



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Receptores macrocíclicos orgánicos con
respuesta a estímulos para aplicaciones
biomédicas II**

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

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

Natalia Fernández Labandeira

Curso: 2020 - 2021

Convocatoria: Julio

*Directores: Marcos Daniel García Romero
Carlos Peinador Veira*

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a mis tutores, Dr. Marcos D. García Romero y Dr. Carlos Peinador Veira, por darme la oportunidad de participar en este proyecto tan apasionante, por su ayuda y apoyo constante.

Gracias a Pablo, por todo lo que me has enseñado y por tus consejos. A Paula y Lía, por echarme una mano siempre que lo necesité. A Iago y a Lili, por ayudarme cuando os pedí consejo.

Gracia a mis amigos de Simultaneidad, por todo lo que hemos vivido juntos estos últimos seis años.

Por último, gracias a mi familia, por todo.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

8MET	8-metoxipsoraleno
AIENs	Antiinflamatorio no esteroideo
Bu ₄ NCl	Cloruro de tetrabutilamonio
COSY	<i>CORrelation SpectroscopY</i> ^{1H-1H} (Espectroscopía de Correlación)
δ	Desplazamiento químico
DCC	Química Covalente Dinámica
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (Mejora sin distorsión por transferencia de polarización)
d	Doblete
eq	Equivalentes
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas con ionización por electrospray)
EXSY	<i>EXchange SpectroscopY</i> (Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser)
HA	Dialdehído
HH	Dihidrazona
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlationital</i> (Correlación Heteronuclear de Enlace Múltiple)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de Masas)
HSQC	<i>Heteronuclear Simple Quantum Correlation</i> (Correlación Heteronuclear de un Único Cuanto)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>K_a</i>	Constante termodinámica de asociación receptor-substrato
λ	Longitud de onda
m	Multiplete
m/z	Relación masa/carga
MIMs	<i>Mechanically Interlocked Molecules</i> (Moléculas mecánicamente entrelazadas)
MRB	Macrocielo <i>red box</i>
MRBf	Macrocielo <i>red box</i> funcionalizado
NAP	Naproxeno
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono

q	Cuadruplete
s	Singulete
S_N2	Reacción de sustitución nucleófila biomolecular
t_R	Tiempo de retención
TA	Trialdehido
TFA	Ácido trifluoroacético

CRONOGRAMA

Octubre 2020						
L	M	M	J	V	S	D
			1	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	

Noviembre 2020						
L	M	M	J	V	S	D
						1
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21	22
23	24	25	26	27	28	29
30						

Diciembre 2020						
L	M	M	J	V	S	D
	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13
14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31			

Febrero 2021						
L	M	M	J	V	S	D
1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28


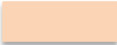

Marzo 2021						
L	M	M	J	V	S	D
1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30	31				

Abril 2021						
L	M	M	J	V	S	D
			1	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30		

Mayo 2021						
L	M	M	J	V	S	D
					1	2
3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29	30
31						

Junio 2021						
L	M	M	J	V	S	D
	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13
14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27
28	29	30				

Julio 2021						
L	M	M	J	V	S	D
	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13
14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31			

	Consulta bibliográfica
	Trabajo experimental
	Análisis de resultados y elaboración de la memoria

RESUMEN

La búsqueda de nuevos macrociclos con capacidad para complejar distintas moléculas ha despertado un gran interés en el campo de la Química Supramolecular. Concretamente, la investigación se ha centrado en aquellos capaces de responder a distintos estímulos y compatibles con el medio biológico, por su importancia en biomedicina. Uno de los macrociclos más prometedores es el ciclofano tetracatiónico *blue box*, ya que puede formar complejos de inclusión con compuestos aromáticos π -excedentes de tamaño adecuado. No obstante, su síntesis es un proceso largo, poco rentable y con bajo rendimiento. Para conseguir una síntesis más eficaz, se está desarrollando actualmente una metodología basada en la química covalente dinámica de iminas para el ensamblaje de análogos de la *blue box*. Esto ha permitido recientemente la obtención de un análogo acil hidrazona, la *white box* así como de un derivado de dihidrazona, la *red box*.

En el presente estudio se ha sintetizado el macrociclo *red box* y un análogo funcionalizado del mismo, que puede sufrir numerosas modificaciones, de forma sencilla y eficiente, gracias al ensamblaje de sus componentes mediante la formación de nuevos enlaces imina bajo control cinético. Además, se estudia el posible uso en biomedicina de la *red box*, mediante la formación de complejos de inclusión con dos sustratos de gran utilidad, como son el naproxeno y el 8-metoxipsoraleno.

PALABRAS CLAVE

Química supramolecular, complejo de inclusión, química covalente dinámica, iminas, macrociclos, ciclofanos.

RESUMO

A procura de novos macrociclos con capacidade para complexar distintas espertou un gran interese no campo da Química Supramolecular. Concretamente, a investigación centrouse naqueles capaces de responder a distintos estímulos e compatibles co medio biolóxico, pola súa importancia en biomedicina. Un dos macrociclos máis prometedores é o ciclofano tetracatiónico *blue box*, xa que pode formar complexos de inclusión con compostos aromáticos π -excedentes de tamaño adecuado. Non obstante, a súa síntese é un proceso longo e cun baixo rendemento. Para conseguir unha síntese máis eficaz, estase desenrolando unha nova metodoloxía que fai uso medio da química covalente dinámica de iminas para a ensamblaxe de análogos da *blue box*. Isto permitiu obter recentemente un análogo con un grupo acil hidrazona, a *white box* e, así como de un derivado de dihidrazona, a *red box*.

No presente estudio sintetizouse o macrociclo *red box* e un análogo funcionalizado do mesmo, que pode sufrir numerosas modificacións, de forma sinxela e eficiente, grazas á ensamblaxe dos seus compoñentes mediante a formación de novos enlaces imina baixo control cinético. Ademais, estúdase o posible uso en biomedicina da *red box*, mediante a formación de complexos de inclusión con dous substratos de grande utilidade, como son o naproxeno e o 8-metoxipsoraleno.

PALABRAS CHAVE

Química supramolecular, complexo de inclusión, química covalente dinámica, iminas, macrociclos, ciclofanos.

ABSTRACT

The search for new macrocycles with the ability to form complexes with several molecules of interest is highly relevant in the field of Supramolecular Chemistry. Specifically, research has been focused on those macrocycles capable of reacting to different stimuli on a biological environment, due to their importance in the field of biomedicine. One of the most promising macrocycles is the tetracationic cyclophane *blue box*, as it can form inclusion complexes with suitably-sized aromatic π -donors. However, its synthesis is a long kinetically-controlled low yielding process. To achieve an efficient synthesis, a new methodology is currently being developed, that makes use of dynamic covalent chemistry of imines for the assembly of *blue box* analogues. This has made possible the development of an acyl hydrazone analogue, the *white box*, and, more recently, a dihydrazone derivative, the *red box*.

In the present study, the *red box* macrocycle and a functionalized analogue have been synthesized, which can undergo various modifications, in a simple and efficient way, thanks to the assembly of its components through the formation of new imine bonds under kinetic control. In addition, the possible use in biomedicine of the *red box* is studied, through the formation of inclusion complexes with two very useful substrates, such as naproxen and 8-methoxypsoralen.

KEYWORDS

Supramolecular chemistry, inclusion complex, dynamic covalent chemistry, imines, macrocycles, cyclophanes.

ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
1.1.	El desarrollo de la química supramolecular	1
1.2.	Química <i>host-guest</i>	2
1.3.	Preorganización y complementariedad receptor-sustrato	3
1.4.	Química covalente dinámica y química supramolecular.....	3
1.5.	Enlace covalente dinámico de iminas	5
1.6.	Interés de los compuestos supramoleculares en biomedicina	6
1.7.	Antecedentes: los ciclofanos <i>blue box</i> , <i>white box</i> y <i>red box</i>	8
2.	Objetivos.....	11
3.	Resultados y discusión	12
3.1.	Síntesis y caracterización de <i>bloques de construcción</i>	12
3.1.1.	Síntesis de la dihidrazona (HH ·2Br).....	12
3.1.2.	Síntesis del dialdehído (DA ·2Br).....	14
3.1.3.	Síntesis del trialdehído (TA ·3Br).....	15
3.2.	Síntesis, purificación y caracterización de los macrociclos	20
3.2.1.	Formación del macrociclo <i>red box</i> (MRB ·4X) y del análogo (MRBf ·5X)	20
3.2.2.	Purificación de MRB ⁴⁺ y MRBf ⁵⁺ mediante HPLC semipreparativa en fase reversa.....	22
3.2.3.	Elucidación estructural de MRB ⁴⁺ y MRBf ⁵⁺ mediante RMN.....	23
3.3.	Estudios de complejación entre el receptor <i>red box</i> y sustratos modelo	30
3.3.1.	Naproxeno⊂ <i>red box</i> (NAP ⊂ MRB ⁴⁺)	31
3.3.2.	8-metoxipsoraleno⊂ <i>red box</i> (8MET ⊂ MRB ⁴⁺)	33
4.	Parte experimental	34
4.1.	Materiales y equipos usados	34
4.2.	Procesos experimentales	35

4.2.1.	Síntesis de la dihidrazona (HH ·2Br).....	35
4.2.2.	Síntesis del dialdehído (DA ·2Br).....	36
4.2.3.	Síntesis del trialdehído (TA ·3Br).....	36
4.2.4.	Ensamblaje y purificación del macrociclo <i>red box</i> funcionalizado (MRBf ·5TFA).....	37
4.2.5.	Ensamble y purificación del macrociclo <i>red box</i> (MRB ·4Br).....	39
4.2.6.	Síntesis de los complejos de inclusión. NAP ⊂ MRB ⁴⁺ y 8MET ⊂ MRB ⁴⁺ ..	40
5.	Conclusiones.....	42
6.	Bibliografía.....	44
	ANEXO	47

1. Introducción

1.1. El desarrollo de la química supramolecular

El término química supramolecular hace referencia a la rama de la química dedicada a la creación de estructuras complejas mediante el autoensamblaje de componentes moleculares más simples.¹ En 1987, el Premio Nobel de Química les fue concedido a Jean-Marie P. Lehn, Donald J. Cram y Charles J. Pedersen por sus estudios pioneros en este campo. En su discurso, Lehn definió la química supramolecular como “la química más allá de la molécula” o “la química del enlace intermolecular”, destacando la importancia del desarrollo, diseño y estudio de moléculas macrocíclicas, moléculas cíclicas de gran tamaño que presentan sitios potenciales de unión para otras moléculas de menor tamaño.²

Dentro de este campo, la investigación se ha centrado en la búsqueda de reacciones de autoensamblaje, en donde la interacción entre las moléculas no es necesariamente de naturaleza covalente, como en el caso de las interacciones metal-ligando, sino que son fuerzas más débiles las que mantienen unidas a las moléculas, como son el enlace de hidrógeno, las interacciones ión-ión, ión-dipolo, apilamiento π - π , las fuerzas de Van der Waals o el efecto hidrofóbico, de forma que se establece un equilibrio reversible entre los productos de partida y el macrociclo.¹

El nacimiento de la química supramolecular está estrechamente ligado a los trabajos de Pederson, Lehn y Cram. En 1967, Pederson descubrió una nueva categoría de poliéteres cíclicos, los éteres corona, gracias al hallazgo casual del dibenzo-18-corona-6. La capacidad de estos macrociclos para actuar como agentes complejadores de cationes metálicos, fue un punto de partida para el diseño de poliéteres funcionalizados más complejos. En 1969, Lehn ideó una nueva ruta sintética en la cual se introducían variaciones en los grupos dadores de oxígeno de los éteres corona, obteniendo el diaza-18-corona-6, precursor del [2,2,2]-criptando, ligando polidentado tridimensional con mayor afinidad por metales alcalinos y lantánidos. Ampliando los estudios de Pederson y Lehn, Cram diseñó los esferandos, éteres cíclicos con capacidad para alojar en su interior moléculas de bajo peso molecular, de diferente geometría y cationes metálicos. En este contexto, fue Cram quien acuñó el término *host-guest chemistry* (Química receptor-sustrato) para referirse a lo que Lehn llamaría más tarde química supramolecular.^{3,4}

A lo largo de las siguientes décadas, se han sintetizado una gran cantidad de macrociclos, como coronandos, cucurbiturilos, cilodextrinas, calixarenos, pilarenos y

otros ciclofanos, centrando la investigación en el ámbito del reconocimiento molecular y los procesos de autoensamblaje, así como en la obtención de macrociclos tridimensionales, rígidos y con respuesta a estímulos.^{1,5,6}

En lo referido a la evolución contemporánea de la disciplina, en 1983, Jean-Pierre Sauvage fue el primero en desarrollar un catenano, especie formada por dos anillos entrelazados. En 1991, James F. Stoddart sintetizó un rotaxano, compuesto por un macrociclo que contiene a otra molécula con forma de mancuerna. Finalmente, en 1999, Bernard L. Feringa diseñó el primer motor molecular. El descubrimiento de los catenanos y rotaxanos (MIMs - *Mechanically Interlocked Molecules*), moléculas que se encuentran entrelazadas a un macrociclo mediante un “enlace mecánico” y no se pueden separar sin la ruptura o distorsión de los enlaces covalentes que forman el macrociclo, ha permitido el estudio de la mecánica a nivel molecular.^{7,8} Así, en 2016 se le concedió el Premio Nobel de Química a Sauvage, Stoddart y Feringa por “el diseño y síntesis de las máquinas moleculares”. Estos descubrimientos en los campos de la química supramolecular y la mecanoestereoquímica, tendrán una gran importancia en un futuro cercano, permitiendo por ejemplo en la creación de nuevos materiales, sensores inteligente o nuevos sistemas de almacenamiento de energía más eficientes.⁹

1.2. Química *host-guest*

La química *host-guest* fue definida por Donald Cram a raíz de sus estudios en el diseño de moléculas (*host* o receptor), capaces de interaccionar de manera específica con diversas sustancias (*guest* o sustrato). El estudio de este fenómeno tiene su origen en el modelo de *lock and key* de catálisis enzimática propuesto por Emil Fisher en 1894, que describe la unión receptor-sustrato mediante una analogía: “*al igual que una llave encaja en una cerradura*”, la geometría de ambas tiene que ser complementaria, lo que permite discernir entre los diferentes sustratos (**Figura 1**). Asimismo, es importante enfatizar también el concepto de receptor biológico, establecido por Paul Ehrlich en 1906, a raíz de sus estudios con anticuerpos, que establece que las moléculas necesitan de su unión para actuar.¹ Por lo tanto, al tomar como referencia estos conceptos, Cram define a un complejo *host-guest* como la unión de dos moléculas, receptor y sustrato, mediante fuerzas de enlace intermoleculares débiles, de forma que hay una disposición estereoelectrónica complementaria de los sitios de unión. El receptor suele ser un compuesto cíclico que posee una cavidad central con sitios de unión convergentes con la que interacciona el sustrato, que precisa tener el tamaño adecuado para introducirse en la cavidad del receptor y sitios

de unión divergentes. El sustrato puede ser desde un catión o un anión hasta moléculas más complejas, como una hormona o un neurotransmisor.⁴

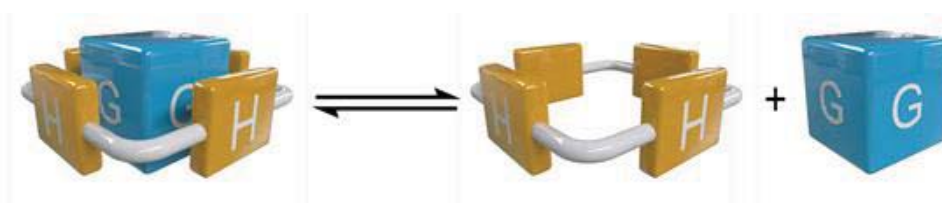


Figura 1. Representación del equilibrio de disociación *host-guest* $H \cdot G \rightleftharpoons H + G$.¹⁰

1.3. Preorganización y complementariedad receptor-sustrato

De acuerdo al principio de interacción de la química *host-guest*, el receptor **H** debe tener sitios de unión complementarios al sustrato **G** (sitios de unión convergentes y divergentes, respectivamente), como pueden ser polaridades opuestas o comportarse como dadores y aceptores de enlace de hidrógeno. Además, deben tener una conformación que facilite la interacción entre ambos en los sitios de unión receptor-sustrato **H·G**. Así, el principio de preorganización establece que cuantos menos grados de libertad presenten receptores y sustratos para la unión, mayor será la interacción entre ambos ($\uparrow K_a$). Por tanto, si existe una cierta geometría relativa adecuada en los componentes, el coste energético para cambiar a la conformación más favorable será bajo. Esta energía será fácilmente compensada por la energía liberada de la unión del receptor-sustrato, en un proceso favorable entálpicamente.^{11,12,13} Asimismo, también estaría favorecida la interacción desde el punto de vista entrópico, al no producirse una gran pérdida de grados de libertad (ordenamiento) al interactuar el receptor-sustrato si, por ejemplo, se compara ésta con la producida entre un receptor acíclico y un sustrato.

Al cambiar el grado de preorganización y de complementariedad del receptor y del sustrato, se puede modificar la selectividad termodinámica de la reacción, que es la relación entre la constante de equilibrio de dos sustratos distintos. Pero hay que tener en cuenta también existe una selectividad cinética, relacionada con la velocidad de unión de los distintos sustratos, por la que se unirá preferentemente el sustrato que más rápido interactúe con el receptor y no aquel que forme un enlace más fuerte.¹

1.4. Química covalente dinámica y química supramolecular

La química covalente dinámica (DCC), se refiere a reacciones químicas reversibles de formación de enlaces covalentes donde, si el proceso es lo suficientemente rápido, se originan productos bajo control termodinámico donde su

proporción depende solo de la estabilidad relativa de los mismos. En contraposición, las reacciones bajo control cinético producen una reacción irreversible al formarse un nuevo enlace covalente, y la proporción relativa de los productos finales depende de la diferencia de energía entre los estados de transición.¹⁴ La DCC es, por tanto, de gran utilidad para la formación y ruptura de enlaces covalentes bajo control termodinámico, permitiendo modificar las proporciones de los productos finales en base a las condiciones de reacción.¹³ Además, la falta de estabilidad cinética de los productos obtenidos mediante interacciones no covalentes es mejorada mediante el empleo de DCC, al tratarse en general de procesos lentos, que requieren de la ruptura de enlaces covalentes, necesitando muchas veces incluso la acción de una catálisis.¹⁴ Así, en general, podríamos resumir que la DCC presenta las ventajas de la química supramolecular, pero con la obtención de especies cinéticamente más inertes.¹⁵

En el contexto de la química orgánica, es bien sabido que muchas reacciones cumplen los criterios de la DCC, por ejemplo en procesos donde dos moléculas se condensan reversiblemente para generar un nuevo producto liberando una pequeña molécula (por ejemplo agua). Del mismo modo, se podrían pensar en intercambios directos, donde tanto en los productos de partida como en los finales existe el mismo tipo de enlace covalente.¹⁴ Así, entre las reacciones más representativas de la DCC se encuentran la formación del enlaces imina, disulfuro, la adición conjugada, la transesterificación o la cicloadición de Diels-Alder (**Figura 2**).¹⁶

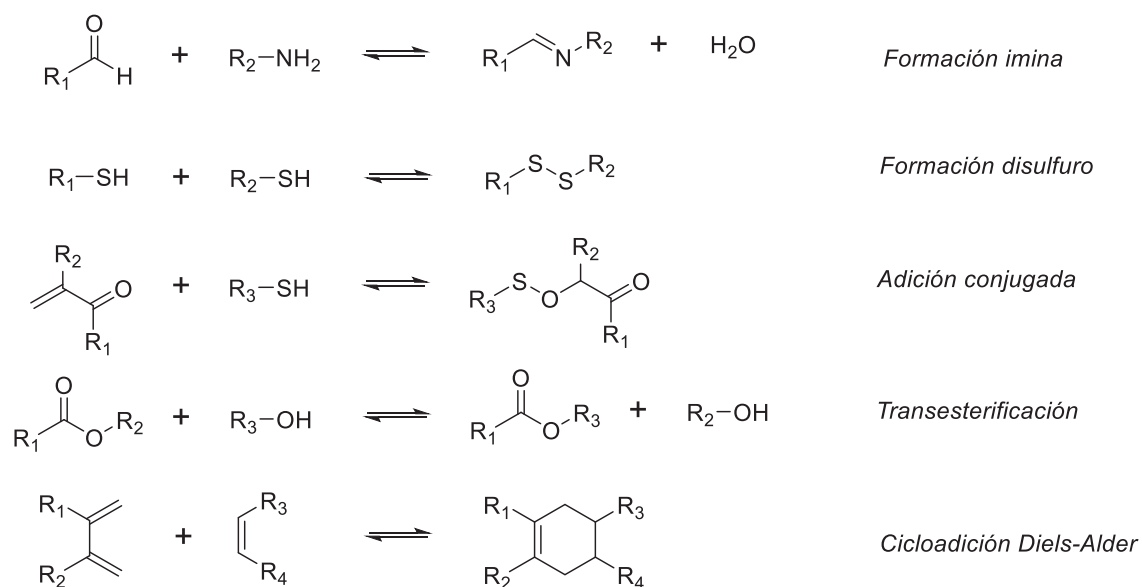


Figura 2. Principales reacciones de la química covalente dinámica.¹⁶

1.5. Enlace covalente dinámico de iminas

Las iminas, $RR^1C=NR^2$ (**Figura 3**), presentan uno de los enlaces más usados en DCC ya que permite la síntesis de productos de control termodinámico muy inertes cinéticamente en un corto período de tiempo. Debido a la existencia del doble enlace, presentan isomería E/Z, siendo generalmente más estable el isómero E.¹³

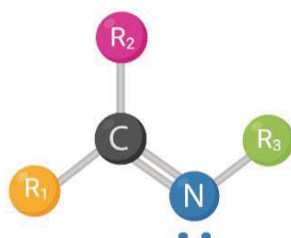


Figura 3. Representación del enlace imina, $R_1R_2C=NR_3$, (R_{1-3} = arilo, alquilo o H).¹³

La reacción de formación del enlace imina es resultado de la condensación de una amina y un aldehído (generalmente en condiciones azeotrópicas y/o con catálisis ácida), en la cual se pierde una molécula de agua y se forma un nuevo enlace C=N intra o intermolecularmente (**Figura 4**). Así, se puede modificar fácilmente el equilibrio hacia la formación de la imina, simplemente retirando el agua de la reacción.

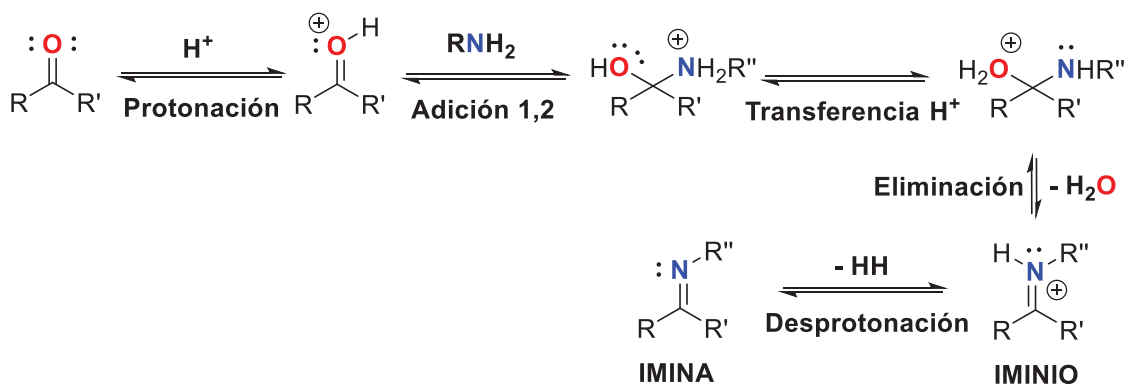


Figura 4. Mecanismo de formación del enlace imina

En cambio, si se añade agua a una imina, el equilibrio se desplaza hacia la formación de los reactivos y ocurre la reacción inversa, la hidrólisis. Asimismo, las iminas también pueden experimentar otros equilibrios como las reacciones de intercambio del grupo R (transiminación), o la metátesis entre dos iminas (**Figura 5**).¹⁵

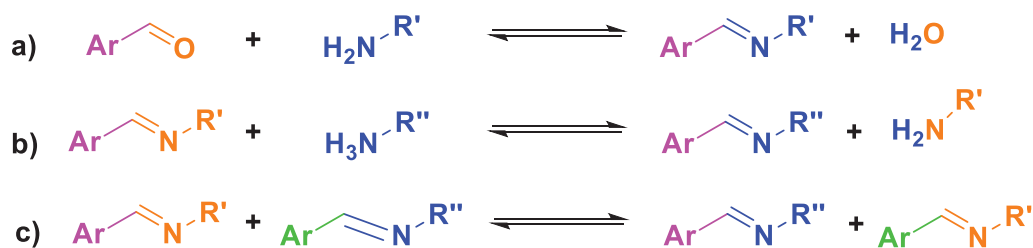


Figura 5. Reacciones típicas de iminas: a) Formación/Hidrólisis, b) Intercambio y c) Metátesis.¹⁵

Otros grupos funcionales muy relacionados con las iminas, como las hidrazonas ($\text{R}^1\text{R}^2=\text{NNHR}^3$) y las oximas ($\text{R}=\text{OH}$), presentan una reactividad análoga a la de las éstas.¹³ Asimismo, debido al efecto del heteroátomo en posición α , hidrazonas y oximas muestran una mayor estabilidad que las iminas en agua. Este efecto, denominado mesomérico, disminuye la electrofilia del enlace $\text{C}=\text{N}$, y produce compuestos que son considerados cinéticamente inertes en condiciones neutras y en agua pura. Al igual que las iminas, pueden experimentar las mismas reacciones de hidrólisis, intercambio y metátesis bajo catálisis ácida,¹⁵ lo cual las convierte en unos compuestos de interés en la DCC porque permiten construir moléculas complejas como MIMs (catenanos, rotaxanos, macrociclos y otros receptores) para su aplicación en medicina, materiales inteligentes y en catálisis.¹³

1.6. Interés de los compuestos supramoleculares en biomedicina

Los descubrimientos de Lehn, Cram y Pedersen supusieron un punto de partida en la búsqueda de nuevos sistemas *host-guest* para el desarrollo de sensores, materiales, dispositivos electrónicos y catalizadores. Gracias a esta asociación *host-guest*, dos o más estructuras químicas se pueden integrar rápida y reversiblemente, generando complejos de alta estabilidad, por lo que hay infinitas posibilidades a la hora de componer nuevas supramoléculas funcionales.¹⁷ Las estructuras formadas por enlaces no covalente o covalentes dinámicos poseen ciertas propiedades únicas (reversibilidad, capacidad de respuesta dinámica a estímulos físico-químicos, auto-fabricación adaptativa, posible reconfiguración de su forma, degradabilidad, etc.), que son de gran utilidad en biomedicina y en ciencia de los materiales. Que su estructura pueda ser modificada fácilmente cambiando el diseño de los *bloques de construcción*, permite además tener diferentes estructuras multivalentes, lo que puede resultar de gran importancia en la obtención de compuestos bioactivos.¹⁶

Además, los materiales supramoleculares, incluidos aquellos basados en sistemas *host-guest*, pueden responder a cambios o estímulos del medio externos al

sistema. Estos incluyen desde factores intrínsecos (temperatura del sistema, concentración de componentes, etc.), hasta factores extrínsecos (pH, potencial eléctrico o la luz), pudiendo modificar la especiación del sistema hacia formas más estables termodinámicamente. Este comportamiento les posibilita un alto grado de ajuste a los ambientes biológicos, donde pequeñas modificaciones en el ambiente fisicoquímico posibilitan la adaptación supramolecular.¹⁶

Es por ello que, recientemente, ha adquirido una gran relevancia el estudio de los macrociclos para su uso como receptores en el campo de la biomedicina. Se han diseñado así desde interruptores supramoleculares hasta biogeles, micelas o nanopartículas capaces de producir la liberación controlada de sustancias de interés biomédico como fármacos, agentes teragnósticos o diagnósticos (**Figura 6**). Algunos de los macrociclos de especial interés son los éteres corona, calixarenos, ciclodextrinas (CDs), cucurbiturilos (CBs) y pilarenos, que muestran buenas biocompatibilidades con el medio biológico y una baja citotoxicidad. Todos presentan cavidades hidrofóbicas para incluir en su interior, de manera específica, otras moléculas de tamaño y forma adecuadas interaccionando con ellas a través de fuerzas no covalentes. La especificidad y versatilidad de estos macrociclos permiten su uso en distintas aplicaciones biomédicas (por ejemplo: transporte y administración de fármacos y genes, la terapia fotodinámica (PDT) o bioimagen.^{16,17}

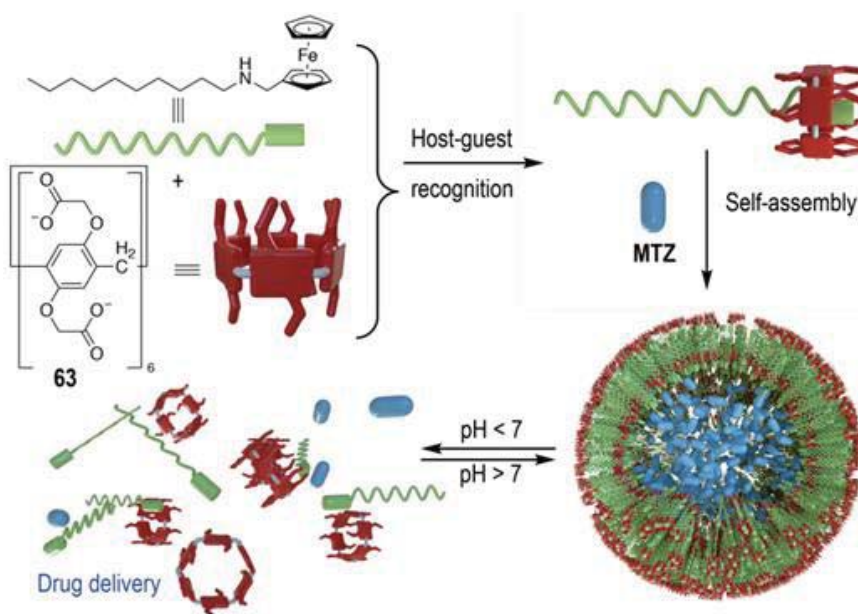


Figura 6. Ejemplo de sistema host-guest con respuesta a pH para la liberación controlada del fármaco antiparasitario metronidazol.¹⁰

1.7. Antecedentes: los ciclofanos *blue box*, *white box* y *red box*

La familia de macrociclos compuesta por el ciclobis(paraquat-*p*-fenileno) o *blue box* y sus derivados, está compuesta por ciclofanos con unidades de bipyridinio π -deficientes. A mediados de los años 80, el grupo de J. F. Stoddart logró con éxito la síntesis de MIMs, como los catenanos y los rotaxanos,^{8,18} gracias a la fuerte interacción entre derivados de 4,4'-bipyridinio y substratos complementarios macrocíclicos π -excedentes.^{19,20} Este trabajo fue la base para que, en 1988, el grupo sintetizase por primera vez la *blue box*, macrociclo tetracatiónico rígido formado por dos unidades de 4,4'-bipyridinio unidas a través de grupos *p*-xileno. Así, el ciclofano resultante posee una cavidad interior hidrofóbica que se ha demostrado no solo óptima para el reconocimiento de sustratos π -excedentes de distintos tamaños, sino también para el desarrollo de máquinas moleculares mucho más complejas pero que toman esta interacción receptor-sustrato como base.^{21,22,23} Además de producirse reacciones de transferencia de carga π - π con huéspedes ricos en electrones, en medios orgánicos los complejos se ven aún más estabilizados por interacciones de Van der Waals (ambos anillos bipyridinio se encuentran a una distancia de unos 3.7 Å)²⁴ y por enlaces de hidrógeno [C—H $\cdots\pi$], entre átomos de H del sustrato y el fenileno, o [C—H \cdots O], en caso de haber huéspedes con grupos éter o éster (**Figura 7**). En contraposición en, medios acuoso, el factor hidrofóbico se antoja como el más importante motor en el reconocimiento, ya que los sustratos aromáticos se encuentran mejor solvatados y estabilizados en el interior de la cavidad hidrofóbica del macrociclo que en la disolución.²²

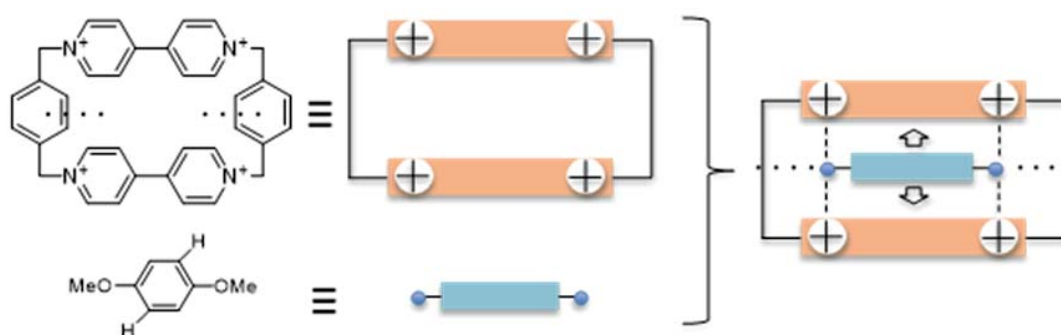


Figura 7. Representación esquemática del ciclobis paraquat-*p*-phenylene como receptor.²¹

Otra característica que convierte a la *blue box* en un receptor único es la existencia de un equilibrio redox por la reducción de las unidades bipyridinio, que conduce a la formación de un catión radical estabilizado de color azul intenso, el cual da nombre al receptor. Así, la fuerza aceptora del macrociclo se puede controlar de forma reversible con el potencial redox (*redox-switchable ligands*).²⁴

A pesar de la gran utilidad de la *blue box*, ésta resulta difícil de preparar y modificar debido a la utilización de control cinético en la etapa clave de macrociclación, siendo además un proceso económicamente costoso. En este contexto, se han buscado nuevos métodos de síntesis más eficientes y simples, haciendo uso de *templates*, altas temperaturas y presiones, etc. y que aún pueden ser optimizados.^{18,22} En esta dirección, el grupo QUIMOLMAT se ha dedicado en los últimos años a desarrollar análogos de la *blue box* cuya síntesis es más sencilla y económica, y que, a diferencia de esta, presenten un carácter dinámico.²⁵ Así, en el año 2018, haciendo uso de la DCC de hidrazonas en medio acuoso, se sintetizó un análogo de la *blue box*, la *white box*. Este nuevo receptor se sintetizó, mediante catálisis ácida, a partir de una mezcla equimolar de dos moléculas complementarias de bis(piridinio)xilileno, de carácter hidrofílico y π -deficientes. El ciclofano resultante reconoce diversos sustratos orgánicos gracias a interacciones hidrofóbicas, *host-guest* π - π y C—H \cdots π . Además de ser una molécula dinámica en agua por la existencia del enlace imina, la *white box* presenta una gran sensibilidad al pH, por la naturaleza ácida de los protones amida ($pK_a = 6.5$). En un medio ácido, el macrociclo es conformacionalmente flexible, presenta isomería rotacional y sigue el modelo de ajuste inducido en los proceso *host-guest*. Por el contrario, en medio suficientemente básico, dos cargas negativas generadas se deslocalizan en los anillos de piridinio, desapareciendo la isomería rotacional de los grupos amida y resultando en una receptor rígido que reconoce sustratos mediante un modelo más cercano al de llave-cerradura.²⁶

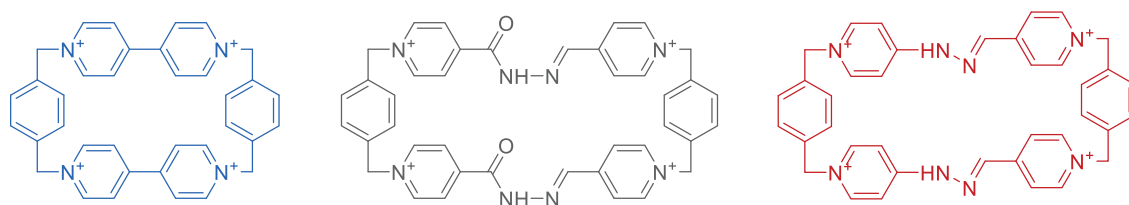


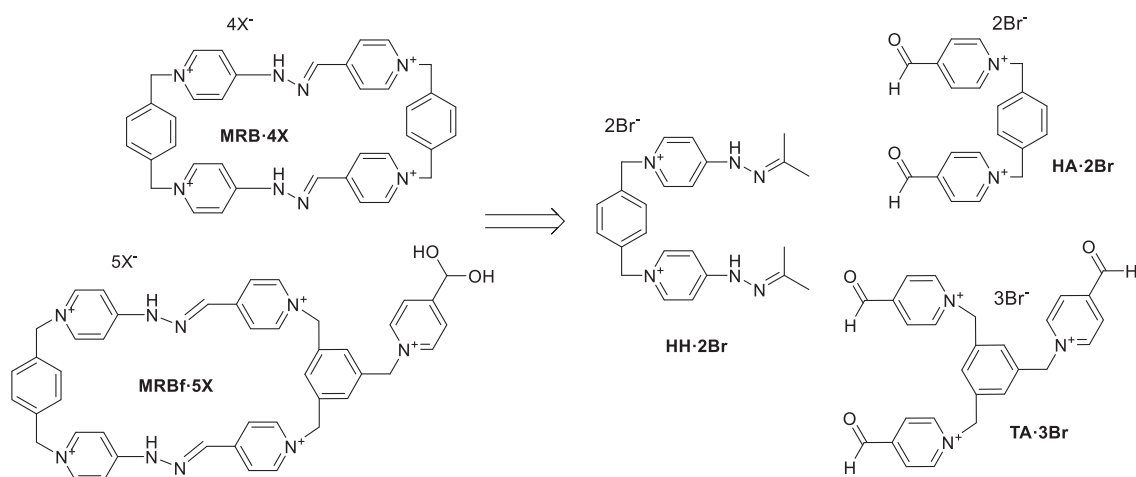
Figura 8. Estructuras de la *blue box*, *white box* y *red box*, respectivamente

En el año 2019, se sintetizó un nuevo análogo dihidrazona de la *blue box*, la *red box*, mediante una reacción de catálisis ácida bajo control cinético en agua. Se eliminan los grupos carbonilos existentes en la *white box* y se consigue mejorar la estabilidad frente a la hidrólisis del receptor porque presenta una mayor deslocalización electrónica (**Figura 8**). La *red box* presenta una gran estabilidad hidrolítica y responde al pH. Es capaz de complejar diversos sustratos en medio acuoso, tanto en su forma básica como ácida ($pK_a = 8.3$). Por el contrario, en medio orgánico, este receptor solo consigue complejar sustratos en su forma ácida, debido a la desaparición del efecto hidrofóbico y la mayor densidad de carga electrónica existente en la base conjugada del *host*.

Por consiguiente, tanto la *white box* como la *red box* son análogos de la *blue box* más fáciles de preparar, con un menor coste económico, fáciles de funcionalizar y que complejan moléculas aromáticas π -excedentes con mayor o menor fortaleza en función del pH. Así, potencialmente, estos compuestos poseen un potencial muy adecuado como vehículos para fármacos hidrofóbicos o aniónicos, para desarrollar nuevos antitumorales o en catálisis supramolecular.²⁷

2. Objetivos

Según lo expuesto en la introducción, la síntesis de receptores moleculares derivados de la *blue box* es de gran interés en el campo de la biomedicina. Estos macrociclos presentan una gran estabilidad, responden al pH y pueden complejar diversos sustratos en medio acuoso. Así, el objetivo general del presente trabajo de fin de grado es la síntesis tanto del macrociclo *red box* como de un análogo funcionalizado del mismo, de acuerdo a la metodología descrita por el grupo QUIMOLMAT (**Esquema 1**). Asimismo, como ejemplificación del potencial práctico de estos compuestos, se estudiará la formación de complejos de inclusión de la *red box* con sustratos de interés en farmacológico.



Esquema 1. Retrosíntesis de los compuestos objetivo **MRB·4X** y **MRBf·5X**

De esta forma, los objetivos específicos del trabajo serán:

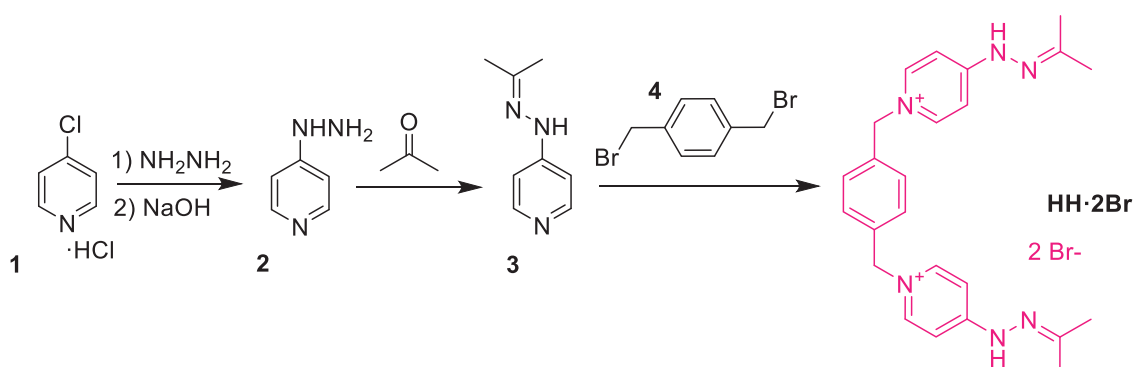
1. Síntesis, mediante reacciones de sustitución nucleófila, de los *bloques de construcción* dihidrazona (**HH²⁺**), dialdehído (**DA²⁺**) y trialdehído (**TA³⁺**).
2. Ensamblaje del macrociclo *red box* (**MRB⁴⁺**) y de un análogo funcionalizado, **MRBf⁵⁺**, a través de DCC de iminas.
3. Purificación de los ciclofanos **MRBf⁵⁺** y **MRB⁴⁺** mediante HPLC semipreparativa en fase reversa, y análisis del producto obtenido por HPLC-MS.
4. Caracterización estructural completa de los compuestos **TA³⁺** y **MRBf⁵⁺** mediante las técnicas de ¹H y ¹³C RMN mono y bidimensionales.
5. Estudio cualitativo de los complejos de inclusión del macrociclo *red box* con dos sustratos aromáticos, el naproxeno (**NAP**) y 8-metoxipsoraleno (**8-MET**), mediante el análisis de ¹H RMN monodimensional.

3. Resultados y discusión

3.1. Síntesis y caracterización de *bloques de construcción*

Según lo mostrado en el **Esquema 1**, la síntesis de los macrociclos receptores objetivo, se plantea a partir de la reacción de condensación en medio acuoso ácido de *bloques de construcción* de geometría adecuada (**MRB**⁴⁺: (**HH**²⁺ + **DA**²⁺); **MRBf**⁵⁺: (**HH**²⁺ + **TA**³⁺)). Así, la síntesis y elucidación estructural de los *bloques de construcción* se discute a continuación.

3.1.1. Síntesis de la dihidrazona (**HH**·2Br)



Esquema 2. Síntesis de la hidrazona **HH**·2Br

La síntesis de la dihidrazona **HH**²⁺ a partir del compuesto comercial cloruro de 4-cloropiridinio **1** se muestra en el **Esquema 2**. Así, en primer lugar, el diclorhidrato de **2**·2Cl se obtiene mediante una reacción de sustitución nucleófila aromática (*S_NAr*) de **1**, con hidrazina en propanol a reflujo durante 24 horas.

A continuación, y previamente a la reacción de sustitución nucleófila conducente al producto de interés, la base libre **1** es obtenida inmediatamente antes de su utilización mediante tratamiento de **2**·2Cl con NaOH (2M) y extracción de la fase acuosa resultante con AcOEt. Debido a la alta polaridad del compuesto como base libre, éste solo puede aislarse con un rendimiento bajo del 30 % tras 8 extracciones, y es utilizado sin mayor purificación en la siguiente etapa de reacción. Además de la liberación de la base libre de la piridilhidrazina, y previamente a la etapa clave de formación de **HH**²⁺, es necesaria la protección del nitrógeno del grupo amino con acetona, para obtener así la hidrazona **3** que impida la posterior formación de productos secundarios por polialquilación del compuesto. Así, dicha protección se realiza *in situ*, simplemente mediante reflujo de **2** en acetona, y la posterior adicción de α,α' -dibromo-*p*-xileno comercial **4** al medio habilita el ataque del nitrógeno del anillo pirídínico a éste electrófilo, formándose la dihidrazona **HH**·2Br, que precipita en el

medio de reacción virtualmente puro en un rendimiento del 93 %. La obtención de **HH**·2Br se corrobora mediante ^1H RMN el cual se corresponde con el previamente reportado por el grupo de investigación para el compuesto puro.

Han de tenerse en consideración varios factores para la elucidación estructural de este compuesto mediante ^1H RMN: es una molécula simétrica, el espectro en D_2O no mostrará los hidrógenos del grupo amino dentro de la hidrazona y, además, una rotación restringida en torno al enlace $\text{C}_6\text{-N}$ (**Figura 9**).

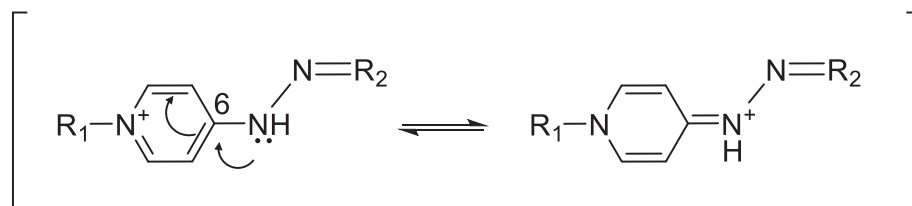


Figura 9. Representación de las dos formas resonantes para los grupos hidrazona

Así, en el espectro de ^1H RMN (**Figura 10**) de **HH**²⁺ se observan 6 señales, con solo tres fuera de la zona de los protones aromáticos. Dos se identifican con singuletes, que integran por 6H, y se corresponde con los Hs de los grupos metileno de la hidrazona no equivalentes (H_7 y H_7'). La otra, que integra por 4H, se identifica con los Hs del grupo metileno (H_3). De las tres señales de aromáticos, el singulete es fácilmente identificable con la señal correspondiente a los protones del fenilo (H_1). Por otra parte, y debido al efecto de rotación restringida comentado con anterioridad, los dobletes esperados para los hidrógenos en α y β en el anillo piridínico, aparecen como singuletes anchos de poca intensidad, en una situación de coalescencia en la escala de tiempos de RMN. La existencia de una carga positiva en el N piridínico retira densidad electrónica y provoca que la señal más desapantallada, la única que aparece claramente en el espectro, sea la correspondiente con los protones en posición α al nitrógeno (H_4). Del mismo modo, la señal más apantallada, prácticamente en completa coalescencia por efecto de la rotación restringida, sería la de los protones en β al nitrógeno (H_5).

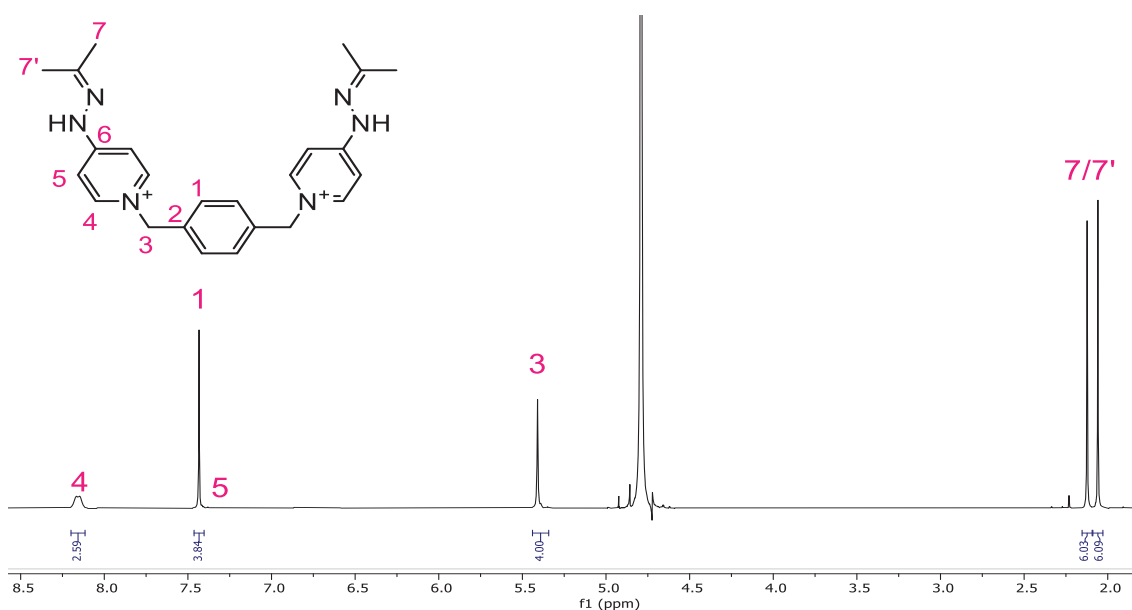
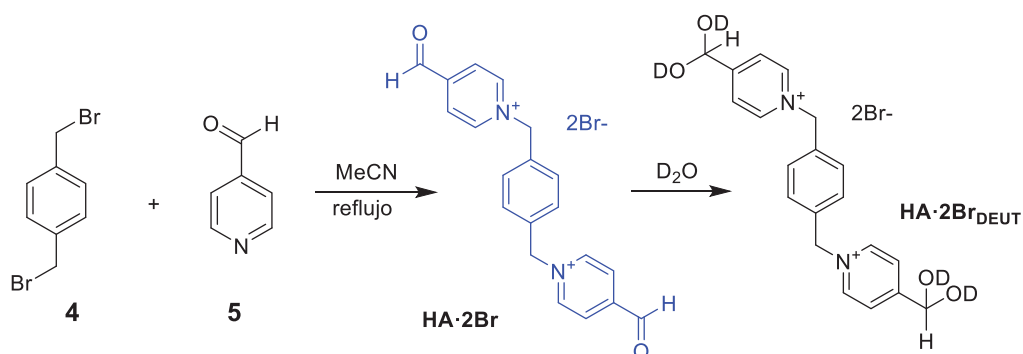


Figura 10. Espectro de ^1H RMN (D_2O , 300 MHz) de HH^{2+} . Se asignan las señales a través de numeración

3.1.2. Síntesis del dialdehído ($\text{DA}\cdot 2\text{Br}$)



Esquema 3. Síntesis de $\text{DA}\cdot 2\text{Br}$ y equilibrio aldehído-glicol observado en D_2O

De acuerdo con la metodología previamente desarrollada por el grupo de investigación, $\text{DA}\cdot 2\text{Br}$ puede ser obtenido mediante reacción $\text{S}_{\text{N}}2$ entre 4-piridincarboxialdehído **5** y α,α' -dibromo-*p*-xileno **4** en acetonitrilo a reflujo, produciéndose la precipitación del dialdehído esperado virtualmente puro en un 76 % de rendimiento (**Esquema 3**). El compuesto puede ser fácilmente identificado como el esperado en base a su ^1H RMN (**Figura 11**), el cual concuerda perfectamente con el previamente reportado por el grupo de investigación para el compuesto puro, DA^{2+} .²⁶

Así, en este espectro ha de tenerse en cuenta que la disolución de $\text{DA}\cdot 2\text{Br}$ en D_2O implica la formación de grupos glicol muy estables por efecto del anillo piridínico o, dicho de otra forma, el equilibrio glicol-dialdehído típico de estos compuestos carbonílicos al disolverse en medio acuoso, está completamente desplazado a la formación del hidrato. De este modo, se pueden observar dos singuletes en la zona alifática, que integran por 4 y que se corresponden con los H_3 metilénicos y H_7

resultado de la hidratación del carbonilo, y tres señales aromáticas. De ellas, la más apantallada, singulete de multiplicidad 4, se identifica con la señal del fenilo (H_1). Los dos dobletes restantes, que integran por 4, se corresponden con los Hs en β y α al N piridínico (H_5 y H_4), siendo la señal más desapantallada el H_α , como consecuencia de que el N retira carga.

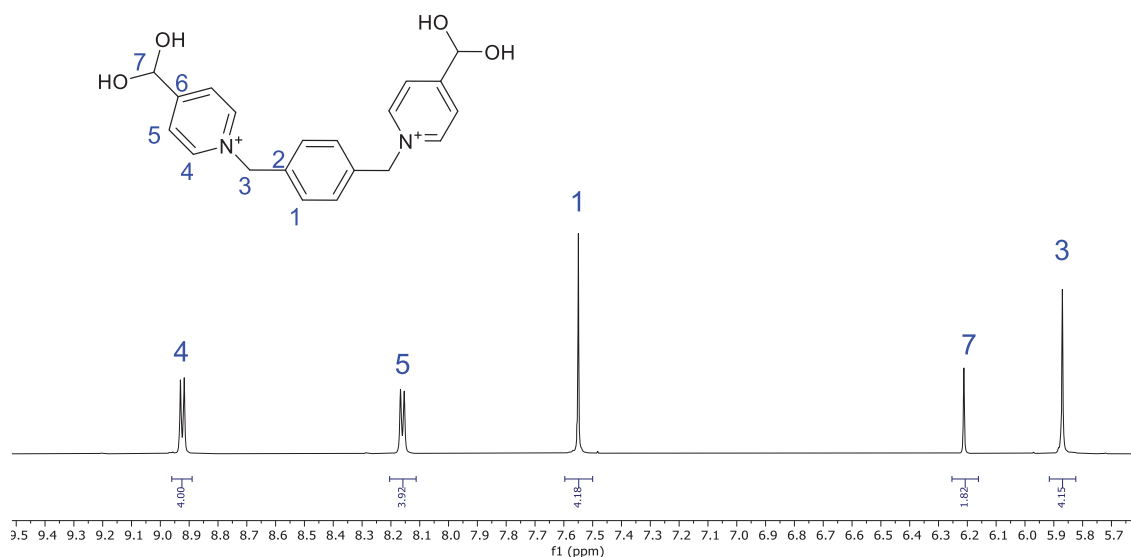
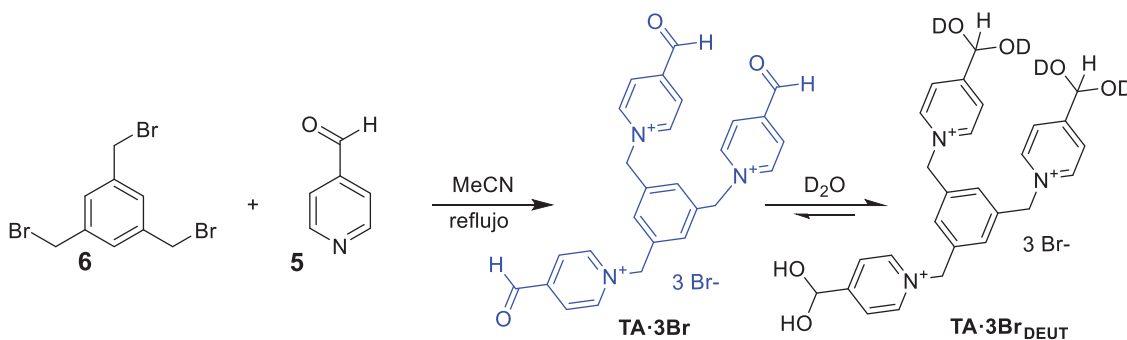


Figura 11. Espectro de 1H RMN (D_2O , 400 MHz) de DA^{2+} , en donde se indica la asignación de las señales con números

3.1.3. Síntesis del trialdehído ($TA \cdot 3Br$)



Esquema 4. Síntesis del compuesto $TA \cdot 3Br$ y representación del equilibrio aldehído glicol

Del mismo modo que para $DA \cdot 2Br$, la preparación del trialdehído (TA^{3+}) no reportado previamente se lleva a cabo mediante una S_N2 en acetonitrilo, en la cual el nitrógeno del 4-piridincarboxialdehído **5** ataca a los carbonos electrófilos de, en este caso, el compuesto comercial 1,3,5-tribromometilbenceno **6**, produciéndose la liberación de 3 iones bromuro para formar la sal $TA \cdot 3Br$, la cual se obtiene con un excelente rendimiento del 91 %, virtualmente pura tras su precipitación en el medio de reacción (**Esquema 4**).

El compuesto se caracteriza como el esperado haciendo uso de las técnicas de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C RMN mono y bidimensional, para lo que se disuelve el producto en D_2O resultando en el bis glicol $\text{TA}\cdot 3\text{Br}_{\text{DEUT}}$. Debido al efecto aceptor de electrones de los grupos piridinio, el ya mencionado equilibrio carbonilo-glicol también se haya en este caso desplazado hacia el hidrato (**Figura 8**). Debido a que el compuesto no ha sido previamente reportado, en este caso se realiza una caracterización completa del mismo en base a experimentos de RMN 1D y 2D, que a continuación pasamos a discutir.

Como el producto es una molécula simétrica, en el espectro de ^1H RMN monodimensional se pueden observar una simplificación en el número de señales observado (**Figura 12**). A menor desplazamiento químico se observan dos singuletes en la zona alifática del espectro, donde aquel a un menor desplazamiento y una integración de 6H se corresponde con los protones metilénicos (H_2), y el que aparece a mayor desplazamiento e integración de 3H, con el protón resultante de la formación del diol H_7 . A mayor desplazamiento se observan 3 señales en la zona aromática. La primera, a menor desplazamiento, es un singulete, que integra por 3H, y que se corresponde con los protones del anillo bencénico trisustituído (H_1). Las dos señales restantes son dos dobletes que integran por 6H, y se corresponden con los protones en α y en β al nitrógeno del anillo piridínico (H_4 y H_5). El doblete a mayor desplazamiento, más desapantallado, se identifica con los protones en α . El nitrógeno presenta una carga parcial positiva que atrae parte de la densidad electrónica de los núcleos próximos. El protón en posición contigua al nitrógeno sufrirá más este efecto, razón por la cual aparece más desapantallado.

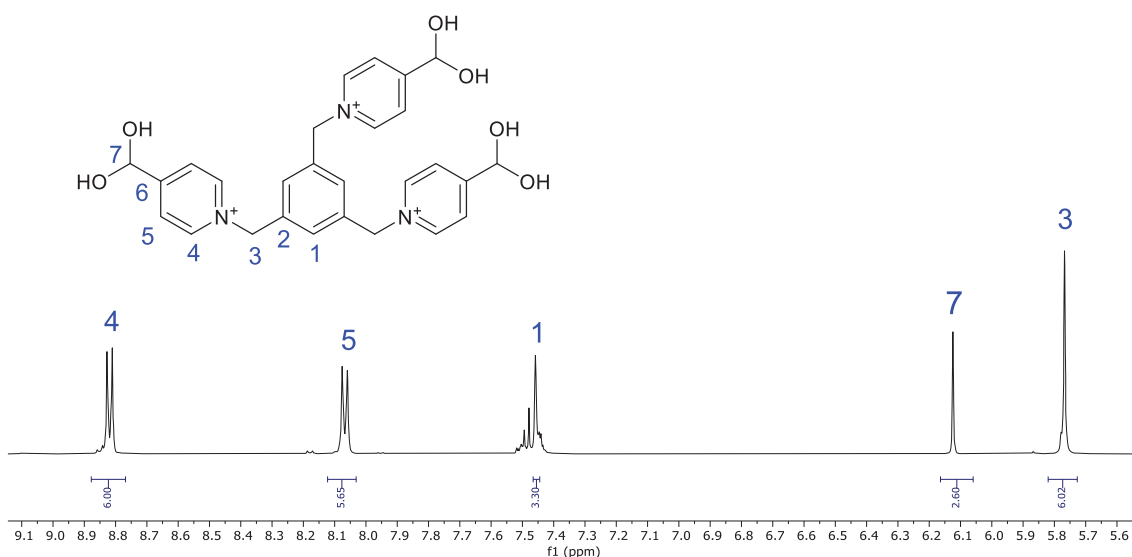


Figura 12. Espectro de ^1H RMN (D_2O , 400 MHz) de TA^{3+} , en donde se indica la asignación de las señales mediante numeración

Aunque la asignación de los núcleos de ^1H resulta trivial para **TA**-3Br en base al correspondiente espectro de RMN monodimensional, la simplicidad del compuesto nos permite ejemplificar de forma muy didáctica cómo se realizaría una asignación de los núcleos usando RMN bidimensionales más complejos, que en este caso nos corroborarán la ya realizada y basada en los experimentos 1D.

En primer lugar, el experimento COSY 2D (*CO*relation *Sp*ectroscop*Y* *bi*dimensional *pr*oton/*pr*oton), nos servirá así a este fin, pudiendo ver las correlaciones entre los distintos núcleos de protón (**Figura 13**). El espectro está simetrizado por representar el espectro un ^1H RMN frente a sí mismo, tiene forma cuadrada y está dividido en dos partes iguales por una diagonal, formada por los picos de cruce que cada protón origina consigo mismo. Los picos de cruce de interés, originados por un núcleo de protón que acopla su spin de con los Hs a 3 enlaces, se encuentran por arriba y por debajo de la diagonal. En este espectro en concreto, podemos comprobar como existe acoplamiento entre los Hs en α y β del anillo piridínico, que se encuentran a tres enlaces de distancia (H_C y H_D).

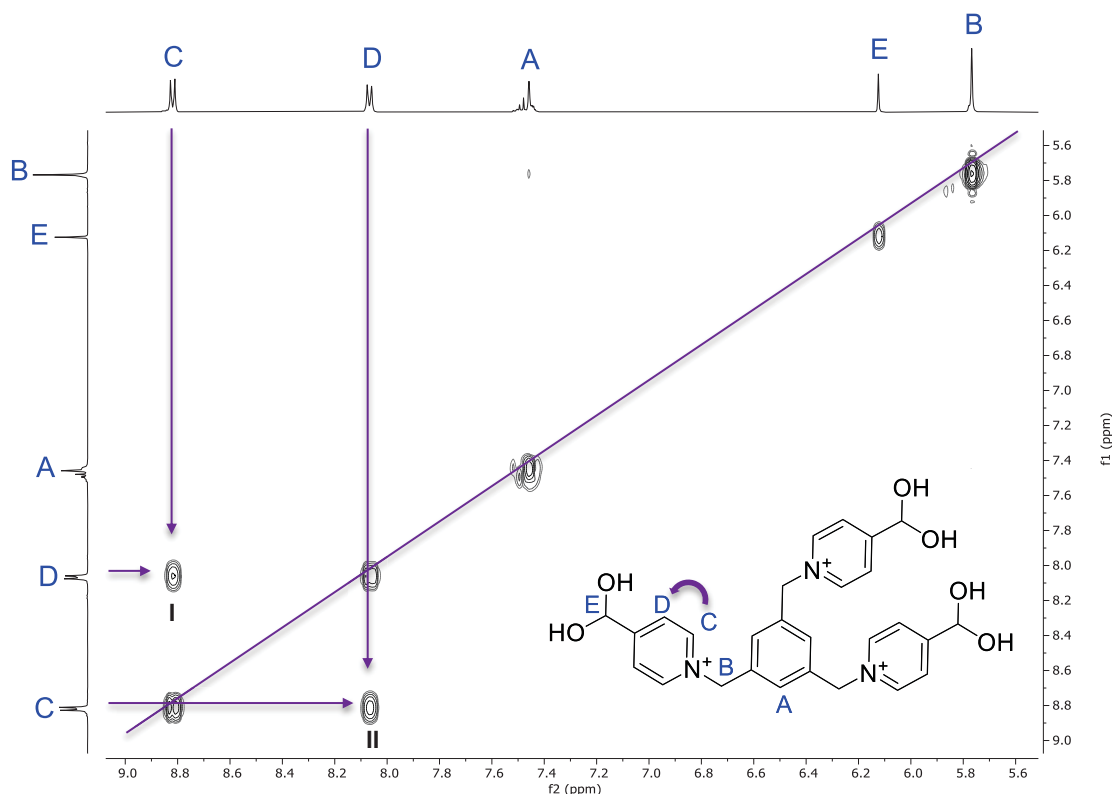


Figura 13. Espectro COSY (D_2O , 400 MHz) de TA^{3+} con las correlaciones I-II indicadas mediante flechas

A continuación, se analizan las señales del espectro de ^{13}C RMN monodimensional y del espectro DEPT (**Figura 14**), que nos da información acerca del número de hidrógenos a los que está unido cada carbono (si el carbono es primario,

secundario, terciario o cuaternario). Se observan 7 señales, de las cuales solo dos se encuentran en la región de los carbonos alifáticos: la señal del carbono terciario del grupo metileno unido al nitrógeno (C_3) y la del carbono terciario del diol (C_7), menos apantallada. Las siguientes 5 señales son todas de carbonos aromáticos. Las tres señales más apantalladas, y más intensas, se corresponden con carbonos terciarios de los anillos piridínico (C_5 , C_4) y bencénico (C_1), respectivamente. Por último, las dos señales de baja intensidad se identifican con carbonos cuaternarios, siendo la señal más apantallada la correspondiente al carbono cuaternario adyacente al carbono del diol (C_6) y la menos apantallada, la de los tres carbonos sustituidos en el anillo bencénico (C_2).

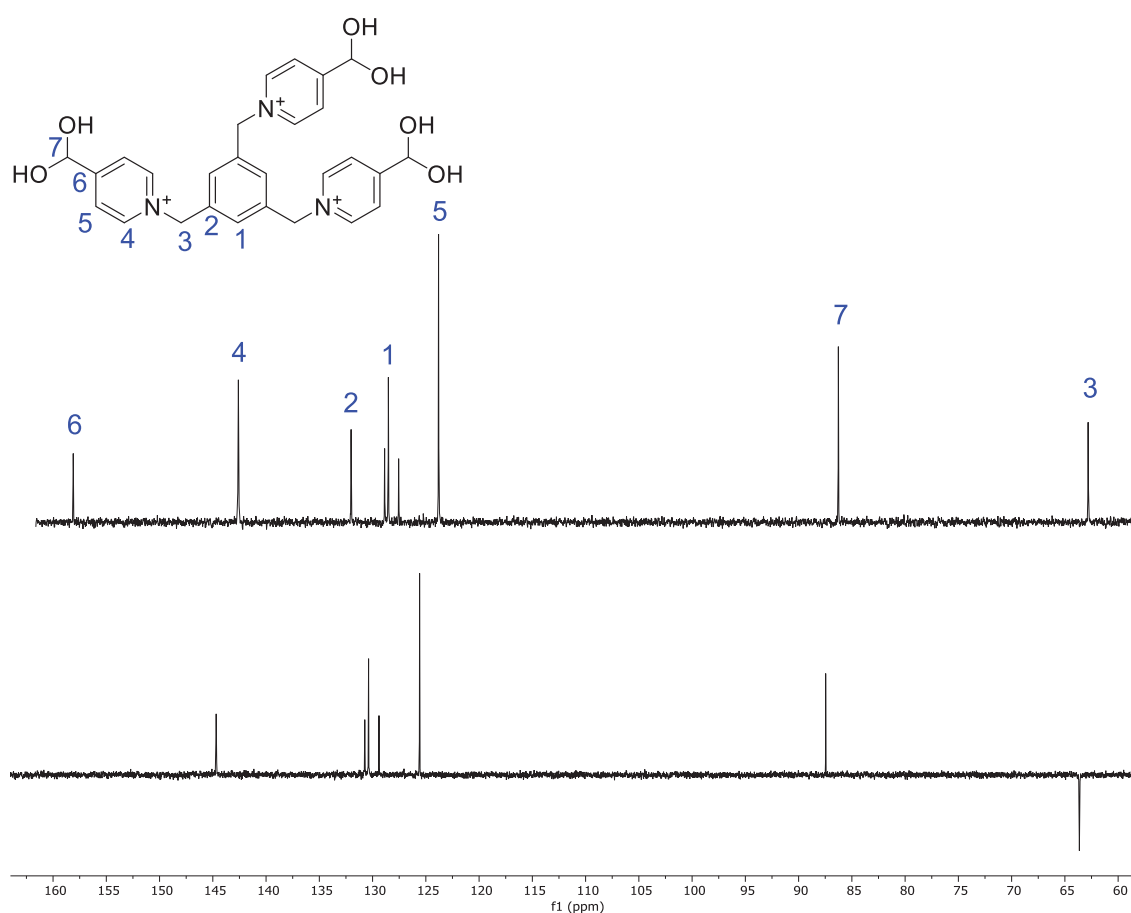


Figura 14. Espectro de ^{13}C RMN (D_2O , 101 MHz) y DEPT de TA^{3+} . Las señales están asignadas a través de numeración

Para corroborar la asignación de 1H y ^{13}C de forma conjunta se hace uso de los experimentos de correlación heteronuclear. Así, el espectro HSQC 2D (*Heteronuclear Simple Quantum Correlation*), nos indica las correlaciones entre los núcleos de protón y los carbonos (**Figura 15**), y representa los espectros de 1H frente ^{13}C . Es útil para descubrir que carbono interactúa con cada hidrógeno, y haciendo uso del DEPT, se puede saber cuántos protones están unidos a cada carbono. Así, se corrobora la

anterior asignación, por la cual los carbonos C₄ y C₅ están correlacionados con los H₄ y H₅, respectivamente en las posiciones α y β del anillo piridínico. Del mismo modo, se confirma la asignación de los carbonos terciarios, el carbono del grupo metileno y del carbono unido al diol.

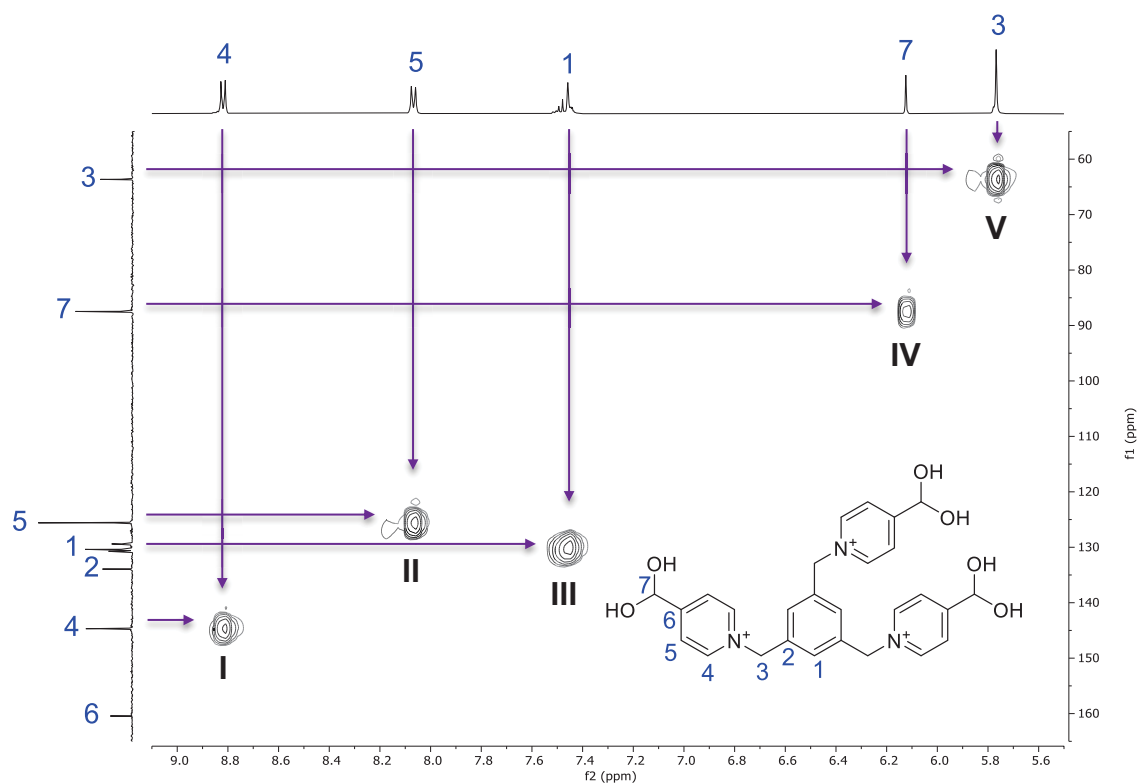


Figura 15. Espectro HSQC (D_2O , 400/101 MHz) de TA^{3+} . Se muestran las correlaciones I-V mediante flechas entre los protones (eje horizontal) y carbonos (eje vertical)

El último espectro analizado es el espectro HMBC 2D (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), necesario para poder establecer la conectividad correlacionan los núcleos de portón y carbono a larga distancia, a dos-tres enlaces (**Figura 16**). Se confirman aquí las asignaciones anteriormente hechas: el C₄ y el H₄ se encuentran en posición α al N del anillo piridínico (correlación I), y el C₅ y el H₅, en β al N. Además, el pico de cruce III nos confirma que C₁ es el C del anillo fenilénico, las correlaciones IV y V nos indican cual es el C del diol y del grupo metilénico. Por último, se comprueba que el C₂ y el C₆ son cuaternarios.

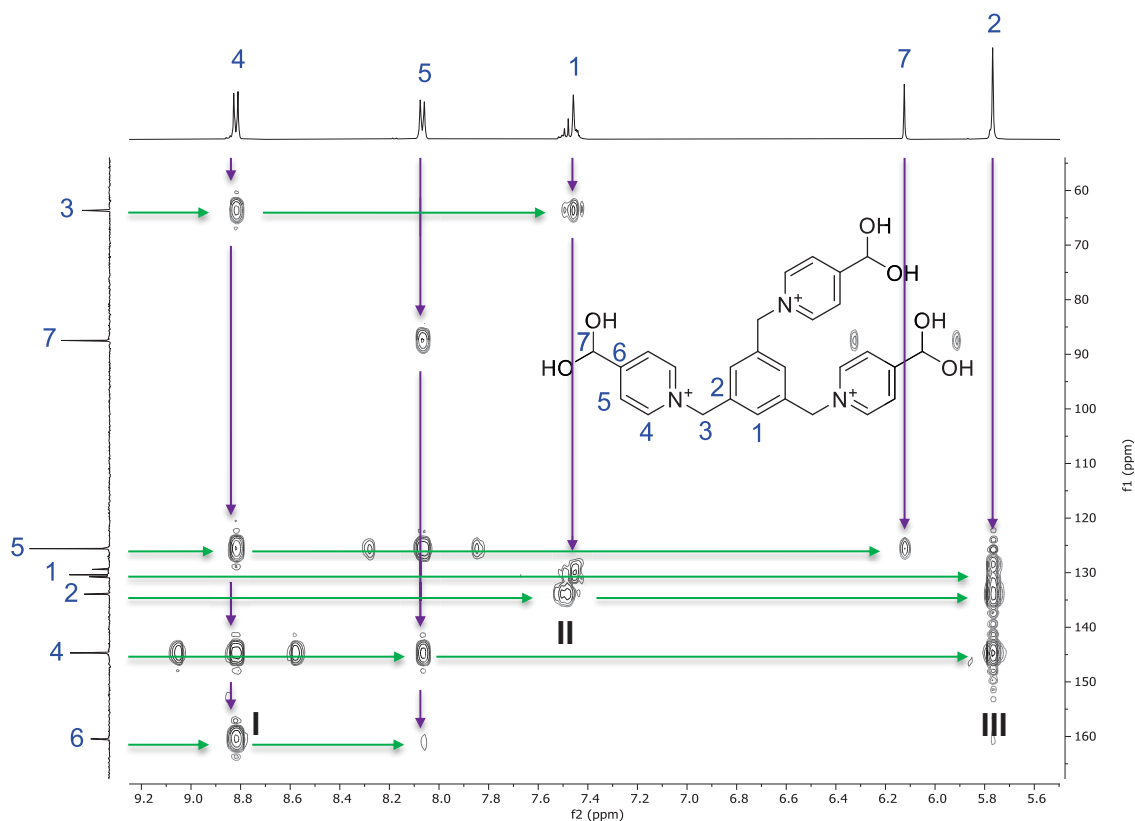
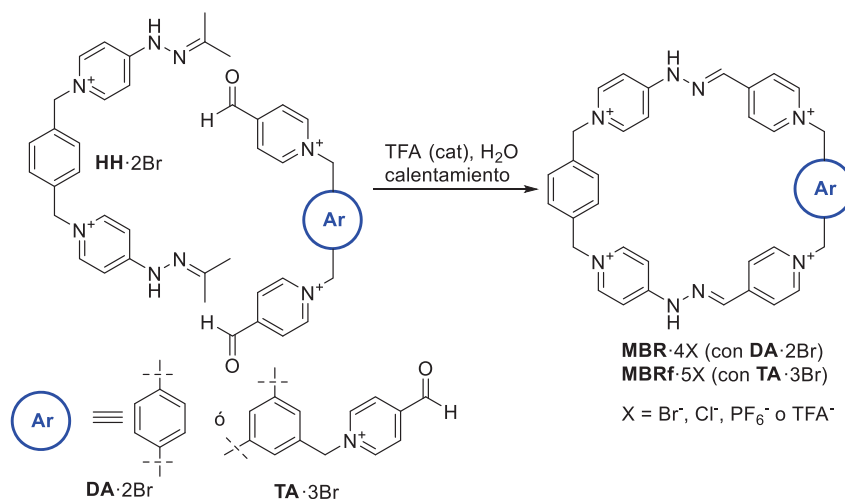


Figura 16. Espectro HMBC (D_2O , 400/101 MHz) de TA^{3+} . Mediante flechas violetas (protones) y verdes (carbonos) se indican las correlaciones I-III

3.2. Síntesis, purificación y caracterización de los macrociclos

Una vez en posesión de los *bloques de construcción* necesarios, se procede a la síntesis de la *red box*, que se forma a partir de un dialdehído, DA^{2+} , el cual se sintetiza del mismo modo que TA^{3+} , pero partiendo α,α' -dibromo-*p*-xileno.

3.2.1. Formación del macrociclo *red box* (MRB-4X) y del análogo (MRBf-5X)



Esquema 5. Síntesis de los compuestos macrocíclicos $MRB-4X$ y $MRBf-5X$

Como se representa en el **Esquema 5**, la reacción de ensamblaje de los macrociclos es una transiminación. Así, la síntesis originalmente reportada para la *red box* seguía un protocolo basado en condiciones de catálisis ácida, calor y alta dilución, típicas para el control termodinámico del enlace hidrazona en agua.²⁶ A diferencia de la mayoría de los procesos asociados con la DCC de iminas, la síntesis de la *red box* en agua tiene la particularidad de que no transcurre bajo control termodinámico, sino cinético por la altísima estabilidad hidrolítica que presentan los nuevos enlaces formados, altamente deslocalizados con los anillos de piridinio. En lo que se refiere a la posibilidad de reacciones secundarias, ha de tenerse en cuenta que en condiciones de alta dilución las especies cíclicas estará favorecidas frente a aquellas oligoméricas lineales, siendo la especie de menor tamaño que se podría formar resultado de la condensación [1:1], que en este caso se ha reportado como aquella que produce el producto mayoritario en medio acuoso a concentraciones por debajo de 5 mM de los componentes. Este efecto se debe a que, en agua, existe un alto grado de preorganización de los compuestos de partida que facilita la formación intramolecular del segundo enlace C=N. Así, el efecto hidrofóbico provoca una buena solvatación de los mismos, los cuales se dispondrían de manera plegada y no extendida. En medios orgánicos, se originarían diversas formas oligoméricas a mayores de la [1:1], pues la formación de otros polímeros de mayor tamaño, especialmente [3:2], está ciertamente favorecida en comparación con la *red box*, por la existencia de un grupo extra en **MRBf⁵⁺** que aumenta las posibilidades de procesos intermoleculares.

En lo referido al procedimiento experimental, para la obtención de los macrociclos, se hace reaccionar a **HH**·2Br con **DA**·2Br o con **TA**·3Br, para la síntesis de **MRB**·4Br y **MRBf**·5Br, respectivamente. Se forman dos nuevos enlaces hidrazona en condiciones de catálisis ácida en medio acuoso (control cinético), mediante el ataque nucleófilo del N de la imina sobre el carbonilo electrófilo del aldehído. A fin de poder tanto de aislar como de caracterizar los macrociclos, se utilizan reacciones de intercambio iónico (metátesis), aprovechando la distinta solubilidad de las sales en los disolventes usados en función del contraión que posean (Cl⁻, Br⁻: disolución acuosa; PF₆⁻: medio orgánico; TFA⁻: ambos). Para ello, se les adiciona la sal KPF₆ en agua, de modo que precipita los compuestos como hexafluorofosfato (**MRB**·4PF₆ y **MRBf**·5PF₆). Luego, se redisuelve en acetonitrilo y se añade la sal Bu₄NCl, de forma que precipita como cloruro (**MRB**·4Cl y **MRBf**·5Cl). En el caso de **MRB⁴⁺**, se precipita en parte como **MRB**·4Cl y como **MRB**·4Br, obteniendo el producto aislado virtualmente puro y con un buen rendimiento del 83 %. En cambio, **MRBf⁵⁺**, se precipita en su totalidad como **MRBf**·5Cl, siendo el rendimiento superior al 200 %, al presentar un exceso de las

sales empleadas en las reacciones de metátesis. Para purificar ambos macrociclos, en particular debido a la necesidad de obtener el producto con una elevada pureza para la realización de ensayos biológicos, se hace uso de la técnica HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) semipreparativa en fase reversa.

3.2.2. Purificación de MRB^{4+} y MRBf^{5+} mediante HPLC semipreparativa en fase reversa

Para purificar los macrociclos, se disuelven en una mezcla de H_2O , CH_3CN y TFA, para asegurarse que el macrociclo está en la forma ácida. Se emplea una columna C18 y como eluyentes $\text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{ TFA}$ y $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\% \text{ TFA}$. Tras la optimización del método, se recupera MRB^{4+} y MRBf^{5+} , siendo los tiempos de retención de ambos compuestos de, respectivamente, 15 (Figura 17) y 15.6 min (Figura 18). El rendimiento de esta etapa de purificación fue del 43 % MRB^{4+} y del 5 % para MRBf^{5+} , por el exceso de la sal Bu_4NCl .

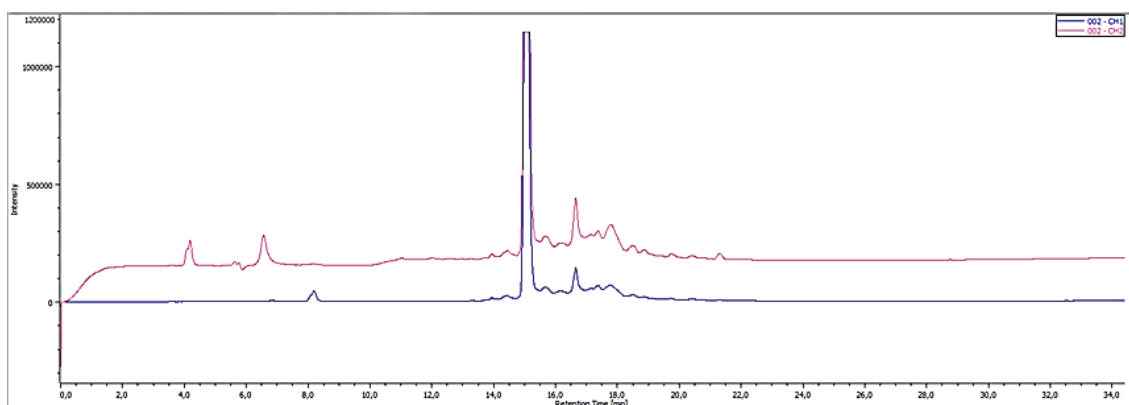


Figura 17. Imagen de la purificación de MRB^{4+} mediante HPLC semipreparativa (a $\lambda=220$ y 254 nm)

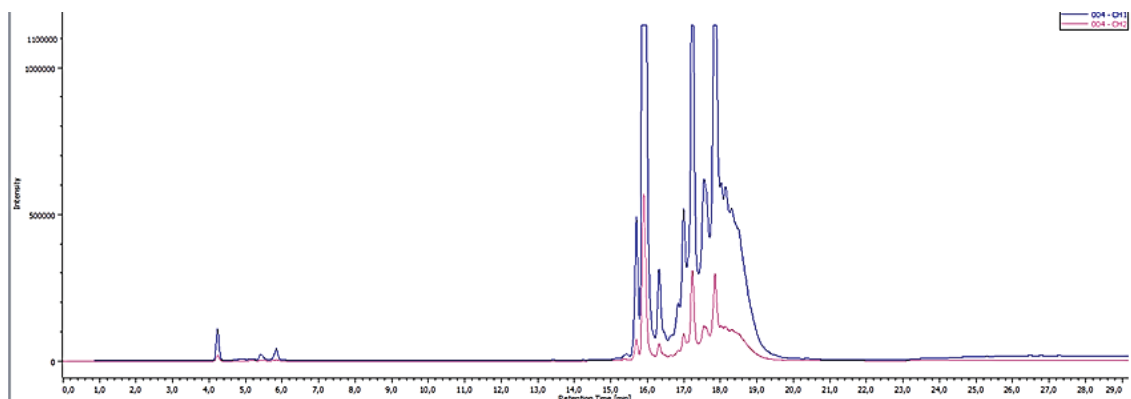


Figura 18. Imagen de la purificación de MRBf^{5+} mediante HPLC semipreparativa (a $\lambda=220$ y 254 nm)

Se puede observar como el cromatograma de MRB^{4+} es mucho más sencillo que el de MRBf^{5+} . La mayor complejidad y presencia de un grupo aldehído extra,

favorece la formación de otras formas poliméricas, lo cual resulta en un mayor número de picos de alta intensidad. Además, parte del compuesto se oxidó por incidencia de la luz, puesto que el aldehído es un grupo fácilmente oxidable. Esto podría explicar, entre otras razones aún no identificadas, el menor rendimiento de la reacción en comparación con la *red box*.

3.2.3. Elucidación estructural de MRB^{4+} y MRBf^{5+} mediante RMN

En cuanto a la caracterización de los compuestos obtenidos, han de tenerse en cuenta una serie de consideraciones estructurales. Como se ha comentado, el enlace imina formado en estos compuestos presenta una mayor estabilidad de la esperada para este tipo de enlace covalente dinámico. Así, debido a la deslocalización de la carga en ambos lados largos del macrociclo (**Figura 19**), el enlace $\text{C}=\text{N}$ de la imina es muy poco electrófilo y, por tanto, menos susceptible a la hidrólisis. Además, el medio ácido conduce a la formación de la forma ácida del macrociclo, de color amarillo, frente a la forma básica, de color rojo que se originaría a pH menores de aproximadamente 8.²⁷

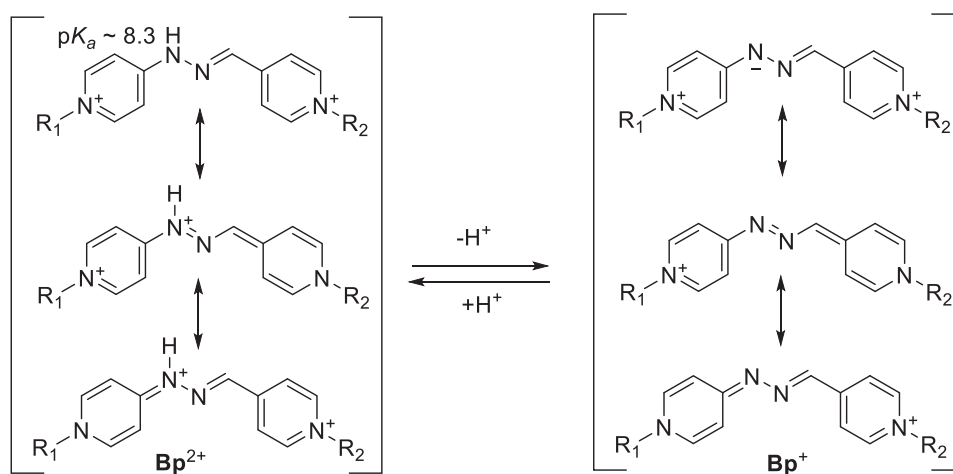


Figura 19. Representación del equilibrio ácido base entre el cromóforo biperidínico Bp^{2+} y su base conjugada Bp^+ . Se representan las dos formas resonantes para cada especie.²⁷

Para la caracterización de los macrociclos sintetizados se procedió de la misma forma que para los *bloques de construcción*, es decir, se discutirá en primer lugar únicamente el ^1H RMN del compuesto *red box*, que coincide plenamente con el previamente reportado para el compuesto puro.

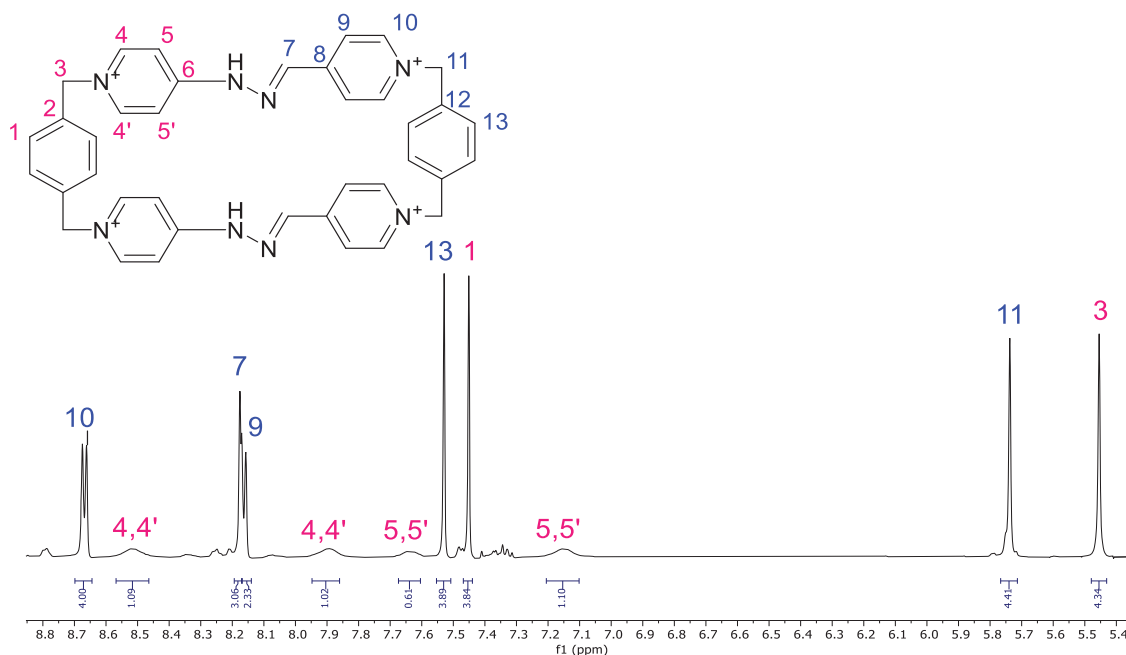


Figura 20. Espectro de ¹H RMN (D₂O, 500 MHz) de MRB⁴⁺ con las señales asignadas mediante letras (en azul, se asignan las señales provenientes del dialdehído y, en rosa, las de la dihidrazona)

Así, el espectro de ¹H RMN de MRB⁴⁺ muestra un total de 11 señales (**Figura 20**). A la derecha del espectro, aparecen dos señales singuletes que integran por 4H y que corresponden a los H metilénicos (H₃ y H₁₁). En la zona aromática, se pueden observar 4 singuletes muy ensanchados y de muy poca intensidad, correspondientes a los protones H₄, H_{4'}, H₅ y H_{5'}. Como ya se explicó para el compuesto HH²⁺, éste fenómeno es debido al fenómeno de rotación impedida en el enlace C₆-N lo que provoca una situación de coalescencia entre protones del anillo piridínico de la dihidrazona, los cuales no son totalmente equivalentes entre sí (H₄≠H_{4'} y H₅≠H_{5'}). Por lo tanto, se observan cuatro singuletes anchos como resultado del intercambio en la escala de tiempos de RMN.

Además, se pueden identificar dos singuletes de gran intensidad y bien definidos que integran por 4H, que se corresponden con los protones de los anillos fenólicos (H₁ y H₁₃), el protón de la imina (H₇) que da una señal de singulete característico a 8.18 ppm, y dos dobletes a mayor desplazamiento. Estos últimos, son los Hs del anillo piridínico del dialdehído (H₉, H₁₀), siendo el protón en α la señal más desapantallada y el protón en β, la más apantallada.

La caracterización estructural por RMN se completó mediante el estudio del espectro HR-ESI-MS (**Figura 21**). Se encontraron dos picos de masa exacta del ión [M]²⁺ (C₃₈H₃₄N₈²⁺) a 301.1447 m/z y [M+Br]⁺ (C₃₈H₃₄N₈Br⁺) a 681.2055 m/z, calcd. para C₃₈H₃₆N₈Br₄ a m/z 923.9756.

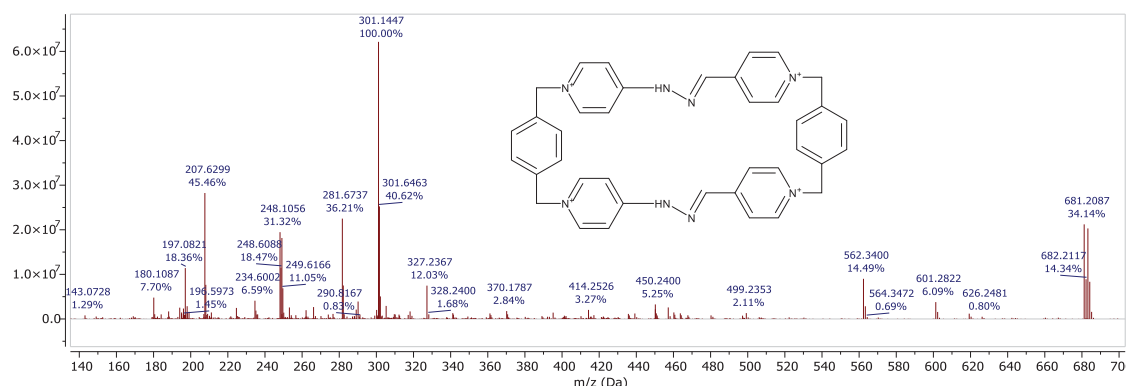


Figura 21. Espectro de HR-ESI-MS de MRB^{4+}

Una vez comprendido este espectro, se analiza en primer lugar el 1H RMN correspondiente al macrociclo funcionalizado MRB^{5+} en el que aparecen 14 señales bien diferenciadas (Figura 22). Así, si analizamos los singuletes a menores desplazamientos, las tres señales más a la derecha (que integran por 4H, 4H y 2H, respectivamente), se corresponden claramente con los H metilénicos (H_3 , H_{11} y H_{16}). Con motivo de la existencia de un grupo piridinilaldehído extra, en el espectro aparece un grupo metileno a mayores con respecto a la *red box*, el cual integra por 2H y aparece a un mayor desplazamiento. A su izquierda, se encuentran otro singulete, que se corresponde con el H unido al diol del grupo aldehído libre (H_{20}). En la región aromática del espectro podemos observar cuatro singuletes anchos de muy baja intensidad (H_4 , H_4' , H_5 y H_5'), originados de nuevo por la impedida en el grupo C-NH-N=C, por lo que los protones no son equivalentes y hay coalescencia en las señales. Además, los Hs del anillo aromático trisustituído perteneciente al trialdehído presentan desplazamientos químicos no equivalentes, y se pueden observar dos señales diferentes (H_{13} y H_{14}). Cabe destacar la señal de los protones del anillo fenilénico correspondiente originada desde la porción de dihidrazona (H_1), que integra por 4H y es de muy alta intensidad, a 7.55 ppm. También se puede ver la señal característica del protón del enlace imina (H_7) a 8.22 ppm. Para identificar las señales de los protones en α y β al N del anillo piridinínico del grupo piridinilaldehído libre y del anillo que forma parte del macrociclo, es imprescindible mirar el valor de la integral de esos protones, ya que todas las señales aparecen como los dobletes. De este modo podemos diferenciar los protones del anillo libre (H_{17} y H_{18}), que tienen una integración de 2H y un mayor apantallamiento, con respecto de los protones del anillo piridinínico que forma el macrociclo, que integran por 4H (H_9 y H_{10}).

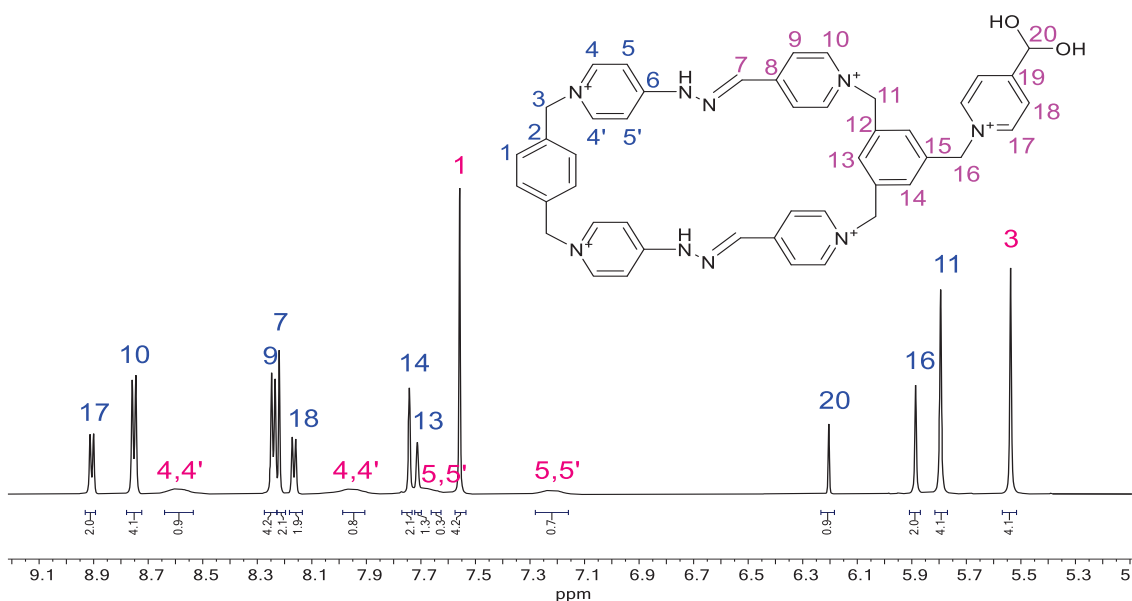


Figura 22. Espectro de ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) de MRBf^{5+} , con la asignación numérica (en azul, se indican las señales procedentes del trialdehído y, en rosa, de la dihidrazona)

En este caso es de nuevo imprescindible para corroborar la asignación tentativa de Hs la interpretación del espectro COSY (**Figura 23**). Se observan cuatro picos de cruce, originados por el acoplamiento entre los Hs en α y β del anillo piridínico provenientes del dialdehído, a tres enlaces de distancia. Son identificados como la correlación entre el H_{17} y H_{18} (17-18) y la correlación entre el H_9 y H_{10} (9-10).

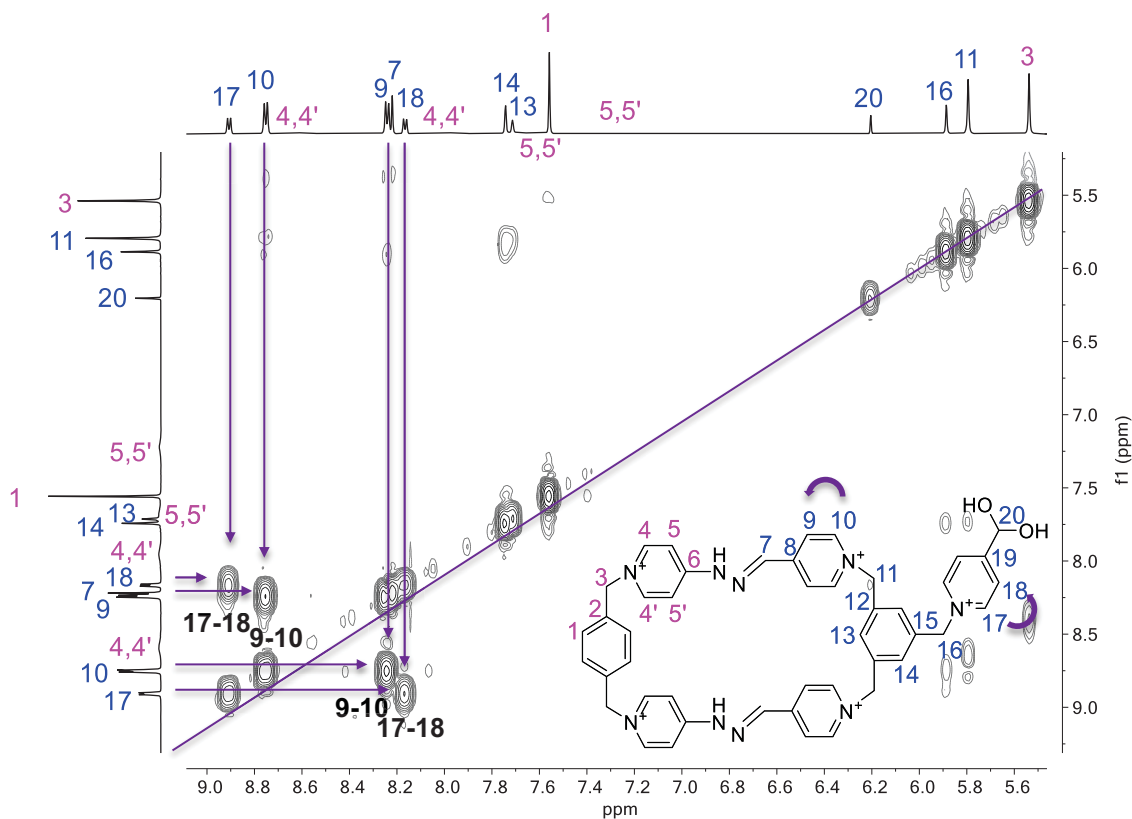


Figura 23. Espectro COSY (D_2O , 400 MHz) de MRBf^{5+} con las correlaciones entre los hidrógenos 9-10 y 17-18 indicadas mediante flechas

Con respecto al espectro de ^{13}C RMN y DEPT (**Figura 24**), se puede reconocer la señal característica del C imínico a 140.5 ppm (C_7), las señales correspondientes a los C terciarios metilénicos (C_3 , C_{11} y C_{16}), a la izquierda del espectro, la señal del C unido al grupo diol (C_{20}) y las señales de los C cuaternarios, de poca intensidad (C_2 , C_{12} y C_{15}).

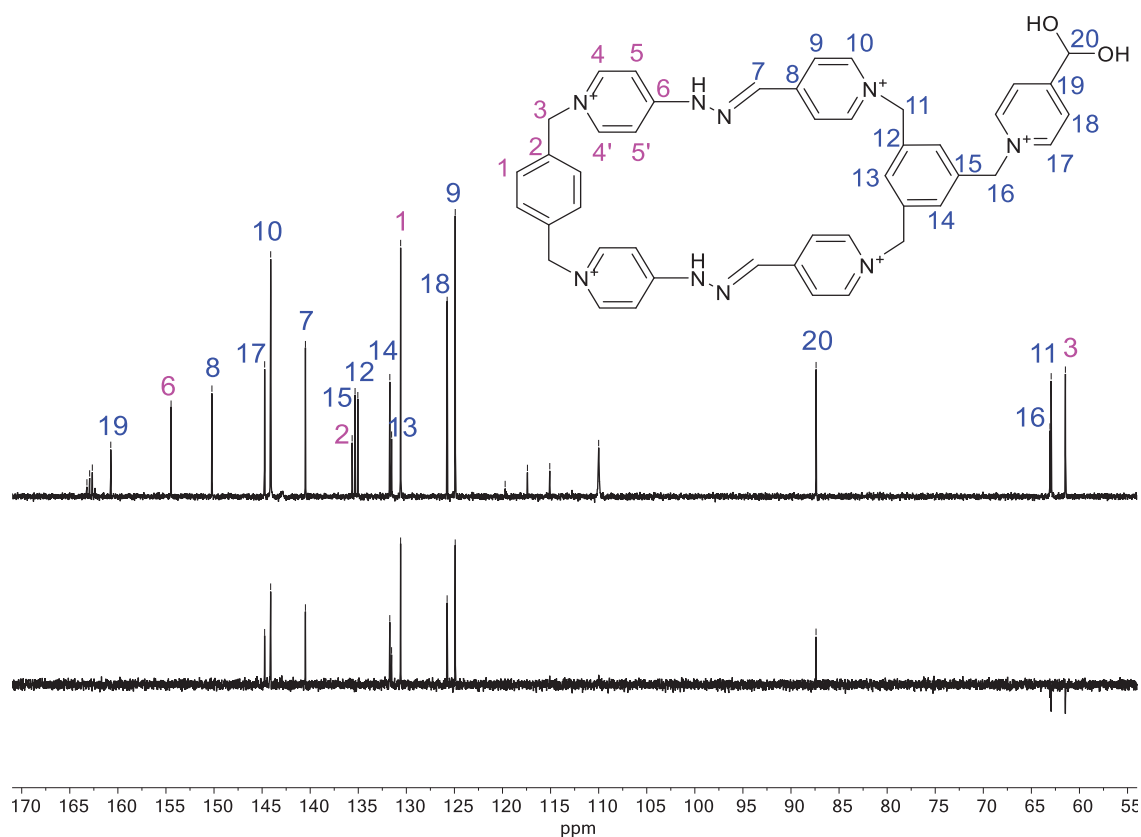


Figura 24. Espectro de ^{13}C RMN (D_2O , 101 MHz) y DEPT de MRBf^{5+} . Las señales están asignadas a través de numeración

Para poder asignar las señales de los carbonos, es necesario interpretar los RMN bidimensionales HSQC y HMBC. En el espectro HSQC de MRBf^{5+} (**Figura 25**), se pueden ver las correlaciones entre ^1H y ^{13}C unidos directamente. Así, se puede confirmar la identificación del protón imínico (C_7) y los Cs metilénicos (C_3 , C_{11} y C_{16}), que se corresponde con las señales más apantalladas a la derecha del espectro. Además, se asignan las señales de los Cs aromáticos, tanto del anillo piridínico (C_9 , C_{10} , C_{17} y C_{18}), de gran intensidad, como de los anillos fenilénicos (C_1 , C_{13} y C_{14}). Debido a la complejidad existente, no se pueden asignar algunas señales de los Cs, como las de los Cs del anillo piridínico procedente de la dihidrazona (C_4 , C_4' , C_5 y C_5').

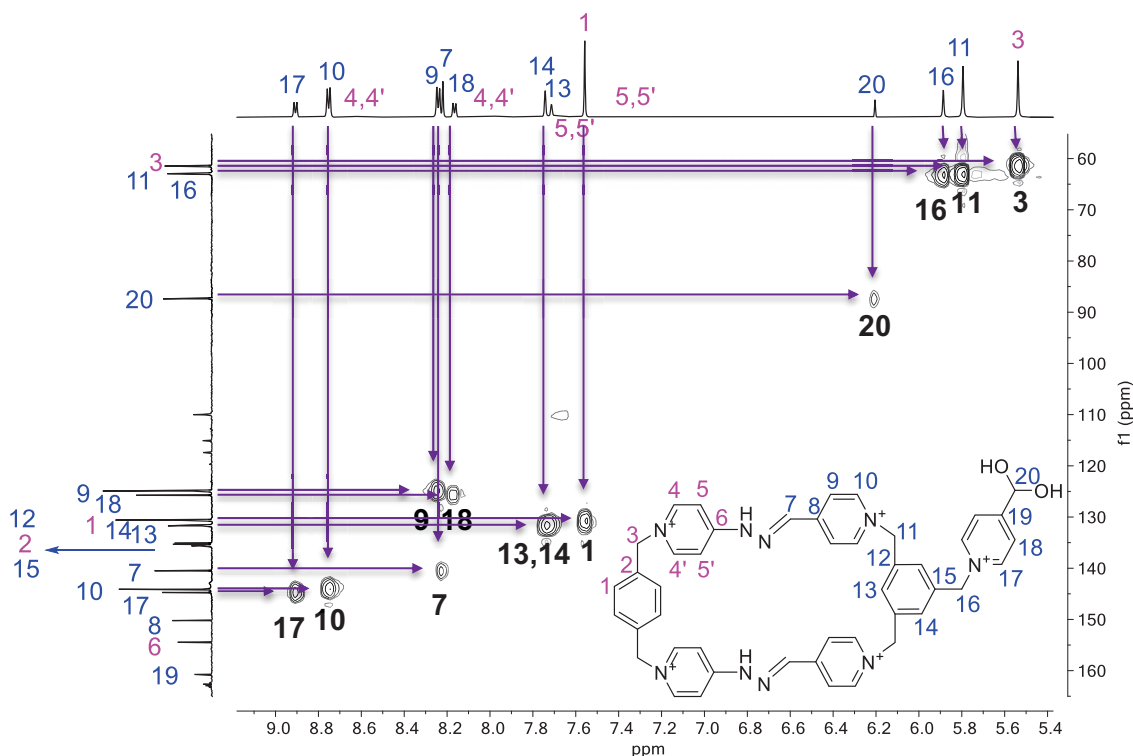


Figura 25. Espectro HSQC (D_2O , 400/101 MHz) de $MRBF^{5+}$. Se muestran las correlaciones mediante flechas entre los protones (eje horizontal) y carbonos (eje vertical)

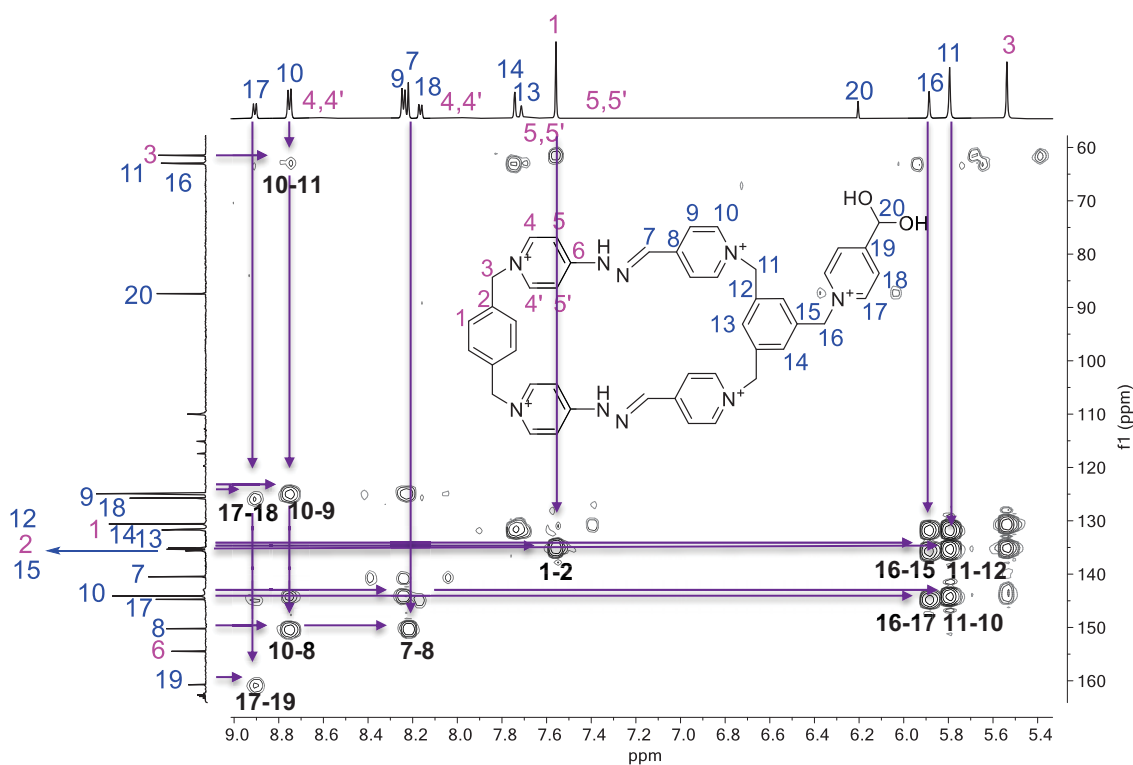


Figura 26. Espectro HMBC (D_2O , 400/101 MHz) de $MRBF^{5+}$. Mediante flechas violetas (protones) y verdes (carbonos) se indican las correlaciones

Por otra parte, el espectro HMBC (Figura 26) nos permite identificar más C, al ver las relaciones a 2-3 enlaces de distancia entre los Cs y los Hs. De este modo,

podemos asignar los Cs cuaternarios de los anillos fenilénicos (C_2 , C_{12} y C_{15}) y los Cs de los anillos piridínicos provenientes del trialdehído (C_8 y C_{19}), de baja intensidad, apareciendo más desapantallada la señal del C del grupo pirinidilaldehído libre.

Por último, en este caso se estudia para el compuesto el espectro EXSY (*EXchange SpectroscopY*), que correlaciona núcleos próximos en el espacio y cuyos spins interactúan a través del denominado efecto NOE (*Nuclear Overhauser Effect*), independientemente del número de enlaces que haya entre ellos. Asimismo, este experimento correlaciona núcleos no equivalentes en el espectro pero que se intercambian a través de algún tipo de equilibrio. De esta manera (**Figura 27**), en el espectro se pueden ver los picos de cruce correspondientes a los Hs no equivalentes de los anillo piridínicos que se encuentran en coalescencia (H_4 , H_4' , H_5 y H_5').

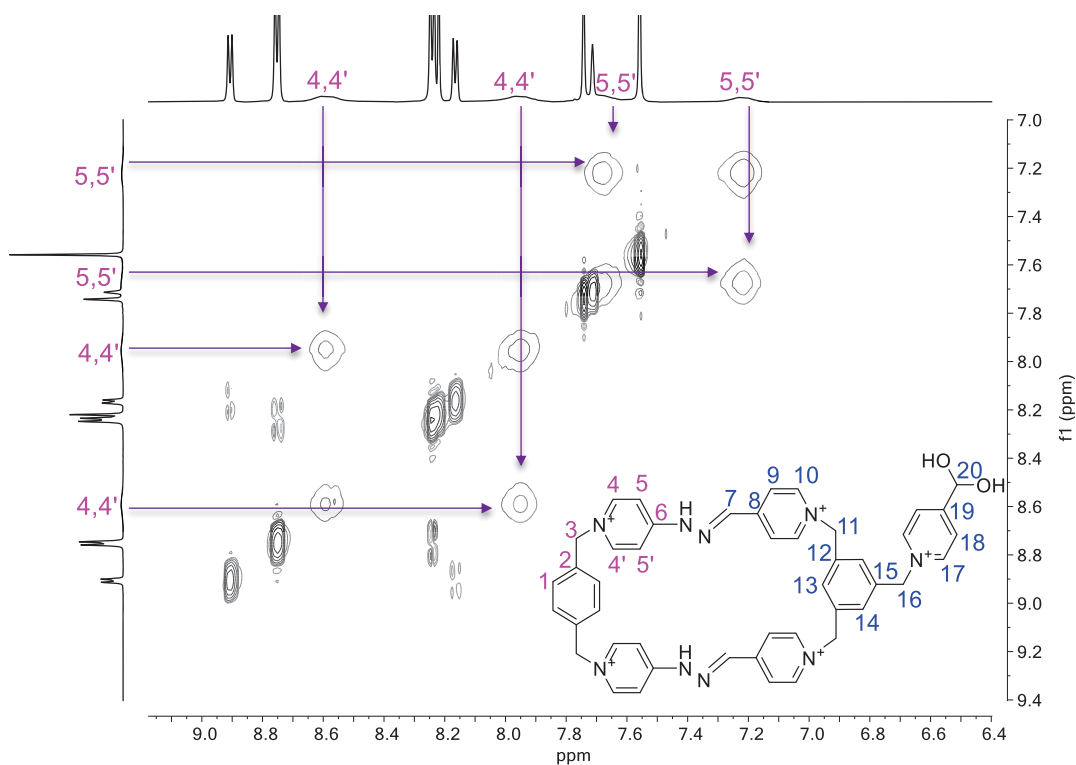


Figura 27. Espectro EXSY (D_2O , 500 MHz) de $MRBf^{5+}$. Se muestran los protones no equivalentes del anillo piridínico de la dihidrazona

Además, se caracterizó a $MRBf^{5+}$ mediante HR-ESI-MS (**Figura 28**). Se encontraron dos picos de masa exacta del ión $[M]^{2+}$ ($C_{46}H_{43}N_9O_2^{2+}$) a m/z 376.6763 y $[M+TFA]^{2+}$ ($C_{48}H_{44}F_3N_9O_4^{2+}$) a 433.6729 m/z , calcd. para $C_{55}H_{44}F_{15}N_9O_{12}$: 1307.2870.

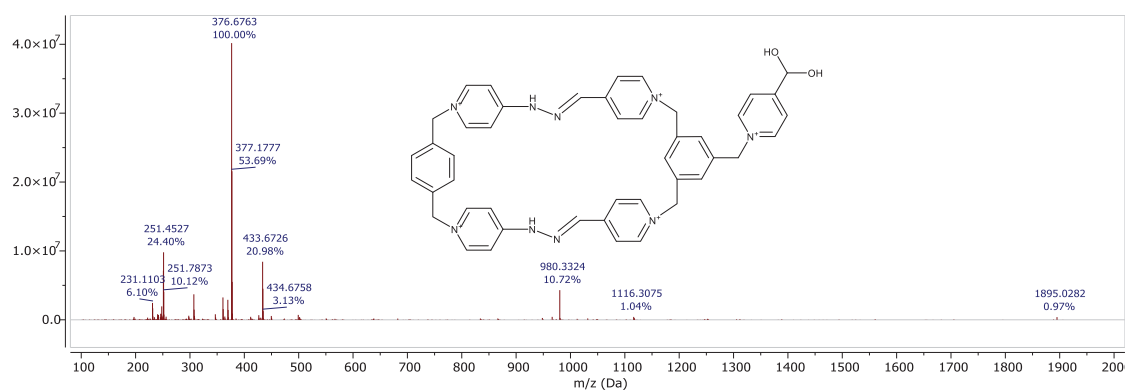


Figura 28. Espectro de HR-ESI-MS de **MRB1⁵⁺**

3.3. Estudios de complejación entre el receptor *red box* y sustratos modelo

En los últimos años, dentro del campo de la biomedicina, está siendo estudiado el uso de macrociclos tales como la *red box* como medio de transporte y liberación controlada de fármacos. Se investiga para reducir los posibles efectos adversos de los fármacos, como es la irritación de la mucosa gástrica debido a la ingesta oral continuada de medicamentos, sin alterar las propiedades farmacológicas del principio activo. La mayoría de los fármacos contra el cáncer tienen una aplicación limitada en medicina por ser poco solubles en agua e inestables.²⁸ Hay estudios que muestran que la internalización de fármacos en este tipo de macrociclos podría no solo reducir los posibles daños que causan al organismo, sino que se aumentaría su solubilidad, permeabilidad celular y estabilidad.²⁹ Además, se reduce la toxicidad local y sistémica y pueden ser modificados al añadir unidades de reconocimiento (ligandos, péptidos, etc.) para ser dirigidos a células o moléculas concretas.³⁰ El interior de la *red box* es un espacio en donde un sustrato de tamaño adecuado puede quedar encapsulado, de tal forma que se forma un complejo de inclusión mediante distintos tipos de interacción receptor-sustrato. Los compuestos aromáticos pueden interactuar con la nube electrónica de la *red box* mediante interacciones de tipo π - π con los lados largos π -deficientes de la *red box* e interacciones [C—H $\cdots\pi$] con los lados cortos del macrociclo.²⁷

En el presente trabajo, se estudia la formación de dichos complejos haciendo uso de dos fármacos diferentes: el naproxeno (**NAP**) y el 8-metoxipsoraleno (**8MET**) (**Figura 29**). El primero es un antiinflamatorio no esteroideo (AINEs) inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, usado para mitigar el dolor, reducir la inflamación y para bajar la fiebre en enfermedades tan diversas como la artritis, artrosis, migrañas o esguinces.³¹ El segundo es una sustancia química fotosensibilizante con efecto antiinflamatorio, antiproliferativo e inmunosupresor que se utiliza en fotoquimioterapia,

un procedimiento terapéutico usado para tratar enfermedades como la psoriasis, el eczema o algunos linfomas cutáneos, en donde se expone al paciente a rayos ultravioletas A (UVA) y B (UVB) tras la ingestión o aplicación cutánea del 8-metoxipsoraleno.³²

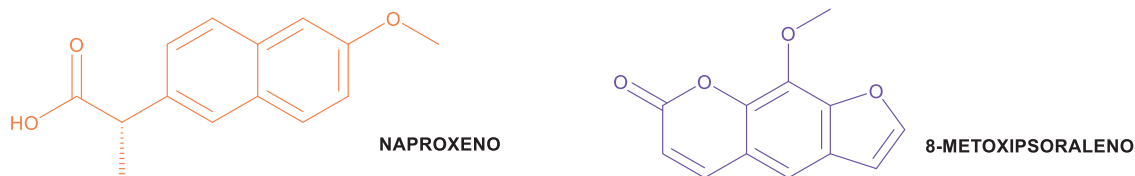


Figura 29. Estructura de los compuestos Naproxeno y 8-Metoxipsoraleno

La reacción de complejación se lleva a cabo en agua. A pesar de que ambos sustratos se disuelven perfectamente en medio orgánico, la falta de efecto hidrofóbico hace que el equilibrio de intercambio sea rápido y que interaccionen menos entre ellos. En cambio, en agua, a pesar de que el naproxeno y, especialmente, el 8-metoxipsoraleno presentan dificultades para disolverse por ser muy lipófilos, se favorece la complejación *host-guest* por el efecto hidrofóbico. Además, al preparar una disolución con una estequiometría 1:1, nos aseguramos que todo el sustrato que se solubilice va a complejarse con la *red box*.

3.3.1. Naproxeno \subset *red box* ($\text{NAP} \subset \text{MRB}^{4+}$)

Mediante el registro de espectros de ^1H RMN, se puede llevar a cabo un estudio cualitativo de la complejación de los sustratos con la *red box en base a los* desplazamientos químicos inducidos por la complejación. Así, en el espectro ^1H RMN de $\text{NAP} \subset \text{MRB}^{4+}$ (Figura 30) se muestra una comparación entre las señales del complejo y las de los componentes del equilibrio libres, MRB^{4+} y del naproxeno. En primer lugar, se pueden identificar las señales del receptor y sustrato dentro del espectro de la mezcla, observándose en primer lugar un desplazamiento de estos con respecto a los componentes no asociados. Así, se puede deducir que ambos compuestos están interaccionando, y que el desplazamiento químico observado se debe a la complejación o, dicho de otra forma, al equilibrio receptor-sustrato. Mientras que el análisis de los desplazamientos de las señales propias del macrociclo, que aparecen tanto a mayores como a menores desplazamientos comparadas con las del componente libre, las relativas al sustrato complejado nos dan más información. Cabe destacar aquí, que el alojamiento del naproxeno en el interior del macrociclo ocasiona que las señales de sus Hs se apantallen considerablemente, debido a la introducción del sustrato π -excedente en una cavidad hidrofóbica en la que se establecen interacciones π - π . También es de destacar que las señales correspondientes al

sustrato aparecen en una situación cercana a la coalescencia en el espectro, dificultando su asignación.

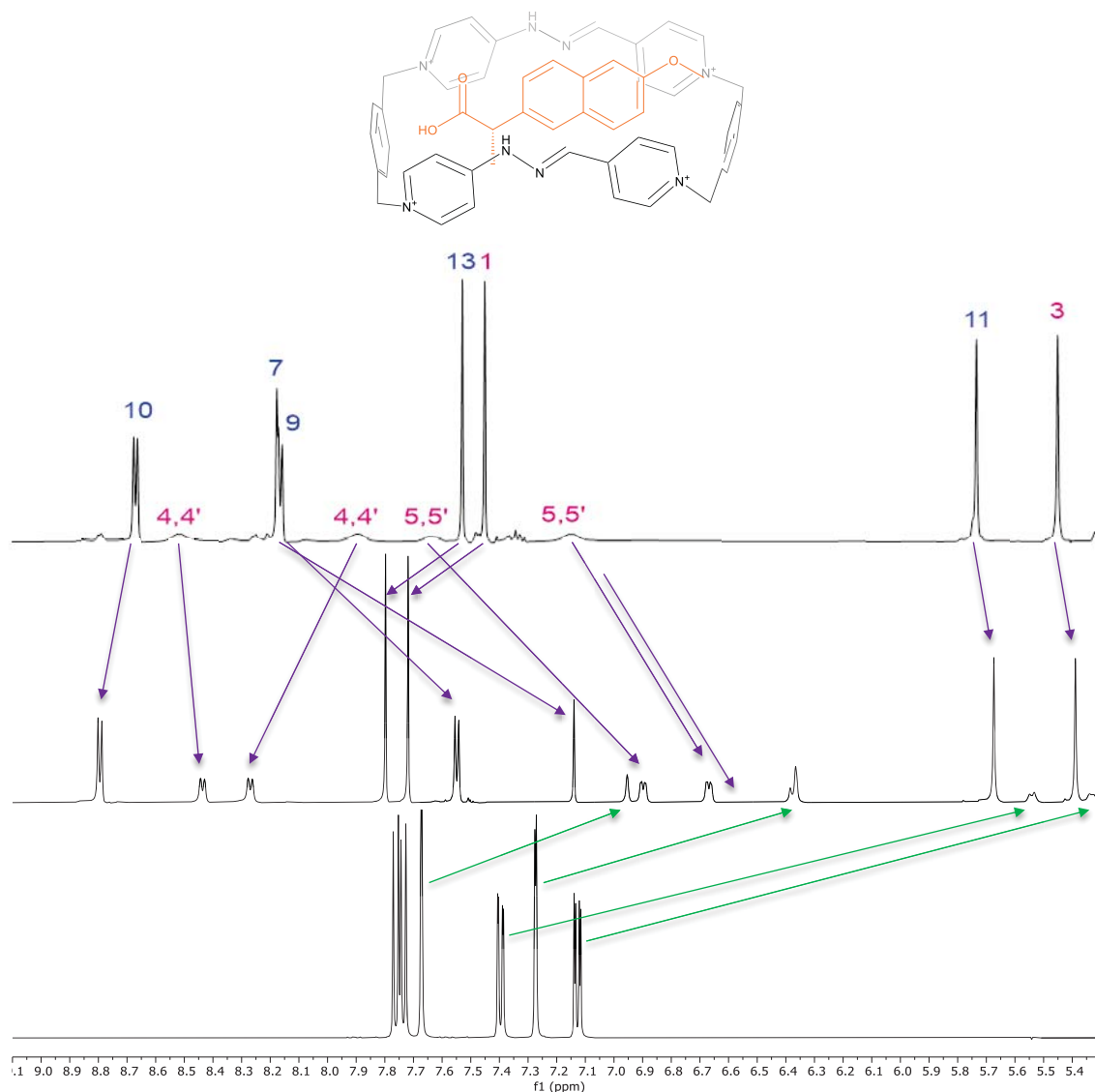


Figura 30. Espectros de ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) de MRB^{4+} (arriba), NAPcMRB^{4+} (medio) y NAP (abajo)

Otro hecho a destacar es referido a las señales pertenecientes a los Hs del anillo piridínico de la dihidrazona (H_4 , H_4' , H_5 , H_5'), anteriormente en coalescencia, y que ahora se resuelven apareciendo como cuatro cuatro dobletes bien definidos. Esto es debido a que la disposición del sustrato en el interior del macrociclo dificulta la rotación del anillo, ralentizando todavía más la rotación impedida del anillo. Asimismo, se puede observar que la señal del H en β al N del anillo piridínico está apantallada (H_9) porque los anillos aromáticos del piridinio son π -excedentes y ceden carga a los lados largos π -deficientes del macrociclo.

3.3.2. 8-metoxipsoralenocred box ($8\text{MET} \subset \text{MRB}^{4+}$)

En el espectro de $8\text{MET} \subset \text{MRB}^{4+}$ (Figura 31), se observa, al igual que en el caso del complejo $\text{NAP} \subset \text{MRB}^{4+}$, como se desplazan las señales del sustrato y del receptor con respecto a las señales del receptor libre. Se puede observar también como algunas señales del 8-metoxipsoraleno se han apantallado (otras aparecen a menores δ), mientras que las del macrociclo presentan un comportamiento similar al ya explicado para $\text{NAP} \subset \text{MRB}^{4+}$.

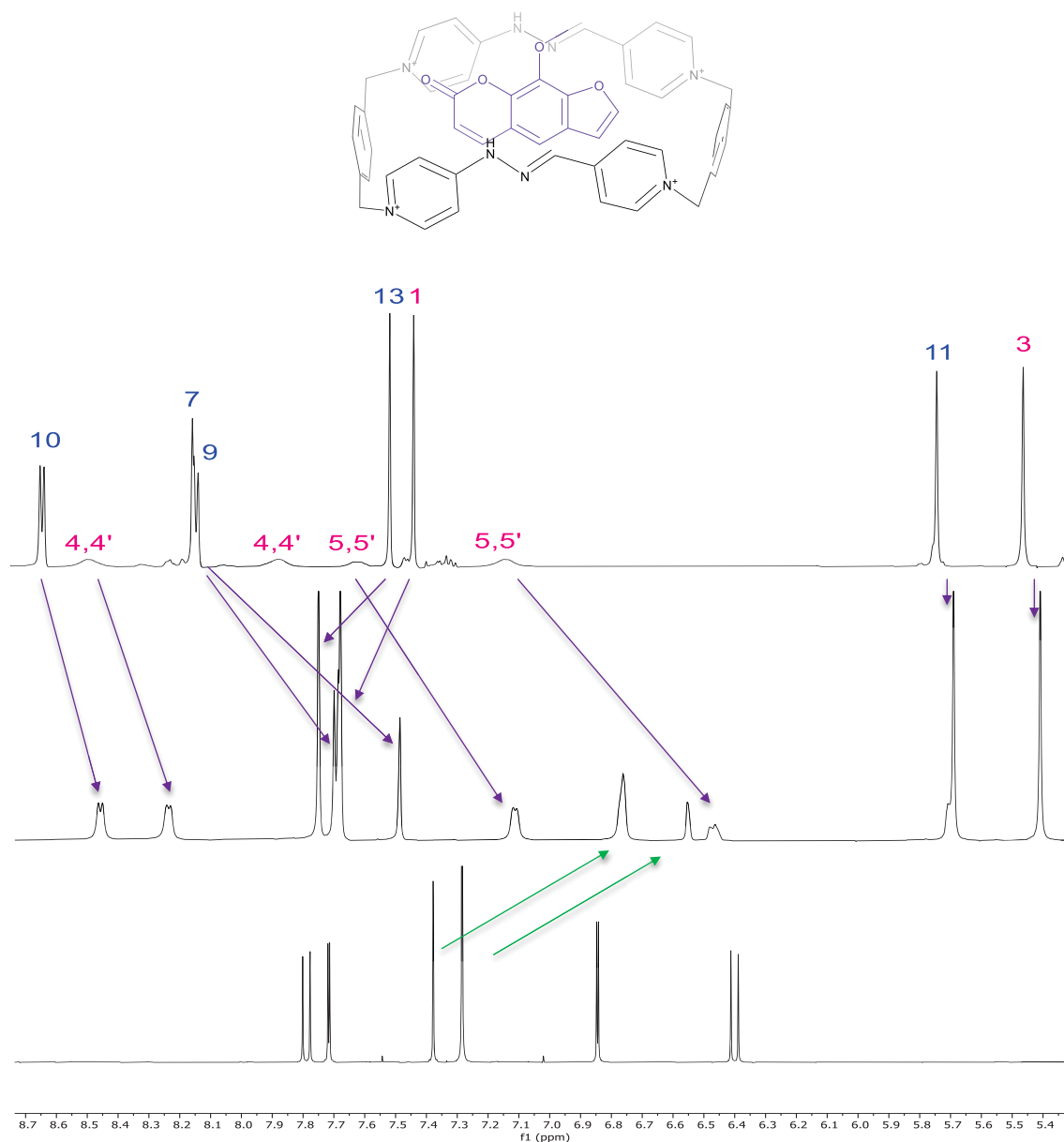


Figura 31. Espectros de ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) de MRB^{4+} (arriba), $8\text{MET} \subset \text{MRB}^{4+}$ (medio) y 8MET (abajo)

4. Parte experimental

4.1. Materiales y equipos usados

En el trabajo experimental, se ha hecho uso de reactivos y disolventes comerciales, empleados sin purificación adicional. Se proporcionó el compuesto de partida HH·2Br, que fue sintetizado por el grupo QUIMOLMAT. El agua utilizada es de calidad miliQ y se obtuvo mediante un equipo Millipore Gradient A10.

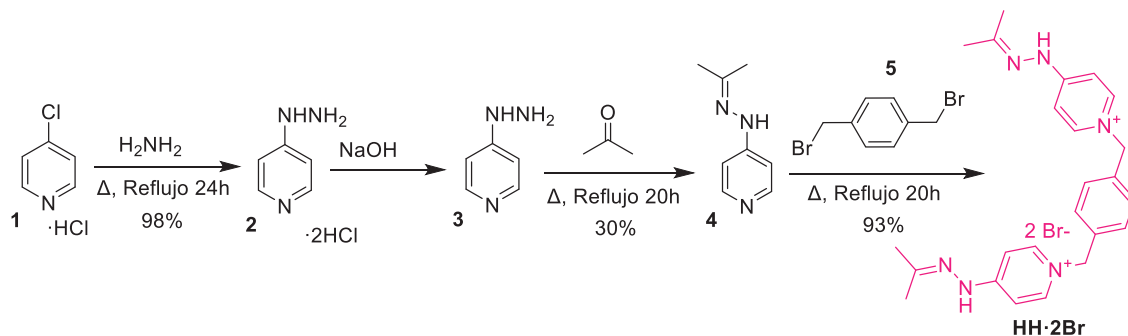
Se llevó a cabo el seguimiento de todas las reacciones por cromatografía en capa fina, haciendo uso de cromatofolios de gel de sílice Merck 60 F254 y, como revelador, radiación ultravioleta a 254 y 360 nm. El eluyente se escogió en base a las polaridades de los compuestos a separar, y se utilizó una mezcla de disolventes, "Magic", preparada a partir de 600 ml de CH₃CN, 150 mL de CH₃OH, 150 mL de H₂O y 5g de NaCl. Además, se utilizó el equipo de ultrasonidos Branson 2510 en caso de necesitar agitación para favorecer la disolución de los compuestos. Cuando se liofilizaron los productos, se usó un liofilizador Telstar Cryodos -80.

Se realizó también el seguimiento de todas las reacciones mediante RMN ¹H, para lo que se empleó un espectrómetro Bruker Avance 300 (300 MHz). Para la caracterización de los compuestos se usaron los espectrómetros Bruker Avance 500 e Bruker Avance III HD 400 (400/500 MHz para ¹H y 101/126 MHz para ¹³C) del SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) de la UDC. Todos los RMNs se realizaron utilizando D₂O como disolvente y tomando como referencia la señal del disolvente protonado.

En la purificación mediante HPLC semipreparativa en fase reversa se empleó un espectrómetro Agilent Technologies 1200 y el detector UV registró a 254 y 310 nm. La columna semipreparativa utilizada fue una Aeris 5 μm PEPTIDE XB-C18 100 Å (250 x 10 mm) de Phenomenex. Por otra parte, en el análisis por HPLC-MS en fase reversa se utilizó un espectrómetro Thermo Scientific Ultimate 3000 con detector PDA (Photo-Diode Array), acoplado a un espectrómetro de cuadrupolo simple Thermo Scientific MSQ Plus, y se detectó a 220 y 280 nm.

4.2. Procesos experimentales

4.2.1. Síntesis de la dihidrazona (HH·2Br)



Se disuelven 5.78 g de 4-cloropiridinahidroclorada (**1**, 38.5 mmol, 1 eq) en 100 mL de 2-propanol. A esta disolución blanquecina, se añaden 37 mL de hidrazina (**2**, 0.594 mol, 15 eq, 50 % H_2O) y se calienta a ebullición y con agitación. La disolución se vuelve de color amarillo claro una vez añadida la hidrazina. Se calienta a ebullición durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, la disolución aún conserva un color amarillento pero se observa la formación de un precipitado blanquecino en el fondo del balón. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se realiza una cromatografía en capa fina para ver si ha acabado la reacción. A continuación, se eliminan los restos de disolvente en el rotavapor y se acaba de secar el producto en el liofilizador (20 horas). El producto final presenta un aspecto de polvo blanquecino y se obtienen 6.84 g, siendo el rendimiento del 98 %.

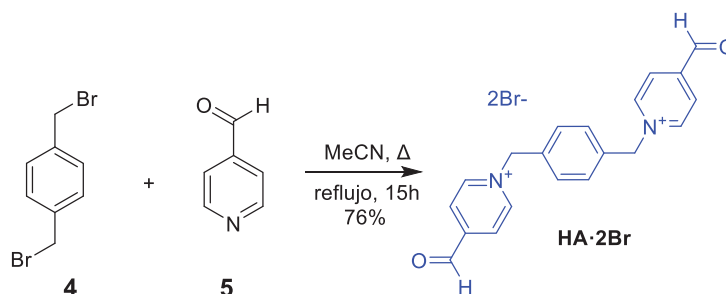
A continuación, se toman 4.02 g de 4-hidrazinpiridinaclorohidratada (**3**, 22 mmol, 1 eq) se disuelven en una disolución de NaOH 2M y se agita durante 30 min. Luego, se realizan 8 extracciones con AcOEt y se seca en el rotavapor hasta que queda poco volumen, momento en el cual se disuelve en 100 mL de acetona y se calienta a ebullición durante 20 horas. Pasado ese tiempo, la disolución presenta un color anaranjado y se observa un precipitado de color cobrizo, la hidrazona protegida, de la cual se obtienen 0.98 g, lo que se corresponde con un rendimiento del 30 % en esta etapa de la reacción.

Estos 0.98 g de hidrazona (**4**, 6.57 mmol, 6 eq) se disuelven en 100 mL de acetona y se añaden 0.29 g de α,α' -dibromo-*p*-xileno (**5**, 1.10 mmol, 1 eq). Se calienta a ebullición durante 20 horas. Inicialmente, la disolución presenta un color anaranjado, pero a los 15 min ya se observa turbidez y, a los 30 min, empieza a precipitar un sólido blanquecino. Una vez retirado del reflujo y enfriado, se realiza una cromatografía en capa fina para ver si ha concluido la reacción. Se filtra a vacío para obtener el sólido

pulvurulento de color beis oscuro. Se lava dos veces con 20 mL de acetona y dos veces con 20 mL de éter etílico y se deja secar. Finalmente, se obtienen 0.57 g de **HH·2Br**, siendo el rendimiento en esta etapa del 93 %.

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.10 (d, $J = 7.35$ Hz, 4H), 7.35 (s, 4H), 6.97 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H), 5.34 (s, 4H). **RMN ¹³C** (101 MHz, D₂O) δ (ppm): 157.45 (C), 142.9 (CH), 135.22 (C), 129.11 (CH), 107.33 (CH), 60.68 (CH₂).

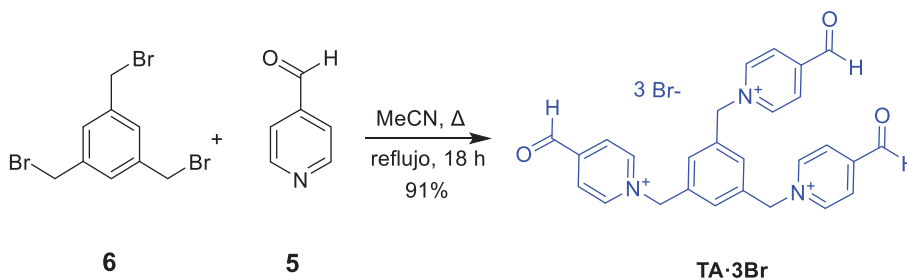
4.2.2. Síntesis del dialdehido (**DA·2Br**)



Se disuelven 0.52 g de α,α' -dibromo-*p*-xileno (**4**, 1.96 mmol, 1 eq) en 60 mL de acetonitrilo y se añaden 642 μL de 4-piridincarboxialdehido (**5**, 6.82 mmol, 3.5 eq). Se calienta a reflujo con agitación. Transcurridos 30 min, la reacción comienza a mostrar un color rojizo y se empieza a formar un precipitado. Se deja reaccionar 15 horas, tras las cuales se filtra el sólido a vacío y se lava 3 veces con 15 mL de acetonitrilo y 3 veces con 15 mL de dietiléter. Se obtiene el producto, sólido pulvurulento amarillento **DA·2Br** (710.4 mg, rendimiento del 76 %).

RMN ¹H (500 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.83 (d, $J = 6.75$ Hz, 4H), 8.07 (d, $J = 6.67$ Hz, 4H), 7.46 (s, 4H), 6.12 (s, 2H), 5.78 (s, 2H). **RMN ¹³C** (126 MHz, D₂O) δ (ppm): 160.38 (C), 144.71 (CH), 134.26 (C), 129.98 (CH), 125.59 (CH), 87.47 (CH), 63.59 (CH₂).

4.2.3. Síntesis del trialdehido (**TA·3Br**)



Para la síntesis del trialdehido (**TA·3Br**), se pesan 0.74 g de 1,3,5-tribromometilbenceno (**6**, 2.07 mmol, 1 eq) y se añaden 1.95 mL de la amino-4-

piridinilcarboxialdehído (**5**, 20 mmol, 10 eq). Una vez agitado, se adicionan 25 mL de acetonitrilo y se pone a calentar a ebullición. La disolución presenta a temperatura ambiente un color amarillo claro y, a medida que se calienta, se va tornando de un color naranja oscuro casi rojo. Una vez alcanzada la ebullición, se observa la formación de un precipitado. Se continúa el calentamiento durante 18 horas y se realiza una cromatografía en capa fina para ver el progreso de la reacción.

Una vez comprobado que la reacción se ha completado, se filtra a vacío y el sólido se lava 3 veces con 25 mL de acetonitrilo y 3 veces con 25 mL de éter etílico, para eliminar los posibles restos del producto sin reaccionar y ayudar a secar el producto. Al observarse que el producto está húmedo, se lava de nuevo 4 veces con 40 mL de éter etílico y se recoge la parte del producto más seca. El resto, se seca en el liofilizador (60 horas aprox). Finalmente, se obtiene en total 1.38 g (91 %) de producto, **TA**·3Br (III), un polvo amarillo ámbar.

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.82 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 8.07 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 7.46 (s, 3H), 6.12 (s, 3H), 5.77 (s, 6H). **RMN ¹³C** (101 MHz, D₂O) δ (ppm): 160.43 (C), 144.69 (CH), 133.94 (C), 130.38 (CH), 125.59 (CH), 87.47 (CH), 63.64 (CH₂).

4.2.4. Ensamblaje y purificación del macrociclo *red box* funcionalizado (MRBf·5TFA)



En la reacción de formación del macrociclo **MRBf**·5TFA se disuelven en 150 mL de H₂O 0.17 g del trialdehído, **TA**·3Br (0.226 mmol, 1.5 eq), y 0.08 g de la dihidrazona, **HH**·2Br (0.149 mmol, 1 eq), previamente comprobado por ¹H RMN que ambos reactivos se encuentran en proporción 1:1, con un pequeño exceso del trialdehído. A continuación, se añaden 1.5 μL de TFA y se calienta con agitación durante 18 horas. Luego, una vez enfría a temperatura ambiente, se realiza una coprecipitación con KPF₆, al añadir un exceso de esta sal y agitar durante 30 min. Se observa un cambio de color en la disolución de amarillo claro a rojo. Se filtra a vacío para recuperar el sólido rojizo y se hacen 4 lavados con 15 mL de H₂O y 3 lavados con 20 mL de éter etílico. Una vez seco, se disuelven en 100 mL de acetonitrilo (se forma una disolución de color amarilla), se añade un exceso de Bu₄NCl y se agita a

temperatura ambiente durante 30 min. Precipita nuestro macrociclo, **MRB**-5Cl como un sólido amarillo claro, que se filtra a vacío y se lava 2 veces con 15 mL de acetonitrilo y 3 veces con 20 mL de éter etílico. De esta forma, se consigue el macrociclo con iones Cl⁻ como contraión, por lo que se puede proceder a su caracterización en medio acuoso (D₂O). Se pesan 0.32 g de **MRBf**-5Cl, siendo un rendimiento superior al 200 %, debido a que hay un gran exceso de Bu₄NCl en el producto.

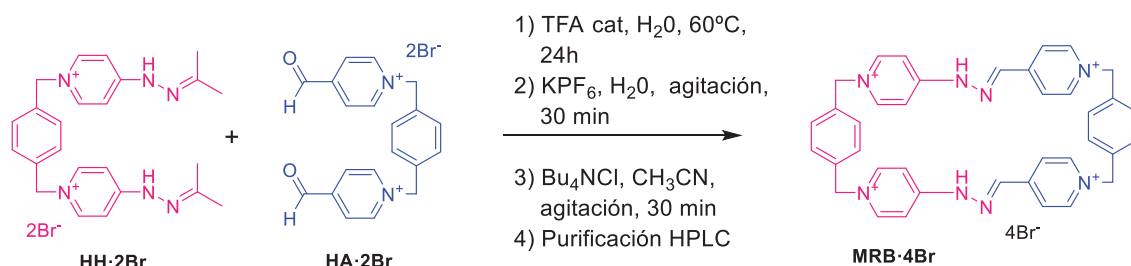
Para llevar a cabo la purificación de **MRBf**-5Cl, se disuelven 101.3 mg en 2 mL de H₂O y 0.8 mL de acetonitrilo. Se filtra la disolución y se añaden unos mL de TFA, para asegurarse que el macrociclo está en la forma ácida. Se purifica mediante la técnica de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) semipreparativa en fase inversa haciendo uso de una columna C18 y de los eluyentes H₂O + 0.1 % TFA y CH₃CN + 0.1 % TFA. Al inicio se inyectaron 20 µL de la muestra, cantidad que se aumentó progresivamente hasta los 120 µL mientras se optimizó el método, probando distintos gradientes de H₂O-CH₃CN y modificando los tiempos de las rampas, hasta conseguir la mejor resolución de los picos (**Tabla 1**), en un tiempo razonable. El tiempo de retención del compuesto es de 15.6 min (**Figura 18**). Por último, se liofiliza el sólido amarillo claro obtenido. Se obtienen 4.8 mg de **MRBf**-5TFA (rendimiento del 5 %, había muchas sales en el producto sin purificar). El producto se analiza mediante HPLC-MS. Se hizo uso de H₂O + 0.04 % TFA y CH₃CN + 0.04 % TFA como eluyentes. El método utilizado en las inyecciones fue 5 % de CH₃CN + 0.04 % TFA durante 2 min y un gradiente de 5→95 % los siguientes 25 min.

Tiempo (min)	% H ₂ O + 0.1 % TFA	% CH ₃ CN + 0.1 % TFA
0	90	10
4	90	10
33	55	45
34	5	95
36	95	5
40	95	5

Tabla 1. Gradiente final optimizado utilizado para purificar **MRBf**⁶⁺ por HPLC semipreparativa

RMN ¹H (500 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.91 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 8.75 (d, *J* = 6.5 Hz, 4H), 8.59 (s ancho, 4H), 8.24 (d, *J* = 6.4 Hz, 4H), 8.22 (s, 2H), 8.17 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.94 (s ancho, 4H), 7.74 (s, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.64 (s ancho, 1H), 7.56 (s, 4H), 7.22 (s ancho, 4H), 6.20 (s, 1H), 5.89 (s, 2H), 5.79 (s, 4H), 5.54 (s, 4H). **HR-ESI-MS** (m/z): calculado para C₅₅H₄₄F₁₅N₉O₁₂: 1307.2870; encontrado, C₄₆H₄₃N₉O₂²⁺: 376.6763 y C₄₈H₄₄F₃N₉O₄²⁺: 433.6729

4.2.5. Ensamble y purificación del macrociclo *red box* (MRB·4Br)



El procedimiento llevado a cabo es el mismo que se ha descrito anteriormente para la *red box* funcionalizada, pero se parte de los siguientes *bloques de construcción*: la dihidrazona (**HH·2Br**), compuesto cuya síntesis se describe en el apartado 4.2.2., y el dialdehído (**DA·2Br**), sintetizado y proporcionado por el grupo QUIMOLMAT 5.

En un matraz de fondo redondo de 400 mL, se disuelven en 400 mg de agua miliQ 0.61 g de la dihidrazona (**HH·2Br**, 1.082 mmol, 1 eq) y 0.55 g del dialdehído (**DA·2Br**, 1.082 mmol, 1 eq). Una vez comprobado que la estequiometría es 1:1 (es necesario añadir 0.07 g más de dihidrazona para corregir la estequiometría), se añaden 160 µL de TFA. La disolución obtenida se divide en dos fracciones (200 mL + 200 mL). Tras agitar 24h a T ambiente, se forma un precipitado naranja. Una de esas partes, se precipita como **MRB·4Cl** para caracterizar en medio orgánico, y de la segunda fracción, se toman 10 mL de **MRB·4Br** para, posteriormente, realizar los ensayos de formación de los complejos de inclusión.

Para purificar MRB·4Br mediante HPLC semipreparativa en fase reversa, se disuelven 85 mg en 1.5 mL de H₂O y 1.5 mL de acetonitrilo, se filtra y se añaden unos mL de TFA. Se vuelve a utilizar una columna C18 y como eluyente H₂O + 0.1 % TFA y CH₃CN + 0.1 % TFA (**Tabla 2**). Se puede observar un menor número de picos, debido a la formación de menos oligómeros durante la síntesis. El tiempo de retención del compuesto es de 15 min (**Figura 17**).

Tiempo (min)	% H ₂ O + 0.1 % TFA	% CH ₃ CN + 0.1 % TFA
0	90	10
4	90	10
30	40	60
38	5	95
40	95	5

Tabla 2. Gradiente final optimizado utilizado para purificar **MRB⁴⁺** por HPLC semipreparativa

El producto de color amarillo **MRB**·4Br es liofilizado y se obtienen 36.2 mg, siendo el rendimiento en la etapa de purificación del 43 %. El producto se analiza mediante HPLC-MS, utilizando las condiciones descritas para **MRBf**·5TFA.

RMN ¹H (500 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.66 (d, *J* = 6.6 Hz, 4H), 8.51 (s ancho, 2H), 8.17 (s, 2H), 8.16 (d, *J* = 6.44 Hz, 4H), 7.88 (s ancho, 2H), 7.63 (s ancho, 2H), 7.52 (s, 4H), 7.44 (s, 4H), 7.14 (s ancho, 2H), 5.73 (s, 4H), 5.45 (s, 4H). **RMN ¹³C** (126 MHz, D₂O) δ (ppm): 154.59 (C), 150.02 (C), 144.18 (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), 109.99 (CH), 109.87 (CH), 63.45 (CH₂), 61.37 (CH₂). **HR-ESI-MS** (m/z): calculado para C₃₈H₃₆N₈Br₄: 923.9756; encontrado, C₃₈H₃₄N₈²⁺: 301.1447 y C₃₈H₃₄N₈Br⁺: 681.2055.

4.2.6. Síntesis de los complejos de inclusión. **NAP**⊂**MRB** y **8MET**⊂**MRB**

Los complejos de inclusión se sintetizan en una estequiometría 1:1. Se prepara una disolución 1 mM del macrociclo *red box*, para lo que se disuelven 2.3 mg de **MRB**·4Br en 2.5 mL de D₂O. Se toman 250 μL de esta disolución y se introducen en un tubo de RMN, en donde se diluyen con 750 μL de D₂O. A continuación, se añaden 6.3 mg de naproxeno sólido, siendo la concentración de NAP de 10 mM, para asegurarnos que la estequiometría es 1:1. Se disuelve calentando suavemente y sonicando, hasta que se forma una disolución de color naranja (aquella parte que se ha disuelto es porque se ha complejado con el macrociclo). Se analiza el espectro de RMN ¹H del complejo **NAP**⊂**MRB** (1:1).

RMN ¹H (500 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.80 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 8.44 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 8.27 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.81 (s, 4H), 7.72 (s, 4H), 7.55 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.15 (s, 2H), 6.96 (s, 1H), 6.91 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 6.68 (d, *J* = 7.3, 2H), 6.39 (s, 1H), 5.69 (s, 4H), 5.55 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.40 (s, 4H), 5.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.88 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 3.26 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 1.24 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H).

En otro tubo de RMN, se repite el mismo procedimiento (misma estequiometría 1:1) pero añadiendo en exceso el 8-metoxipsoraleno, sólido de color lila. En este caso, como el 8-metoxipsoraleno no es muy soluble en agua, la solubilidad del sustrato la marca la complejación. Hay una mayor dificultad para la disolución del compuesto, porque es mucho más hidrófobo que el naproxeno, por lo que es necesario calentar y sonicar durante más tiempo. Se estudia el espectro de ¹H RMN del complejo **8MET**⊂**MRB** (1:1).

RMN ¹H (500 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.79 (d, 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, 2H), 6.55 (s, 2H), 6.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.69 (s, 4H), 5.41 (s, 4H), 3.45 (s, 3H).

5. Conclusiones

Considerando los objetivos iniciales de hacer uso de la química covalente de iminas para la síntesis supramolecular de macrociclos de interés en biomedicina, y en base a los resultados de este trabajo, se pueden formular las siguientes conclusiones:

- Los *bloques de construcción* **DA**²⁺, **HH**²⁺ e **TA**³⁺ se sintetizaron mediante reacciones S_N2 de forma eficaz, siendo los rendimientos obtenidos superiores al 90 %.
- Los macrociclos **MRB**⁴⁺ y **MRBf**⁵⁺ se ensamblaron al formarse un nuevo enlace imina bajo control cinético, en un tiempo breve.
- La purificación de **MRB**⁴⁺ y **MRBf**⁵⁺ mediante HPLC semipreparativa en fase reversa permitió obtener los macrociclos puros. El rendimiento de **MRB**⁴⁺ fue bueno, del 43 %, mientras que el de **MRBf**⁵⁺ fue muy bajo, del 5 %, por lo que es necesaria la optimización de su síntesis en un futuro.
- Todos los compuestos no reportados previamente han sido caracterizados por ¹H y ¹³C RMN mono y bidimensional, lo que permitió la asignación estructural de los mismos. Además, se confirmó la formación de los productos mediante HR-ESI-MS.
- El estudio cualitativo de la formación de los complejos de inclusión con NAP y 8MET confirma que **MRB**⁴⁺ interacciona con estos sustratos, abriendo las puertas a futuras investigaciones que profundicen en el estudio del potencial de este macrociclo como vehículo de fármacos.

Conclusión

Considerando los objetivos iniciales de hacer uso de la química covalente de iminas para la síntesis supramolecular de macrociclos de interés en biomedicina, y basándose en los resultados de este trabajo, pueden formularse las siguientes conclusiones:

- Os *bloques de construcción* **DA**²⁺, **HH**²⁺ e **TA**³⁺ sintetizáronse mediante reaccións S_N2 de forma eficaz, sendo os rendementos superiores ao 90 %.
- Os macrociclos **MRB**⁴⁺ e **MRBf**⁵⁺ ensambláronse ao formarse un novo enlace imina baixo control cinético, nun tempo breve.
- A purificación de **MRB**⁴⁺ e **MRBf**⁵⁺ mediante HPLC semipreparativa en fase reversa permitiu obter os macrociclos puros. O rendemento de **MRB**⁴⁺ foi bo, do 43 %, mentres que o de **MRBf**⁵⁺ foi moi baixo, do 5 %, polo que é necesaria a optimización da súa síntese nun futuro.

- Todos os compostos non reportados previamente foron caracterizados por ^1H e ^{13}C RMN mono e bidimensional, o que posibilitou a asignación estrutural dos mesmos. Ademais, confirmouse a formación dos produtos mediante HR-ESI-MS.
- O estudio cualitativo da formación dos complexos de inclusión con NAP e 8MET confirma que **MRB**⁴⁺ interactúa con estes substratos, abrindo as portas a futuras investigacións que afonden no estudio do potencial deste macrociclo como vehículo de fármacos.

Conclusions

Considering the initial objectives of making use of imine covalent chemistry for the supramolecular synthesis of macrocycles of interest in biomedicine, and according to the results of this work, the following conclusions can be stated:

- The building blocks **DA**²⁺, **HH**²⁺ e **TA**³⁺ were synthesized by $\text{S}_{\text{N}}2$ reactions in an efficient way, being the yields obtained greater than 90 %.
- The **MRB**⁴⁺ and **MRBf**⁵⁺ macrocycles were assembled by forming a new imine bond under kinetic control, in a short period of time.
- The purification of **MRB**⁴⁺ and **MRBf**⁵⁺ by means of semi-preparative reversed-phase HPLC allowed obtaining the pure macrocycles. The yield of **MRB**⁴⁺ was good, 43 %, while that of **MRBf**⁵⁺ was low, 5 %, therefore it is necessary to optimize its synthesis in the future.
- All compounds not previously reported have been characterized by one and two-dimensional ^1H and ^{13}C NMR, which enable their structural assignment. Furthermore, the formation of the products was confirmed by HR-ESI-MS.
- The qualitative study of the formation of inclusion complexes with NAP and 8MET confirms that **MRB**⁴⁺ interacts with both substrates, opening doors to future research that deepens in the study of the potential of this macrocycle as a drug vehicle.

6. Bibliografía

- (1) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*; Wiley: Chichester (Inglaterra), 2000.
- (2) Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture)*. *Angew. Chemie Int. Ed. Eng.* **1988**, *27*, 89–112.
- (3) Cragg, P. J. *A Practical Guide to Supramolecular Chemistry*; Wiley: Chichester (Inglaterra), 2005.
- (4) Cram, D. J.; Cram, J. M. Host-Guest Chemistry. *Science*. **1974**, *183*, 803–809.
- (5) Bell, T. W.; Firestone, A.; Guzzo, F.; Hu, L. Y. Torands: Planar Polyazamacrocyclic Ligands for Metal Ions. *J. Incl. Phenom.* **1987**, *5*, 149–152.
- (6) Funk, S.; Schatz, J. Cucurbiturils in Supramolecular Catalysis. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2020**, *96*, 1–2.
- (7) Singapore National Institute of Chemistry. The Nature of the Mechanical Bond, J Fraser Stoddart. <https://web.archive.org/web/20050913180455/http://www.snic.org.sg/events/authorinfo.html> (accedido Mar 30, 2021).
- (8) Liu, Z.; Nalluri, S. K. M.; Fraser Stoddart, J. Surveying Macrocyclic Chemistry: From Flexible Crown Ethers to Rigid Cyclophanes. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2459–2478.
- (9) The Nobel Prize. Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2016. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2016/press-release> (accedido Mar 31, 2021).
- (10) 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.
- (11) Cram, D. J.; Kaneda, T.; Helgeson, R. C.; Brown, S. B.; Knobler, C. B.; Maverick, E.; Trueblood, K. N. Host-Guest Complexation. 35. Spherands, the First Completely Preorganized Ligand Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3645–3657.

- (12) Cram, D. J. Preorganization—From Solvents to Spherands. *Angew. Chemie Int. Ed. Eng.* **1986**, *25*, 1039–1057.
- (13) Meyer, C. D.; Joiner, C. S.; Stoddart, J. F. Template-Directed Synthesis Employing Reversible Imine Bond Formation. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1705–1723.
- (14) Rowan, S. J.; Cantrill, S. J.; Cousins, G. R. L.; Sanders, J. K. M.; Stoddart, J. F. Dynamic Covalent Chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed. Eng.* **2002**, *41*, 898–952.
- (15) Belowich, M. E.; Stoddart, J. F. Dynamic Imine Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2003–2024.
- (16) Zhang, Y.; Qi, Y.; Ulrich, S.; Barboiu, M.; Ramström, O. Dynamic Covalent Polymers for Biomedical Applications. *Mater. Chem. Front.* **2020**, *4*, 489–506.
- (17) Ma, X.; Zhao, Y. Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host-Guest Interactions. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7794–7839.
- (18) Dale, E. J.; Vermeulen, N. A.; Juríček, 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.
- (19) Allwood, B. L.; Spencer, N.; Shahriari-Zavareh, H.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. Complexation of Diquat by a Bisparaphenylene-34-Crown-10 Derivative. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1061–1064.
- (20) Ashton, P. R.; Goodnow, T. T.; Kaifer, A. E.; Reddington, M. V.; Slawin, A. M. Z.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Vicent, C.; Williams, D. J. A [2] Catenane Made to Order. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1989**, *28*, 1396–1399.
- (21) 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. Chemie Int. Ed. Eng.* **1988**, *27*(11), 1547–1550.
- (22) 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.
- (23) Barnes, J. C.; Juríček, M.; Vermeulen, N. A.; Dale, E. J.; Stoddart, J. F. Synthesis of ExnBox Cyclophanes. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 11962–11969.

- (24) Bernardo, A. R.; Stoddart, J. F.; Kaifer, A. E. Cyclobis(Paraquat-*p*-Phenylene) as a Synthetic Receptor for Electron-Rich Aromatic Compounds: Electrochemical and Spectroscopic Studies of Neurotransmitter Binding. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10624–10631.
- (25) García, M. D.; Alvaríño, C.; López-Vidal, E. M.; Rama, T.; Peinador, C.; Quintela, J. M. Complexation of Aromatic Compounds with Self-Assembled PdII and PtII Metallacycles. *Inorg. Chimica Acta.* **2014**, *417*, 27–37.
- (26) 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.
- (27) 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.
- (28) Tian, B.; Hua, S.; Liu, J. Cyclodextrin-Based Delivery Systems for Chemotherapeutic Anticancer Drugs: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *232*, 115805.
- (29) 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.
- 30) Zhang, J.; Ma, P. X. Cyclodextrin-Based Supramolecular Systems for Drug Delivery: Recent Progress and Future Perspective. *Adv. Drug Del. Rev.* **2013**, *65*(9), 1215–1233.
- (301) Laboratorios Cinfa. Prospecto: información para el usuario: naproxeno sódico cinfa 550 mg comprimidos recubiertos con película EFG, 2018. Centro de información online de medicamentos de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. <https://cima.aemps.es/cima/dohtml/p/65730> (accedido Mar 29, 2021).
- (32) Asociación Nacional de Enfermería Dermatológica e Investigación del Deterioro de la Integridad Cutánea. Procedimiento de Fotoquimioterapia <https://anedidic.com/descargas/recomendaciones-anedidic/02/procedimiento-de-fotoquimioterapia.pdf> (accedido Mar 29, 2021).

ANEXO

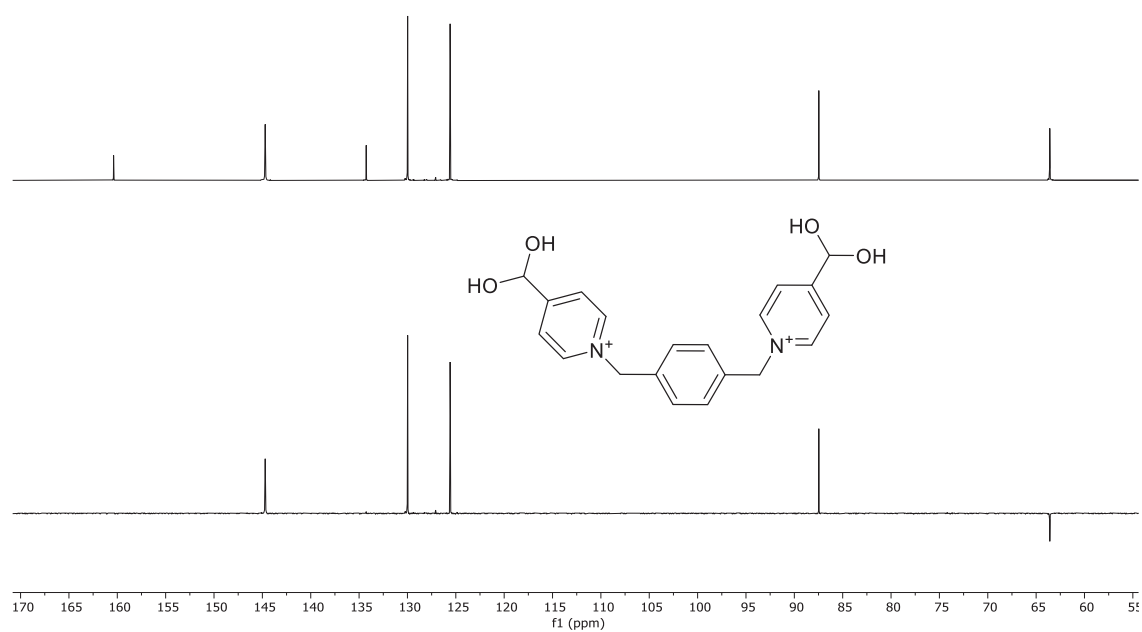


Figura 32. Espectro de ^{13}C RMN (D_2O , 126 MHz) de DA^{2+}

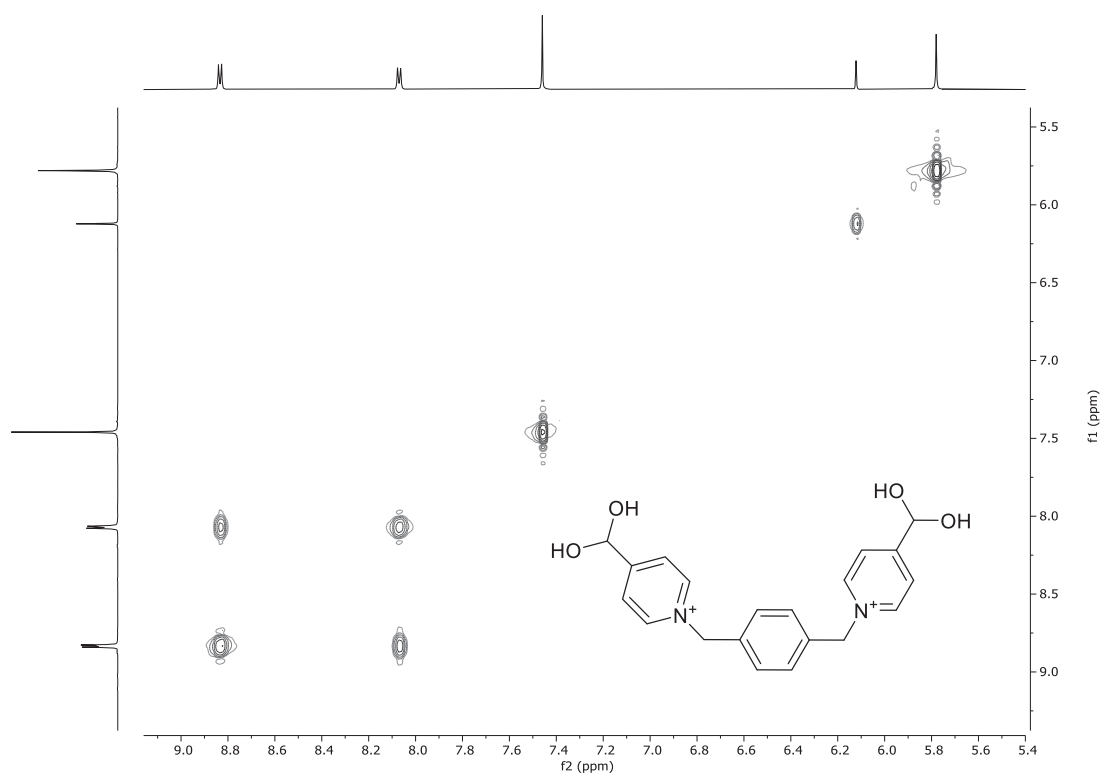


Figura 33. Espectro COSY (D_2O , 500 MHz) de DA^{2+}

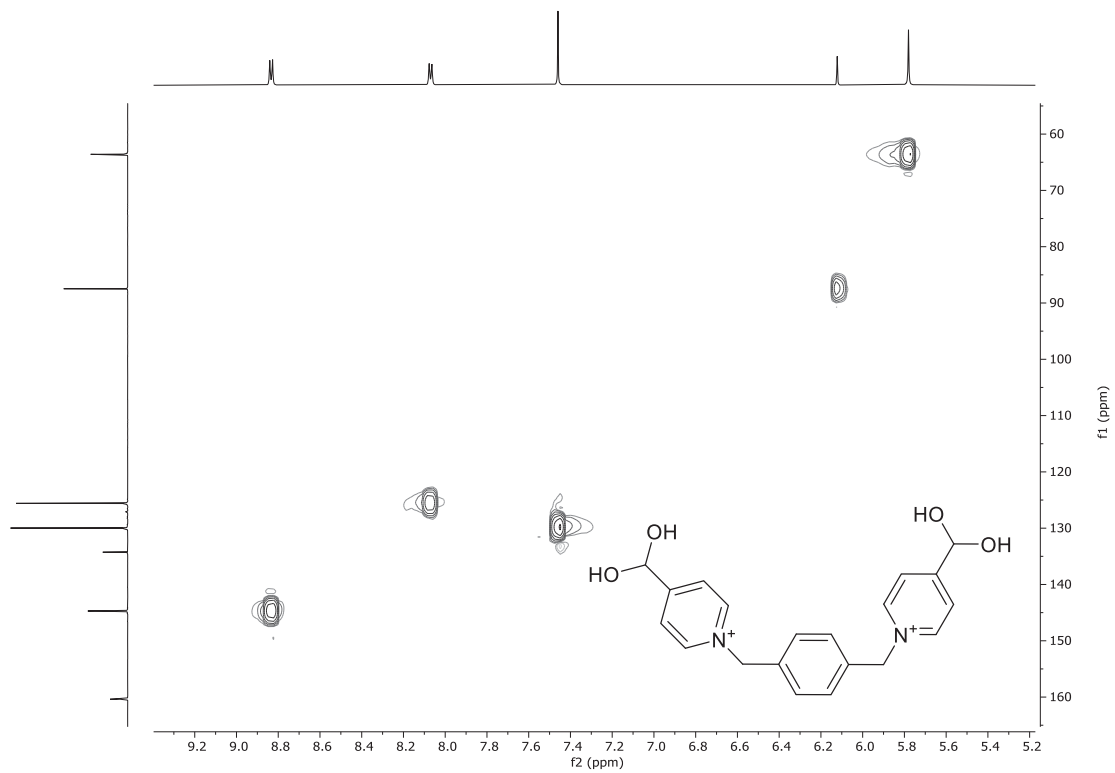


Figura 34. Espectro HSQC (D_2O , 500 e 126 MHz) de DA^{2+}

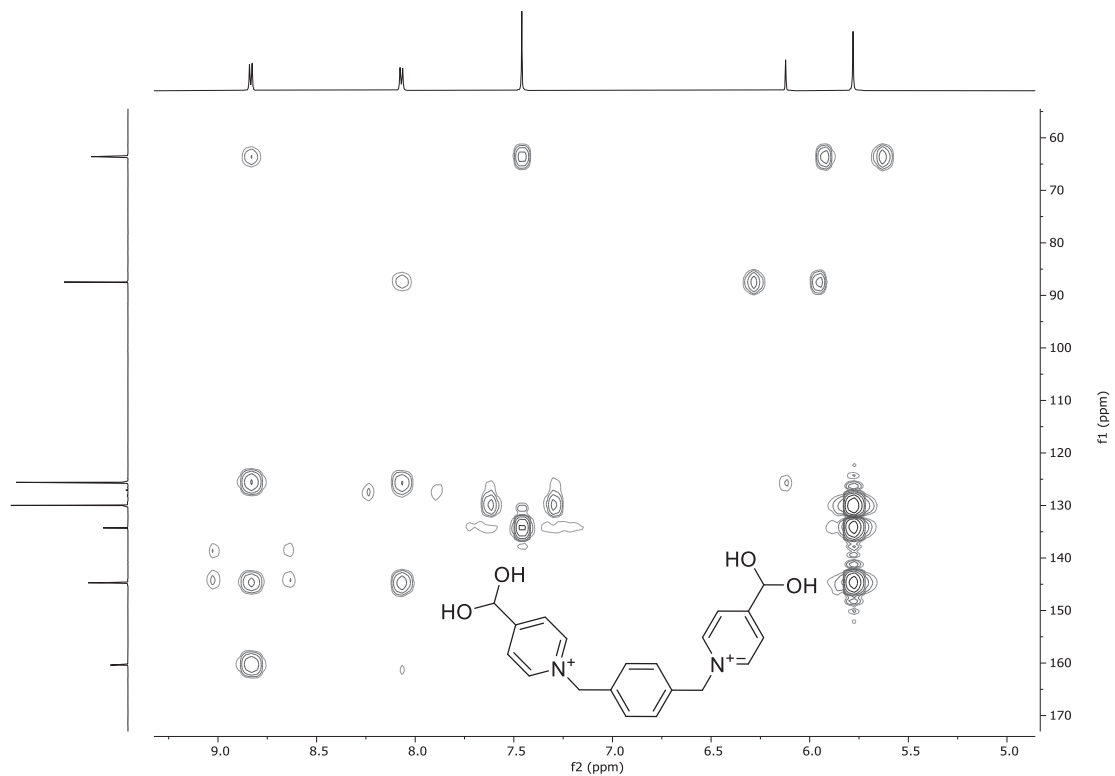


Figura 35. Espectro HMBC (D_2O , 500 e 126 MHz) de DA^{2+}

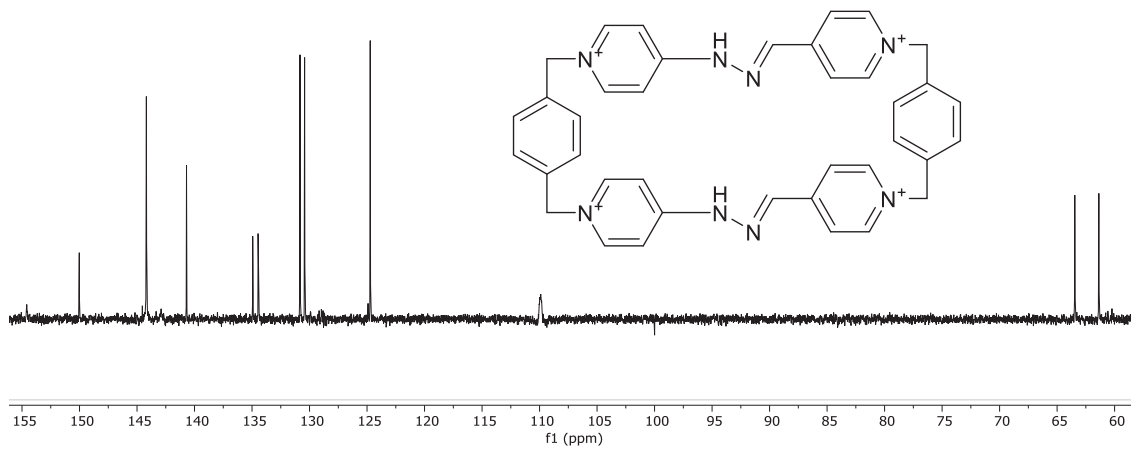


Figura 36. Espectro de ^{13}C RMN (D_2O , 126 MHz) de MRB^{4+}

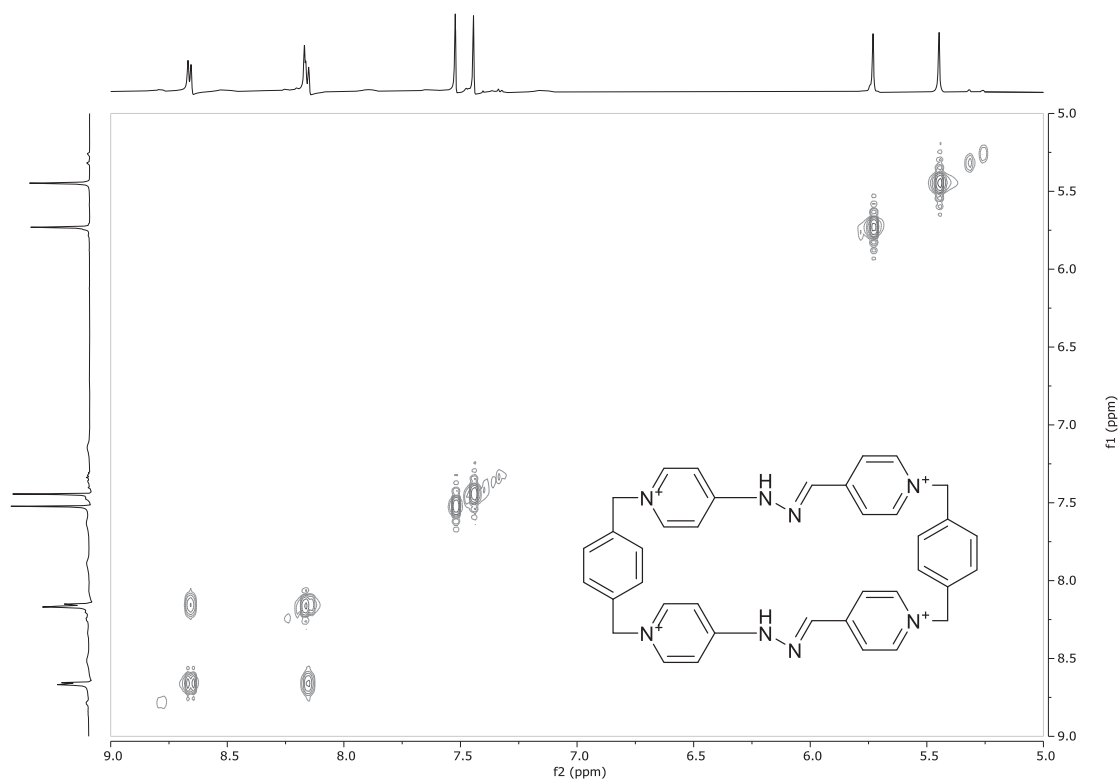


Figura 37. Espectro COSY (D_2O , 500 MHz) de MRB^{4+}

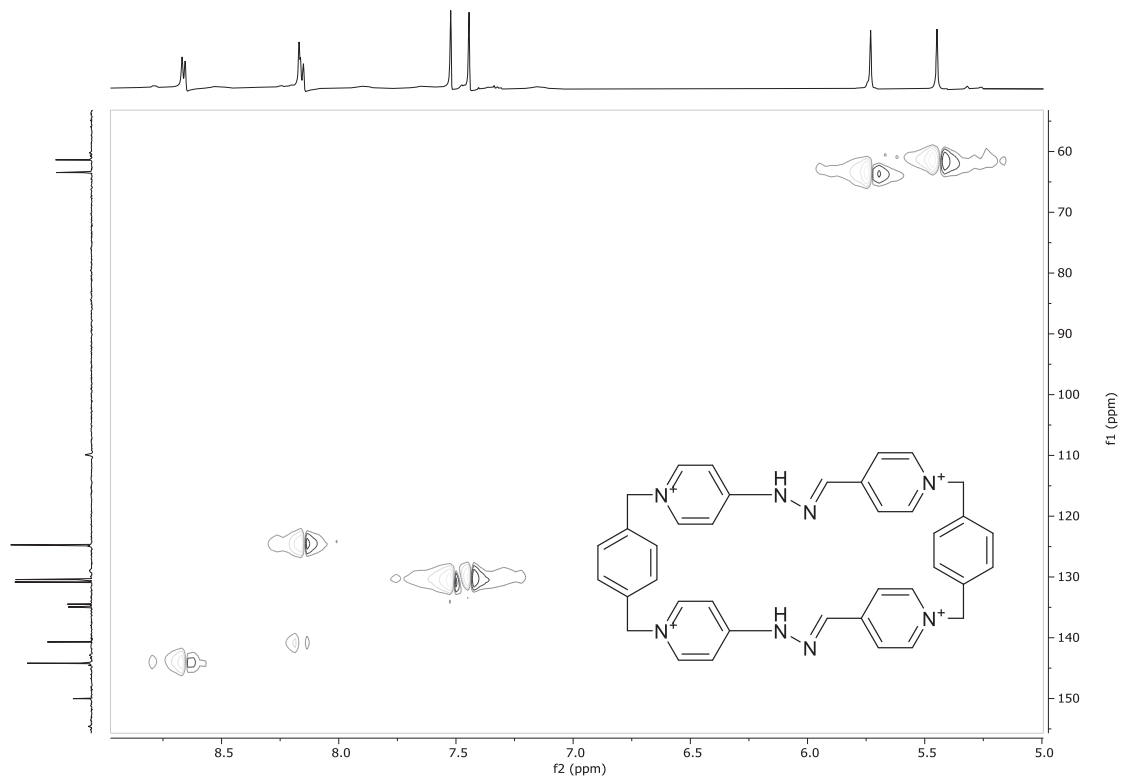


Figura 38. Espectro HSQC (D_2O , 500 MHz) de MRB^{4+}

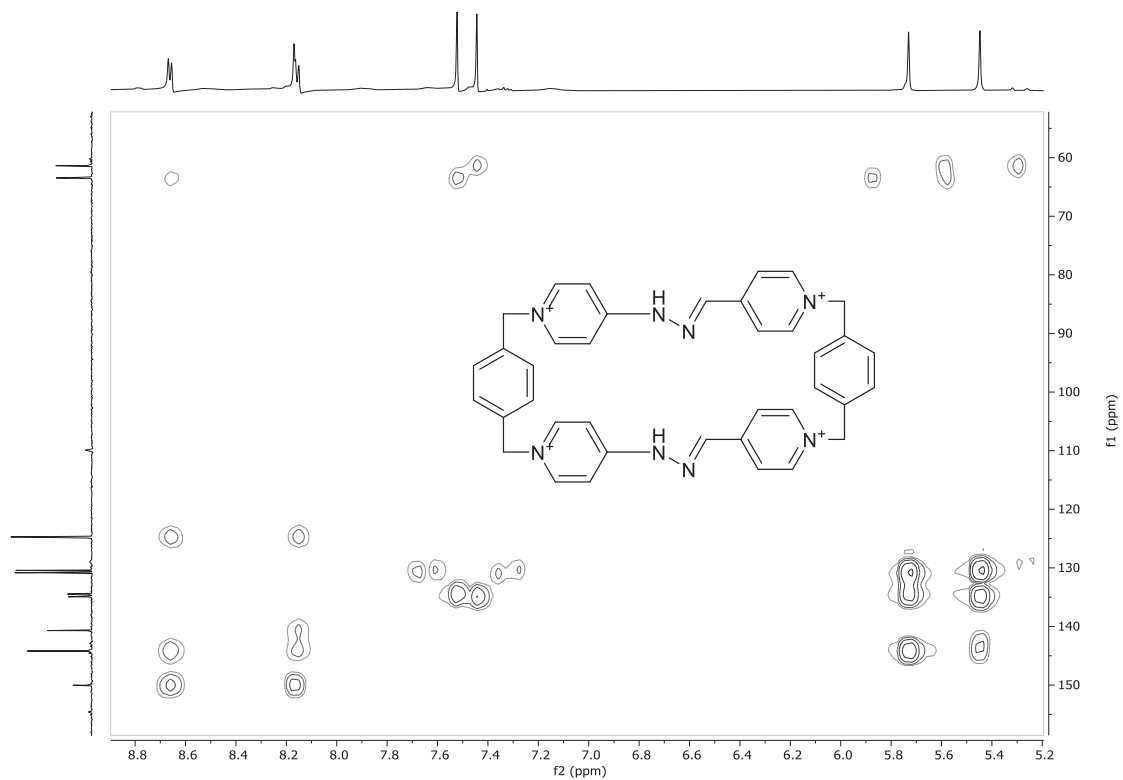


Figura 39. Espectro HMBC (D_2O , 500 MHz) de MRB^{4+}

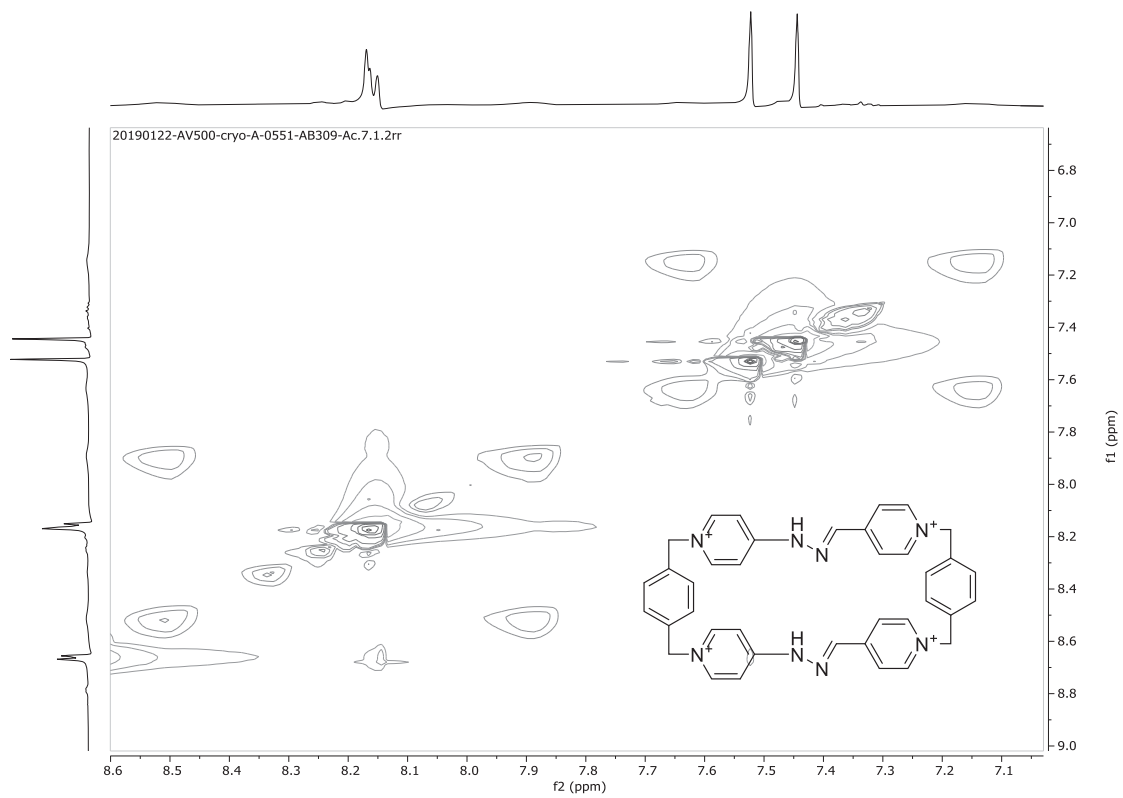


Figura 40. Espectro NOESY (D_2O , 500 MHz) de MRB^{4+}