	<i>Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY</i> (Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser)
<b>NPX</b>	Naproxeno
<b>q</b>	Cuadruplete
<b>RB</b>	<i>red box</i>
<b>RB<sub>F</sub></b>	<i>red box</i> funcionalizada
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Resonancia Magnética Nuclear de protón
<b>s</b>	Singulete
<b>S<sub>N</sub>2</b>	Reacción de substitución nucleófila bimolecular
<b>t</b>	Triplete
<b>TFA</b>	<i>Trifluoroacetic acid</i> (ácido trifluoroacético)
<b>TH</b>	Trihidrazona
<b>TH<sub>p</sub></b>	Trihidrazona protexida
<b>t<sub>R</sub></b>	Tempo de retención
<b>λ</b>	Lonxitude de onda

## RESUMO

A síntese de receptores moleculares con capacidade de complexación ten un gran interese dentro da Química Supramolecular, e as súas aplicacións esténdense a outras áreas. Así, por exemplo, son especialmente prometedoras as aplicacións dos sistemas receptor-substrato no eido da biomedicina onde, grazas á súa biocompatibilidade, e a propiedades como a capacidade de autoensamblaxe ou de resposta a estímulos, serven como base para o desenvolvemento de sistemas de liberación controlada de fármacos.

O ciclofano tetracatiónico *blue box* é un dos receptores máis estudados ao ter unhas características xeométricas e electrónicas que lle permiten complexar substratos aromáticos  $\pi$ -excedentes. Sen embargo, a súa síntese non é eficiente, o que levou á procura de novos macrociclos con propiedades semellantes e procesos sintéticos máis prácticos e/ou con mellores rendementos. Para isto foi moi importante o paso do control cinético tradicional ao termodinámico. Un exemplo destes novos macrociclos é o análogo acil hidrazona, coñecido como *white box*, obtido mediante química covalente de iminas e co emprego dunha plantilla. Seguindo esta liña de investigación tamén se conseguiu obter un análogo hidrazona, a *red box*, prescindindo do uso da plantilla e unicamente a través da formación de enlaces covalentes imínicos, resultando nun proceso sintético eficiente e sinxelo que, a pesar de rexerse polo control cinético, amosa tamén as vantaxes do control termodinámico.

Este traballo céntrase na síntese e purificación do macrociclo *red box* e dun análogo funcionalizado do mesmo, para posteriormente, no Traballo de Fin de Grao de Bioloxía, levar a cabo un estudo de citocompatibilidade ante as prometedoras aplicacións destes ciclofanos no eido da biomedicina. Ademais, tamén se realizou un estudo preliminar da capacidade de este tipo de receptores para formación de complexos de inclusión cos substratos aromáticos de interese farmacolóxico naproxeno e o 8-metoxipsoraleno.

## PALABRAS CHAVE

Química supramolecular, química receptor-substrato, química covalente dinámica, macrociclos, ciclofano.

## RESUMEN

La síntesis de receptores moleculares con capacidad de complejación tiene un gran interés dentro de la Química Supramolecular, y sus aplicaciones se extienden a otras áreas. Así, por ejemplo, son especialmente prometedoras las aplicaciones de los sistemas receptor-sustrato en el campo de la biomedicina donde, gracias a su biocompatibilidad, y a propiedades como la capacidad de autoensamblaje o de respuesta a estímulos, sirven como base para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos.

El ciclofano tetracatiónico *blue box* es uno de los receptores más estudiados, al tener unas características geométricas y electrónicas que le permiten complejar sustratos aromáticos  $\pi$ -excedentes. Sin embargo, su síntesis no es eficiente, lo que llevó a la búsqueda de nuevos macrociclos con propiedades semejantes y procesos sintéticos más prácticos y/o mejores rendimientos. Un ejemplo de estos nuevos macrociclos es el análogo acil hidrazona, conocido como *white box*, obtenido mediante química covalente de iminas y con el empleo de una plantilla. Siguiendo esta línea de investigación también se consiguió obtener un análogo hidrazona, la *red box*, prescindiendo del uso de la plantilla, y únicamente a través de la formación de enlaces covalentes imínicos. Esto resulta en un proceso sintético eficiente y sencillo que, a pesar de regirse por el control cinético, muestra también las ventajas del control termodinámico.

Este trabajo se centra en la síntesis y purificación del macrociclo *red box* y de un análogo funcionalizado del mismo, para posteriormente, en el Trabajo de Fin de Grado de Biología, llevar a cabo un estudio de citocompatibilidad ante las prometedoras aplicaciones de estos ciclofanos en el campo de la biomedicina. Además, también se realizó un estudio preeliminar de la capacidad de este tipo de receptores para la formación de complejos de inclusión con los sustratos aromáticos de interés farmacológico naproxeno y 8-metoxipsoraleno.

## PALABRAS CLAVE

Química supramolecular, química receptor-sustrato, química covalente dinámica, macrociclos, ciclofano.

## ABSTRACT

The synthesis of molecular receptors with complexation capacity is of great interest within Supramolecular Chemistry, and its applications extend to other areas. Thus, for example, the applications of host-guest systems in the field of biomedicine are particularly promising where, thanks to their biocompatibility, and to properties such as the ability to self-assemble or stimuli responsiveness, serve as a basis for the development of controlled drug release systems.

The tetracationic cyclophane *blue box* is one of the most studied hosts, having geometric and electronic characteristics that allow it to complex  $\pi$ -electron rich aromatic guests. However, its synthesis is not efficient, which led to the search for new macrocycles with similar properties and more practical synthetic processes and/or better yields. An example of these new macrocycles is the acyl hydrazone analogue, known as *white box*, obtained by imine covalent chemistry and with the use of a template. Following this line of research, it was also possible to obtain a hydrazone analogue, the *red box*, without the use of the template, and only through the formation of iminic covalent bonds, resulting in an efficient and simple synthetic process that despite being under kinetic control, it also shows the advantages of thermodynamic control.

This project focuses on the synthesis and purification of the *red box* macrocycle and a functionalized analogue of it, for later, in the Biology Degree Final Project, carry out a cytocompatibility study for the promising applications of these cyclophanes in the field of biomedicine. In addition, a preliminary study was also conducted on the capacity of this type of receptor for the formation of inclusion complexes with aromatic substrates of pharmacological interest naproxen and 8-methoxypsoralen.

## KEY WORDS

Supramolecular chemistry, host-guest chemistry, dynamic covalent chemistry, macrocycles, cyclophane.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Química Supramolecular .....	1
1.2. Química receptor-substrato.....	2
1.3. Química covalente dinámica (DCvC). .....	3
1.5. Antecedentes: Os ciclofanos <i>blue box</i> e <i>white box</i> .....	6
1.6. Aplicacións biomédicas dos receptores moleculares. ....	8
OBJECTIVOS .....	10
2. RESULTADOS E DISCUSIÓN.....	11
2.1. Síntese e caracterización dos <i>Building Blocks</i> .....	11
2.1.1. Síntese do Dialdehido (DA <sup>2+</sup> ).....	11
2.1.2. Síntese da Dihidrazona (DH <sup>2+</sup> ) .....	15
2.1.3. Síntese da Trihidrazona (TH <sup>3+</sup> ).....	17
2.2. Síntese e caracterización dos Macrociclos.....	18
2.2.1. Ensamblaxe e purificación do macrociclo <i>red box</i> (RB·4X).....	18
2.2.2. Ensamblaxe e purificación do macrociclo <i>red box</i> funcionalizado (RB <sub>F</sub> ·5X).....	21
2.3. Estudo dos complexos de inclusión.....	24
2.3.1. Complexo NPX⊂RB <sup>4+</sup> .....	25
2.3.2. Complexo 8MPSC⊂RB <sup>4+</sup> .....	26
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	28
3.1. Procedementos .....	28
3.2. Síntese dos Compoñentes .....	28
3.2.1. Síntese do dialdehido (DA·2Br).....	28
3.2.2. Síntese da dihidrazona(DH·2Br) .....	29
3.2.3. Síntese da trihidrazona (TH <sub>P</sub> ·3Br).....	30
3.3. Síntese e purificación dos macrociclos .....	31
3.3.1. Ensamblaxe e purificación do macrociclo <i>red box</i> (RB·4X).....	31
3.3.2. Ensamblaxe e purificación do macrociclo funcionalizado (RB <sub>F</sub> ·5X) .....	32
3.4. Estudo dos complexos de inclusión.....	33
3.4.1. Complexo NPX⊂RB <sup>4+</sup> .....	34
3.4.2. Complexo 8MPSC⊂RB <sup>4+</sup> .....	34
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA .....	38
ANEXOS .....	41



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Química Supramolecular

En 1978 Jean Marie Lehn definiu a química supramolecular como “*a química das ensamblaxes moleculares e do enlace intermolecular*”. Referiuse a ela tamén como a “*química máis alá das moléculas*” entendendo as supramoléculas como “*entidades complexas e organizadas que resultan da asociación de dúas ou máis especies químicas mediante forzas intermoleculares*”.<sup>1</sup> Entre as forzas intermoleculares, que presentan as supramoléculas, destacan as forzas de Van der Waals, as interaccións  $\pi$ - $\pi$  e  $C-H\cdots\pi$ , o enlace de hidróxeno, o efecto hidrofóbico ou as interaccións electrostáticas.<sup>2</sup> De este xeito, a síntese supramolecular (autoensamblaxe) é un proceso dinámico, debido a que as forzas “non covalentes” son febles, establecéndose un equilibrio entre os produtos e os materiais de partida.

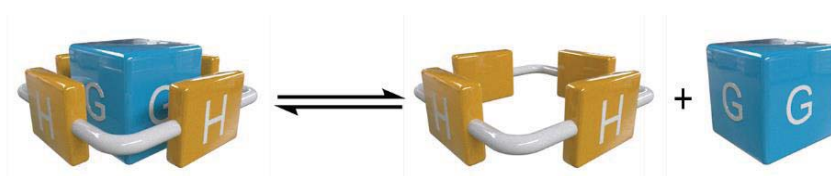
En consecuencia, a base da química supramolecular son os procesos de autoensamblaxe e o recoñecemento molecular,<sup>3</sup> polo que para o seu desenvolvemento foi moi importante o progreso na química macrocíclica sintética. Tamén se debe ter en conta como un importante antecedente as ideas seminais de Emil Fischer sobre recoñecemento molecular, o denominado principio *lock and key*, que establecía xa en 1894 a necesidade dunha complementariedade estrutural na unión supramolecular entre as enzimas e os seus substratos. Sen embargo, os primeiros compostos macrocíclicos naturais capaces de recoñecer moléculas non se coñeceron ata os anos 50, cando se estudaron, por exemplo, as ciclodextrinas ou a valinomicina. En 1967 Charles Pedersen obtivo as primeiras macromoléculas artificiais que amosaban a capacidade de recoñecemento molecular, uns poliéteres macrocíclicos coñecidos como “éteres coroa”. Estes estudos abriron novas liñas de investigación co obxectivo de sintetizar macrociclos con características similares. Un exemplo disto, é a obtención en 1969 dos primeiros criptandos (poliéteres macrobíclicos), por parte de Lehn e os seus colaboradores, capaces de complexar distintos catións metálicos. Así mesmo, grazas aos descubrimentos de Charles Pedersen, xurdiu a química receptor-substrato (ou *host-guest*) da man de Donald Cram, unha nova área de investigación que levou á síntese de novos contenedores orgánicos, chamados esferanos e cavitandos, que presentan cavidades que poden conter catións metálicos ou pequenas moléculas orgánicas. A disciplina da química supramolecular quedou completamente establecida no intre en que Lehn propuxo ese mesmo termo, agrupando todas estas novas áreas en desenvolvemento. Por todos estes novidosos estudos, en 1987, Lehn, Pedersen e Cram recibiron o Premio Nobel de Química.<sup>4, 5, 30</sup>

Durante as décadas seguintes e ata a actualidade seguiuase investigando na síntese de novos compostos macrocíclicos (cucurbiturilos, calixarenos, pilarenos, etc.), e as súas aplicacións en relación cos procesos de autoensamblaxe e recoñecemento molecular.<sup>5</sup> A química supramolecular,

además, impulsou unha gran transformación na síntese química clásica a dous niveis: na utilización práctica de *síntese mediante autoensamblaxe*, que deu acceso a numerosas supramoléculas, tanto discretas como poliméricas; e na *síntese molecular con asistencia supramolecular*, tamén referida como autoensamblaxe seguido de modificación covalente - que se empregou para obter receptores e contedores moleculares complexos, así como de *MIMs* (*Mechanically Interlocked Molecules*), como por exemplo rotaxanos e catenanos.<sup>6</sup> Nun principio a química supramolecular centrouse na preorganización para o deseño de receptores moleculares, con funcións de recoñecemento, catálise ou transporte, pero máis adiante avanzou cara o deseño de estruturas altamente organizadas capaces de autoensamblarse e comportarse como sistemas programados, e, nalgúns casos, cunha integración funcional dos compoñentes activos, co obxectivo de fabricar máquinas nanométricas.<sup>3</sup> Como culminación de esta evolución, no 2016, Ben Feringa, J. Fraser Stoddart e Jean-Pierre Sauvage recibiron o Premio Nobel de Química polos seus traballos na fabricación do primeiro “motor molecular”, e na síntese de rotaxanos e catenanos, respectivamente.<sup>31</sup>

## 1.2. Química receptor-substrato

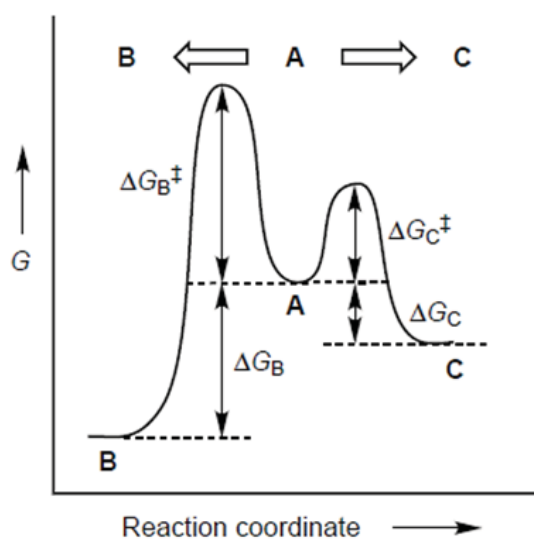
Donald Cram foi quen formalizou a área coñecida coma química receptor-substrato (ou *host-guest*), tras o seu descubrimento de *receptores* sintéticos e naturais con capacidade de recoñecemento específico de diversos *substratos*. A base deste recoñecemento asociouse ao principio “*lock and key*” proposto por Fischer, que postulaba que o mecanismo de recoñecemento dun substrato por parte dunha enzima é comparable a un sistema dunha chave e unha ferradura. Así, os termos química receptor-substrato e química do recoñecemento molecular considéranse, habitualmente, como termos sinónimos.<sup>4</sup> O receptor soe ser unha molécula de gran tamaño ou un agregado de moléculas, como por exemplo unha enzima ou un composto cíclico sintético, que posúe unha cavidade central de tamaño variable. Por outra banda, o substrato pode ser un catión monovalente, un anión inorgánico, ou moléculas máis complexas como hormonas ou neurotransmisores. Máis formalmente, defínese o *receptor* como unha entidade molecular que posúe sitios de unión converxentes (p.e. doadores de enlaces de hidróxeno, átomos doadores básicos de Lewis, etc.), mentres que o *substrato* ten lugares de unión diverxentes (p.e. aniós haluro aceptores de enlaces de H, átomos aceptores ácidos de Lewis, etc.). A interacción receptor-substrato implica así unha organización estereoelectrónica complementaria dos sitios de unión de ambos compoñentes baixo estrito control termodinámico (*Esquema 1*).<sup>7</sup>



**Esquema 1:** Representación do equilibrio de disociación receptor-substrato (host-guest) dun complexo de inclusión.

### 1.3. Química covalente dinámica (DCvC).

Os procesos de autoensamblaxe non están restrinxidos ao uso de interaccións intermoleculares febles, xa que a única restrición é a necesidade da existencia de equilibrio entre materiais de partida e produtos. Así, na DCvC agrúpanse aquelas reaccións que se basean na ruptura e formación reversibles de enlaces covalentes e que, polo tanto, están baixo un control termodinámico. Así, existe a posibilidade de “corrección de erros” nas estruturas formadas, e a distribución dos produtos depende unicamente da estabilidade relativa destes ( $\Delta G^\circ$ ). En contraposición, nas reaccións baixo control cinético, a proporción dos produtos finais dependerá da estabilidade dos estados de transición que levan a estes ( $\Delta G^\ddagger$ ).<sup>6</sup> Na **Figura 1** represéntase graficamente a diferenza entre estes dous tipos de procesos: as reaccións que están baixo control cinético ( $A \rightarrow C$ ), e as que están baixo control termodinámico ( $A \rightarrow B$ ). No primeiro caso, a irreversibilidade fai que se favorezan os produtos cun estado de transición máis estable (no exemplo  $\Delta G_C^\ddagger < \Delta G_B^\ddagger$ , favorece a formación de **C**). Como xa mencionamos anteriormente, a reversibilidade dos procesos de DCvC vai a implicar unha distribución dos produtos que depende unicamente da súa estabilidade ( $\Delta G_B < \Delta G_C$ , favorece a **B**).<sup>6</sup>



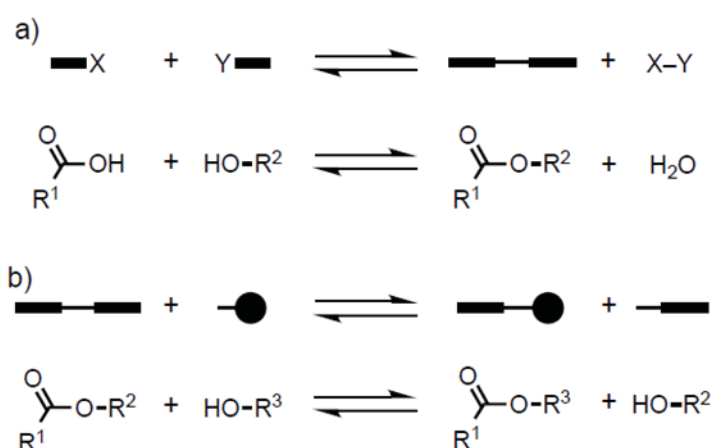
**Figura 1:** Perfil de enerxías libres para procesos baixo control cinético ou termodinámico.<sup>6</sup>

A química covalente dinámica evolucionou grazas a incorporar a capacidade dinámica da química supramolecular, e co obxectivo de solucionar os problemas de labilidade cinética de moitas supramoléculas en disolución, que dificultan o seu illamento e caracterización. Deste xeito, a química supramolecular é dinámica no ámbito máis aló das moléculas, a través de interaccións non covalentes, mentres que a DCvC é dinámica a nivel molecular grazas á formación e ruptura reversible de enlaces covalentes. Ambas permiten cambios en compoñentes moleculares e supramoleculares e, polo tanto, agrúpanse baixo o termo de Química Dinámica Constitucional (CDC) definida por Lehn.<sup>8</sup> Sen embargo, no caso da DCvC, a menor labilidade cinética vai moitas

veces asociada á necesidade de uso de catalizadores que permitan acadar rapidamente a situación de equilibrio.<sup>6,8</sup>

Para que unha reacción covalente reversible sexa adecuada para a DCvC é necesario considerar varios factores: 1) o tempo de vida dos enlaces covalentes debe estar no rango  $1 \text{ ms} < t < 1 \text{ min}$  – para poder manter estruturas moleculares que poidan ser detectables e illables, e seguir tendo un comportamento dinámico –; 2) as condicións de reacción deben ser suaves e adecuadas aos grupos funcionais presentes nos *bloques de construción (building blocks)* e prantillas (*templates*)– os medios acuosos e biocompatibles son preferidos para as posibles aplicacións das biomoléculas – e 3) o proceso de intercambio debe poder deterse facilmente, para poder illar os produtos desexados – as formas de deter estes procesos inclúen o control por  $T^a$ , o control por pH, a eliminación do catalizador ou a captura do produto mediante oxidación/reducción.<sup>8</sup> O control destes factores permite axustar a distribución dos produtos, debido a que ten un importante efecto sobre a  $\Delta G^\circ$  do proceso.<sup>6</sup>

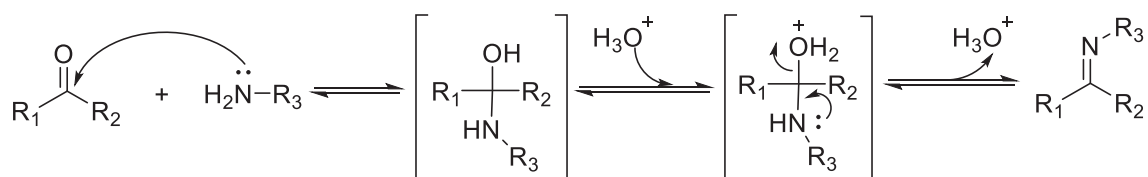
De xeito xeral, poden distinguirse dous tipos de reaccións covalentes dinámicas (*Esquema 2*): a) as que implican formación ou rotura dun novo tipo de enlace; e b) as reaccións de intercambio directo, onde reactivos e produtos teñen o mesmo tipo de enlace. Entre os enlaces máis empregados aquí están os enlaces C-C, C-N, C-O, C-S, S-S ou B-O. Algúns destes enlaces son direccionais e asimétricos (p.e. os enlaces C=N ou B-O), e requiren a combinación de dous compoñentes. Por outra banda, temos enlaces simétricos (p.e. C=C ou C≡C) que permiten o intercambio.<sup>8</sup>



**Esquema 2.** tipos de reaccións covalentes dinámicas: a) Formación/ruptura dun novo enlace covalente (p.e. formación dun éster); b) Reacción de intercambio directo (p.e. transesterificación).<sup>6</sup>

#### 1.4. Química covalente de iminas.

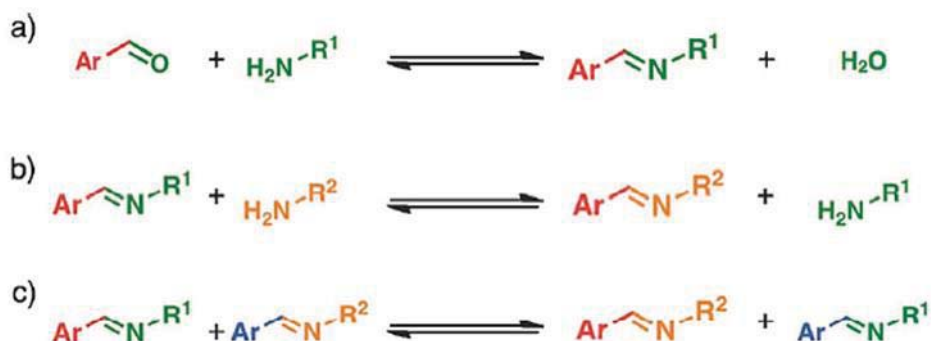
Dentro da DCvC, unha das reaccións máis empregadas é a de formación de iminas (xunto ca de oximas e hidrazonas), que consiste na condensación dun grupo carbonilo e unha amina primaria para dar lugar, de xeito reversible, á formación dun enlace C=N (*Esquema 3*). Este tipo de compostos con enlace imina coñécense tamén como bases de Schiff, en honor a Hugo Schiff descubridor da reacción en 1864.<sup>9</sup> A definición destes compostos, de fórmula  $R_1R_2C=NR_3$ , implica que  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  sexan un grupo arilo, alquilo ou un átomo de hidróxeno.<sup>10</sup>



**Esquema 3:** Mecanismo de reacción da formación do enlace imina.

A reacción de formación de estes compostos é unha condensación na que se libera H<sub>2</sub>O, lévase a cabo en condicións de refluxo e baixo catálise ácida, para que o grupo carbonilo sexa máis electrófilo ante o ataque nucleófilo da amina.<sup>10,11</sup> Ao tratarse dun equilibrio, modificando as condicións da reacción pódese cambiar a dirección cara a formación de produtos ou reactivos. A eliminación da auga formada (p.e. mediante unha destilación azeotrópica, ou engadindo algún axente desecante), favorece a formación da imina, mentres que a adición de auga ao medio de reacción favorece a hidrólise da imina.<sup>10</sup>

A maiores da reacción de formación/hidrólise, as iminas poden participar, normalmente, en outros dous tipos de reaccións (*Esquema 4*): reaccións de transaminación ao engadir unha amina, que resulta no intercambio dos grupos R; e reaccións de metátesis ao engadir unha segunda imina, na que tamén se intercambian os grupos R.<sup>10</sup>



**Esquema 4:** Tipos de reaccións de iminas: a) formación/hidrólise, b) intercambio e c) metátesis.<sup>10</sup>

Debido a inestabilidade hidrolítica das iminas, no eido da *DCvC* empréganse máis habitualmente análogos máis estables, como as hidrazonas ou as acil hidrazonas. Estes compostos, de fórmula  $R_1R_2C=NNR_3R_4$  e  $R_1R_2C=NNR_3C=OR_4$  respectivamente, son máis estables que as iminas debido a un efecto mesomérico que reduce a electrofilia do enlace  $C=N$ . Por isto mesmo, as hidrazonas e acil hidrazonas considéranse cinéticamente inertes baixo condicións neutras, pero, baixo catálise ácida, poden sufrir os tres tipos de reaccións das iminas xa mencionadas (*Esquema 4*).<sup>10</sup>

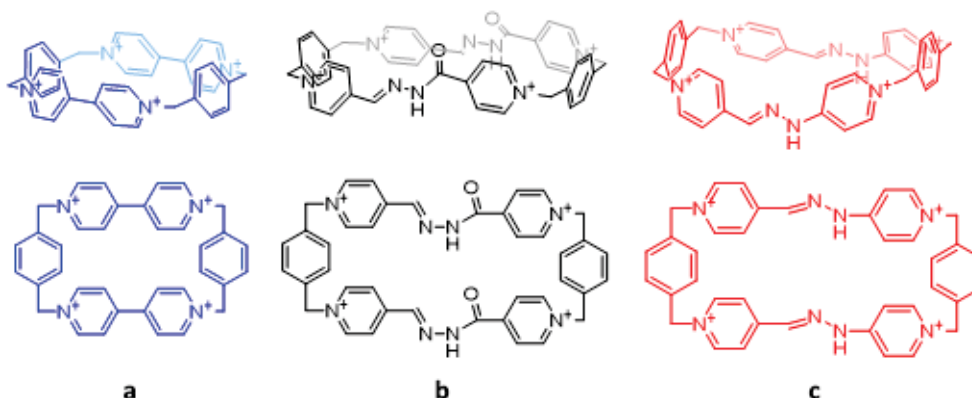
A formación de enlaces imina é amplamente empregada para a síntese de catenanos, rotaxanos ou macrociclos, sendo estes últimos o obxecto deste traballo. En moitos casos a química supramolecular asiste a esta *DCvC*, a través do emprego de *templates*, co obxectivo de preorganizar os reactivos nunha xeometría desexada, arredor dunha molécula, e favorecer a formación do enlace  $C=N$ . Así, a unión da *DCvC* e a síntese dirixida por plantilla permite a obtención dunha gran variedade de estruturas mecanicamente entrelazadas.<sup>9</sup>

### 1.5. Antecedentes: Os ciclofanos *blue box* e *white box*

Os ciclofanos, un dos tipos de macrociclos máis estudados, engloba calquera molécula cíclica formada por aneis aromáticos unidos por átomos ou cadeas ponte alifáticas.<sup>4</sup> En particular, os ciclofanos policatiónicos da familia da *blue box*, desenrolados por Stoddart *et al.* son receptores moleculares que conteñen subunidades bipyridinio  $\pi$ -deficientes, e que son capaces de complexar substratos  $\pi$ -excedentes. Dentro destes, a mencionada *blue box* ou ciclobis(paraquat-*p*-fenileno), é o máis coñecido e empregado, xogando un papel chave no desenrolo da química das *MIMs*.<sup>12</sup> Este ciclofano ten unha estrutura rectangular que consiste en dúas subunidades  $\pi$ -deficientes 4,4'-bipyridinio (lados longos), conectadas en ambos extremos a través de dúas unidades *p*-xileno (lados curtos). Estas características delimitan unha cavidade hidrofóbica e rixida, capaz de formar complexos con diversos substratos aromáticos  $\pi$ -excedentes<sup>13</sup> (**Figura 2a**).

A complexación deses substratos ten lugar a través de varias interaccións febles: interaccións dador-aceptor  $\pi$  (o substrato aromático cede densidade de carga ás unidades deficientes en densidade electrónica  $\pi$  dos lados longos); interaccións  $[C-H \cdots \pi]$  (entre os Hs do substrato e a nube  $\pi$  dos aneis fenilénicos dos lados curtos); interaccións electrostáticas ion-cuadrupolo; e forzas de Van der Waals. Tamén é destacable a importancia das interaccións solvofóbicas en medios polares, que favorecen que o substrato se estabilice no interior da cavidade, onde está mellor solvatado ca no seo da disolución.<sup>12, 14</sup> Grazas a estas propiedades, a *blue box* converteuse nun excelente receptor para substratos como os derivados da hidroquinona e resorcinol, compostos baseados no dioxinaftaleno, substratos bifenilo, indol e derivados, neurotransmisores, aminoácidos aromáticos, etc.<sup>14</sup> Ademais, a *blue box* destaca pola súa resposta a estímulos, xa que pode oxidarse e reducirse fácil e reversiblemente, o que a converteu nun bloque de construción chave

para o desenvolvemento de máquinas moleculares ou sistemas de liberación de fármacos (ver **Figura 3** en *Aplicacións biomédicas dos receptores moleculares*).



**Figura 2:** Estruturas 2D e 3D dos macrociclos *blue box* (a), *white box* (b) e *red box* (c).

Dende que Fraser Stoddart *et al.* publicaron en 1988 a síntese da *blue box*,<sup>15</sup> as condicións da reacción foron variándose co fin de mellorar o proceso, empregando *templates*, catalizadores, condicións de alta temperatura, presión, etc.<sup>12, 14</sup> Non obstante, estes métodos de síntese baixo control cinético amosaron unha gran posibilidade de mellora, co fin de acadar o control termodinámico na etapa de ciclación. Con este obxectivo, o grupo de investigación QUIMOLMAT comezou a estudar a síntese baixo control termodinámico de receptores análogos ao macrociclo, a través da coordinación de ligandos bipyridínicos a centros metálicos de Pd(II)/Pt(II), na procura de reducir os tempos de reacción e mellorar os rendementos.<sup>16</sup> En particular, no referido ao presente traballo, no ano 2019 o grupo logrou sintetizar, mediante DCvC de iminas, un análogo acil hidrazona da *blue box* que recibiu o nome de *white box* (**Figura 2b**). A síntese lévese a cabo quentando a 80 °C unha mestura equimolar de dous derivados hidrofílicos complementarios baseados en bis(piridinio)xilileno, baixo catálise ácida (TFA) e engadindo un exceso de 2,7-DHN, que actúa como *template*. Deste xeito conseguíuse obter o ciclofano con bos rendementos, e baixo control termodinámico. O macrociclo obtido amosou unha marcada resposta ao pH en medio acuoso, debido á particular alta acidez dos protóns amida da súa estrutura ( $pK_a = 8.5$ ). Consecuentemente, e debido á existencia dun isomerismo rotacional baixo condicións ácidas – con ata 3 rotámeros estables –, a *white box* amosou un comportamento dual como receptor molecular: baixo condicións ácidas é conformacionalmente flexible e responde a un modelo de axuste inducido; mentres que en condicións neutras/básicas é fixo e segue o modelo *lock & key*. Grazas ás súas propiedades este composto é capaz de formar complexos de inclusión con substratos aromáticos, ao igual ca o análogo *blue box*, a través de interaccións  $\pi$ - $\pi$ ,  $[C-H \cdots \pi]$  e, especialmente, do efecto hidrofóbico.<sup>17</sup>



Tendo en conta estes resultados e continuando con esta liña de investigación, o grupo concluíu que a eliminación dos grupos carbonilos, do enlace acil hidrazona da *white box*, non tería un efecto significativo sobre a estabilidade do ciclofano, e incluso melloraría a súa capacidade de complexar substratos aromáticos. Con isto en mente, o grupo conseguiu sintetizar un análogo hidrazona da *white box*, que foi nomeado como *red box*<sup>18</sup> (**Figura 2c**). O obxectivo do presente traballo é, obter un análogo funcionalizado da *red box*, ademais de sintetizar e purificar a *red box* para, posteriormente estudar as súas aplicacións no campo biomédico.

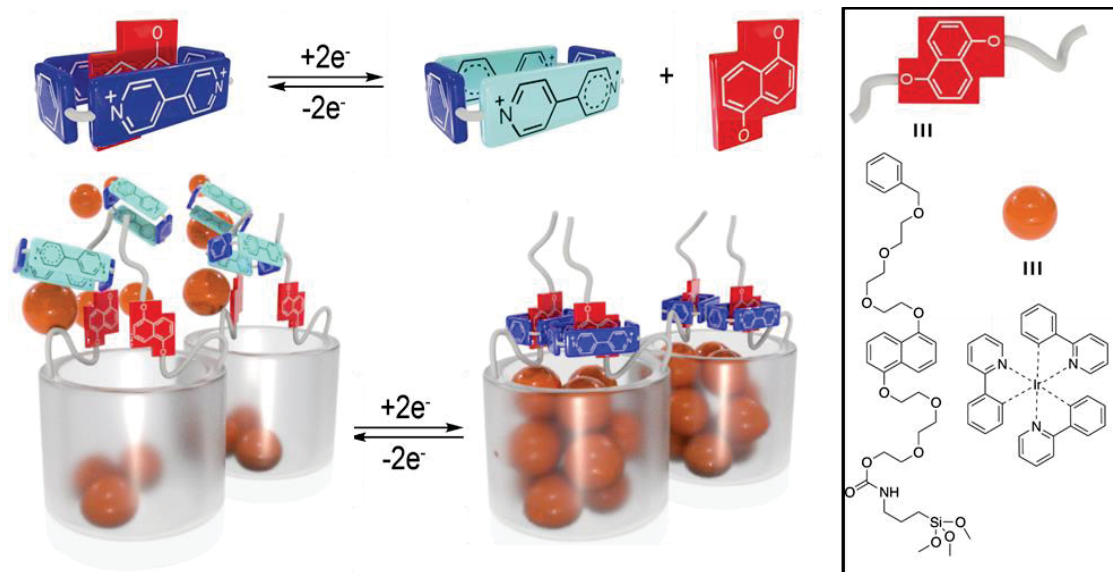
### 1.6. Aplicacións biomédicas dos receptores moleculares.

Tendo en conta o xa comentado nos apartados anteriores, é posible entrever as numerosas aplicacións e a importancia que pode chegar a ter a química supramolecular noutras áreas, como poden ser a Bioloxía, a Ciencia dos Materiais ou a Nanotecnoloxía. Nas últimas décadas, as aplicacións dos sistemas receptor-substrato en catálise, materiais funcionais, sensores e nanomedicina, entre outras, foron amplamente investigadas.<sup>5</sup> Estes sistemas amosan unha serie de vantaxes, que espertan un gran interese, entre as que destacan: I) que os métodos de síntese, a través da autoensamblaxe son sinxelos, con custes baratos e non prexudiciais co medio ambiente; II) a natureza non covalente e reversible das unións permite a disociación e reorganización do sistema con baixos custes enerxéticos, podendo darse a reciclaxe e autorreparación; III) a súa capacidade adaptativa, que permite cambios na estrutura e reordenamentos como resposta a estímulos externos do medio;<sup>19</sup> e, grazas a esta, IV) a súa capacidade de actuar como interruptores moleculares, posibilitando cambios reversibles na súa estrutura ante estímulos externos ao sistema como cambios no pH, potencial eléctrico, luz ou adición de efectores químicos. Estas modificacións reversibles poden, por exemplo, permitir a liberación ou captura controlada dun substrato, como pode ser un fármaco.<sup>20, 21, 22</sup> A maiores destas propiedades, a baixa toxicidade destes compostos reforza o interese en estudar as aplicacións destes sistemas no campo da Bioloxía.

En particular, os sistemas receptor-substrato baseados en receptores macrociclos son dos máis investigados pola súa potencialidade práctica, especialmente no eido da biomedicina. Habitualmente, algunha propiedade do receptor favorece a interacción co disolvente, mentres que as propiedades da cavidade facilitan a inclusión do substrato – o caso máis común e a inclusión dun substrato hidrofóbico na cavidade hidrofóbica, nun medio acuoso. As razóns que motivan este interese son: a súa elevada biocompatibilidade, e a capacidade de formar complexos receptor-substrato de xeito sinxelo e reversible, posibilitando o deseño de sistemas capaces de responder a estímulos. As aplicacións biomédicas máis destacables destes inclúen o transporte e liberación de fármacos (**Figura 3**), o transporte de xenos, a terapia fotodinámica (*PDT*) ou a bioimaxe.<sup>19</sup> Outras posibles aplicacións son o desenvolvemento de biomateriais poliméricos como micelas, hidroxelés



ou vesículas,<sup>23,24</sup> e, máis recentemente, na nova quimioterapia supramolecular intentando solucionar os problemas das terapias tradicionais, como pode ser a baixa solubilidade ou o baixo control da liberación do fármaco.<sup>25, 26</sup>

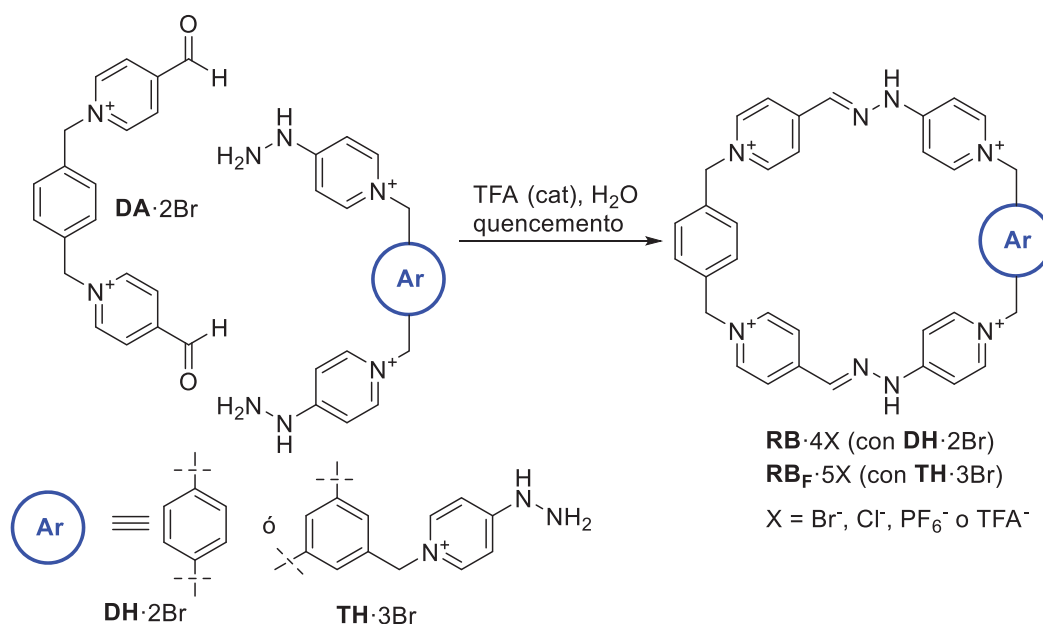


**Figura 3:** Representación esquemática dun sistema modelo para a liberación controlada de fármacos dende nanosílica porosa que utiliza a resposta estímulo da *blue box*.<sup>22</sup>

## OBXECTIVOS

Continuando coa liña de investigación do grupo QUIMOLMAT, e co obxectivo de obter receptores semellantes á *blue box*, este traballo céntrase na síntese e purificación do macrociclos *red box* e dun análogo funcionalizado do mesmo. Cabe subliñar que a *red box* foi empregada ademais nun estudo de citocompatibilidade no Traballo de Fin de Grao de Bioloxía coordinado co presente. Concretamente, os obxectivos específicos do TFG son os seguintes:

1. Síntetizar os *building blocks* Dialdehido (**DA**<sup>2+</sup>), Dihidrazona (**DH**<sup>2+</sup>) e Trihidrazona (**TH**<sup>3+</sup>), mediante reaccións de substitución nucleófila (**Esquema 5**).



**Esquema 5:** Síntese dos ciclofanos obxectivo **RB**<sup>4+</sup> e **RB<sub>f</sub>**<sup>5+</sup>.

2. Ensamblaxe do ciclofano *red box* (**RB**<sup>4+</sup>) e dun análogo funcionalizado (**RB<sub>f</sub>**<sup>5+</sup>) mediante química covalente de iminas (**Esquema 5**).

3. Purificación de ambos macrociclos mediante HPLC semipreparativa en fase reversa e caracterización mediante ESI-MS.

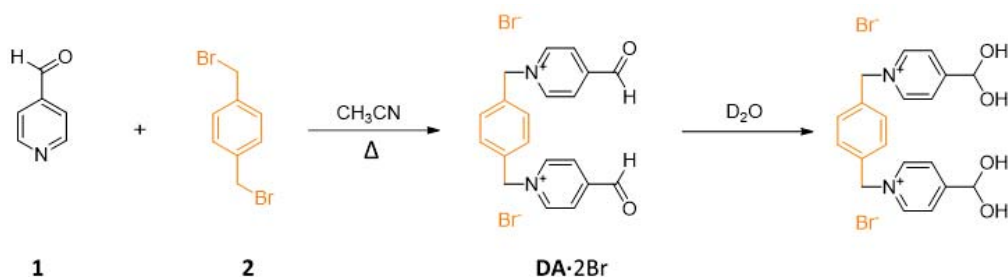
4. Caracterización estrutural de tódolos compostos obtidos mediante as técnicas de <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-RMN mono e bidimensionais.

5. Estudo cualitativo dos complexos de inclusión do macrociclo *red box* con substratos aromáticos de aplicación no campo da biomedicina: naproxeno (**NPX**) e 8-metoxipsoraleno (**8MPS**).

## 2. RESULTADOS E DISCUSIÓN

### 2.1. Síntese e caracterización dos *Building Blocks*

#### 2.1.1. Síntese do Dialdehido (DA<sup>2+</sup>).



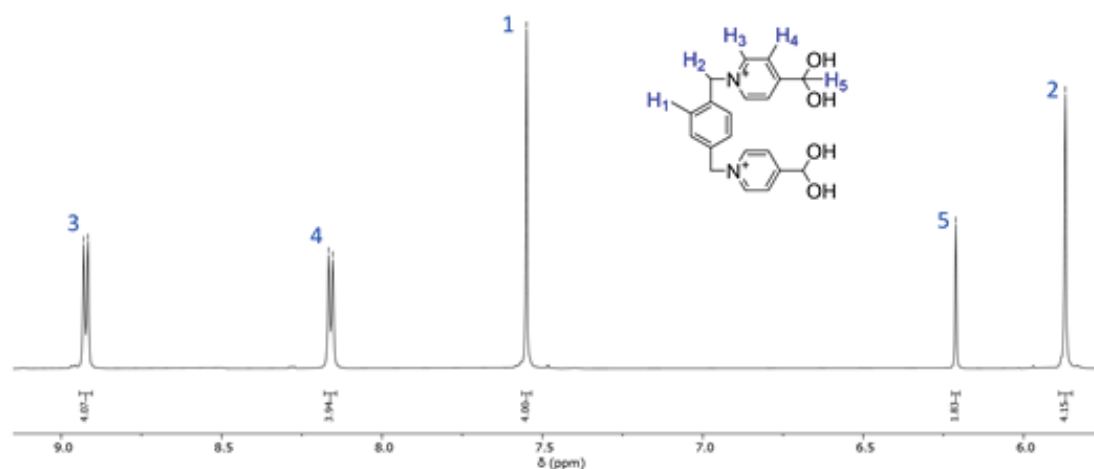
Esquema 5: Síntese do dialdehido DA·2Br

A síntese do dialdehido (DA·2Br), común ao macrociclo *Red Box* e ao análogo funcionalizado, consiste nunha reacción de substitución nucleófila bimolecular ( $S_N2$ , **Esquema 5**). O nitróxeno do 4-piridincarboxialdehido (1) ataca, nas posicións bencílicas, ao  $\alpha,\alpha'$ - dibromo-*p*-xileno (2) producíndose facilmente a substitución, debido a que os bromuros son bos grupos saíntes. Estes bromuros libéranse e quedan como contraíóns no dialdehido final. Dende o punto de vista práctico, a substitución está favorecida nun disolvente aprótico polar como é o acetonitrilo, pero a reacción da lugar a sales de piridinio que precipitan con facilidade e unha alta pureza no medio de reacción, favorecendo o seu illamento e purificación.<sup>1</sup>

A estrutura de DA·2Br caracterízase mediante técnicas de <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-RMN mono e bidimensionais. Debido á elevada electrofilia do grupo carbonilo, agudizada polo grupo piridinio, en medio acuoso (D<sub>2</sub>O) o composto atópase hidratado. Ademais, hai que ter en conta que a molécula é simétrica, polo que os espectros de RMN simplifícanse moito. Deste xeito, no espectro de <sup>1</sup>H-RMN (**Figura 4**) aparecen soamente 5 sinais, tres das cales son aromáticas e dúas alifáticas. En base ao desprazamento químico, a integración e a multiplicidade é moi sinxelo asignar as sinais do espectro. Así, das dúas alifáticas, o singulete que aparece a 5.87 ppm integrando por 4H correspóndese cos hidróxenos H<sub>2</sub> metilénicos, mentres que a 6.21 ppm aparecen os dous hidróxenos H<sub>5</sub> do grupo carbonilo hidratado. Na zona das resonancias aromáticas aparece unha sinal a 7.55 ppm, singulete por 4H, típico dos H<sub>1</sub> fenilénicos. Os dous dobretes restantes que aparecen correspóndense cos hidróxenos do anel de piridinio, e pódense diferenciar polo seu desprazamento. O nitróxeno do anel de piridinio ten carga positiva, polo que vai a tender a retirar carga e desapantallar as sinais, de maneira máis acusada nas sinais dos átomos adxacentes.

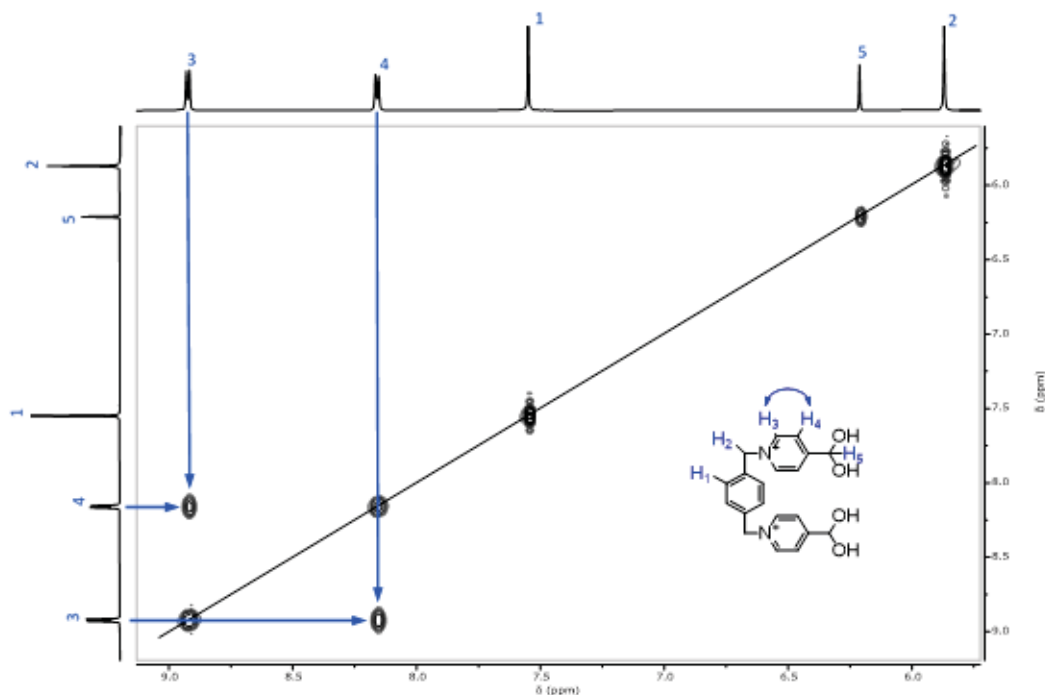
<sup>1</sup> A este respecto, tamén se debe especificar que os anións modulan a solubilidade das sales de piridinio, con aqueles pequenos e pouco polarizables facendo que a sal sexa soluble en disolventes próticos e medio acuoso (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>), e anións poliatómicos coa carga negativa moi despolarizada facendo que as sales sexan solubles en medios orgánicos (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, etc.). A excepción soe ser o anión trifluoroacetato (TFA<sup>-</sup>), que produce sales solubles.

Deste xeito, o dobrete que aparece a 8.92 ppm correspóndese aos hidróxenos en  $\alpha$  ao nitróxeno ( $H_3$ ), mentres que o dobrete a 8.16 ppm refírese aos hidróxenos en  $\beta$  ( $H_4$ ).



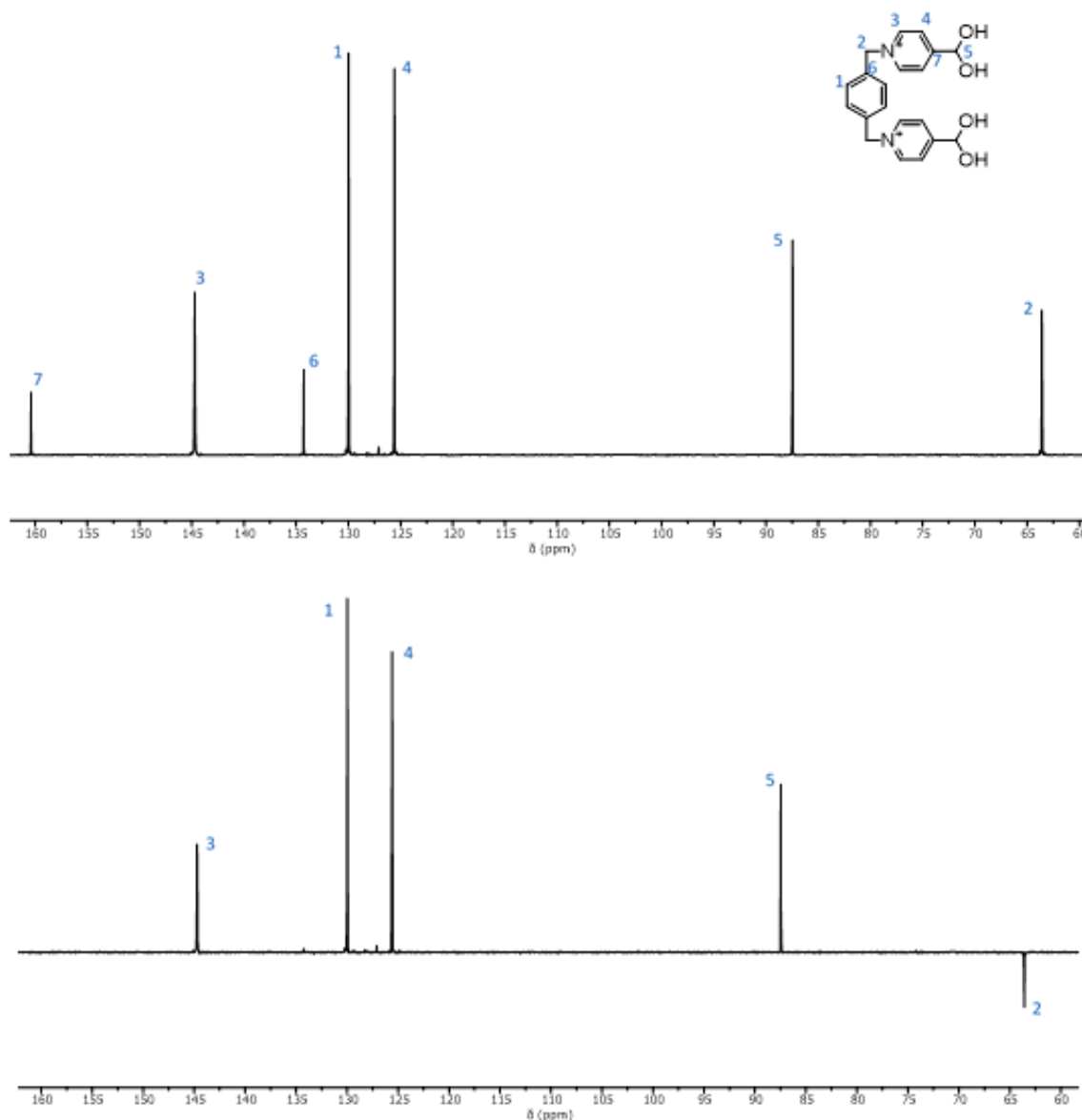
**Figura 4:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) de  $\text{DA}\cdot 2\text{Br}$ , no que se indica a asignación dos sinais a través da numeración.

Para corroborar a asignación destas sinais do anel de piridinio pódese empregar o espectro de RMN bidimensional COSY (*Figura 5*), que amosa as correlacións  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  correspondentes ao acoplamento spin-spin. Primeiro localízase a diagonal – formada polos acoplamentos dos  $^1\text{H}$  consigo mesmos – e, posteriormente, búscanse as sinais por enriba e por debaixo da diagonal, que son as que amosan os acoplamentos entre núcleos diferentes. Os protóns en  $\alpha$  e  $\beta$  do anel de piridinio dan lugar a dous puntos de cruce no espectro COSY, confirmando o acoplamento dos hidróxenos  $H_3$  e  $H_4$  que se atopan a tres enlaces de distancia.



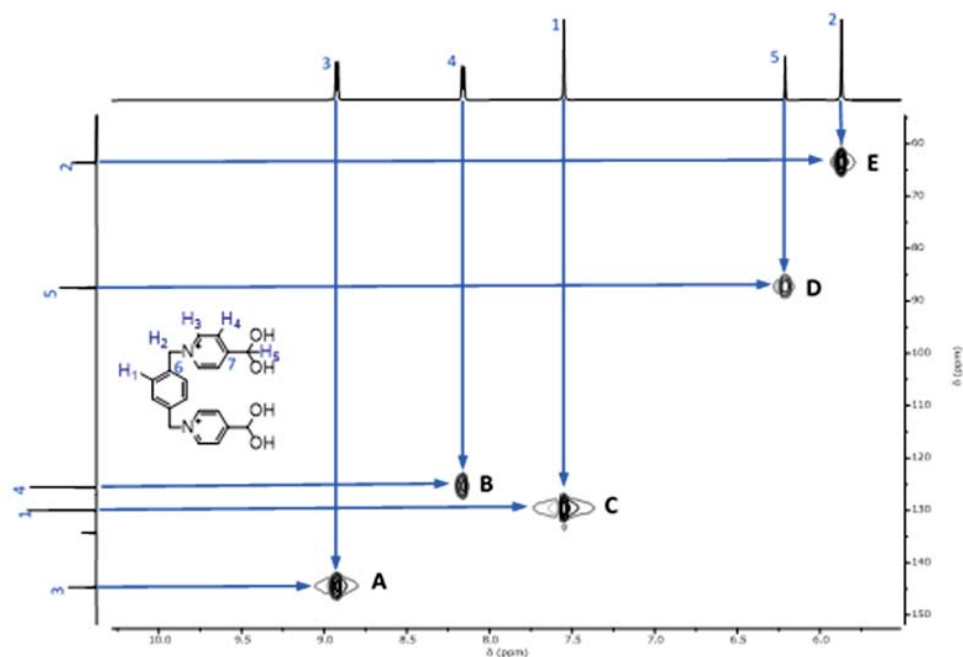
**Figura 5:** Espectro COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) de  $\text{DA}\cdot 2\text{Br}$ . As frechas indican os protóns implicados en cada unha das correlacións.

No referido ao espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (*Figura 6*) aparecen 7 sinais, cinco das cales son aromáticas e dúas son alifáticas. As sinais alifáticas asígnanse facilmente comparando co espectro DEPT (*Figura 6*) no que a única sinal correspondente a un carbono secundario é a que aparece a 63.6 ppm, e polo tanto trátase do carbono metilénico ( $\text{C}_2$ ). A outra sinal alifática a 87.4 ppm correspóndese co carbono do grupo carbonilo hidratado ( $\text{C}_5$ ).



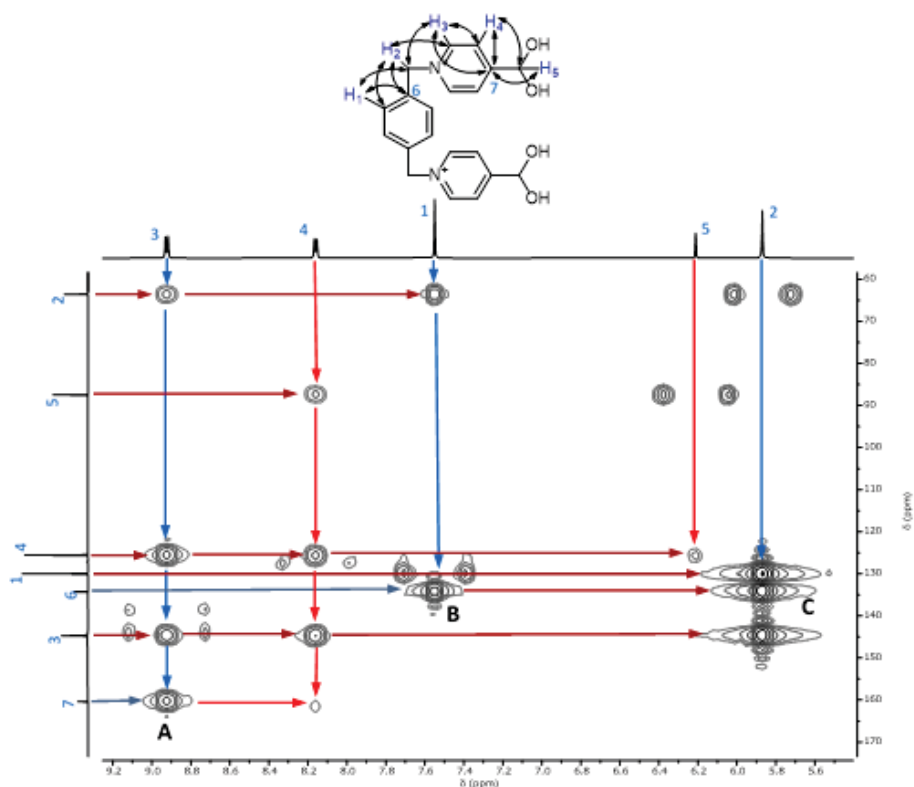
**Figura 6** Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN e DEPT ( $\text{D}_2\text{O}$ , 126 MHz) de  $\text{DA}\cdot 2\text{Br}$ , no que se indica a asignación dos sinais a través da numeración. A numeración dos C é concordante coa dos H.

Para diferenciar as sinais aromáticas emprégase o espectro bidimensional HSQC (*Figura 7*) no que se correlacionan as sinais de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  enlazados directamente. O hidróxeno  $\text{H}_1$  da lugar a un punto de cruce coa sinal de carbono a 130.0 ppm, e, polo tanto, esta sinal correspóndese coa dos carbonos primarios do anel fenilénico ( $\text{C}_1$ ). Os hidróxenos  $\alpha$  e  $\beta$  do anel de piridinio dan puntos de cruce coas sinais de carbono a 144.7 e 125.6 ppm, respectivamente, que se corresponderán con  $\text{C}_{3-4}$ .



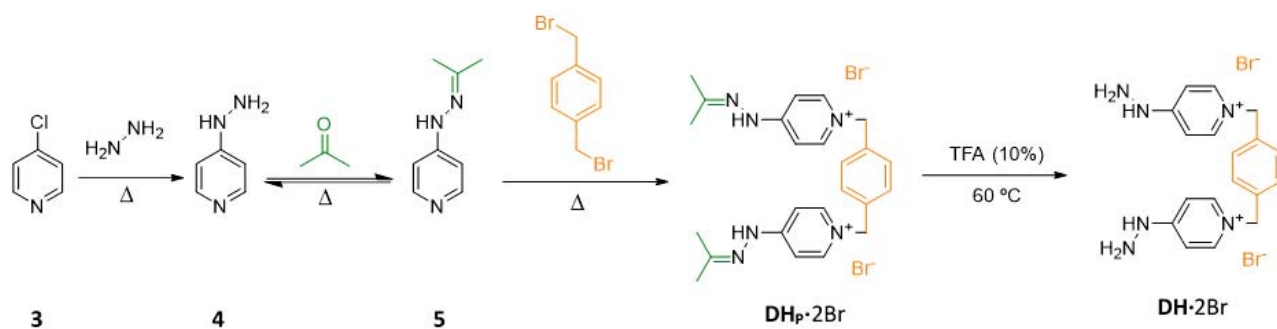
**Figura 7:** Espectro HSQC (D<sub>2</sub>O, 500 e 126 MHz) de DA-2Br. As frechas indican os protóns (eixe horizontal) e carbonos (eixe vertical) implicados nas correlacións A-E.

Por último, para poder asignar as sinais dos carbonos cuaternarios emprégase o espectro HMBC (Figura 8) que amosa as correlacións <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C a dous ou máis enlaces de distancia. A sinal de carbono a 134.0 ppm da lugar a puntos de cruce cos protóns H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>, polo que se trata do carbono cuaternario fenilénico C<sub>6</sub>. Por outro lado, a sinal do outro carbono cuaternario, a 160.4 ppm, da lugar a puntos de cruce cos protóns H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>, sendo por tanto C<sub>7</sub>.



**Figura 8:** Espectro HMBC (D<sub>2</sub>O, 500 e 126 MHz) de DA-2Br. As frechas azuis indican os protóns (eixe horizontal) e carbonos (eixe vertical) implicados nas correlacións A-C.

### 2.1.2. Síntese da Dihidrazona (DH<sup>2+</sup>)

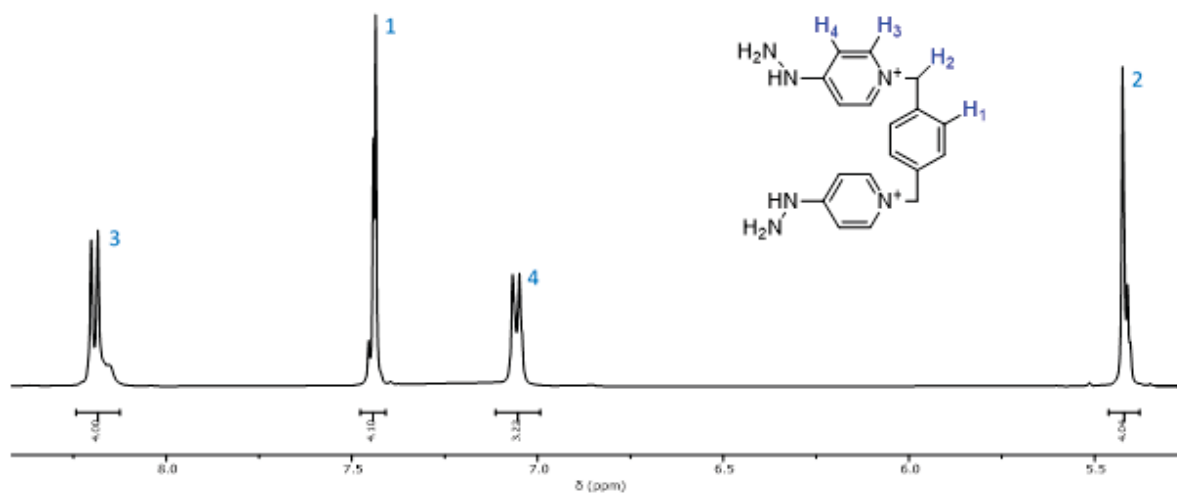


Esquema 6: Síntese da dihidrazona DH·2Br.

Para sintetizar o compoñente dihidrazona pártese do produto comercial 4-cloropiridina (**3**) que reacciona coa hidracina e, mediante unha reacción de Substitución Electrífila Aromática ( $S_{EAr}$ ), da lugar á 4-hidrazinopiridina (**4**). Este último ten 3 átomos de nitróxeno, cun par de electróns desapareados cada un, que poden realizar ataques nucleófilos. Destes tres, o menos nucleófilo é o nitróxeno da hidracina máis próximo ao anel de piridina – debido ás formas resoantes co anel que deslocalizan a carga. O grupo amino da hidracina ten o nitróxeno coa maior nucleofilia e, polo tanto, é necesario protexelo para que o ataque nucleófilo o leve a cabo o nitróxeno da piridina. Para levar a cabo a protección emprégase acetona xa que non interferirá na posterior ensamblaxe – debido á labilidade do enlace C=N xa explicada na introdución – e, ademais, permite a selectividade na reacción co grupo amino. A reacción de protección consiste nun ataque do grupo amino da hidracina ao carbonilo da acetona, e a conseguinte formación da hidrazona **5**. Unha vez protexido o grupo hidracina faise reaccionar co  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*p*-xileno **2** e, mediante o ataque nucleófilo do nitróxeno da piridina – a través dun mecanismo de reacción  $S_{N2}$  – aos carbonos electrófilos, liberándose bromuros que quedan de contraións no produto final, obtense a dihidrazona protexida (**DH<sub>p</sub>·2Br**).

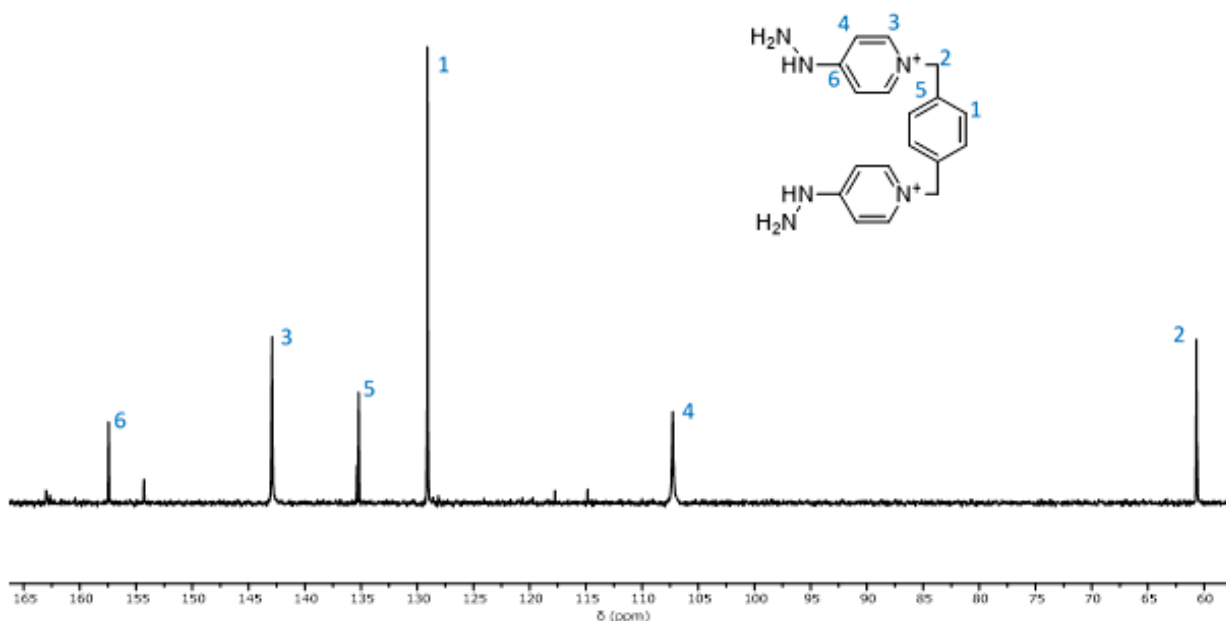
A caracterización deste produto lévase a cabo mediante as técnicas de <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-RMN mono e bidimensionais. Para facilitar a caracterización desprotéxese a hidrazona mediante unha hidrólise con catálise ácida, empregando TFA, a 60 °C para obter a dihidracina **DH·2Br**. Na ensamblaxe do macrociclo *red box* partírase da dihidracina protexida e no medio de reacción sufrirá unha desprotección idéntica con catálise ácida. No espectro de <sup>1</sup>H-RMN (*Figura 9*) aparecen 4 sinais, tres das cales son aromáticas. A sinal de menor desprazamento correspóndese cos hidróxenos metilénicos (H<sub>2</sub>). As sinais aromáticas poden asignarse seguindo o mesmo razoamento ca non caso anterior, tendo en conta a multiplicidade e o desprazamento dos hidróxenos  $\alpha$  e  $\beta$  do anel de piridinio. Coma no anterior composto descrito, o dobrete de maior desprazamento correspóndese cos H en  $\alpha$  ao nitróxeno do anel (H<sub>3</sub>), mentres que o de menor desprazamento correspóndese cos H en  $\beta$  (H<sub>4</sub>). O singulete restante trátase dos hidróxenos fenilénicos (H<sub>1</sub>). Os hidróxenos da

hidracina non aparecen no espectro ao intercambiarse en D<sub>2</sub>O. O acoplamento dos hidróxenos  $\alpha$  e  $\beta$  do anel de piridinio pode corroborarse co espectro COSY (ver *Anexos*).



**Figura 9:** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) de **DH**·2Br, no que se indica a asignación dos sinais a través da numeración.

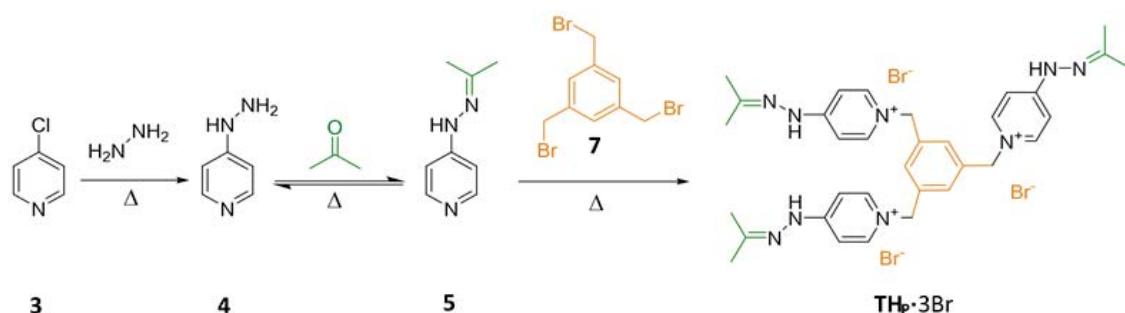
O espectro de <sup>13</sup>C-RMN ten o mesmo tipo de sinais ca no discutido para **DA**·2Br coa excepción da sinal do carbonilo hidratado. A asignación das sinais é coincidente coa do dialdehído, aínda que os desprazamentos son lixeiramente diferentes debido á presenza da hidracina. Para corroborar a asignación das sinais empréganse, tras comparar co espectro DEPT, os espectros HSQC e HMBC (ver *Anexos*).



**Figura 10:** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN (D<sub>2</sub>O, 101 MHz) de **DH**·2Br, no que se indica a asignación dos sinais a través da numeración.



### 2.1.3. Síntese da Trihidrazona (TH<sup>3+</sup>)



Esquema 7: Síntese da dihidrazona TH<sub>p</sub>·3Br.

A síntese da trihidrazona é análoga a do compoñente **DH**·2Br explicada no apartado anterior, coa única diferenza de que a hidrazona **5** reacciona co 1,3,5-tris(bromometil)benceno **7**, dando lugar á trihidrazona **TH<sub>p</sub>·3Br**. Como nos casos anteriores a caracterización lévase a cabo mediante as técnicas de <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-RMN mono e bidimensionais. No espectro de <sup>1</sup>H-RMN aparecen 7 sinais correspondentes ao produto esperado e algunhas sinais de menor intensidade correspondentes a impurezas. Na zona alifática aparecen as sinais dos metilos provintes da acetona empregada na protección (H<sub>6</sub> e H<sub>7</sub>). A 5.40 ppm aparece a sinal dos hidróxenos metilénicos (H<sub>2</sub>), e a 7.13 o sinal correspondente aos fenilénicos (H<sub>1</sub>). En canto as sinais dos protóns do piridinio, a de 8.08 ppm correspondese cos hidróxenos en α (H<sub>3</sub>), mentres que a dos H en β non son equivalentes, parecendo como dous singuletes anchos, o que se explicará con máis detalle no apartado correspondente ao macrociclo *red box*.

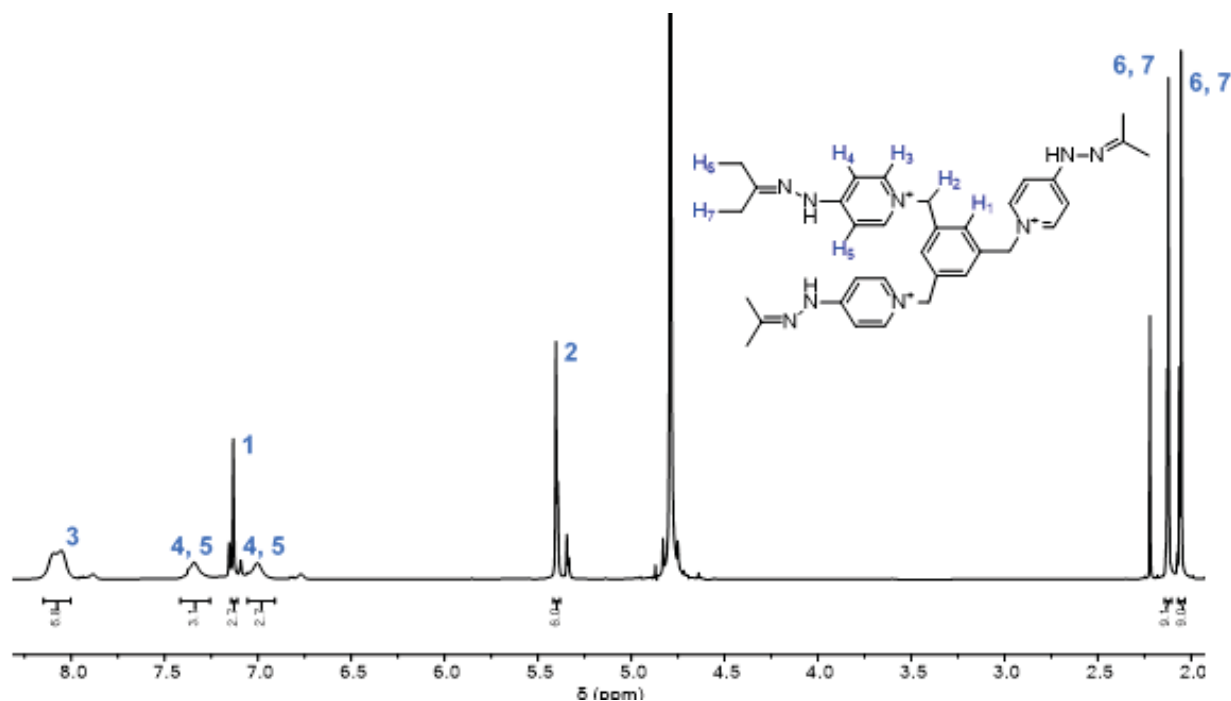
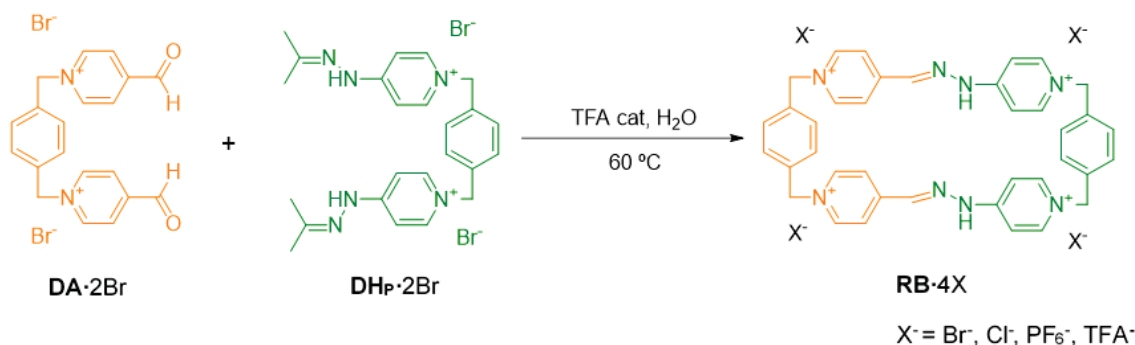


Figura 11: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) de TH<sub>p</sub>·3Br, no que se indica a asignación dos sinais a través da numeración.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  pódese ver no apartado *Anexos* onde tamén se amosan os espectros bidimensionais empregados para a asignación das sinais do RMN- $^1\text{H}$ .

## 2.2. Síntese e caracterización dos Macrociolos

### 2.2.1. Ensamblaxe e purificación do macrociclo *red box* (RB·4X)

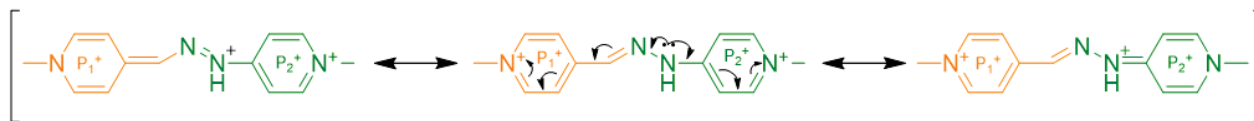


**Esquema 8:** Síntese do macrociclo *red box* (RB·4X).

O macrociclo *Red Box* sintetízase por reacción dos compoñentes de partida (DA·2Br e DHp·2Br), formando dous enlaces hidrazona nunha estrutura cíclica. Esta transaminación, que transcorre en medio acuoso con catálise ácida, dá lugar ao oligómero cíclico de menor tamaño, que é a especie favorecida en condicións de alta dilución.<sup>17, 22, 27</sup> A pesar de que as condicións son as típicas da Química Covalente Dinámica de iminas, en este caso en particular, a reacción transcorre baixo control cinético, como veremos, pola grande estabilidade do enlace C=N formado e como xa ten demostrado o grupo QUIMOLMAT nunha recente publicación.<sup>18</sup> Así, neste traballo, confirmouse que a *red box* obtense como produto principal baixo control cinético, en medio acuoso e prescindindo da plantilla, xa que os enlaces hidrazona formados son máis estables do normal debido á deslocalización da carga en ambos lados longos da estrutura da *red box*, dando lugar ata a diversas formas resoantes (**Figura 12**).<sup>2</sup> Deste xeito, o enlace C=N ten un carbono pouco electrófilo e, polo tanto, a súa hidrólise resulta máis difícil. A maiores do xa mencionado, o rendemento da reacción é alto para tratarse dun composto macrocíclico obtido baixo control cinético e sen efecto *template*. É importante resaltar que, en medio acuoso, o produto maioritario é o macrociclo *red box*, mentres que en medio orgánico obtéñense preferentemente especies oligoméricas. Isto pode deberse a unha elevada preorganización en medio acuoso dos precursores, de xeito que hai unha maior solvatación dunha forma pregada fronte a unha forma

<sup>2</sup> Débese ter en conta que a deslocalización da carga electrónica fai que o enlace N-C(piridinio) teña características de dobre enlace, o que se traduce nunha rotación impedida do anel. Este fenómeno é o que provoca unha situación de non equivalencia dos núcleos observados por RMN nas fraccións de hidacinilpiridinio destes compostos, encontrándose estes nunha situación de equilibrio.

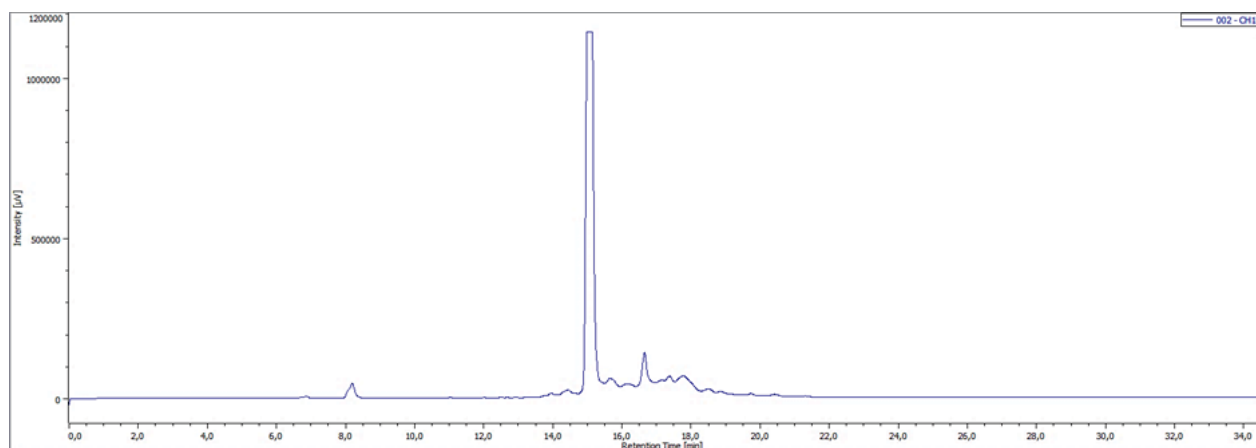
estendida – debido ao efecto hidrofóbico – o que favorece a formación dun segundo enlace hidrazona intramolecular.



**Figura 12:** Tres das formas resoantes posibles resultado da deslocalización da carga nos lados longos da estrutura da *red box*.

No aspecto práctico, o ciclofano obtense como a correspondente sal (**RB·4Br**) e, posteriormente, realízanse varios cambios de contraíón que facilitan o seu illamento e purificación. En primeiro lugar, lévase a cabo o cambio por hexafluorofosfato, que permite aillar o composto por precipitación do mesmo en medio acuoso, e permite a caracterización en medio orgánico. Máis tarde, realízase o intercambio por cloruros, para estudos en medio acuoso. Os intercambios de ións lévanse a cabo facilmente mediante a adición dunha sal –  $KPF_6$  e  $Bu_4NCl$ , respectivamente – e posterior precipitación en distintos medios – como xa se explicou, grazas ás diferenzas de solubilidade.

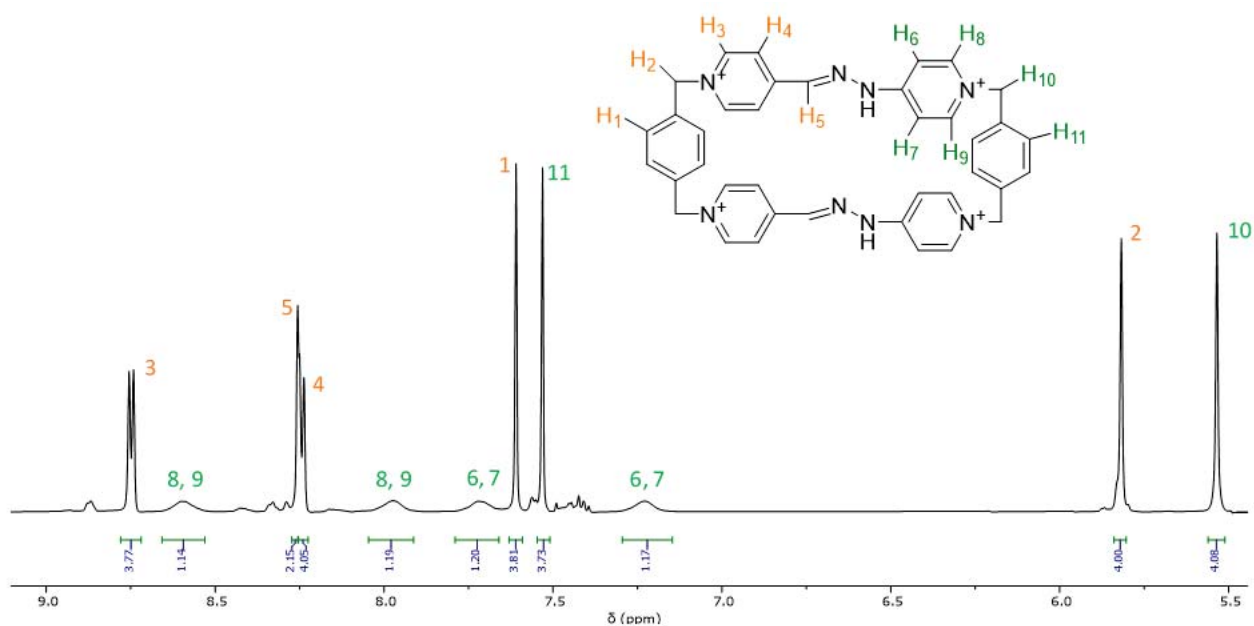
Posteriormente á síntese de **RB·4Br** lévase a cabo unha purificación mediante HPLC semipreparativa en fase reversa, co fin de obter o macrociclo o máis puro posible para levar a cabo os ensaios de citotoxicidade e internalización celular, no traballo de fin de grao de Bioloxía coordinado co presente. Para a purificación é necesario empregar unha columna de fase reversa debido á elevada carga do macrociclo, o que impediría a súa elución nunha columna de fase normal. No cromatograma amosado na **Figura 13** pódese comprobar que o cru de reacción non presenta case impurezas. Tras unha liofilización confirmouse a obtención do produto mediante HR-ESI-MS (ver *Anexos*). O pico maioritario do ESI-MS reflexa a masa exacta do produto obtido, que se corresponde coa teórica esperada, o que confirma a obtención do macrociclo puro. Ademais, pódese obter información estrutural do composto, grazas a os picos que reflexan as sucesivas perdas de contraíóns, e incluso perda de Hs.



**Figura 13:** Cromatograma de UV-Vis ( $\lambda = 220$  nm), correspondente á purificación do cru de reacción do macrociclo *red box* (**RB·4TFA**).

A caracterización estrutural do macrociclo **RB**<sup>4+</sup> realizouse empregando as técnicas de <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-RMN, mono e bidimensionais, en medio acuoso (D<sub>2</sub>O) e en medio orgánico (CD<sub>3</sub>CN). Para isto empréganse os produtos **RB**·4TFA e **RB**·4PF<sub>6</sub>, respectivamente, con resultados moi similares e análogos aos xa reportados polo grupo de investigación.<sup>18</sup>

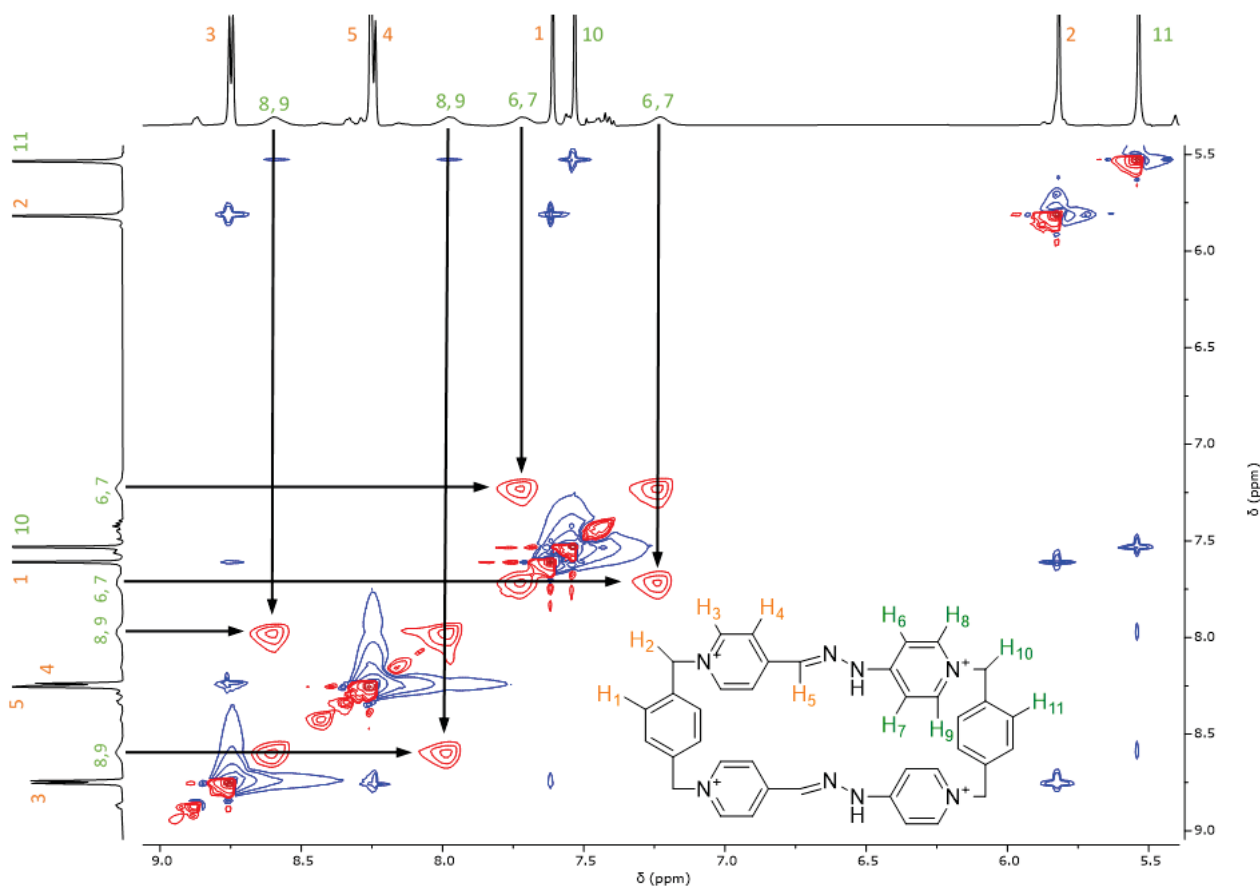
Así por exemplo, no caso do medio acuoso, obsérvanse no <sup>1</sup>H-RMN 11 sinais, dúas das cales son alifáticas correspondentes aos hidróxenos metilénicos (H<sub>2</sub> e H<sub>10</sub>), e 9 son aromáticas. Entre as sinais aromáticas, localízanse facilmente como é habitual as correspondentes aos núcleos dos fenilos (H<sub>1</sub> e H<sub>11</sub>), e os piridinios provintes da dihidrazona (H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>). A maiores destas sinais aparecen catro singletes anchos pouco intensos debido ao fenómeno xa discutido de inequivalencia entre os protóns H<sub>6-9</sub>). Para asignar correctamente estes sinais é necesario empregar os espectros bidimensionais, o que tamén se fixo na caracterización previa dos precursores dialdehído e dihidrazona. É destacable tamén mencionar a aparición dun singlete a 8.26 ppm, por 2H, característico dos protóns imínicos H<sub>5</sub>, que confirma a formación do enlace hidrazona. Os dous dobretes a 8.75 e 8.24 ppm correspóndense cos hidróxenos en  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente, do anel de piridinio (H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>). Por último, os dous singletes a 7.61 e 7.53 ppm refírense aos protóns dos aneis fenilénicos, H<sub>1</sub> e H<sub>11</sub> respectivamente.



**Figura 14:** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) de **RB**·4TFA.

Como xa se explicou, os hidróxenos da parte superior e inferior dos grupos hidrizanilpiridion non son equivalentes (H<sub>6</sub>≠H<sub>7</sub> e H<sub>8</sub>≠H<sub>9</sub>). Isto tradúcese, no caso concreto da *red box*, nunha situación de coalescencia dos sinais de <sup>1</sup>H-RMN a temperatura ambiente, nun réxime de intercambio entre rápido e lento na escala de tempo de RMN, de xeito que as sinais dos protóns se manifestan como catro singletes anchos. Neste caso para asignar parcialmente as sinais pode empregarse o espectro NOESY/EXSY. Esta técnica amosa o acoplamento entre protóns a través do espazo

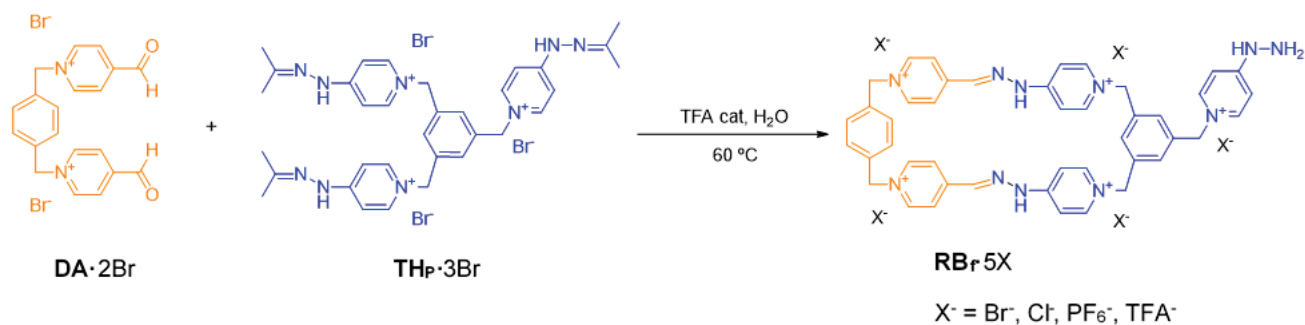
(acoplamentos dipolares), a diferenza do espectro COSY no que aparecen acoplamentos entre protóns a través de enlaces (acoplamentos escalares). Ademais, con esta técnica é posible identificar os hidróxenos que están en intercambio químico (cruces EXSY). Así, grazas ao desprazamento que presentan, é posible asignar parcialmente as sinais – cos protóns  $\alpha$  menos apantallados ca os  $\beta$ .



**Figura 15:** Espectro NOESY/EXSY ( $D_2O$ , 500 MHz) de **RB-4TFA**. As frechas indican os cruces para os protóns non equivalentes ( $H_6 - H_9$ ) do anel de piridinio da dihidrazona ( $DH^{2+}$ ).

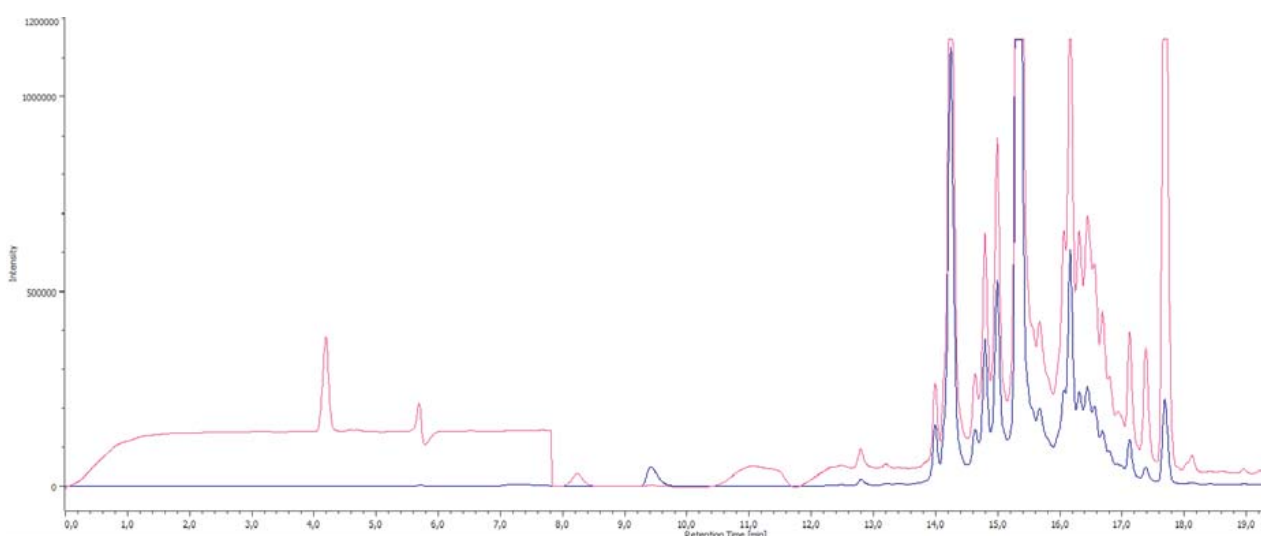
No referido ao espectro de  $^{13}C$ -RMN (*Anexos*), tamén se observa a aparición dunha sinal a 140.8 ppm correspondente co carbono imínico, o que corrobora tamén a formación do enlace hidrazona. As sinais deste espectro xunto cas do  $^1H$ -RMN confirman a formación do ciclofano.

### 2.2.2. Ensamblaxe e purificación do macrociclo *red box* funcionalizado (**RB<sub>F</sub>-5X**)



**Esquema 9:** Síntese do ciclofano **RB<sub>F</sub>-5X**

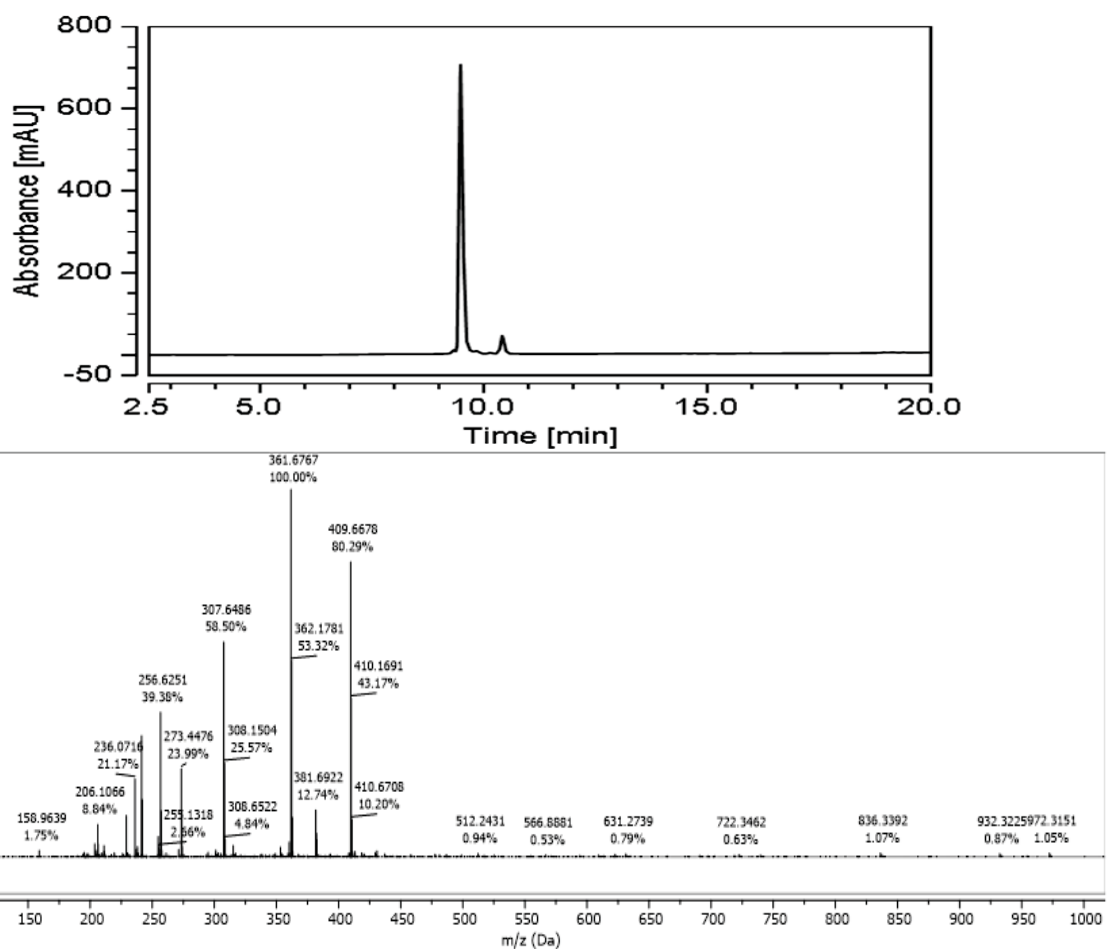
Trala síntese de **RB**·4X planteouse, como segundo obxectivo do traballo, a obtención dun análogo funcionalizado do mesmo (**RB**<sub>F</sub>·5X). A síntese deste ciclofano é moi similar á empregada para a *red box*, coa diferenza de que se emprega o compoñente trihidracina **TH**<sub>F</sub>·3Br, dando lugar ao produto final **RB**<sub>F</sub>·5Br cun grupo hidracina libre que permite unha potencial funcionalización posterior. Neste caso, ao empregar a trihidracina, é necesario traballar en condicións de maior dilución ca no caso da *red box*, para favorecer a formación do macrociclo e reducir a formación de outros oligómeros non desexados. A pesar disto é necesario levar a cabo unha purificación mediante HPLC semipreparativa en fase reversa, ademais de polos mesmos motivos ca no caso de **RB**·4Br, pola aparición dun grande número de produtos secundarios, como se pode comprobar no cromatograma da **Figura 16**.



**Figura 16:** Cromatograma de UV-Vis ( $\lambda = 220$  e  $254$  nm), para á purificación do cru de reacción para **RB**<sub>F</sub>·5TFA.

Se comparamos coa reacción de ensamblaxe do macrociclo **RB**·4Br, no caso da síntese do análogo funcionalizado o *building block* trihidrazona presenta unha posición reactiva a maiores que pode dar lugar a oligómeros. Ademais, no produto final tamén temos un grupo hidrazona libre que pode reaccionar para formar outros oligómeros. Tras recoller os 4 picos de máxima intensidade e liofilizalos o análise mediante HPLC-MS confirmou a obtención do produto **RB**<sub>F</sub>·5TFA purificado, que se corresponde co segundo pico de máxima intensidade da **Figura 16**.

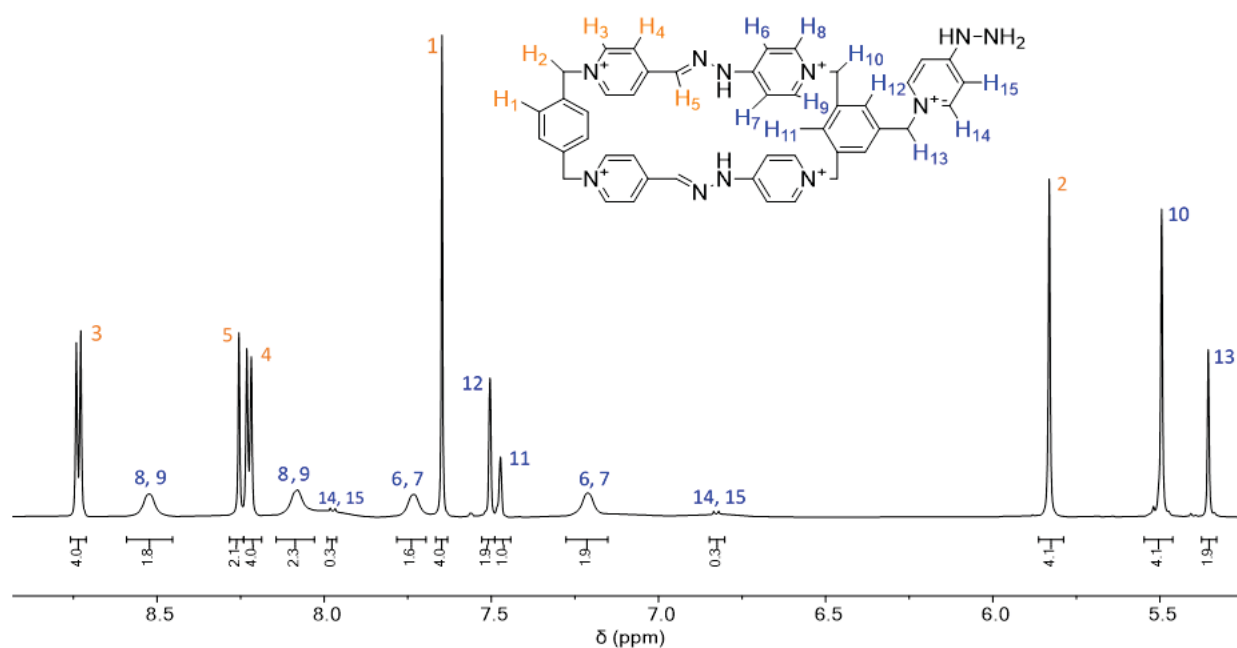
Como se pode comprobar no cromatograma de UV-Vis (**Figura 17**),soamente se observa un pico maioritario, a un tempo de retención de 9.6 minutos, cuxo espectro de masas amosa a *m/z* correspondente ao ión molecular, e outras debido á perda de hidróxenos e combinación con TFA que aportan información estrutural. Todo isto confirma a obtención do produto **RB**<sub>F</sub>·5TFA cun rendemento sen optimizar dun 11 % na etapa de purificación.



**Figura 17:** Cromatograma de UV-Vis ( $\lambda = 220$  nm) e espectro HR-ESI-MS, correspondente ao análise por HPLC-MS da fracción correspondente a  $\text{RB}_F \cdot 5\text{TFA}$  puro.

A caracterización lévase a cabo empregando as técnicas de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN mono e bidimensionais. No espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (**Figura 18**) aparecen tres sinais na zona alifática, correspondentes aos hidróxenos metilénicos, e o resto de sinais son aromáticas. Obsérvase que aparece o singulete característico a 8.26 ppm, correspondente co protón imínico, así como os dobre tes a 8.73 e 8.22 ppm para os hidróxenos en  $\alpha$  e en  $\beta$ , respectivamente, do anel de piridinio provinte do dialdehido ( $\text{H}_3$  e  $\text{H}_4$ ). A 7.65 ppm aparece un sinal por 4H correspondente aos protóns fenilénicos  $\text{H}_1$ , mentres que a 7.50 e 7.47 ppm, aparecen os outro hidróxenos fenilénicos que proveñen da porción de trihidracina ( $\text{H}_{11}$  e  $\text{H}_{12}$ ). Na zona alifática aparecen a 5.83 ppm o sinal dos  $\text{CH}_2$  do dialdehido ( $\text{H}_2$ ), e a 5.49 e 5.36 ppm as correspondente aos  $\text{CH}_2$  provintes da trihidracina ( $\text{H}_{10}$  e  $\text{H}_{13}$ , respectivamente). Por último cabe destacar a aparición de 4 singule tes anchos que se corresponden cos hidróxenos dos aneis de piridinio, provintes da trihidracina, que se sitúan nos lados longos do macrociclo. Estes hidróxenos non son equivalentes debido a que experimentan un fenómeno de coalescencia idéntico ao explicado no apartado anterior para a *red box*. Ademais, aparecen dous dobre tes moi pouco intensos que se corresponden cos H do anel de piridinio do extremo funcionalizable do ciclofano. Esta pouca intensidade pode deberse á rotación rápida dese anel de piridinio, na escala de tempos de RMN, a diferenza do que sucede nos outros aneis. A

asignación das sinais complétase empregando os espectros bidimensionais (ver *Anexos*). O espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN, que ten unha asignación complexa, tamén se amosa no apartado *Anexos*.

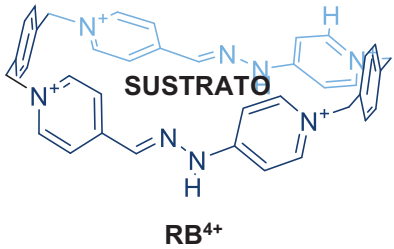
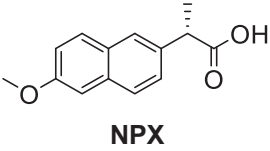
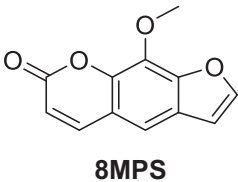


**Figura 18:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) de  $\text{RB}_F\text{-5TFA}$ .

### 2.3. Estudo dos complexos de inclusión.

O ciclofano *red box* presenta, como xa se mencionou, unha estrutura rectangular cunha cavidade hidrofóbica e compacta, cuxos lados longos presentan aneis  $\pi$ -deficientes. Estas características fan que sexa un bo receptor de substratos aromáticos, que pode estabilizar mediante diferentes tipos de interaccións. Neste traballo vamos a centrarnos nun estudo cualitativo preliminar con dous substratos aromáticos con aplicación biomédica. O composto naproxeno (**NPX**) é un medicamento empregado para o tratamento da dor, febre e inflamación; mentres que o 8-metoxipsoraleno (**8MPS**), tamén coñecido como metoxaleno, empregase no tratamento de eccemas, psoriasis, e algúns linfomas cutáneos. A complexación destes compostos, no interior do macrociclo, pode favorecer a súa internalización celular, aumentando a súa solubilidade, estabilidade, e incluso reducir efectos prexudiciais no organismo.<sup>28</sup>

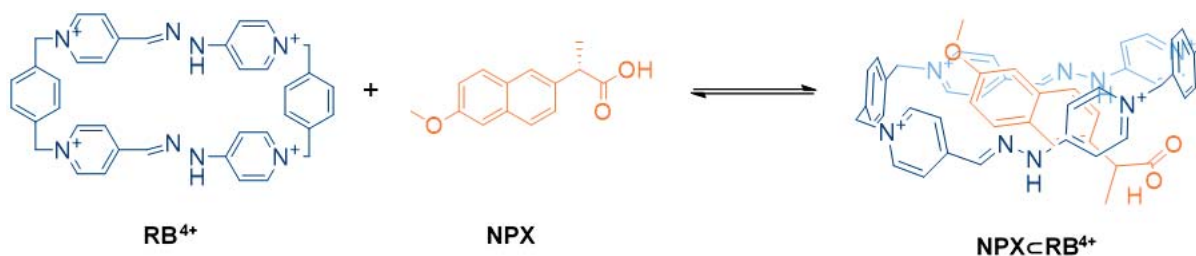


RECEPTOR	SUSTRATOS
	
	

**Táboa 1:** Receptor e substratos empregados para o estudo dos complexos de inclusión

A o estudo dos complexos entre receptor e substrato levarase a cabo mediante  $^1\text{H}$ -RMN para, inicialmente, confirmar a capacidade de complexación do macrociclo *red box*. Unha vez confirmada a capacidade de complexación, levaranse a cabo estudos de citotoxicidade en distintas liñas celulares co macrociclo, no traballo de fin de grado de Bioloxía coordinado co presente traballo.

### 2.3.1. Complexo $\text{NPX} \subset \text{RB}^{4+}$ .



**Esquema 10:** Autoensamblaxe do complexo de inclusión  $\text{NPX} \subset \text{RB}^{4+}$ .

Para o estudo do complexo de inclusión co substrato **NPX** analízase o espectro de  $^1\text{H}$ -RMN dunha mestura 1:1 de naproxeno e **RB**·4TFA, e compárese cos espectros dos compoñentes libres.

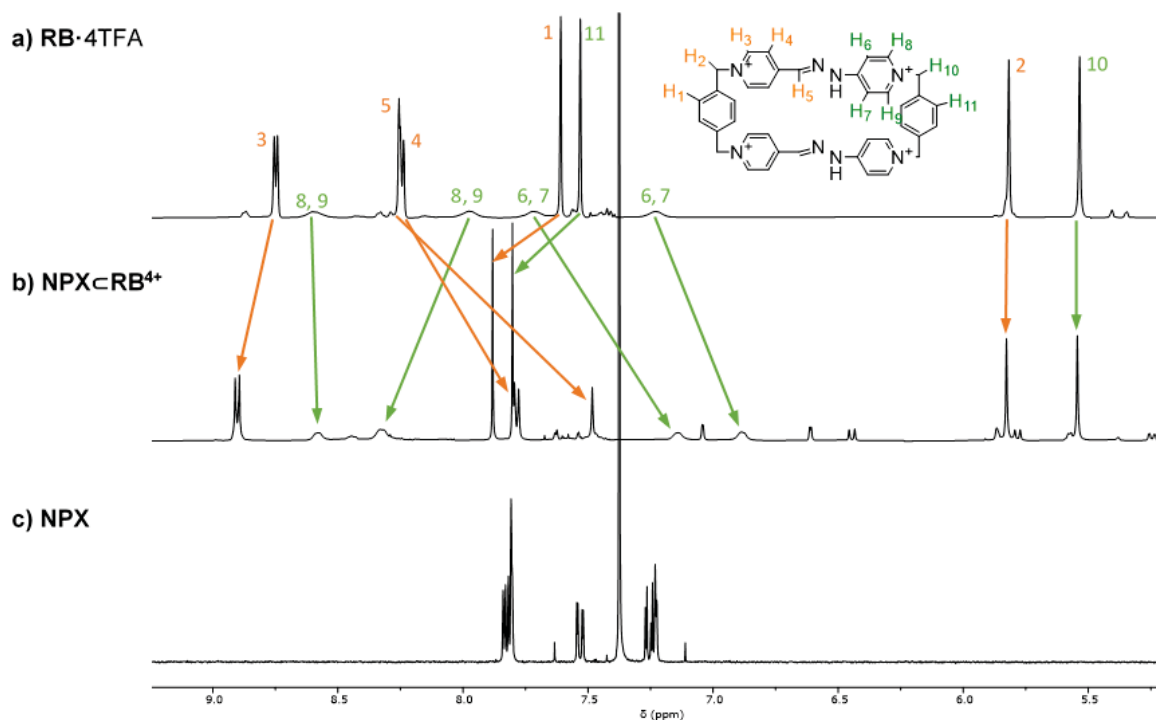
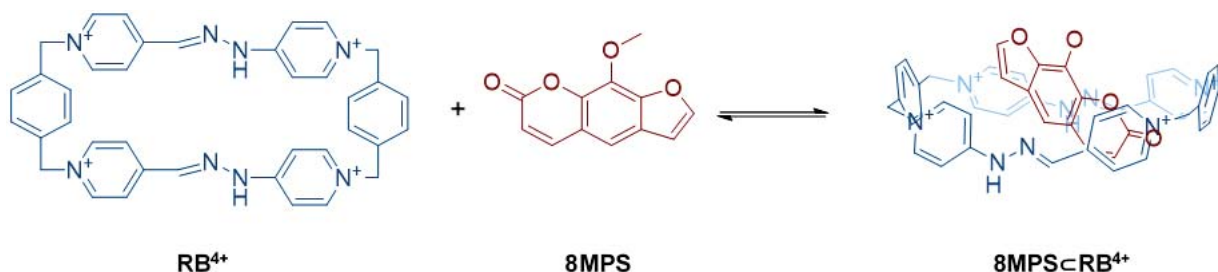


Figura 19: Comparación dos espectros parciais de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) de: a)  $\text{RB}\cdot 4\text{TFA}$ ; b)  $\text{NPX}\subset\text{RB}^{4+}$  e c)  $\text{NPX}$ .

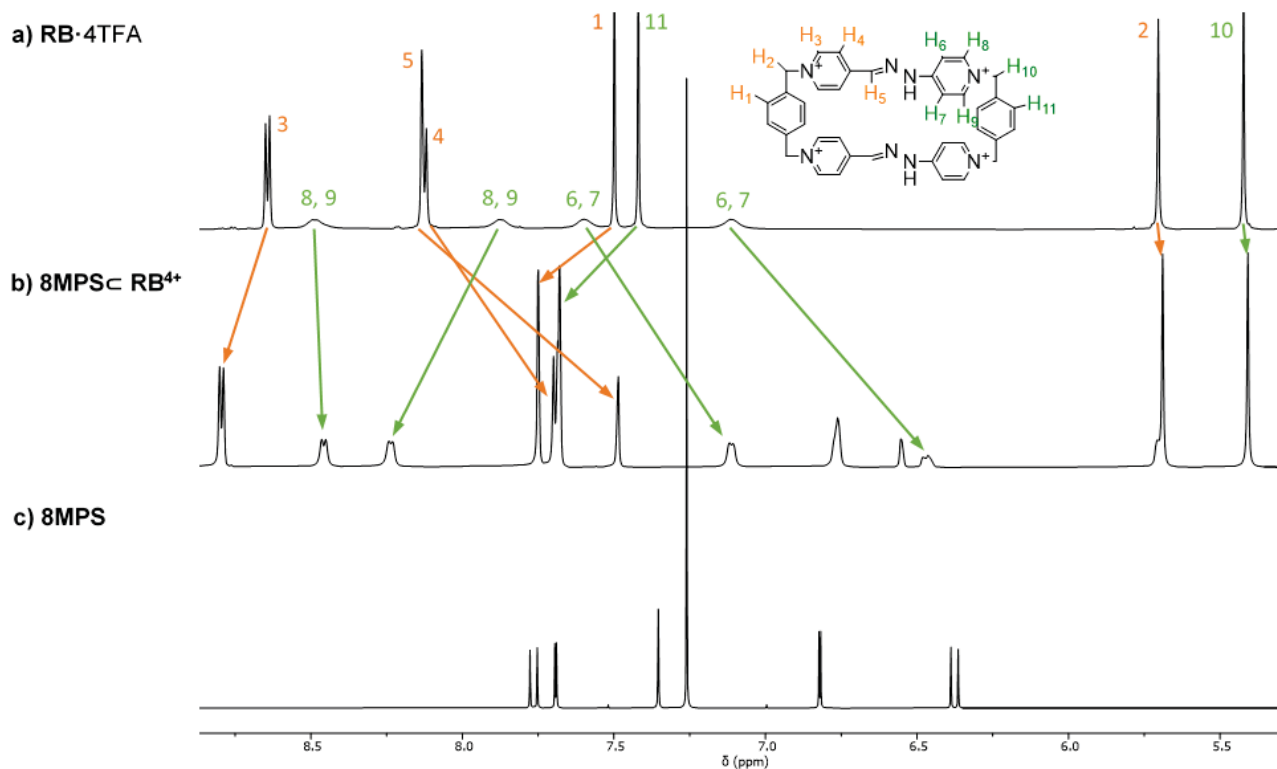
Na comparación dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN pode comprobarse que, tanto as sinais de  $\text{RB}^{4+}$  como as de  $\text{NPX}$ , sofren variación nos seus desprazamentos químicos ao mesturar ambos compostos, respecto aos sinais que amosan os espectros de receptor e substrato por separado. Así, os sinais do  $\text{NPX}$  – non amosadas todas na figura – sofren un apantallamento, mentres que os do macrociclo experimentan ambos tipos de cambios. Os núcleos centrais do lado longo da estrutura ( $\text{H}_{4-7}$ ) apantállanse, mentres que os Hs fenilénicos ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_{11}$ ) sofren un desapantallamento debido á interacción  $[\text{CH}\cdots\pi]$ . Estes cambios nos desprazamentos corroboran a interacción entre receptor e substrato e a formación dun complexo de inclusión, xa que coinciden co comportamento observado en sistemas semellantes, con ese tipo de substratos aromáticos.<sup>18, 29</sup>

### 2.3.2. Complexo $8\text{MPS}\subset\text{RB}^{4+}$ .



Esquema 11: Autoensamblaxe do complexo de inclusión  $8\text{MPS}\subset\text{RB}^{4+}$ .

Para o estudo do complexo de inclusión co substrato **8MPS** compárase o espectro de  $^1\text{H}$ -RMN dunha mestura 1:1 en  $\text{D}_2\text{O}$ , de receptor e substrato, co espectro do ciclofano libre e do substrato puro.



**Figura 20:** Comparación dos espectros parciais de RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) de: a) **RB $^{4+}$** ; b) **8MPS** en **RB $^{4+}$**  e c) **8MPS**.

Ao igual ca no caso anterior, pode comprobarse que existe un cambio nos desprazamentos químicos das sinais do macrociclo e do substrato ao mesturarse, respecto á situación deles por separado. As sinais do 8-metoxipsoraleno – non todas amosadas na figura – sofren un apantallamento, mentres que as da *red box* amosan un comportamento similar ao caso anterior, cun apantallamento dos núcleos  $\text{H}_{4-7}$  e un desapantallamento de  $\text{H}_1$  e  $\text{H}_{11}$ . Cabe destacar que as sinais dos protóns do anel de piridinio provinte da dihidracina ( $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$ ,  $\text{H}_8$  e  $\text{H}_9$ ), que aparecen como singuletes anchos no espectro de **RB $^{4+}$** , amósanse agora como dobretes algo máis claros no espectro de **8MPS** en **RB $^{4+}$** . Este comportamento pode deberse á presenza do substrato na cavidade, que dificulta aínda máis a rotación do anel de piridinio. Sen embargo, este feito non parece afectar aos protóns do anel provinte do dialdehido, que se manteñen como dous dobretes ( $\text{H}_3$  e  $\text{H}_4$ ). Como xa se menciona no caso anterior, o cambio nos desprazamentos químicos confirman a formación do complexo, posto que se trata dun comportamento xa observado en sistemas semellantes con ese tipo de substratos aromáticos.<sup>18, 29</sup>

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

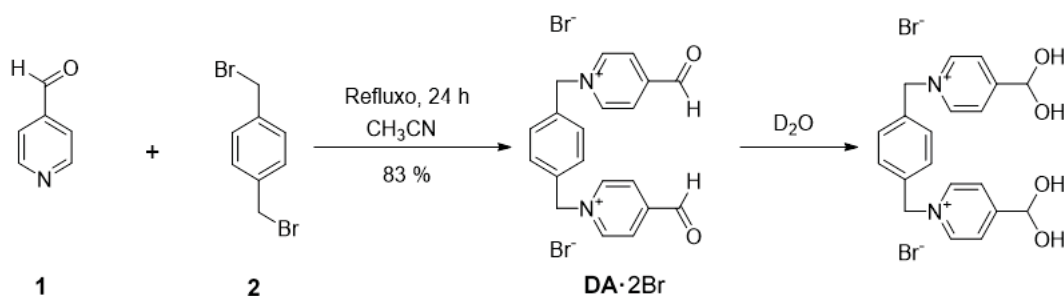
#### 3.1. Procedementos

Os reactivos e disolventes empregados nas sínteses son comerciais e non foron sometidos a purificacións adicionais. A auga de calidade MilliQ empregada obtívose a partir dun equipo *Millipore Gradient A10*. Para o seguimento dalgunhas reaccións realizouse unha cromatografía en capa fina empregando cromatofolios de xel de sílice *Merck 60 F254*, que se revelaron mediante luz ultravioleta (254 e 360 nm). Como eluínte empregouse unha mestura de elevada polaridade chamada "Magic", que contén CH<sub>3</sub>CN (600 mL), CH<sub>3</sub>OH (150 mL), H<sub>2</sub>O (150 mL) e NaCl (5 g). No caso de necesitar unha axitación por ultrasóns empregouse un equipo *Branson 2510*.

Para o seguimento das reaccións por <sup>1</sup>H-RMN utilizouse un equipo *Bruker Avance 300* (300 MHz), mentres que para a caracterización e estudo dos complexos de inclusión empregouse o equipo *Bruker Avance 500* (500 MHz para <sup>1</sup>H e 126 MHz para <sup>13</sup>C), de maior resolución, que pertence ao SAI (Servizo de Apoio á Investigación) da UDC. Como disolvente para preparar as mostras utilizouse D<sub>2</sub>O e CD<sub>3</sub>CN. Na purificación por HPLC semipreparativa en fase reversa utilizouse un espectrómetro *Agilent Technologies 1200*, e o detector UV rexistrou a 220 e 254 nm. Empregouse unha columna semipreparativa *Aeris 5 μm PEPTIDE XB-C18 100 Å (250 x 10.0 mm)* de *Phenomenex*. Pola súa banda, na análise de HPLC-MS en fase reversa empregouse o espectrómetro *Thermo Scientific Ultimate 3000* con detector PDA (*Photo-Diode Array*), acoplado a un espectrómetro de cuadrupolo simple *Thermo Scientific MSQPlus*. A detección levouse a cabo a 220 e 280 nm simultaneamente e empregouse unha columna analítica *Aeris 3.6 μm PEPTIDE XB-C18 100 Å (150 x 2.1 mm)*. A liofilización dos macrociclos purificados levouse a cabo nun liofilizador *Telstar Cryodos -80*.

#### 3.2. Síntese dos Compoñentes

##### 3.2.1. Síntese do dialdehido (DA·2Br)

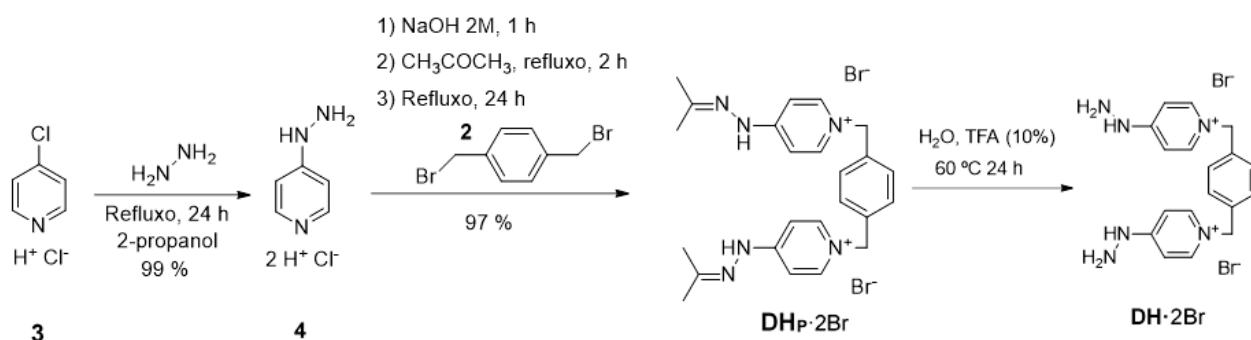


En primeiro lugar disólvense 1.00 g de α,α'-dibromo-*p*-xileno **2** (3.79 mmol, 1 eq.) en 50 mL de CH<sub>3</sub>CN. A continuación, engádense 1.66 mL de 4-piridincarboxialdehido **1** (11.370 mmol, 3 eq.) e

quéntase a refluxo e con axitación (95 °C, 24 h). Ao cabo de 1 hora a disolución vólvese de cor alaranxado e aparece un precipitado abundante. A reacción séguese por cromatografía de capa fina e, tras 24 h, filtrase ao baleiro e en quente o sólido, e lávase con CH<sub>3</sub>CN quente (3 × 20 mL) e despois con Et<sub>2</sub>O (2 × 15 mL). O sólido resultante sécase na liña de baleiro durante 24 h obténdose, como un pó amarelo, o produto **DA**·2Br (1.63 g, rendemento dun 83 %), cuxa identidade se comprobou en base aos seus datos espectroscópicos.

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 8.92 (d, *J* = 6.5 Hz, 4H), 8.16 (d, *J* = 6.4 Hz, 4H), 7.55 (s, 4H), 6.21 (s, 2H), 5.87 (s, 4H). <sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 160.38 (C), 144.71 (CH), 134.26 (C), 129.98 (CH), 125.59 (CH), 87.47 (CH), 63.59 (CH<sub>2</sub>). **HR-ESI-MS**, *m/z* calculado para [C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 461.1071; encontrado 461.1071.

### 3.2.2. Síntese da dihidrazona(DH·2Br)

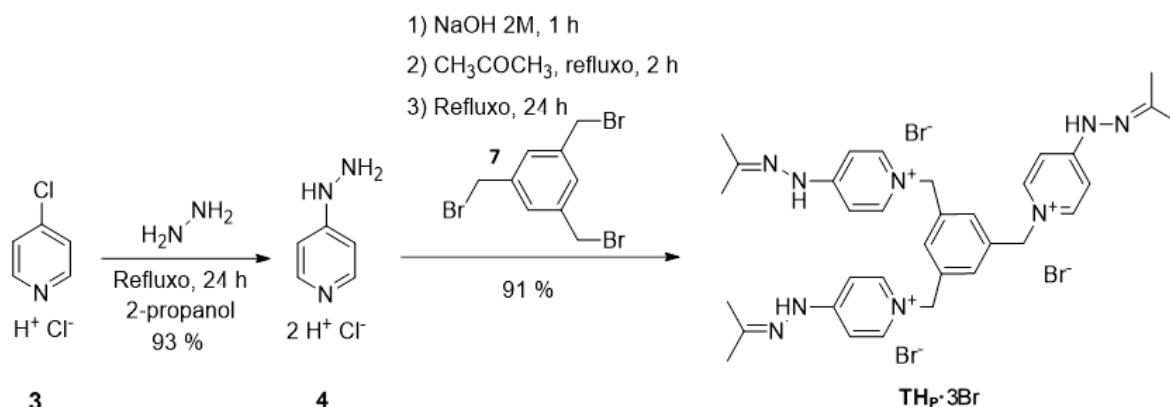


Primeiro disólvense 5.78 g de hidrocloreuro de 4-cloropiridin **3** (38.5 mmol, 1 eq.) en 100 mL de 2-propanol. A continuación engádense 37 mL de hidracina (577 mmol, 15 eq.) e quéntase a refluxo e con axitación durante 24 h (128 °C). Pasado ese tempo concéntrase a sequidade a disolución e o sólido resultante deixase a secar na liña de baleiro durante 24 h. Obtense o produto 4-hidracinpiridina **4** como un sólido branco moi higroscópico (6.94g, rendemento dun 99 %).

Disólvense 4.02 g de 4-hidracinpiridina **4** (22.01 mmol, 1 eq.) en 200 mL de NaOH 2 M e mantense con axitación durante 1 hora. A continuación, realízanse extraccións con acetato de etilo (8 × 50 mL) e a fase orgánica sécase con MgSO<sub>4</sub> e concéntrase no rotavapor. Obtense o intermedio como un aceite alaranxado (6.58 mmol, 6 eq.) que se dissolve en 60 mL de acetona e se quenta a refluxo con axitación durante 2 horas (60 °C). Pasado ese tempo engádense 0.29 g de α,α'-dibromo-*p*-xileno **2** (1.09 mmol, 1 eq.) e mantense a refluxo durante 24 h. Observase a aparición dun precipitado branco alaranxado que se filtra en quente, e se lava con acetona quente (3 × 50 mL) e con Et<sub>2</sub>O (2 × 15 mL, obténdose o produto **DHP**·2Br (0.57 g, rendemento dun 93 %), cuxa identidade se comprobou en base aos seus datos espectroscópicos.

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 8.19 (d, *J* = 7.1 Hz, 4H), 7.44 (s, 4H), 7.06 (d, *J* = 7.9, 2.6, 3H), 5.42 (s, 4H). **<sup>13</sup>C-RMN** (126 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 157.44 (C), 154.31 (C), 142.92 (CH), 135.20 (C), 129.08 (CH), 107.27 (CH), 60.66 (CH<sub>2</sub>). **HR-ESI-MS:** m/z calculado para [C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>Br]<sup>+</sup> 401.1084; encontrado 401.1084.

### 3.2.3. Síntese da trihidrazona (TH<sub>P</sub>·3Br)



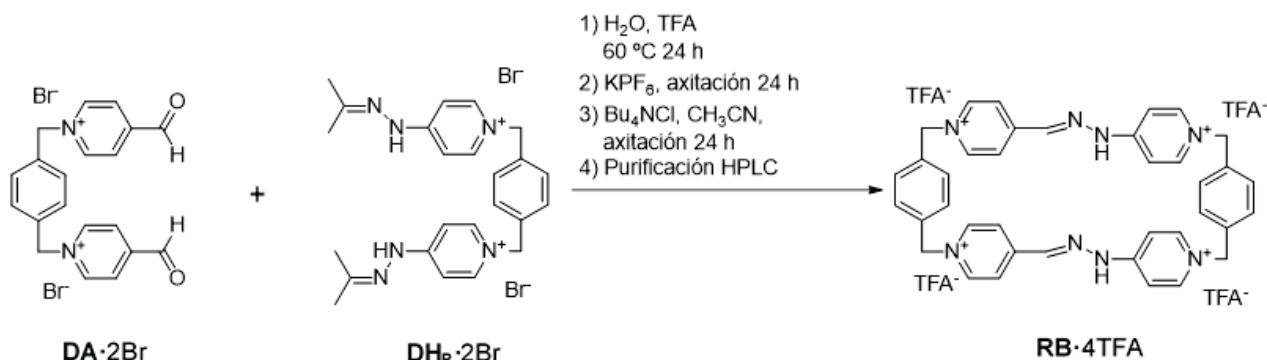
Primeiro disólvese 6.60 g de hidrocloreto de 4-cloropiridina **3** (43.90 mmol, 1 eq.) en 115 mL de 2-propanol. A continuación engádense 41 mL de hidracina (659 mmol, 15 eq.) e quéntase a refluxo e con axitación durante 24 h (128 °C). Pasado ese tempo concéntrase a sequidade a disolución e o sólido resultante deixase a secar na liña de baleiro durante 24 h. Obtense o produto 4-hidracinpiridina **4** como un sólido branco moi higroscópico (7.43 g, rendemento dun 93 %).

Disólvese 3.42 g de 4-hidracinpiridina **4** (18.1 mmol, 1 eq.) en 50 mL de NaOH 2 M e mantense con axitación durante 1 hora. A continuación, realízanse extraccións con acetato de etilo (8 × 50 mL) e a fase orgánica sécase con MgSO<sub>4</sub> e concéntrase no rotavapor. Obtense o intermedio como un aceite alaranxado (8.38 mmol, 5 eq.) que se dissolve en 60 mL de acetona e se quenta a refluxo con axitación durante 2 horas (60 °C). Pasado ese tempo engádense 0.60 g de 1,3,5-tris(bromometil) benceno **7** (1.68 mmol, 1 eq.) e mantense a refluxo durante 24 h. Observase a aparición dun precipitado branco alaranxado que se filtra en quente, e se lava con acetona quente (3 × 50 mL) e con Et<sub>2</sub>O (2 × 15 mL, obténdose o produto **TH<sub>P</sub>·3Br** (1.23 g, rendemento dun 91 %), cuxa identidade se comprobou en base aos seus datos espectroscópicos.

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 8.08 (s ancho, 6H), 7.36 (s ancho, 3H), 7.13 (s, 3H), 7.00 (s ancho, 3H), 5.40 (s, 6H), 2.13 (s, 9H), 2.05 (s, 9H). **<sup>13</sup>C-RMN** (126 MHz, D<sub>2</sub>O): 162.86 (C), 154.26 (C), 143.60 (CH), 142.32 (CH), 136.98 (C), 126.92 (CH), 108.86 (CH), 106.85 (CH), 59.82 (CH<sub>2</sub>), 24.36 (CH<sub>3</sub>), 17.35 (CH<sub>3</sub>). **HR-ESI-MS:** m/z calculado para [C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>N<sub>9</sub>]<sup>2+</sup>: 281.6737, encontrado: 281.6740.

### 3.3. Síntese e purificación dos macrociclos

#### 3.3.1. Ensamblaxe e purificación do macrociclo *red box* (RB·4X)



Disólvense 0.61 g de **DH<sub>p</sub>·2Br** (1.08 mmol, 1 eq.) e 0.55 g de **DA·2Br** (1.08 mmol, 1 eq.) en 400 mL de H<sub>2</sub>O, para ter unha disolución 2.5 mM de ambos compoñentes. A partires dunha alícuota da disolución compróbase, mediante <sup>1</sup>H-RMN, a estequiometría da reacción. A continuación engádense 166 µL de TFA (2.16 mmol, 2 eq.) e quéntase a 60 °C con axitación durante 24 horas. Tras ese tempo, sepáranse 200 mL do crudo de reacción e engádense 0.5 g de KPF<sub>6</sub> (2.5 mmol, 5 eq.) e deixase 24 horas en axitación. Observase a aparición dun precipitado alaranxado que, tras ese tempo, se filtra ao baleiro e se lava con H<sub>2</sub>O (3 × 20 mL) e con Et<sub>2</sub>O (2 × 15 mL), e se deixa a secar na liña de baleiro durante 24 h. Obténse o produto **RB·4PF<sub>6</sub>** como un sólido vermello (0.57 g, 58 %), para a súa caracterización en medio orgánico (CD<sub>3</sub>CN), cuxa identidade se comprobou en base aos seus datos espectroscópicos.

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ (ppm): 10.80 (s, 2H), 8.52 (d, *J* = 6.6 Hz, 4H), 8.47 (s ancho, 2H), 8.24 (d, *J* = 6.7 Hz, 4H), 8.17 (s, 2H), 7.76 (s ancho, 4H), 7.59 (s, 4H), 7.52 (s, 4H), 7.22 (s ancho, 2H), 5.70 (s, 4H), 5.46 (s, 4H). <sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ (ppm): 154.98 (C), 150.32 (C), 145.24 (CH), 144.80 (CH), 141.09 (CH), 135.20 (C), 134.72 (C), 131.79 (CH), 131.39 (CH), 125.33 (CH), 110.71 (CH), 110.34 (CH), 63.74 (CH<sub>2</sub>), 61.72 (CH<sub>2</sub>). **HR-ESI-MS**, *m/z* calculado para [C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>]<sup>2+</sup> 301.1447; encontrado 301.1447.

Os 200 mL restantes do crudo de reacción concéntranse a sequedade e pénsanse 85 mg de **RB·4Br**. Disólvese esa cantidade en 3 mL dunha mestura 1:1 de H<sub>2</sub>O e CH<sub>3</sub>CN, e adiciónanse unhas gotas de TFA. A continuación fíltrase esa disolución nun vial para levar a cabo unha purificación por HPLC semipreparativa en fase reversa. O volume de disolución en cada inxección foi incrementándose gradualmente dende os 20 ata os 100 µL. Empréganse como eluínates as disolucións A (H<sub>2</sub>O, 0.1 % TFA) e B (CH<sub>3</sub>CN, 0.1 % TFA), e próbanse diferentes gradientes para



optimizar a resolución dos picos e o tempo de retención, escolléndose finalmente o gradiente amosado na **Táboa 2**.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% B
0	2.500	15
4	2.500	15
30	2.500	55
38	2.500	55
40	2.500	5

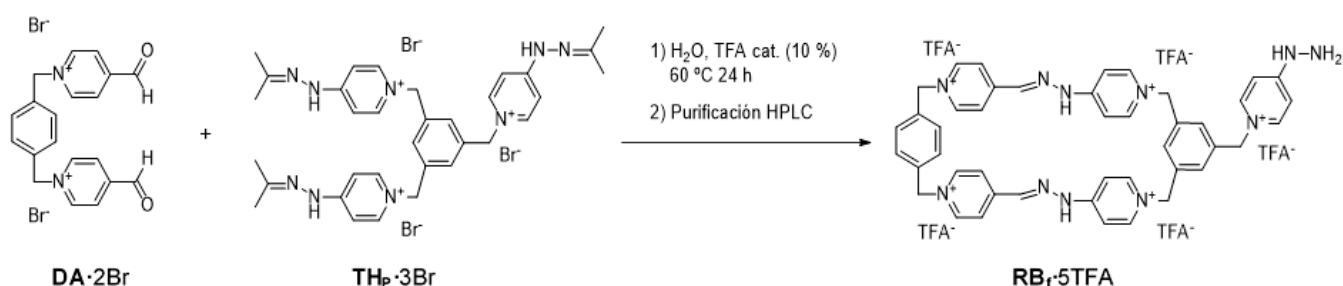
**Táboa 2:** Gradiente final empregado na purificación por HPLC semipreparativa en fase reversa de **RB**·4Br

$t_R = 15.0$  min (columna *Aeris* 5  $\mu\text{M}$  PEPTIDE XB-C18 100 Å; 250 x 10 mm).

Tras unha liofilización obtense un sólido de cor amarela **RB**·4TFA (36.2 mg, 43 %), cuxa identidade se comprobou en base aos seus datos espectroscópicos.

**$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm): 8.75 (d,  $J = 6.4$  Hz, 4H), 8.59 (s ancho, 2H), 8.26 (s, 2H), 8.24 (d,  $J = 6.0$  Hz, 4H), 7.97 (s ancho, 2H), 7.72 (s ancho, 2H), 7.61 (s, 4H), 7.53 (s, 4H), 7.23 (s ancho, 2H), 5.82 (s, 4H), 5.53 (s, 4H).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm): 150.02 (C), 144.19 (CH), 143.34 (CH), 142.90 (CH), 140.70 (HC=N), 134.94 (C), 134.47 (C), 130.83 (CH), 130.43 (CH), 124.72 (CH), 110.01 (CH), 109.93 (CH), 63.46 ( $\text{CH}_2$ ), 61.37 ( $\text{CH}_2$ ). **HR-ESI-MS**, m/z calculado para  $[\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{N}_8]^{2+}$  301.1447; encontrado 301.1447.

### 3.3.2. Ensamblaxe e purificación do macrociclo funcionalizado (**RB<sub>F</sub>**·5X)



O procedemento para a síntese do macrociclo funcionalizado é análogo á síntese da *red box*. Disólvense 0.11 g de **DA**·2Br (0.20 mmol, 1 eq.) e 0.16 g de **TH<sub>P</sub>**·3Br (0.23 mmol, 1 eq.) en 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , para ter unha disolución 1 mM de ambos compoñentes. A partir dunha alícuota da disolución compróbase, mediante  $\text{RMN-}^1\text{H}$ , a estequiometría da reacción. A continuación, engádense 2  $\mu\text{L}$  de TFA (0.0002 mmol, 0.1 eq.) e quéntase a 60 °C con axitación durante 24 horas.



Concéntrase parte do crudo de reacción e pésanse 50 mg deste. Disólvense en 2 mL dunha disolución de H<sub>2</sub>O e CH<sub>3</sub>CN 1:1, e engádense 3 gotas de TFA. A continuación fíltrase a disolución nun vial para levar a cabo unha purificación por HPLC semipreparativa en fase reversa. A cantidade de disolución en cada inxección vai incrementándose dende os 15 ata os 80 µL. Como elúintes empréganse as disolucións A (H<sub>2</sub>O, 0.1 % TFA) e B (CH<sub>3</sub>CN, 0.1 % TFA), e próbanse diferentes gradientes para optimizar a resolución dos picos e o tempo de retención, escolléndose finalmente o gradiente amosado na **Táboa 3**.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% B
0	2.500	10
4	2.500	10
30	2.500	55
38	2.500	55
40	2.500	5

**Táboa 3:** Gradiente final empregado na purificación por HPLC semipreparativa en fase reversa de **RB<sub>F</sub>-5Br**.

$t_R = 17.2$  min (columna *Aeris* 5 µM PEPTIDE XB-C18 100 Å; 250 x 10 mm).

Tras unha liofilización obtense un sólido de cor alaranxado (5.2 mg, 11 %) que se analiza mediante HPLC-MS, e cuxa identidade se comprobou en base aos seus datos espectroscópicos. Os elúintes empregados foron, A: H<sub>2</sub>O, 0.04 % TFA e B: CH<sub>3</sub>CN, 0.04 % TFA, e o método estándar empregado para as inxeccións analíticas foi 5 % de B durante 2 min seguido dun gradiente ata 95 % de B durante 23 min.

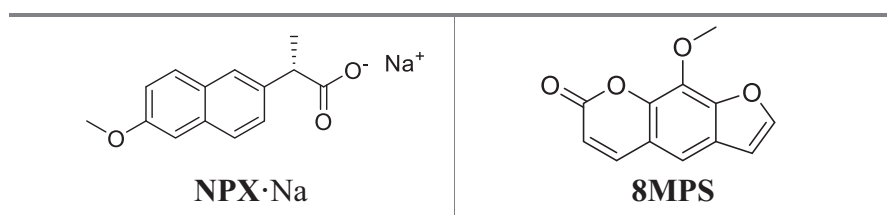
$t_R = 9.64$  min (columna *Aeris* 3.6 µM PEPTIDE XB-C18 100 Å; 150 x 2.1 mm).

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 8.73 (d,  $J = 6.7$  Hz, 4H), 8.52 (s ancho, 2H), 8.26 (s, 2H), 8.22 (d,  $J = 6.5$  Hz, 4H), 8.08 (s ancho, 2H), 7.73 (s ancho, 2H), 7.65 (s, 4H), 7.50 (s, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.21 (s ancho, 2H), 5.83 (s, 4H), 5.49 (s, 4H), 5.36 (s, 2H). **HR-ESI-MS:** m/z calculado para [C<sub>44</sub>H<sub>41</sub>N<sub>11</sub>]<sup>2+</sup> 361.6768; encontrado 361.6767.

### 3.4. Estudo dos complexos de inclusión

O estudo preliminar dos complexos de inclusión lévase a cabo mediante RMN-<sup>1</sup>H. O receptor *red box* emprégase na súa forma purificada, mentres que os substratos empréganse na súa forma comercial. As disolucións dos complexos prepáranse en D<sub>2</sub>O.

## SUBSTRATOS



Táboa 4: Substratos empregados para o estudo dos complexos de inclusión.

### 3.4.1. Complexo NPX $\subset$ RB<sup>4+</sup>

En primeiro lugar prepáranse 2.5 mL dunha disolución *stock* de **RB**·4TFA en D<sub>2</sub>O de 0.6 mM. Tómanse 250  $\mu$ L desa disolución e lévanse a 1 mL nun tubo de RMN. A continuación engádese un exceso de **NPX**·Na e disólvese mediante axitación e calor. Debido á baixa solubilidade en auga solo se dissolve o substrato que se complexa de xeito que se obtén unha estequiometría 1:1. Noutro tubo de RMN mestúranse 300  $\mu$ L da disolución de estequiometría 1:1 con 300  $\mu$ L da disolución *stock* de *red box* para obter unha relación estequiométrica sustrato:receptor de 0.5:1. As sinais de RMN-<sup>1</sup>H que se obteñen da disolución de estequiometría 1:1 son:

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 8.90 (d,  $J = 7.0$  Hz, 4H), 8.58 (s ancho, 2H), 8.31 (s ancho, 2H), 7.88 (s, 4H), 7.80 (s, 4H), 7.78 (d,  $J = 6.6$  Hz, 4H), 7.48 (s, 2H), 7.14 (s ancho, 2H), 7.04 (s, 1H), 6.88 (s ancho, 2H), 6.61 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 6.44 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.83 (s, 4H), 5.78 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 5.54 (s, 4H).

### 3.4.2. Complexo 8MPS $\subset$ RB<sup>4+</sup>

O procedemento a seguir para o estudo deste complexo de inclusión é idéntico ao seguido para o complexo anterior. Debido a que o 8-metoxipsoraleno é insoluble en medio acuoso, a complexación está marcada pola solubilidade. Tendo en conta isto, tómanse 250  $\mu$ L da disolución *stock* 0.6 mM e lévanse a 1 mL nun tubo de RMN. A continuación engádese un exceso de **8MPS**, xa que soamente se disolverá a cantidade que se complexe, e tamén é necesario recorrer a calor e axitación. As sinais que se obteñen para a mestura de estequiometría 1:1 son as seguintes:

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 8.79 (d,  $J = 6.4$  Hz, 4H), 8.46 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 8.24 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 7.75 (s, 4H), 7.69 (d,  $J = 6.6$  Hz, 4H), 7.68 (s, 4H), 7.49 (s, 2H), 7.11 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 6.76 (s, 3H), 6.55 (s, 2H), 6.47 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 5.69 (s, 4H), 5.41 (s, 4H), 3.45 (s, 3H).

## CONCLUSIONES

Tendo en conta os obxectivos iniciais establecidos e os resultados obtidos, pódense extraer as seguintes conclusións do presente traballo:

1. Os *bloques de construción* **DA**·2Br, **DH<sub>F</sub>**·2Br e **TH<sub>F</sub>**·3Br sintetizáronse dun xeito eficiente, con rendementos elevados en torno ao 90%.

2. A ensamblaxe do ciclofano **RB**·4Br, previamente reportado, levouse a cabo satisfactoriamente cun elevado rendimento do 58%, grazas á formación de enlaces hidrazona baixo control cinético.

3. No caso do novo análogo **RB<sub>F</sub>**·5Br, este púdiuse sintetizar seguindo a mesma estratexia que para **RB**·4Br, si ben o baixo rendimento e pureza obtidos fan necesaria unha optimización futura das condicións de reacción.

4. A purificación de ambos macrocilos, mediante HPLC semipreparativa en fase reversa, permitiu obter os produtos puros **RB**·4TFA e **RB<sub>F</sub>**·5TFA, con rendementos nesta etapa do 43 % e 11%, respectivamente.

5. As técnicas de <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-RMN mono e bidimensionais permitiron caracterizar e confirmar a obtención de tódolos produtos.

6. O estudo mediante RMN da formación dos complexos de inclusión do macrociclo *red box* e os substratos de interese biomédico naproxeno e 8-metoxipsoraleno, confirmou a formación das supramoléculas **NPX** ⊂ **RB**<sup>4+</sup> e **8MPS** ⊂ **RB**<sup>4+</sup>.

## CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos iniciales establecidos y los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones del presente trabajo:

1. Los *bloques de construcción* **DA**·2Br, **DH<sub>P</sub>**·2Br e **TH<sub>P</sub>**·3Br se sintetizaron de modo eficiente, con rendimientos elevados en torno al 90 %.
2. El ensamblaje del ciclofano **RB**·4Br, previamente reportado, se llevó a cabo satisfactoriamente con un elevado rendimiento del 58%, gracias a la formación de enlaces hidrazona bajo control cinético.
3. En el caso del nuevo análogo **RB<sub>F</sub>**·5Br, este se pudo sintetizar siguiendo la misma estrategia que para **RB**·4Br, si bien el bajo rendimiento y pureza obtenidos hacen necesaria una optimización futura de las condiciones de reacción.
4. La purificación de ambos macrocilos, mediante HPLC semipreparativa en fase reversa, permitió obtener los productos puros **RB**·4TFA e **RB<sub>F</sub>**·5TFA, con rendimientos en esta etapa del 43 % y 11%, respectivamente.
5. Las técnicas de <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-RMN mono y bidimensionales permitieron caracterizar y confirmar la obtención de todos los productos.
6. El estudio mediante RMN de la formación de los complejos de inclusión del macrociclo *red box* y los sustratos de interés biomédico naproxeno y 8-metoxipsoraleno, confirmó la formación de las supramoléculas **NPX** ⊂ **RB**<sup>4+</sup> e **8MPS** ⊂ **RB**<sup>4+</sup>.

## CONCLUSIONS

Taking into account the initial objectives established and the results obtained, the following conclusions can be drawn from this project:

1. The building blocks **DA**·2Br, **DH<sub>P</sub>**·2Br and **TH<sub>P</sub>**·3Br were efficiently synthesized, with high yields of around 90 %.
2. The previously reported assembly of the cyclophane **RB**·4Br was carried out satisfactorily with a high yield of 58%, thanks to the formation of hydrazone bonds under kinetic control.
3. In the case of the new analogue **RB<sub>F</sub>**·5Br, this could be synthesized following the same strategy as for **RB**·4Br, although the low yield and purity obtained make necessary a future optimization of the reaction conditions.
4. The purification of both macrocycles, by semi-preparative HPLC in reverse phase, made it possible to obtain the pure products **RB**·4TFA and **RB<sub>F</sub>**·5TFA, with yields at this stage of 43 % and 11%, respectively.
5. The mono- and two-dimensional <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-NMR techniques allowed to characterize and confirm the formation of all products.
6. The NMR study of the formation of the inclusion complexes, between the macrocycle *red box* and substrates of biomedical interest naproxen and 8-methoxypsoralen, confirmed the formation of the supramolecules **NPX** ⊂ **RB**<sup>4+</sup> and **8MPS** ⊂ **RB**<sup>4+</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lehn, J.-M. Supramolecular Chemistry - Scope and Perspectives, Molecules, Supermolecules and Molecular Devices (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89–112.
2. Biedermann, F.; Schneider, H.-J. Experimental Binding Energies in Supramolecular Complexes. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 5216–5300.
3. Lehn, J.-M. Towards Complex Matter: Supramolecular Chemistry and Self Organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 4763–4768.
4. Ariga, K.; Kunitake, T. Supramolecular Chemistry - Fundamentals and Applications; *Springer*. Heidelberg, Alemania, **2006**.
5. Liu, Z.; Nalluri, S. K. M.; Stoddart, J. F. Surveying Macrocyclic Chemistry: From Flexible Crown Ethers to Rigid Cyclophanes. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 2459–2478.
6. Rowan, S. J.; Cantrill, S. J.; Cousins, G. R. L.; Sanders, J. K. M.; Stoddart, J. F. Dynamic Covalent Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 898–952.
7. Steed, J. W.; Atwood, J. L. Supramolecular Chemistry, Second.; *Wiley*. Chichester, Inglaterra, **2009**.
8. Jin, Y.; Yu, C.; Denman, R. J.; Zhang, W. Recent Advances in Dynamic Covalent Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6634–6654.
9. Meyer, C. D.; Joiner, C. S.; Stoddart, J. F. Template-Directed Synthesis Employing Reversible Imine Bond Formation. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1705–1723.
10. Belowich, M. E.; Stoddart, J. F. Dynamic Imine Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2003–2024.
11. Da Silva, C. M.; Da Silva, D. L.; Modolo, L. V.; Alves, R. B.; De Resende, M. A.; Martins, C. V. B.; De Fátima, Â. Schiff Bases: A Short Review of Their Antimicrobial Activities. *J. Adv. Res.* **2011**, 2, 1–8.
12. Dale, E. J.; Vermeulen, N. A.; Juriček, M.; Barnes, J. C.; Young, R. M.; Wasielewski, M. R.; Stoddart, J. F. Supramolecular Explorations: Exhibiting the Extent of Extended Cationic Cyclophanes. *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49, 262–273.
13. Barnes, J. C.; Juriček, M.; Vermeulen, N. A.; Dale, E. J.; Stoddart, J. F. Synthesis of ExBox Cyclophanes. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 11962–11969.
14. Asakawa, M.; Dehaen, W.; L'abbé, G.; Menzer, S.; Nouwen, J.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. Improved Template-Directed Synthesis of Cyclobis(Paraquat-p-Phenylene). *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 9591–9595.

15. Odell, B.; Reddington, M. V.; Slawin, A. M. Z.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. Cyclobis(Paraquat-p-phenylene). A Tetracationic Multipurpose Receptor. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1547–1550.
16. García, M. D.; Alvariño, C.; López-Vidal, E. M.; Rama, T.; Peinador, C.; Quintela, J. M. Complexation of Aromatic Compounds with Self-Assembled PdII and PtII Metallacycles. *Inorg. Chim. Acta* **2014**, *417*, 27–37.
17. Blanco-Gómez, A.; Fernández-Blanco, Á.; Blanco, V.; Rodríguez, J.; Peinador, C.; García, M. D. Thinking Outside the “Blue Box”: Induced Fit within a Unique Self-Assembled Polycationic Cyclophane. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3959–3964.
18. Blanco-Gómez, A.; Neira, I.; Barriada, J. L.; Melle-Franco, M.; Peinador, C.; García, M. D. Thinking Outside the “Blue Box”: From Molecular to Supramolecular pH-Responsiveness. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10680–10686.
19. Ma, X.; Zhao, Y. Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host-Guest Interactions. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7794–7839.
20. Molecular Switches; Feringa, B. L., Ed.; *Wiley-VCH*. Weinheim, Alemania, **2011**.
21. Pazos, E.; Novo, P.; Peinador, C.; Kaifer, A. E.; García, M. D. Cucurbit[8]Uril (CB[8])-Based Supramolecular Switches. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, *58*, 403–416.
22. Blanco-Gómez, A.; Cortón, P.; Barravecchia, L.; Neira, I.; Pazos, E.; Peinador, C.; García, M. D. Controlled Binding of Organic Guests by Stimuli-Responsive Macrocycles. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 3834–3862.
23. Loh, X. J. Supramolecular Host-Guest Polymeric Materials for Biomedical Applications. *Mater. Horiz.* **2014**, *1*, 185–195.
24. Ye, E.; Chee, P. L.; Prasad, A.; Fang, X.; Owh, C.; Yeo, V. J. J.; Loh, X. J. Supramolecular Soft Biomaterials for Biomedical Applications. *Mater. Today.* **2014**, *17*, 194–202.
25. Zhou, J.; Yu, G.; Huang, F. Supramolecular Chemotherapy Based on Host-Guest Molecular Recognition: A Novel Strategy in the Battle against Cancer with a Bright Future. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 7021–7053.
26. Huang, X., Zhou, H., Jiao, R., Liu, H., Qin, C., Xu, L., & Chen, Y. Supramolecular Chemotherapy: Host-Guest Complexes of Heptaplatin-Cucurbit[7]uril toward Colorectal Normal and Tumor Cells. *Langmuir.* **2021**, *37*, 5475-5482.

27. Zheng, X.; Zhang, Y.; Wu, G.; Liu, J.-R.; Cao, N.; Wang, L.; Wang, Y.; Li, X.; Hong, X.; Yang, C.; Li, H. Temperature-Dependent Self-Assembly of a Purely Organic Cage in Water. *Chem. Commun.* **2018**, 54, 3138–3141.

28. Blanco, J.; Vila-Jato, J. L.; Otero, F.; Anguiano, S. Influence of Method of Preparation on Inclusion Complexes of Naproxen with Different Cyclodextrins. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1991**, 17, 943–957.

29. Rama, T.; López-Vidal, E. M.; García, M. D.; Peinador, C.; Quintela, J. M. Complexation and Catenation in Aqueous Media Using a Self-Assembled PdII Metallacyclic Receptor. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 9482–9487.

30. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1987/press-release/>

31. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2016/press-release/>



# ANEXOS

## Dihidrazona (DH<sub>P</sub>·2Br)

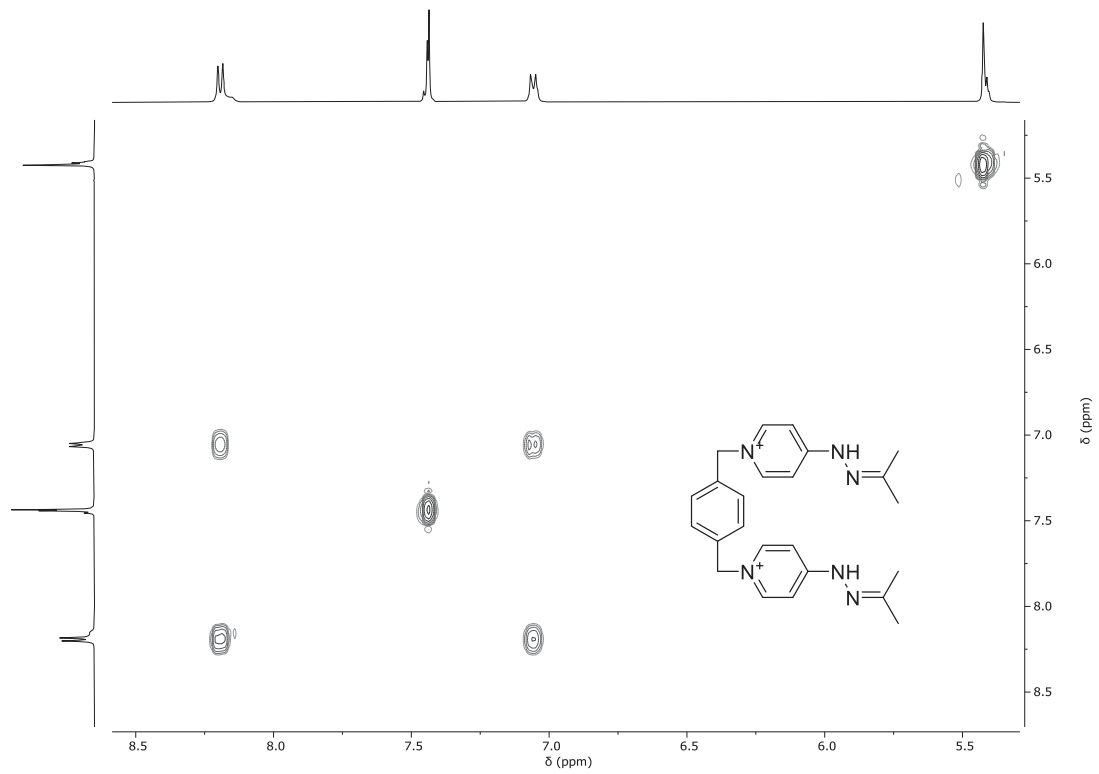


Figura 21: Espectro COSY (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) de DH<sub>P</sub>·2Br.

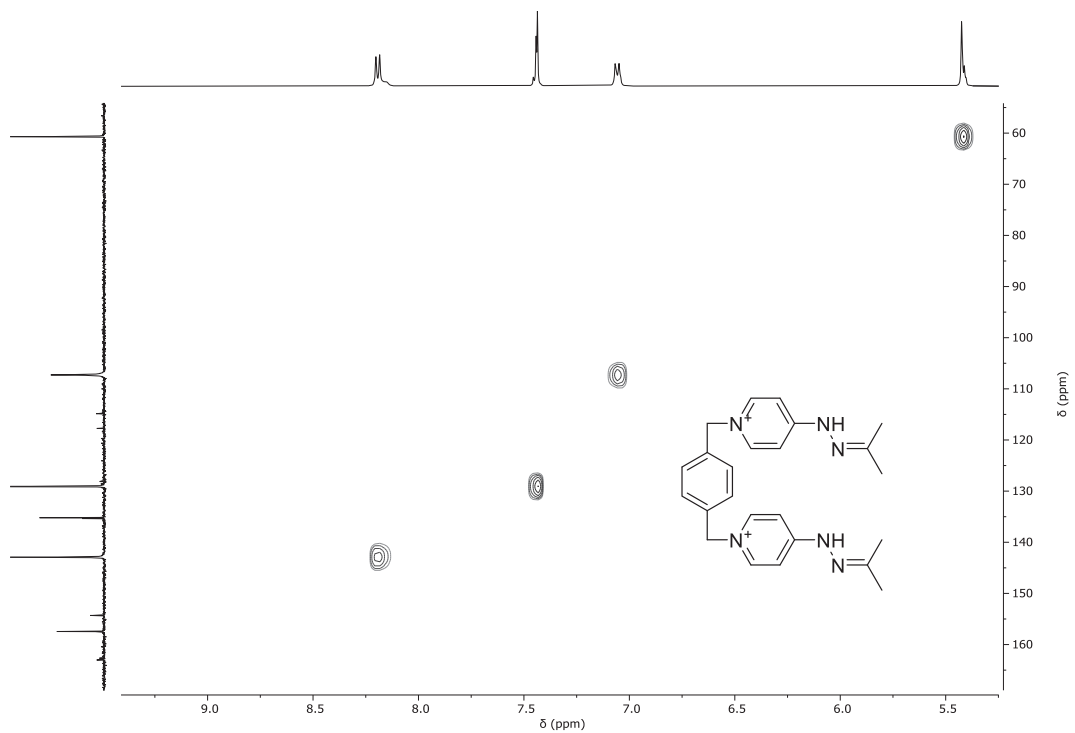


Figura 22: Espectro HSQC (D<sub>2</sub>O, 500 e 126 MHz) de DH<sub>P</sub>·2Br.

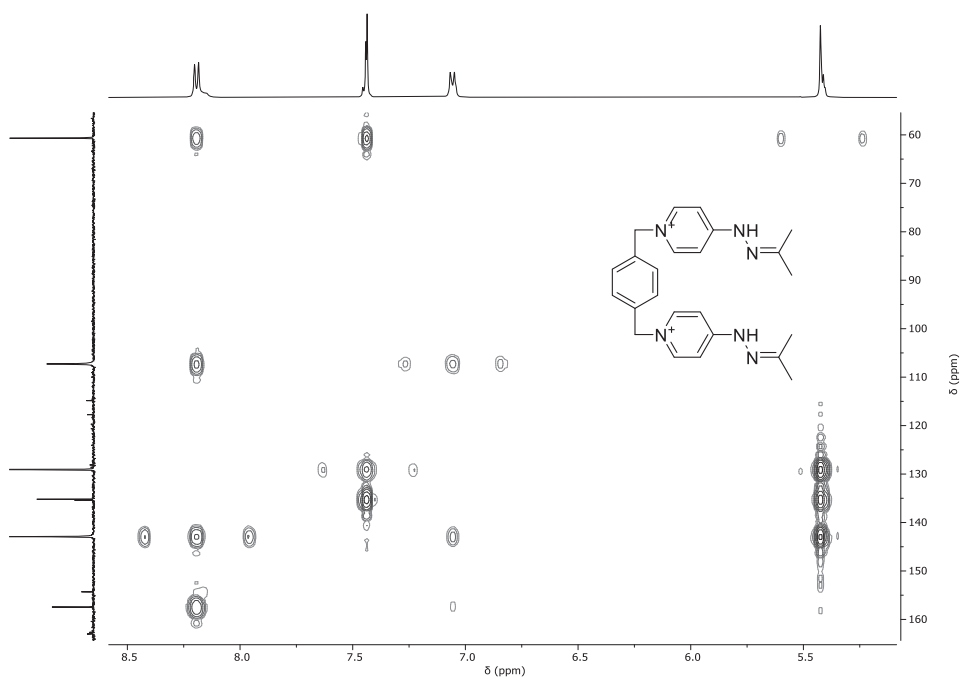


Figura 23: Espectro HMBC (D<sub>2</sub>O, 500 e 126 MHz) de DHP-2Br.

### Trihidrazona (THP-3Br)

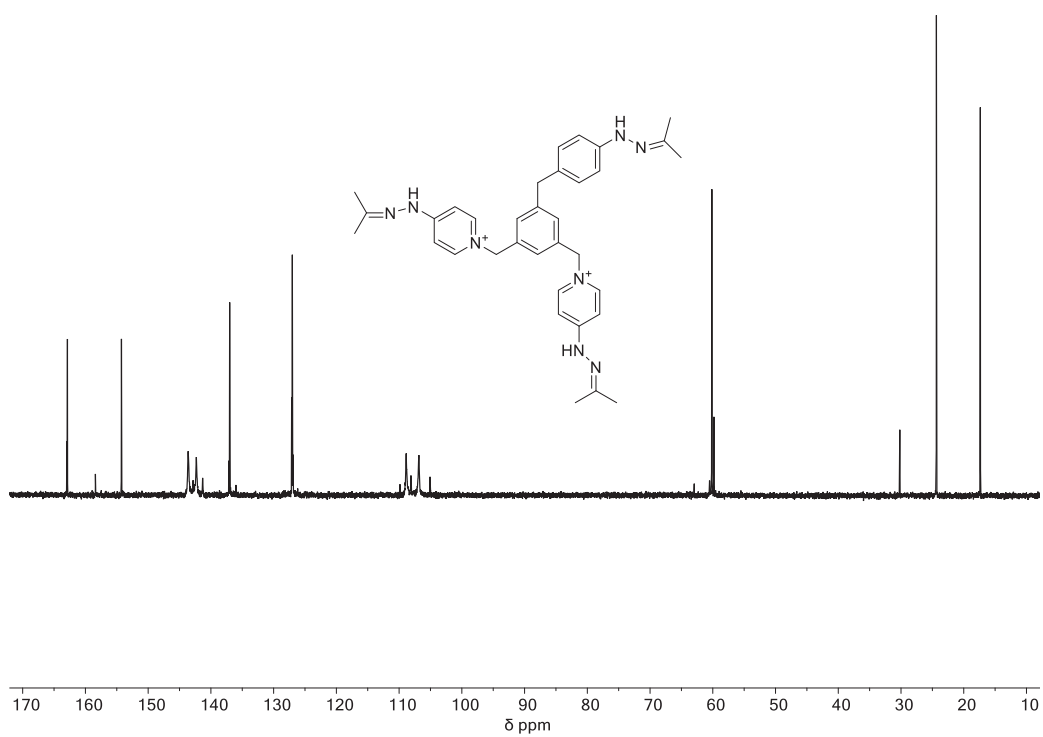


Figura 24: Espectro <sup>13</sup>C-RMN (D<sub>2</sub>O, 126 MHz) de THP-3Br

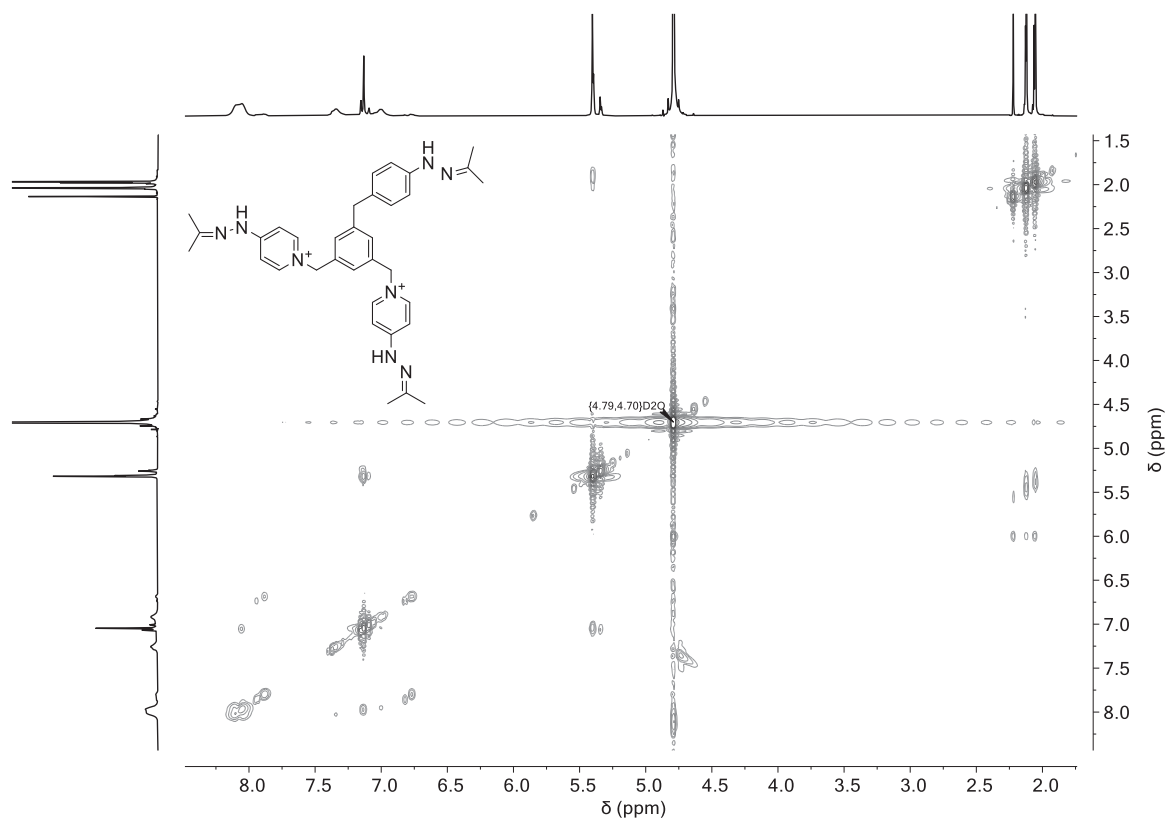


Figura 25: Espectro COSY (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) de THP 3Br.

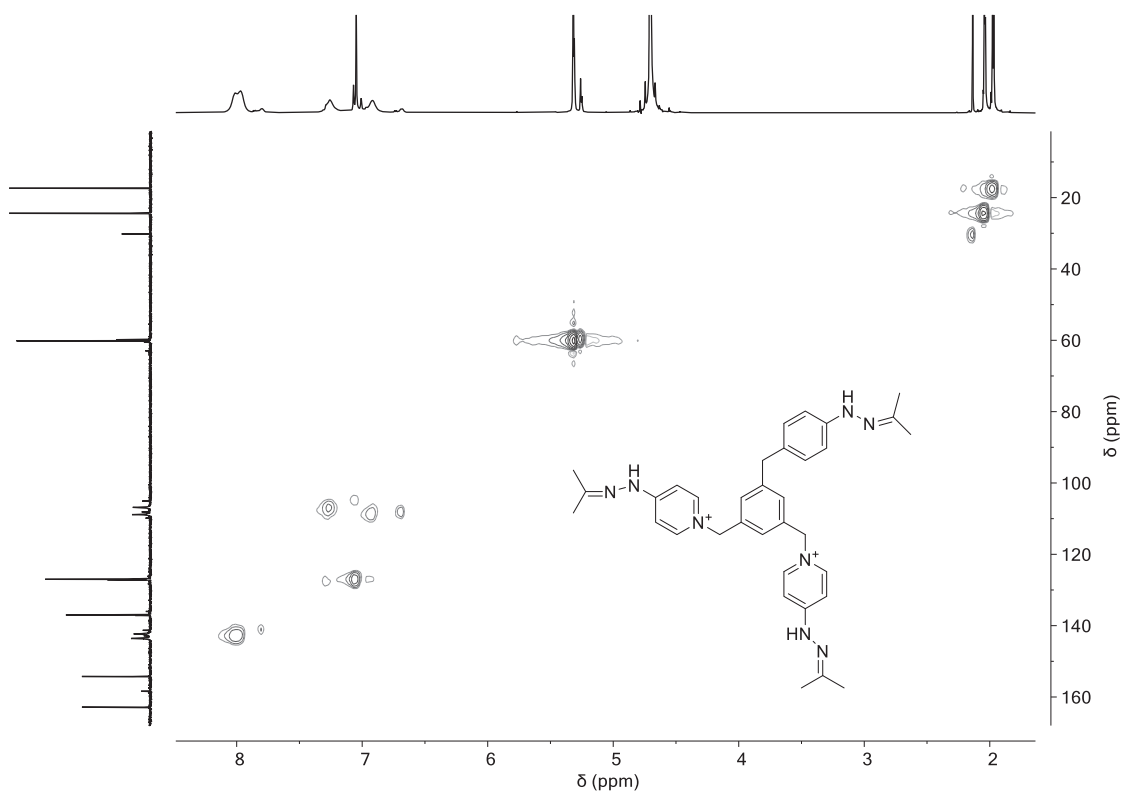


Figura 26: Espectro HSQC (D<sub>2</sub>O, 500 e 126 MHz) de THP 3Br.

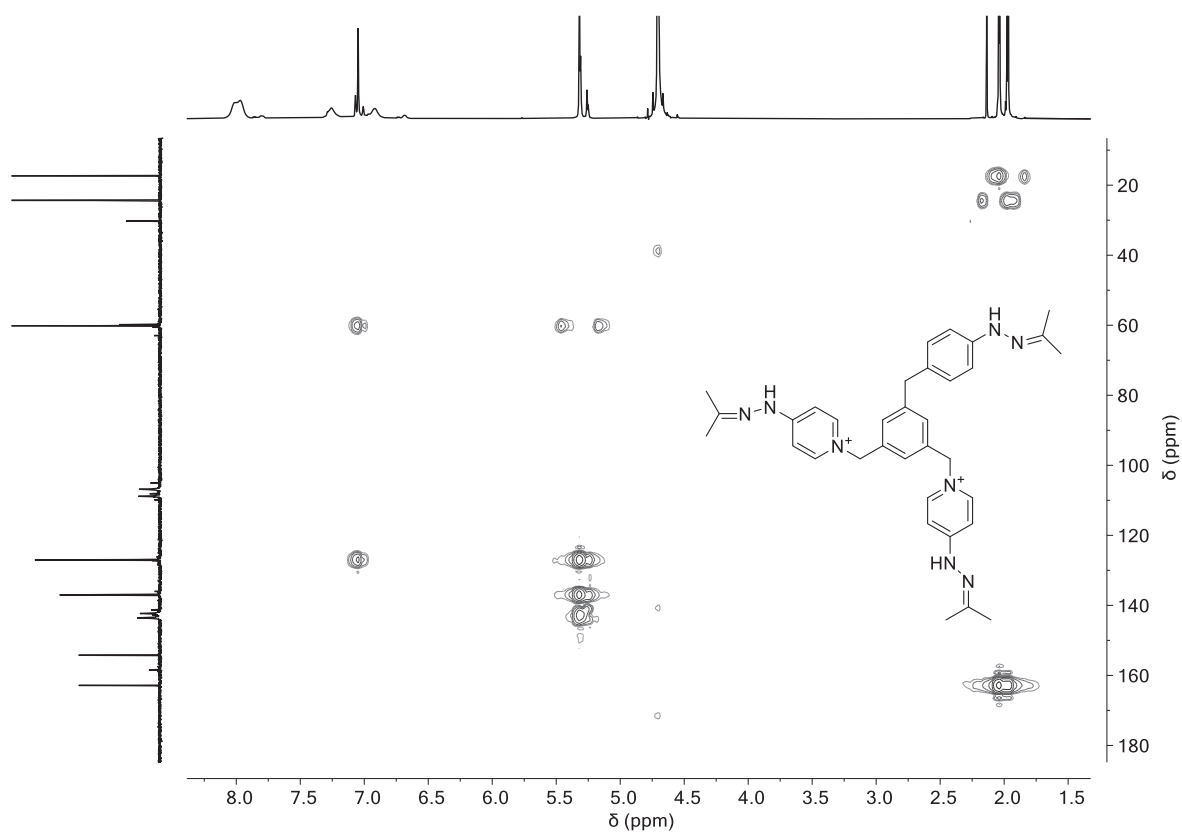


Figura 27: Espectro HMBC ( $D_2O$ , 500 e 126 MHz) de THP-3Br.

Red Box (RB-4TFA) en  $D_2O$

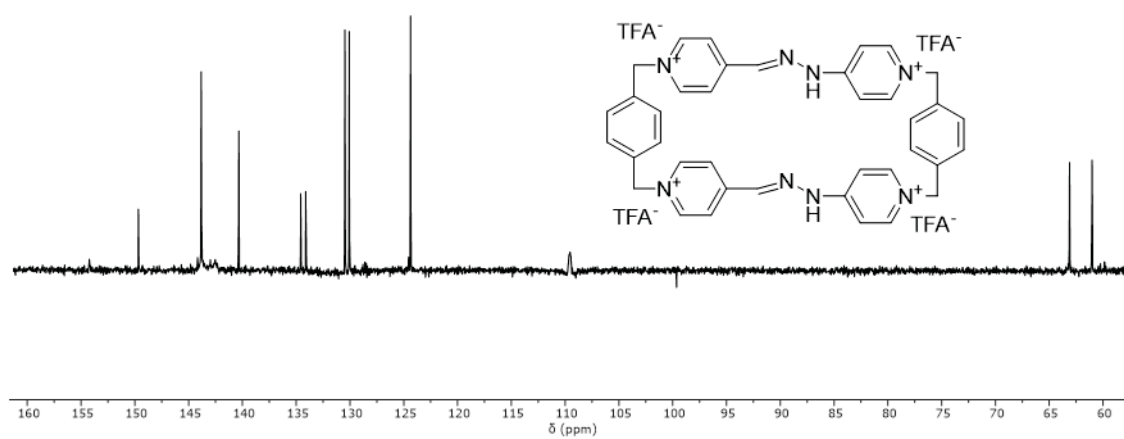
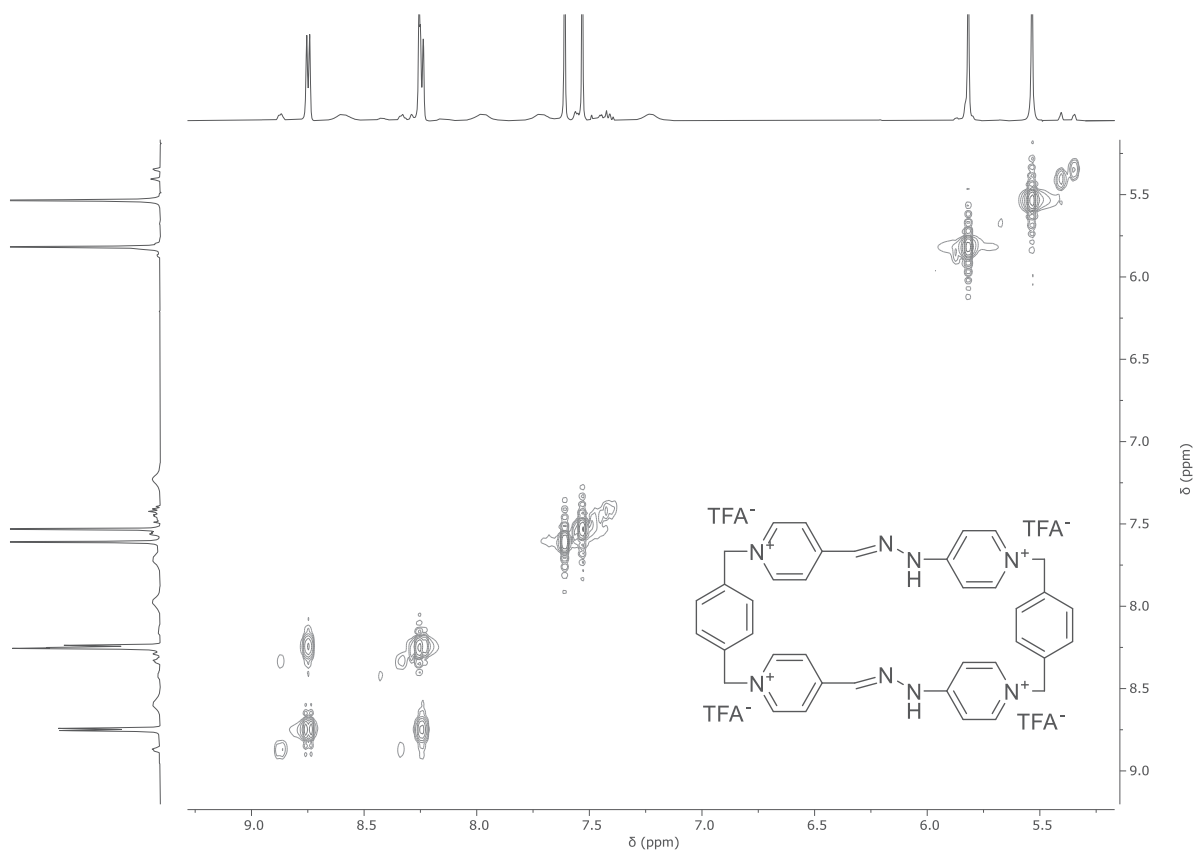
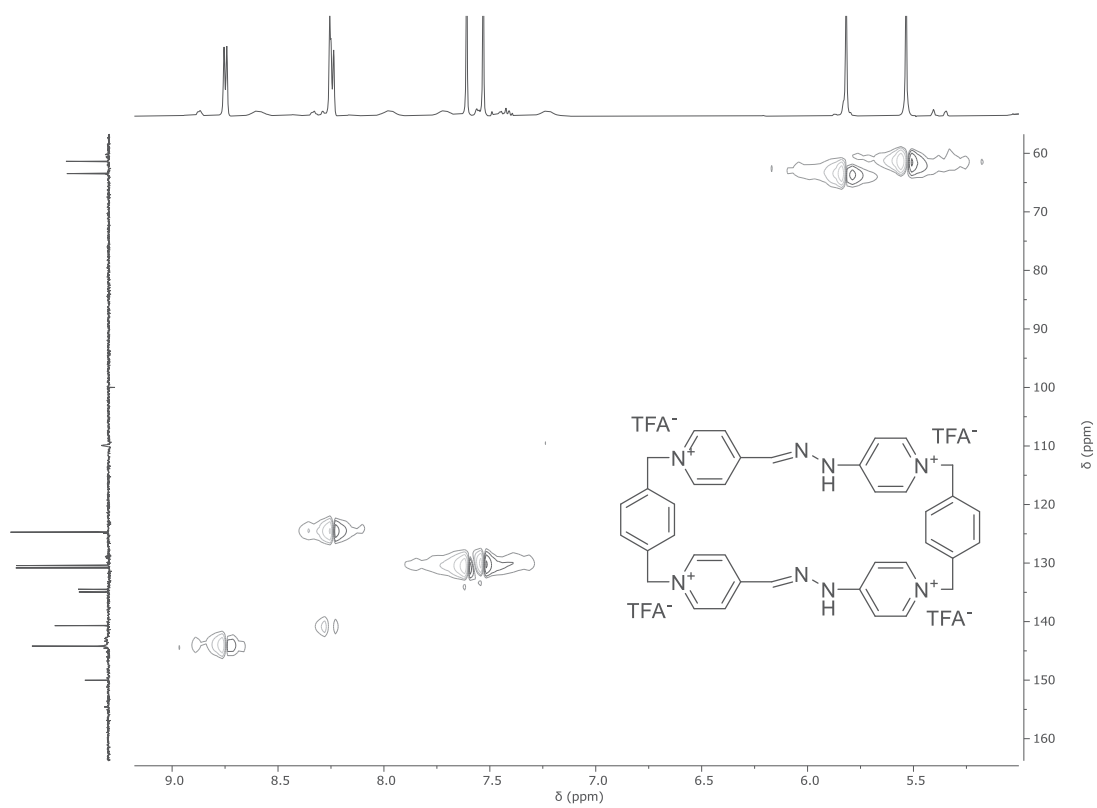


Figura 28: Espectro  $^{13}C$  RMN- ( $D_2O$ , 126 MHz) de RB-4TFA.



**Figura 29:** Espectro COSY (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) de RB·4TFA.



**Figura 30:** Espectro HSQC (D<sub>2</sub>O, 500 e 126 MHz) de RB·4TFA.

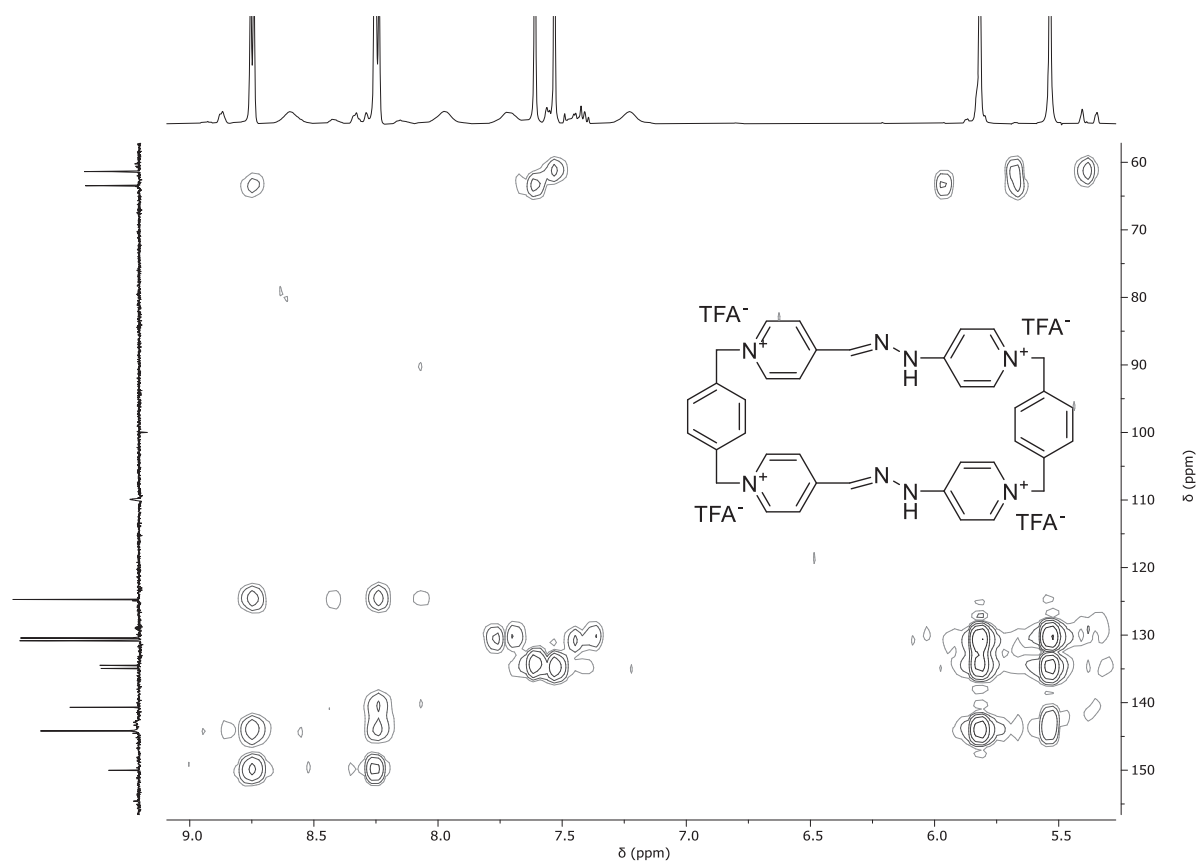


Figura 31: Espectro HMBC (D<sub>2</sub>O, 500 e 126 MHz) de RB-4TFA.

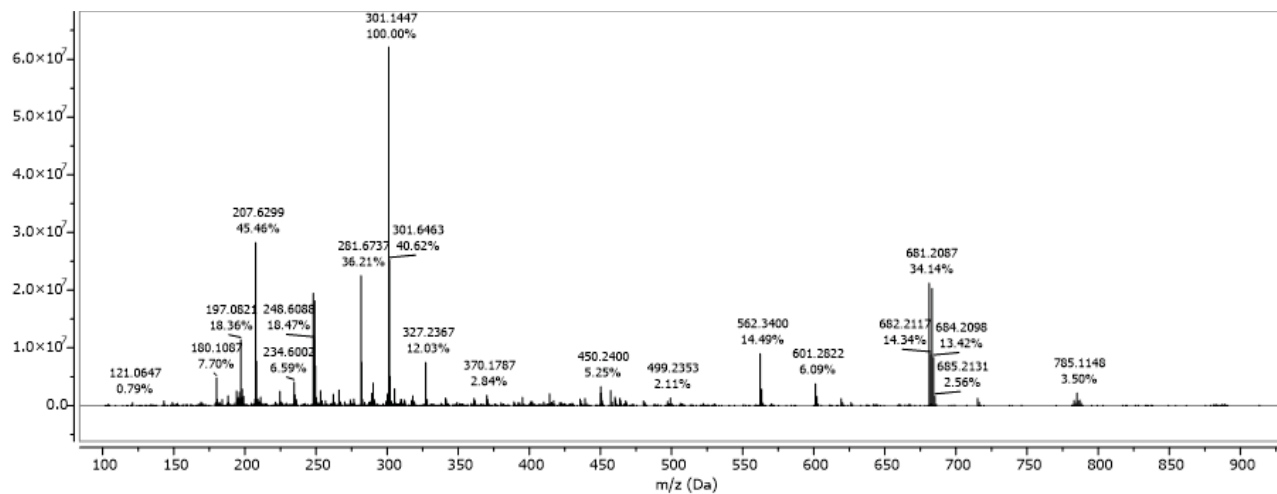


Figura 32: Espectro HR-ESI-MS de RB-4TFA

Red Box (**RB**·4PF<sub>6</sub>) en CD<sub>3</sub>CN

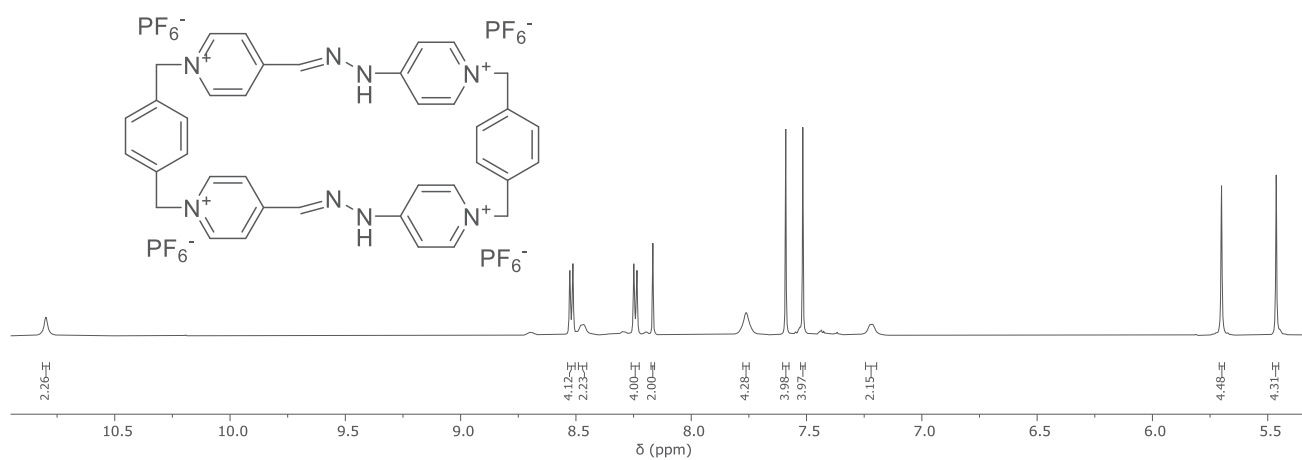


Figura 33: Espectro <sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz) de **RB**·4PF<sub>6</sub>.

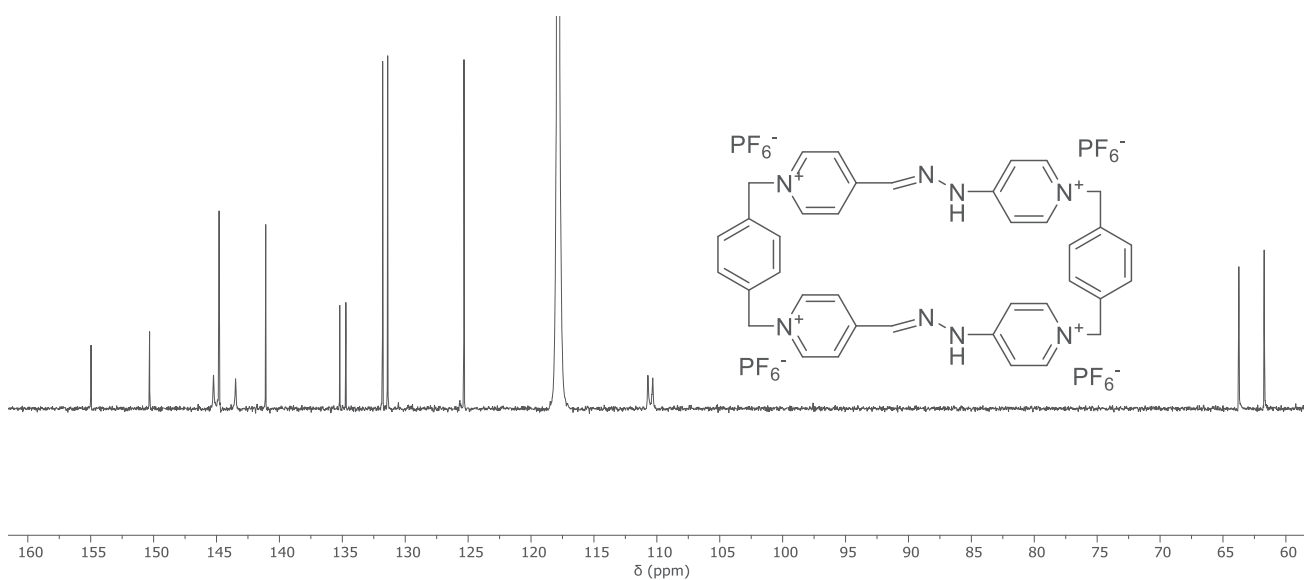
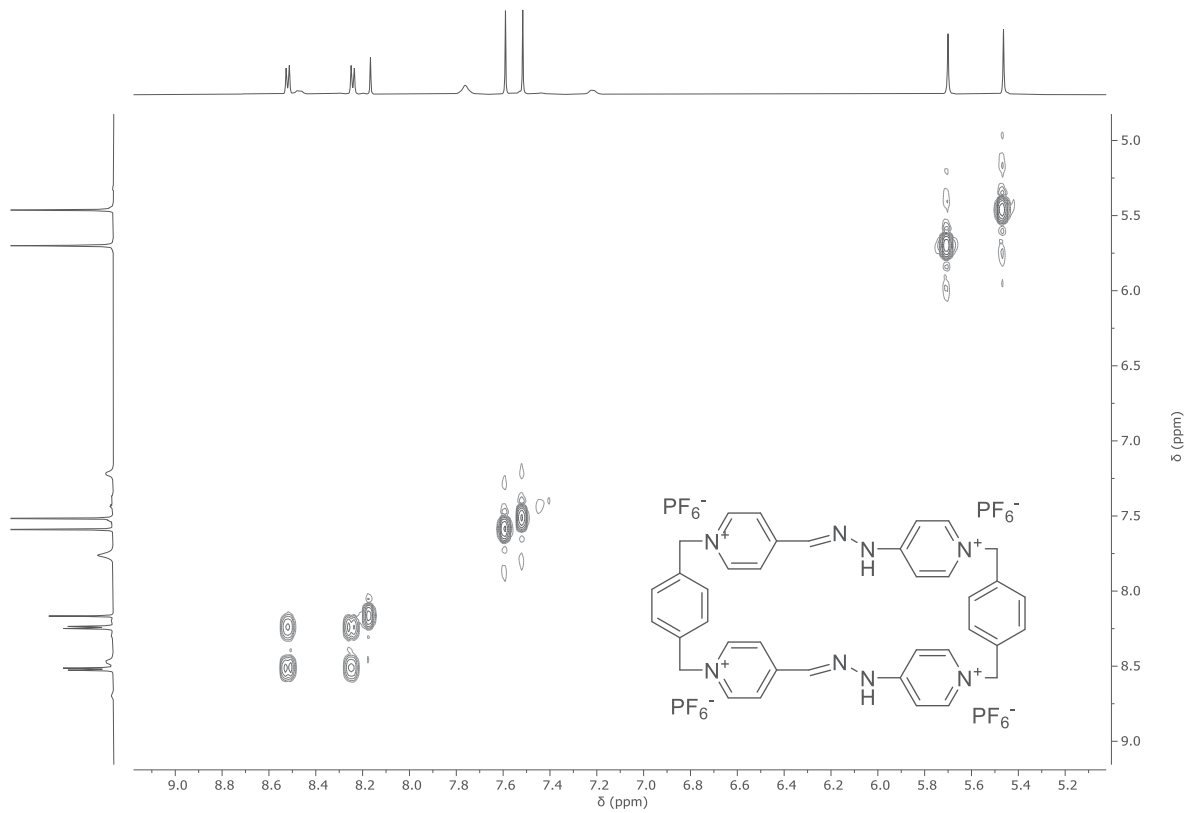
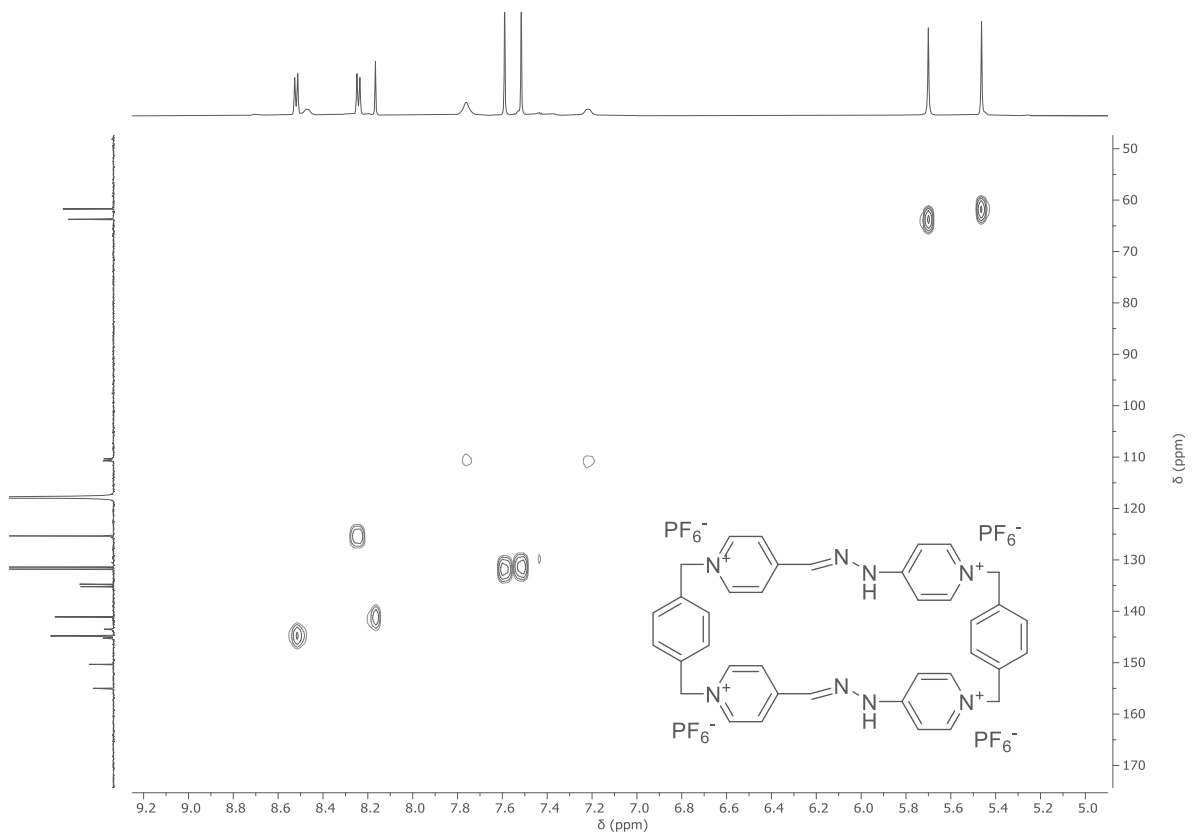


Figura 34: Espectro <sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz) de **RB**·4PF<sub>6</sub>.



**Figura 35:** Espectro COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) de  $\text{RB} \cdot 4\text{PF}_6^-$ .



**Figura 36:** Espectro HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 e 126 MHz) de  $\text{RB} \cdot 4\text{PF}_6^-$ .



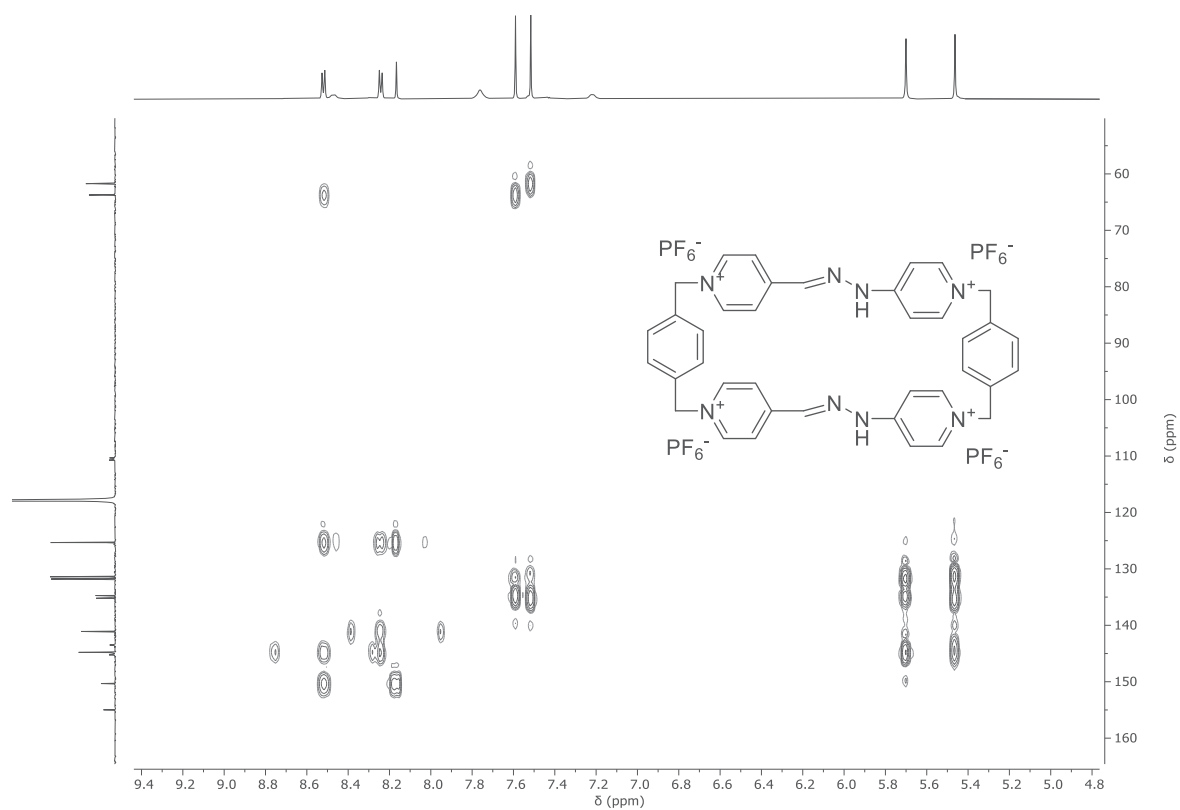


Figura 37: Espectro HMBC (CD<sub>3</sub>CN, 500 e 126 MHz) de RB·4PF<sub>6</sub>.

Red Box funcionalizada (RB<sub>F</sub>-5TFA)

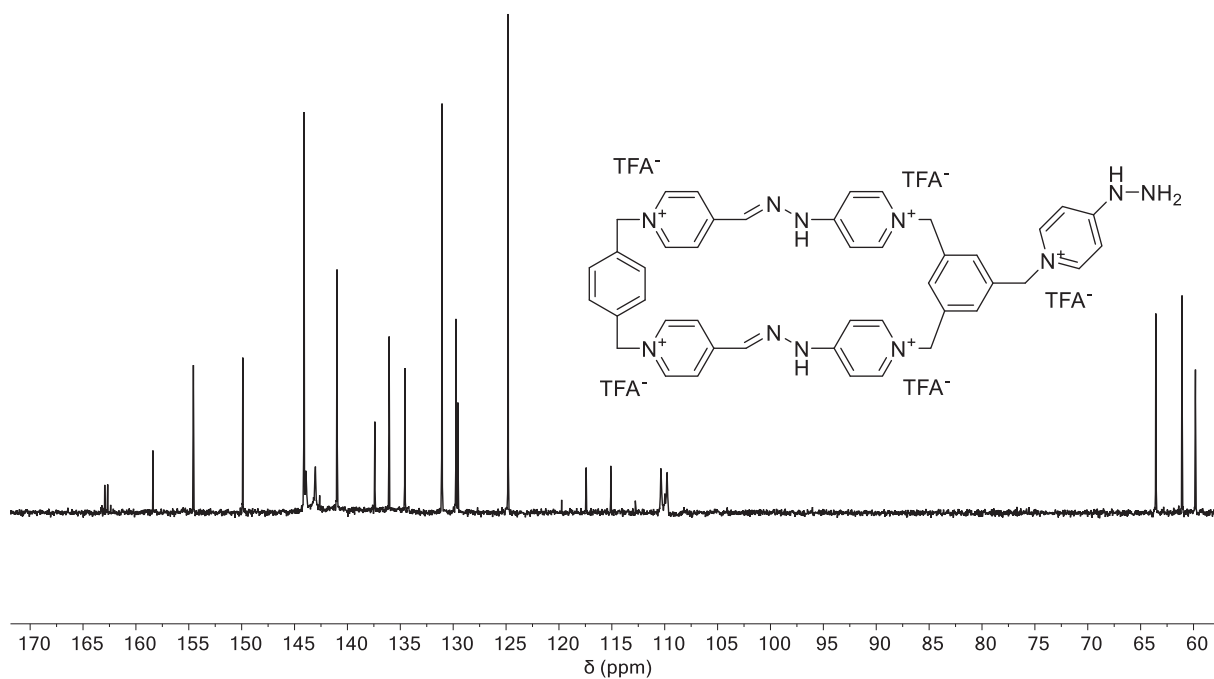


Figura 38: Espectro <sup>13</sup>C-RMN- (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) de RB<sub>F</sub>-5TFA.

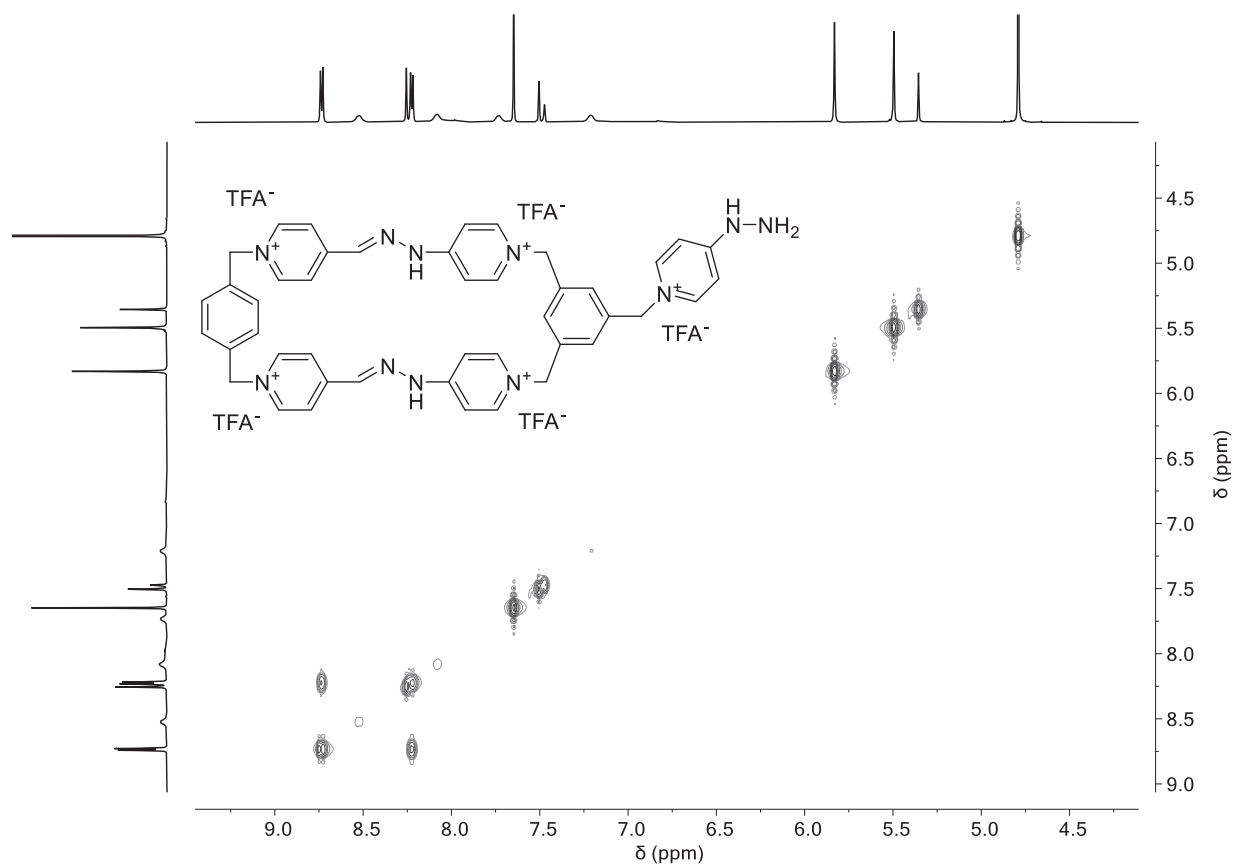


Figura 39: Espectro COSY (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) de RB<sub>F</sub>-5TFA.

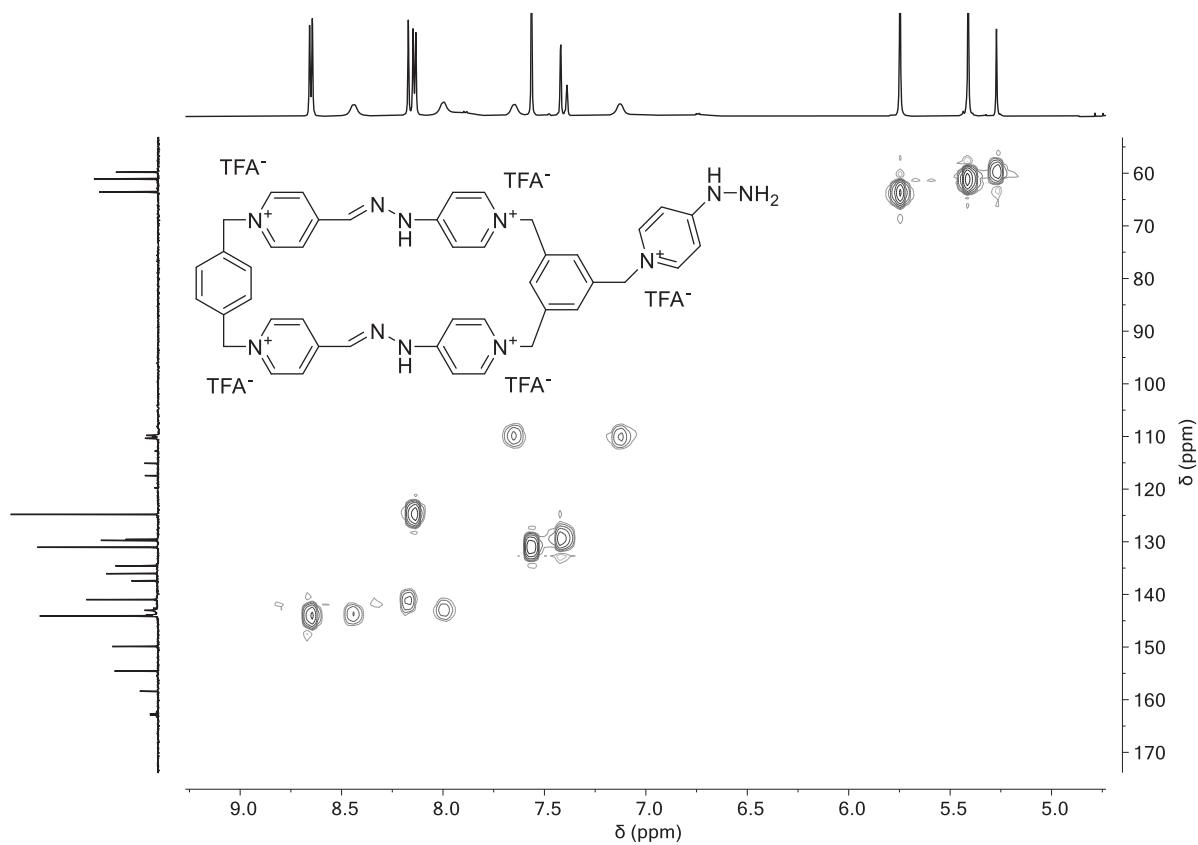


Figura 40: Espectro HSQC (D<sub>2</sub>O, 500 e 126 MHz) de RB<sub>F</sub>-5TFA.

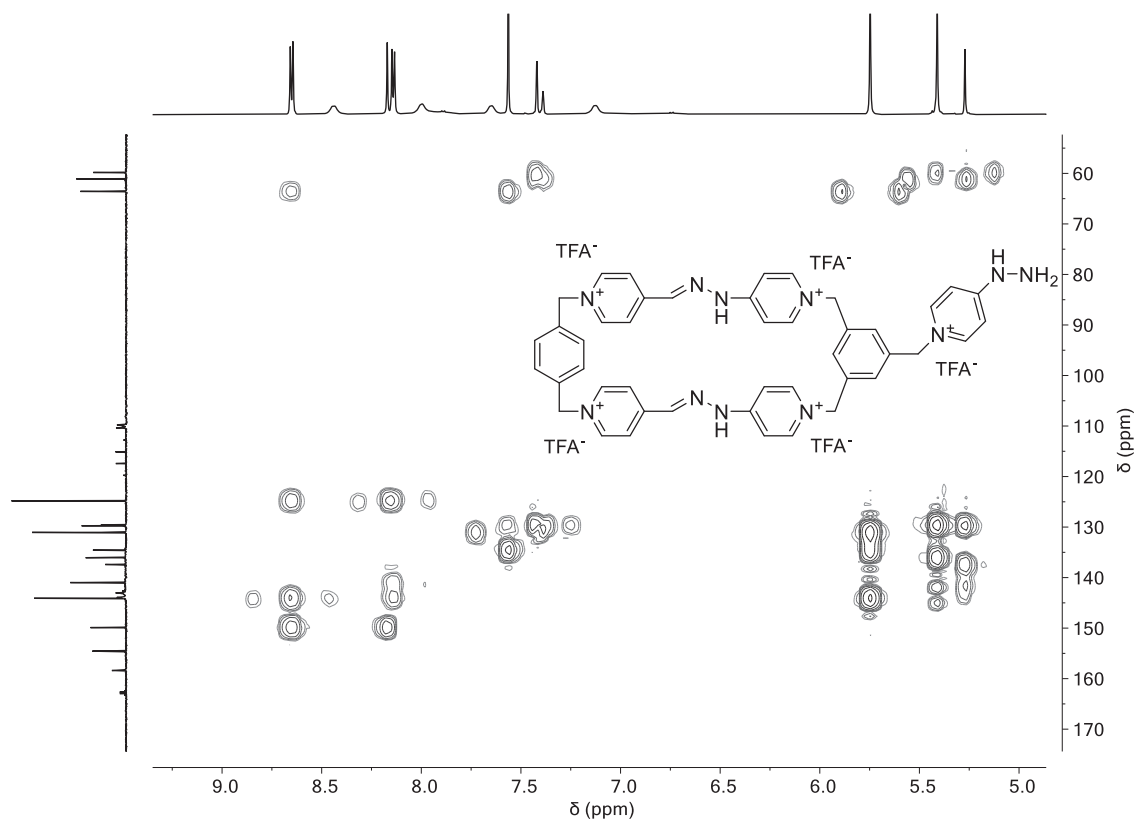


Figura 41: Espectro HMBC ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 e 126 MHz) de  $\text{RB}_F\text{-5TFA}$ .

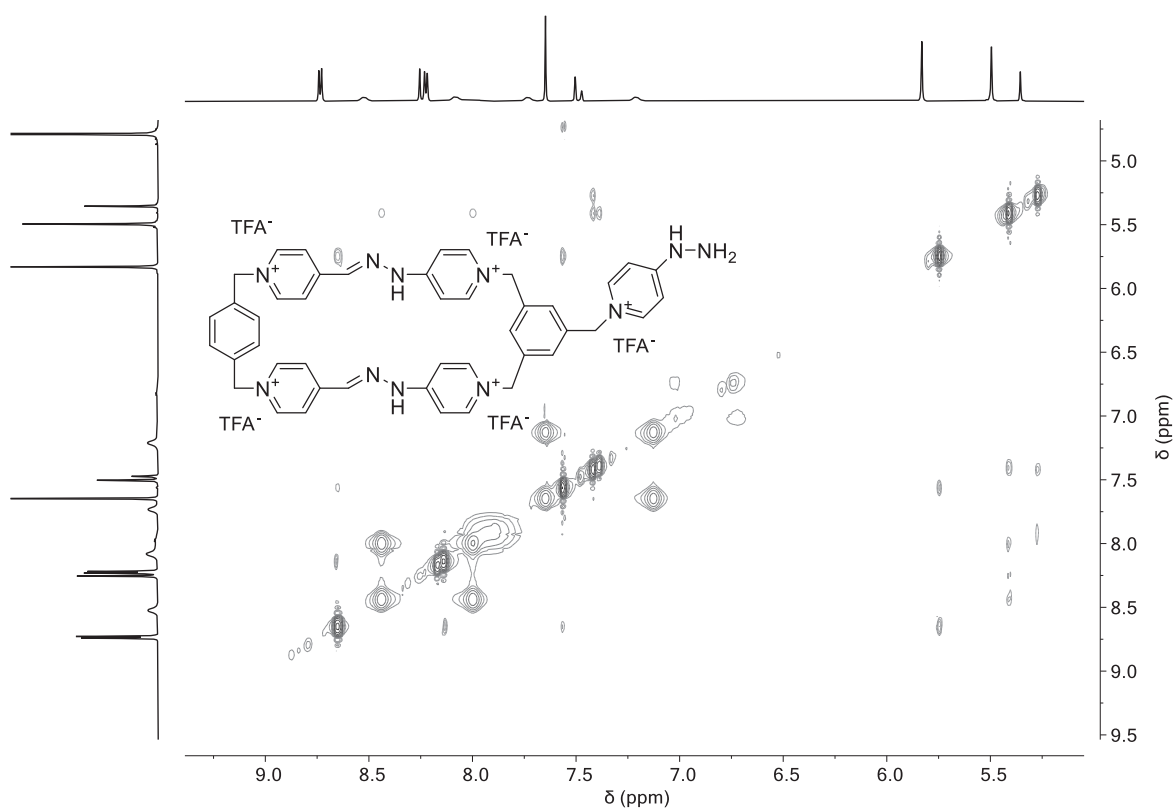


Figura 42: Espectro NOESY/EXSY ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) de  $\text{RB}_F\text{-5TFA}$ .