



**Máster Universitario en Investigación Química e Química Industrial**

SÍNTESIS DE NUEVOS ANFIFILOS CATIONICOS CON RESPUESTA AL  
PH Y SU QUÍMICA RECEPTOR SUSTRATO CON CB[7]

SÍNTESE DE NOVOS ANFIFILOS CATIONICOS CON RESPOSTA AO  
PH E A SÚA QUÍMICA RECEPTOR SUBSTRATO CON CB[7]

SYNTHESIS OF NEW PH RESPONSIVE CATIONIC AMPHIPHILES AND  
ITS CB[7] HOST-GUEST CHEMISTRY

Trabajo de Fin de Máster

Alejandro Vila García

2021-2022

Directores: Carlos Peinador Veira, Arturo Blanco Gómez

Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA)

Grupo de investigación QUIMOLMAT-Supra

Universidade da Coruña



## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a mis directores, el Dr. Carlos Peinador Veira y el Dr. Arturo Blanco Gómez por permitirme participar en este proyecto, guiándome y permitiéndome continuar mi formación como químico.

Gracias a todos los integrantes de QUIMOLMAT-Supra, en especial a Lili, Mauro y Natalia por hacer más amenos los días acortando las horas de trabajo.

Por último, agradecer a mi familia el apoyo incondicional, a mis amigos esos momentos de descanso tan necesarios y a Claudia, su paciencia y el estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos.

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

' minutos

<sup>13</sup>C-RMN Resonancia magnética nuclear de carbono

<sup>1</sup>H-RMN Resonancia magnética nuclear de hidrógeno

CB[7] Cucurbit[7]urilo

CB[8] Cucurbit[8]urilo

CB[n] Cucurbiturilos de n unidades de glicourilo

COSY Correlación espectroscópica

d Doblete

dd Doble doblete

DOSY Espectroscopía de orden difusional

DEPT Mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización

eq. Equivalentes

g Gramo

h Horas

*J* Constante de acoplamiento

HMBC Correlación de enlace múltiple heteronuclear

HR-ESI-MS Espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electrospray.

HSQC Correlación heteronuclear de cuanto simple

m multiplete

mg Miligramo

mL Mililitro

**mM** Milimolar

**m/z** Relación masa/carga

**nm** Nanómetro

**NOESY** Espectroscopia de efecto nuclear Overhauser

**q** Cuadruplete

**RMN** Resonancia magnética nuclear

**s** Singulete

**S<sub>N</sub>2** Sustitución nucleofílica bimolecular

**t** Triplete

**ta** Temperatura ambiente

**TFA** Ácido trifluoroacético

**TFM** Trabajo de fin de máster

**UV-Vis** Ultravioleta-Visible

**°C** Grados centígrados

**μL** Microlitro

**δ** Desplazamiento químico

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1.INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Química Supramolecular .....	3
1.1.1 Fundamentos.....	3
1.1.2. Química receptor sustrato .....	3
1.1.3. Autoensamblaje .....	5
1.2. Compuestos anfífilicos y supra-anfífilicos .....	6
1.2.1. Compuestos anfífilicos .....	6
1.2.2. Compuestos supra-anfífilicos .....	7
1.3. De viológenos a vermellógenos.....	8
2. OBJETIVOS .....	10
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	11
3.1. Aspectos Generales.....	11
3.1.1. Planificación Sintética .....	11
3.1.2. Caracterización estructural mediante RMN .....	11
3.1.3. Caracterización estructural mediante espectrometría de masas .....	12
3.2. Síntesis y caracterización de los compuestos .....	12
3.2.1. Síntesis y caracterización de los <i>building blocks</i> precursores. ....	12
3.2.2. Síntesis de los anfífilos $Ac^{2+}$ y $Al^{2+}$ .....	13
3.2.3. Caracterización de $Ac^{+2}$ en medio orgánico .....	14
3.3.3. Caracterización de $Ac^{2+}$ en medio acuoso .....	19
3.4. Estudio de la formación de complejos supramoleculares entre el compuesto anfífilico $Ac^{2+}$ y el macrociclo CB[7] mediante RMN.....	26
3.4.1. Aspectos generales: .....	26
3.4.2. Complejo de inclusión $Ac^{2+} \subset CB[7]$ a $pD = 7$ .....	27

3.4.3. Complejo de inclusión $\text{Ac}^{2+} \subset \text{CB}[7]$ a $\text{pD} = 11$ .....	33
4. APARTADO EXPERIMENTAL.....	34
4.1. General.....	34
4.2. Síntesis.....	35
4.2.1. Síntesis de la piridil hidrazina precursora 3: .....	35
4.2.2 Síntesis de los piridil aldehídos precursores 4A y 4B: .....	36
4.2.3. Condensación de los vermellógenos anfílicos Ac y Al: .....	37
4.2.3. Estudios de $\text{Ac}^{2+}$ en medio acuoso a $\text{pH} = 7$ y $\text{pH} = 11$ . .....	38
4.3. Estudio de la interacción entre el anfífilo $\text{Ac}^{2+}$ y el receptor $\text{CB}[7]$ .....	39
4.4. Cálculos computacionales .....	40
5.CONCLUSIONES.....	42
CONCLUSIONS .....	43
6.BIBLIOGRAFÍA.....	44
7. ANEXOS.....	48

## RESUMEN

El empleo de moléculas anfifílicas se han establecido como una de las opciones más interesantes en la administración de fármacos y otras moléculas de interés biológico debido a su capacidad de autoensamblarse en nanocompartimentos (micelas, vesículas, etc.) que ayudan a disolver, proteger y distribuir por el organismo estas moléculas. Sin embargo, su bajo control en la liberación hace necesario la búsqueda de nuevos compuestos anfifílicos capaces de controlar su agregación a través de estímulos externos y por lo tanto regular la liberación de moléculas de interés.

El presente trabajo de fin de máster se centra en la síntesis y caracterización de moléculas anfifílicas que presentan una fracción de vermellógeno (unidad sintética no tóxica derivada de los viológenos en los que existe un enlace hidrazona entre ambos anillos de piridinio) capaz de responder a variaciones en el pH modificando su estructura. Estos compuestos presentan un elevado interés para el desarrollo de futuras investigaciones, la respuesta al pH que presentan permite modificar el estado de agregación y la formación de complejos de inclusión con CB[7].

**Palabras clave:** anfifilo, química supramolecular, autoensamblaje, química receptor-sustrato, viológeno, vermellógeno, cucurbit[7]urilo.

## ABSTRACT

The use of amphiphilic molecules has been established as one of the most interesting options in the administration of drugs and other molecules of biological interest due to their ability to self-assemble into nanocompartments (micelles, vesicles, etc.) that help to dissolve, protect, and distribute by the organism these molecules. However, its low release control makes necessary to search for new amphiphilic compounds with the capacity of controlling their aggregation through external stimuli application, and therefore, regulating the release of the interest molecule.

This master's thesis focuses on the synthesis and characterization of amphiphilic molecules that present a red thread fraction (a non-toxic synthetic unit derived from viologens in which there is a hydrazone bond between both pyridinium rings) capable of responding to variations in the pH, modifying its structure. These compounds present a high interest for the development of future investigations, the response to pH that they present allows to modify the state of aggregation and the formation of inclusion complexes with CB[7].

**Key words:** amphiphile, supramolecular chemistry, self-assembly, host-guest chemistry, viologen, red-thread, cucurbit[7]uril.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Química Supramolecular

### 1.1.1 Fundamentos

La Química Supramolecular se define como la interacción o ensamblaje entre distintas moléculas mediante fuerzas intermoleculares reversibles, no covalentes, encontrándose estos sistemas bajo estricto control termodinámico.<sup>1</sup> La naturaleza de las interacciones no covalentes es diversa, entre ellas, encontramos enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Wals, interacción ión-ión o efecto hidrofóbico entre otras. Esta rama de la química nace en la década de los 60, de la mano de Pederson, Lehn y Cram con sus estudios de complejación empleando éteres corona,<sup>2</sup> criptandos,<sup>3</sup> y esferandos.<sup>4</sup> Sin embargo, la química supramolecular no se reduce al empleo de sistemas complejantes. Desde su aparición, se ha ido diversificando, pasando por la aparición de rotaxanos,<sup>5</sup> y catenanos,<sup>6</sup> hasta la síntesis de las primeras máquinas moleculares,<sup>7</sup> capaces de responder a estímulos y realizar procesos de gran eficiencia y selectividad.

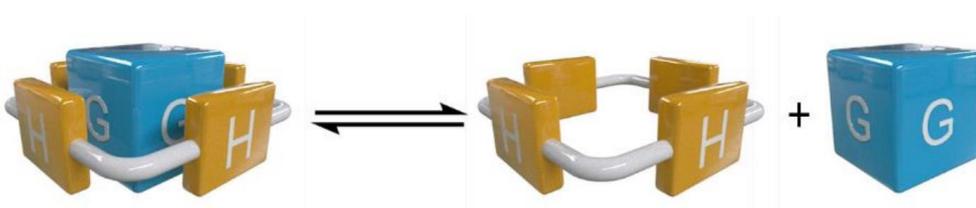
Para lograr el diseño y síntesis de estos sistemas artificiales, es necesario comprender y manipular las fuerzas intermoleculares que los conforman. El entendimiento de las interacciones no covalentes permite predecir y modificar el modo de interacción entre las distintas moléculas. Esto tiene un papel esencial en su estructura y ensamblaje, así como en muchas de las propiedades que presentan (fragilidad, estabilidad, tendencia a asociarse, selectividad, dinámica, rigidez, etc).<sup>8,9</sup>

Estas interacciones no covalentes son de vital importancia en los sistemas biológicos, siendo la base de muchos procesos como el reconocimiento, el transporte, la regulación, la catálisis enzimática o el reconocimiento antígeno-anticuerpo, entre muchos otros ejemplos.<sup>8</sup> Debido a esto, muchos de los sistemas supramoleculares sintetizados hasta la fecha tienen una fuerte inspiración en los sistemas biológicos.

### 1.1.2. Química receptor sustrato

La química receptor-sustrato (**Figura 1**) se basa en el reconocimiento entre dos o más moléculas, donde una de ellas actúa como receptor (*host*) y la otra como sustrato (*guest*). El receptor suele ser una molécula grande con una cavidad central, donde se situará el sustrato, y presenta sitios de unión convergentes para maximizar las interacciones con este.

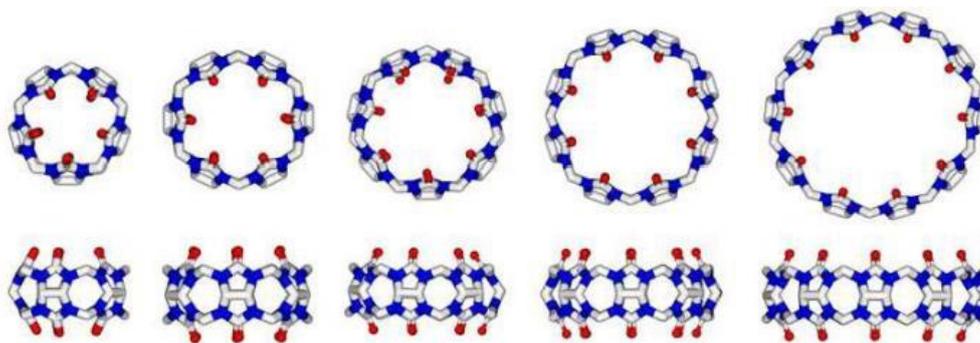
El sustrato, por su parte, puede ser de tamaño variable en función de la cavidad del receptor, comprendiendo desde pequeños iones a moléculas complejas. Al contrario que los receptores, los sustratos van a presentar sitios de unión divergentes para interactuar con el *host*. Estas interacciones establecidas entre receptor y sustrato son del tipo no covalente, y requieren de complementariedad geométrica e interaccional para formar el complejo (principio de doble complementariedad).<sup>8</sup> Muchos factores intervienen en este reconocimiento como los estéricos (tamaño y forma), la complementariedad, el área de contacto o el número de interacciones, el factor hidrofóbico o la preorganización del receptor.<sup>10</sup>



*Figura 1. Representación de un equilibrio de disociación Host-Guest.*<sup>11</sup>

Desde los comienzos de la química supramolecular, se han diseñado, sintetizado y caracterizado las propiedades que presentan en el reconocimiento molecular una gran variedad de receptores. De esta manera podemos clasificar los *hosts* en diferentes familias como los éteres corona, calixarenos, ciclodextrinas, metalociclos o cucurbiturilos entre otras. Cada uno de estos receptores presentará características propias de solubilidad y reconocimiento pudiendo complejar diferentes sustratos en función del medio en el que se encuentren.<sup>10</sup>

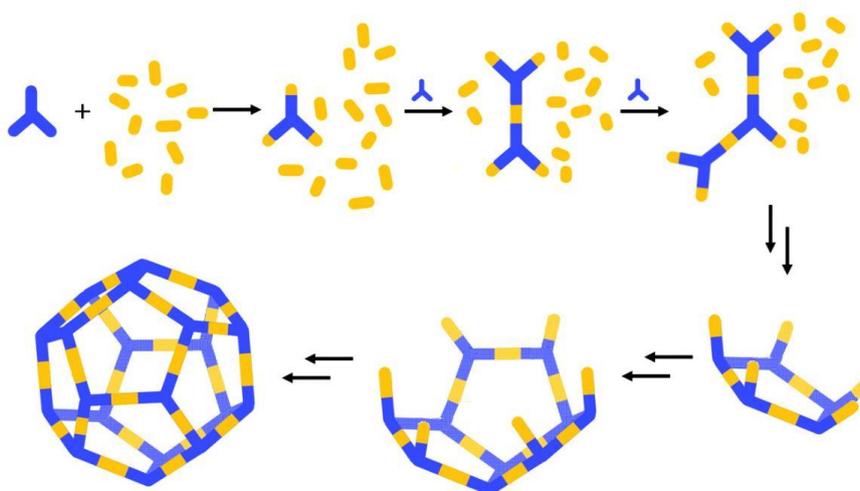
De entre todos los receptores, una de las familias más interesantes para la formación de complejos en medio acuoso, son los Cucurbiturilos (CB[n], n = 5,6,7,8..., **Figura 2**). Estos macrociclos están formados por **n** unidades de glicourilo unidas mediante puentes metílenos, formando una cavidad interna rígida e hidrofóbica. En ambas aberturas de la cavidad, se encuentran los grupos carbonilo de los glicourilos con los que se podrán interaccionar los sustratos. Gracias a estas características, estos macrociclos son capaces de alojar en medio acuoso una amplia diversidad de sustratos en su interior, tanto catiónicos como neutros.<sup>12</sup>



*Figura 2. Representación tridimensional de distintos macrociclos CB[n] donde  $n = 5, 6, 7, 8, 10$ .*<sup>12</sup>

### 1.1.3. Autoensamblaje

El autoensamblaje hace referencia a la capacidad de ciertas moléculas para organizarse de forma espontánea y reversible, generando sistemas supramoleculares ordenados más complejos (**Figura 3**). Esta característica se observa en la propia naturaleza donde se forman estructuras de funcionalidad compleja a partir de sus monómeros sencillos (formación de la doble hélice de ADN, membrana celular, estructura cuaternaria de las proteínas, etc.)<sup>13</sup>. La unión espontánea se logra cuando los *building blocks* (unidades de construcción) contienen toda la información necesaria (tamaño, forma, simetría, propiedades eléctricas...) para formar de forma selectiva una superestructura concreta. Una vez más, son las interacciones no covalentes las que provocan la asociación bajo condiciones determinadas. La capacidad de controlar y modificar el autoensamblaje de los *building blocks* permiten a estos sistemas actuar como interruptores o máquinas moleculares.<sup>8,9</sup>



*Figura 3. Representación del autoensamblaje de monómeros en una estructura supramolecular.*<sup>14</sup>

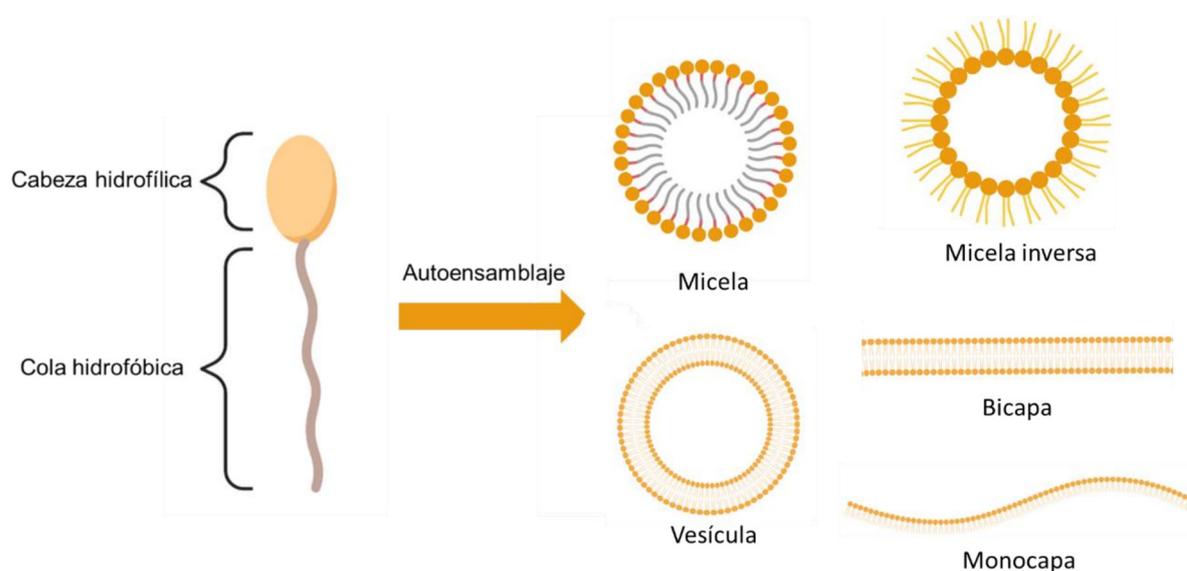
Al tratarse de sistemas dinámicos y reversibles, los compuestos autoensamblados tienen la capacidad de modificar la agregación al variar las condiciones externas, de ser capaces de controlar los factores que influyen en ella, se podrían obtener sistemas capaces de modificarse en función de los estímulos externos que reciban.

El grupo de investigación en el que se llevó a cabo el presente trabajo presenta una larga experiencia en el autoensamblaje de receptores metalocíclicos basados en ligandos de monoalquil 4,4'-bipiridina dirigido por centros metálicos de Pd/Pt(II).<sup>15</sup>

## 1.2. Compuestos anfífilicos y supra-anfífilicos

### 1.2.1. Compuestos anfífilicos

Las moléculas anfífilicas son compuestos que presentan en su estructura dos regiones definidas: una región hidrofóbica apolar y una cabeza hidrofílica polar. Debido a su naturaleza dual, estas moléculas en medio acuoso van a presentar un comportamiento característico, la región hidrofóbica tenderá a minimizar las interacciones con el medio, quedando hacia el interior del sistema, mientras que la cabeza polar se expondrá al medio maximizando la interacción con el agua. En función del tipo de anfífilo, así como las condiciones externas del medio (concentración, pH, fuerza iónica, etc.), estas moléculas pueden tender a formar agregados dinámicos autoensamblados. La topología de estos agregados puede ser muy diversa y variar en función de las características del medio. Las arquitecturas más habituales son las monocapas, bicapas, micelas, micelas inversas y vesículas (**Figura 4**).<sup>16</sup>



*Figura 4. Autoensamblaje de anfífilos en distintas arquitecturas.*

Este tipo de agregados supramoleculares presenta un elevado interés biotecnológico, como se ha demostrado desde la década de los años 60, en el proceso de encapsulamiento, protección, permeabilización celular y administración efectiva de moléculas de interés biológico (fármacos, genes, proteínas, etc.).<sup>17</sup> Mediante el empleo de este tipo de sistemas como nanotransportadores de fármacos, se consigue solventar una de las principales problemáticas a nivel médico: la baja biodistribución y rápida metabolización en el organismo.<sup>16,17</sup>

### **1.2.2. Compuestos supra-anfifílicos**

A pesar de todas las ventajas que ofrecen los compuestos anfifílicos en el transporte farmacológico, presentan un gran inconveniente: una difusión inespecífica a través de la membrana, lo que imposibilita la liberación regulada.<sup>18</sup> Bajo estas premisas, se ha prestado especial atención a la búsqueda y desarrollo de sistemas capaces de controlar la liberación mediante la aplicación de estímulos externos, siendo la química supramolecular una de las principales áreas para su desarrollo.

En la formación de estructuras supramoleculares capaces de responder a estímulos, los viológenos (sales disustituidas de N,N'-4,4'-bipiridinio) son una de la familia de compuestos más empleadas. Esto es debido principalmente a su fácil síntesis y a su capacidad para responder al potencial eléctrico, reduciéndose de forma reversible; cualidad muy interesante en la formación de interruptores (supra)moleculares. Su uso en sistemas supramoleculares ha sido ampliamente estudiado, ya sea como unidad sintética en la formación de macrociclos (Blue Box),<sup>19</sup> en la formación de estructuras supramoleculares autoensambladas (micelas, metalociclos...)<sup>20,21</sup> o en la realización de interruptores y máquinas moleculares.<sup>22,23</sup>

La formación de anfifilos supramoleculares empleando moléculas derivadas del viológeno también ha sido estudiada. De entre todos los posibles receptores para formar anfifilos supramoleculares, la familia de los cucurbiturilos (CB[7,8]) es una de las más empleadas para complejar derivados del viológeno. En la interacción de los CB[7,8] con los viológenos se establecen interacciones apolares entre la cavidad y los anillos de piridinio, e interacciones ión-dipolo entre los carbonilos de los portales y los nitrógenos cargados positivamente del piridinio. Esta interacción bimodal da lugar a constantes de asociación muy elevadas en agua (en torno a  $10^4$ - $10^5$ M<sup>-1</sup>).<sup>24</sup>

La complejación de los anfífilos puede generar un cambio en las propiedades y en la arquitectura del agregado supramolecular. En función del equilibrio de complejación (modo de inserción, estequiometría, tamaño del macrociclo...) se podrán modificar las características del autoensamblaje. Existen numerosos estudios que emplean derivados anfífilos del viológeno complejados con CBs, formando diferentes estructuras supramoleculares como polímeros supramoleculares,<sup>25</sup> micelas o vesículas.<sup>26,27</sup>

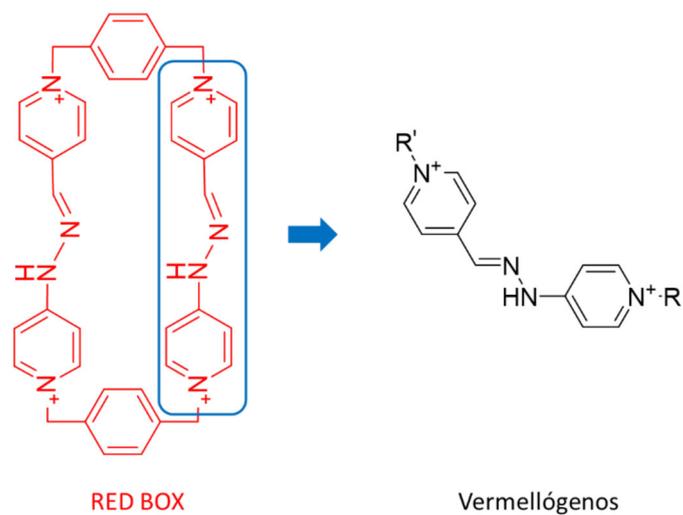
Los viológenos anfífilos también se han empleado para la construcción de interruptores moleculares con CB[8]. Estos sistemas son capaces de modificar el modo de inserción, del viológeno a la cadena carbonada, al cambiar las condiciones del medio.<sup>28,29</sup> Tal capacidad se podría emplear para modificar la agregación supramolecular.

### 1.3. De viológenos a vermellógenos

El principal inconveniente que presentan los viológenos, y que reduce su aplicabilidad en el campo biomédico, es su elevada citotoxicidad. En consecuencia, es necesario la obtención de nuevas unidades estructurales no nocivas capaces de responder a estímulos, manteniendo esas cualidades tan interesantes de los viológenos.

Bajo estas premisas, los vermellógenos, derivados del viológeno que presentan un enlace hidrazona entre ambos anillos de piridinio, se establecen como una alternativa interesante. Estos compuestos, obtenidos en base a los estudios de la Red Box,<sup>30</sup> han presentado una citotoxicidad mucho menor que los viológenos, en base a estudios preliminares.<sup>31</sup> Los vermellógeno exhiben una marcada respuesta al pH, al presentar el hidrógeno ácido de la fracción de la hidrazona, haciendo posible el desarrollo de interruptores moleculares.

Además de esta respuesta al pH, estas unidades sintéticas presentan una serie de ventajas como son una síntesis sencilla en agua, los elevados rendimientos con los que se obtienen o la fácil funcionalización, tanto simétrica como asimétrica de los nitrógenos piridínicos.



*Figura 5. Desarrollo de los vermellógenos (derecha) en base a los estudios previos de la Red Box (izquierda).*

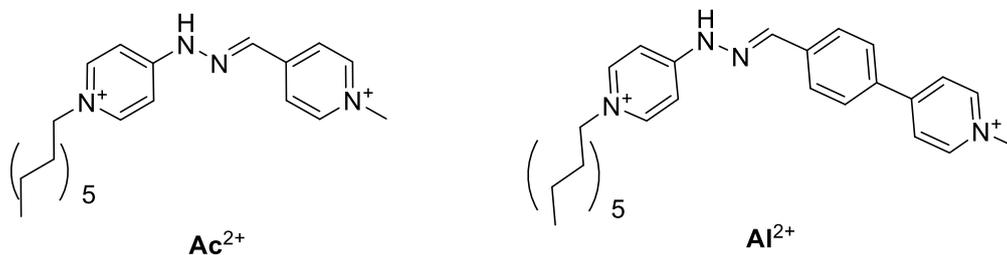
Como se ha comentado, existen varios ejemplos de estructuras supramoleculares formadas por viológenos sustituidos asimétricamente con propiedades anfifílicas,<sup>26</sup> sin embargo, sus análogos derivados del vermellógeno no han sido estudiados todavía, siendo este el centro del presente trabajo.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente TFM se engloba dentro de un proyecto más general llevado a cabo dentro del grupo de investigación QUIMOLMAT-Supra, encaminado al desarrollo de un nuevo tipo de moléculas anfifílicas derivadas del viológeno, y al estudio de su agregación bajo la influencia del pH y la química receptor-sustrato.

De esta forma, se presentan como objetivos específicos del presente TFM:

1. Síntesis y caracterización estructural de los compuestos  $\mathbf{Ac}^{2+}$  (Anfifilo Corto) y  $\mathbf{Al}^{2+}$  (Anfifilo Largo) a través de las técnicas de caracterización típicas en el campo (**Figura 7**).



*Figura 6. Compuestos anfifílicos  $\mathbf{Ac}^{2+}$  y  $\mathbf{Al}^{2+}$ .*

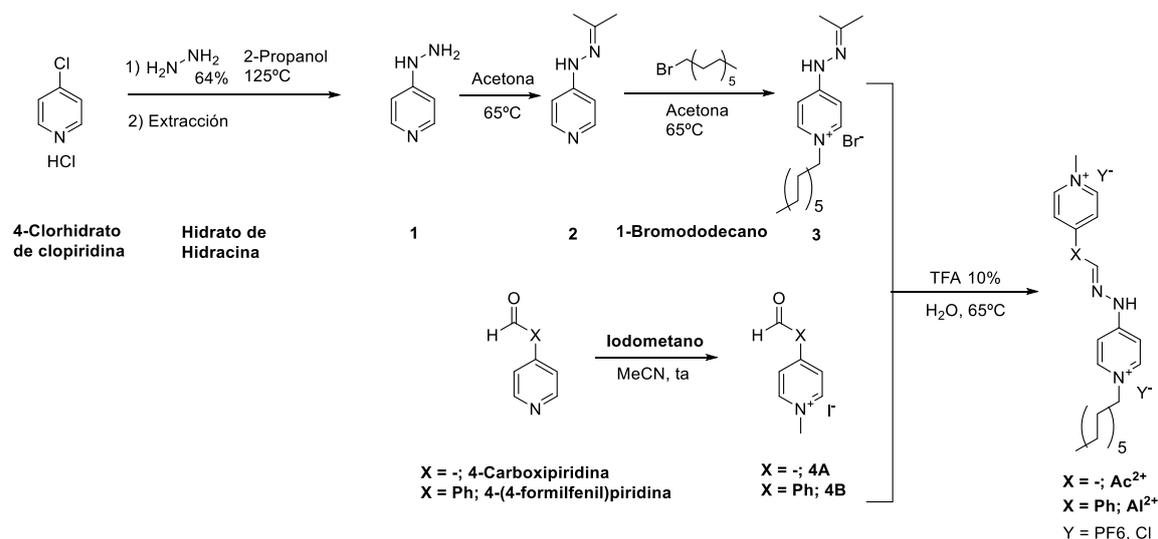
2. Caracterización en medio acuoso del anfifilo  $\mathbf{Ac}^{2+}$  a pH neutro (7) y básico (11) mediante RMN mono y bidimensional, DOSY y UV-Vis.
3. Estudio mediante RMN mono y bidimensional de la interacción receptor-sustrato entre el compuesto  $\mathbf{Ac}^{2+}$  y el receptor molecular CB[7] a pH neutro y básico.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Aspectos Generales

#### 3.1.1. Planificación Sintética

La síntesis de los Vermellógenos (**Figura 8**), desarrollada por el propio grupo de investigación donde se lleva a cabo este trabajo, consiste en una condensación a través de un enlace hidrazona en medio acuoso, empleando una sal de piridina-4-carboxaldehído alquilada (**4<sup>a</sup>/B**) y una sal de 4-hidracinopiridina alquilada (**3**), bajo catálisis ácida. Esta condensación se realiza de forma sencilla empleando cantidades estequiométricas, una sencilla purificación y un elevado rendimiento. Las etapas realizadas para la obtención de los precursores son todas ellas reacciones del tipo S<sub>N</sub>2 con elevados rendimientos, estas etapas se presentan en la Figura 8.



*Figura 7. Planificación sintética de los vermellógenos anfifílicos.*

#### 3.1.2. Caracterización estructural mediante RMN

La caracterización de las moléculas reportadas en el presente trabajo se llevó a cabo mediante la interpretación de los espectros de RMN monodimensionales (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) y bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC, NOESY y DOSY). Para realizar la caracterización, primero se intentó asignar las señales del espectro de RMN de <sup>1</sup>H mediante su desplazamiento químico y multiplicidad. Posteriormente, se asignaron las señales del espectro de RMN de <sup>13</sup>C por su desplazamiento y tipo de núcleo con ayuda del DEPT.

Para comprobar que la asignación inicial es correcta, y para identificar aquellas señales en las que existe duda, se utilizaron los espectros bidimensionales. El COSY (espectroscopia de correlación homonuclear) aporta información sobre protones acoplados escalarmente entre sí y, en consecuencia, de los hidrógenos que se encuentran sobre carbonos adyacentes. El HSQC (Correlación heteronuclear de cuanto simple) correlaciona protones directamente unidos a heteronúcleos de  $^{13}\text{C}$ , indicando el carbono sobre el que se sitúan los distintos hidrógenos. El HMBC (correlación heteronuclear a través de múltiples enlaces) correlaciona los núcleos de  $^1\text{H}$  con heteronúcleos de  $^{13}\text{C}$  separados entre 2 y 4 enlaces químicos. Es especialmente útil para asignar carbonos cuaternarios y para completar y comprobar la asignación realizada. El DOSY (Espectroscopía de orden difusional) es una técnica empleada para conocer el coeficiente de difusión que presenta una molécula, da información del número de especies y del radio hidrodinámico de las mismas. Por último, el NOESY (espectroscopia de efecto nuclear Overhauser), correlaciona núcleos de  $^1\text{H}$  próximos en el espacio.<sup>32</sup>

### 3.1.3. Caracterización estructural mediante espectrometría de masas

La caracterización de las moléculas se complementó mediante la técnica de espectrometría de masas. Aunque esta técnica ofrece información estructural debido a la fragmentación de la molécula en iones, en el presente trabajo se utilizó únicamente para comprobar la formación de las moléculas finales, comparando la masa molecular obtenida del espectrómetro con la masa esperada para el compuesto.<sup>33</sup>

## 3.2. Síntesis y caracterización de los compuestos

En este apartado se va a discutir la síntesis de los compuestos a partir de materiales de partida comerciales, empleando reacciones del tipo  $\text{S}_{\text{N}}2$  y la condensación mediante enlace hidrazona.

### 3.2.1. Síntesis y caracterización de los *building blocks* precursores.

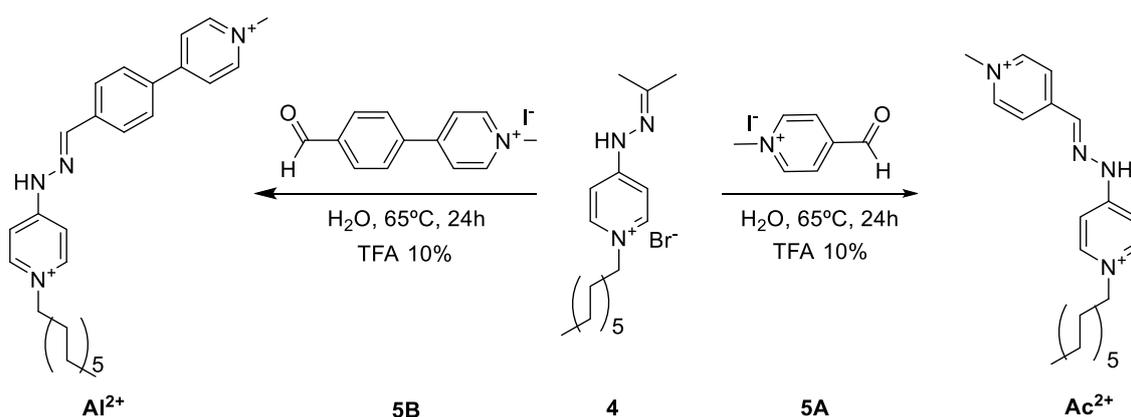
La síntesis comenzó con la obtención de los precursores **3** y **4A/B** necesarios para la condensación. La síntesis de **3** se llevó a cabo a partir del clorohidrato de la **4-cloropiridina** comercial y de **hidrazina** a través de una sustitución nucleófila. La obtención de **3** se realizó en dos etapas. Primeramente, fue necesaria la protección del compuesto **1** como hidrazona para evitar la alquilación en el nitrógeno de la hidracina y, a continuación, se hizo reaccionar a través de una  $\text{S}_{\text{N}}2$  con 1-bromododecano, obteniéndose el compuesto **3**, precursor común a los anfifilos  $\text{Ac}^{2+}$  y  $\text{Al}^{2+}$ .

La obtención del compuesto **3** se confirmó mediante su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 34, Anexos**). La caracterización de este tipo de compuestos se explicará más detalladamente en el apartado **3.2.2**.

La síntesis de las sales de piridilaldehído metiladas **4A/B** se realizó a través de la metilación del piridil-4-carboxaldehído comercial (**4A**) o de la 4-(4-formilfenil)piridina (**4B**), empleando yodometano a temperatura ambiente. De igual forma, la caracterización de estos *building blocks* se realizó por RMN (**Figura 35, 36, Anexos**).

### 3.2.2. Síntesis de los anfifilos $\text{Ac}^{2+}$ y $\text{Al}^{2+}$

Una vez obtenidos los precursores, se realizó la condensación de ambas moléculas finales ( $\text{Ac}^{2+}$  y  $\text{Al}^{2+}$ , **Figura 9**). La reacción tuvo lugar en agua a  $65\text{ }^\circ\text{C}$ , empleando cantidades estequiométricas y añadiendo una cantidad catalítica de TFA (10% molar). La función del TFA es, por una parte, catalizar la hidrólisis de la hidrazona permitiendo el ataque nucleófilo y, por otra, activar el aldehído, reduciendo la energía de activación de la reacción al promover el ataque de la hidrazina. La purificación de los productos se realizó mediante una metátesis, empleando  $\text{KPF}_6$ . Al añadir un exceso de la sal al crudo de reacción, se logra precipitar los productos como sales de  $\text{PF}_6^-$ . De esta forma se obtuvieron ambos compuestos finales con un rendimiento del 73% para  $\text{Ac}\cdot\text{PF}_6$  y del 83% para  $\text{Al}\cdot\text{PF}_6$ .



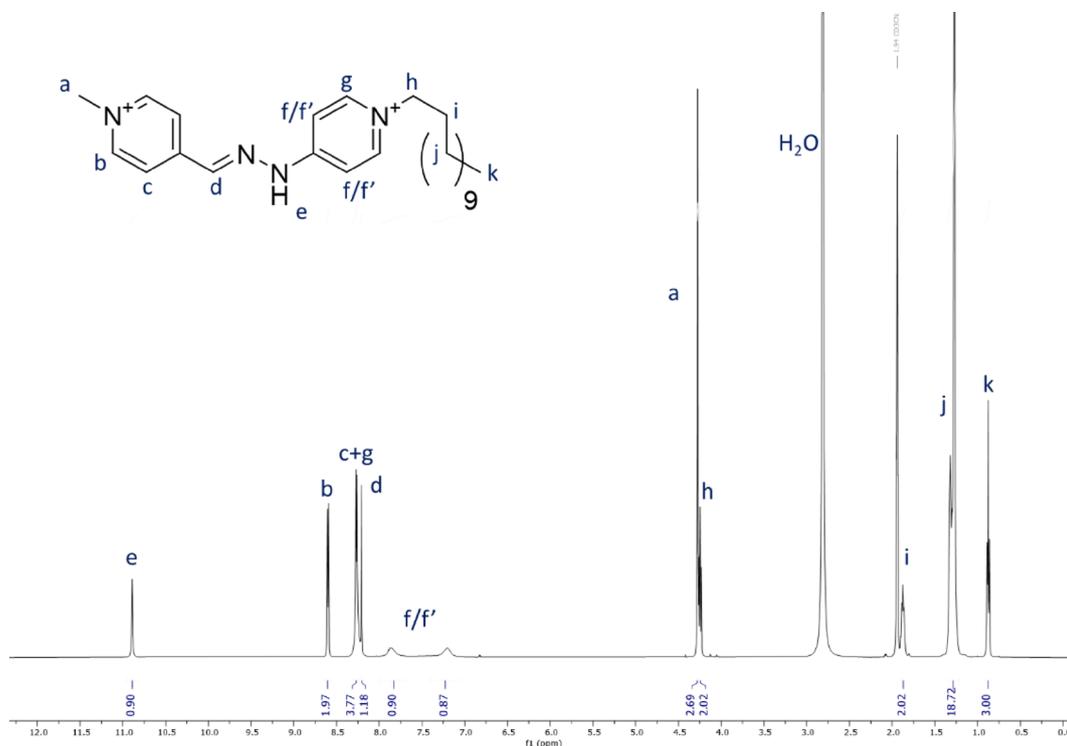
**Figura 9.** Condensación de  $\text{Al}^{2+}$  y  $\text{Ac}^{2+}$  a partir de los precursores.

Una vez obtenidos los compuestos, se realizó su caracterización en medio orgánico para evitar posibles problemas de agregación debido a su naturaleza anfifílica. La caracterización se llevó a cabo empleando técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (mono y bidimensional), DOSY y HR-ESI-MS.

### 3.2.3. Caracterización de $Ac^{2+}$ en medio orgánico

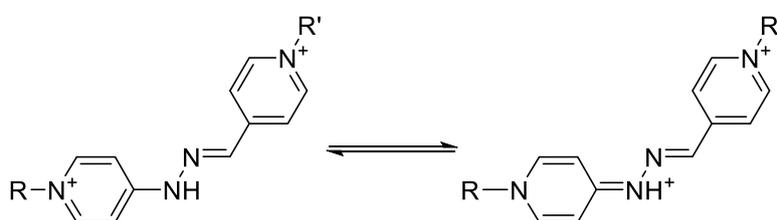
En lo referente al espectro de  $^1H$ -RMN del compuesto  $Ac^{2+}$  en  $CD_3CN$  (**Figura 10**), se pueden asignar fácilmente las señales pertenecientes a la región alifática de la molécula. La señal *a*, singlete a 3.6 ppm que integra por 3 protones, se corresponde al metilo terminal unido directamente a la piridina. La señal *h*, que presenta un desplazamiento similar (4.25 ppm), y es un triplete que integra por 2 protones, se asigna con el  $CH_2$  unido directamente a la piridina. Al presentar la señal *h* un punto de cruce en el COSY (**Figura 37, Anexos**) con la señal *i* (2H, quintuplete, 1.87 ppm), podemos identificarla como el siguiente  $CH_2$  de la cadena. Los protones de la cadena central (*j*) aparecen entre 1.36-1.21 ppm como un multiplete. Por último, la señal *k* (triplete, 0.88 ppm, 3H) se corresponde al metilo terminal de la cadena alquílica.

De la región del vermellógeno, encontramos dos de las señales más características del compuesto y que nos indica la formación del nuevo enlace hidrazona entre **3** y **4A**. La primera señal (*e*), que presenta un gran desplazamiento (10.2 ppm, 1H, singlete), se corresponde con el hidrógeno del NH del grupo hidrazona, el cual acopla espacialmente en el experimento NOESY con la señal *d* a 8.21 ppm (**Figura 37, Anexos**) correspondiente al hidrógeno imínico.



**Figura 10.** Espectro de RMN de  $^1H$  del compuesto  $Ac^{2+}$ .

Se esperaría que los protones de la fracción aromática del vermellógeno (*b*, *c*, *f*, *g*) aparecieran como 4 dobletes de 2H. Sin embargo, esto no es lo que se observa. Otra de las características estructurales de los vermellógenos es la rotación impedida de la fracción de la piridina proveniente de la hidracina. Esto se debe a la elevada deslocalización de la carga a lo largo de esta piridina y del enlace C<sub>py</sub>-NH que adquiere una elevada componente de doble enlace (**Figura 11**). En consecuencia, los protones de esta piridina (*f* y *g*) suelen desdoblarse en dos señales diferentes o aparecer en coalescencia debido a la rotación impedida entono al enlace C<sub>py</sub>-NH. Para completar la asignación, sirve de ayuda saber que, en este tipo de moléculas, las señales pertenecientes a los hidrógenos en α al nitrógeno alquilado de las piridinas aparecen más desapantallados que los β, debido a la retirada de carga generada por la carga positiva del N alquilado.

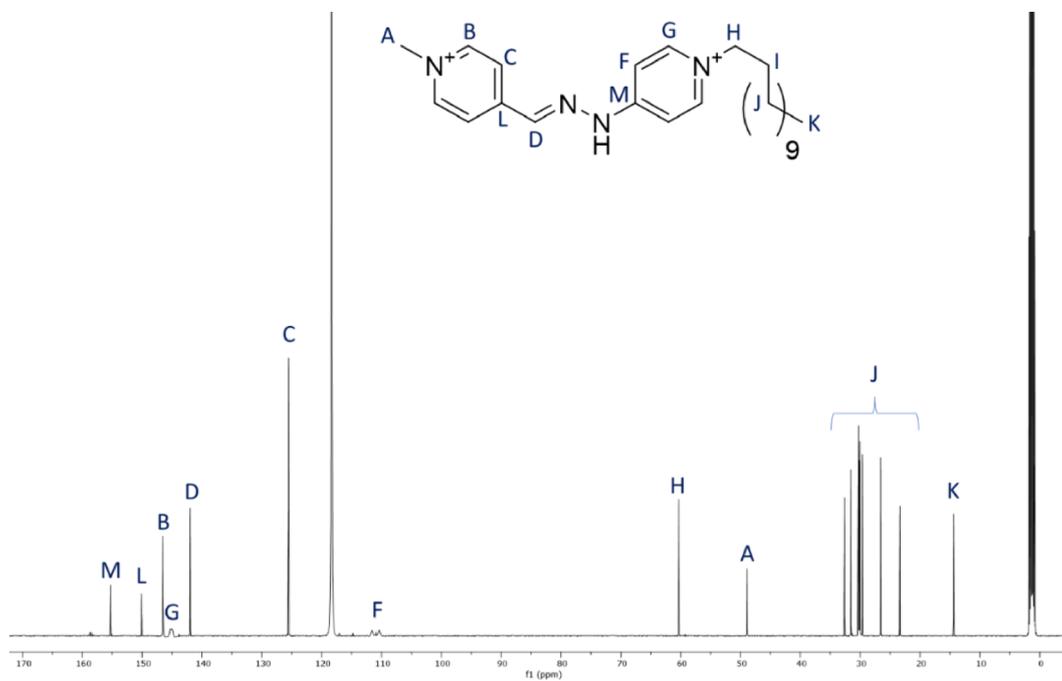


**Figura 81.** Forma resonante en la que se observa la componente de doble enlace del enlace C<sub>py</sub>-N.

Teniendo esto en cuenta, se puede asignar el resto de las señales del espectro. La señal *b* (doblete, 7.92 ppm, 2H) se asigna a los protones en α a la fracción proveniente del piridil aldehído. La siguiente señal (doblete aparente, 7.59 ppm, 4H), se corresponde con las señales de *c* y *g* solapadas, esto se observa en el HSQC ya que se obtienen dos puntos de cruce con carbonos diferente y se identifican a partir del COSY, en el que se observan puntos de cruce con la señal *b* y con la señal *h*. Por último, las señales *f* y *f'* (2H, 7.18 y 6.52 ppm), que aparecen en coalescencia, se corresponden con los hidrógenos en β de la fracción de la piridil hidrazina.

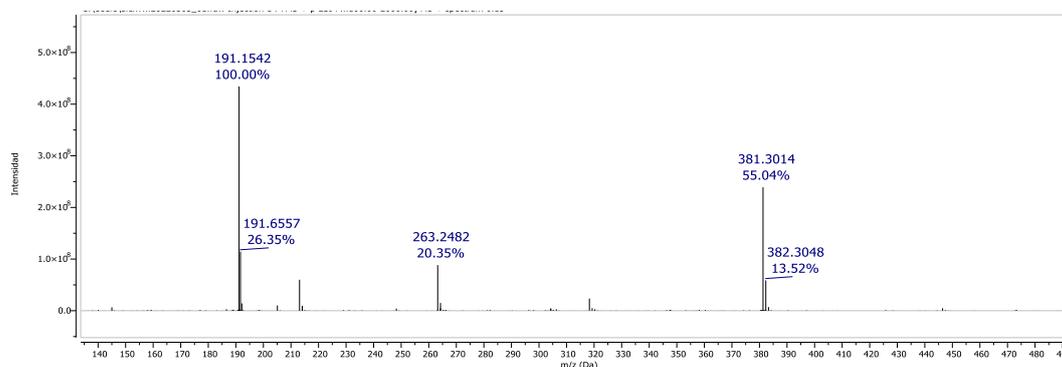
El espectro de <sup>13</sup>C del compuesto (**Figura 12**) se asigna de manera sencilla empleando el DEPT y los espectros bidimensionales. Habiendo asignado el espectro de <sup>1</sup>H se pudo identificar las señales de carbono *A*, *B*, *D*, *F*, *H*, *I*, *J*, *K* mediante los puntos de cruce del HSQC. Para los carbonos cuaternarios *L* y *M* y para asignar las señales *C* y *G*, cuyos protones se encuentran solapados, se recurrió al HMBC (**Figura 39, Anexos**). Se pudo diferenciar *L* de *M* por el punto de cruce entre *M* y el protón del NH ε o mediante el punto de cruce de *L* con los protones *b* y *c*. La asignación de *C* y *G* quedó clara al observarse los puntos de cruce de *C* con el protón *b* y de *G* con el protón *e* del NH.

La baja intensidad que presentan las señales *G* y *F* (carbono alfa y beta de la piridina proveniente de la hidrazina) se debe a la coalescencia típica que presentan este tipo de compuestos y que se puede apreciar en el espectro de  $^1\text{H}$  para las señales *g* y *f*.



**Figura 12.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $\text{Ac}^{2+}$ .

Por último, se identificó de forma inequívoca el compuesto  $\text{Ac}\cdot 2\text{PF}_6$  mediante análisis estructural a través de HR-ESI-MS (**Figura 13**). En este caso, se encontraron varios picos relacionados con el compuesto. Así, el pico de mayor intensidad, con una relación masa/carga de 191.1542 se identifica con el compuesto  $[\text{M}-2\text{PF}_6]^{2+}$ :  $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_4^{2+}$  ( $m/z$  (teórico) = 191.1543). El pico de relación masa/carga 381.3014, se corresponde con la relación calculada para el compuesto desprotonado  $[\text{M}-\text{H}-2\text{PF}_6]^+$ :  $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_4^+$  ( $m/z$  (teórico) = 381.3013).

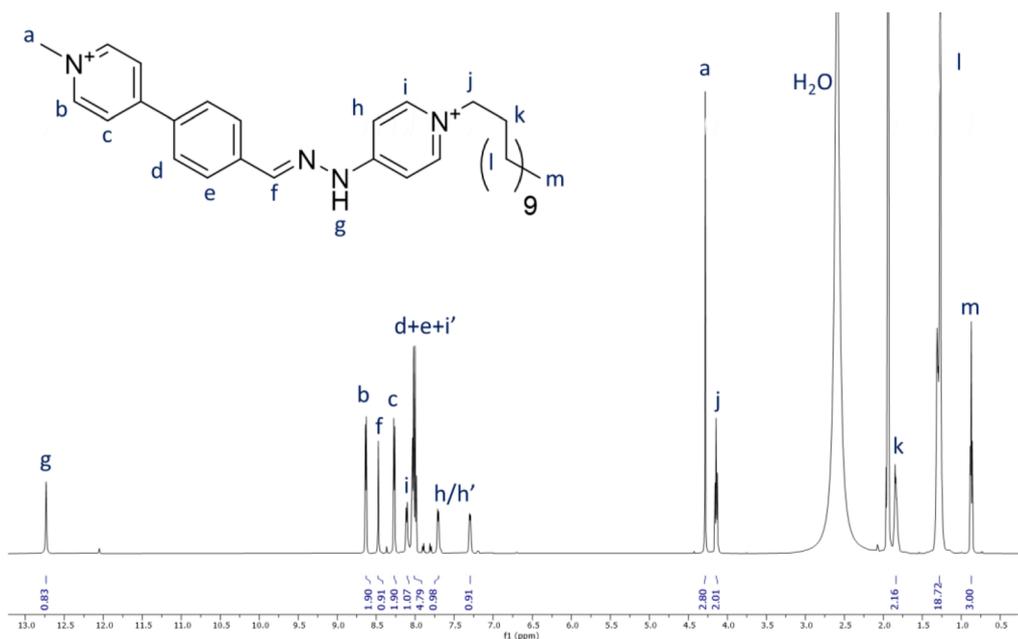


**Figura 13.** Espectro de masas del compuesto  $\text{Ac}\cdot 2\text{PF}_6$ .

Con los datos obtenidos mediante RMN y HR-ESI-MS, se pudo concluir inequívocamente que la molécula obtenida se corresponde del anfifilo **Ac**·2PF<sub>6</sub> y que la asignación por RMN es correcta.

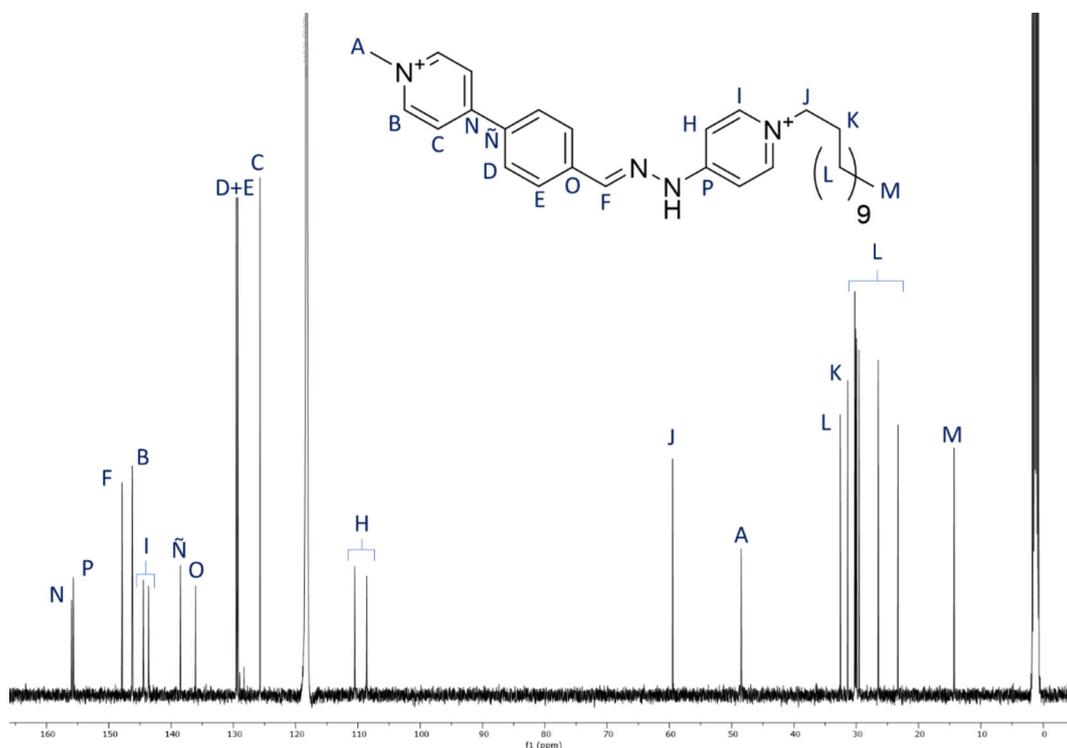
La caracterización estructural mediante <sup>1</sup>H-RMN de **Al**·2PF<sub>6</sub> en CD<sub>3</sub>CN (**Figura 14**) es muy similar a la observada con **Ac**·2PF<sub>6</sub>. En la región alifática se observan las mismas señales variando ligeramente los desplazamientos. La señal *a* (singlete, 4.27 ppm, 3H) se corresponde con el metilo terminal unido directamente a la piridina y *j* (tripleto, 4.25 ppm, 2H), *k* (quintuplete, 1.87 ppm, 2H), *l* (multiplete, 1.49 – 1.13 ppm, 18H) y *m* (tripleto, 0.88 ppm, 3H) se corresponden con las señales de la cadena carbonada.

En la región aromática se observa de nuevo el protón del NH muy desapantallado (*g*, 10.89 ppm, singlete, 1H) y el singlete del hidrógeno imínico (*f*, 8.46 ppm, singlete, 1H). La principal diferencia del espectro de **Al**<sup>2+</sup> con respecto al de **Ac**<sup>2+</sup> es la señal de los hidrógenos del grupo fenilo adicional (*d* + *e*), que se encuentra solapada con una de las señales de la piridina, dando un multiplete que aparece entre 8.06 y 7.93 ppm e integra por 5H. Las señales de las piridinas se asignan de nuevo empleando los espectros bidimensionales COSY (**Figura 40, Anexos**) y NOESY (**Figura 43, Anexos**), asignando *b* (8.63, doblete, 2H) y *c* (8.27, doblete, 2H) con las señales α y β de la piridina unida al fenilo. Las señales de la otra piridina aparecen desdobladas por la rotación impedida *i* (8.11 ppm, doblete, 1H), *i'* (8.06- 7.93 ppm, multiplete, 1 H) *h* (7.71 ppm, doblete, 1H) y *h'* (7.30 ppm, doblete, 1H) siendo las α las que aparecen a un mayor desplazamiento(*i/i'*).



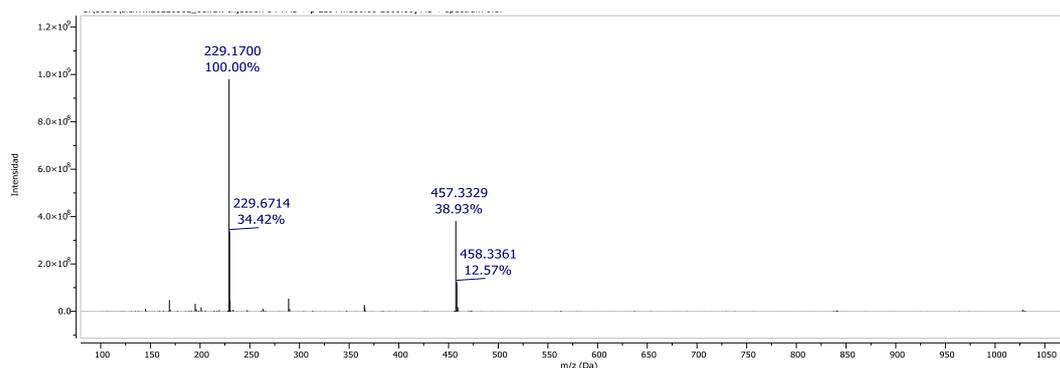
**Figura 14.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto **Al**<sup>2+</sup>.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 15**) se asignó con ayuda del DEPT y los espectros bidimensionales al igual que se hizo para el caso de  $\text{Ac}^{2+}$ . Conociendo la asignación del  $^1\text{H}$ -RMN se pudo asignar todas las señales con la ayuda de los experimentos HSQC y HMBC (**Figura 41 y 42, Anexos**) siguiendo el mismo procedimiento de elucidación empleado con  $\text{Ac}^{2+}$ .



**Figura 15.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $\text{Ac}^{2+}$ .

Por último, la caracterización estructural por RMN del compuesto  $\text{Al}\cdot 2\text{PF}_6$  en medio orgánico, se complementó con el estudio de la muestra mediante HR-ESI-MS (**Figura 16**). Como ocurría en el caso de  $\text{Ac}\cdot 2\text{PF}_6$ , se encontraron varios picos relacionados con el compuesto. El pico más intenso, de relación masa/carga de 229.1700 se corresponde a la molécula  $[\text{M}-2\text{PF}_6]^{2+}$ :  $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_4^{2+}$  ( $m/z$  (teórico) = 229.1699). El siguiente pico en intensidad, con una relación masa/carga de 457.3329 se identifica con el compuesto desprotonado  $[\text{M}-\text{H}-2\text{PF}_6]^+$   $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_4^+$  ( $m/z$  (teórico) = 457.3326).



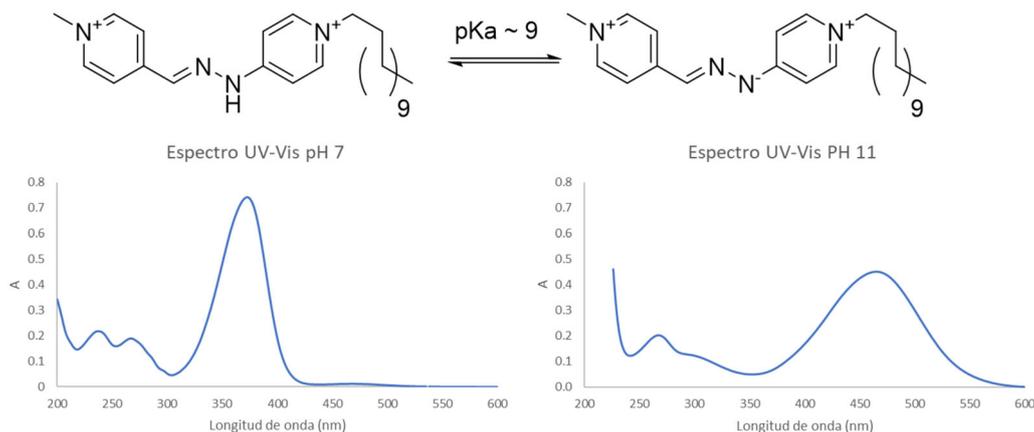
**Figura 16.** Espectro de masas del compuesto  $Al \cdot 2PF_6$ .

A partir de los datos obtenidos mediante RMN y HR-ESI-MS, podemos afirmar inequívocamente que la molécula obtenida se trata del anfifilo  $Al^{2+}$  y que la asignación por RMN es correcta.

### 3.3.3. Caracterización de $Ac^{2+}$ en medio acuoso

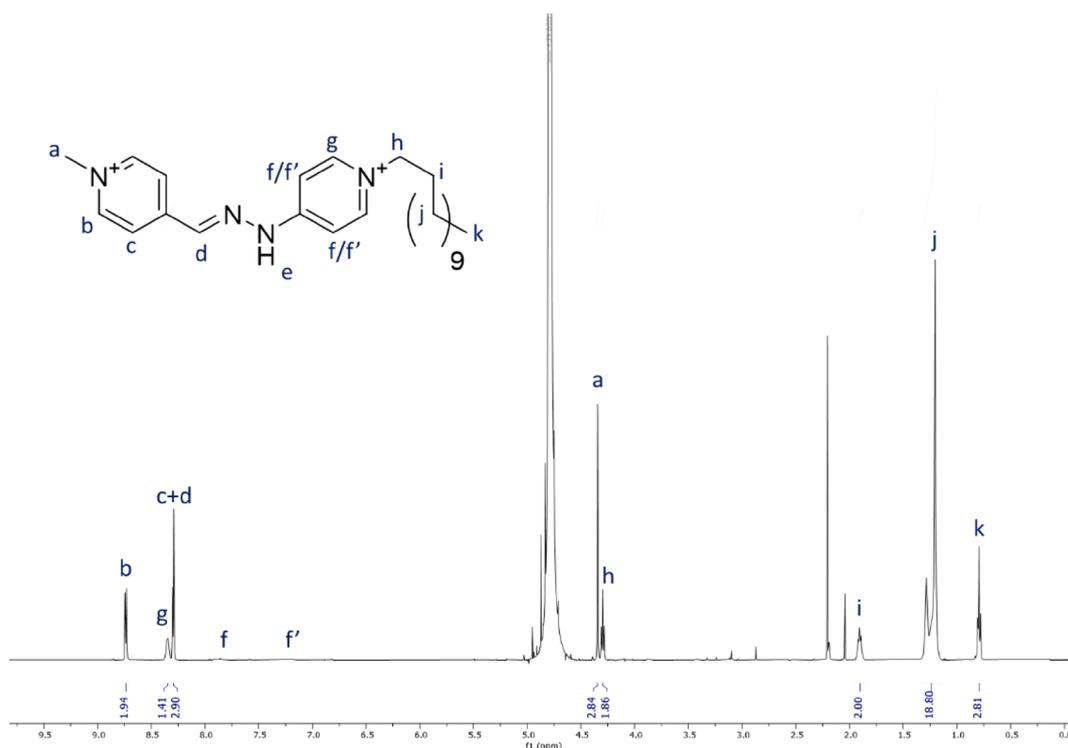
Una vez caracterizados ambos anfifilos en medio orgánico, nos centramos en el estudio de  $Ac^{2+}$  en medio acuoso. Como ya se explicó en la introducción, los vermellógenos presentan una marcada respuesta al pH debido al protón ácido del NH con un pKa del orden de 9).<sup>30</sup> Esta desprotonación genera un cambio en la carga neta de la molécula, pasando de una carga 2+ a 1+. Este cambio puede ser determinante en el modo de agregación del anfifilo, como se ha visto con otros compuestos anfílicos dependientes del pH.<sup>34</sup> Con todo ello, la caracterización y los diferentes estudios en medio acuoso de  $Ac \cdot 2Cl$  se realizaron en medio tamponado a pH 7 y 11 (tampón fosfato 50 mM), para asegurar la presencia de la forma protonada  $Ac^{2+}$  y desprotonada  $Ac^+$  del anfifilo.

Este hecho se comprobó realizando el espectro de absorción UV-Vis para cada una de las condiciones de pH (**Figura 17**). En el caso del espectro a pH 7, se observó únicamente la banda de absorción del compuesto protonado, que presenta un máximo a 373 nm.<sup>30</sup> Para la molécula a pH 11 encontramos la banda con un máximo a 465 nm, debida al compuesto desprotonado.<sup>29</sup> De esta forma podemos confirmar que a los pH de trabajo tenemos el compuesto en el estado de protonación deseado.



**Figura 17.** Espectros de absorción UV-Vis de  $Ac^{2+}$  (izquierda) y su base conjugada  $Ac^+$  (derecha).

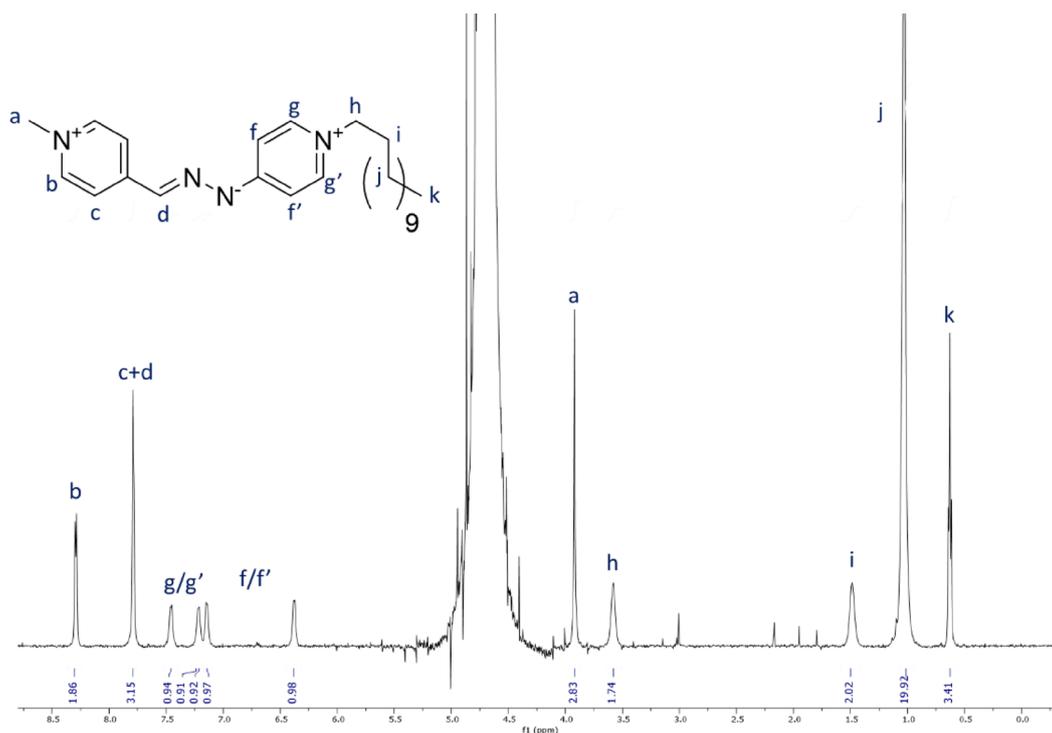
A una concentración de 1 mM, el espectro de RMN de  $^1H$  en  $D_2O$  del compuesto a  $pD = 7$  (**Figura 18**) es similar al obtenido en medio orgánico. La región alifática sigue el mismo patrón que en medio orgánico, modificando únicamente los desplazamientos de las señales. Por otra parte, en la región aromática se observan claramente las señales provenientes del pirdilaldehído,  $b$  (8.74 ppm, doblete, 2H) y  $c$  (8.31 – 8.28, multiplete 3H), estando esta última solapada con la señal del protón imínico  $d$  (8.31 – 8.38, multiplete 3H). Las señales provenientes de la pirdilhidrazina se encuentran en coalescencia debido a la rotación impedida del enlace  $C_{Py}-NH$ , provocando que las señales de los protones en  $\alpha$  al nitrógeno ( $g$ , 8.38 – 8.31, multiplete, 1.4H) aparezcan ensanchadas y no integren correctamente; mientras que los protones en posición  $\beta$   $f$  (7.97 – 7.81, multiplete, 0.1H) y  $f'$  (7.27 – 7.13, multiplete, 0.1H), son extremadamente poco intensas. Aun siendo poco intensas, se pudieron identificar como  $f$  y  $f'$  al observar los puntos de cruce esperados en el NOESY (**ANEXOS Figura 44**).



**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto  $\text{Ac}^{2+}$  en medio acuoso a  $\text{pD} = 7$ .

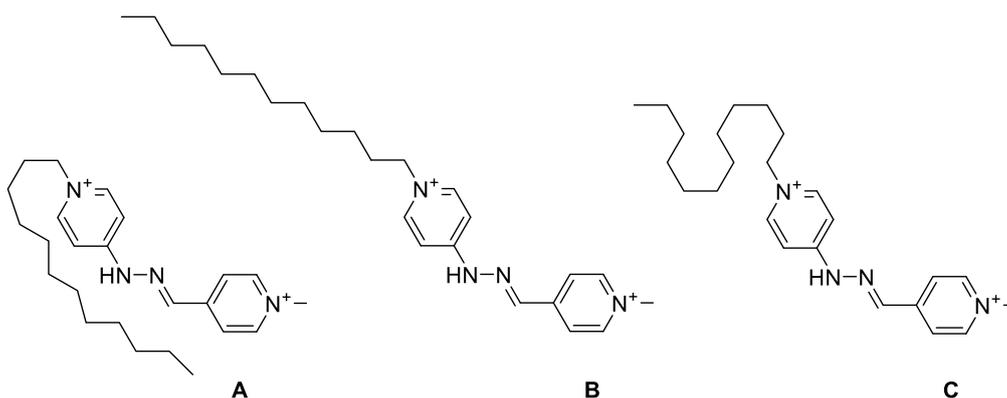
Para el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de  $\text{Ac}^+$  a una concentración de 1 mM en  $\text{pD} = 11$  (**Figura 19**), se observó que las señales son más anchas y menos intensas a las observadas a  $\text{pD} = 7$ . Esto se debe a la menor solubilidad que presenta el anfifilo  $\text{Ac}^+$ , posiblemente causado por la presencia de agregados bajo esta condición de pH.

En cuanto a los desplazamientos, las señales alquílicas son muy similares a las obtenidas para el espectro a  $\text{pD} = 7$ , si bien, los desplazamientos varían ligeramente. En la región aromática se observan las 4 señales de la fracción de piridil hidrazina: los protones en  $\alpha$  al nitrógeno,  $g$  (7.54, singlete aparente, 1H) y  $g'$  (7.30, singlete aparente, 1H), y los  $\beta$ ,  $f$  (7.23, singlete aparente, 1H) y  $f'$  (6.46, singlete aparente, 1H). Estos protones aparecen como 4 señales debido a un mayor impedimento de la rotación, causado por la desprotonación del grupo NH que provoca una mayor deslocalización de carga e impide la rotación de la piridina entorno al enlace  $\text{C}_{\text{Py}}\text{-N}^-$ . Las dos señales restantes son las de los protones en  $\alpha$  al piridil aldehído,  $b$  (8.38 ppm, doblete, 2H), y las señales de los hidrógenos  $\beta$  ( $c$ ) e imínico ( $d$ ) que aparecen solapados (7.91- 7.83, multiplete, 3 H).



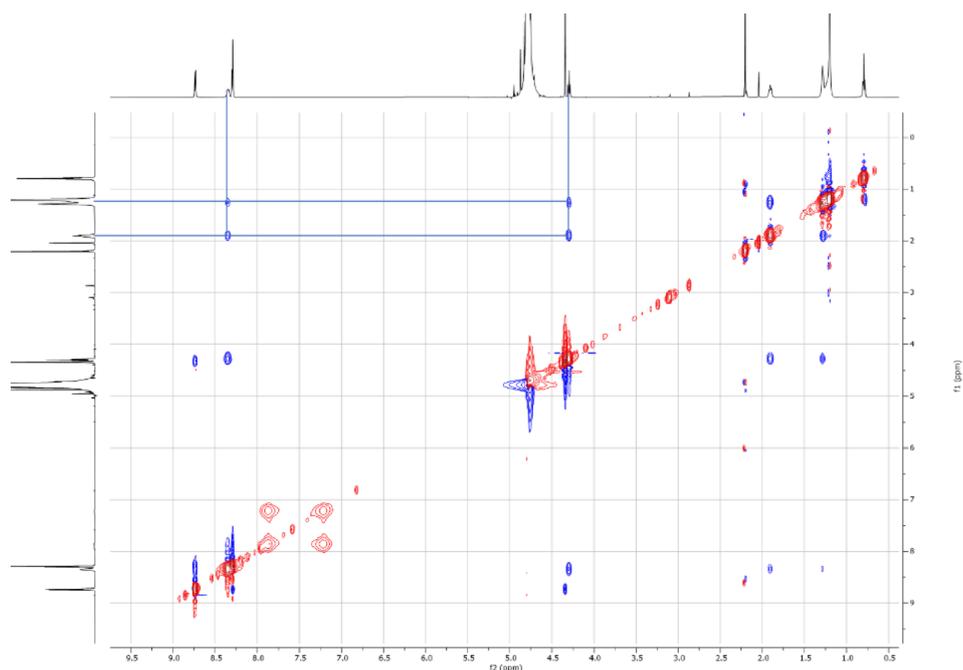
**Figura 19.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto  $\text{Ac}^{2+}$  en medio acuoso a  $\text{pD} = 11$ .

Una vez identificadas las señales en medio acuoso fijando el pH en las dos condiciones de interés, se estudió mediante el experimento NOESY la disposición de la cadena carbonada en el espacio. Esta puede permanecer estirada, plegada sobre sí misma en múltiples conformaciones o situarse a lo largo de la fracción aromática debido a su naturaleza flexible (**Figura 20**).



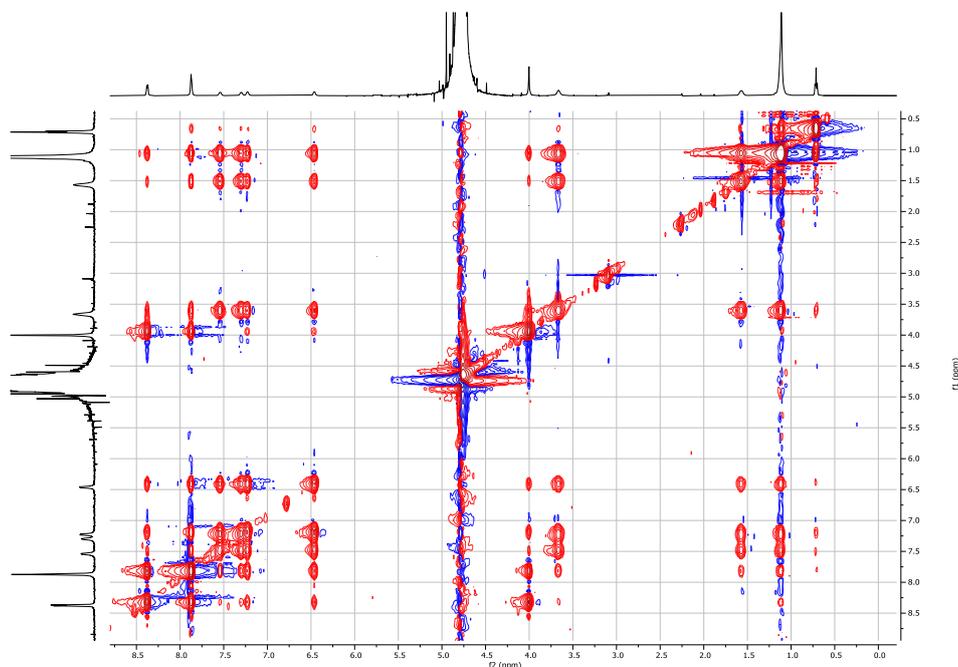
**Figura 20.** Conformaciones posibles de la cadena carbonada: doblada en forma de U a lo largo de la unidad aromática (A), estirada (B) o plegada en múltiples conformaciones (C).

En el NOESY del compuesto a  $\text{pD} = 7$  (**Figura 21**), los únicos puntos de cruce que se observan entre los hidrógenos de la cadena carbonada y la fracción del vermellógeno son con los hidrógenos en  $\alpha$  a la piridina próxima a la cadena, como era de esperar por su proximidad en el espacio.



*Figura 21. NOESY del compuesto  $Ac^{2+}$  en medio acuoso a  $pD = 7$ .*

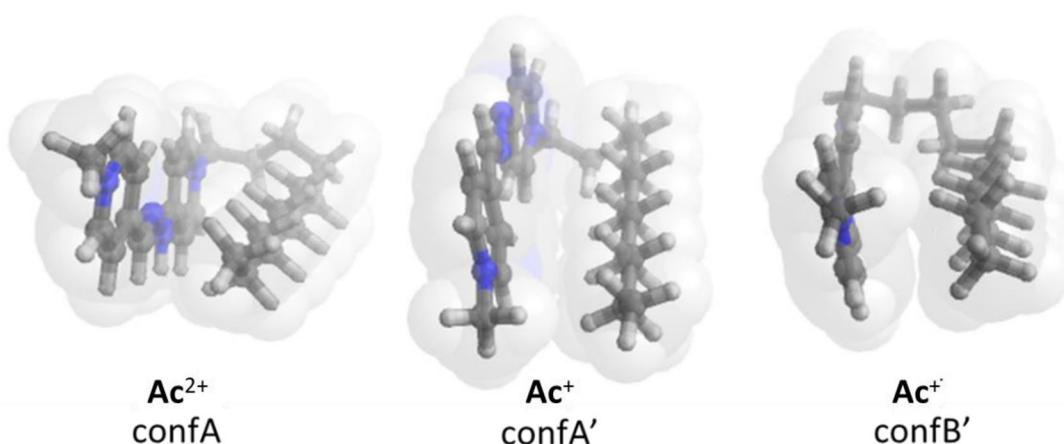
En cambio, en el NOESY de  $Ac^{2+}$  a  $pD = 11$  (**Figura 22**), se observan una gran cantidad de puntos de cruce entre la fracción aromática y la cadena carbonada, así como entre las propias señales de la región aromática. Estos puntos de cruce parecen indicar la existencia de un agregado dinámico en el que existe acoplamiento espacial entre fracciones aromáticas de las distintas moléculas.



*Figura 22. NOESY del compuesto  $Ac^{2+}$  en medio acuoso a  $pD = 11$ .*

Al no haber obtenido una información concisa sobre la colocación de la cadena, se recurre al uso de cálculos computacional para encontrar las geometrías más probables de la molécula protonada y desprotonada.

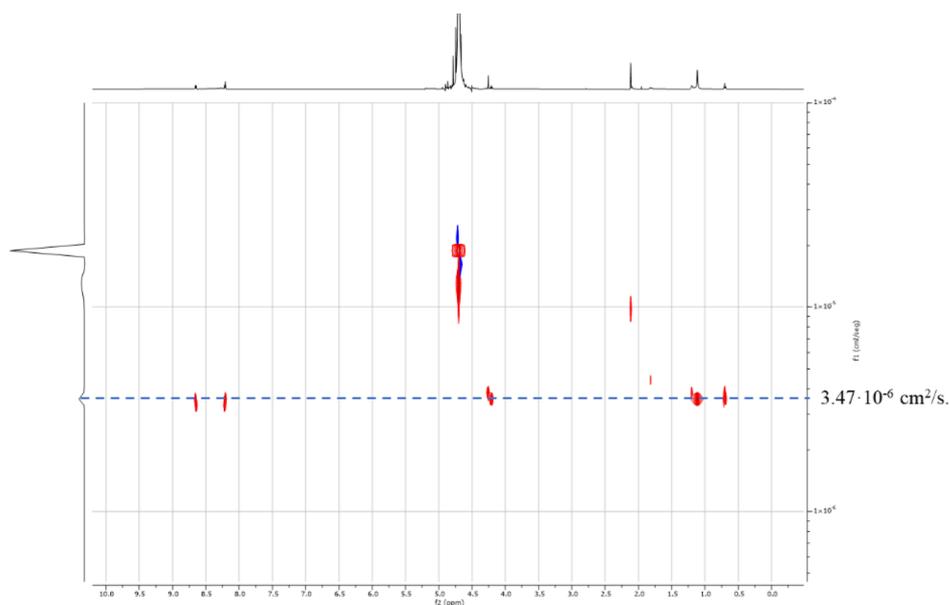
De esta forma, se realizó el estudio computacional buscando los posibles conformeros del anfífilo en agua a 298.15K, encontrando un total de 1474 conformeros para  $\text{Ac}^{2+}$  y 2117 para  $\text{Ac}^+$ , en ambos casos accesibles a temperatura ambiente en una ventana de 6 kcal/mol. Al encontrar una cantidad tan elevada de conformaciones, se refinaron los cálculos empleando métodos cada vez más costosos computacionalmente, hasta obtener 35 conformeros para  $\text{Ac}^{2+}$  y 14 para  $\text{Ac}^+$ . En ambos casos, todas las conformaciones más probables se encuentran con la cadena plegada a lo largo de la fracción aromática (**Figura 20A**), estructura que minimiza la exposición al disolvente. De entre todas estas posibilidades para  $\text{Ac}^{2+}$ , se encontró un único conformero con una población superior al 10% (ConfA, **Figura 23**). En el caso de  $\text{Ac}^+$  el conjunto estructural final muestra una menor diversidad, con dos estructuras representando en torno al 70% de la distribución de Boltzman (ConfA' ConfB' **Figura 23**).



**Figura 23.** Conformeros más poblados en agua a  $T = 298.15\text{K}$  para  $\text{Ac}^{2+}$  y su base conjugada  $\text{Ac}^+$ .

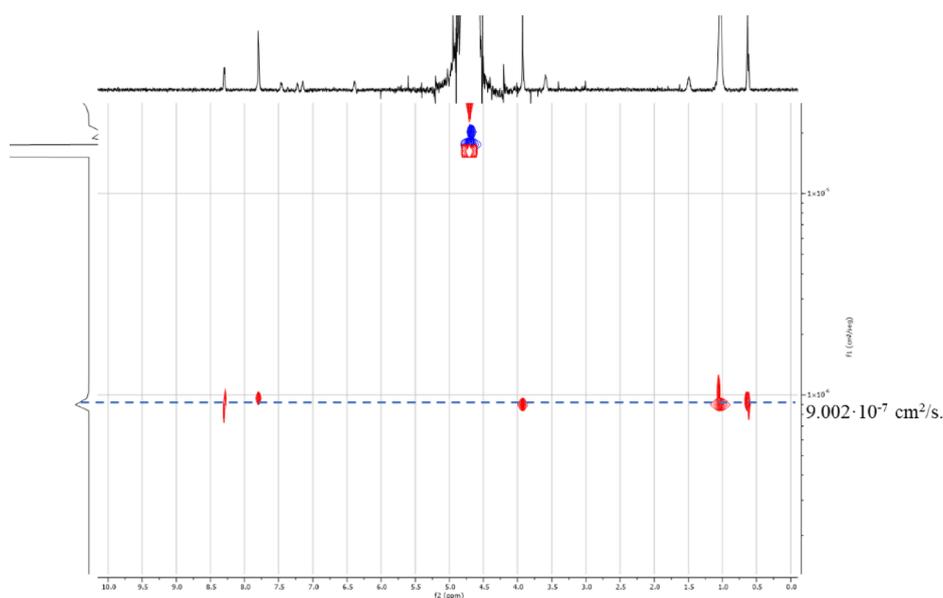
Tras establecer la posición espacial de la cadena y con el fin de completar los estudios de  $\text{Ac}^{2+}$  en medio acuoso, se realizaron experimentos DOSY de la molécula bajo las dos condiciones de pH estudiadas, para observar cómo varía la difusión.

Para la molécula a  $\text{pH} = 7$  (**Figura 24**) se observa un único coeficiente de difusión, lo que nos indica que tenemos una única especie en el medio, tal y como se esperaba. El coeficiente de difusión de la molécula a pH neutro es de  $3.47 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ .



**Figura 24.** DOSY del compuesto  $Ac^{2+}$  en medio acuoso a  $pD = 7$ .

El DOSY de la molécula a  $pH = 11$  (**Figura 25**) muestra de nuevo un único coeficiente de difusión, siendo de  $9.002 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ .



**Figura 25.** DOSY del compuesto  $Ac^{2+}$  en medio acuoso a  $pD = 11$ .

La difusión obtenida a  $pH 11$  es medio orden de magnitud menor a la que presenta a  $pH 7$ , esto implica que la molécula desprotonada difunde de una forma más lenta. Al tratarse de la misma molécula, la razón de su diferente difusión es la modificación en el radio hidrodinámico que presentan. Teniendo en cuenta la naturaleza del compuesto y las evidencias anteriormente descritas, es probable que a la concentración de trabajo ( $1 \text{ mM}$ ) se encuentre formando agregados a  $pH 11$  mientras que, a  $pH 7$  la concentración mínima de agregación sea superior.

Como dato adicional para apoyar esta hipótesis, se calculó la difusión esperada para el compuesto **Ac**, en su conformación plegada, en D<sub>2</sub>O empleando la ecuación de Stokes Einstein con una corrección geométrica (**Figura 26**), aproximando la molécula a un elipsoide prolato.<sup>35,36</sup> Los valores tomados para los radios de la molécula fueron obtenidos a partir de cálculos computacionales de optimización geométrica, comentados anteriormente. Obteniendo un valor de 7.91 Å de radio largo (a) y de 3.68 Å de radio corto (b), estos valores son los mismos para **Ac**<sup>2+</sup> y para **Ac**<sup>+</sup>.

Ecuación Stokes-Einstein corregida

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\mu R f}$$

D = Coeficiente de difusión  
 K<sub>b</sub> = constante de Boltzmann  
 T = temperatura  
 μ = viscosidad del medio

Para un elipsoide prolato

$$R = \sqrt[3]{ab^2};$$

a = radio mayor b = radio menor

$$f = \frac{P^{-1/3}\sqrt{P^2 - 1}}{\ln(P + \sqrt{P^2 - 1})};$$

$$P = a/b$$

**Figura 26.** Ecuaciones empleadas en el cálculo de la difusión teórica.

Tomando el valor de viscosidad del D<sub>2</sub>O a 298K (1.232·10<sup>-3</sup> P·s)<sup>35,36</sup> se obtiene un valor teórico de difusión de 3.44·10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup>/s, muy similar al obtenido en el DOSY para el compuesto a pH 7, teniendo en cuenta que estamos realizando aproximaciones con errores asociados. Esta similitud apoya la hipótesis de que **Ac**<sup>2+</sup> al encontrarse protonado a una concentración de 1 mM difunde como una molécula discreta mientras que la difusión que presenta a esa misma concentración al encontrarse desprotonado es mucho menor y no se asemeja a la esperada, por lo que es probable que se encuentre formando agregados.

### 3.4. Estudio de la formación de complejos supramoleculares entre el compuesto anfílico **Ac**<sup>2+</sup> y el macrociclo CB[7] mediante RMN.

#### 3.4.1. Aspectos generales:

El estudio de la interacción entre el compuesto **Ac**<sup>2+</sup> y el macrociclo comercial CB[7] se realizó de forma cualitativa mediante experimentos de RMN de <sup>1</sup>H, DOSY y NOESY.

En general, la información que se puede obtener en el estudio de procesos de equilibrio está relacionada con la velocidad de intercambio entre componentes en la escala de tiempo de la técnica. En el caso del RMN tendríamos dos situaciones extremas: el **equilibrio rápido**, donde se observan las señales promedio de las distintas especies (en este caso sustrato libre, receptor y complejo); y el **equilibrio lento**, en el que se observan

las señales asociadas a cada especie del equilibrio. En caso de tener una situación intermedia en la escala de tiempos de la técnica, se observa una situación de **coalescencia**, en donde las señales aparecen más o menos resueltas en función de la temperatura (u otro factor que afecte a la velocidad del proceso) y de la distancia en Hz entre las señales que se intercambian. Por lo general, mediante los estudios de complejación por RMN se puede obtener distinta información: 1) **desplazamientos químicos relativos** de las especies complejadas respecto a los de las especies libres, que pueden indicar no solo si se ha producido la complejación de forma cualitativa, sino también en la determinación de la constante termodinámica para el proceso. 2) **estequiometría de los procesos**, permitiéndonos observar, por ejemplo, si se forman estructuras de tipo [2]- o [3]pseudorotaxano (estequiometrías 1:1 o 1:2). 3) **modo de inserción**, que estaría referido a la disposición relativa del sustrato  $\text{Ac}^{2+}$  con respecto a la cavidad del receptor CB[7], como se ha comentado en la introducción, este tipo de moléculas pueden ser complejadas tanto en la fracción del pseudoviologeno como en la cadena carbonada.

Otra técnica de RMN de gran utilidad para estudiar estos procesos dinámicos de complejación es el DOSY. Si el receptor y el sustrato el forman un complejo de inclusión se observará un único coeficiente de difusión, mientras que si no es así se observarán dos, correspondientes a las especies libres. Finalmente, el COSY y NOESY nos sirve de ayuda para identificar el desplazamiento de las señales en caso de duda.

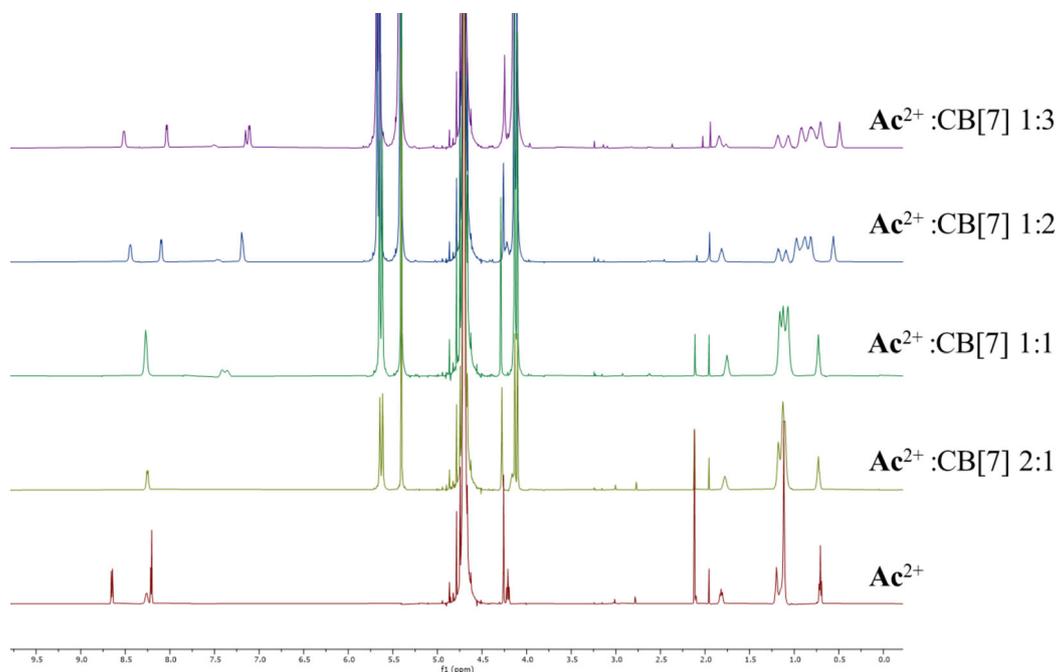
#### **3.4.2. Complejo de inclusión $\text{Ac}^{2+}\subset\text{CB}[7]$ a $\text{pD} = 7$ .**

Como se ha comentado en el apartado 3.4.1, al formarse un complejo supramolecular del tipo *Host-Guest*, el sustrato va a experimentar una modificación de los desplazamientos químicos en RMN al encontrarse en el interior de la cavidad. Esta variación en los desplazamientos aporta una gran cantidad de información del modo de complejación.

Al comparar los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de  $\text{Ac}^{2+}$  a pH 7 con distintas cantidades de CB[7] (0, 0.5, 1, 2 y 3 equivalentes, **Figura 27**) podemos ver cómo la adición del macrociclo afecta a las señales.

Con la adición de 0.5 y 1 equivalentes de CB[7], se observa que las señales de la región alifática del sustrato no sufren ningún cambio en su desplazamiento químico, mientras que en la región aromática se observa un cambio en las señales, que entran en coalescencia.

Esto nos indica que, con 0.5 y 1 equivalentes del macrociclo, el equilibrio tendrá una velocidad intermedia en la escala de tiempos de RMN y que la complejación va a ocurrir principalmente a nivel de la unidad del vermellógeno.



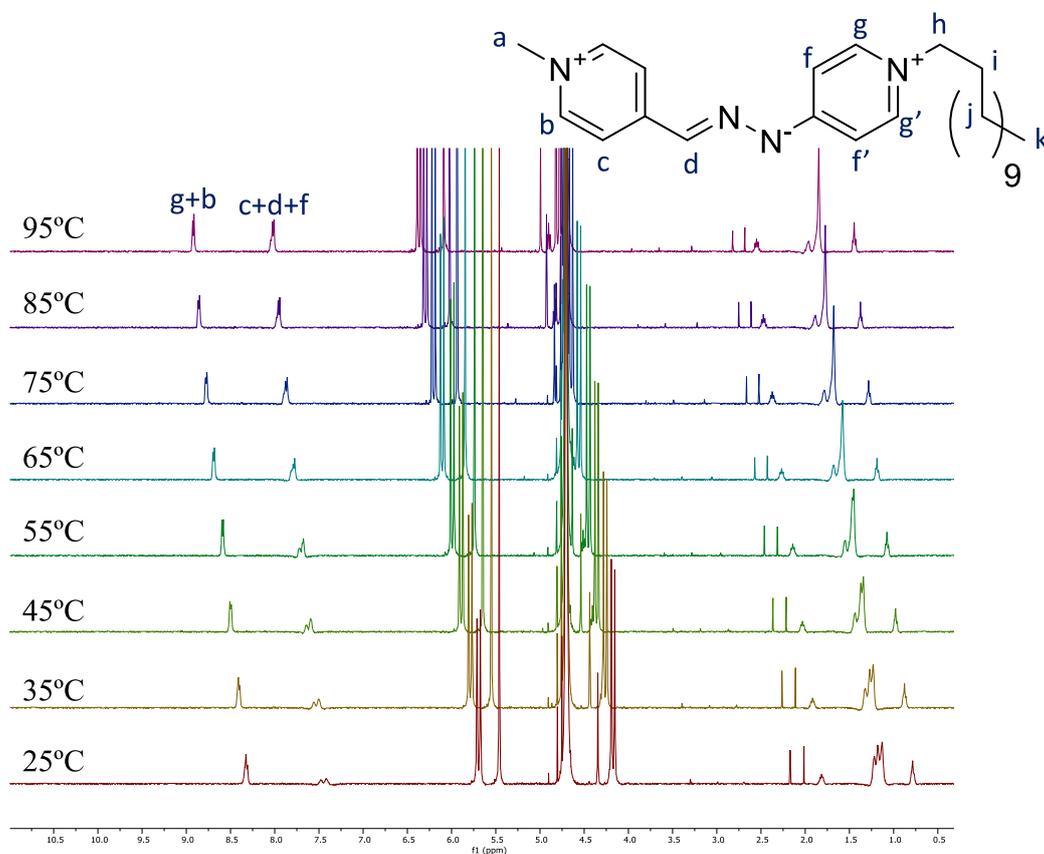
**Figura 9.** Comparación de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para el complejo  $\text{Ac}^{2+}\cdot\text{CB}[7]$  a  $\text{pD} = 7$  con distintos equivalentes de macrociclo.

Al añadir el segundo y tercer equivalentes de cucurbiturilo, las señales en coalescencia de la región aromática se resuelven mientras que en la zona alifática se modifican los desplazamientos, efecto más acusado en la zona media y terminal de la cadena. Esta variación en los desplazamientos puede ser debida a la inclusión de un único  $\text{CB}[7]$  en equilibrio rápido entre la región aromática y alquílica de  $\text{Ac}^{2+}$  o a la inclusión de un segundo  $\text{CB}[7]$  para formar un [3]pseudorotaxano.

Con los espectros obtenidos para las diferentes relaciones de receptor/sustrato, no es posible seguir el desplazamiento químico de las señales del sustrato. Con el fin de establecer los desplazamientos de  $\text{Ac}^{2+}$ , se estudian las señales de  $^1\text{H}$  RMN para las relaciones receptor/sustrato 1:1 y 1:2, empleando experimentos complementarios como el temperatura variable, el NOESY o el ROESY.

En el caso de la relación receptor/sustrato 1:1, se realizó un experimento de  $^1\text{H}$ -RMN a temperatura variable ( $25^\circ\text{C} - 95^\circ\text{C}$ ) con el fin de observar la salida de la coalescencia de las señales aromáticas de  $\text{Ac}^{2+}$  al aumentar la temperatura (**Figura 28**).

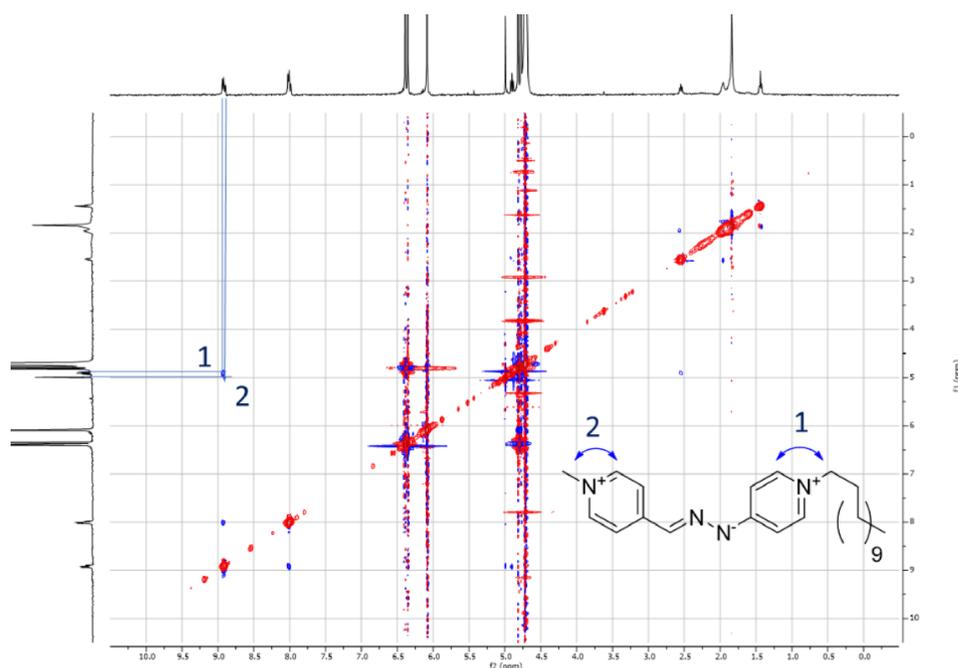
De esta forma, vemos que, al aumentar la temperatura, se produce la salida de la coalescencia de la señal  $c+d+f$  (7.43 ppm). Además, mediante la integración de las señales se confirma que el protón imínico se encuentra solapado en esta región.



**Figura 108.** Experimento  $1H$  RMN a temperatura variable de 25-95°C con incremento de 10°C para el complejo  $Ac^{2+}CB[7](1:1)$  a  $pD = 7$ .

Una vez observada la salida de la coalescencia, se realizó un experimento NOESY a 368K (**Figura 29**), temperatura a la cual las señales están resueltas. Se encuentran dos puntos de cruce claves para asignar las señales. 1 indica el acoplamiento entre la primera señal (8.40 ppm) con el metilo terminal ( $a$ ), el punto de cruce 2 se debe al acoplamiento entre esta misma señal y el primer  $CH_2$  de la cadena ( $h$ ). De esta forma podemos saber que la señal a 8.40 ppm se debe a los dos juegos de protones en  $\alpha$  a los nitrógenos piridínicos ( $g$  y  $b$ ). Una vez identificada esta primera señal, por la integración de la siguiente (7.53 ppm) sabemos que es debida a los protones en  $\beta$  a los nitrógenos y al imínico solapados ( $c$ ,  $d$  y  $f$ )

En la primera señal (8.40 ppm) se han podido identificar los NOE con el metilo terminal ( $a$ ) y con el primer  $CH_2$  de la cadena ( $h$ ) indicándonos que en esta se corresponde con los protones  $g$ ,  $b$  solapados. Siendo la siguiente señal (7.53) debida a los protones  $c$ ,  $d$  y  $f$ .



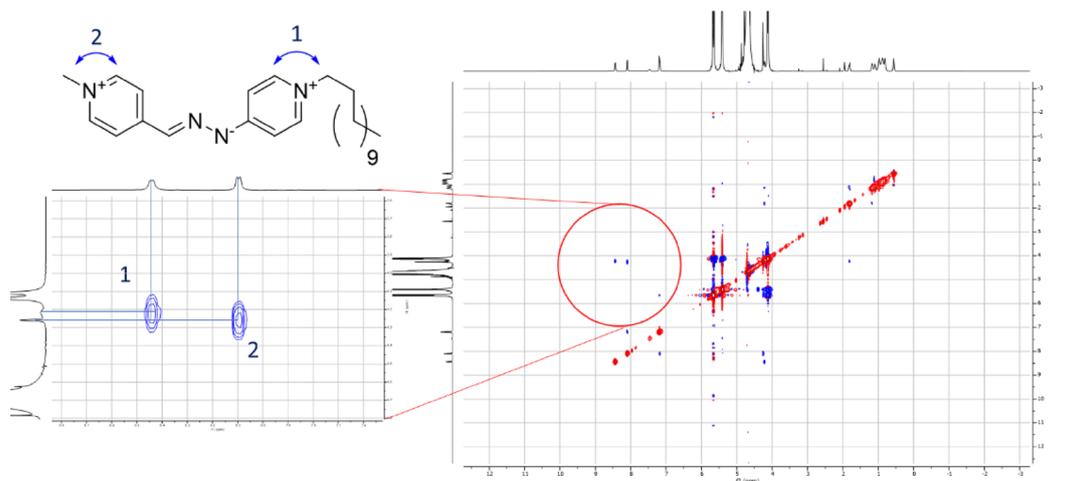
**Figura 11.** NOESY del complejo  $\text{Ac}^{2+}\text{-CB}[7](1:1)$  a  $\text{pD} = 7$ .

Una vez asignadas las señales para el complejo 1:1, podemos ver que las señales que experimentan un mayor apantallamiento y que, por lo tanto, se encuentran en el interior de la cavidad del macrociclo, son los protones provenientes de la fracción del aldehído (*b*, *c*), el protón imínico (*d*) y las señales en beta a la hidrazinilpiridina (*f*). El estudio del complejo  $\text{Ac}^{2+}\text{-CB}[7](1:1)$  indica que el macrociclo se va a situar preferentemente sobre la fracción aromática, interaccionando en mayor medida con la región proveniente del piridilaldehído.

Una vez identificado el desplazamiento de las señales con 1 eq. de macrociclo, se estudia el desplazamiento para el complejo de inclusión con 2 eq. de CB[7]. Para ello, se realiza el ROESY para esta relación receptor/sustrato (**Figura 30**).

Al estudiar los puntos de cruce obtenidos, podemos identificar la primera señal (8.53 ppm, doblete, 2H) como los protones en  $\alpha$  al nitrógeno de la piridil hidrazina (*g*) ya que dan un NOE con el primer  $\text{CH}_2$  de la cadena. La segunda señal (8.18 ppm, doblete, 2H) presenta un NOE con el metilo unido a la piridina, lo que nos indica que se corresponde con los protones en  $\alpha$  de la fracción proveniente del piridil aldehído (*b*). La pequeña señal (7.62 – 7.46 ppm, multiplete, 0.8H) se asignan los protones  $\beta$  de la piridil hidrazina (*f*), que presentan la coalescencia característica y, la última señal aromática

(7.32 – 7.20 ppm, multiplete, 3H) se debe al solapamiento del protón imínico (*d*) con los protones en β al piridil aldehído (*c*).

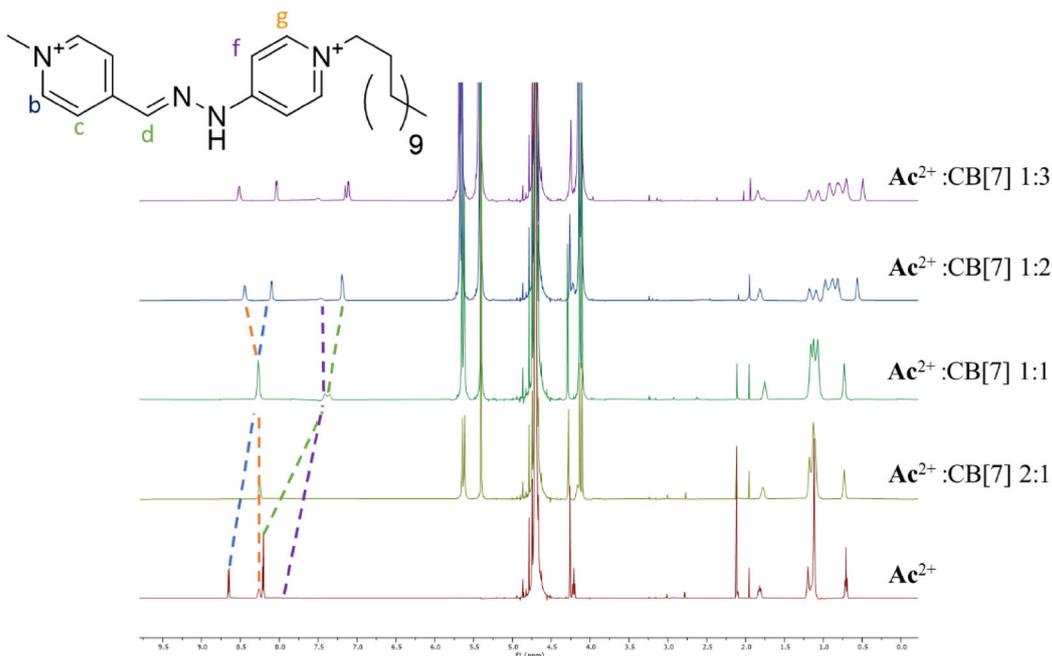


**Figura 3012.** ROESY del complejo  $Ac^{2+}@CB[7](1:2)$  a  $pD = 7$ .

Al identificar las señales para el equilibrio entre el sustrato y 2 equivalentes del receptor, se establece la modificación de todas las señales de la fracción del vermellógeno (**Figura 31**). Al pasar de 1 a 2 equivalentes de receptor, se aprecia como las señales provenientes de la piridil hidrazina (*b*, *c*) y del protón imínico (*d*) se apantallan todavía más al añadir este segundo equivalente. Por el contrario, las señales provenientes de la piridil hidrazina (*f*, *g*), se desapantallan con respecto a espectro para una relación 1:1.

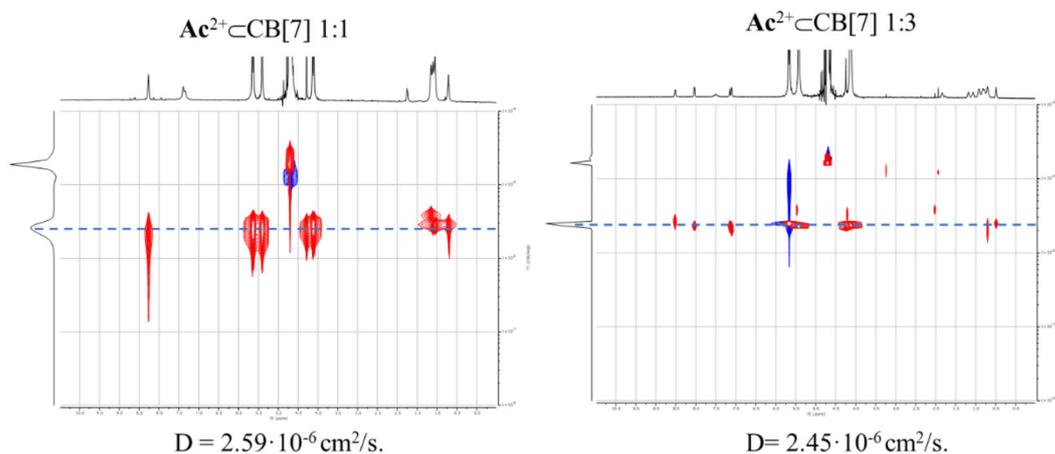
De esta forma, podemos saber que el macrociclo va a situarse sobre la fracción aromática, incluyendo preferentemente en el interior de la cavidad el protón imínico y los protones provenientes del piridil aldehído y estableciendo interacciones entre la fracción de piridil hidrazina y los carbonilos de los portales del receptor.

Como se observa en la región alifática, existe un apantallamiento de las señales al añadir el segundo equivalente de CB[7], lo que nos indica que podría existir un segundo equilibrio *host-guest* en el que el macrociclo incorpora la cadena en su interior. Para poder determinarlo habría que realizar más experimentos, como por ejemplo una valoración para poder determinar la estequiometría del equilibrio de asociación.



**Figura 31.** Comparación de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para el complejo  $\text{Ac}^{2+}\text{-CB}[7]$  a  $\text{pD} = 7$  con distintos equivalentes de macrociclo. Se muestran los desplazamientos marcados.

Una vez caracterizados los complejos de inclusión, se realizaron los DOSY del complejo para 1 y 3 equivalentes de macrociclo (**Figura 32**) para observar si existe una disminución de la difusión por la inclusión de un segundo CB[7]. Se obtiene un coeficiente de difusión de  $2.59 \cdot 10^{-6}$  para el complejo formado con 1 equivalente de CB[7]. El coeficiente de difusión obtenido para el complejo con 3 equivalentes de CB[7] es de  $2.45 \cdot 10^{-6}$ .



**Figura 32.** DOSY para el complejo  $\text{Ac}^{2+}\text{-CB}[7]$  1:1 a  $\text{pD} = 7$  (izquierda) y DOSY con para el complejo  $\text{Ac}^{2+}\text{-CB}[7]$  1:3 a  $\text{pD} = 7$  (derecha).

Cabe esperar que si se forma un complejo 1:2, en el que dos unidades de CB[7] interaccionen simultáneamente con  $\text{Ac}^{2+}$ , la difusión sea sustancialmente menor. Sin embargo, no es lo que ocurre en este caso. La difusión similar parece indicar que podría existir un equilibrio entre los dos modos de inserción, donde el macrociclo interacciona con la unidad aromática y alquílica en equilibrio rápido.

### 3.4.3. Complejo de inclusión $\text{Ac}^{2+} \subset \text{CB}[7]$ a $\text{pD} = 11$ .

En el estudio de la complejación del anfifilo a  $\text{pH} = 11$  con el macrociclo CB[7] a distintos equivalentes (Figura 33) se observa una tendencia diferente. Al contrario que en el caso anterior, la región aromática prácticamente no se desplaza. A partir de la adición del segundo equivalente del macrociclo parecen modificarse los desplazamientos de la cadena alquílica, aunque de una forma muy ligera.

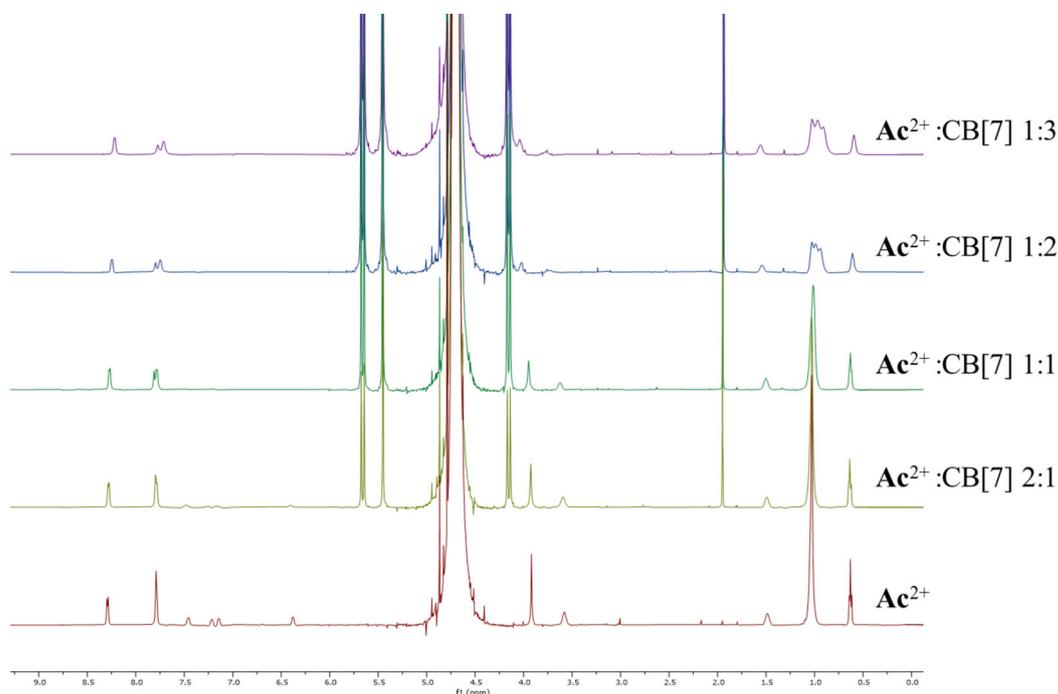


Figura 33. Comparación de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para el complejo  $\text{Ac}^+ \subset \text{CB}[7]$  a  $\text{pD} = 11$  con distintos equivalentes de macrociclo.

A la vista de los espectros obtenidos, no se puede confirmar una interacción entre el macrociclo CB[7] y el compuesto  $\text{Ac}^+$  desprotonado. De existir interacción, esta sería mucho menor a la observada en el caso del compuesto protonado, pudiendo emplearse esta característica para provocar la complejación/descomplejación por efecto del  $\text{pH}$ .

## 4. APARTADO EXPERIMENTAL

### 4.1. General

Todos los reactivos comerciales fueron utilizados sin realizar una purificación adicional. El agua utilizada en síntesis y elaboraciones es de calidad Milli-Q, obtenida a partir de un aparato Millipore Gradient A10.

El seguimiento de todas las reacciones en disolución se realizó mediante cromatografía de capa fina, utilizando cromatofolios de gel de sílice Merck 60 F254 y empleando radiación ultravioleta (254 y 360 nm) para el revelado. Como mezcla eluyente en las cromatografías se empleó una mezcla polar de disolventes ( $\text{H}_2\text{O}$ , MeCN, MeOH) con NaCl.

La comprobación de la formación del producto, así como de la ausencia de reactivos de partida tras la elaboración se realizó mediante RMN de  $^1\text{H}$  empleando un espectrómetro Bruker Avance 300 (300 MHz). La caracterización de los productos se lleva a cabo mediante un espectrómetro Bruker Avance 500 (500 MHz para  $^1\text{H}$  y 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Para la preparación de las muestras de RMN se utilizaron disolventes deuterados ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) utilizando la señal residual del disolvente protonado como señal de referencia.

Para la obtención de la masa de los productos se empleó un espectrómetro Applied Biosystems QSTAR Elite con analizador híbrido LC-Q-q-TOF para ESI de baja y alta resolución.

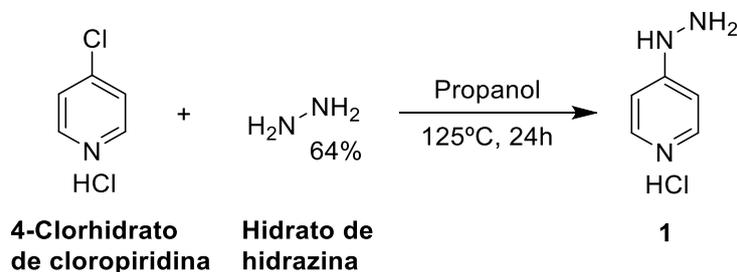
Los espectros de UV-Vis fueron registrados en un equipo Jasco V-650 spectrometer.

Para medir el pH de las disoluciones se empleó un pH-metro Fisher Scientific accumet AE150.

## 4.2. Síntesis

### 4.2.1. Síntesis de la piridil hidrazina precursora 3:

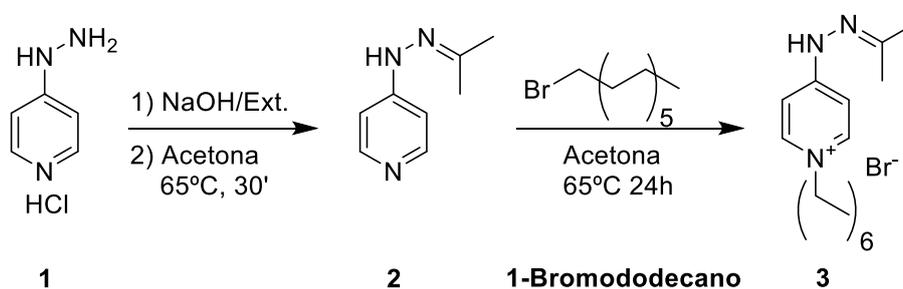
Síntesis del intermedio 1.



En un balón de reacción se disolvieron 8.24 mg de hidrocloreto de 4-clorhidrato de cloropiridina (54.9 mmol, 1 eq.) en 150 mL de 1-propanol y se añadieron 17,1 mL de hidrato de hidrazina (549 mmol, 10 eq.). El crudo se dejó reaccionar a 125°C. Tras 24h la reacción se rota a sequedad obteniendo **1** (14 g, 140%) de un aceite amarillo hidratado.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 7.95 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 6.74 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2H).

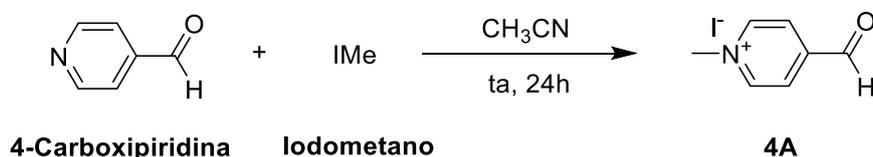
Síntesis del precursor 3.



Se disuelven 2.02 g de **1** (11,1 mmol, 1 eq.) en 70 mL de una disolución de NaOH 3M y se deja agitar durante 45'. Pasado este tiempo se realizan 8 extracciones con 50 mL de AcOEt para liberar la piridil hidrazina, la fase orgánica se seca y rota obteniendo 0.9226 g del compuesto **2** (76%). El total del compuesto obtenido (**2**, 8.46 mmol, 1eq) se disuelve en 60 mL de acetona y se deja en agitación durante 30' a 65°C con el fin de proteger la hidrazina. Una vez transcurrida la media hora se añaden 3.6 mL de 1-bromododecano (12.7 mmol, 1.5 eq.) sobre la disolución de acetona la cual obtiene un color ocre. Se deja reaccionar durante 24h a 65°C. Una vez transcurrida la reacción se lleva el crudo a sequedad, se disuelve en 20 mL de acetonitrilo y se lava con 4 x 50 mL de hexano. Por RMN se ve el compuesto esperado, se rota y seca obteniendo 2.36 g de **3** (69%), un aceite rojo oscuro.

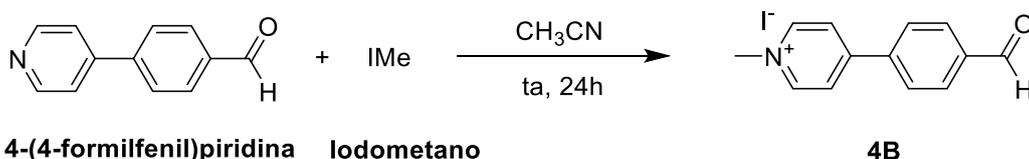
**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ (ppm): 10.44 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 13.7, 7.3 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.96 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.73 – 1.62 (m, 2H), 1.20 – 1.08 (m, 18H), 0.75 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H).

#### 4.2.2 Síntesis de los piridil aldehídos precursores 4A y 4B:



Se disolvieron 950 mg de **4-carboxipiridina** (7.6 mmol, 1 eq.) en 50 mL de MeCN, se añadieron 7 mL de **iodometano** (114 mmol, 15 eq.) a través de un septum. El crudo se dejó reaccionar durante 48h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se observa la aparición de un precipitado naranja. Se filtra el sólido y se lava con CH<sub>2</sub>Cl y Et<sub>2</sub>O, obteniendo 1.9 g del compuesto 4A (95%).

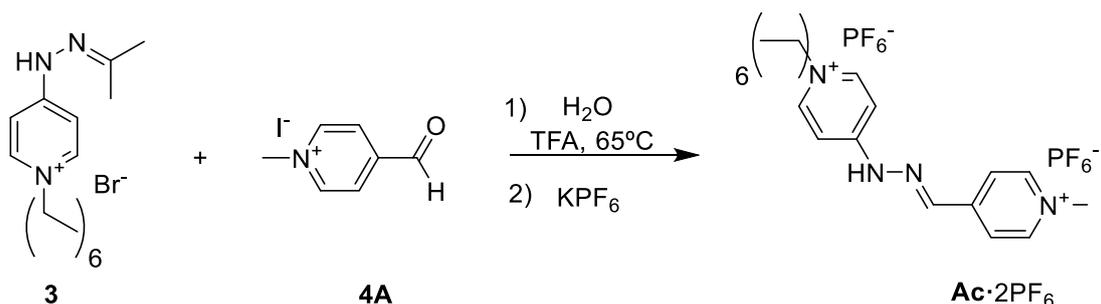
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.20 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.52 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 6.61 (s, 1H), 5.18 (s, 3H), 3.96



Se disolvieron 563 mg de **4-4(formilfenil)piridina** (3.08 mmol, 1 eq.) en 25 mL de MeCN, se añadieron 1.93 mL de **iodometano** (30.8 mmol, 10 eq.) a través de un septum. El crudo se dejó reaccionar durante 24h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se observa un precipitado amarillo, se filtra a vacío, se lava con MeCN y Et<sub>2</sub>O y se seca. Por RMN del crudo se observa únicamente el compuesto **4B**, se rota el crudo y se lava con MeCN y Et<sub>2</sub>O. Se obtienen 923 mg de **4B** (92%), un sólido amarillo brillante.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 10.08 (s, 1H), 8.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 8.38 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 8.18 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.44 (s, 3H).

### 4.2.3. Condensación de los vermellógenos anfífilos Ac y Al:

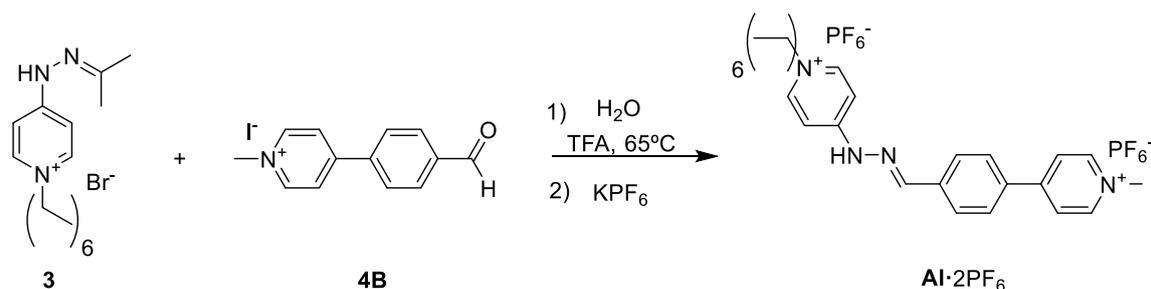


Se disolvieron 295 mg de la hidrazona (**3**, 0.74 mmol, 1 eq.) en 150 mL de H<sub>2</sub>O, a esta disolución se le añadieron 222 mg del aldehído (**4A**, 0,89 mmol, 1.2 eq.). A continuación, se añadieron 10  $\mu$ L de TFA para desproteger la hidrazona y catalizar la reacción al activar el aldehído. Tras 24h a 65°C se confirma por RMN la formación del compuesto. El producto se precipita empleando KPF<sub>6</sub>. El precipitado obtenido se lava y seca, obteniendo 364.6 mg de **Ac·2 PF<sub>6</sub>** (73%) un sólido marrón.

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  (ppm): 10.89 (s, 1H), 8.60 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 8.27 (d aparente,  $J = 6.8$  Hz, 4H), 8.21 (s, 1H), 7.87 (s aparente, 1H), 7.21 (s aparente, 1H), 4.27 (s, 3H), 4.25 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.87 (p,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.49 – 1.13 (m, 18H), 0.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  (ppm): 155.17 (C), 150.00 (C), 146.46 (2 x CH), 145.17 (2 x CH), 141.89 (CH), 125.48 (2 x CH), 111.55 (CH), 110.28 (CH), 60.25 (CH<sub>2</sub>), 48.85 (CH<sub>3</sub>), 32.55 (CH<sub>2</sub>), 31.46 (CH<sub>2</sub>), 30.24 (CH<sub>2</sub>), 30.23 (CH<sub>2</sub>), 30.10 (CH<sub>2</sub>), 29.98 (CH<sub>2</sub>), 29.96 (CH<sub>2</sub>), 29.55 (CH<sub>2</sub>), 26.47 (CH<sub>2</sub>), 23.30 (CH<sub>2</sub>), 14.30 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESI-MS** (m/z) calculada para [M-2PF<sub>6</sub>]<sup>2+</sup>: C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub><sup>2+</sup> = 191.1543, (m/z) obtenida = 191.1542. (m/z) calculada para [M-H-2PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup>: C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup> = 381.3013, (m/z) obtenida = 381.3013.



Se disolvieron 330 mg de **3** (0.828 mmol, 1 eq.) en 160 mL de H<sub>2</sub>O obteniendo una disolución roja, se añadieron sobre esta disolución 269 mg del aldehído (**4B**, 0.828 mmol, 1 eq.). Se añadieron 30 μL de TFA para desproteger la hidrazona y se dejó reaccionar durante 24h a 70°C. Transcurrido este tiempo se confirma por RMN la formación del compuesto. Se realizó una precipitación empleando KPF<sub>6</sub> obteniendo 514,2 mg de Al·2PF<sub>6</sub> (83%), un sólido verdoso.

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ (ppm): 12.73 (s, 1H), 8.63 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.47 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.11 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.06 – 7.97 (m, 5H), 7.71 (dd, *J* = 7.3, 2.4 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 7.3, 2.7 Hz, 1H), 4.28 (s, 3H), 4.14 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.88 – 1.79 (m, 2H), 1.35 – 1.21 (m, 18H), 0.87 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ (ppm): 155.99 (C), 155.70 (C), 147.87 (CH), 146.21 (2x CH), 144.44 (CH), 143.61 (CH), 138.50 (C), 136.09 (C), 129.54 (2 x CH), 129.32 (2x CH), 125.72 (2 x CH), 110.50 (CH), 108.61 (CH), 59.49 (CH<sub>2</sub>), 48.47 (CH<sub>3</sub>), 32.55 (CH<sub>2</sub>), 31.38 (CH<sub>2</sub>), 30.25 (CH<sub>2</sub>), 30.23 (CH<sub>2</sub>), 30.09 (CH<sub>2</sub>), 29.98 (CH<sub>2</sub>), 29.96 (CH<sub>2</sub>), 29.55 (CH<sub>2</sub>), 26.48 (CH<sub>2</sub>), 23.31 (CH<sub>2</sub>), 14.31 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESI-MS** (m/z) calculada para [M-2PF<sub>6</sub>]<sup>2+</sup>: C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub><sup>2+</sup> = 229.1699, (m/z) obtenida = 229.1700. (m/z) calculada para [M-H-2PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup>: C<sub>30</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup> = 457.3329, (m/z) obtenida = 457.3326.

#### 4.2.3. Estudios de Ac<sup>2+</sup> en medio acuoso a pH = 7 y pH = 11.

Para trabajar en medio acuoso, se realiza un cambio de contraión de Ac·2PF<sub>6</sub> a Ac·2Cl, mediante una metátesis empleando cloruro de tetrabutilamonio. Este se llevó a cabo disolviendo 150 mg de Ac·2PF<sub>6</sub> en 5 mL de MeCN y se añadiendo dos puntas de espátula de cloruro de tetrabutilamonio. La adición de la sal provoca la precipitación de Ac·2Cl. Tras 20' en agitación se filtra el sólido y se lava con MeCN y éter, obteniendo 66 mg de un sólido amarillo esponjoso (65%).

Para ajustar el pH de las disoluciones se emplearon tampones fosfato 50 mM

**Ac<sup>2+</sup>** a pH 7:

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>OCD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  (ppm): 8.74 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 8.35 (s, 2H), 8.30 (d,  $J = 5.9$  Hz, 3H), 7.87 (coalescencia, 1H), 7.21 (coalescencia, 1H), 4.34 (s, 3H), 4.30 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.94 – 1.87 (m, 2H), 1.31 – 1.17 (m, 18H), 0.81 – 0.77 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (126 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 154.37 (C), 149.31 (C), 145.15 (2 x CH), 140.89 (CH), 124.37 (2 x CH), 59.27 (CH<sub>2</sub>), 47.59 (CH<sub>3</sub>), 31.12 (CH<sub>2</sub>), 29.79 (CH<sub>2</sub>), 28.69 (CH<sub>2</sub>), 28.53 (CH<sub>2</sub>), 28.39 (CH<sub>2</sub>), 28.27 (CH<sub>2</sub>), 28.11 (CH<sub>2</sub>), 27.73 (CH<sub>2</sub>), 24.81 (CH<sub>2</sub>), 21.97 (CH<sub>2</sub>), 13.34 (CH<sub>3</sub>).

**Ac<sup>2+</sup>** a pH 11:

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>OCD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  (ppm): 8.38 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 7.92 – 7.82 (m, 3H), 7.54 (s aparente, 1H), 7.30 (s aparente, 1H), 7.23 (s aparente, 1H), 6.46 (s aparente, 1H), 4.00 (s, 3H) 3.66 (s aparente, 2H), 1.57 (s aparente, 2H) 1.24 – 1.00 (m, 18H), 0.71 (t,  $J = 6.5$  Hz, 3H).

### 4.3. Estudio de la interacción entre el anfifilo **Ac<sup>2+</sup>** y el receptor CB[7]

El estudio de la formación de complejos supramoleculares se llevó a cabo mediante técnicas de espectroscopía de RMN empleando diferentes relaciones entre el sustrato y el receptor. Para esto, se prepararon 5 mL de una disolución de **Ac·2Cl** 1 mM y 1.5 mL de una disolución 1 mM para **Ac·2Cl** y 6 mM para el CB[7]. A partir de estas dos disoluciones stock se prepararon los tubos de RMN a distintas relaciones de equivalentes, tal y como se muestra en la tabla 1.

*Tabla 1. Equivalentes y volúmenes de los tubos de RMN del estudio de la unión de **Ac<sup>2+</sup>** con CB[7].*

Relación de equivalentes CB[7]/Ac <sup>2+</sup>	V disolución Ac·2Cl ( $\mu$ L)	V disolución Ac·2Cl-CB[7] ( $\mu$ L)
0	500	0
0.5	500	45
1	500	100
2	500	250
3	500	500

A partir de estas mezclas se realizaron los espectros de <sup>1</sup>H-RMN, COSY, NOESY y ROESY explicados en el apartado de resultados y discusión.

#### 4.4. Cálculos computacionales

El muestreo conformacional se realizó utilizando el código de libre acceso CREST v. 2.11.2.,<sup>37,38</sup> empleando en todos los casos el método cuántico semiempírico xtb-GFN2,<sup>39</sup> en combinación con el modelo de solvatación implícita ALPB.<sup>40</sup> Todos los cálculos de DFT se realizaron utilizando el software ORCA v.5.0.3.<sup>41</sup>

Para obtener la información estructural de los conformeros de  $\text{Ac}^{2+}$  y  $\text{Ac}^+$  en medio acuoso se utilizó en primer lugar el programa CREST en su configuración estándar, empleando el método cuántico semiempírico **xtb-GFN2** y el modelo de solvatación **ALPB** (agua). Encontrando 1474 conformeros para  $\text{Ac}^{2+}$  y 2117 para  $\text{Ac}^+$

Para refinar estos cálculos, se aplicó el protocolo CENSO (Command-line ENergetic Sorting),<sup>42,43</sup> en sus partes 0-3, con el objetivo de clasificar los conformeros en base a su energía libre, empleando distintos niveles de cálculo de coste computacional creciente. Considerando las componentes de la **Ecuación 1** en el cálculo de la energía libre.

$$G_i = E_{i,\text{gas}} + \delta G_{\text{isolv}} + G_{i,\text{trv}}$$

*Ecuación 1. Cálculo de la energía libre de Gibbs.*

Donde:

$E_{i,\text{gas}}$ : Energía total estimada para la especie en fase gas

$\delta G_{\text{isolv}}$ : Energía de solvatación para la sustancia dependiente de la temperatura

$G_{i,\text{trv}}$ : Corrección termoestadística de energía a energía libre a una temperatura dada y teniendo en cuenta las contribuciones asociadas a la traslación-rotación- vibración, e incluyendo además las correcciones de trabajo por unidad de volumen y vibracional de punto cero.

El cálculo de la energía libre se realizó en 4 pasos, cribando aquellos conformeros con una mayor energía libre en cada paso.

Paso 0 (Preselección económica): se calcularon  $E_{i,\text{gas}}$  mediante cálculos de punto simple DFT para todas las estructuras del CC ( nivel B97-D3(0)/def2-SV(P)+gCP). Las demás contribuciones se consideran al nivel de cálculo semiempírico xtb-GFN2/alpb (agua). Se descartan aquellas estructuras por encima de  $\Delta G = 4.0$  kcal/mol.

Paso 1 (Preselección): Se calculan  $E_{i,gas}$  mejoradas mediante cálculos de punto simple DFT para todas las estructuras del CCp0 (en nuestro caso el método compuesto r2scan-3c). Energías de solvatación mejoradas y calculadas mediante cálculos al nivel r2scan-3c/SMD (agua).  $G_{i,trv}$  estimadas xtb-GFN2/alpb(agua). Se descartan aquellas estructuras por encima de  $\Delta G = 3.5$  kcal/mol.

Paso 2 (Optimización): Se optimizan las geometrías de CCp1 al nivel de cálculo r2scan-3c.  $\delta G_{isolv}$  es estimada a nivel DFT mediante puntos simples al nivel r2scan-3c/SMD (acetona).  $G_{i,trv}$  estimadas xtb-GFN2/ALPB(agua). Se conservan aquellas estructuras cuya  $\Delta G$  complete la distribución de Boltzman a la temperatura dada en un 99% ( $\Delta G = 2.5$  kcal/mol)

Paso 3 (Refinamiento): Para una evaluación más precisa de las energías electrónicas estas son calculadas con un funcional híbrido o doble híbrido y un conjunto base suficientemente complejo (en nuestro caso la combinación PW6B96D4/DEF2-TZVP(P))

De esta forma, se obtuvieron los resultados que se recogen en la **Tabla 2**:

<b>Ac<sup>2+</sup> T = 298.15 K</b>					<b>Confórmero más poblado</b>	
<b>crest</b>	<b>censo p0</b>	<b>censo p1</b>	<b>censo p2</b>	<b>censo p3</b>	<b>Confórmero</b>	<b>Población Boltzman</b>
<b>CE1 n° de confórmeros</b>	<b>CE2 n° de confórmeros</b>	<b>CE3 n° de confórmeros</b>	<b>CE4 n° de confórmeros</b>	<b>CE5 n° de confórmeros</b>		
1474	587	168	112	35	ConfA	13.5
<b>Ac<sup>+</sup> T = 298.15 K</b>					<b>Confórmeros más poblados</b>	
<b>CE1</b>	<b>CE2</b>	<b>CE3</b>	<b>CE4</b>	<b>CE5</b>	<b>Confórmero</b>	<b>Población Boltzman</b>
2117	399	59	21	14	ConfA'	40.3
					ConfB'	30.5

## 5. CONCLUSIONES

Los sistemas autoensamblados con capacidad para responder a estímulos externos modificando su agregación, presentan una alternativa interesante a la administración de moléculas de interés biológico. En el presente trabajo se ha reportado la síntesis y caracterización de dos anfífilos pertenecientes a una nueva familia de compuestos, los vermellógenos anfífilicos, con los que poder desarrollar futuras investigaciones. Las conclusiones concretas que se pueden extraer de este trabajo son las siguientes:

1. Se han sintetizado los anfífilos  $\mathbf{Ac}^{2+}$  y  $\mathbf{Al}^{2+}$  empleando una condensación en agua de una sal de piridil hidrazina sustituida con una sal de piridil aldehído sustituido.
2. Se han encontrado evidencias que indican una mayor tendencia a la agregación del compuesto  $\mathbf{Ac}$  al encontrarse desprotonado.
3. Mediante el uso de diversas técnicas de RMN se ha confirmado la formación de un complejo supramolecular entre el compuesto  $\mathbf{Ac}^{2+}$  y el receptor CB[7].
4. Se ha observado una variación en la tendencia a formar el complejo de inclusión con el CB[7] en función del estado de protonación de la molécula  $\mathbf{Ac}^{2+}/\mathbf{Ac}^+$ .
5. Se ha realizado con éxito la caracterización estructural de ambos compuestos en medio orgánico, así como en medio acuoso para  $\mathbf{Ac}^{2+}$  y los complejos de inclusión con CB[7]

## CONCLUSIONS

Self-assembled systems with the capacity to respond to external stimuli by modifying their aggregation are an interesting alternative to the administration of molecules of biological interest. In the present work, the synthesis and characterization of two amphiphiles belonging to a new family of compounds, the amphiphilic red threads, with which to develop future research, has been reported. The specific conclusions that can be drawn from this work are the following:

1. Amphiphiles  $\mathbf{Ac}^{2+}$  and  $\mathbf{Al}^{2+}$  have been synthesized using a water condensation of a substituted pyridyl hydrazine salt with a substituted pyridyl aldehyde salt.
2. Evidence has been found that indicates a greater tendency for compound  $\mathbf{Ac}$  to aggregate when it is deprotonated.
3. Using different NMR techniques, the formation of a supramolecular complex between the  $\mathbf{Ac}^{2+}$  amphiphile and the CB[7] receptor has been confirmed.
4. A variation in the tendency to form the inclusion complex with CB[7] has been observed by changing the protonation state of the  $\mathbf{Ac}^{2+}/\mathbf{Ac}^+$  molecule.
5. The structural characterization of both compounds has been successfully carried out in organic medium, as well as in aqueous medium for  $\mathbf{Ac}^{2+}$  and the inclusion complexes with CB[7].

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Lehn, J. Supramolecular Chemistry—Scope And Perspectives Molecules, Supermolecules, And Molecular Devices(Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed* **1988**, *27*, 89-112.
- (2) Pedersen, C. Cyclic Polyethers And Their Complexes With Metal Salts. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2495-2496.
- (3) Dietrich, B.; Lehn, J.; Sauvage, J. Diaza-Polyoxa-Macrocycles Et Macrobicycles. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 2885-2888.
- (4) Kyba, E.; Helgeson, R.; Madan, K.; Gokel, C.; Tarnowski, T.; Moore, S.; Cram, D.: Host-Guest Complexation 1. Concept And Illustration *Chem. Inf.-Dienst* **1977**, *8*, 2564-2571.
- (5) Harrison, I.; Harrison, S. Synthesis Of A Stable Complex Of A Macrocycle And A Threaded Chain. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5723-5724.
- (6) Schill, G.; Lüttringhaus, A. The Preparation Of Catena Compounds By Directed Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1964**, *3*, 546-547.
- (7) Koumura, N.; Zijlstra, R.; van Delden, R.; Harada, N.; Feringa, B. Light-Driven Monodirectional Molecular Rotor. *Nature* **1999**, *401*, 152-155.
- (8) Steed, J.; Atwood, J. Supramolecular chemistry, 2<sup>nd</sup> Ed.; Wiley: Chichester, Inglaterra, **2009**.
- (9) Cooper, S. R. Crown Compounds: Toward Future Applications. *Anal. Chim. Acta*, **1993**, *279*, 344.
- (10) Stoddart, J. Chapter 12. Host–Guest Chemistry. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. B: Org. Chem.* **1988**, *85*, 353-386.
- (11) Blanco-Gómez, A.; Cortón, P.; Barravecchia, L.; Neira, I.; Pazos, E.; Peinador, C.; García, M. Controlled Binding Of Organic Guests By Stimuli-Responsive Macrocycles. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 3834-3862.
- (12) Cong, H.; Ni, X.; Xiao, X.; Huang, Y.; Zhu, Q.; Xue, S.; Tao, Z.; Lindoy, L.; Wei, G. Synthesis And Separation Of Cucurbit[N]Urils And Their Derivatives. *Chem. Inform.* **2016**, *47*. 4335-4364.

- (13) Mendes, A.; Baran, E.; Reis, R.; Azevedo, H. Self-Assembly In Nature: Using The Principles Of Nature To Create Complex Nanobiomaterials. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnology* **2013**, *5*, 582-612.
- (14) Davis, A.; Yeh, R.; Raymond, K. Supramolecular Assembly Dynamics. *Chem. Inform.* **2010**, *33*, 4793-4796.
- (15) Neira, I.; Blanco-Gómez, A.; Quintela, J.; García, M.; Peinador, C. Dissecting The “Blue Box”: Self-Assembly Strategies For The Construction Of Multipurpose Polycationic Cyclophanes. *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53*, 2336-2346.
- (16) Jesorka, A.; Orwar, O. Liposomes: Technologies And Analytical Applications. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 801-832.
- (17) Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers’ Entry Into The Cell: Relevance To Drug Delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2873-2896.
- (18) Fu, Y.; Kao, W. Drug Release Kinetics And Transport Mechanisms Of Non-Degradable And Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 429-444.
- (19) Odell, B.; Reddington, M.; Slawin, A.; Spencer, N.; Stoddart, J.; Williams, D. Cyclobis(Paraquat-P-Phenylene), A Tetracationic Multipurpose Receptor. *Chem. Inform.* **1989**, *27*, 1547-1550
- (20) Domarco, O.; Neira, I.; Rama, T.; Blanco-Gómez, A.; García, M.; Peinador, C.; Quintela, J. Synthesis Of Non-Symmetric Viologen-Containing Ditopic Ligands And Their Pd(II)/Pt(II)-Directed Self-Assembly. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 3594-3602.
- (21) Takuma, K.; Sakamoto, T.; Nagamura, T.; Matsuo, T. Novel Properties Of The Self-Assembling Amphipathic Viologen System. 1. A Study Of Electron-Exchange Reactions In Micellar Systems. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 619-621.
- (22) Cheng, C.; McGonigal, P.; Schneebeli, S.; Li, H.; Vermeulen, N.; Ke, C.; Stoddart, J. An Artificial Molecular Pump. *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10*, 547-553.
- (23) Cheng, C.; McGonigal, P.; Liu, W.; Li, H.; Vermeulen, N.; Ke, C.; Frasconi, M.; Stern, C.; Goddard III, W.; Stoddart, J. Energetically Demanding Transport In A Supramolecular Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14702-14705.
- (24) Gadde, S.; E. Kaifer, A. Cucurbituril Complexes Of Redox Active Guests. *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 27-38.

- (25) Rauwald, U.; Scherman, O. Supramolecular Block Copolymers With Cucurbit[8]Urils In Water. *Angew. Chem. Int. Ed* **2008**, *47*, 3950-3953.
- (26) Jeon, Y.; Bharadwaj, P.; Choi, S.; Lee, J.; Kim, K. Supramolecular Amphiphiles: Spontaneous Formation Of Vesicles Triggered By Formation Of A Charge-Transfer Complex In A Host. *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4807-4807.
- (27) Mondal, J.; Ahmed, S.; Das, D. Physicochemical Analysis Of Mixed Micelles Of A Viologen Surfactant: Extended To Water-In-Oil (W/O) Microemulsion And Cucurbit[8]Urils-Assisted Vesicle Formation. *Langmuir* **2014**, *30*, 8290-8299.
- (28) Pedrini, A.; Devi Das, A.; Pinalli, R.; Hickey, N.; Geremia, S.; Dalcanale, E. The Role Of Chain Length In Cucurbit[8]Urils Complexation Of Methyl Alkyl Viologens. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, *2021*, 1547-1552.
- (29) Ko, Y.; Hwang, I.; Kim, H.; Kim, Y.; Kim, K. Molecular Pop-Up Toy: A Molecular Machine Based On Folding/Unfolding Motion Of Alkyl Chains Bound To A Host. *Chem. Asian J.* **2014**, *10*, 154-159.
- (30) Blanco-Gómez, A.; Neira, I.; Barriada, J.; Melle-Franco, M.; Peinador, C.; García, M. Thinking Outside The “Blue Box”: From Molecular To Supramolecular Ph-Responsiveness. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10680-10686.
- (31) Vila García, A. Análise biolóxica de sondas mitocondriais de especies osixenadas reactivas baseadas en violóxenos. Trabajo Fin de Grado en Biología, Universidade da Coruña, **2021**.
- (32) Randazzo, A.; Montaña Pedrero, A.; Batalla García, C. Guía práctica para la interpretación de espectros de RMN; Loghia: Nápoles, **2018**.
- (33) Glish, Gary L.; Vachet, Richard W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov.* **2003**, *2*, 140–150.
- (34) Hafez, I.; Ansell, S.; Cullis, P. Tunable Ph-Sensitive Liposomes Composed Of Mixtures Of Cationic And Anionic Lipids. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1438-1446.
- (35) Wheate, N.; Kumar, P.; Torres, A.; Aldrich-Wright, J.; Price, W. Examination Of Cucurbit[7]Urils And Its Host–Guest Complexes By Diffusion Nuclear Magnetic Resonance. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2311-2314.

- (36) Blanco, V.; García, M.; Platas-Iglesias, C.; Peinador, C.; Quintela, J. Dynamic Formation Of Self-Organized Corner-Connected Square Metallochromes By Stoichiometric Control. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6672-6674.
- (37) Pracht, P.; Bohle, F.; Grimme, S. Automated Exploration Of The Low-Energy Chemical Space With Fast Quantum Chemical Methods. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 7169-7192.
- (38) GitHub - grimme-lab/crest: Conformer-Rotamer Ensemble Sampling Tool based on the xtb Semiempirical Extended Tight-Binding Program Package. <https://github.com/grimme-lab/crest> (accessed Jun 28, 2022).
- (39) Bannwarth, C.; Ehlert, S.; Grimme, S. GFN2-Xtb—An Accurate And Broadly Parametrized Self-Consistent Tight-Binding Quantum Chemical Method With Multipole Electrostatics And Density-Dependent Dispersion Contributions. *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, *15*, 1652-1671.
- (40) Ehlert, S.; Stahn, M.; Spicher, S.; Grimme, S. Robust And Efficient Implicit Solvation Model For Fast Semiempirical Methods. *J. Chem. Theory Comput.* **2021**, *17*, 4250-4261.
- (41) Neese, F. Software Update: The ORCA Program System—Version 5.0. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2022**. e1606
- (42) GitHub - grimme-lab/CENSO: CENSO - Commandline ENergetic SORTing of Conformer Rotamer Ensembles. <https://github.com/grimme-lab/CENSO> (accessed Jun 28, 2022).
- (43) Grimme, S.; Bohle, F.; Hansen, A.; Pracht, P.; Spicher, S.; Stahn, M. Efficient Quantum Chemical Calculation Of Structure Ensembles And Free Energies For Nonrigid Molecules. *J. Phys. Chem. A* **2021**, *125*, 4039-4054.

## 7. ANEXOS

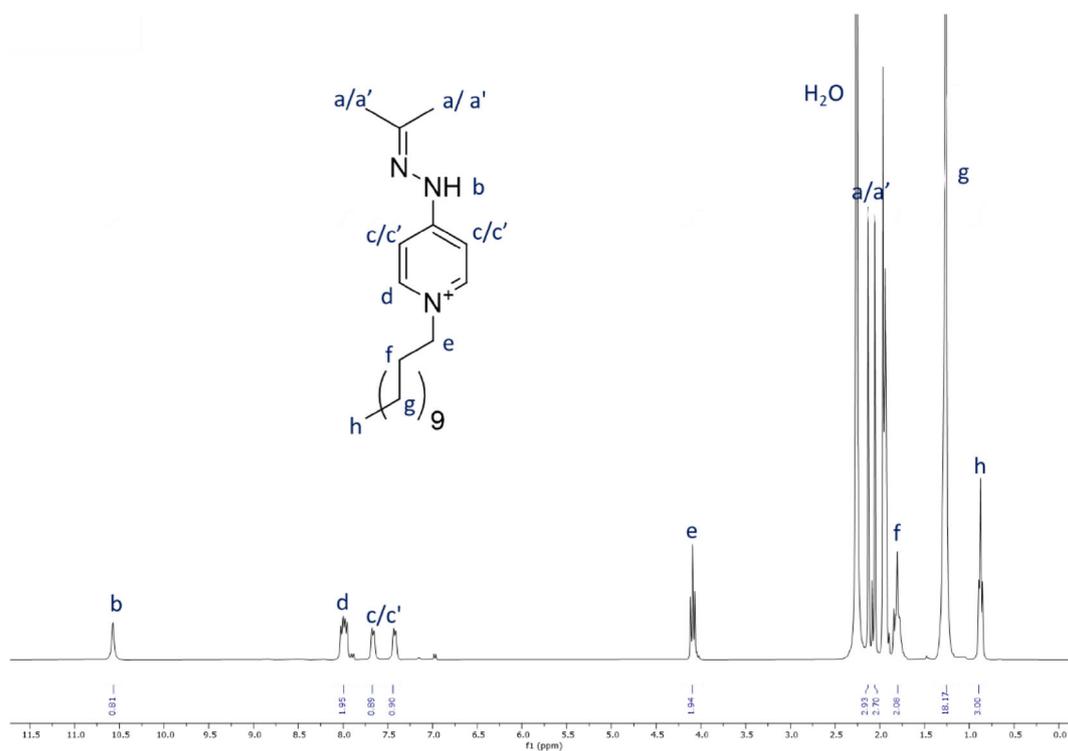


Figura 34. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 3.

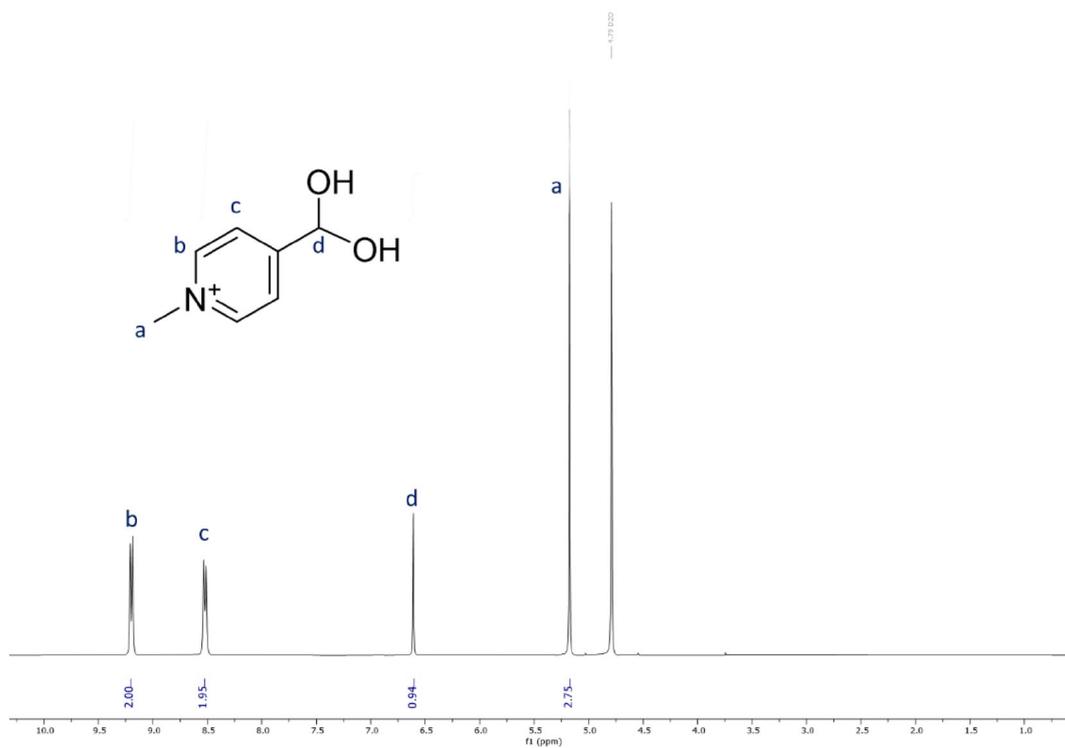
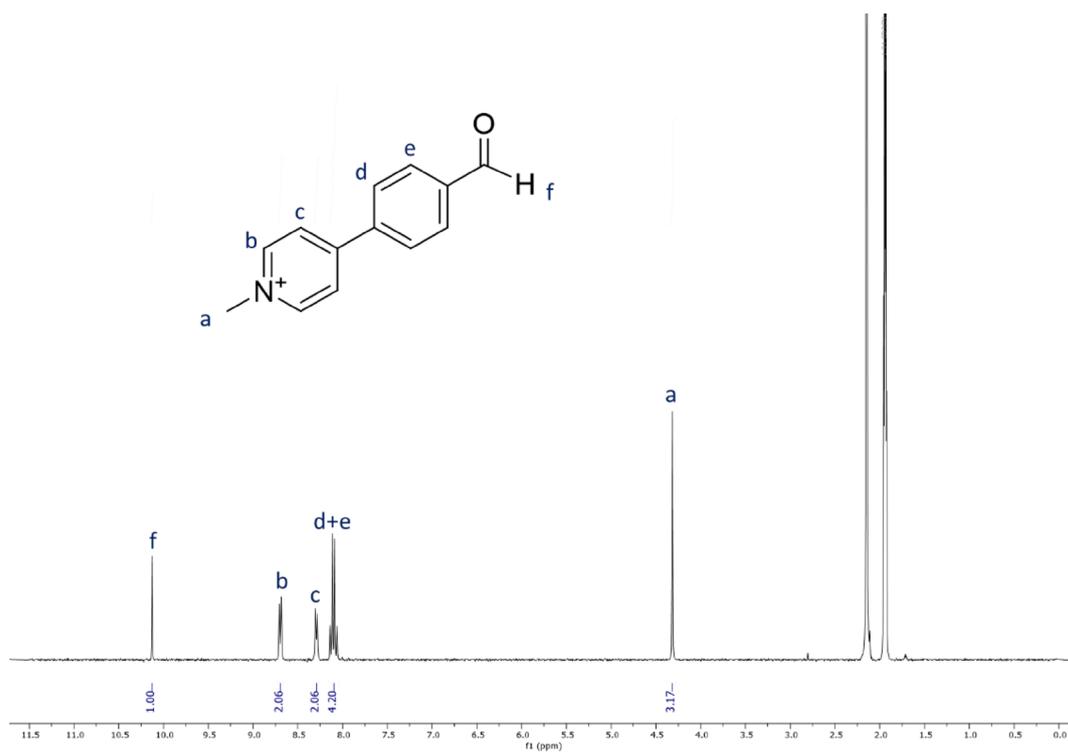
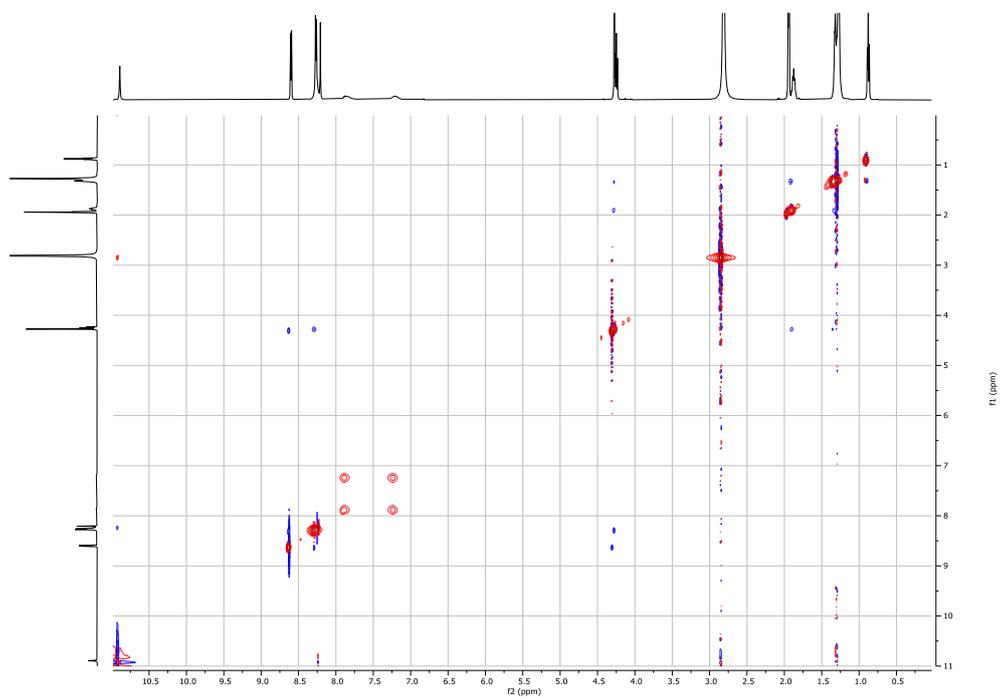


Figura 135. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 4A.



**Figura 36.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **4B**.



**Figura 37.** NOESY del compuesto  $\text{Ac}^{2+}.14$

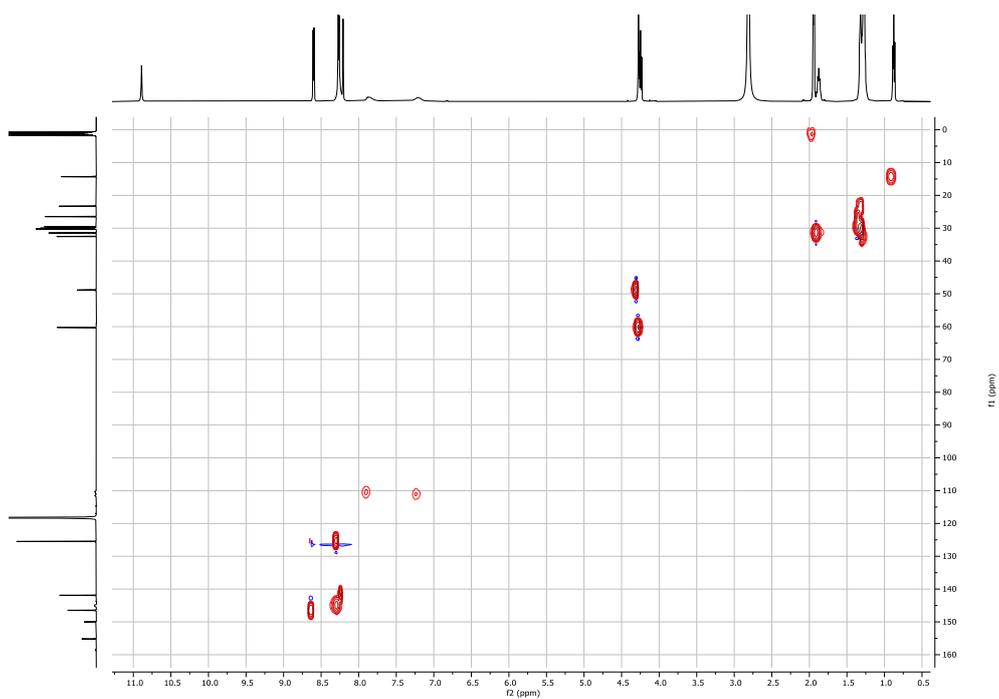


Figura 38. HSQC del compuesto  $Ac^{2+}$ .

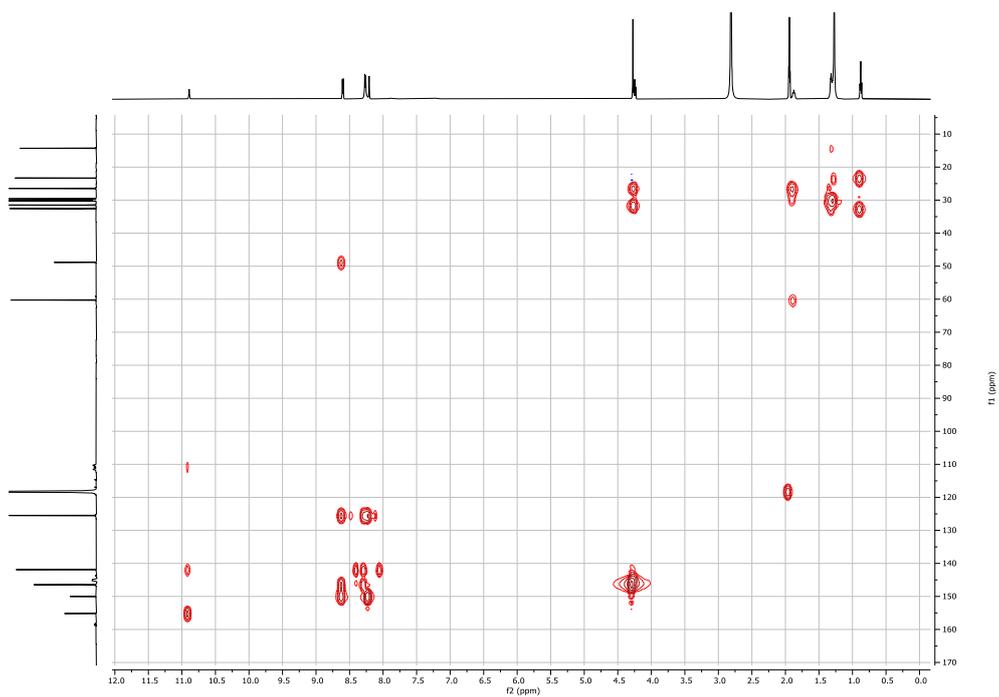
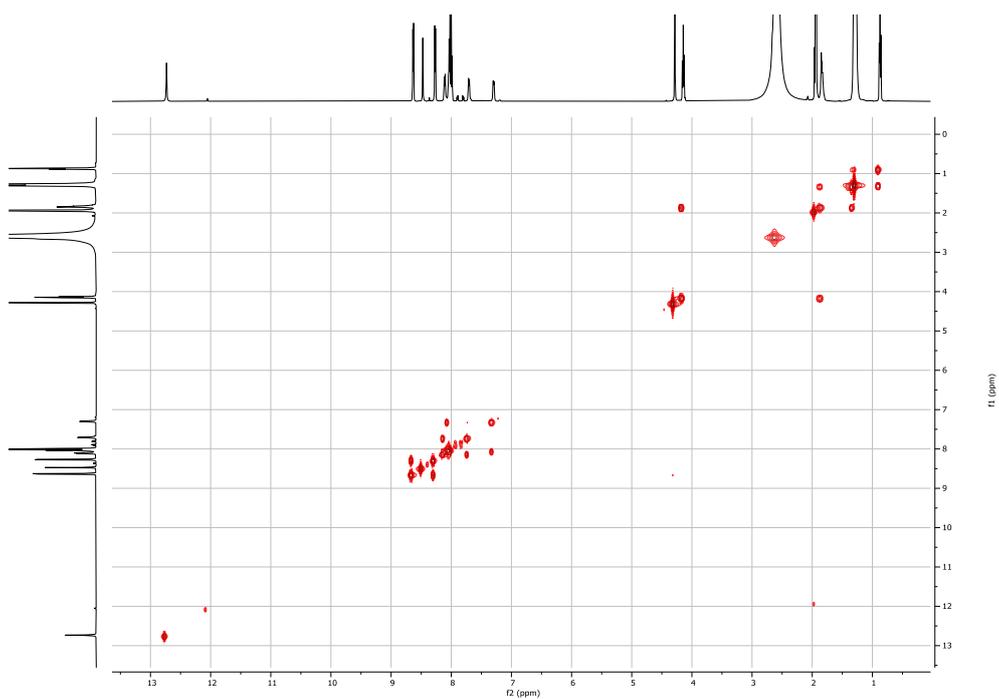
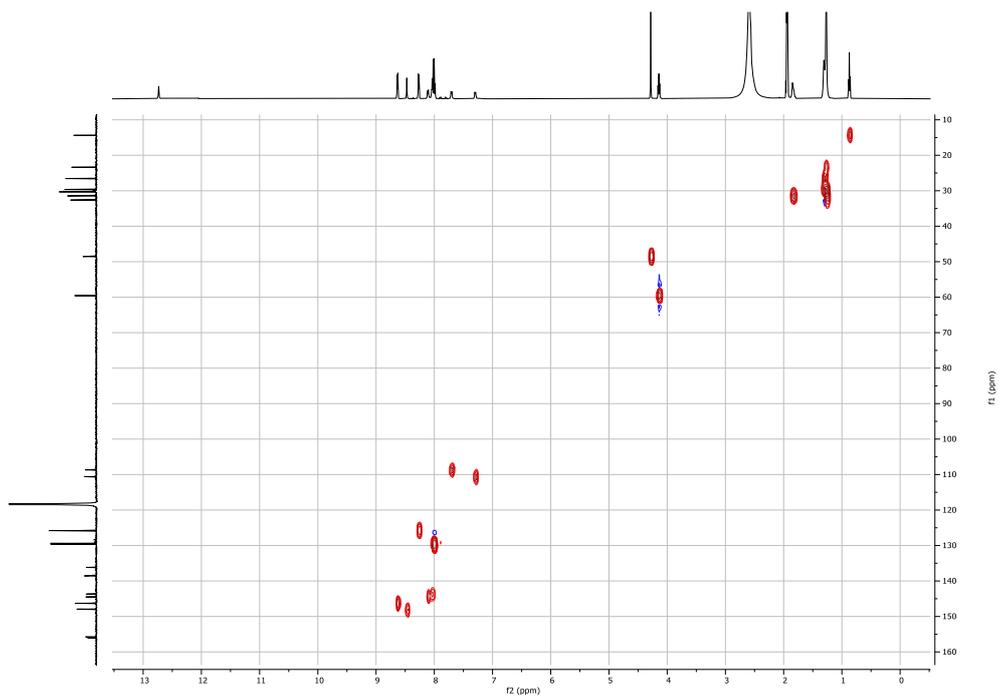


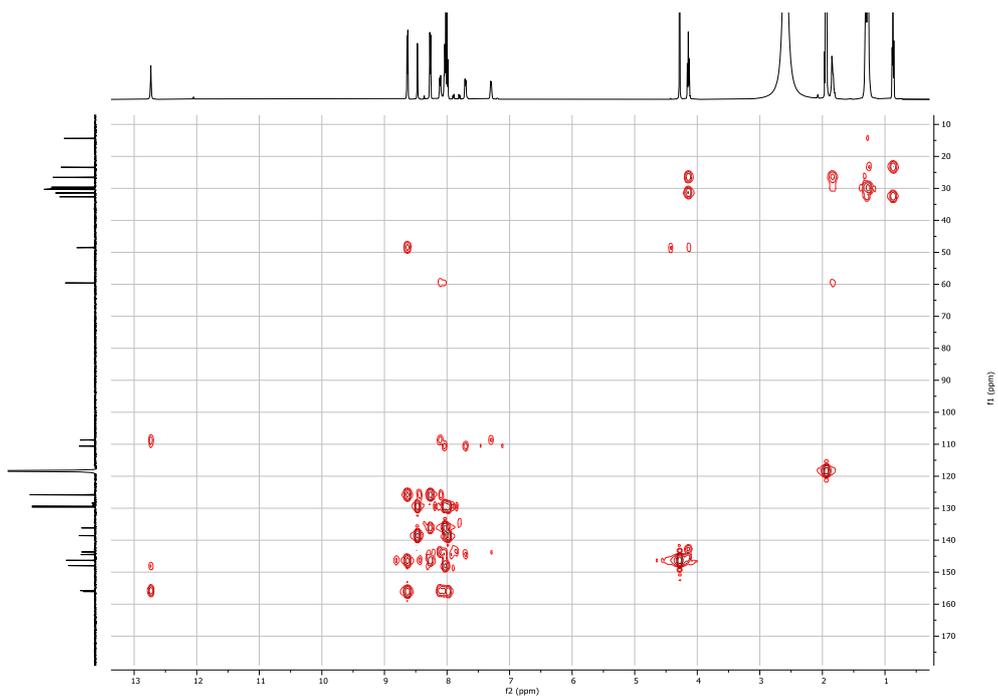
Figura 3915. HMBC del compuesto  $Ac^{2+}$ .



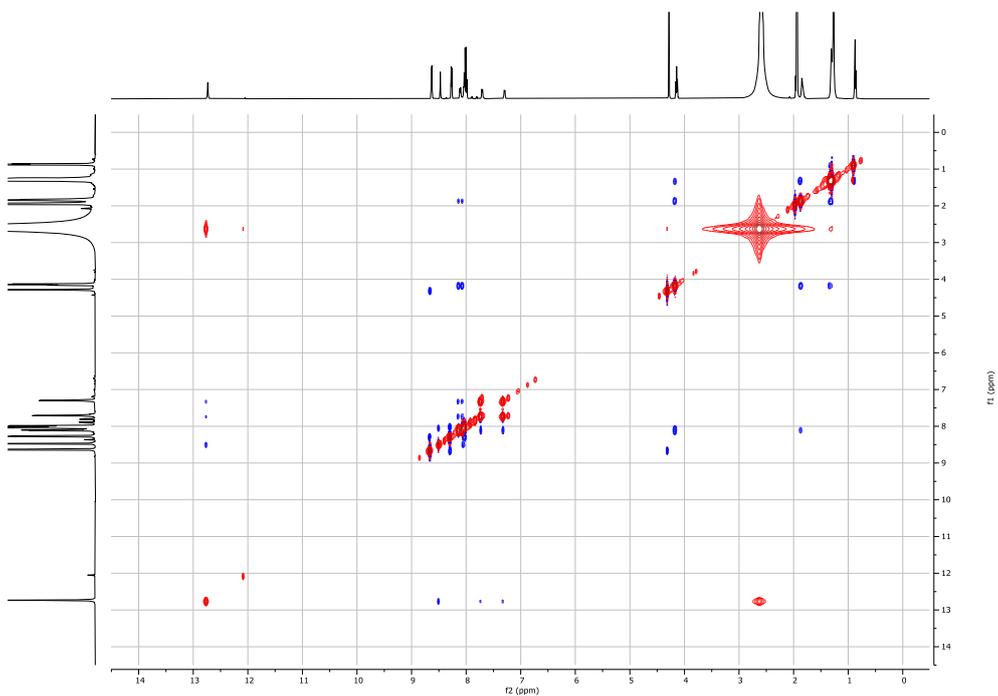
**Figura 40.** COSY del compuesto  $Al^{2+}$ .



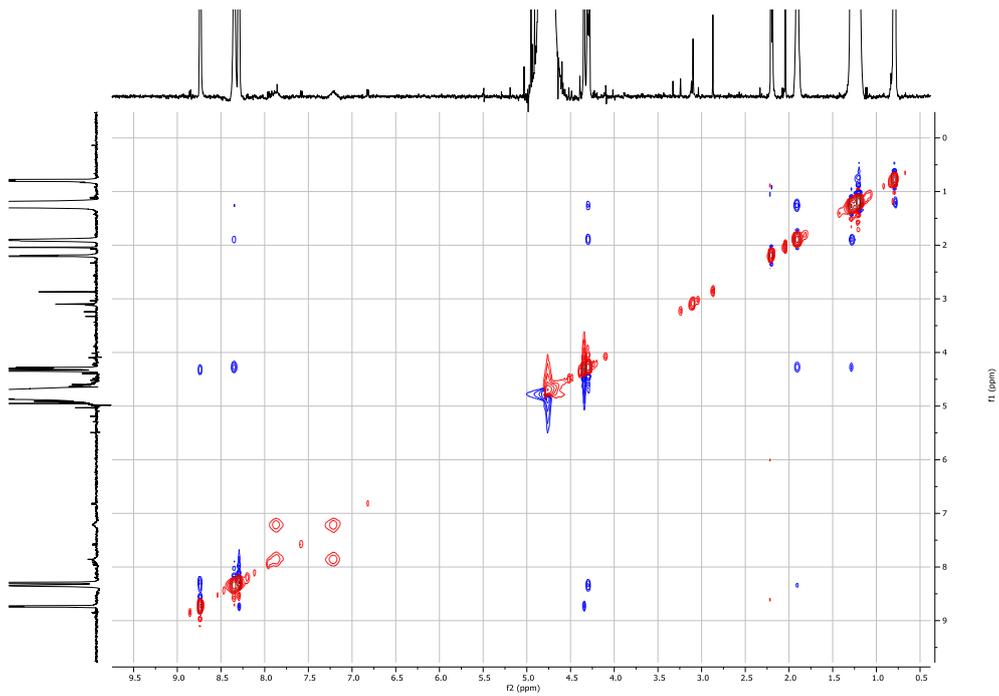
**Figura 41.** HSQC del compuesto  $Al^{2+}$ .



*Figura 42. HMBC del compuesto  $Al^{2+}$ .*



*Figura 43. NOESY del compuesto  $Al^{2+}$ .*



*Figura 44. NOESY del compuesto  $Ac^{2+}$  a  $pD = 7$ .*