



Treball Final de Grau

Metallic pseudopeptidic macrocycles. Study of molecular recognition processes of amino acids.

Macrocles pseudopeptídics metàl·lics. Estudi de processos de reconeixement molecular d'aminoàcids.

Miquel Sintès Marcos

Juny 2014

Aquesta obra esta subjecta a la llicència de:
Reconeixement–NoComercial–SenseObraDerivada



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/>

Genius is one percent inspiration, ninety-nine percent perspiration.

Thomas Alva Edison

REPORT

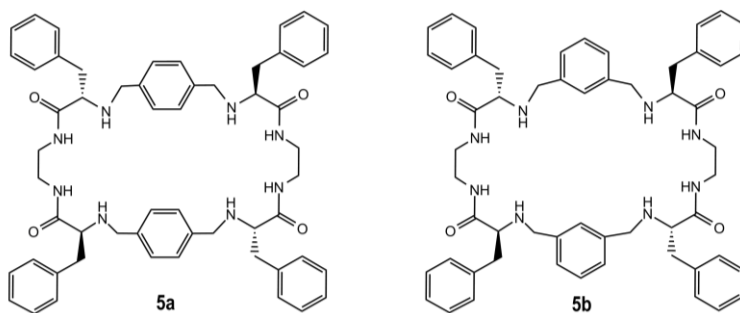
CONTENTS

1. SUMMARY	3
2. RESUM	5
3. INTRODUCTION	7
4. OBJECTIVES	9
5. SÍNTESI DEL MACROCICLE PSEUDOPEPTÍDIC QUIRAL	11
5.1. Esquema de la reacció de macrociclació	11
5.2. Preparació del precursor pseudopeptídic	13
5.2.1. Síntesi de la diamina protegida 6	13
5.2.2. Desprotecció de la diamina	14
5.3. Síntesi de la plantilla aniònica 3	16
5.4. Reacció de macrociclació	17
5.5. Síntesi dels complexos metàl·lics	19
6. RECONeixEMENT MOLECULAR D'AMINOÀCIDS	21
6.1. Escombratge d'aminoàcids	22
6.1.1. Escombratge amb el complex <i>para</i> Cu ₂ 5a	23
6.1.2. Escombratge amb el complex <i>meta</i> Cu ₂ 5b	24
6.2. Estudi dels complexos Cu ₂ 5a i Cu ₂ 5b en presència de L i D Malat	26
6.2.1. Valoracions amb el complex <i>para</i> Cu ₂ 5a	27
6.2.2. Valoracions amb el complex <i>meta</i> Cu ₂ 5b	29
7. EXPERIMENTAL	32
7.1. Instruments i mètodes utilitzats	32
7.2. Síntesi del macrocicle pseudopeptídic 5b	33
7.2.1. Preparació de la diamina protegida amb Cbz 6	33
7.2.2. Desprotecció de la diamina	33
7.2.3. Reacció de macrociclació	34
7.3. Síntesi dels complexos metàl·lics	35

7.3.1. Síntesi del complex <i>para</i> Cu ₂ 5a	35
7.3.2. Síntesi del complex <i>meta</i> Cu ₂ 5b	35
7.4. Estudis de reconeixement molecular	36
7.4.1. Escombratge d'aminoàcids	36
7.4.2. Valoracions individuals de L i D Malat	36
8. CONCLUSIONS	37
9. REFERENCES AND NOTES	39
10. ACRONYMS	41
APPENDICES	
Appendix 1	45
Appendix 2	46

1. SUMMARY

The aim of this work is the synthesis of the chiral pseudopeptidic macrocycle **5b** and its use, together with analogue macrocycle **5a** (Scheme 1) as ligands for Cu^{2+} , in molecular recognition processes of amino acids. The two dinuclear complexes will be used as receptors in molecular recognition processes.



Scheme 1. Pseudopeptidic macrocycles studied in this work.

The synthesis of the [2+2] pseudopeptidic macrocycle through a reductive amination is carried out by using an anionic template which places the four subunits in the right orientation for their union. The obtained product is characterized by ESI-MS and NMR. Copper complexes are prepared starting with the *meta* macrocycle and its *para* analogue. The resulting products are characterized by ESI MS.

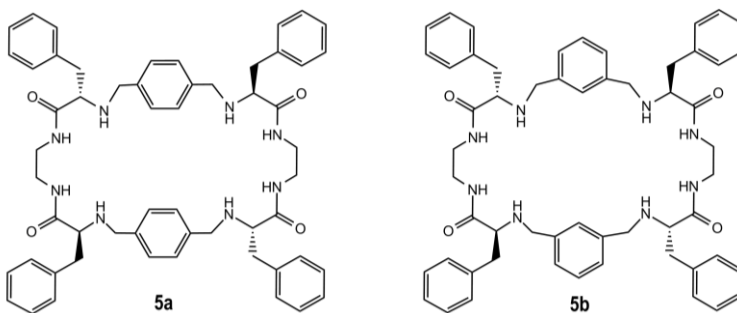
A comparative study of many amino acids and analogues behavior with the two macrocyclic complexes is carried out by UV-Vis spectrophotometry. After that, recognition tests are made with the two possible Malate isomers and association constants values are calculated for both isomers with macrocyclic copper complex.

A small selectivity between isomers is observed for L-malate by macrocycle **5b** complex. For the case of macrocycle **5a** complex, the response is the same for L and D malate.

Keywords: Molecular recognition, pseudopeptides, macrocycles, metal complexes, supramolecular chemistry, amino acids.

2. RESUM

L'objectiu d'aquest treball és la síntesi del macrocicle pseudopeptídic quiral **5b** i el seu ús, juntament amb l'anàleg, el macrocicle **5a** (Esquema 1) com a lligands de Cu^{2+} , en processos de reconeixement molecular d'aminoàcids. Els dos complexos dinuclears seran utilitzats com a receptors en processos de reconeixement molecular.



Esquema 1. Macrocicles pseudopeptídics estudiats en aquest treball.

La síntesi del macrocicle pseudopeptídic [2+2] mitjançant una aminació reductiva es porta a terme utilitzant una plantilla aniònica que dirigeix les quatre subunitats en la correcta orientació per la seva unió. El producte obtingut es caracteritza per ESI-MS i RMN. A partir del macrocicle *meta* obtingut i el seu anàleg *para* es sintetitzen els corresponents complexos de coure. Es caracteritzen els productes obtinguts per ESI-MS.

Es fa un estudi comparatiu del comportament de diversos aminoàcids i anàlegs amb els dos complexos macrocíclics mitjançant espectrofotometria de UV-Vis. Posteriorment es fan proves de reconeixement amb els dos possibles isòmers de malat i es calculen els valors de les constants d'associació d'aquests amb els complexos macrocíclics de coure.

S'ha observat una petita selectivitat entre isòmers a favor del L-malat per part del complex del macrocicle **5b**. Per el cas del complex del macrocicle **5a** la resposta és igual tant per L com per D malat.

Paraules clau: Reconeixement molecular, pseudopèptids, macrocicles, complexos metàl·lics, química supramolecular, aminoàcids.

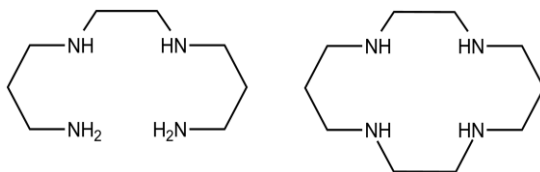
3. INTRODUCTION

Supramolecular chemistry refers to the domain of chemistry that focuses on non-covalent interactions between molecules which leads to larger species with an organized structure. These interactions are weak forces as hydrogen bonds, Van der Waals forces, π - π interactions and hydrophobic effects^[1]. Structures formed thanks to these forces are thermodynamically less stable, kinetically labile and more flexible, and the parts that join together must be complementary to each other.

One of the most important issues in supramolecular chemistry is molecular recognition. It is based on complementarity of two parts: host and guest. It is necessary a perfect geometrical adjust between the two species in order to achieve a good union^[2]. When a host has a stronger binding with one guest than with others, it is said that it is selective toward the guest. Then, molecular recognition is a process involving both binding and selection of substrates by a given receptor molecule^[1].

The development of supramolecular chemistry has led to synthesis of host compounds for a manifold of substrates. Complexation of natural products with such artificial receptors is under active development and is of considerable theoretical and practical interest. Taking the nature as an example, macrocyclic natural products have often biological activity, and many of these compounds (or their derivatives) are used as drugs^[3].

The reason why these natural compounds have interesting properties in nature is the macrocyclic effect. Macrocyclic effect refers to the higher thermodynamically stability of the macrocyclic systems in front of the opened analogues. When a complexation with the system occurs, entropic and enthalpic effects make the formed structure more stable. For example, it is observed that the Zn (II) complex of the macrocycle in scheme 2 is significantly more stable than the complex of the open analogue^[4]. This shall be discussed in section 6.



Scheme 2. Acyclic and macrocyclic aza-ligands^[4].

Previously, macrocyclic dicopper complexes have been used for molecular recognition^[5] and transport across membranes^[6] of amino acids. The distance between the two metallic atoms is key in this sort of recognition because the amino acid molecule binds to both coordination sites and a favorable interaction of the two parts depends on the amino acid chain length.

Many studies about pseudopeptidic macrocycles have been carried out, and they have shown that these molecules can be modified in order to further restrict their conformation. Modifications include the use of unnatural amino acids^[7], the incorporation of N-methylated substituents^[8] or the use of aromatic rings in the macrocyclic ring^[9]. For that reason pseudopeptidic macrocycles are useful in molecular recognition and can act as receptors for small molecules and ions.

4. OBJECTIVES

The goal of this work is to synthesize a chiral pseudopeptidic macrocycle by using an anion template as method to achieve a good yield in the macrocyclization reaction. Further objectives are the preparation of copper (II) complexes of the two macrocycles named above (**5a** and **5b**) and use them as molecular receptors in a study of molecular recognition of amino acids.

The metallic derivatives will be used to investigate if selective unions between different amino acids are observed, as well as between stereoisomers. The effect of the distance between the two coordination centers will be studied by changing the complex receptors, whose variation in the aromatic spacer (*meta* and *para* substitution of the aromatic ring) causes a different separation of the coordination sites.

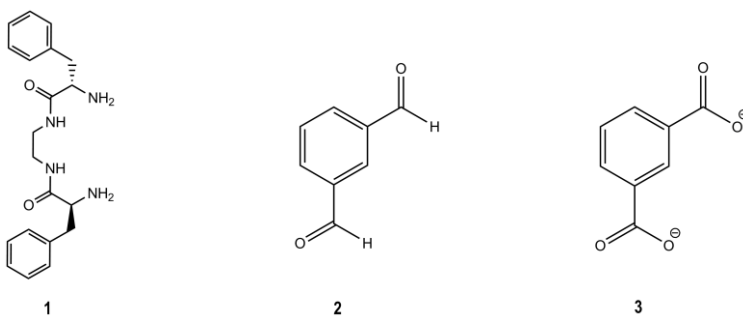
5. SÍNTESI DEL MACROCICLE PSEUDOPEPTÍDIC

L'etapa decisiva en l'obtenció de macrocicles pseudopeptídics, és la reacció de macrociclació^[10]. Sovint, en aquest pas sorgeixen problemes com l'oligomerització o polimerització, cosa que provoca una disminució important del rendiment i complicacions posteriors en el processos de purificació. S'ha vist que les condicions d'alta dilució no són una opció viable ja que ocorren altres reaccions laterals que condueixen a un rendiment final molt baix^[11]. L'elevada energia d'activació d'aquest tipus de reaccions és deguda a la distància que existeix entre els extrems de la molècula que generaran el cicle. Apropant-los en una conformació preorganitzada contribuirà a que la ciclació sigui més ràpida i eficient^[12].

En el nostre cas, s'utilitzarà una plantilla aniònica^[13] en forma de dicarboxilat per col·locar el nostre sistema en una disposició apta per a la posterior ciclació. El *modus operandi* de la plantilla és a través d'enllaços d'hidrogen, molt comuns en pèptids i proteïnes com a causants de les estructures secundàries i terciàries d'aquests.

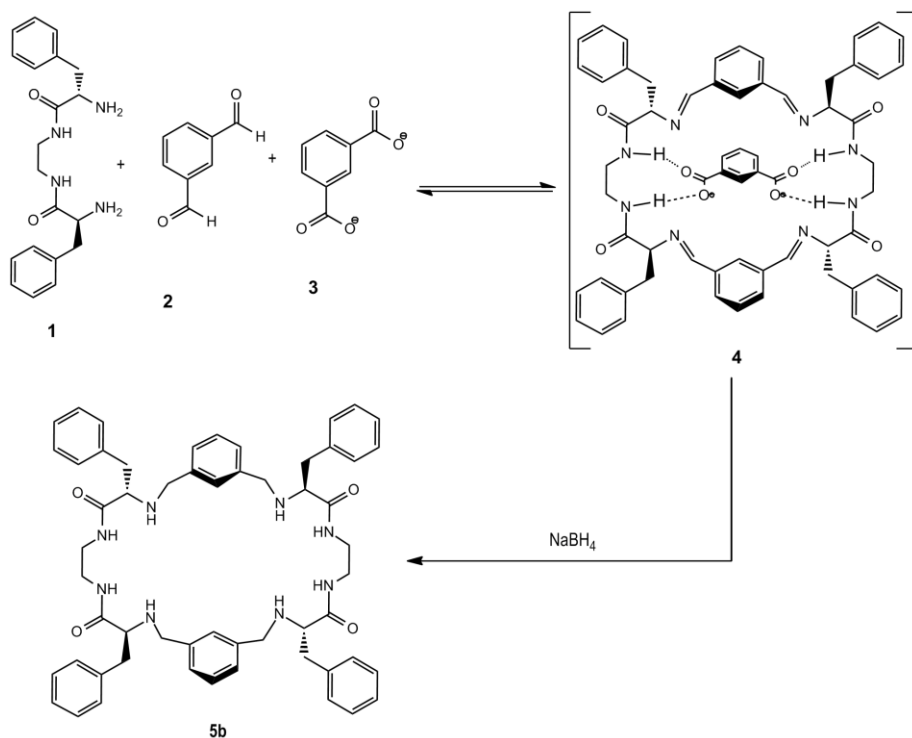
5.1. ESQUEMA DE LA REACCIÓ DE MACROCICLACIÓ

El macrocicle que es vol sintetitzar consisteix en la unió [2+2] de dues unitats del pseudopèptid **1** assemblades per dues molècules de dialdehid **2** (Esquema 3) mitjançant una aminació reductiva.



Esquema 3.

L'aproximació i preorganització del sistema per l'adequada síntesi del macrocicle es porta a terme gràcies a la presència al medi de la plantilla isoftalat **3** (Esquema 1) en forma de sal de tetrabutilamoni (TBA) que, a través de les interaccions d'apilament π - π dels anells aromàtics i enllaços d'hidrogen entre els carboxilats i amides, condueix a la formació de l'intermedi tetraimínic **4**^[1] (Esquema 4).



Esquema 4. Resum de la reacció de macrociclació.

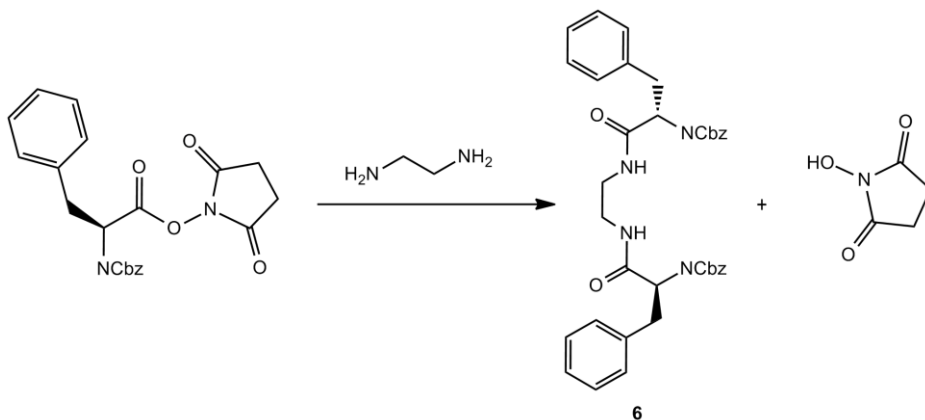
La formació de **4** es veu afavorida tant cinèticament com termodinàmicament per la presència de la plantilla, ja que, l'efecte estabilitzant de les interaccions anomenades anteriorment no només afecta a l'estat de transició sinó també a la pròpia tetraimina resultant **4**. L'últim pas per obtenir el macrocicle desitjat és la reducció dels grups imino a amina utilitzant borhidruir de sodi.

5.2. SÍNTESI DEL PRECURSOR PSEUDOPEPTÍDIC

L'obtenció del precursor consta de dos passos: la preparació de la unitat que conté els grups amina protegits i la seva posterior desprotecció per tal que puguin reaccionar amb l'aldehid en l'etapa de ciclació.

5.2.1. Síntesi de la diamina (2S)-2-amino-N-{2-[(2S)-2-amino-3-fenilpropanamido]etil}-3-fenilpropanamida protegida, **6**.

L'èster d'hidroxisuccinimida de la Cbz-N- fenilalanina i etilendiamina es fan reaccionar amb una relació molar 2:1 en THF anhidre (Esquema 5). La reacció es deixa durant 24 hores en atmosfera inert i agitació constant. Una vegada finalitzat el temps de reacció es filtra el sòlid i, després d'assecar-lo be, es caracteritza per RMN de ¹H (Figura 1).



Esquema 5.

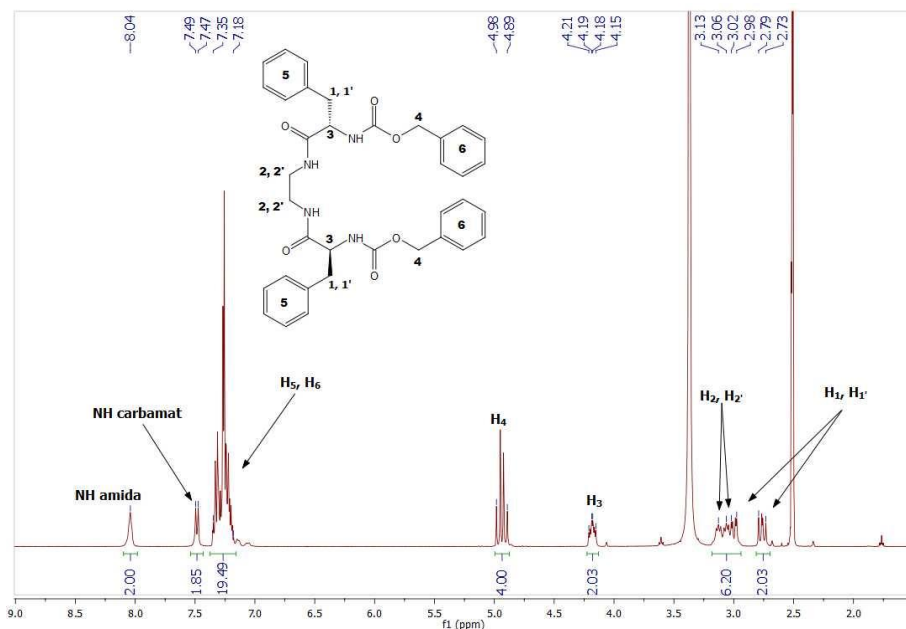
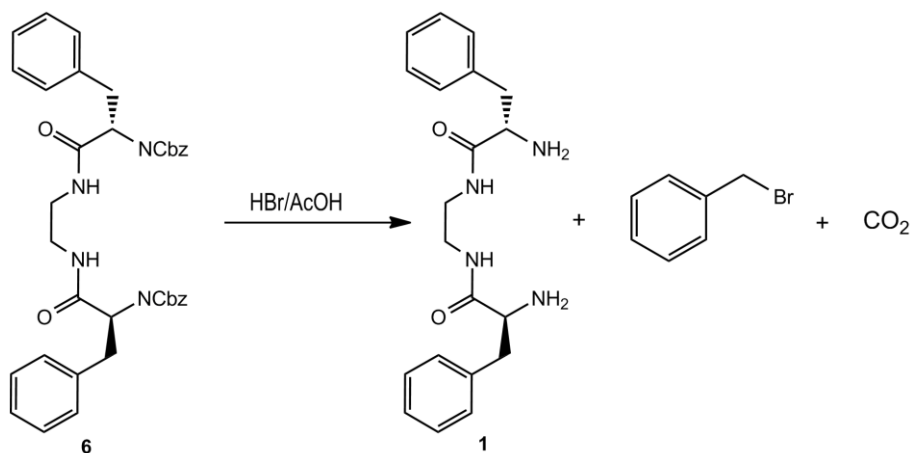


Figura 1. Espectre RMN de ^1H de la diamina protegida en DMSO-d_6 . (400 MHz, 298 K)

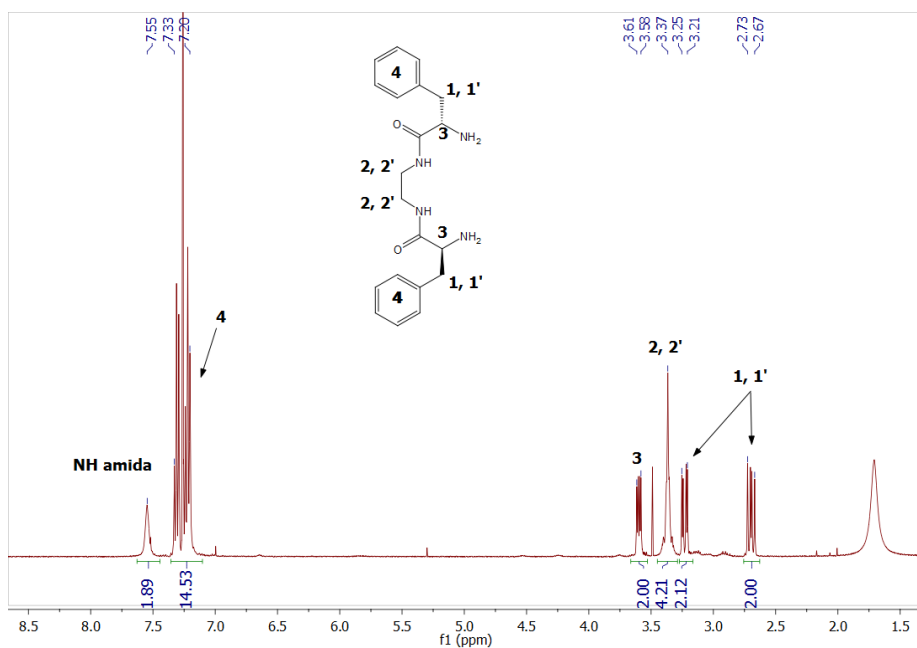
Com es pot observar, el producte s'ha sintetitzat correctament, de manera que es segueix amb la seva desprotecció per utilitzar-lo posteriorment com a precursor en la formació de macrocicles pseudopeptídics.

5.2.2. Desprotecció del precursor

La reacció de desprotecció s'efectua tractant la diamina protegida **6** obtinguda anteriorment amb un excés de HBr/AcOH mantenint agitació constant durant 30 minuts (Esquema 6). Un cop finalitzat el temps es tracta la mescla de reacció per aïllar la diamina **1** dels altres subproductes obtinguts. Es caracteritza el producte per RMN de ^1H (Figura 2).



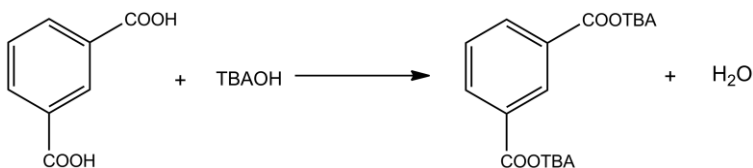
Esquema 6. Reacció de desprotecció del grup Cbz.

Figura 2. Espectre RMN de ^1H de la diamina desprotegida en CDCl_3 . (400 MHz, 298 K)

Es conclou que el precursor es apte per utilitzar-lo en la reacció de macrociclació.

5.3. SÍNTESI DE LA PLANTILLA ANIÒNICA 3

L'isofalcat de tetrabutilamoni havia estat preparat amb anterioritat al laboratori. El procediment seguit per obtenir-la és una reacció àcid base entre l'hidròxid de tetrabutilamoni (TBA) i l'àcid isoftàlic, en una relació molar 2:1 (Esquema 7). Es va enregistrar un espectre de RMN de ^1H de la plantilla per comprovar que estigués en bon estat (Figura 3).



Esquema 7.

Els senyals 5-7 (Figura 3) que es troben entre 7 i 9 ppm corresponen als protons de l'anell aromàtic. A desplaçaments químics més baixos es veuen els pics corresponents a les cadenes alquíliques del TBA; les senyalades com a 2, 3 i 4 fan referència als metilens i la 1 al metil.

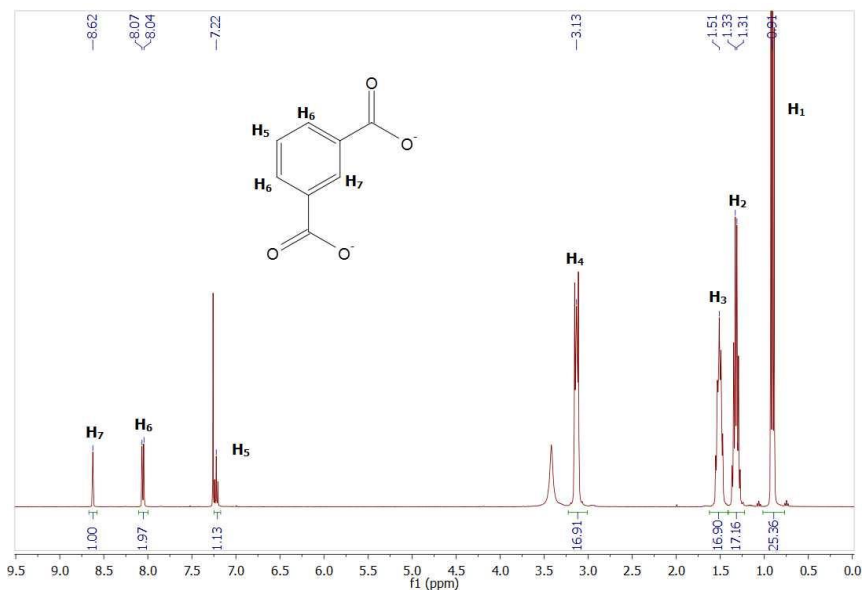


Figura 3. Espectre RMN de ^1H plantilla 3 en CDCl_3 . (400 MHz, 298 K)

5.4. REACCIÓ DE MACROCICLACIÓ

El precursor pseudopeptídic **1** juntament amb el dialdehid **2** i la plantilla aniònica **3** es fan reaccionar en relació molar 2:1:2 durant 24 hores en metanol i sota atmosfera inerta. S'ha observat l'aparició d'un sòlid de color groc insoluble en un gran nombre de dissolvents. Una vegada finalitzada la reacció, s'afegeix un excés de borhidruir de sodi per reduir els grups imina i, passades 24 hores s'acidifica el medi amb HCl concentrat per hidrolitzar el sistema. Posteriorment s'extreu el producte, s'asseca i s'evapora el dissolvent a sequedat. S'obté un oli groc.

L'anàlisi per cromatografia de capa fina de l'oli resultant de la reacció que indica que el producte no és pur i es procedeix a purificar-lo amb una columna de sílice flash fent servir CH₂Cl₂:MeOH (30:1) com a eluent. S'enregistra un espectre de masses que revela que s'ha format el macrocicle desitjat de forma pura i no conté el producte d'adició [3+3] com s'havia observat en intents previs realitzats al grup de recerca (Figura 4).

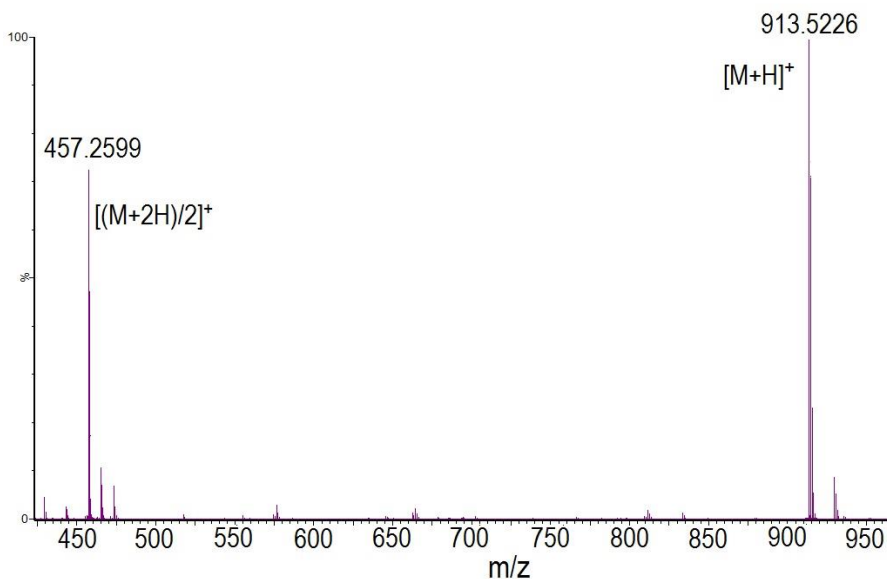


Figura 4. Espectre de masses del macrocicle **5b**.

Els principals pics que s'observen en la figura 4 corresponen al macrocicle [2+2] monoprotonat (913.518) i al diprotonat, que té una m/z menor a causa de tenir el doble de càrrega (457.261). Si en la mostra estes present el producte d'addició [3+3] es veuria, apart dels dos senyals esmentats, un pic a 685 $[(M_{(3+3)}+2H)/2]^{2+}$ i un altre a 1369 $[M_{(3+3)}+H]^+$.

L'anàlisi per HPLC (paral·lelament a l'anàlisi d'una referència de macrocicle sintetitzat del que es disposa al laboratori) indica que el producte no conté impureses (Annex 1). Es caracteritza el producte per RMN de 1H , dissolt en $CDCl_3:CD_3OD$ (7:2) per tal d'evitar la formació d'agregats (Figura 5).

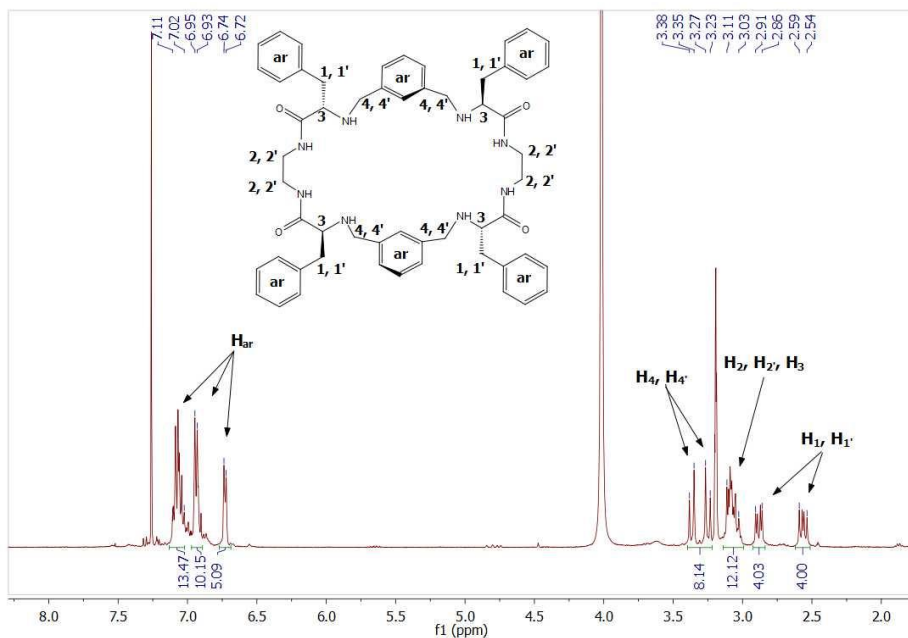
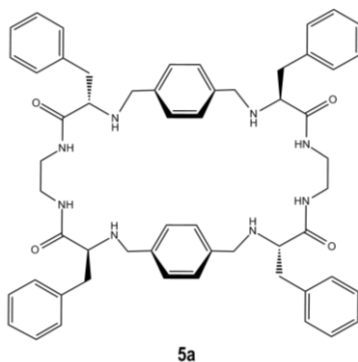


Figura 5. Espectre RMN de 1H del macrocicle **5b** en $CDCl_3:CD_3OD$.

Com es pot veure, el compost està pur i es considera apte per utilitzar-lo en la preparació dels complexos metàl·lics de la següent part. El rendiment (11%) ha estat baix ja que es creu existeixen reaccions paral·leles de polimerització de les unitats reactives formant cadenes enlloc de cicles. Això explicaria la formació del sòlid groc durant la reacció.

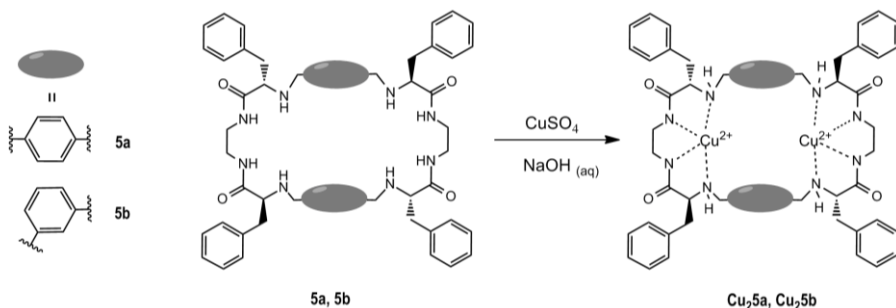
5.5. SÍNTESI DELS COMPLEXOS METÀL·LICS

En aquesta segona part de la síntesi, es preparen dos complexos metàl·lics de coure utilitzant com a lligand el macrocicle **5b** i l'isòmer d'aquest, el macrocicle **5a** (Esquema 8) del stock de que es disposa al laboratori.



Esquema 8.

La complexació del coure per part del macrocicle depèn del pH, com s'ha observat en estudis anteriors d'aquest tipus de compostos pseudopeptídics. Si el medi no és suficientment bàsic com per desprotonar els grups amida, el coure es veu complexat per els parells lliures de l'oxigen carbonil enlloc que per l'amida protonada^[14]. Per tal de poder actuar com a receptor a dins del macrocicle, és interessant que el coure estigui coordinat a través del nitrogen dels grups amida i amina. Per aconseguir-ho s'ha de portar a terme una reacció en medi bàsic (Esquema 9).



Esquema 9.

El color de la solució, que inicialment és blau gràcies al coure (II) en solució, canvia a lila a mida que s'afegeix la base, cosa que indica que el coure està sent complexat per el lligand macrocíclic. Posteriorment s'aïlla el complex format centrifugant la mescla de reacció. Amb això s'aconsegueix separar el complex, que està dissolt en metanol, del precipitat de NaSO_4 format durant la reacció.

Es pot veure a la figura 6 l'espectre de masses del complex $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$.

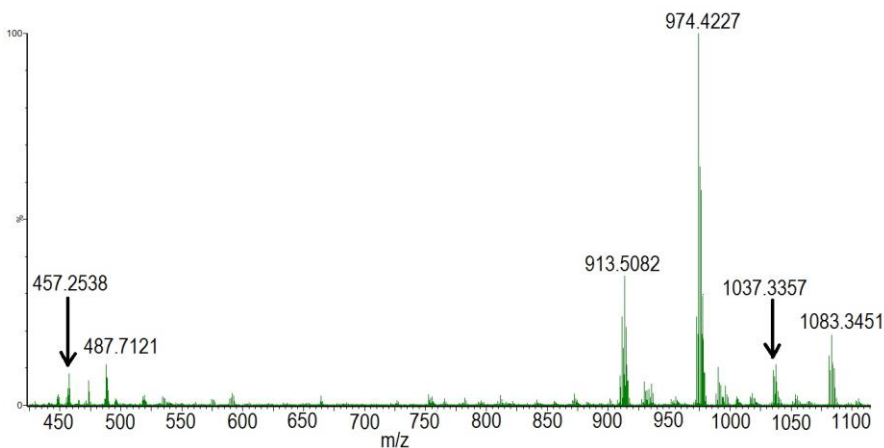


Figura 6. Espectre de masses ESI-TOF del complex $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$ en metanol.

El pic a 1037,3357 correspon al complex $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$ monoprotonat, mentre que el de 974,4227 representa el macrocicle complexant un coure. La protonació dels grups amidur i la conseqüent descomplexació d'un dels ions coure es pot haver donat a causa de les condicions àcides de ionització. És per això que també es poden observar els senyal a 913.5082 i a 457.2538 (com s'ha vist a l'apartat anterior), del macrocicle sense cap àtom de coure. El a 487.7121 fa referència a la forma diprotonada del complex amb només un sol àtom de coure. El senyal a 1083.3451 correspon al complex $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$ juntament amb àcid fòrmic. L'espectre del complex $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$ conté els mateixos senyals i es pot consultar a l'apèndix 1.

Els espectres de masses mostren que els complexos s'han sintetitzat correctament, de manera que es podran utilitzar per les proves de reconeixement molecular amb aminoàcids.

6. RECONeixEMENT MOLECULAR D'AMINOÀCIDS

Els lligands cíclics són habituals en la natura i generalment més bons complexants que els seus anàlegs oberts a causa de l'efecte macrocíclic. L'efecte macrocíclic fa referència a l'estabilitat termodinàmica d'aquests sistemes gràcies a contribucions entròpiques i entàlpiques. Quan una molècula del lligand polidentat coordina un ió, es produeix un desplaçament de diverses molècules de dissolvent, amb el consegüent augment d'entropia que això implica. L'efecte entròpic succeeix tant en sistemes oberts com en cicles, i la diferència d'estabilitat recau en el factor entàlpic. Per produir-se una complexació efectiva, el lligand obert ha d'adoptar una conformació adequada, mentre que el cicle ja està preorganitzat. En el cas del lligand acíclic es requereix més energia per adquirir la conformació correcta que per el macrocicle. A part de l'estabilitat del complex format, els macrocicles com a amfitrions selectius tenen un valor afegit, ja que la seva conformació està restringida. Si això no fos així, el receptor seria capaç d'interaccionar amb una gran varietat de substrats gràcies a la seva llibertat conformacional.

Com s'ha explicat abans, fent reaccionar la sal de coure (CuSO_4) i el macrocicle en medi bàsic s'aconsegueix formar un sistema dinuclear. Inclouent en una mateixa molècula dos centres metàl·lics es pot afavorir una major interacció per part dels aminoàcids que contenen dos àtoms coordinants. Una diferència és entre dos complexos sintetitzats, que també pot ser motiu de selectivitat, és la distància dels dos centres metàl·lics. En el cas del macrocicle **Cu₂5a**, aquests estan a una distància major que en el cas del **Cu₂5b**, degut a la diferent substitució dels espaiadors (anells aromàtics en substitució *para* o *meta*).

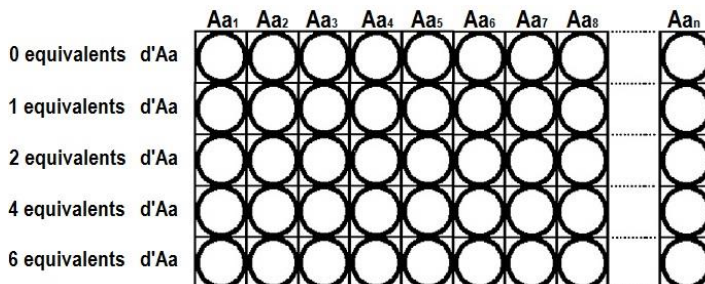
L'objectiu d'aquesta part del Treball de Fi de Grau és l'estudi dels processos de reconeixement molecular d'aminoàcids i anàlegs d'aminoàcids a partir dels complexos macrocíclics sintetitzats; **Cu₂5a** i **Cu₂5b**. Els aminoàcids utilitzats han estat; Glicina, L-Prolina, L-Histidina, L-Lisina, Àcid L i D Glutàmic, Àcid L i D Aspàrtic, L-Triptòfan, L-Alanina, L-Fenilalanina, L-Metionina, L-Serina, L-Aspargina i β -Alanina. També s'han inclòs en l'estudi l'Àcid L i D Màlic.

Amb els següents experiments es vol aconseguir observar diferent selectivitat entre els substrats anomenats i entre els complexos de coure que actuaran com a receptors.

6.1. ESCOMBRATGE D'AMINOÀCIDS.

Els espectres electrònics dels complexos de coure sintetitzats presenten bandes d-d a la zona de l'espectre visible, que són les responsables del color lila del complex. La intensitat i la posició d'aquestes bandes són sensibles al mode de coordinació del sistema, de manera que es veuen afectades per un canvi de lligand^[15]. Per aquest motiu, és possible fer l'estudi de reconeixement molecular mitjançant l'espectroscòpia d'ultraviolat-visible.

L'experiment d'escombratge consisteix en enregistrar simultàniament l'espectre d'absorció d'ultraviolat-visible del complex de coure amb diferents quantitats de cada aminoàcid o molècula d'interès. Les lectures s'efectuen en una placa de pous com la que està il·lustrada a l'esquema 10.



Esquema 10.

El que permetrà aquest experiment d'escombratge és poder fer una comparació representativa de la interacció dels potencials hosts amb els complexos Cu₂5a i Cu₂5b. Posteriorment, es portarà a terme un estudi més profund dels que presentin una millor associació amb els complexos amfitrió.

6.1.1. Escombratge d'aminoàcids i anàlegs amb el complex *para* Cu₂5a

L'espectre d'absorció del complex Cu₂5a presenta una banda de transferència de càrrega a longituds d'ona inferiors a 350 nm i una banda corresponent a transicions d-d a 524 nm^[14]. La intensitat de la segona decreix quan s'afegeix aminoàcid o la molècula d'interès al complex i apareix una nova banda d'intensitat més baixa a majors longituds d'ona. En la figura 7 es representa la variació absoluta de l'absorbància normalitzada a 524 nm. No estan presents tots els aminoàcids i anàlegs anomenats anteriorment ja que en les mesures d'alguns d'ells es formava un precipitat i els valors d'absorbància obtinguts eren incoherents.

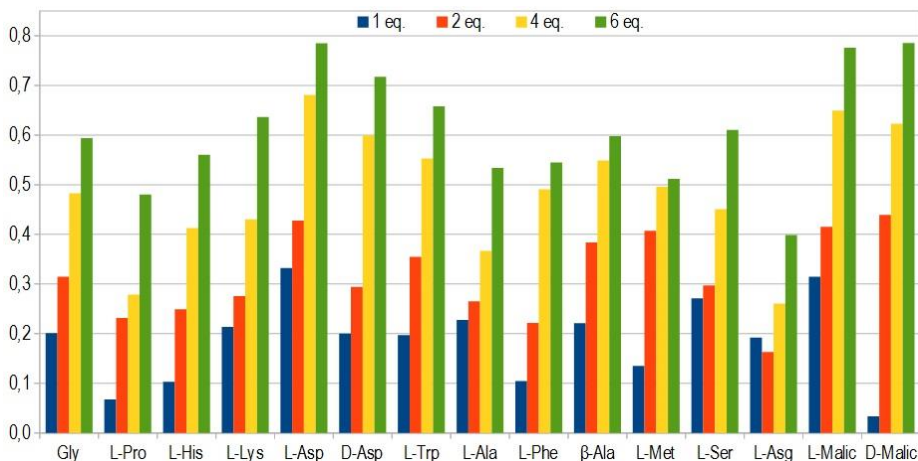


Figura 7. Disminució de l'absorbància a 524 nm de l'espectre de Cu₂5a amb diferents quantitats de cada hoste.

La disminució de la banda a 524 nm i l'augment de la banda a 650 implica un canvi de color en la solució, de lila a blau clar. Aquest canvi es pot apreciar a la figura 8, on es mostra una fotografia de la placa on es va enregistrar l'escombratge del complex Cu₂5a.

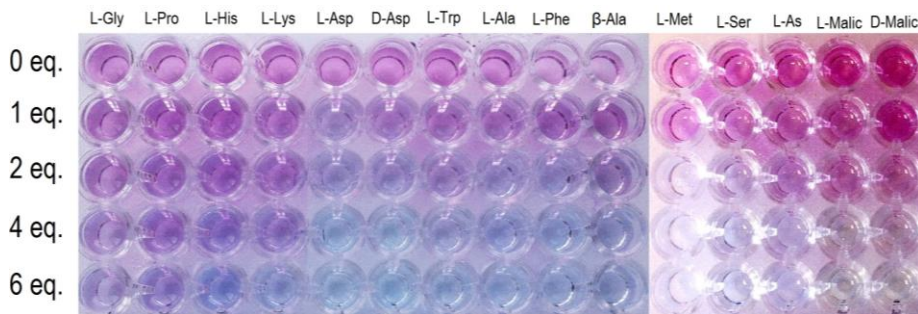


Figura 8. Fotografia de la placa amb la que es fa ver l'escombratge del complex $\text{Cu}_25\mathbf{a}$.

S'ha observat que l'àcid aspàrtic i àcid màlic han donat una resposta major que les altres molècules estudiades. Es pot notar una diferència entre el color adoptat per les solucions del complex amb àcid màlic, que són quasi incolores, respecte les solucions dels altres aminoàcids, que han adquirit un to blau.

6.1.2. Escombratge d'aminoàcids i anàlegs amb el complex *meta* $\text{Cu}_25\mathbf{b}$

L'espectre d'absorció d'aquest complex en dissolució és quasi idèntic al del seu anàleg *para* però la lambda màxima de la seva banda d'absorció d-d és 520. La banda que augmenta d'intensitat en afegir la molècula coordinant està situada a longituds d'ones més altes.

A la figura 9 es presenta el resultat de l'escombratge del complex $\text{Cu}_25\mathbf{a}$ actuant com a receptor. No estan presents tots els anomenats anteriorment ja que en algunes de les mesures d'alguns d'ells es formava precipitat i els valors d'absorbància obtinguts eren incoherents.

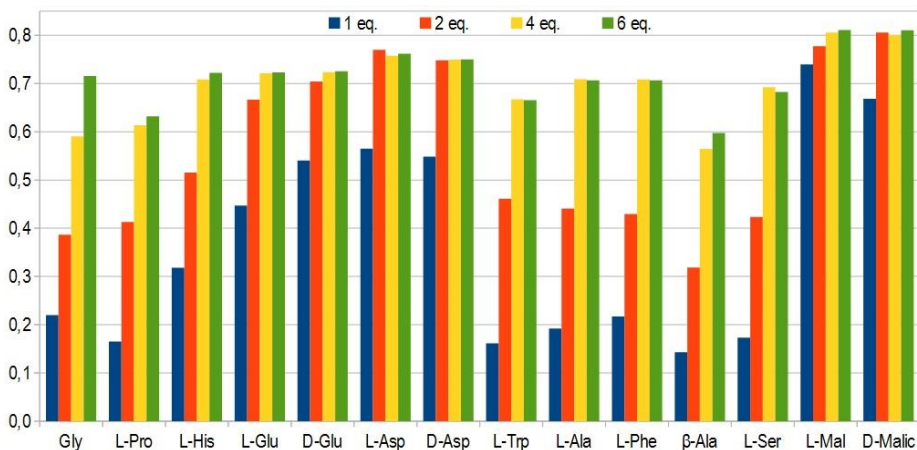


Figura 9. Variació de l'absorbància a 520 nm de l'espectre de $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$ amb diferents quantitats de cada hoste.

La figura 10 és la fotografia de la placa on es va realitzar l'escombratge del receptor $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$.

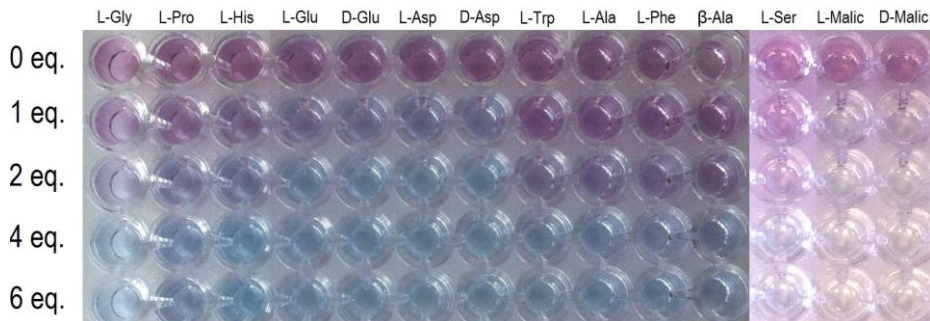


Figura 10. Fotografia de la placa amb la que es fa ver l'escombratge del complex $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$.

S'ha observat que la banda de la transició d-d del receptor $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$ presenta majors variacions en els casos de l'àcid Glutàmic, àcid Aspàrtic i àcid Màlic, els tres compostos dicarboxilats. Es portarà a terme un estudi dels dos isòmers L i D de l'àcid màlic amb els dos receptors per tal de poder treure valors de constants d'associació del complex format i observar si existeix alguna enantioselectivitat per part dels complexos metàl·lics macrocíclics.

6.2. ESTUDI DELS COMPLEXES Cu_25A I Cu_25B EN PRESENCIA D'ÀCID MÀLIC

S'ha pogut observar amb els experiments realitzats que els complexos estudiats tenen una resposta major amb àcid màlic que amb els altres aminoàcids. Amb els altres hostes s'ha vist que el canvi de color és de lila a blau, mentre que amb àcid màlic (ambdós isomers) s'observa que la solució torna d'un color verd molt poc intens, després de reproduir les condicions de l'escombratge a una concentració més elevada (Figura 11).

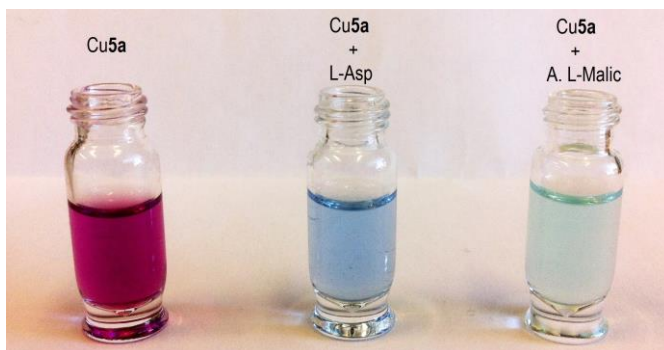


Figura 11. Fotografia del complex Cu_25a sol i en presència d'àcid L-aspàrtic i L-màlic.

Com que es pretén observar l'interacció dels complexos amb l'anió malat, sense l'efecte àcid de la seva forma protonada, s'utilitzaran les sals de tetrabutilamoni de l'àcid L i D màlic per fer les mesures individuals d'absorbància.

6.2.1 Valoracions amb el complex para Cu₂5a

Els espectres d'absorbància realitzats en la mesura del complex de coure Cu₂5a en la presència de L-Malat es mostren a la figura 12.

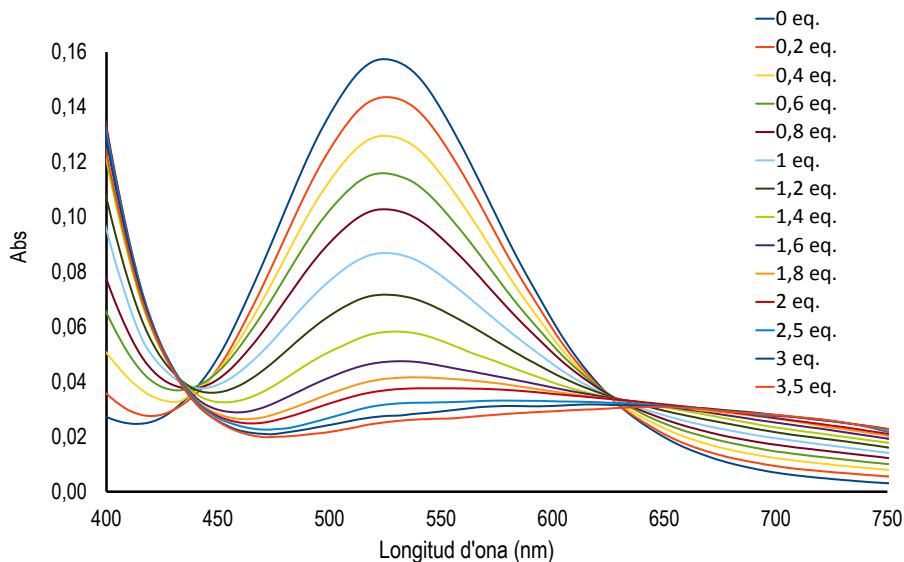


Figura 12. Espectres d'absorbància del complex de coure de Cu₂5a en metanol en presència de diferents quantitats de L-Malat.

Es pot veure al gràfic la banda centrada a 524 nm, corresponent a la transició d-d del complex. Aquesta banda va disminuint la seva intensitat a mesura que augmenta la quantitat de L-Malat al medi. Paral·lelament, el complex format augmenta la seva absorció de llum a 645 nm. Aquest comportament s'observa també per el cas del complex Cu₂5a amb el D-Malat (Apèndix 2).

S'ha representat la variació de les absorbàncies normalitzades del complex a la longitud d'ona de 524 nm en funció del número d'equivalents dels dos isòmers malat addicionats al medi (Figura 13).

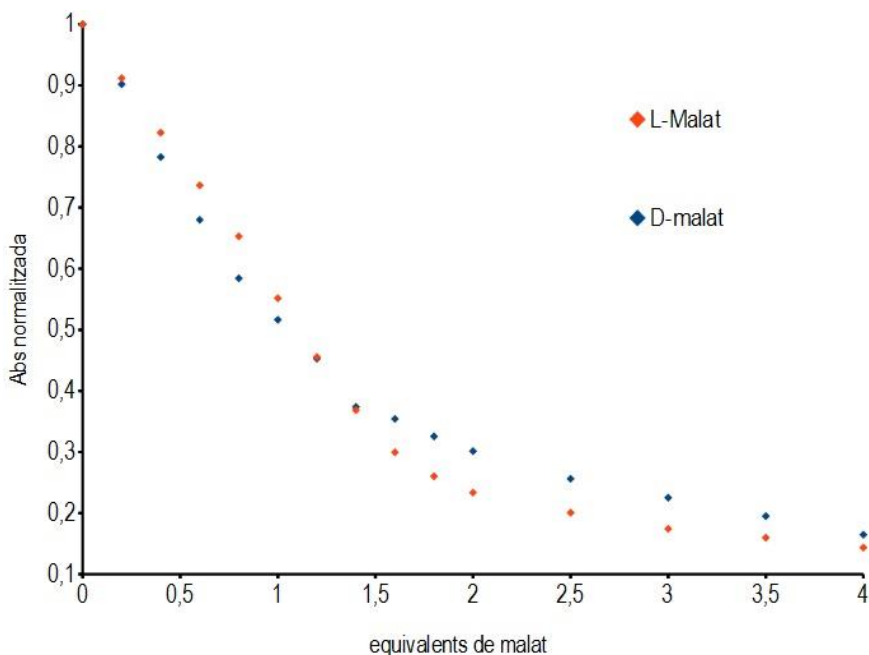
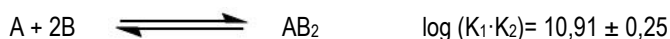


Figura 13. Variació de l'absorbància normalitzada a 524 nm per part del complex $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$ en presència de diferents quantitats de L i D malat.

S'han obtingut els següents valors de les constants d'associació del complex de coure $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$ a través de les dades espectrals comentades utilitzant el programa HypSpec;

Complex $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$ amb L-Malat. ($\text{Cu}_2\mathbf{5a} \equiv \text{A}$, L-Malat $\equiv \text{B}$)



Complex $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$ amb D-Malat. ($\text{Cu}_2\mathbf{5a} \equiv \text{A}$, D-Malat $\equiv \text{B}$)



Els valors extrets de les constants indiquen que el complex format entre el $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$ i el L-Malat és el més estable que el format amb el seu isòmer D. En el rang d'equivalents entre 0 i 1 del gràfic de la figura 13 es produeix una disminució lleugerament superior de l'absorbància a 520 nm quant interacciona el D-Malat amb el receptor $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$ mentre que a partir de 1.6 fins a 4 equivalents la molècula que produeix major resposta al sistema és el L-Malat.

No és possible treure conclusions pel que fa a l'afinitat del complex receptor amb els isòmers de Malat, ja que només s'ha enregistrat una mesura d'espectres de cada un d'ells. Les constants presenten una desviació diferent tenint en compte que les valoracions d'on s'han tret les dades per el seu càlcul s'han portat a terme en les mateixes condicions. Caldria fer noves mesures per tal d'obtenir valors més fiables.

S'ha fet una simulació mitjançant l'eina informàtica HySS de l'abundància relativa de les diverses espècies existents en una solució 0,5 mM de complex de coure amb el macrocicle *para* en funció de la concentració de malat racèmic. Figura 14.

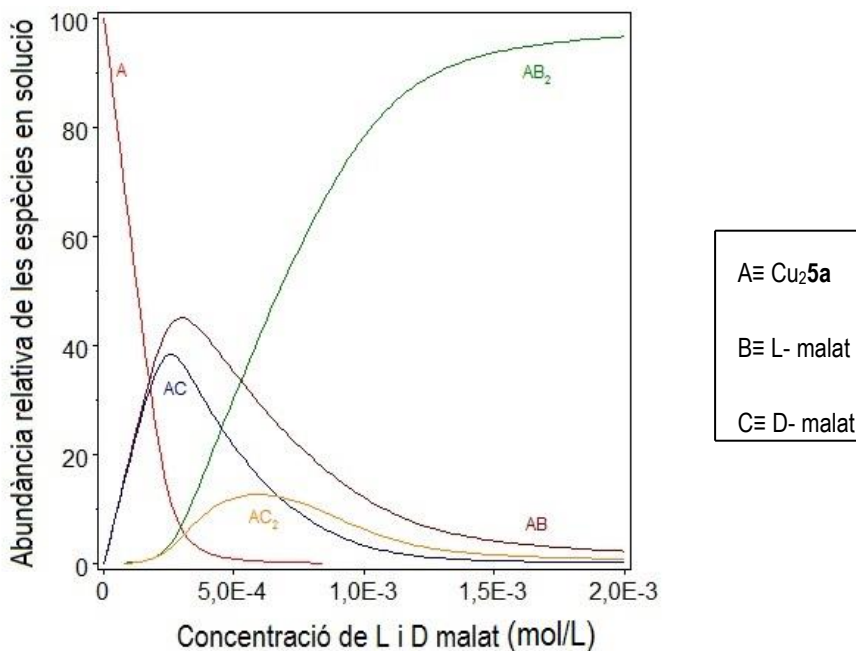


Figura 14. Simulació de la distribució del receptor $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$ entre L i D malat.

Com es pot veure al gràfic, a partir de la presència de dos equivalents d'aminoàcid, hi ha una preferència molt gran cap el L-malat, cosa que no es representativa del comportament observat a l'espectre d'absorció.

Per tal de complementar i comprovar la fiabilitat de les dades experimentals obtingudes es proposa repetir les mesures dels espectres en diferents concentracions de partida de receptor. També caldria contrastar els resultats obtinguts per espectrofotometria de UV-Vis amb altres tècniques, com per exemple ITC (Isothermal Titration Calorimetry).

6.2.2 Valoracions amb el complex *meta* Cu₂5b

Els espectres d'absorbància realitzats en la mesura del complex de coure Cu₂5b en metanol en presència de L- Malat es mostren a la figura 15. El registre d'espectres del complex Cu₂5b amb D-Malat es pot veure a l'apèndix 2.

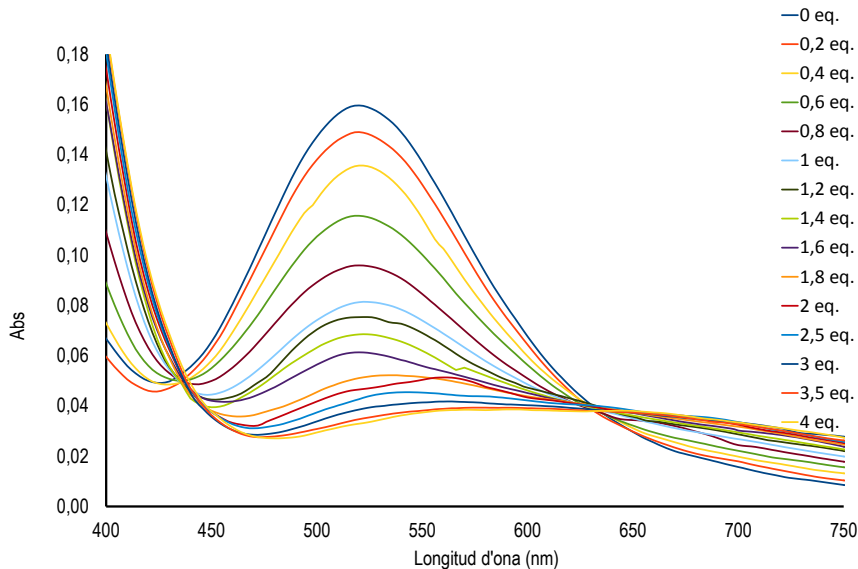


Figura 15. Espectres d'absorbància del complex de coure Cu₂5b en metanol en presència de diferents quantitats de L-Malat.

Per aquest complex $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$, la banda corresponent a la transició d-d té la seva lambda màxima a 520 nm. En complexar l'aminoàcid la banda es desplaça a 670 nm i la seva intensitat disminueix, com s'ha vist també amb el complex *para*.

No s'ha observat cap preferència per ningun dels dos estereoisòmers, com s'il·lustra a la corba de la figura 16. Per tant, el complex $\mathbf{5a}$ mostra major selectivitat per a distingir entre aquests dos estereoisòmers.

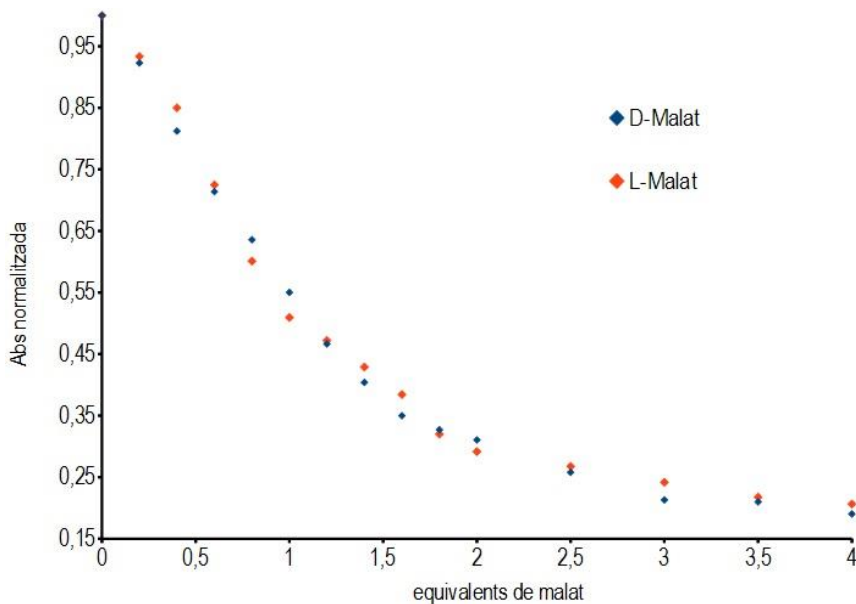


Figura 16. Variació de l'absorbància normalitzada a 520 nm per part del complex $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$ en presència de diferents quantitats de L i D malat.

7. EXPERIMENTAL

7.1. INSTRUMENTS I MÈTODES UTILITZATS.

Espectroscòpia de RMN.

Els espectre de RMN de ^1H s'han enregistrat en un espectròmetre Agilent VNMRS Direct Drive 400.

Espectrometria de masses.

Els experiments de espectrometria de masses es van realitzar en un equip UPL-ESI-TOF (Columna: Acquity UPLC BEH C18[®] 1.7 mm, 2.1x100 mm, LCT Premier Xe, Waters).

Espectrometria UV-Vis

Espectrofotòmetre Spectramax M5 de Molecular Devices.

Cromatografia HPLC

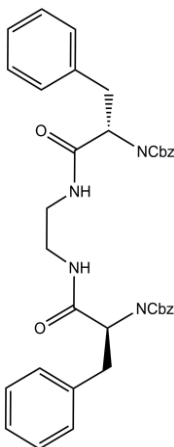
S'ha utilitzat un cromatògraf Agilent Technologies 1100 Series amb una columna XTerra[®] MS C18, 5 μm de 4,6x150 mm.

Càlcul de constants d'associació

S'ha utilitzat el programa HypSpec per obtenir valors de constants d'associació a partir de les dades espectrofotomètriques extretes de les valoracions individuals de L i D Malat. S'ha establert que les espècies absorbents en el rang de la mesura son; $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$, $\text{Cu}_2\mathbf{5a}+1$ (L/D Malat) i $\text{Cu}_2\mathbf{5a} + 2$ (L/D Malat).

7.2. SÍNTESI DELS MACROCICLE PSEUDOPEPTÍDIC 5B

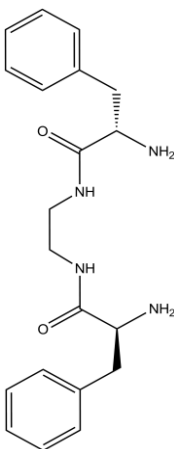
7.2.1. Síntesi de la diamina (2S)-2-amino-N-{2-[(2S)-2-amino-3-fenilpropanamido]etil}-3-fenilpropanamida protegida amb Cbz, 4.



Es dissol l'ester de N-hidroxisuccinimida de la N-Cbz-L-fenilalanina (5,1 g, 12,9 mmol) en THF anhidre (100 mL). L'etilendiamina, dissolta també en THF (20 mL) s'afegeix gota a gota a la primera dissolució, en condicions d'atmosfera inerta. La mescla es deixa reaccionar a temperatura ambient i agitació constant durant 24h. El sòlid blanc obtingut es filtra i es renta primer amb una solució saturada de NaHCO_3 i posteriorment amb H_2O . S'obté un sòlid blanc amb un endiment del 71% (2,85 g, 4,6 mmol).

RMN de ^1H : (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 2,76 (dd, $J_1=13,7$, $J_2=10,4$, 2H), 3,00 (dd, $J_1=13,8$, $J_2=4,3$, 2H), 3,10 (m, 4H), 4,18 (m, 2H), 4,94 (q, AB, $|J_{ab}|=12,7$, 2H), 7,18-7,35 (m, 20H)

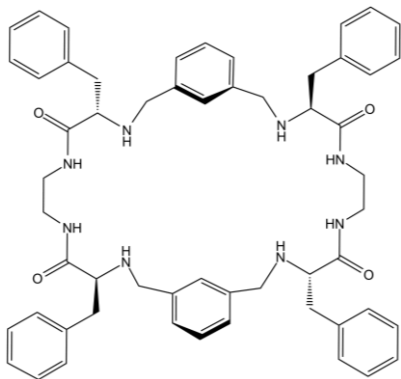
7.2.2 Desprotecció de la diamina.



S'afegeix un excés de HBr/AcOH (33%) (20 mL) a sobre de la diamina protegida 4 (2,59 g, 4,15 mmol) i es deixa la mescla a temperatura ambient i agitació constant fins que es deixa d'observar despreniment de CO_2 . Llavors, s'afegeix èter dietílic sobre la solució i es forma un precipitat de color blanc. Es filtra el sòlid i es dissol en la mínima quantitat de H_2O . La solució resultant es renta amb CHCl_3 (3 x 30 mL). S'ajusta el pH de la fase aquosa fins a 12 amb NaOH 4M i s'extreu amb CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). Els extractes orgànics obtinguts s'assequen amb MgSO_4 anhidre i es concentren a sequedat per obtenir un sòlid blanc amb un rendiment del 43% (0,63 g, 1,77 mmol).

RMN de ^1H : (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 2,70 (dd, $J_1=13,7$, $J_2=9,2$, 2H), 3,23 (dd, $J_1=13,7$, $J_2=4,3$, 2H), 3,37 (m, 4H), 3,60 ($J_1=4,28$, $J_2=9,2$, 2H), 7,20-7,33 (m, 20H)

7.2.3 Macrocycle pseudopeptidic meta



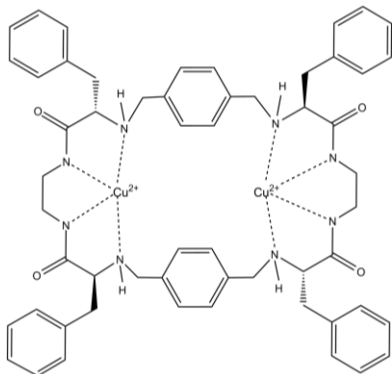
5b: El precursor pseudopeptidic **1** (0,62 g, 1,75 mmol) es dissol en MeOH desgasificat (12 mL) sota atmosfera de nitrogen. L'isofalcat **3** (0,56 g, 0,88 mmol) es dissol en MeOH (8 mL) i s'afegeix sobre la solució de **1**, mantenint agitació constant. Passats 30 minuts, s'afegeix a la mescla el dialdehid **2** (0,23 g, 1,75 mmol) dissolt en MeOH (8 mL). Es deixa reaccionar durant 24h a temperatura ambient i amb agitació constant. Passat el temps, s'afegeix a la mescla un excés de NaBH₄ (0,34 g, 8,75 mmol). Aquest procés es fa lentament i a 0° C. Es deixa reaccionar 24h i s'hidrolitza amb HCl concentrat, fins a pH àcid. S'evapora a sequedat i es dissol el sòlid resultant en la mínima quantitat de NaOH 2M. S'extreu la solució aquosa amb CHCl₃ (3 x 30 mL), s'asseca la fase orgànica amb MgSO₄ anhidre i s'evapora el dissolvent al buit. Es purifica el producte per cromatografia de sílice flash utilitzant com a eluent CH₂Cl₂/MeOH (30:1) i finalment s'augmenta la polaritat afegint gotes de NH₃ per millorar la total extracció del producte. Rendiment = 11% (84 mg, 0,092 mmol). Sòlid blanc.

RMN de ¹H: (CDCl₃-CD₃OD, 7:2, 400 MHz) δ (ppm) 2,56 (dd, *J*₁=13,7 Hz, *J*₂=8,7 Hz, 1H), 2,88 (dd, *J*₁=13,7 Hz, *J*₂=5,1 Hz, 1H), 3,03-3,11 (m, senyals solapades, 4H), 3,25 (d, *J*=13,4 Hz, 4H), 3,37 (d, *J*=13,3 Hz, 4H), 6,73 (d, 4H), 6,90-6,95 (m, 10H), 7,02-7,10 (m, 14H).

ESI TOF MS: (m/z) 457,4608 {[(M_(5a)+2H)/2]²⁺, calc: 457,2559}, 913,5156 {[M_(5a)+H]⁺, calc: 913,5084}.

7.3. SÍNTESI DELS COMPLEXOS METÀL·LICS

7.3.1. Síntesi del complex *para* amb *coure*

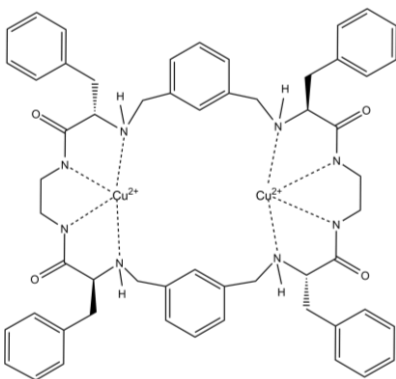


Cu₂5a: El macrocicle pseudopeptídic **5a** (103 mg, 0,11 mmol) es dissol en MeOH (20 mL) i se li afegeix a la solució CuSO₄·5H₂O (56 mg, 0,23 mmol) i el NaOH (18 mg, 0,45 mmol). La solució blava es torna ràpidament de color lila fosc. Es deixa agitant durant 30 minuts a temperatura ambient. Es transvasa la solució a dos falcons de 20 mL i es centrifuga per separar la fase metanòlica que conté el complex del precipitat de sulfat de sodi s. Es decanta la solució orgànica i es concentra a

sequedat. Rendiment = 75% (87 mg, 0,084 mmol). Sòlid lila.

ESI TOF MS: (m/z) 457,2538 {[M(_{5a})+2H]/2}⁺, calc: 457,2559}, 487.7121 {[M(Cu_{5a})+2H]/2}⁺, calc: 487,7095}, 913,5082 {[M(_{5a})+H]}⁺, calc: 913,5084}, 974.4227 {[M(Cu_{5a})+H]}⁺, calc: 974.4190}, 1083,3451 {[M(Cu₂5a + àcid fòrmic)+H]}⁺, calc: 1083,3366}.

7.3.2. Síntesi del complex *meta* amb *coure*



Cu₂5b: El procediment per obtenir aquest compost és el mateix que el descrit per el complex del macrocicle **5a**. En aquest cas s'utilitzen com a reactius; el macrocicle pseudopeptídic **5b** (66 mg, 0,077 mmol), CuSO₄·5H₂O (36 mg, 0,15 mmol) i NaOH (11mg, 0,29 mmol). Rendiment = 83% (63 mg, 0,06 mmol). Sòlid lila.

ESI TOF MS: (m/z) 457,2449 {[M(_{5a})+2H]/2}⁺, calc: 457,2559}, 487.7140 {[M(Cu_{5a})+2H]/2}⁺, calc: 487,7095}, 913,5107 {[M(_{5a})+H]}⁺, calc: 913,5084}, 974.4106 {[M(Cu_{5a})+H]}⁺, calc: 974.4190}, 1083,3451 {[M(Cu₂5a + àcid fòrmic)+H]}⁺, calc: 1083,3366}.

7.4. ESTUDI DE RECONeixEMENT MOLECULAR

7.4.1. Escombratge d'aminoàcids

Es preparen, per a cada complex (**Cu₂5a** i **Cu₂5b**) 30 mL de solució 0.833 mM en MeOH d'alta puresa (>99.9%). De cada aminoàcid es preparen 3 mL de dissolució 50 mM (excepte L i D glutàmic, L i D aspàrtic i triptòfan en que la concentració és 25 mM degut a la seva baixa solubilitat en aigua) utilitzant H₂O mili Q.

Els dos experiments s'enregistren amb l'espectròmetre de UV-Vis fent servir plaques de 96 pous de poliestirè. Damunt mateixos volums i concentració solució de complex (**Cu₂5a** o **Cu₂5b**) s'afegeixen diferents quantitats conegudes d'aminoàcid (entre 0 i 6 equivalents) i s'enregistra l'espectre d'absorció corresponent.

7.4.2. Valoracions individuals amb L i D Malat

Per a cada complex (**Cu₂5a** i **Cu₂5b**) es preparen 15 mL de solució 0.5 mM i 3 mL de L-Malat de TBA i D-Malat de TBA 12.5 mM, totes quatre en MeOH d'alta puresa (>99,9%).

Les valoracions es duen a terme a l'espectròmetre d'UV-Vis amb una microcubeta de quars. S'afegeixen sobre 0.5 mL ($25 \cdot 10^{-3}$ mmol) de solució de cada complex, quantitats conegudes de les solucions de malat (4 i 10 μ L, 0,2 i 0,5 equivalents) i s'enregistra l'espectre d'absorció en cada punt (0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,5, 3, 3,5, i 4 equivalents).

8. CONCLUSIONS

Regarding the work developed in the first part:

- The pseudopeptidic macrocycle **5b** has been successfully prepared but in low yield.
- Isophthalate dianion has been used as template to carry out the synthesis of the [2+2] product.
- NMR spectroscopy and mass spectrometry (ESI-TOF) verify the correct synthesis of the obtained macrocycle **5b**.
- Copper complexes of macrocycles **5a** and **5b** have been prepared in good yield and characterized by mass spectrometry..

Regarding the work developed in the second part:

- Complexes $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$ and $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$ have been used as receptors in molecular recognition of different amino acids and analogues.
- A higher response has been observed by both complexes when were used as receptors of Glutamic acid, Aspartic acid and Malic acid as guests.
- No selectivity between Malate isomers has been shown by complex $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$.
- Spectrophotometric data has been used to calculate association constants of *para* complex $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$ with L-Malate and D-Malate. A light preference for L isomer was observed. However, this enantioselectivity needs to be confirmed using other techniques.

9. REFERENCES AND NOTES

- [1] J.-M. Lehn, *Struct. Bonding (Berlin)* **16** **1973** 1.
- [2] Fisher, E. *Ber. Deutsch. Chem., Ges.* **1894**, **38**, 2985-2993.
- [3] Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *J. Nat. Prod.* **2003**, **66**, 1022-1037.
- [4] Beer, P. D.; Gale, P. A.; Smith, D. K. *Supramolecular Chemistry*, Oxford University Press: Oxford, **1999**.
- [5] M. Bonizzoni, L. Fabbrizzi, G. Piovani and A. Taglietti, *Tetrahedron*, **2004**, **60**, 1.
- [6] Pichler, U.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; Veronesea, A. and Verzinia, M., *Tetrahedron Letters*. **45**, **2004**, 1643–1646
- [7] Fernandez-Lopez, S.; Kim, H. S.; Choi, E. C.; Delgado, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Kraehenbuehl, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxon, K. M.; Ghadiri, M. R. *Nature* **2001**, **104**, 6085-6117.
- [8] Fuchter, M. J.; Beall, L. S.; Montalban, A. G.; Sakellariou, E. G.; Mani, N. S.; Miller, T.; Vesper, B. J.; White, A. J. P.; Williams, D. J.; Barret, A. G. M.; Hoffman, B. M. *Tetrahedron* **2005**, **61**, 6130.
- [9] Scharm, D.; Germeroth, L.; Scheneider-Menegger, J.; Wenschuh, H. *J. Org. Chem.* **2001**, **66**, 507-513.
- [10] Gloe, K. *Macrocyclic Chemistry: Current Trends and Future perspectives*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, **2005**.
- [11] Sokolenko, N.; Abbenante, G.; Scanlon, M. J.; Jones, A.; Gahan, L. R.; Hanson, G. R.; Fairlie, D. P. *Journal of American Chemical Society* **1999**, **121**, 2603-2604.
- [12] Shin, S. B. Y.; Yo, B.; Todaro, L. J.; Kirshenbaum, K. *Journal of American Chemical Society* **2007**, **129**, 3218-3225.

[13] Bru, M.; Alfonso, I.; Burguete, M. I.; Luis S. V. *Angew. Chem.* **2006**, *45*, 6155-6159

[14] a) Blasco, S.; Burguete, M. I.; Clares, M. P.; García-España, E.; Escorihuela, J.; Luis, S. V. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 7841–7852. b) Martí, I.; Ferrer, A.; Escorihuela, J.; Burguete, M. I. and Luis, S. V. *Dalton Trans.*, **2012**, *41*, 6764.

10. ACRONYMS

Aa	Aminoàcid
Abs	Absorbància
d	Doblet
dd	Doblet de doblets
ESI MS	Espectrometria de masses amb ionització d'electrospray
ESI TOF MS	Espectrometria de masses amb ionització d'electrospray i detector per temps de vol
Eq	Equivalents
HPLC	Cromatografia líquida d'alta eficàcia
m	multiplet
RMN	Ressonància magnètica nuclear
TBA	Tetrabutilamoni
UV-Vis	Ultraviolat visible

APPENDICES

APÈNDIX 1.

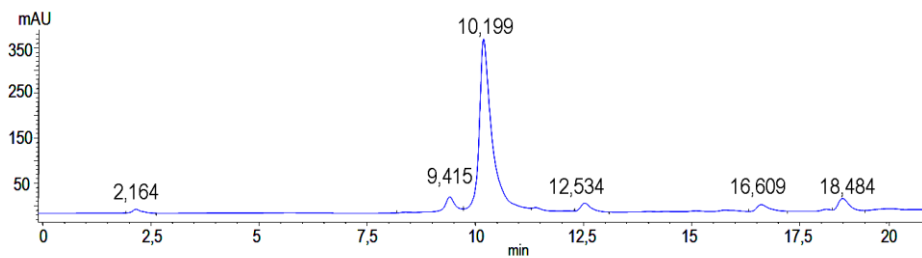


Figura 17. Cromatograma del macrocicle **5b**.

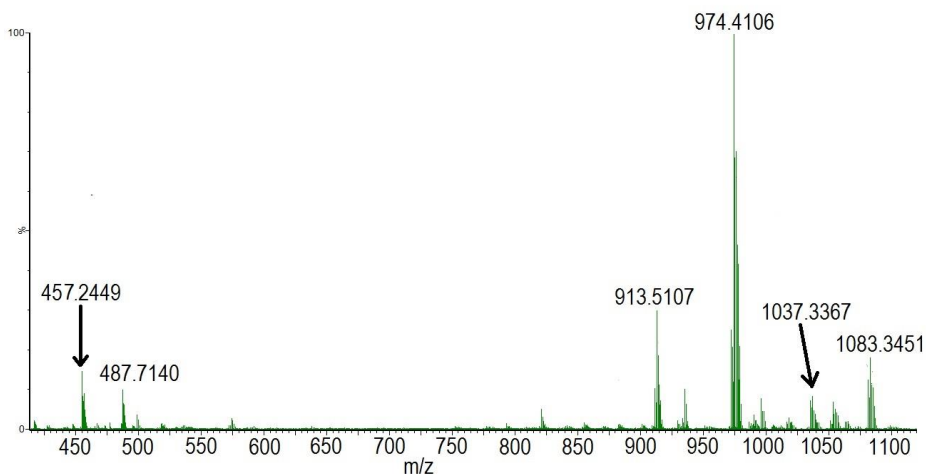


Figura 18. Espectre de masses ESI-TOF del complex $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$.

APÈNDIX 2.

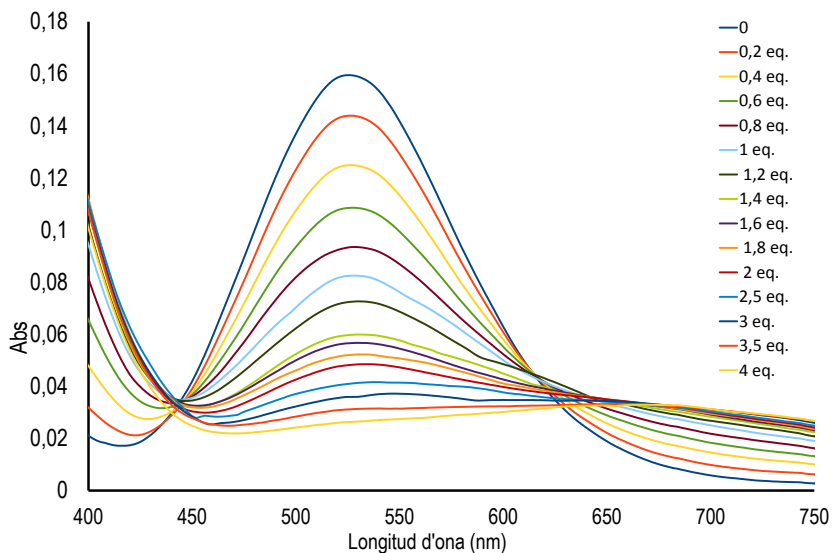


Figura 19. Espectres d'absorbància de $\text{Cu}_2\mathbf{5a}$ en metanol en presència de diferents quantitats de D-Malat.

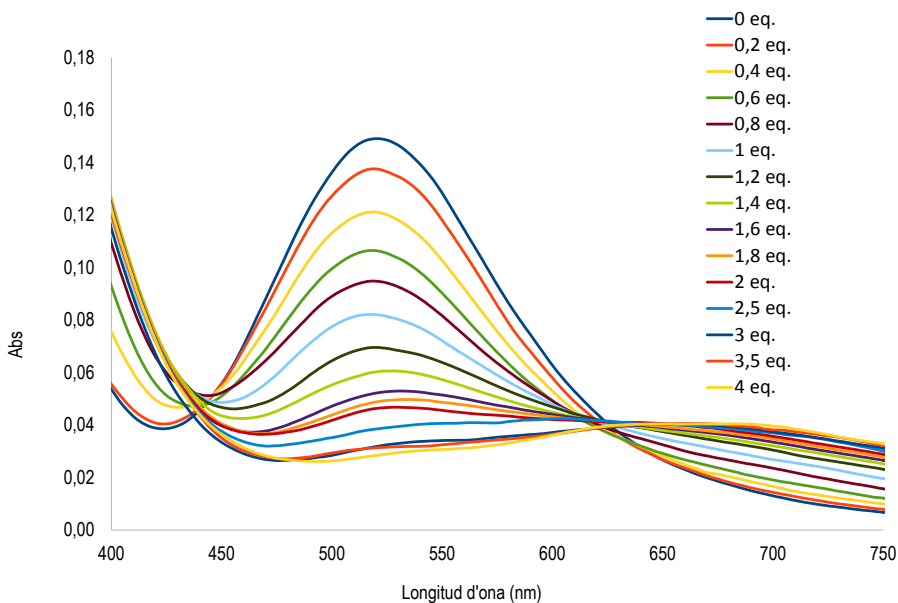


Figura 20. Espectres d'absorbància de $\text{Cu}_2\mathbf{5b}$ en metanol en presència de diferents quantitats de D-Malat.