



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA**
FACULTAD DE QUÍMICA

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN QUÍMICA

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
 β -TIOCIcloDEXTRINA

Ana M^a Pérez Calabuig

Curso 2015-2016

Julio 2016



CENTRO SINGULAR DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA BIOLÓGICA Y MATERIALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

ÍNDICE

1. ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 Estructura y propiedades	5
<i>a. Formación de complejos de inclusión</i>	7
<i>b. Propiedades catalíticas</i>	8
2.2 Aplicaciones	10
3. OBJETIVOS	12
3.1 Producción mundial ciclodextrina	12
3.2 Aplicaciones de β-ciclodextrina tiolada	12
<i>a. Interacción con nanopartículas (NPs) metálicas</i>	12
<i>b. Enlaces disulfuro</i>	13
<i>c. Grupo tiol más reactivo que el hidroxilo</i>	14
4. REACCIONES	15
4.1 Reactivos	15
4.2 Mono-6-O-(p-toluensulfonil)-β-ciclodextrina (β-CD-OTs)	16
<i>a. Procedimiento experimental</i>	16
<i>b. Caracterización</i>	17
4.3 Mono-6-tio- β-ciclodextrina (β-CD-SH)	18
<i>a. Procedimiento experimental</i>	18
<i>b. Caracterización</i>	19
5. PROPIEDADES	20
5.1 Acidez	21
5.2 Polaridad	22

5.3 Reactividad MNTS	26
<i>a. Espectrofotómetro secuencial stopped-flow</i>	28
<i>b. Experimental</i>	30
<i>c. Mecanismo</i>	32
6. CONCLUSIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38

1. ABSTRACT

Español

Las ciclodextrinas (CDs) oligosacáridos cíclicos. La superficie exterior es hidrofílica, porque la mayoría de los grupos hidrofílicos están hacia el exterior, consiguiendo una buena solubilidad en agua. La cavidad interna es relativamente apolar, y puede encapsular compuestos no polares con las dimensiones apropiadas, ocurriendo la unión a través de diversas interacciones no polares. Esta unión se conoce como complejación “host-guest” (complejos de inclusión). En este trabajo se estudiarán los cambios que pueden ocurrir en las propiedades de la β -ciclodextrina (siete unidades de glucosa), solamente sustituyendo el hidroxilo del C-6 de una de las unidades de glucosa por un grupo tioéter mediante una síntesis en dos etapas.

Gallego

As ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos. A superficie exterior é hidrofílica, porque a maioría dos grupos hidrofílicos están cara ó exterior, conseguindo unha boa solubilidade na auga. A cavidade interna é relativamente apolar, e pode encapsular compostos non polares coas dimensións apropiadas, ocorrendo a unión a través de diversas interaccións non polares. Esta unión coñécese como complexación “host-guest” (complexos de inclusión). Neste traballo estudarase os cambios que poden ocorrer nas propiedades da β -ciclodextrina (sete unidades de glucosa), só substituíndo o hidroxilo do C-6 dunha das unidades de glucosa por un grupo tioéter mediante unha síntese en dúas etapas

Inglés

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides. The outer surface is hydrophilic, because the majority of the hydroxyl groups project outward, resulting in good water solubility. The internal cavity is relatively nonpolar, and it can be encapsulated nonpolar solutes of appropriate dimensions, with binding occurring through various nonpolar interactions. Such binding is known as host-guest complexation. On this work it will study changes that may occur on β -cyclodextrine (seven units of glucose), only substituting the C-6 hydroxyl of one of the units of glucose by a thioether group using a two-step synthesis.

2. INTRODUCCIÓN

Las ciclodextrinas (CDs) son azúcares cíclicos naturales de seis (α -CDs), siete(β -CDs) u ocho(γ -CDs) unidades de glucosa, unidas por enlaces $\alpha(1-4)$ ^[1]

Se obtienen como resultado de una reacción de transglucosilación intramolecular en la degradación del almidón, llevada a cabo por la enzima ciclodextrina glucotransferasa de *Bacillus macerans*.^[2]

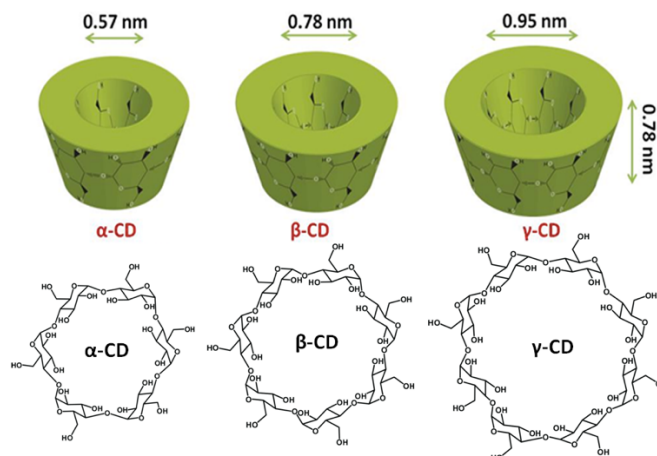


Figura 1. Estructura de las ciclodextrinas nativas y tamaño de sus cavidades

Las ciclodextrinas fueron descubiertas por Villiers en 1891 cuando observó que ocurría una cristalización dentro de un cultivo bacteriano como producto de la degradación parcial del almidón a causa de *Bacillus macerans*. Sin embargo, fue entre 1903 y 1911 cuando Schardinger estableció las bases de la química de las ciclodextrinas e identificó las ciclodextrinas α y β ; a pesar de ello, muchas de las propiedades físico-químicas de las ciclodextrinas eran aún desconocidas cuando Schardinger publicó su último artículo. En la década de los 30, Freundberg y colaboradores identificaron la γ y sugirieron la existencia de ciclodextrinas mayores. Establecieron que las CDs eran oligosacáridos cíclicos formados por unidades de glucosa y tiempo después Cramer y colaboradores describieron su habilidad para formar complejos de inclusión. En los años 50 las características más importantes de las ciclodextrinas ya habían sido descubiertas, sin embargo las CDs con aplicaciones farmacéuticas no estuvieron disponibles hasta 25 años después.^{[3],[4]}

2.1 Estructura y propiedades

Las ciclodextrinas están constituidas por 6 (α -CDs), 7 (β -CDs) 8 (γ -CDs) o más unidades de α -D-glucopiranosas unidas por enlaces $\alpha(1-4)$ ^[1]

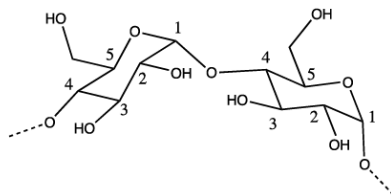


Figura 2. Representación de dos unidades glucopiranosas de una molécula de CD, donde se muestra el puente glicosídico $\alpha(1-4)$

Se observó que todos los tipos de CDs tenían estructura troncocónica, debido a la conformación en forma de silla de las unidades de glucopiranosas. Orientados hacia la boca ancha de la estructura troncocónica se encuentran los $-OH$ secundarios de los carbonos C-2 y C-3 de cada unidad de glucosa; y hacia la boca estrecha de la estructura se encuentran los $-OH$ primarios de los C-6, quedando los grupos $-CH_2OH$ orientados hacia la superficie externa del cono. Los hidrógenos de los carbonos más apolares de los azúcares (C-3 y C-5) y el oxígeno de los enlaces glucosídicos entre las unidades de glucosa, quedan orientados hacia el interior de la estructura troncocónica (**Figura 3**). La orientación específica de todos estos grupos, da lugar a una molécula cuya superficie externa es hidrofílica, por lo que es soluble en agua, y cuya cavidad interna es hidrofóbica.^[3]

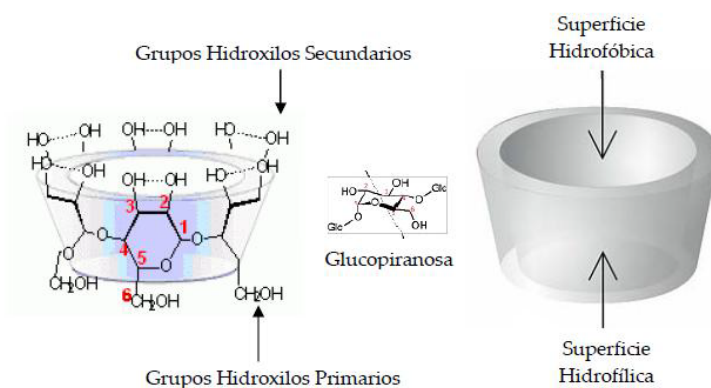


Figura 3. Estructura troncocónica de la ciclodextrina

Hay tres tipos de CDs denominadas de primera generación, parentales o naturales: α -, β - y γ -CDs. La β -CD es el tipo más utilizado debido a su bajo coste. Las principales características de las CDs naturales se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Propiedades físicas de las ciclodextrinas nativas

PROPIEDAD	α -CDs	β -CDs	γ -CDs
Nº unidades de glucosa	6	7	8
Peso molecular (g/mol)	972	1134	1296
Diámetro interno (pm)	500	620	800
Diámetro externo (pm)	1460	1540	1750
Volumen cavidad (10^6pm^3)	174	262	427
$[\alpha]_D$ a 25°C	140±0,5	162,5±0,5	177,4±0,5
Rango Temperatura de fusión (°C)	255-260	255-265	240-245
Contenido en agua (% en peso)	10,2	13-15	8-18
Nº molécula de agua	6	11	17
Solubilidad en agua (g/100 mL)	14,5	1,85	23,2

Las ciclodextrinas son muy solubles en disolventes apolares como dimetilsulfóxido (DMSO) o N,N-dimetilformamida (DMF), sin embargo en agua y otros disolventes polares su solubilidad es menor. La β -CD es la más insoluble de las tres, ya que forma un cinturón de enlaces de hidrógeno que le confiere gran estabilidad. La α -CD sólo forma cuatro de los seis posibles enlaces de hidrógeno, pues la tensión del anillo distorsiona las unidades de glucosa. Por su parte, la γ -CD es la menos tensionada de las tres, lo que confiere mayor flexibilidad y solubilidad.

A partir de las CDs naturales se han sintetizado otros tipos de CDs llamadas derivadas o modificadas, que son obtenidas por acilaciones, esterificaciones o eterificaciones de los -OH de los carbonos primarios y secundarios de las CDs naturales.

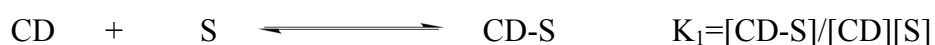
Debido a su capacidad para unirse de forma específica mediante enlace covalente o no covalente a otras CDs, estos azúcares cíclicos se pueden utilizar como bloques para la construcción de complejos supramoleculares. Su habilidad para formar complejos de inclusión con moléculas huésped de carácter orgánico, ofrece la posibilidad de desarrollar hilos supramoleculares.

a. *Formación de complejos de inclusión*

En disolución acuosa, la cavidad de la ciclodextrina, ligeramente apolar está ocupada por moléculas de agua, las cuales están energéticamente desfavorecidas (interacción polar-apolar) y por lo tanto son fácilmente sustituibles por la “molécula huésped” apropiada que es menos polar que el agua.

La relación “host-guest” más frecuente es 1:1; sin embargo, relaciones tales como 2:1, 1:2, 2:2, o incluso más complicadas han sido llevadas a cabo en algunas reacciones.^[5]

Los complejos de inclusión formados se pueden aislar como sustancias cristalinas estables. La complejación con un sustrato establece el siguiente equilibrio termodinámico:



La forma más favorable de unión implica la inserción de la parte menos polar de la molécula huésped en la cavidad, mientras que la parte más polar y a menudo la cargada queda expuesta al disolvente exterior por la parte más ancha de la cavidad de la CD.

Los principales factores implicados en la unión CD-huésped son fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas aunque el establecimiento de enlaces de hidrógeno y los efectos estéricos también tiene importancia.

Dentro de las fuerzas de Van der Waals las más importantes son las tipo dipolo-dipolo inducido. La distribución simétrica de las cargas de los hidroxilos de la CD produce un momento bipolar permanente que interacciona con las moléculas apolares huéspedes.

La interacción entre dos dipolos permanentes es mucho más fuerte que con un dipolo inducido porque no es un efecto momentáneo, por lo que se podría pensar que los complejos de inclusión con moléculas polares deberían verse favorecidos. Por el contrario los estudios han demostrado la irrelevancia de esta interacción ya que existen numerosos compuestos estables que no poseen momentos dipolar permanente.

Otro factor que confiere estabilidad a la estructura es la formación de enlaces de hidrógeno entre ciertas moléculas huésped y los hidroxilos de la CD.

Estos dos efectos no son suficientes para explicar la gran estabilidad de los complejos de inclusión ni tampoco el por qué se forma más rápidamente en disolución acuosa que en otros disolventes. La explicación reside en la energía liberada al formar el complejo.

b. Propiedades catalíticas

Una de las propiedades más significativas de las CDs es su comportamiento catalítico. Se demostró que los ésteres se unen a la cavidad de la CD acilando los grupos hidroxilo de la misma, existiendo ciertas preferencias geométricas.

La catálisis por medio de la CD tiene lugar a través de la formación del complejo de inclusión, con lo que se consigue un estado de transición más estable.

Las reacciones catalizadas por CDs se pueden clasificar en:

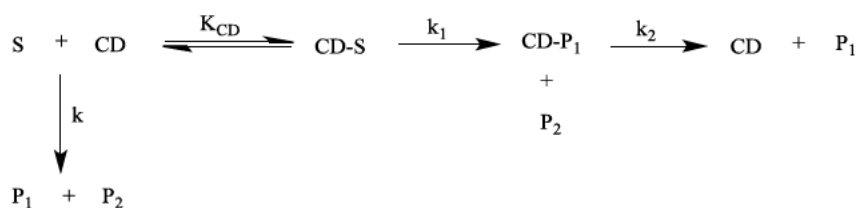
- Catálisis covalente: se producen interacciones covalentes entre un grupo funcional de la CD y el sustrato
- Catálisis no covalente: la CD proporciona su cavidad para la reacción sin la existencia de ningún intermedio covalente.
- Inhibición: se produce una disminución en la velocidad de reacción

Catálisis covalente

La catálisis covalente es una de las más estudiadas. Se han estudiado reacciones en las que se produce una interacción covalente entre un grupo funcional de la CD y el sustrato durante la etapa lenta de la reacción.

La reactividad del sustrato puede ser explicada en términos de la geometría del complejo activado, del que podemos obtener información mediante modelos moleculares.

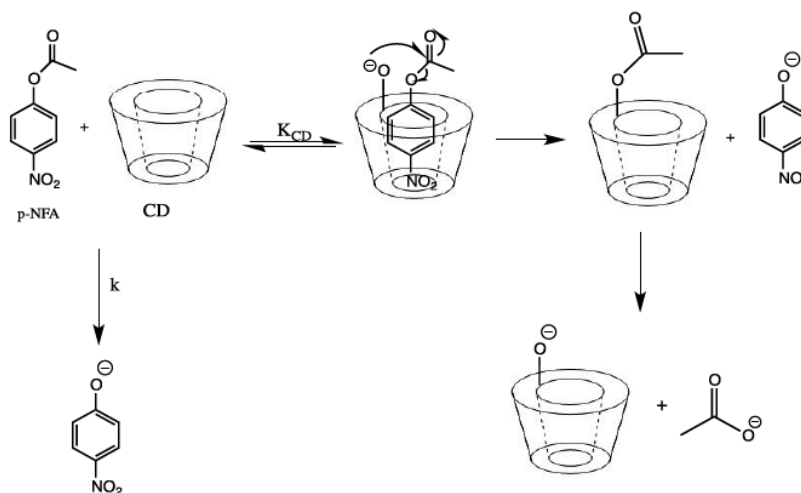
El esquema de reacción propuesto para este tipo de catálisis es el siguiente:



Esquema 1. Reacción para una catálisis covalente, mediante un mecanismo “host-guest” 1:1

El primer paso es la formación de un complejo de inclusión gobernado por K_{CD} seguido del ataque nucleofílico de un hidroxilo de la CD sobre el sustrato S formando un intermedio covalente (CD-P₁). En esta reacción se forma el primer producto y posteriormente se hidroliza el intermedio covalente recuperándose la CD y obtenido el producto P₂.

Uno de los sistemas de catálisis CD-sustrato más estudiado es la hidrólisis de fenilésteres.^{[6],[7]} Un ejemplo de esta reacción siguiendo el mecanismo anterior es la hidrólisis del p-nitrofenol acetato.



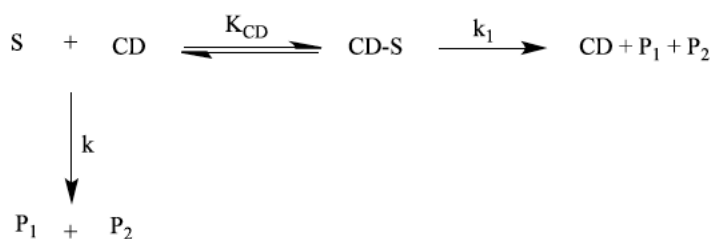
Esquema 2. Mecanismo de catálisis covalente para la hidrólisis de p-nitrofenol acetato (p-NFA)

Tenemos que considerar que los mecanismos cinéticos mostrados anteriormente siguen un mecanismo de complejación “host-guest” 1:1. Especialmente interesantes son algunos casos en los que dos CDs cooperan en la división de un éster, que unirá el acilo y el arilo de la CD.^[8] Ejemplos que siguen este comportamiento son los mostrados por los alcanosatos carboxifenílicos.

Catálisis no covalente

En esta forma de catálisis, la inclusión del sustrato en la cavidad de la CD proporciona un medio de reacción diferente al acuoso. Las CDs pueden actuar simplemente proporcionando un entorno apolar (efecto microdieléctrico)^[9] y estéricamente restringido (restricciones conformacionales) para que tenga lugar la reacción. En este modo de catálisis la cavidad de CD actúa de medio de reacción acelerando o inhibiendo la misma

El esquema de reacción en este caso es el siguiente:



Esquema 3. Reacción para una catálisis no covalente

Inhibición

Del mismo modo que se produce la catálisis puede darse una inhibición de la reacción como consecuencia de la formación de un complejo de inclusión del sustrato con la CD no reaccionando entre ellos. En estos casos, las CDs no intervienen directamente en la reacción como reactivo pero si influyen en la velocidad de la misma, dado que secuestran a uno de los reactivos.

2.2 Aplicaciones

Existe un gran interés en controlar la habilidad de las ciclodextrinas para formar complejos, pues este es el punto clave para su aplicación en campos tan diversos como farmacología, química analítica, síntesis orgánica y fotofísica.^[10]

Una de las aplicaciones más estudiada se centran en su uso como agentes encapsulantes. Las CDs pueden aumentar la solubilidad y actuar como transportadores de fármacos y evitar la descomposición de moléculas inestables. También se le han encontrado potenciales aplicaciones en las industrias alimentarias y cosméticas.^{[10],[11]}

Desde un punto de vista de modelo, las reacciones catalizadas por CDs tienen gran importancia al ser cinéticamente similares en muchos aspectos a las reacciones enzimáticas. Por esta razón las CDs pueden servir como modelos de ciertas enzimas porque:

- Sus solubilidades en agua son relativamente altas
- Los compuestos huéspedes disponibles son versátiles
- Sus estructuras moleculares están bien definidas
- Los grupos hidroxilo como catalizadores están regularmente ordenados en los anillos de CDs

Además la complejación de CDs con fármacos, insecticidas, tintas, etc., es extremadamente útil al variar el comportamiento físico-químico y bioquímico de estas sustancias lo que, por ejemplo, permite la solubilización de ciertas drogas facilitando la inyección.^[12]

Otra aplicación de las ciclodextrinas está en su uso en RMN para aumentar la intensidad de ciertas señales para diversos compuestos.^[13] Las CDs son también usadas para separación de compuestos en columnas cromatográficas ya que pueden incorporar substratos específicamente.^[13]

3. OBJETIVO

Modificar el grupo –OH del C6 de una de las unidades de glucopiranososa por un grupo tioéter para así estudiar sus propiedades físicas y la reacción de complejación con N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida (MNTS).

3.1 Producción mundial ciclodextrinas

Las ciclodextrinas como se explicó en la Introducción, son moléculas naturales formadas por degradación del almidón con una enzima. Existen tres tipos de ciclodextrinas que se conocen como nativas (α -, β - y γ -). La producción anual de β -ciclodextrina estaba cerca de las 10.000 toneladas/año en el 2007.^[14]

Conociendo estos datos de producción anual y sabiendo que el rendimiento de las reacciones que se estudiaron fueron sólo de un 11% y un 22%, es necesario conocer bien las aplicaciones que la molécula producida puede tener para averiguar si la producción es rentable o no.

3.2 Aplicaciones de β -ciclodextrina tiolada

Reemplazar un grupo hidroxilo por un grupo tioéter en cualquier molécula tiene diversas aplicaciones debido a la reactividad del grupo molecular. Además, el estar unido a una molécula supramolecular como puede ser la ciclodextrina, hace que ese campo de aplicaciones sea mucho más amplio debido a su propiedad de formar complejos de inclusión. Algunos ejemplos se expondrán a continuación.

a. Interacción con nanopartículas (NPs) metálicas

Desde el punto de vista supramolecular, la β -ciclodextrina puede interaccionar con NPs metálicas como puede ser oro (Au) o plata (Ag) mediante el azufre, ya que se adhiere a la superficie metálica. Esto hace que puedan funcionalizarse añadiendo grupos moleculares. De esta manera, se consiguen buenas propiedades catalíticas gracias a la contribución del Au^[15].

También pueden utilizarse para detectar moléculas mediante SERS, en donde se forma un complejo de inclusión “host-guest” con la molécula objeto del estudio, como se observa en la **Figura 4**^[16]

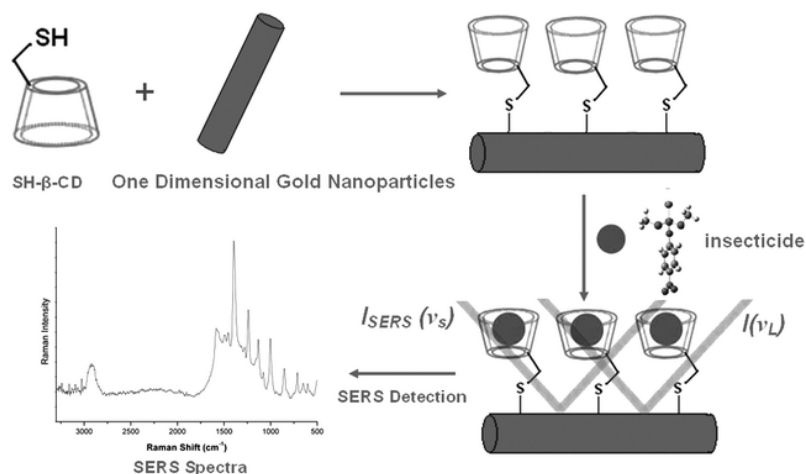


Figura 4. Ejemplo de utilización de β -ciclodextrina tiolada para la detección mediante SERS con NPs en forma de barra de Au

También se puede enlazar a NPs cilíndricas de Ag para detección por SERS de diferentes partículas (**Figura 5**).^[17]

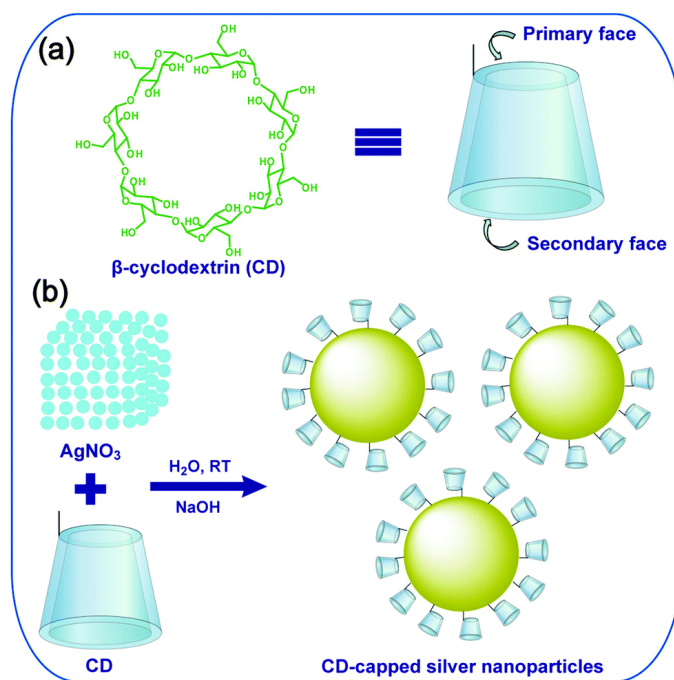


Figura 5. Ejemplo de utilización de β -ciclodextrina tiolada para detección mediante SERS con NPs cilíndricas de Ag

b. *Enlaces disulfuro*

Una de las propiedades más importantes del grupo tioéter es su facilidad para formar enlaces disulfuro. Si el puente se forma entre dos ciclodextrinas, la capacidad de formar complejos de inclusión de la supramolécula es mucho mayor. Esto se traduce en que puede formar complejos “host-guest” con moléculas mucho más grandes^[18]

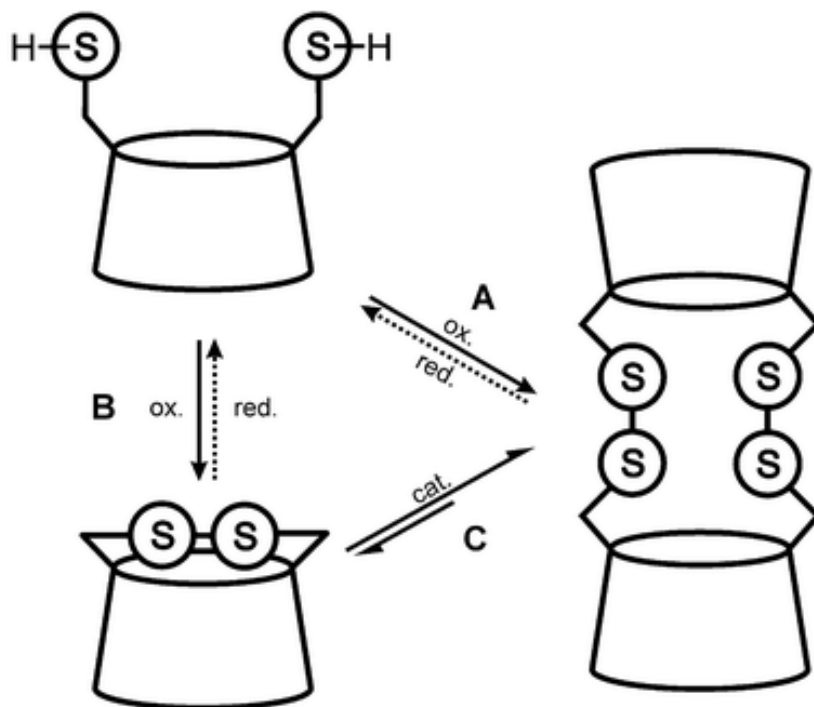


Figura 6. Formación enlace disulfuro entre dos ciclodextrinas

c. *Grupo tiol más reactivo que el hidroxilo*

Los tioles, compuestos con grupo $-SH$, son más ácidos que los alcoholes, compuestos con grupo $-OH$, lo que significa que tienen un pK_a más bajo. Al ser menos básicos son más nucleófilos por lo que el tiolato ($R-S^-$) puede reaccionar con muchos más electrófilos que el alcóxido ($R-O^-$)

Un ejemplo sería reacciones de sustitución nucleófila aromática^[19]

4. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

4.1 Reactivos

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- β -Ciclodextrina (β -CD), PM=1162,8 g/mol; cloruro de p-toluensulfonilo (TsCl), PM=190,65 g/mol; tiourea, PM= 76,12 g/mol, tricloroetileno, PM=131,4 g/mol. Suministrados por Sigma
- Hidróxido de sodio (NaOH), PM=40 g/mol. Suministrado por Aldrich
- Metanol, PM=32 g/mol

Todos ellos eran de un grado de pureza suficientemente elevado lo que hizo innecesaria su purificación. Las disoluciones fueron preparadas en todos los casos por pesada directa.

4.2 Mono-6-O-(p-toluensulfonyl)- β -ciclodextrina (β -CD-OTs)

a. Procedimiento experimental^[20]

En un matraz, se disolvieron 5 gramos de β -CD en una disolución de 2,5 g de NaOH en 150 mL de H₂O, tras lo cual se llevó la disolución a 0°C en un baño de hielo.

Se añadió 5 gramos de TsCl y con agitación magnética, se removió durante 2 horas procurando siempre que el matraz estuviese bien frío reponiendo el hielo cada hora.

Transcurrido el tiempo, se añadieron 3 gramos más de TsCl y se agitó durante 3 horas.

A continuación, se preparó una placa filtrante con una capa bien compacta de celita. Se filtró a vacío la disolución consiguiendo que el TsCl en exceso quedase en la capa de celita.

Se añadieron 35 mL de HCl 10% (m/v) a partir de HCl comercial (37% y d=1,18 g/mL) y se dejó toda la noche en la nevera.

Al día siguiente se filtró a vacío con placa filtrante y el sólido se volvió a disolver en la mínima cantidad de agua caliente. Se dejó toda la noche recristalizando. Se repitió este proceso un mínimo de dos veces más.

La última vez se dejó secando en la placa filtrante, se metió en un vial previamente tarado y se colocó en el desecador, consiguiendo así un rendimiento del 22%. Se llevó a cabo un estudio ¹H-RMN.

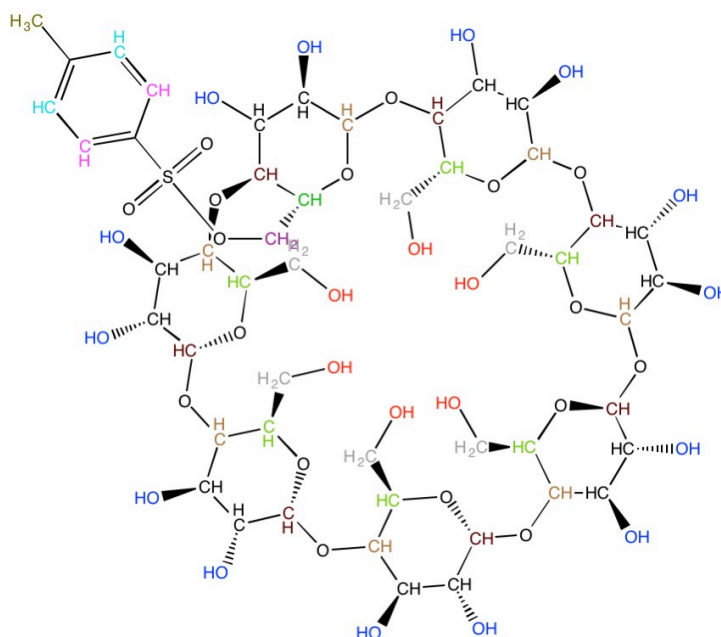


Figura 7. β -ciclodextrina tosilada (β -CD-OTs)

b. Caracterización

^1H -RMN (DMSO, 300 MHz) δ (ppm): 7.7 (A) (d, 2H, Ar-H); 7.38 (B) (d, 2H, Ar-H); 5.73-5.64 (C) (m, 14H, -CHOH); 4,8 (D) (m, 6H, CHCH₂OH); 4.48 (E) (t, 3H, Ar-CH₃); 4,29-4.27 (F) (m, 1H, CHCH₂SH); 3.61-3.31(G) (m, 40H); 2.38 (H) (s, 2H, CH₂-OTs).

Las señales entre 3.61-3.31 se corresponden a los siguientes -H: 3.8 (m, 14H, CHOH), 3.6 (m, 12H, CHCH₂OH); 3.5 (m, 7H, -OCHO-); 3.3 (combinado con la señal del agua) (m, 7H, -OCHO-)

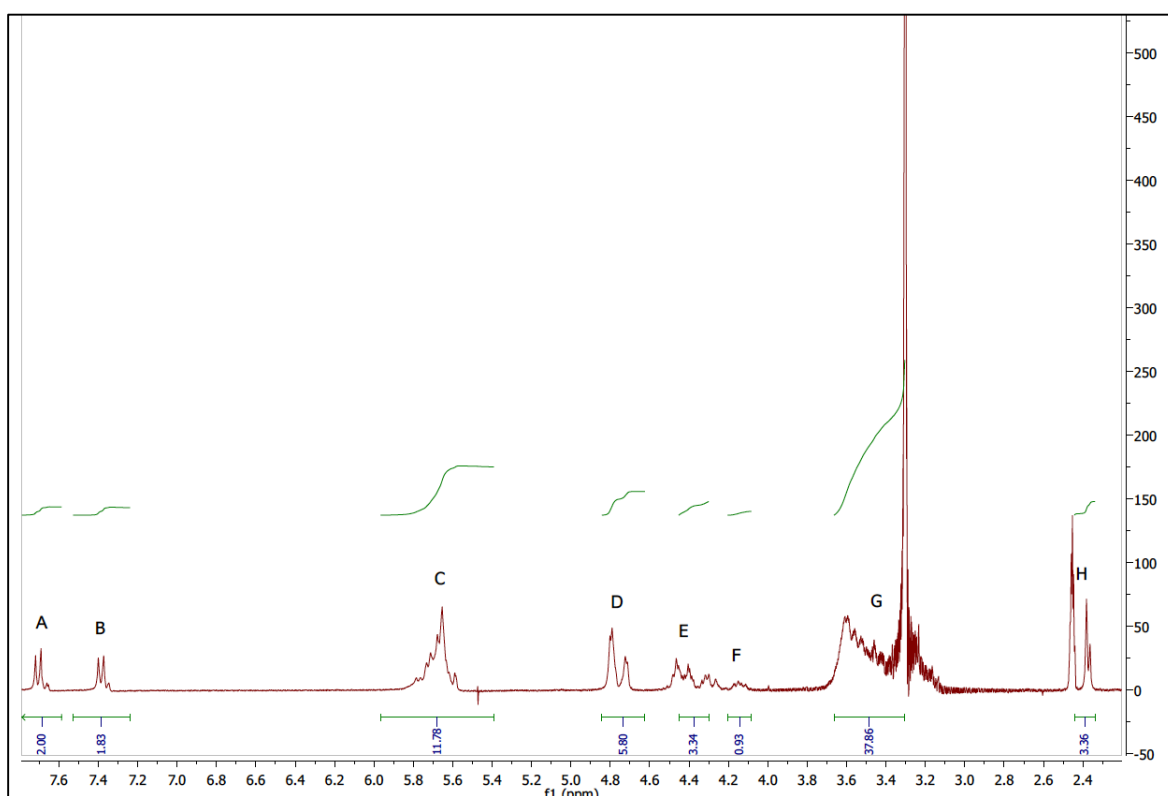


Figura 8. Espectro RMN- ^1H de β -ciclodextrina tosilada (β -CD-OTs)

4.3 Mono-6-tio- β -ciclodextrina (β -CD-SH)

a. *Procedimiento experimental*^[21]

En un matraz se añadió 1,5 gramos de β -CD-OTs que se disolvieron en 37,5 mL de una disolución metanol:agua (80:20). Tras lo cual se añadió 1,5 gramos de tiourea.

Se puso a reflujo con un septum y un globo de argón (Ar) durante 3 días con agitación magnético a 75°C. Transcurrido ese tiempo, se bajó la temperatura hasta 20°C y se llevó al rotavapor hasta que se evaporó todo el disolvente.

Al soluto resultante se añadió 22,5 mL de metanol, rascando bien con una varilla para bajar todo el sólido de las paredes del matraz. Se removió con agitación magnética durante 1 hora a temperatura ambiente con un septum y un globo.

Se filtró con placa filtrante y se dejó toda la noche en la placa tapado con papel de parafina. Al día siguiente se añadió 7,5 mL de una disolución de NaOH y se agitó durante 5 horas a unos 50°C con refrigerante.

La disolución se acidificó con HCl hasta pH=2 y luego se añadió 3,6 mL de tricloroetileno. Se dejó toda la noche agitando con septum y un globo. Al día siguiente se filtró a vacío y el soluto se disolvió en agua.

Cuando estuvo fría la disolución, se añadió gota a gota sobre un matraz con etanol observándose la formación de un producto muy fino. Es necesario tener en cuenta que si hay poco etanol no se observará el precipitado, y si se añade el etanol gota a gota sobre el producto tampoco se observará el precipitado.

Se filtró en una placa filtrante el polvo fino dejando que primero se asiente en una capa antes de poner el vacío.

El producto resultante se añadió en un vial tarado y se colocó en el desecador para eliminar todo el etanol, consiguiendo un rendimiento del 11%. Se llevó a cabo un estudio ¹H-RMN.

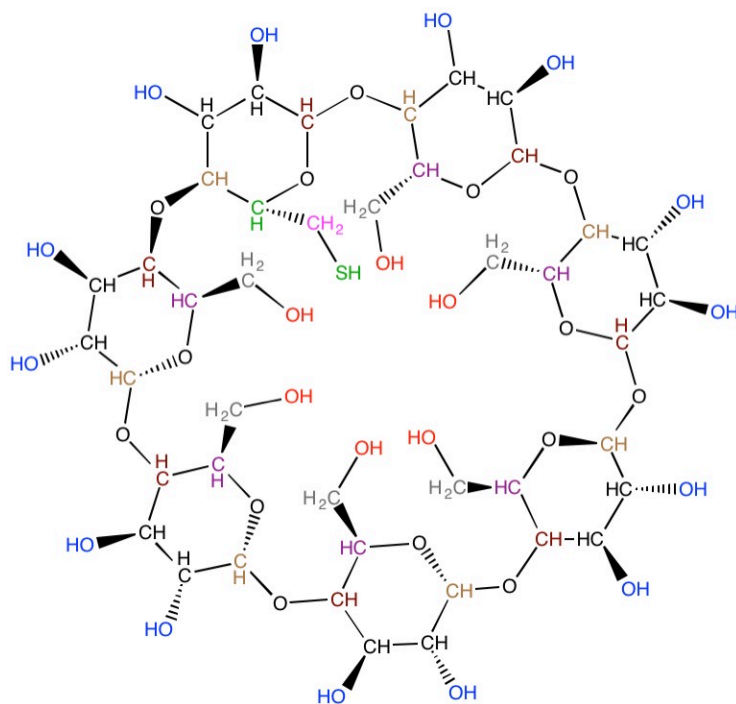


Figura 9. β -ciclodextrina tiolada (β -CD-SH)

b. Caracterización

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO, 300 MHz) δ (ppm): 5.7-5.8 (**A**) (m, 14H, -CHOH); 4.9 (**B**) (s, 1H, CHCH₂SH); 4.8 (**B**) (m, 6H, CHCH₂OH); 4.4 (**C**) (m, 6H, CH₂OH); 3.8 (**D**) (m, 14H, CHOH), 3.6 (**D**) (m, 12H, CHCH₂OH); 3.5 (**D**) (m, 7H, -OCHO-); 3.3 (**E**) (combinado con la señal del agua) (m, 7H, -OCHO-), 2.5 (**F**) (s, 2H, CHCH₂SH); 1.1 (**G**) (t, 1H, SH)

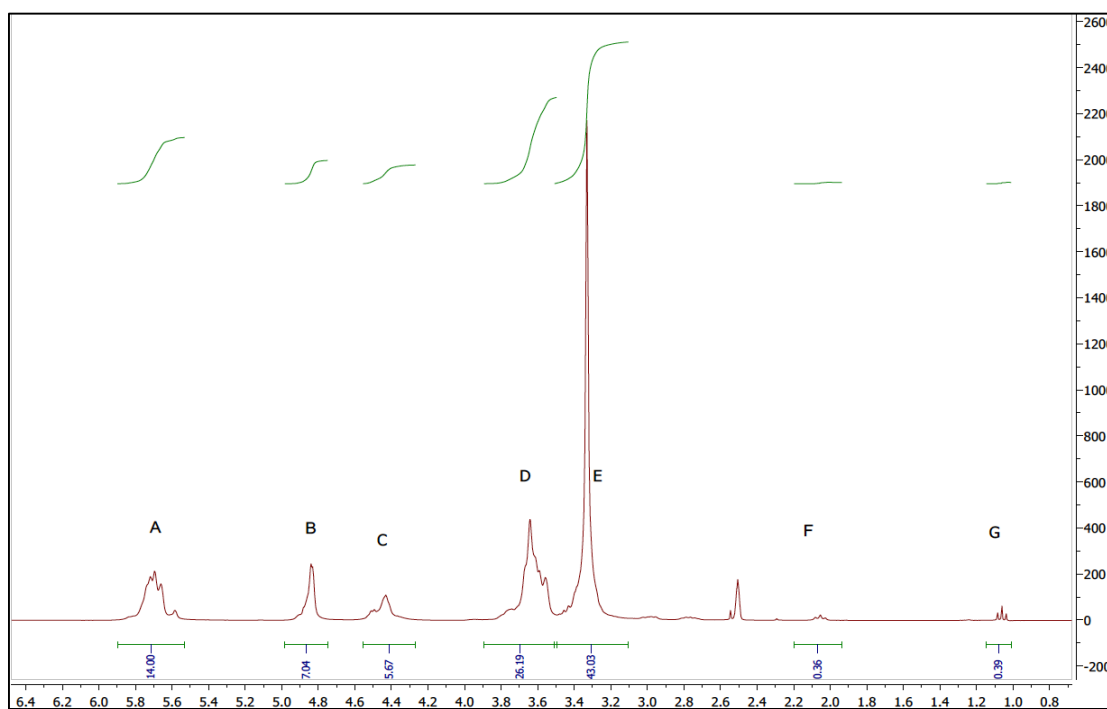


Figura 10. Espectro RMN- ^1H de β -ciclodextrina tiolada (β -CD-SH)

5. PROPIEDADES DE β -CD-SH

5.1 Acidez

Se estudió el pK del grupo tiol de la molécula final utilizando un pH-metro.

El pH-metro es un instrumento que tiene un sensor (electrodo) que utiliza un método electroquímico para medir el pH de una disolución.

La determinación del pH consiste en medir el potencial que se desarrolla a través de una fina membrana de vidrio que separa dos disoluciones con diferentes concentraciones de protones (H^+). Una celda para la medida del pH consiste en un par de electrodos, uno de calomelanos ($Hg|Hg_2Cl_2$) y otro de vidrio sumergido en la disolución que queremos medir el pH.

La varita de soporte de electrones es de vidrio común y no es conductora de la electricidad, mientras que el bulbo, que es el extremo sensible del electrodo, está formado por un vidrio polarizable (sensible de pH)

Se llena el bulbo con la disolución de HCl 0,1 N saturado con AgCl. El voltaje en el interior del bulbo es constante porque se mantiene su pH constante (pH 7) de manera que la diferencia de potencial solo depende del pH del medio externo.

El alambre que se sumerge al interior (normalmente Ag|AgCl) permite conducir este potencial hasta un amplificador.



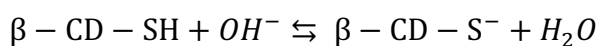
Figura 11. pH-metro

En un vial se añadieron 5 mL de β -CD-SH 5 mM y se le midió el pH (6,15). Tras lo cual se fueron añadiendo distintos μ L de NaOH y se fue midiendo el pH, como se observa en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Valores de pH a distintas [NaOH] y de [β -CD-SH]

mmol NaOH	μ L de NaOH	pH	[NaOH] recalculada (mM)	[β -CD-SH] recalculada (mM)
$2,5 \times 10^{-3}$	100	8,81	0,490	4,902
5×10^{-3}	200	9,59	1,415	4,717
5×10^{-3}	200	10,14	2,273	4,545
5×10^{-3}	200	10,62	3,070	4,386
$2,5 \times 10^{-3}$	100	10,77	3,448	4,310
$2,5 \times 10^{-3}$	100	10,86	3,814	4,237

De esta forma se halló el pK representando en una hoja de cálculo los datos anteriores mediante la siguiente ecuación como se observa en el **Gráfico 1**.



$$[\text{HA}] = [\beta - \text{CD} - \text{SH}] - [\text{OH}^-]$$

$$[\text{A}^-] = [\text{NaOH}] = [\text{OH}^-]$$

Ecuación 1

$$pH = pK + \log \left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right)$$

Tabla 3. Valores de pH y del logaritmo del cociente de concentraciones

pH	$\log \left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right)$
8,81	$-9,54 \times 10^{-1}$
9,59	$-3,68 \times 10^{-1}$
10,14	$0,00 \times 10^0$
10,62	$3,68 \times 10^{-1}$
10,77	$6,02 \times 10^{-1}$
10,86	$9,54 \times 10^{-1}$

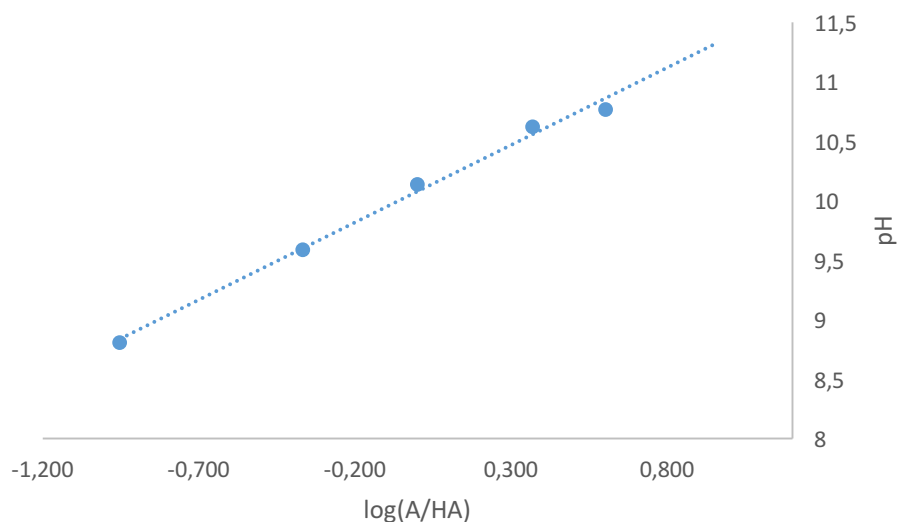


Gráfico 1. Representación del pH frente al logaritmo de las concentraciones

La ecuación de la recta es $y=1,299x + 10,077$, en donde la pendiente es $1,3 \pm 0,1$ y la ordenada en el origen es $10,1 \pm 0,2$.

Por lo que el pK del H^+ del grupo $-SH$ (tioéter) será de $10,1 \pm 0,2$

5.2 Polaridad

Para esta parte del estudio se utilizó un Espectrofotómetro de fluorescencia CARY ECLIPSE, también llamado Fluorímetro.

La fluorescencia es un proceso de emisión de luz por átomos y moléculas excitadas al absorber luz o radiación electromagnética. Cuando los átomos o moléculas excitadas se relajan al estado fundamental, liberan el exceso de energía en forma de fotones. Esta emisión induce modificaciones, tales como la vida media, rendimiento cuántico, entre otras.

La espectrometría de fluorescencia o fluorimetría es un tipo de espectroscopia que permite analizar y medir la fluorescencia de una muestra. Los fluorímetros son los dispositivos que permiten medir los parámetros de la fluorescencia de una muestra como su intensidad y la distribución de longitudes de onda del espectro de emisión después de la excitación por una fuente de luz monocromática de alta energía. Mediante un sistema de monocromadores es posible seleccionar el rango de longitudes de onda de interés.



Figura 12. Espectrofotómetro de fluorescencia CARY ECLIPSE o Fluorímetro
Se utilizó para este experimento, una sonda fluorescente; en concreto, el Prodan (6-propionil-2-dimetilamino-naftaleno), cuya estructura se representa en la **Figura 13**:

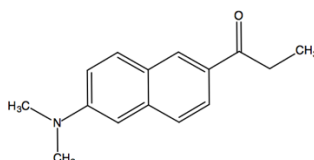


Figura 13. Estructura del Prodan

Una sonda fluorescente es un indicador cromático que sirvió, en este caso, para determinar las constantes de formación para la complejación de β -CD y β -CD-SH.

Para ello, se prepararon las muestras en cubetas de cuarzo. Antes de la realización de las medidas, las cubetas con los reactivos se mantuvieron durante 10 minutos en el portacubetas del espectrofotómetro cuya temperatura se mantuvo constante mediante el flujo de agua procedente de un termostato.

La longitud de onda de excitación fueron 380 nm.

En un primer momento se realizó el estudio con β -CD cuyos resultados como se observan en la **Tabla 4**^[22]. Tras lo cual, se realizó el estudio con β -CD-SH, **Tabla 5**, y se compararon ambos resultados.

$$V_{prodan} = \frac{1\mu M \times 2500\mu L}{170,7\mu L} = 15\mu L$$

Tabla 4. Valores de volúmenes para distintas concentraciones de β -CD

$[\beta\text{-CD}](M)$	0	0,0003	0,0006	0,001	0,002	0,004	0,007
$V_{\beta\text{-CD}} (\mu L)$	0	75	150	250	500	1000	1750
$V_{H_2O} (\mu L)$	2485	2410	2385	2235	1985	1485	735

Tabla 5. Valores de volúmenes para distintas concentraciones de β -CD-SH

$[\beta\text{-CD-SH}](\text{M})$	0	1×10^{-5}	$1,5 \times 10^{-5}$	2×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-5}$	7×10^{-5}	$1,5 \times 10^{-4}$	3×10^{-4}	6×10^{-4}	8×10^{-4}	1×10^{-3}
$V_{\beta\text{-CD-SH}}(\mu\text{L})$	0	50	75	100	125	35	75	150	300	400	500
$V_{\text{H}_2\text{O}}(\mu\text{L})$	2485	2435	2410	2385	2360	2450	2410	2335	2185	2085	1985

Para la β -CD se partió de una concentración de $[\beta\text{-CD}] = 10 \text{ mM}$, mientras que para la β -CD-SH se partieron de dos concentraciones, $[\beta\text{-CD-SH}] = 5 \text{ mM}$ para valores de $[\beta\text{-CD-SH}]_{\text{cubeta}} \geq 7 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $[\beta\text{-CD-SH}] = 0,5 \text{ mM}$ preparado a partir de la disolución 5 mM para valores de $[\beta\text{-CD-SH}]_{\text{cubeta}} < 7 \times 10^{-5} \text{ M}$.

En este caso, en vez de estudiar la intensidad del pico a una longitud de onda dada, se determinó el máximo de longitud de onda, observándose que a mayor $[\beta\text{-CD-SH}]$, el pico se desplazará más hacia valores de longitud de onda más pequeños, como se observan en **Gráfico 2** (para la β -CD) y en **Gráfico 3** (para la β -CD-SH)

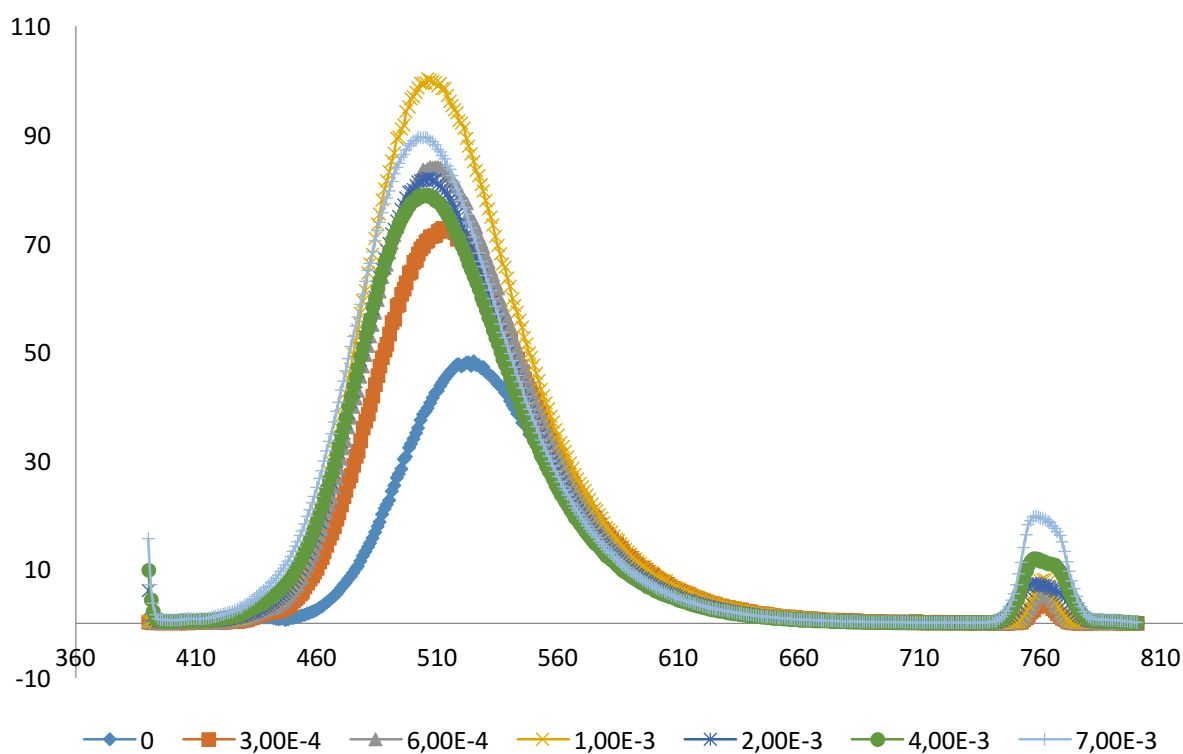


Gráfico 2. Espectro de fluorescencia a distintas concentraciones de β -CD

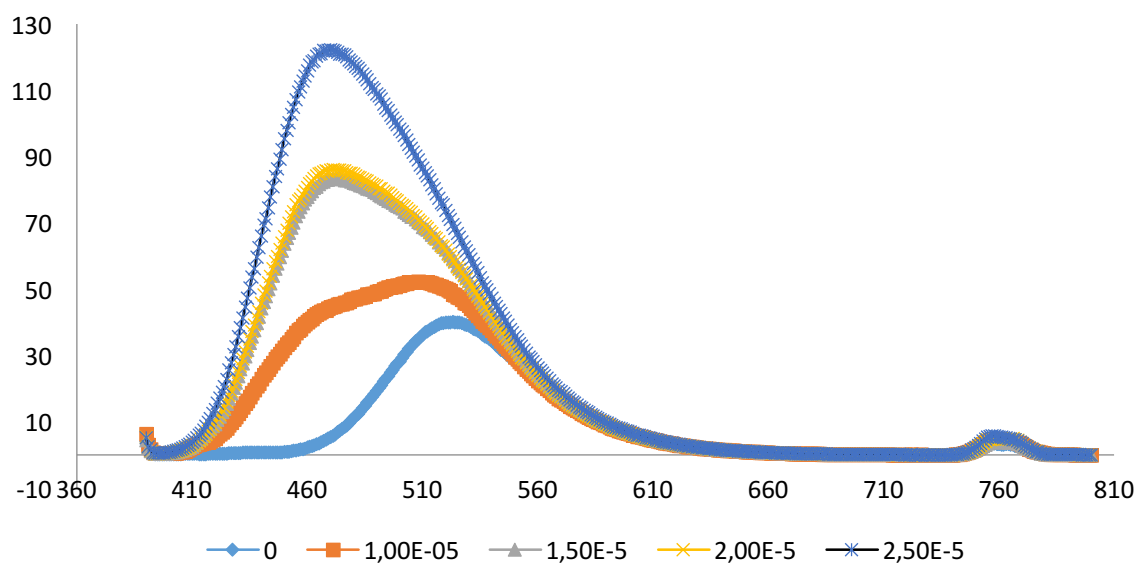


Gráfico 3. Espectro de fluorescencia a distintas concentraciones de β -CD-SH

Se observa cómo se desplaza la longitud de onda hacia menores valores al aumentar la $[\beta$ -CD-SH]

De esta forma, se recogieron los siguientes valores de longitud de onda para β -CD (Tabla 6) y para β -CD-SH (Tabla 7) que se representaron conjuntamente en el Gráfico 4 para poder compararlos.

Tabla 6. Longitud de onda del pico del espectro de fluorescencia a distintas concentraciones de β -CD

$[\beta$ -CD]/M	0	0,0003	0,0006	0,001	0,002	0,004	0,007
λ /nm	525,1	511,9	509,0	506,0	506,0	506,0	506,0

Tabla 7. Longitud de onda del pico del espectro de fluorescencia a distintas concentraciones de β -CD-SH

$[\beta$ -CD-SH]/M	0	1×10^{-5}	$1,5 \times 10^{-5}$	2×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-5}$	7×10^{-5}	$1,5 \times 10^{-4}$	3×10^{-4}	6×10^{-4}	8×10^{-4}	1×10^{-3}
λ /nm	523,0	508,1	474,0	471,1	470,0	469,0	468,1	467,0	467,0	467,0	465,1

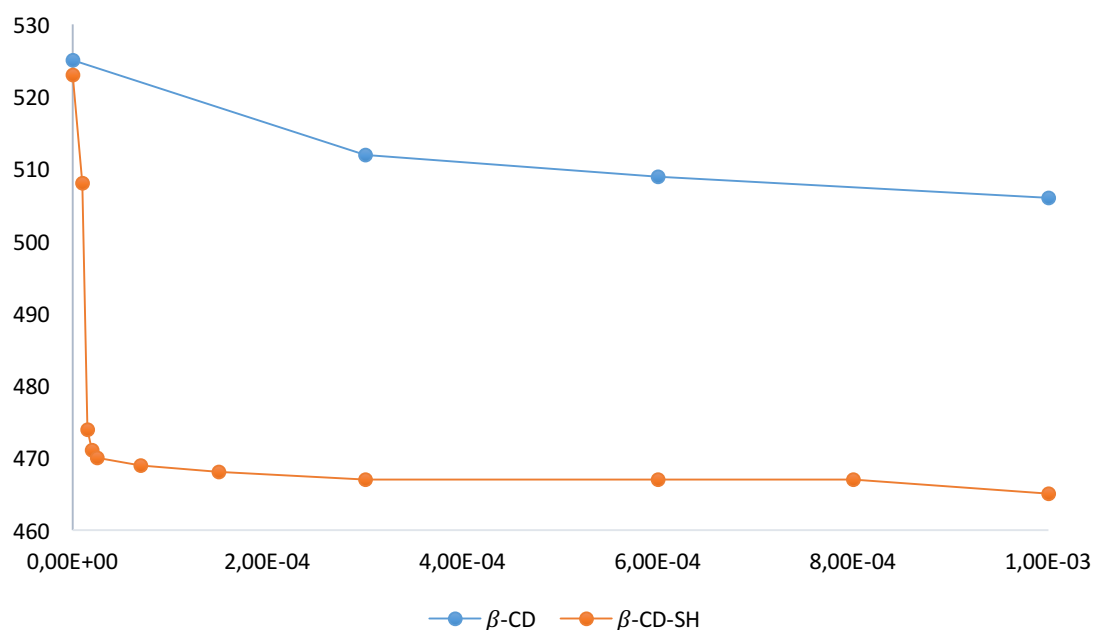


Gráfico 4. Comparación entre β -CD y β -CD-SH de las longitudes de onda del pico del espectro de fluorescencia a distintas concentraciones.

Como se observa en el **Gráfico 4** hay una diferencia notable entre las constantes de formación para la complejación de β -CD y β -CD-SH. Es muy interesante este cambio, teniendo en cuenta que solo se modificó un $-OH$ primario de una de las unidades de glucosa de la β -CD inicial.

5.3 Reactividad MNTS

El MNTS es un compuesto conocido como Diazald o N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida y de fórmula molecular $C_8H_{10}O_3SN_2$. Su estructura se observa en la **Figura 14**.

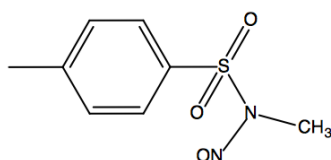
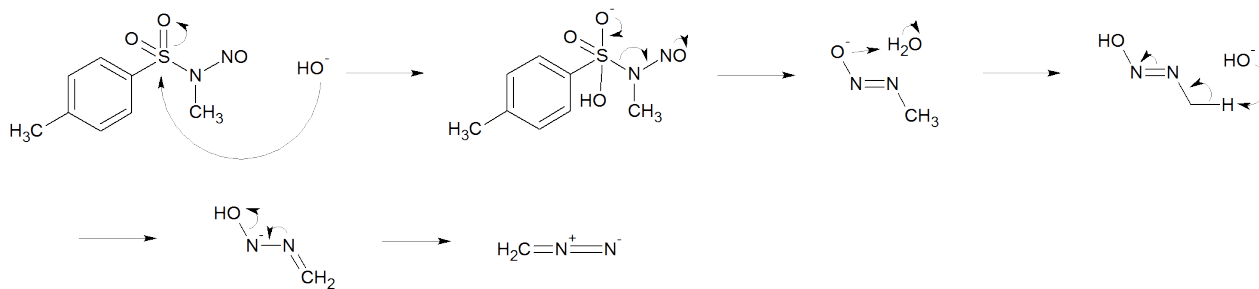


Figura 14. Estructura del MNTS

Es un compuesto cancerígeno si se ingiere. Al ser un sólido sólo es peligroso por ingesta directa. Esto se solucionó añadiendo todo el material que tocaba el producto, guantes incluidos, en un baño de agua con NaOH. El Diazald reacciona con el NaOH en

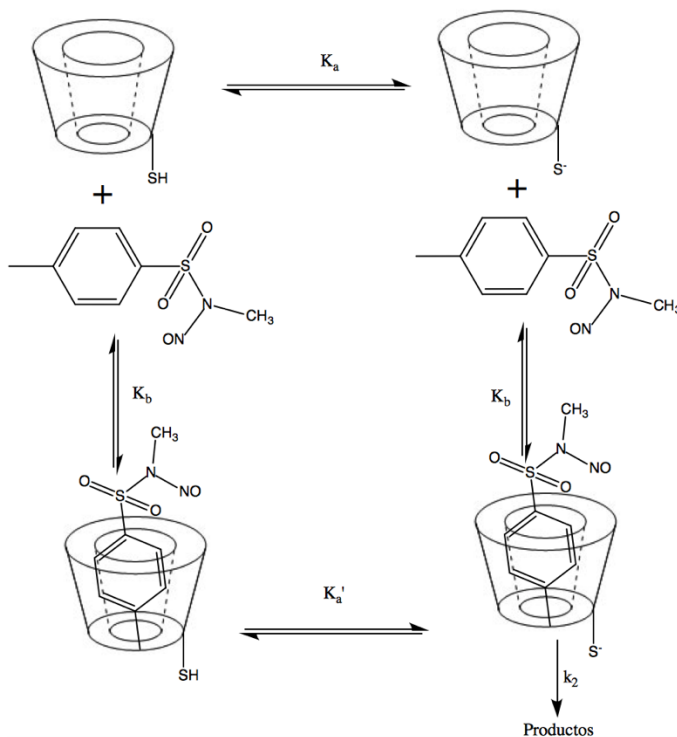
una reacción de hidrólisis, produciendo diazometano, como se observa en la **Esquema 4**, consiguiendo productos menos dañinos que el MNTS.



Esquema 4. Mecanismo hidrólisis Diazald

La reacción que se estudió mediante diversos métodos con este compuesto se observa en la **Esquema 5**. En ella se expone un posible mecanismo de la reacción en el cual el MNTS se coloca dentro de la cavidad de β -CD-SH tanto si ésta está en su forma básica (sin el H^+ del grupo $-SH$) como en su forma ácida.

Al final de este apartado se estudiará si este mecanismo puede ser el correcto.



Esquema 5. Mecanismo de β -CD-SH con MNTS

a. *Espectrofotómetro secuencial stopped-flow*

Para este experimento se utilizó un espectrofotómetro secuencial de flujo detenido, “stopped-flow”. Este equipo permite el seguimiento de reacciones químicas rápidas, realizándose el seguimiento del avance de la reacción por medidas espectrofotométricas.

El instrumento consta de:

- Una lámpara de arco de xenón de 150W
- Un monocromador que permite seleccionar la longitud de onda de trabajo
- Una unión de fibra óptica que transporta la radiación del monocromador hasta la célula de mezclado
- Una unidad de inyección de muestras con dos entradas provistas de dos jeringas, movidas por una bala de aire, por medio de las cuales se inyectan los reactivos que fluyen a través de la célula de mezclado.
- Un termostato HETC que mantiene la celda de reacción a $25\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.
- Dos tubos fotomultiplicadores (uno para medidas de fluorescencia) que detectan la radiación que atraviesa la celda de reacción y transforma la señal óptica en señal eléctrica analógica.
- Una señal de trabajo donde se filtra la señal procedente del detector y se introduce en el ordenador mediante un convertidor analógico digital. El ordenador consta de un programa que permite el análisis de los datos.

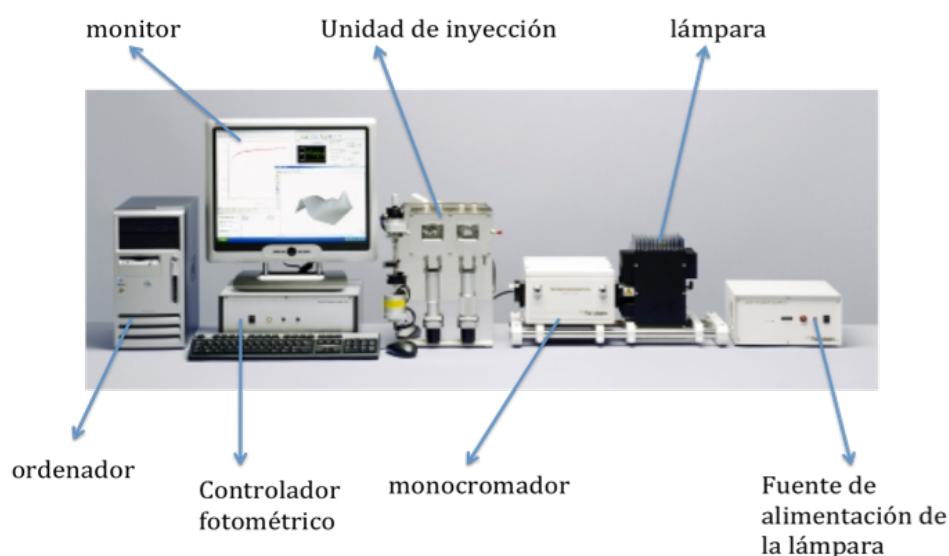


Figura 15. Espectrofotómetro secuencial de stopped-flow

Se realizaron las medidas a 340 nm. Se realizaron disoluciones necesarias también para las medidas cinéticas en el espectrofotómetro. En ellas se fue variando la concentración de NaOH para así conseguir disoluciones a distintos pH.

A partir de [NaOH]=0,025 M

5 mL de [β -CD-SH]= 5 mM

$$5 \text{ mL } \beta - \text{CDSH} \times \frac{10^{-3} \text{ L}}{1 \text{ mL}} \times \frac{5 \times 10^{-3} \text{ mol}}{1 \text{ L}} \times \frac{1150,35 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 0,02875 \text{ g}$$

- 5 mM [β -CD-SH] y 1 mM [NaOH] (5 mL)

$$\circ 0,02884 \text{ g de } \beta - \text{CDSH y } V_{\text{NaOH}} =$$

$$\frac{1 \times 10^{-3} \times 5000}{0,025} = 200 \mu\text{L}$$

- 5 mM [β -CD-SH] y 2 mM [NaOH] (5 mL)

$$\circ 0,02860 \text{ g de } \beta - \text{CDSH y } V_{\text{NaOH}} =$$

$$\frac{2 \times 10^{-3} \times 5000}{0,025} = 400 \mu\text{L}$$

- 5 mM [β -CD-SH] y 2,5 mM [NaOH] (5 mL)

$$0,02900 \text{ g de } \beta - \text{CDSH y } V_{\text{NaOH}} = \frac{2,5 \times 10^{-3} \times 5000}{0,025} = 500 \mu\text{L}$$

- 5 mM [β -CD-SH] y 4 mM [NaOH] (5 mL)

$$0,02884 \text{ g de } \beta - \text{CDSH y } V_{\text{NaOH}} = \frac{4 \times 10^{-3} \times 5000}{0,025} = 800 \mu\text{L}$$

- 0,4 mM [MNTS] (20 mL) a partir de [MNTS]=5 mM

$$V_{\text{MNTs}} = \frac{0,43 \times 20000}{5} = 1600 \mu\text{L}$$

Las medidas en el stopped-flow se hicieron para 50, 100 y 200 segundos. Hay que tener en cuenta que son tiempos de reacción muy elevados para hacer en el stopped-flow, por lo que puede haber interferencias debido a que la válvula debe estar ejerciendo presión durante demasiado tiempo.

Tabla 8. Valores de constantes de velocidad, diferencias de absorbancia y absorbancia a tiempo infinito para disoluciones con distintas [NaOH]

[NaOH]/mM	t/s	Δ Abs	k/s^{-1}	Abs($t=\infty$)
1	100	0,046	$0,01348 \pm 4 \times 10^{-4}$	0,1825
1	200	0,057	$0,00902 \pm 4,5 \times 10^{-4}$	0,2040
2	50	0,022	$0,02362 \pm 1,2 \times 10^{-4}$	0,2090
2	100	0,026	$0,01611 \pm 6,4 \times 10^{-4}$	0,2180
2	200	0,025	$0,01587 \pm 4,8 \times 10^{-4}$	0,2260
2,5	100	0,029	$0,03228 \pm 13,0 \times 10^{-4}$	0,0220
2,5	150	0,032	$0,01461 \pm 7,3 \times 10^{-4}$	0,0350
4	50	0,021	$0,03076 \pm 12,3 \times 10^{-4}$	0,2560
4	100	0,021	$0,02140 \pm 10,7 \times 10^{-4}$	0,2703
4	200	0,023	$0,01875 \pm 5,6 \times 10^{-4}$	0,2770

Debido a que son tiempos de reacción muy elevados y a que se observaba que la reacción había terminado, se decidió estudiar la reacción en el espectrofotómetro UV-Vis. Esto significó que la reacción era más lenta de lo que se supuso en un primer momento.

b. Experimental

Para esta parte del experimento se utilizó un espectrofotómetro CARY 50 UV-Vis, termostatizado a 25°C. Las muestras se prepararon en las cubetas en donde se realizaron las medidas. Estas cubetas eran de 1 cm de paso de luz y se mantuvieron tapadas durante las medidas. Los reactivos se añadieron directamente en las cubetas progresivamente mediante pipetas automáticas calibradas. Debido a que la reacción era muy rápida, no se termostataron las cubetas en el espectrofotómetro cuya temperatura se mantuvo constante a 25°C mediante el flujo de agua procedente de un termostato. El portacubetas es múltiple y está directamente controlado por el software de medida lo que nos permite realizar varios experimentos simultáneamente. Las medidas se realizaron a 340 nm

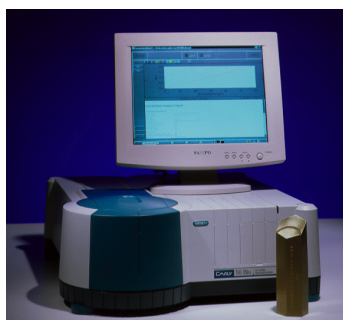


Figura 16. Espectrofotómetro CARY50 UV-Vis

Se utilizaron para las medidas las mismas disoluciones que para el stopped-flow. Recordemos que las cubetas tenían un volumen final de 2,5 L (2500 μ L)

5 mM [β -CD-SH] y 1 mM [NaOH] (5 mL)

5 mM [β -CD-SH] y 2 mM [NaOH] (5 mL)

5 mM [β -CD-SH] y 2,5 mM [NaOH] (5 mL)

5 mM [β -CD-SH] y 4 mM [NaOH] (5 mL)

0,4 mM [MNTS] (20 mL)

Se necesitaba llegar a un punto la absorbancia no variaba con el tiempo lo que suponía que la reacción había terminado. Se probó hacer medidas durante 2 horas a una longitud de onda de 340 nm con la disolución que contiene [NaOH]=2,5 mM

Transcurrido las 2 horas se observó que la reacción no había terminado. Por lo que se repitió durante 10 horas haciendo medidas cada 0,1 min (3 s) a 340 nm y la misma cantidad de [NaOH]

Se observó que la reacción no era que no había terminado sino que el perfil de absorbancia es debido a una precipitación. La β -CD-SH es muy inestable en agua y al nitrosarla se vuelve todavía más insoluble. Los primeros 200 min se forman aglomerados del compuesto que van creciendo (de ahí que se observe ese aumento de absorbancia) hasta que son lo suficientemente grandes como para que precipiten (disminución de absorbancia).

Al ver la cubeta sobre fondo negro previamente agitada se observa turbidez.

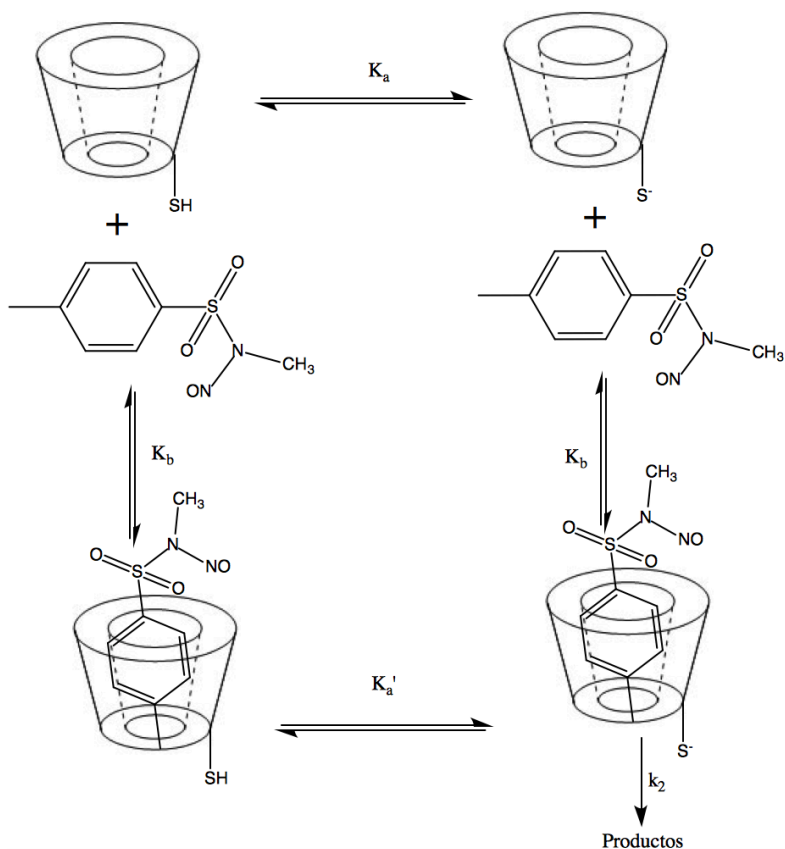


Figura 17. Cubeta con la disolución donde se observa cierta turbidez en el fondo

Esto supuso que los valores del experimento del stopped-flow fueron los más óptimos para estudiar la reacción con el MNTS, ya que a tiempos tan cortos la formación de aglomerados podía considerarse nula. Por lo que se descartaron los valores del espectrofotómetro UV-Vis y se retomaron los valores del stopped-flow.

c. Mecanismo

Llegados a este punto se trabajará con las ecuaciones de las constantes de equilibrio y de velocidad y con los datos conseguidos en el experimento con el stopped-flow se intentará llegar a una ecuación en donde se confirmará o se rechazará este posible mecanismo de pseudo-primer orden.



Esquema 6. Mecanismo de β -CD-SH con MNTS

Se considera que el equilibrio de acidez del β -CD-SH no está afectado por la inclusión del MNTS (Diazald)

$$K_a = \frac{[CDS^-][H^+]}{[CD-SH]} \quad K_b = \frac{[CDSH \cdot MNTS]}{[CDSH][MNTS]} \quad K_a' = \frac{[CDS^- \cdot MNTS][H^+]}{[CDSH \cdot MNTS]}$$

$$\begin{aligned}
[MNTS]_T &= [MNTS] + [CDSH \cdot MNTS] + [CDS^- \cdot MNTS] \\
&= [MNTS] + K_b[MNTS][CDSH] + \frac{K_a'[CDSH \cdot MNTS]}{[H^+]} \\
&= [MNTS] + K_b[MNTS][CDSH] + \frac{K_a'K_b[CDSH][MNTS]}{[H^+]} \\
&= [MNTS] \left(1 + K_b[CDSH] + \frac{K_a'K_b[CDSH]}{[H^+]} \right)
\end{aligned}$$

Ecuación 2 $[MNTS]_T = [MNTS] \left[1 + \left(K_b + \frac{K_a'K_b}{[H^+]} \right) [CDSH] \right]$

Considerando $[CDSH]_T \gg [MNTS]_t$ podemos hacer el siguiente balance de materia para $[CDSH]_T$:

$$\begin{aligned}
[CDSH]_T &= [CDSH] + [CDS^-] + [CDSH \cdot MNTS] + [CDS^- \cdot MNTS] \\
[CDSH]_T &\approx [CDSH] + [CDS^-] \\
[CDSH]_T &= \frac{[CDS^-][H^+]}{K_a} + [CDS^-] \\
[CDSH]_T &= [CDS^-] \left(\frac{[H^+]}{K_a} + 1 \right) = [CDS^-] \frac{[H^+] + K_a}{K_a} \\
[CDS^-] &= \frac{[CDSH]_T K_a}{[H^+] + K_a}, \text{ si } [CDS^-] = \frac{[CDSH] K_a}{[H^+]} \\
\frac{[CDSH] K_a}{[H^+]} &= \frac{[CDSH]_T K_a}{[H^+] + K_a} \\
[CDSH] &= \frac{[CDSH]_T [H^+]}{[H^+] + K_a}
\end{aligned}$$

Sustituir el valor de $[CDS^-]$ en la ecuación del balance de materia del MNTS

$$[MNTS]_T = [MNTS] \left[1 + \left(K_b + \frac{K_a'K_b}{[H^+]} \right) \frac{[CDSH]_T [H^+]}{[H^+] + K_a} \right]$$

Ecuación de velocidad: **(Ecuación 3)**

Ecuación 3 $v = k_2 [CDS^- \cdot MNTS] = k_2 \frac{[CDSH \cdot MNTS] K_a}{[H^+]}$

$$= k_2 \frac{K_a}{[H^+]} K_b [CDSH] [MNTS]$$

$$[MNTS] = \frac{[MNTS]_T}{\left[1 + \left(K_b + \frac{K_a'K_b}{[H^+]} \right) \frac{[CDSH]_T [H^+]}{[H^+] + K_a} \right]}$$

Sustituir $[MNTS]$ en la ecuación de velocidad:

$$v = k_2 \frac{K_a'}{[H^+]} K_b [CDSH] \frac{[MNTS]_T}{\left[1 + \left(K_b + \frac{K_a'K_b}{[H^+]} \right) \frac{[CDSH]_T [H^+]}{[H^+] + K_a} \right]}$$

$$k_{obs} = \frac{k_2 \frac{K_a'}{[H^+]} K_b [CDSH]}{1 + \left(K_b + \frac{K_a' K_b}{[H^+]} \right) \frac{[CDSH]_T [H^+]}{[H^+] + K_a}}$$

Ecuación 4

$$v = k_{obs} [MNTS]_T$$

$$k_{obs} = \frac{k_2 K_a' K_b}{[H^+]} [CDSH] \frac{1}{1 + \left(K_b + \frac{K_a' K_b}{[H^+]} \right) \frac{[CDSH]_T [H^+]}{[H^+] + K_a}}$$

$$k_{obs} = \frac{k_2 K_a' K_b}{[H^+]} \frac{[CDSH]_T [H^+]}{[H^+] + K_a} \frac{1}{1 + \left(K_b + \frac{K_a' K_b}{[H^+]} \right) \frac{[CDSH]_T [H^+]}{[H^+] + K_a}}$$

Como observación se realizaron los siguientes cálculos para conseguir una ecuación más sencilla:

$$1 + \left(K_b + \frac{K_a' K_b}{[H^+]} \right) \frac{[CDSH]_T [H^+]}{[H^+] + K_a} = 1 + \frac{K_b [H^+] + K_a' K_b}{[H^+]} \frac{[CDSH]_T [H^+]}{[H^+] + K_a}$$

$$= \frac{[H^+]([H^+] + K_a) + (K_b [H^+] + K_a' K_b) [CDSH]_T [H^+]}{[H^+]([H^+] + K_a)}$$

$$k_{obs} = k_2 K_a' K_b \frac{[CDSH]_T}{[H^+] + K_a} \frac{1}{\frac{[H^+] + K_a + (K_b [H^+] + K_a' K_b) [CDSH]_T}{[H^+] + K_a}}$$

$$k_{obs} = k_2 K_a' K_b \frac{[CDSH]_T}{[H^+] + K_a} \frac{[H^+] + K_a}{[H^+] + K_a + (K_b [H^+] + K_a' K_b) [CDSH]_T}$$

$$[CDSH] = 5 \text{ mM} = 5 \times 10^{-3} \text{ M} = 0,005 \text{ M}$$

$$\frac{k_{obs}}{0,005} = \frac{k_2 K_a' K_b}{[H^+] + K_a + (K_b [H^+] + K_a' K_b) 0,005}$$

$$\frac{k_{obs}}{0,005} = \frac{k_2 K_a' K_b}{[H^+] + K_a + K_b [H^+] 0,005 + K_a' K_b 0,005}$$

$$\frac{k_{obs}}{0,005} = \frac{k_2 K_a' K_b}{K_a + K_a' K_b 0,005 + (0,005 K_b + 1) [H^+]}$$

$$\frac{k_{obs}}{0,005} = \frac{\frac{k_2 K_a' K_b}{K_a + K_a' K_b 0,005}}{1 + \frac{0,005 K_b + 1}{K_a + K_a' K_b 0,005} [H^+]} \Rightarrow y = \frac{a}{1 + bx}$$

De esta forma, reordenando la ecuación se consigue una ecuación de primer orden (**Ecuación 5**) que se representará gráficamente (**Gráfico 5**) utilizando los datos del experimento del stopped-flow (**Tabla 9**)

$$\text{Ecuación 5} \quad \boxed{\frac{0,005}{k_{obs}} = \frac{K_a + K_a' K_b 0,005}{k_2 K_a' K_b} + \frac{\frac{0,005 K_b + 1}{K_a + K_a' K_b 0,005}}{\frac{k_2 K_a' K_b}{K_a + K_a' K_b 0,005}} [H^+]} \Rightarrow \frac{1}{y} = \frac{1}{a} + \frac{b}{a} x$$

Tabla 9. Valores del experimento del stopped-flow

[CDSH]/M	[OH] _{eq} /M	k _{obs} /s ⁻¹	[OH] _{add} /M	[H ⁺]/M	1/y
0,005	3,02E-05	0,009±4,5x10 ⁻⁴	0,001	3,31E-10	0,554
0,005	8,39E-05	0,016±6,4x10 ⁻⁴	0,002	1,19E-10	0,311
0,005	0,0001	0,023±1,2x10 ⁻⁴	0,003	1,00E-10	0,215
0,005	0,0005	0,031±12,3x10 ⁻⁴	0,004	2,00E-11	0,162

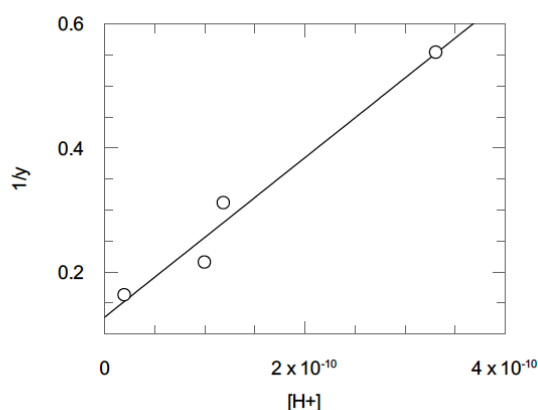


Gráfico 5. Representación gráfica de la ecuación de primer orden

La pendiente de la ecuación es $1,29 \times 10^9 \pm 0,16 \times 10^9$ y la ordenada en el origen es $0,127 \pm 0,029$

$$\text{ordenada} = \frac{K_a + K_a' K_b 0,005}{k_2 K_a' K_b} \quad \text{pendiente} = \frac{\frac{0,005 K_b + 1}{K_a + K_a' K_b 0,005}}{\frac{k_2 K_a' K_b}{K_a + K_a' K_b 0,005}}$$

Se supuso inicialmente que el MNTS no influía en el equilibrio de acidez de β -CD-SH, lo que significa que las constantes de acidez son iguales ($K_a' = K_a$)

$$\begin{aligned} \text{pendiente} &= \frac{0,005 K_b + 1}{k_2 K_a K_b} & \text{ordenada} &= \frac{1 + K_b 0,005}{k_2 K_b} \\ pK_a = 10,1 &\Rightarrow K_a = K_a' = 7,94 \times 10^{-11} \\ \frac{\text{ordenada}}{\text{pendiente}} &= \frac{1 + K_b 0,005}{k_2 K_b} \frac{k_2 K_a K_b}{0,005 K_b + 1} = K_a \\ \frac{\text{ordenada}}{\text{pendiente}} &= \frac{0,127}{1,29 \times 10^9} = 9,84 \times 10^{-11} = K_a \end{aligned}$$

Se observa que el cociente entre ordenada y pendiente da un valor parecido a la constante de acidez del grupo tioéter de la β -CD-SH por lo que se llega a la conclusión de que la suposición del mecanismo inicial es correcta.

Para poder comparar los valores de constantes de velocidad con otras moléculas del grupo tioéter, se supuso un valor a la constante de inclusión del MNTS en la cavidad de la β -ciclodextrina. $K_b \approx 500 \text{ M}^{-1}$

$$\text{pendiente} = 1,29 \times 10^9 = \frac{0,005 \times 500 + 1}{k_2 \times 500 \times 7,94 \times 10^{-11}}$$

$$k_2 = \frac{1 + 0,005 \times 500}{1,29 \times 10^9 \times 500 \times 7,94 \times 10^{-11}} = 0,068 \text{ s}^{-1}$$

La reacción es de segundo orden, pero como la [MNTS] es mucho menor que la de [β -CD-SH] se puede suponer que es de pseudo-primer orden. Pero a la hora de comparar con otros tioles, la reacción es de segundo orden, por lo que para comparar dos valores de constantes cinéticas se necesitan que ambas tengan las mismas unidades. Esto se consigue multiplicando la constante de pseudo-primer orden por la constante de equilibrio.

$$k_2 K_b = 0,068 \text{ s}^{-1} \times 500 \text{ M}^{-1} = 34,17 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Para poder concluir si las suposiciones planteadas inicialmente fueron correctas, es necesario comparar la constante de velocidad de segundo orden calculada anteriormente con la constante de velocidad de una molécula que tenga un tiol de un pK parecido al de la β -CD-SH (pK=10,1).

Por lo que se comparó con una molécula con un tiol de $\text{pK}_a=10,6$, que tiene una constante de velocidad de $K = (19,2 \pm 0,5) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Ambas constantes de velocidad se encuentran dentro del mismo orden de magnitudes por lo que se puede deducir que la reacción sigue un mecanismo.

6. CONCLUSIONES

Español

Se puede concluir que aunque el rendimiento de la síntesis sea bajo, se comprueba que cambiando un único hidroxilo de una de las siete unidades de glucosa, las propiedades de la β -ciclodextrina tiolada han mejorado, especialmente en la complejación con una sonda fluorescente; en este caso el prodan, lo que abre un amplio campo de estudio y futuras aplicaciones. En relación a la reacción con el MNTS se puede concluir que sigue un mecanismo de pseudo-primer orden debido a que la concentración de MNTS fue muy inferior a la concentración de β -CD-SH durante los distintos estudios. Además, también se puede suponer con estos resultados que para que ocurra la reacción el MNTS se compleja con la β -CD-SH, para que la aproximación de ambos compuestos sea óptima.

Gallego

Pódese concluir que aínda que o rendemento da síntese foi baixo, compróbase que cambiando un único hidroxilo dunha das sete unidades de glucosa, as propiedades da β -ciclodextrina tiolada melloraron, especialmente na complexación cunha sonda fluorescente, neste caso o prodan, o que abre un amplo campo de estudos e futuras aplicacións. En relación á reacción có MNTS pódese concluir que segue un mecanismo de pseudo-primeiro orde debido a que a concentración de MNTS foi moi inferior á concentración de β -CD-SH durante os distintos estudos. Ademais, tamén pódese supoñer con estes resultados que para que ocorra a reacción de MNTS compléxase coa β -CD-SH, para que a aproximación de ámbolos compostos sexa óptima.

Inglés

It can be concluding that although the percent yield is low, it is found that changing a single hydroxyl of one of the seven glucose units, properties of β -thiolate cyclodextrine improve, specially in complexation with a fluorescent probe, on this case prodan, which opens a wide field of studies and future applications. Regarding the reaction with MNTS, this can be concluded that follows a mechanism pseudo-first order due to the concentration of MNTS is lower than the concentration of β -CD-SH during different studies. Furthermore, it can also mean to these results for the reaction to occur, MNTS should complex with the β -CD-SH, for the approximation of both compounds is optimal.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Szente, L.; Szemán, J. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 8024-8030
- [2] Charoensakdi, R.; Murayaki, S.; Aoki, K.; Rimphanitchayakit, V.; Limpaseni, T. *J Biochem Mol Biol.* **2007**, 40, 333-340
- [3] Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743-1754
- [4] Bender, M. L.; Komiyama, M. *Cyclodextrin Chemistry*; Ed: Springer-Verlag Berlin, 1978
- [5] Chatzieftimiou, S.; Yannakopoulou, K.; Mavridis, I. *Cryst Eng Common.* **2007**, 9, 976-979
- [6] Luzkkov, V.; Akvist, J. *Chemical Physics Letters.* **1999**, 302, 267-272
- [7] Luzkkov, V.; Akvist, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6131-6137
- [8] Báscuas, J; García-Río, L.; Leis, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1186-1193
- [9] Harada, A., *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34(6), 456-464
- [10] De Lisi, R.; Miloto, S.; Muratore, N. *J. Phys. Chem.* **2002**, 106, 8944-8953
- [11] Davis, M. E.; Brewster, M. E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 1023-1035
- [12] Bilensoy, E. *Cyclodextrins in pharmaceuticals, cosmetics and biomedicine*; Ed: Wiley, Hacettepe University, Turkey, 2011
- [13] Dodziuk, H. *Cyclodextrins and Their Complexes*; Ed: Wiley-Vich, Turkey, 2006
- [14] Loftsson, T.; Dominique, D. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 39, 1-11
- [15] Huang, T.; Meng, F.; Qi, L. *J. Phys. Chem. C.* **2009**, 113, 13636-13642
- [16] Wang, L.; Kong, L. T.; Guo, Z.; Xu, J. Y.; Liu, J. H. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 5271-5279
- [17] Premkumar, T.; Geckeler, K. E. *New J. Chem.* **2014**, 38, 2847-2855
- [18] Kumprecht, L.; Buděšínský, M.; Bouř, P.; Kraus, T. *New J. Chem.* **2010**, 34, 2254-2260
- [19] Montanari, S.; Paradisi, C.; Scorrano, G. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5268-5631
- [20] Lovrinovic M.; Niemeyer C. M. *ChemBioChem* **2007**, 8, 61-67
- [21] Yhava F.; Sutinah A.; Gregory, A. M.; Liang, M.; Stenzel, M. H. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2012**, 50, 4085-4093
- [22] Crane, N. J.; Mayhofer, R.C.; Betts, T. A. *J. Chem. Ed.* **2002**, 72, 1261-1263