ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

María Victoria
López Corbalán

Tesis doctoral

CÁPSULAS PEPTÍDICAS SUPRAMOLECULARES: UN ESPACIO PARA EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR, EL CONFINAMIENTO Y SUS APLICACIONES

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Ciencia y Tecnología Química

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

CÁPSULAS PEPTÍDICAS SUPRAMOLECULARES: UN ESPACIO PARA EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR, EL CONFINAMIENTO Y SUS APLICACIONES

María Victoria López Corbalán

Director: Juan Ramón Granja Guillán y Manuel Amorín López

Tutor: Juan Ramón Granja Guillán

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

A mis padres y a mi hermana

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Agradecimientos

Escribo estas líneas al completar la estructura de este manuscrito, y aunque exhausta, me siento profundamente afortunada de haber podido dedicar estos cinco años a algo que me apasiona. Completar esta etapa ha sido posible gracias a la contribución de muchas personas e instituciones, a las que me encantaría expresar mi agradecimiento.

En primer lugar, a los directores de esta tesis doctoral, los profesores Juan Granja y Manuel Amorín, por haber confiado en mí para llevar a cabo el trabajo que se describe en este manuscrito. Especialmente, me gustaría agradecer a Juan por haberme transmitido ese entusiasmo con el que, aún hoy, tras 40 años en la investigación, sigue afrontando cada proyecto. También por haber sido mi mentor y colaborador, enseñándome a trabajar con la rigurosidad que la investigación científica requiere, compartiendo conmigo su conocimiento e impulsándome a dar lo mejor de mí en esta dura tarea. Por último, lo más importante, el respeto y la rectitud característicos en su trato con todos los investigadores que formamos parte del equipo. Por todo esto, Juan ha sido un verdadero ejemplo para mí.

Al profesor Fahmi Himo, de la Universidad de Estocolmo, por haberme brindado la oportunidad de realizar una estancia predoctoral en su grupo que me permitió adentrarme en el modelado computacional de estructuras supramoleculares con métodos DFT. Gracias a los conocimientos que aprendí en su grupo he podido desarrollar algunos estudios relativos a los trabajos que se exponen en esta tesis. También quiero agradecer a Eugenio Vázquez, que ha preparado algunas de las figuras a través de las cuales se ilustran las cápsulas estudiadas en esta tesis.

A la Xunta de Galicia, que ha financiado la investigación que he llevado a cabo a través del programa de becas de apoyo a la etapa predoctoral (ED481A-2019/117). Me gustaría agradecer a otras entidades públicas que han apoyado los proyectos realizados en estos años por el grupo del profesor Juan Granja, en concreto el Ministerio de Economía, Comercio y Empresa del Gobierno de España (RED2022-134287-T), la Agencia Estatal de Investigación (PID2019-111126RB-100 y PID2022-142440NB-I00), la Xunta de Galicia (ED431G 2019/03 y ED431C 2021/21), la Unión Europea (ERDF) y la red ORFEO-CINCA. También al Centro Singular de Química Biológica y Materiales Moleculares de la Universidad de Santiago de Compostela, que financió mi comienzo en la investigación como alumna de máster y que ha puesto a disposición de todos los investigadores equipos de última tecnología para el desarrollo de nuestros trabajos, así como personal de apoyo que facilita numerosas tareas. Especialmente me gustaría agradecer a Arcadio, si el cual no sé qué haríamos cuando algún equipo no funciona, y a Laura, que siempre va con una sonrisa. También quiero agradecer a Pablo, por hacer tan bien su trabajo, con amabilidad y sin ninguna pereza, dispuesto a ayudar en cualquier momento. A la RIAIDT de la USC, especialmente a los servicios de espectrometría de masas y RMN del CACTUS, donde Esteban y Manuel tiene una paciencia infinita con mis muestras.

Me remontaré ahora algunos años atrás, para contar cómo una murciana se vino al sitio más lluvioso del país con una idea muy clara. Hace casi siete años les dije a mis padres que había decidido irme a Santiago de Compostela a estudiar un máster, ya que estaba convencida de que yo quería ser investigadora. Recuerdo con mucha felicidad el entusiasmo que sentía al pensar en verme a mí misma en laboratorio, ya que, durante mi etapa formativa en química, en la Universidad de Murcia, deseaba que llegaran los días de prácticas para estar *entre*

cacharros y me encantaba encontrar respuestas a mis preguntas. Mis padres pensaron, aún no sé por qué, que finalmente no me atrevería a irme, porque estaba a 1000 Km de mi ciudad natal, pero me fui. Como anécdota, el primer día que llovió tras mi llegada, se me rompió el paraguas, que no estaba preparado para tales ventiscas. Poco después, comencé la investigación relacionada con mi trabajo de fin de máster, en el grupo del profesor Granja. Todo fue gracias a Alicia, que era mi compañera de clase y conocía bien el grupo. Por eso, cuando le dije que estaba interesada en aquella oferta de TFM, no dudó en decirme que allí iba a estar genial, y así fue. Quiero aprovechar aquí para agradecer a Alicia, que recientemente me ha dado una lección al escoger su camino con firmeza y me ha recordado la importancia de no pretender cumplir las expectativas de nadie. Sigamos ahora por mi llegada al laboratorio. Allí conocí a quienes que han sido como mi segunda familia en Galicia, mis compañeros. Los integrantes del grupo por aquel entonces me acogieron con los brazos abiertos, aunque mi acento les parecía muy raro. Ángel, que es tal cual indica su propio nombre, me ayudó en mis inicios en el trabajo experimental, y siempre con su mejor cara me explicaba todo con una amabilidad y paciencia que agradezco muchísimo. Puedo decir que es una de las mejores personas que he conocido en toda mi vida, y un amigo para siempre. Pronto empecé a darme cuenta de que me encantaba estar allí, tanto por el trabajo que hacía como por lo mucho que me dolía la barriga de reírme a carcajadas con mis compañeros. Todos ellos han contribuido en mayor o menor medida al acopio de anécdotas que guardo en mi memoria. Gracias a Alberto, por encontrar las verdaderas joyas de YouTube, que ahora tengo memorizadas, y abrirnos los ojos ante ese material de valor incalculable. En su faceta más formal, Alberto es la fuente de sabiduría a la todos podemos ir a preguntar nuestras dudas. Gracias también a Marta, por ser siempre tan buena conmigo, aunque hace tiempo que no está en la vitrina de al lado, no se me olvidan todas las anécdotas que vivimos juntas, especialmente la de las *spice girls*, cada uno que piense lo que quiera. A Evita, una sabia, siempre con la practicidad por delante y nada de tonterías, aunque no le gusta subirse a los puentes. Gracias a Lamiñas, el más obsesionado con el orden (cosa que luego heredó su alumno, Marcos, de quien hablaremos más tarde) y cuyos arranques de locura, debida a efectos secundarios de la tesis, me siguen haciendo reír (sola). Gracias también a Marisa, una persona con la que da gusto compartir trabajo, siempre con una sonrisa y tan amable con todos, además de un ejemplo, junto con Alberto, por el camino empresarial que han emprendido, en el que seguro tendrán éxito por ser tan trabajadores. A Iván, de carácter explosivo y sin pelos en la lengua, gracias por tantos buenos ratos de risas y confidencias.

Pasó el tiempo, y todos los nombrados terminaron su etapa en el laboratorio. La cosa se puso seria, porque entre tanto, yo también comencé mi tesis. Menos mal que lo hice con muchísima ilusión y junto a mi *parter in crime*, Alfonso (el *crime* es la tesis). Con Alfonso he compartido estos cinco años de alegrías, penas, desesperación (esto bastante), entusiasmo, desequilibrios emocionales y vuelta a empezar (por favor, no intentar en casa). Alfonso no deja indiferente a nadie, y aunque también es la persona más pesada que conozco, tiene un corazón enorme. Precisamente por eso, hay que quererlo como es. Me siento muy afortunada de haberlo conocido, y agradecida por todo su apoyo en los momentos en que quería tirar todas mis libretas de laboratorio por la ventana. En parte, es gracias a Alfonso que he terminado el programa de doctorado sin que me echasen por no entregar algún documento a tiempo cada año.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Poco después llegaron Ezequiel, Marcos y Sandra, tres personajes de cuidado. Ezequiel Arturo Troncoso Mondragón es el señor más fuerte del CIQUS, inquebrantable, también

mentalmente, como ha demostrado con su persistencia frente a los duros golpes de la tesis doctoral. Es la calma en persona, ni siquiera Alfonso es capaz de alterar su paz mental, tan necesaria para el balance de temperamentos del P3L2. En contraste, está Marcos, el picao por excelencia, pero tan buen compañero y buena persona que nunca duda en ayudarte para lo que necesites, como recoger un matraz de la bomba, o explicarme por decimocuarta vez cómo se pone una secuencia. A Marcos, Ezequiel y Alfonso, os pido perdón por perder el móvil 30 veces al día, de verdad. Y nuestra Sandra Natalia, la reina de los colchones (esto que no se malinterprete), devoradora oficial (junto con Marcos) de la comida del laboratorio y muy, muy divertida. Si hablo de gente divertida, no puedo dejar de mencionar a Jose María, que ya mientras escribo esto me estoy acordando de su anécdota con la bicicleta y me estoy muriendo de la risa. Jose es un remanso de paz y a la vez transmite alegría a raudales. Quiero agradecer también a Rebeca, por ser la calma y amabilidad personificadas, y por esos buenos ratos de risas en las quedadas que hacemos en su casa, la anfitriona de película.

Entre una cosa y otra, gente llegaba y otra se iba, y Alfonso y yo nos convertimos en los veteranos del laboratorio, cosa que a él le encanta, porque es un pequeño dictador. Mientras tanto, yo con una tesis en mantilla, donde cada cosa que intentaba parecía estar destinada al fracaso…este camino ha sido muy pedregoso. Por aquí, más o menos, se incorporó Patricia Fulias (que no Fulías ni Fuliás), una chica de armas tomar, en el buen sentido, y a quien quiero agradecer por ser tan sensata y procurar que todo vaya como la seda (esto todo sabemos que es imposible, pero se hace lo que se puede). El que haya leído hasta aquí ya podrá apreciar lo variopinto que es este grupo de trabajo. Al pensar en Patri tengo que mencionar inmediatamente a Mayra (Mayrita), una guatemalteca que ha llegado y nos ha robado el corazón a todos por ser tan buena y graciosa, o será, quizás, lo mucho que nos hacen reír sus expresiones (sobre todo a Marcos). Además, tengo la suerte de ser su compañera de piso y tener siempre la diversión y conversación asegurada.

La verdad es que, esos cafés a media tarde donde nos sentamos todos a comentar la jornada, y lo que surja, no tienen precio. No importa que a ninguno nos hayan salido los experimentos o que estemos al borde del colapso, esos ratos son lo que yo llamaría trabajo en equipo y no os hacéis una idea de lo mucho que lo he echado de menos estos meses de escritura.

Quiero agradecer también a las jóvenes incorporaciones del grupo, con los que no he podido compartir tanto tiempo, pero si el suficiente para hacer varias apreciaciones. Sergio, un terremoto de persona y a la vez tan buen compañero y servicial. Amaia, de quien tengo que reconocer que la presentación que preparó para su primer seminario me hizo tener vergüenza de mis presentaciones actuales, no hay color. Da gusto ver las ganas que pone Amaia en todo y lo bien que le sale el brownie de chocolate. Alba, mi compañera de lesiones, la primera que se apunta a un viaje y a quien nunca se le olvida traerme el café oscuro. A los tres os deseo un camino de tesis lleno de paciencia, ilusión y perseverancia.

A todas las personas con las que he compartido también muchos días de trabajo. Giulia y Fede, nuestras italianas, con carácter incluido. Gracias a las dos por tantas anécdotas y a Giulia por las delicias culinarias que prepara. A Ale e Irene, las centralitas de conocimiento a las que siempre puedes consultar sabiendo que serás bien recibido. A Nacho, Julián y Adrián, mucha suerte a los tres en vuestra nueva etapa. Especialmente, tengo que agradecer a Adrián que me sacase de apuros cuando estaba a punto de ser el objetivo de la furia de una señora sueca de

dudosa estabilidad mental…es que tengo una cantidad de historias. A Héctor, que cuando se juntaba con Alfonso, la diversión estaba asegurada. A Yeray y Lucía, almas de la fiesta, que han llegado a traernos aire fresco, jaleo y alegría. A Celia, una extremeña con mucha chispa y mucho genio, que nos alegra con sus visitas a la planta tres. A los chicos de Rebeca, "los de computacional", por dejarnos con la boca abierta en cada seminario, a primera hora de la mañana. A Alfonso C., tan amable conmigo cuando tengo alguna duda sobre mis cálculos. También quiero agradecer especialmente a Martín, un santo, que tiene mucha, pero que mucha paciencia y una respuesta a todas mis preguntas. Por supuesto, también a la jefa de este grupo tan curioso, a Rebeca, que vale oro por su cercanía y buen trato con todo el mundo.

A otros compañeros que, a pesar de no haber trabajado codo con codo, guardo muy buen recuerdo de su paso por el grupo, Richard, Ghibom, Jose Juan R., También a los más *juniors* que apenas he tenido tiempo de conocer, pero que ya veo que viene a revolucionar con nuevas aventuras.

A mis amigas Cristina, Esperanza y Marian. Qué bonitas son esas amistades que no necesitan una alta dosis de mantenimiento, y que da igual si eres tan despistada que te olvidas siempre de los cumpleaños. Nos volvemos a ver y es como si no hubiera pasado el tiempo. Me siento muy feliz al pensar en lo bien que nos va a las cuatro y todas las cosas buenas que han pasado desde que nos conocimos y, sobre todo, en las que están por venir. Por casualidades de la vida, Marian también vino a vivir a Santiago y ha sido un gran apoyo para mi este año. Es murciana pero como si fuese italiana, por el drama digo. Qué recuerdos de nuestras conversaciones en la cocina, intentando arreglar nuestra vida sin mucho éxito.

Durante estos años he avanzado y aprendido mucho profesional y personalmente. Sin embargo, las mayores enseñanzas las recibí en casa, de la mano de mis padres. Se llaman Paco y María, y creo que no tengo palabras suficientes para expresar lo que siento hacia ellos. De pronto, noto un nudo de emoción y mis ojos se ponen vidriosos al pensar en que ellos me han demostrado cómo de grande es el amor que siente un padre por un hijo. Hace algo más de quince años que mi vida dio un vuelco por completo, y estuve a punto de perderla. Mis padres nunca me dejaron sola y me di cuenta de que ellos daban su vida por la mía. Me han enseñado tantas cosas. A vivir con intensidad, disfrutando de la gente que me rodea y poniendo pasión en lo que hago. Me han enseñado a actuar con rectitud, y a que nada que merezca la pena se puede conseguir sin pasar por la casilla del esfuerzo. Por eso y tantas otras cosas, todos mis logros son suyos a la vez. Ojalá, si algún día tengo la bendición de ser madre, pueda hacerlo la mitad de bien que ellos.

A mi hermana, mi cómplice. El que tiene un hermano tiene un tesoro, y vaya tesoro. Quiero a mi hermana con locura, y soy su mayor fan. Se llama Mirian y es puro nervio, con tremendo carácter y un corazón enorme. Estoy muy orgullosa de ella y no puedo evitar decir a cualquiera que me pregunta que es una estupenda veterinaria, y no es porque sea mi hermana, es que es verdad, porque pone todo de ella en lo que hace. Mi gran apoyo en la distancia.

A Jacobo, mi compañero de vida. La entrega de esta memoria de tesis habría sido imposible sin su apoyo. Siempre dice que él no ha hecho nada, que le gustaría poder ayudarme más. Sin embargo, desde el principio comprendió lo importante que era para mí el camino que había escogido y me ha ayudado a sobrellevar los peores momentos de estos años, y a la vez, ha celebrado conmigo los mejores. A veces, puede ser difícil para otros entender que uno esté

dispuesto a sacrificar tanto tiempo y esfuerzo por un trabajo. Gracias por no haberme reprochado nunca mi falta de tiempo, sino al contrario, apreciar cada minuto que pasamos juntos como si fuera oro. Soy muy afortunada, he encontrado un tesoro.

Pido perdón si alguien se me ha quedado en el tintero, seguro que sí, pues son muchas las personas con las que he compartido trabajo estos últimos años. La sensación con la que termino esta tesis es de un enorme agradecimiento a todas las personas que me rodean y que, en mayor o menor medida, me hacen la vida más fácil y llena de felicidad.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Índice

1. Abreviaturas 1

2. Resumen 4

3. Summary 10

4. Introducción 15

4.1 La búsqueda humana de conocimiento 16

4.2 La química supramolecular 18

4.3 Química anfitrión-huésped 24

4.3.1 Conceptos fundamentales 24

4.3.2 Receptores formados a través de enlaces covalentes cinéticamente estables. 27

4.3.3 Receptores formados a través de enlaces covalentes dinámicos. 33

4.3.4 Receptores autoensamblados mediante interacciones no covalentes. 39

4.3.5 Cajas de coordinación. 47

4.4 Cápsulas con porfirinas. 58

4.5 Transformaciones en espacios confinados 74

4.5.1 Transformaciones en cápsulas autoensambladas mediante enlaces de hidrógeno. 75

4.5.2 Transformaciones en cápsulas preparadas mediante enlaces covalentes dinámicos. 79

4.5.3 Transformaciones en cajas de coordinación 84

4.5.4 Metaloenzimas 90

4.6 Reconocimiento de aniones 98

4.6.1 Transporte de aniones 109

4.7 Ciclopéptidos 122

5. Objetivos 140

6. Resultados 147

6.1 Simbiosis entre ciclopéptidos y porfirinas en receptores supramoleculares con potencial catalítico. 149

6.1.1 Cápsula molecular basada en un α,γ-ciclodecapéptido con tapas porfirínicas: síntesis y estudio de un sistema multicomponente. 149

6.1.1.1 Síntesis de los ligandos. 150

6.1.1.2 Síntesis de la cápsula. 153

6.1.1.3 Seguimiento de la coordinación porfirina-ligando a través de UV-Vis. 165

6.1.1.4 Seguimiento de la coordinación cápsula-ligando a través de UV-Vis. 171

6.1.1.5 Cálculos DFT sobre **D2** y **Ln⊂D2'**. 183

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.1.2 Péptidos cíclicos como armazón protector de un centro catalítico de porfirina: Diseño y estrategia sintética. 192
6.1.2.1 Síntesis de los precursores 194
6.1.2.2 Formación del aducto **P2⊂(D3-4)$_2$** 200
6.2 Heterociclos en los brazos moleculares de un α,γ-ciclohexapéptido: síntesis y estudios preliminares sobre su capacidad de coordinación y actividad esterasa. 204
6.2.1 Antecedentes y primera aproximación 204
6.2.2 Estudios de hidrólisis con **CP6b** y **CP6c** 205
6.2.3 Nuevo diseño 206
6.2.4 Síntesis de **CP6e** 208
6.2.5 Síntesis de **CP7b** 211
6.2.6 Actividad esterasa de **CP7b** 216
6.2.7 Estudios de coordinación con **CP6e** 217
6.3 Cápsulas supramoleculares para el reconocimiento de aniones 228
6.3.1 Precedentes y diseño 228
6.3.2 Síntesis 229
6.3.3 Estudios con **CP8** 233
6.3.3.1 Encapsulación de bisnitrilos de cadena corta en la cavidad de **D8**. 234
6.3.3.2 Estudio del reconocimiento de aniones por parte de **CP8.** 239
6.3.3.3 **CP8** como transportador de aniones a través de membranas lipídicas. . 267
6.3.4 Estudios con **CP9** 278
6.3.5 Estudios computacionales sobre homo- y heterodimerización de los CPs estudiados. 297
7. Conclusions 309
8. Bibliografía 313
9. Methodology 315
9.1 Symbiosis between cyclopeptides and porphyrins in supramolecular receptors with catalytic potential. 316
9.2 Heterocycles in the molecular arms of an α,γ-cyclohexapeptide: synthesis and preliminary studies on its coordination and esterase activity. 321
9.3 Supramolecular capsules for anion recognition 323
9.4 General Materials 328
10. Experimental Section 330
10.1 Symbiosis between cyclopeptides and porphyrins in supramolecular receptors with catalytic potential. 331
10.1.1 Synthesis and characterization 331

10.1.2 Figures 356
10.2 Heterocycles in the molecular arms of an α,γ-cyclohexapeptide: synthesis and preliminary studies on its coordination and esterase activity. 361
10.2.1 Synthesis and characterization 361
10.3 Supramolecular capsules for anion recognition 372
10.3.1 Synthesis and characterization 372
10.3.2 Figures 386
11. Appendix 403
11.1 Spectra 404
11.1.1 Symbiosis between cyclpeptides and porphyrins in supramolecular receptors with catalytic potential. 404
11.1.2 Heterocycles in the molecular arms of an α,γ-cyclohexapeptide: synthesis and preliminary studies on its coordination and esterase activity. 450
11.1.3 Supramolecular capsules for anion recognition 493
11.2 Conflict of interest 563
11.3 Rights and permissions of the images 563
11.4 Origin of images without reference of reproduction right or permission. 579

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1. Abreviaturas

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

$[\alpha]_D^{20}$	rotación óptica específica a 20 °C con lampara de sodio
δ	desplazamiento químico
λ_{max}	longitud de onda del máximo de absorbancia
Aa	aminoácido
γ-Aca	ácido 3-aminocicloalcanocarboxílico
γ-Ace	ácido *cis*-4-aminociclopent-2-enocarboxílico
γ-Ach	ácido *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico
γ-Acp	ácido *cis*-3-aminociclopentanocarboxílico
γ-Ahf	ácido 4-amino-3-hidroxitetrafurano-2-carboxílico
AB	acoplamiento con efecto tejado
Abs	absorbancia
Ala	alanina
aq.	disolución acuosa
Ar	argón
Boc	*terc*-butiloxicarbonilo
$(Boc)_2O$	anhídrido de *terc*-butiloxicarbonilo
br	pico ancho
CaCC	Canales de cloruro activados por calcio (*calcium-activated chloride channels*)
Cbz	benciloxicarbonilo
COSY	espectroscopía de correlación
CP	ciclopéptido
CuAAC	cicloadición azida-alquino catalizada por Cu (I)
^{13}C NMR	resonancia magnética nuclear de ^{13}C
ClC	Canales de cloruro (*Chloride Channels*)
CFTR	Canal transmembrana regulador de la fibrosis quística (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*)
d	doblete
D	dímero
D	coeficiente de difusión
dd	doble doblete
ddd	doble doble doblete
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DEPT	incremento no distorsionado por transferencia de polarización de ^{13}C
DIEA	diisopropiletilamina
DLS	Dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering*)
DMF	*N,N*-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DOSY	espectroscopía de orden difusional
dt	doble triplete
DPC	dodecilfosforilcolina
ESI	ionización por electrospray
EYPC	fosfatidilcolina de yema de huevo
FTIR	espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanisulfónico
HPTS	ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (piranina)
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
^{1}H RMN	resonancia magnética nuclear de ^{1}H

HRMS	espectrometría de masas de alta resolución
HSQC	espectroscopía de correlación cuántica simple heteronuclear
J	constante de acoplamiento
K_a	constante de asociación
LUVs	vesículas unilamelares grandes
m	multiplete
MALDI	espectroscopía de masas por ionización láser asistida por matriz
MOF	entramado metaloorgánico
MS	espectrometría de masas
m/z	relación masa/carga
N-HATU	hexafluorofosfato de *N*-óxido de *N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3 triazolo[4,5-b]piridin-1-il-metilen]-*N*-metilmetanamino
N-HBTU	hexafluorofosfato de *N*-óxido de *N*-[(1*H*-benzotriazol-1- il)dimetilamino-metilen]-*N*-metilmetanamino
N-TBTU	tetrafluoroborato de *N*-óxido de *N*-[(1*H*-benzotriazol-1- il)dimetilamino-metilen]-*N*-metilmetanamino
nOe	efecto nuclear Overhauser
NOESY	espectroscopía de efecto nuclear Overhauser
Ns	2-nitrobencenosulfonilo o 4-nitrobencenosulfonilo (nosilo)
p-NP	*p*-nitrofenol
p-NPA	*p*-nitrofenilacetato
PEG	poli-etilenglicol
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
ppm	partes por millón
q	quintuplete
r_h	radio hidrodinámico aparente
RMN	resonancia mangnética nuclear
ROESY	espectroscopía de efecto nuclear Overhauser en el plano rotatorio
s	singlete
t	triplete
TBTA	*tris*[(1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina
td	triple doblete
TFA	ácido trifluoroacético
TMEDA	tetrametiletilendiamina
TMSS	*tetrakis*(trimetilsilil)silano
TMS	tetrametilsilano
TOCSY	espectroscopía de correlación total
TOF	espectroscopía de correlación total
TPP	5,10,15,20-tetrafenilporfirina
TREN	*tris*(2-aminoetil)amina
SDS	dodecilsulfato sódico
VRAC	Canal de aniones regulado por volumen (*volume-regulared anion channel*)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. Resumen

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La química supramolecular se presenta como una rama de gran relevancia dentro de la investigación. Se sustenta, principalmente, sobre el pilar de las interacciones no covalentes, encontrando con los sistemas naturales multitud de semejanzas. Precisamente, de la analogía entre las primeras estructuras supramoleculares sintéticas y las enzimas naturales surge el término "química *host-guest"*, que cubre toda el área de reconocimiento molecular, una pieza fundamental de esta tesis doctoral. De las interacciones entre el receptor y el huésped, así como de la complementariedad morfológica entre ambos, dependerá, en gran medida, la estabilidad del complejo formado. De este modo, un sumatorio de pequeñas contribuciones entálpicas derivadas de un conjunto de interacciones logra compensar el costo entrópico del ordenamiento implícito del sistema. El estudio detallado de estos procesos de ensamblaje ha permitido descifrar los factores que influyen más significativamente en el mecanismo de reconocimiento entre dos o más moléculas. Fruto de esto, se han desarrollado multitud de receptores que están racionalmente diseñados para albergar un huésped con unas características determinadas. Este es el caso de los receptores sintéticos de aniones que surgen, entre otras necesidades, como respuesta al interés en esclarecer y aportar soluciones a la problemática de las canalopatías. Este término engloba a un conjunto de disfunciones fisiológicas que derivan de las alteraciones en el correcto funcionamiento de los sistemas de transporte de iones a través de las membranas celulares. Por otro lado, la posibilidad de aislar una molécula del medio que la rodea, formando parte de un sistema receptor-huésped, abre la oportunidad de estudiar su reactividad en espacios confinados. Además, las propiedades de estos sistemas dependen ampliamente del grado de confinamiento, siendo las cápsulas supramoleculares las que proporcionan un completo recubrimiento del huésped.

Como se ha comentado, la complementariedad estructural entre los componentes del sistema es un factor que aporta estabilidad al ensamblado. Por ello, los investigadores han hecho uso de moléculas que tienen un elevado grado de preorganización y/o que permiten modificaciones estructurales de manera sencilla, para actuar como receptores. Estas características están presentes entre las propiedades de los ciclopéptidos autoensamblables, cuya capacidad para formar nanotubos supuso el inicio de una amplia lista de estudios en torno a estas estructuras. La alternancia de la quiralidad entre los residuos que componen el esqueleto peptídico es uno de los factores determinantes de la planaridad de los α,γ-CPs, que son el hilo conductor de esta tesis doctoral. La *N*-alquilación de los residuos de la misma quiralidad en este tipo de CPs restringe el ensamblaje a la formación exclusiva de dímeros, y dispone a dichos grupos a la entrada de la cavidad de estas estructuras. Gracias a ello, la modificación de estos grupos bloqueantes permite incorporar tapas o brazos moleculares con una gran precisión espacial. De esta forma, la estructura resultante está provista de una cavidad donde el péptido y la tapa aportan selectividad. En esta tesis se han explorado las propiedades, como receptores supramoleculares, de este tipo de estructuras, atendiendo a las especificidades del esqueleto peptídico y de la cubierta molecular.

En la primera parte de los resultados descritos en esta memoria se detalla cómo se abordó la síntesis de estructuras supramoleculares que incorporan ciclopéptidos anclados a macrociclos de porfirina. En este sentido, hemos diferenciado entre el papel que cumple el anillo de porfirina en dos tipos de ensamblado. Por un lado, pretendíamos diseñar una cápsula que tuviese capacidad para actuar como nanorreactor, catalizando transformaciones químicas en su seno. En un trabajo previo realizado en el grupo, se demostró que la incorporación de una metaloporfirina de zinc como tapa molecular de un α,γ-ciclooctapéptido permitía la

encapsulación de ligandos bidentados de piridina. Basándonos en estos resultados prometedores, desarrollamos una estrategia sintética para preparar **CP2/D2**, una cápsula con características estructurales similares a la especie estudiada anteriormente, pero con modificaciones introducidas con el propósito de agrandar la cavidad para ser el seno de transformaciones químicas de sustratos de pequeño tamaño. Para ello, se preparó **CP1**, un α,γ-ciclodecapéptido funcionalizado con dos cadenas de propilazida, y **P1**, una tetrafenilporfirina funcionalizada con dos grupos acetileno. La unión entre ambos subcomponentes se llevó a cabo mediante acoplamiento alquino -azida catalizada por Cu^{I}, dando como resultado **CP2/D2**. Para estudiar las propiedades de **D2** como receptor, se preparó un conjunto de ligandos bidentados de piridina, donde se varió la longitud, la flexibilidad y la posición del nitrógeno de las piridinas terminales, entre *para*-, *meta*- y *orto*-derivados. Además, de entre este conjunto de ligandos, tres de ellos incorporaban un sitio central de coordinación, un núcleo de bipiridina. Pretendíamos emplear estos ligandos para atrapar, en el interior de la cápsula, complejos metálicos con actividad catalítica (centro reactivo). En primer lugar, estudiamos la interacción entre los ligandos, **Ln**, y la porfirina modelo, **P1**. El proceso de coordinación se abordó mediante espectroscopía UV-Vis, a través del desplazamiento de la banda Soret de la porfirina. Para **P1** libre, esta banda aparece a 421 nm, mientras que la formación de los complejos **P1·Ln** induce el desplazamiento batocrómico de la banda hasta 431 nm. De estos estudios pudimos extraer las constantes de asociación para la formación de los complejos **P1·Ln**, así como los valores de absortividad molar a 431 nm para cada complejo, ya que la diferencia electrónica entre los **Ln** repercute notablemente en este valor. Posteriormente, se estudió la interacción entre **D2** y el conjunto de **Ln**, pudiendo apreciar una clara diferencia entre aquellos resultados obtenidos con **P1**. Estas diferencias significativas implican que la doble interacción de estos con **D2** como consecuencia de la encapsulación de los ligandos supone un notable incremento en las constantes de afinidad, o lo que es lo mismo hay cooperatividad, aunque en muchos casos se trata de una cooperatividad negativa. Un estudio detallado de los resultados obtenidos con cada uno de ellos permite apreciar que no todos los ligandos operan bajo el mismo mecanismo de interacción con **D2**. Además, según nuestras apreciaciones, su comportamiento como huéspedes no está exclusivamente ligado a su longitud. Planteamos que, de forma general, se pueden clasificar los ligandos entre aquellos que interaccionan mediante un mecanismo 1:1 para formar los complejos **Ln⊂D2** y aquellos que actúan según un modelo 1:2, donde el segundo ligando desplaza la doble interacción del primer ligando para interaccionar por la cara externa de la cápsula y formar **Ln⊂D2·Ln**. Para indagar sobre los factores que pudieran estar implicados, realizamos pequeño estudio computacional en que optimizamos tanto la estructura de **D2'**, así como la de cada uno de los complejos **Ln⊂D2'**, siendo **D2'** el péptido análogo a **D2,** pero donde todos los α-Aa son residuos de alanina. Pudimos observar que, tal y como habíamos planteado en nuestro diseño, la tapa molecular de **D2** tiene un alto grado de libertad de movimiento, ya que la orientación relativa de ambas porfirinas varía notablemente dependiendo del ligando incorporado en su interior. Además, los cálculos de energía de complejación para cada **Ln⊂D2'** parecen seguir, en líneas generales, una tendencia análoga a los valores de $K_{Ln⊂D2}$ obtenidos a través de los ajustes de los datos experimentales. Sin embargo, no encontramos relación entre los dos modelos propuestos para explicar el diferente comportamiento experimental entre los Ln y la deformación que cada uno de ellos promueve en el esqueleto de **D2'**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Por otra parte, relacionado también con la idea de introducir porfirinas en estos ensamblados peptídicos, hemos desarrollado un canal catalítico, donde una porfirinasituada en

la parte central de ese canal podría actuar como potencial sitio activo. Para ello, tras explorar diferentes rutas sintéticas, se preparó la *meso*-tetrakis(3-formilfenil)porfirina, **P2**. La presencia de cuatro grupos formilo en esta porfirina permitió su acoplamiento con dos unidades de **CP3**, un α,γ-ciclooctapéptido provisto de dos grupos hidrazida, por sus dos caras. Además, la formación de la especie heterodimérica entre **CP3** y **CP4**, siendo **CP4** el *c*-[(*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Acp)$_4$], nos permitió favorecer la formación de una estructura tipo sándwich en frente a un ensamblado tipo nanotubo. De este modo, la porfirina queda atrapada entre dos unidades de heterodímero. Prevemos que el diámetro y el carácter de la cavidad interna de los CPs pueda favorecer el acercamiento de unos sustratos frente a otros.

La segunda parte de los resultados está dedicada a la síntesis y estudios preliminares de dos α,γ-ciclohexapéptidos diseñados como posibles imitadores de la actividad esterasa, a través de sus brazos moleculares. Por un lado, se preparó **CP6e**, un péptido con tres brazos flexibles donde cada uno de ellos porta una piridina terminal *meta*-sustituida. Ante la dificultad para obtener **CP6e** a partir de su precursor propargilado mediante hidrogenación, se desarrolló una ruta alternativa donde la introducción del anillo de piridina se llevó a cabo sobre el dipéptido que hace de bloque de construcción básico. De este modo, tras posteriores etapas de acoplamiento para hacer crecer la cadena peptídica, se obtuvo **CP6e** con éxito. En relación con este CP, se estudió su capacidad para formar complejos de coordinación octaédrica con Co^{II}, Cu^{II}, Fe^{II} y Mn^{II}, todos ellos paramagnéticos. En los casos de Co^{II} y Cu^{II}, estos estudios preliminares parecen indicar la formación de complejos donde una molécula de bipiridina y otra de ácido acetilenodicarboxílico forman parte de la estructura que se forma en disolución. Por otro lado, se preparó **CP7b**, un péptido con tres anillos imidazólicos cuya síntesis implicó la puesta a punto de una metodología de basada en acoplamientos Sonogashira sobre el precursor propargilado **CP5**. Esta síntesis utiliza un grupo protector tosilo sobre el imidazol, que permitió llevar a cabo el acoplamiento de Sonogashia con buenos rendimiento conduciendo a **CP7a**. La desprotección del grupo tosilo se llevó a cabo con *p*-metoxitiofenol, que supone una aproximación novedosa para retirar este grupo, teniendo en cuenta las condiciones mucho más severas a las que se suele recurrir normalmente. Finalmente, pudimos comprobar que **CP7b** es capaz de facilitar la hidrólisis del *p*-nitrofenilacetato mediante la coordinación con Zn^{II}, emulando la actividad esterasa de la anhidrasa carbónica. Aunque los resultados son preliminares, **CP6e** y **CP7b** se presentan como dos buenos candidatos para estudiar su actividad como enzimas artificiales.

Finalmente, la tercera parte de los resultados que se exponen en esta memoria está dedicada al estudio de las capacidades de ciertos α,γ-ciclohexapéptidos para actuar como receptores y/o transportadores de aniones. En concreto, se prepararon cuatro potenciales receptores a partir de cuatro subcomponentes. Por un lado, distinguimos entre dos esqueletos peptídicos, uno de ellos, **CP5**, incorpora residuos de γ-Aa con anillos de cinco miembros (Acp), y el otro, **CP10**, incorpora residuos de seis miembros (Ach). Ambos CPs estaban funcionalizados con tres grupos propargilo que se emplearon en la incorporación de las tapas moleculares mediante reacciones de cicloadición alquino-azida. Por otra parte, seleccionamos dos tapas moleculares con características diferentes, la tris(2-azidoetil)amina (pre-tapa A) y el 1,3,5-tris(azidometil)-2,4,6-trietilbenceno (pre-tapa B). Respecto a la primera, es flexible y de carácter básico. La segunda, por contrario, es marcadamente más rígida, y su anillo aromático podría estabilizar el complejo con el anión mediante interacciones anión-π. De las posibles combinaciones entre los péptido y las tapa obtuvimos **CP8** mediante el acoplamiento entre el **CP5** y la pre-tapa A, y **CP9** cuando el mismo péptido se acopló con la pre-tapa B. Por otro lado,

el acoplamiento de **CP10** con la pre-tapa A resultó en **CP11**, y en **CP12** cuando se acopló con la pre-tapa B. Afortunadamente, pudimos obtener las estructuras cristalinas de **CP8**, **CP10** y **CP11**, que confirman que se forman los ensamblados diméricos. Debido a que en la estructura cristalina de **CP8** se encontró una molécula de acetonitrilo, pensamos que, quizás, el espacio de su cavidad sería apropiado para la encapsulación de bisnitrilos de cadena corta. Comprobamos que, efectivamente, era capaz de encapsular tanto malononitrilo como succinonitrilo, presentando mayor afinidad por este último. Tras estas primeras observaciones, comenzamos a estudiar la capacidad de **CP8** como receptor de aniones. Inicialmente, llevamos a cabo experimentos de valoración, seguidos por ^{1}H RMN, entre **CP8** y las sales de cloruro y fluoruro de tetrabutilamonio. En ellos, pudimos apreciar que la adición de estas sales provocaba la desaparición de las señales de **CP8** en favor de la formación de otro conjunto de señales que atribuímos a las especies complejadas. Además, los complejos con cloruro y fluoruro debían tener una gran similitud estructural, pues los espectros de ^{1}H RMN de ambos complejos eran muy similares, a excepción del desplazamiento químico a campo bajo del protón amídico, mucho mayor para el caso de fluoruro. Un detallado análisis de los espectros bidimensionales de los complejos nos permitió llegar a la conclusión de que el esqueleto de **CP8** sufría una profunda reorganización para acomodar, de algún modo, a los aniones. Para indagar sobre la naturaleza del complejo formado, realizamos dos experimentos en los que, previamente a la adición de los halogenuros, formábamos las especies heterodiméricas **D8-10** o **D8-11**. Queríamos comprobar si los heterodímeros eran capaces de acomodar aniones, al igual que **CP8**, así como también evaluar la fuerza de las interacciones. Lo que observamos fue que, tras la adición de la sal, se producía el desensamblaje de los heterodímeros en favor de la formación de los complejos entre **CP8** y cloruro o fluoruro. De estos experimentos concluimos también que ni **CP5**, ni **CP10** ni **CP11** era capaces de acomodar estos aniones, pues cuando se llevaron a cabo los experimentos de valoración con estas especies como "receptores", no se apreciaron cambios remarcables. Además, también advertimos que el agua tenía un papel fundamental en la formación de los complejos, pues el secado de las muestras con tamices moleculares conducía a la recuperación de la especie libre **CP8/D8**. La posterior adición de una pequeña proporción de agua volvía a revertir, formándose el complejo de reconocimiento del anión. La obtención de las estructuras cristalinas de los complejos con fluoruro y cloruro mostraba, efectivamente, que ambas observaciones experimentales tenían su fundamento en el tipo de ensamblado que se formaba. Un clúster compuesto por tres aniones y un número variable de moléculas de agua, quedaba embebido entre dos monómeros de **CP8**. Además, el esqueleto de **CP8** estaba totalmente reorganizado comparado con la estructura cristalina de **D8**, ya que los monómeros adoptaban una forma de pirámide trigonal, donde las cadenas de leucina quedaban en los vértices de la base triangular con la tapa *tris*-triazólica haciendo de cúspide. Tras estos hallazgos, comprobamos que otros halogenuros que en nuestros estudios iniciales no promovieron la formación de complejo alguno con **CP8** (bromuro y yoduro), sí lo hacían cuando se adicionaba una pequeña cantidad de agua extra en las muestras. Otros aniones, como AcO^-, NO_3^-, N_3^-, también promovieron la formación de complejos similares con **CP8**, aunque en estos casos, desconocemos el número de moléculas de agua que participan en la formación de los clústeres. Tras estos resultados, decidimos estudiar la actividad transportadora de **CP8**. A través del ensayo de lucigenina, comprobamos que era capaz de llevar a cabo el intercambio H^+/Cl^- (o Cl^-/OH^-), algo que ratificamos con el ensayo HPTS, que informa de que el transporte de cloruro estaba asociado a una basificación del medio intravesicular. Además, **CP8** era capaz de transportar I^- y Br^- de manera más eficiente que Cl^-. En cambio, la eficiencia de transporte de NO_3^- era similar a la de Cl^-, mientras para el resto de

los aniones estudiados, la eficiencia era menor. Por otra parte, los estudios con **CP9** mostraron que este péptido es selectivo para el reconocimiento de F^-. Aunque, en este caso no pudimos obtener estructuras cristalinas que confirmasen la estructura de los complejos formados, los estudios de RMN realizados muestran un comportamiento muy similar a **CP8** por lo que, prevemos, que el mecanismo de reconocimiento ha de ser similar al descrito anteriormente. Por su parte, **CP12**, que comparte la misma tapa que **CP9**, pero con el esqueleto peptídico de Ach, no solo no es capaz de reconocer aniones, sino que no es capaz de auto-ensamblarse para formar **D12**, aunque sí puede interracionar con **CP5** para formar el heterodímero **D5-12**. Previsiblemente, la rigidez de **CP12** le impide reorganizar su esqueleto para orientar apropiadamente los grupos C=O y N-H de forma que permitan la formación de enlaces de hidrógeno con otra molécula de **CP12**. Sin embargo, la mayor flexibilidad de **CP5** sí que permite su adaptación a las características estructurales de **CP12** para formar la especie heterodimérica.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Summary

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Supramolecular chemistry has become a highly relevant area of research. It is based mainly on the pillar of non-covalent interactions, finding many similarities with natural systems. Precisely, the term "host-guest chemistry" arises from the analogy between the first synthetic supramolecular structures and natural enzymes, and it covers the entire area of molecular recognition, a fundamental piece of this doctoral thesis. The stability of the complex formed will largely depend on the interactions between receptor and host, as well as the morphological complementarity between both. In this way, a sum of small enthalpic contributions manages to compensate the entropic cost of system ordering. The detailed study of these assembly processes has allowed the researchers to decode the factors that most significantly influence the recognition mechanism between two or more molecules. As a result of this, a multitude of receptors have been developed, and they are rationally designed to recognize a host with certain characteristics. This is the case of synthetic anion receptors, which arise, among other needs, in response to the interest in clarifying and providing solutions to the problem of channelopathies. This term encompasses a set of physiological dysfunctions that derive from alterations in the correct functioning of the ion transport systems through the membrane. On the other hand, the possibility of isolating a molecule from the environment that surrounds it, forming part of a receptor-host system, opens the opportunity to study reactivity in confined spaces. Furthermore, the properties of these systems largely depend on the degree of confinement, with supramolecular capsules being the ones that manage to completely envelop the host.

As mentioned, the morphological complementarity between the components of the system is a factor that provides stability to the assembly. For this reason, researchers have made use of molecules that have a high degree of preorganization or that allow structural modifications in a simple way, to act as receptors. These characteristics are among the properties of self-assembling cyclopeptides, whose ability to form nanotubes marked the beginning of a wide list of studies around these structures. The alternation of chirality between the residues that constitute the peptide backbone is the determining factor of the planarity of the α,γ-CPs, which are the guiding thread of this doctoral thesis. The *N*-alkylation of residues of the same chirality leads to block the assembly for the exclusive formation of dimers. In this way, if we introduced caps or molecular arms, the resulting structure is provided with a cavity where the peptide and the cap provide selectivity. In this thesis, the abilities, as supramolecular receptors, of this type of structures have been explored, taking into account the specificities of the peptide backbone and the molecular cover.

The first part of the results described in this manuscript details how we have studied the synthesis of supramolecular structures that incorporate cyclopeptides anchored to porphyrin macrocycles. In this sense, we have differentiated between the role played by the porphyrin ring in two types of assembly. On the one hand, we intended to prepare a capsule that had the structural capacity to act as a nanoreactor. In previous work carried out in the group, it was shown that the incorporation of a zinc metalloporphyrin as a molecular cap of an α,γ-cyclooctapeptide allowed the encapsulation of bidentate pyridine ligands. Based on these promising results, we developed a synthetic strategy to prepare **CP2/D2**, a capsule with structural characteristics similar to the one studied in the previous work, but with modifications introduced with the purpose of enlarging the cavity to be the room of chemical transformations of small size substrates. To this end, **CP1**, an α,γ-cyclodecapeptide functionalized with two propylazide chains, and **P1**, a tetraphenylporphyrin functionalized with two acetylene groups,

were prepared. The connection between both subcomponents was carried out through alkyne-azide coupling catalyzed by Cu^{I}. In order to study the properties of **CP2** as a receptor, a set of bidentate pyridine ligands was prepared, where the length, flexibility and nitrogen position of the terminal pyridines were varied, between *para*-, *meta*- and *ortho*-derivatives. Furthermore, among this set of ligands, three of them incorporated a central coordination site, a bipyridine core. We intended to use these ligands to trap, inside the capsule, metal complexes with catalytic activity. First, we studied the interaction between the ligands, **Ln**, and the model porphyrin, **P1**. The coordination process was studied by UV-Vis spectrometry, through the displacement of the Soret band of the porphyrin. For free **P1**, this band appears at 421 nm, while the formation of **P1·Ln** complexes shifts the band to 431 nm. From these studies we were able to extract the constants for the formation of the **P1·Ln** complexes, as well as the molar absorptivity values at 431 nm for each complex since the electronic difference between the **Ln's** has a noticeable impact on this value. Subsequently, the interaction between **D2** and the set of **Ln** was studied, being able to appreciate a clear difference between those results obtained with **P1**. These significant differences imply that in the case of **D2** there is cooperativity involved in the process and encapsulation of the ligands take place. However, a broad view of the results with each of them allows us to appreciate that not all ligands operate under the same interaction mechanism with **D2**. Furthermore, according to our observations, it does not seem that its behavior is exclusively related to its length. We propose that, in general terms, we can divide the ligands between those that interact through a 1:1 mechanism to form the **Ln⊂D2** complexes and those that, for unclarified reasons, deviate towards a 1:2 model, where the coordination of an extra ligand for the formation of **Ln⊂D2·Ln** is more favored. In order to investigate the factors that could be involved in that process, we carried out a small computational study in which we optimized both the structure of **D2'**, as well as that of each of the **Ln⊂D2'** complexes, with **D2'** being the peptide analogous to **D2**, but where all α-Aa have been substituted by alanine residues. We were able to observe that, as we had proposed in our design, the molecular cap of **D2** has a high degree of freedom of movement, since the relative orientation of both porphyrins varies significantly depending on the ligand incorporated inside. Furthermore, the complexation energy calculations for each **Ln⊂D2'** appear to follow, broadly, a trend analogous to the $K_{Ln⊂D2}$ values obtained through fits to the experimental data. However, we found no relationship between the two models proposed to explain the different experimental behavior between the **Ln** and the deformation that each of them promotes in the **D2'** framework.

On the other hand, also related to the idea of introducing porphyrins into these peptide assemblies, we have developed a catalytic channel, where a porphyrin has been introduced as a potential active site. To this end, after exploring different synthetic routes, meso-tetrakis(3-formylphenyl)porphyrin, **P2**, was prepared. The presence of four formyl groups in this porphyrin allowed its coupling with two units of **CP3**, an α,γ-cyclooctapeptide provided with two hydrazide groups, on both sides. Furthermore, the formation of the heterodimeric species between **CP3** and **CP4**, **CP4** being c-[(D-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Acp)$_4$], allowed us to favor the formation of a sandwich-type structure over an assembled nanotube type. In this way, the porphyrin is trapped between two heterodimer units. We anticipate that the diameter and character of the internal cavity of the CPs will favor the approach of some substrates over others.

The second part of the results section is dedicated to the synthesis and preliminary studies of two α,γ-cyclohexapeptides designed as possible mimics of carbonic anhydrase, through their molecular arms. On the one hand, **CP6e** was prepared, a peptide with three flexible arms where

each of them carries a *meta*-substituted terminal pyridine. Given the difficulty in obtaining **CP6e** from its propargylated precursor through hydrogenation, an alternative route was developed where the introduction of the pyridine ring was carried out on the dipeptide that acts as the basic building block. Thus, after subsequent coupling steps to grow the peptide chain, **CP6e** was successfully obtained. In relation to this CP, its ability to form octahedral coordination complexes with Co^{II}, Cu^{II}, Fe^{II} and Mn^{II}, all of them paramagnetic, was studied. In the cases of Co^{II} and Cu^{II}, these preliminary studies seem to indicate the formation of complexes where a molecule of bipyridine and another of acetylenedicarboxylic acid are part of the structure that forms in solution. On the other hand, **CP7b** was prepared, a *tris*-imidazolic peptide that, in this case, could be obtained from its propargylated precursor **CP5**. It should be noted that the synthesis of **CP7b** was possible, on the one hand, thanks to the use of the tosyl protecting group on the imidazole, which allowed the Sonogashira coupling to be carried out between it and **CP5** to obtain **CP7a**. The deprotection of the tosyl group was carried out with *p*-methoxythiophenol, which represents a novel approach to remove this group, taking into account the severe conditions normally used. Finally, we were able to verify that **CP7b** is able to facilitate the hydrolysis of *p*-nitrophenylacetate through coordination with Zn^{II}, emulating the esterase activity of carbonic anhydrase. Although the results are preliminary, **CP6e** and **CP7b** seem to be two good candidates to study their activity as artificial enzymes.

Finally, the third part of the results presented in this manuscript is dedicated to the study of the capacities of certain α,γ-cyclohexapeptides to act as receptors and/or transporters of anions. Specifically, four potential receptors were prepared from four subcomponents. On the one hand, we distinguish between two peptide backbones, one that incorporates Acp residues as γ-Aa (**CP5**) and another that incorporates Ach residues (**CP10**). Both CPs were functionalized with three propargyl groups for subsequent coupling to the molecular caps via alkyne-azide coupling. On the other hand, we selected two molecular caps with different characteristics, tris(2-azidoethyl)amine (pre-cap A) and 1,3,5 tris(azidomethyl)-2,4,6-triethylbenzene (pre-cap B). Regarding the first, it is flexible and basic. The second, on the other hand, is more rigid, and its aromatic ring could stabilize the complex with the anion through anion-π interactions. Of the possible combinations between peptide and cap, we obtained **CP8** through the coupling between **CP5** and pre-cap A, and **CP9** when the same peptide was coupled with pre-cap B. On the other hand, the coupling of **CP10** with pre-cap A resulted in **CP11**, and in **CP12** when it was combined with pre-cap B. Fortunately, we were able to obtain the crystal structures of **CP8**, **CP10**, and **CP11**, which confirm that they are dimeric assemblies. Since an acetonitrile molecule was found in the crystal structure of **CP8**, we thought that perhaps its cavity would be appropriate for the encapsulation of short-chain bisnitriles. We verified that, indeed, it was able to encapsulate both malononitrile and succinonitrile, presenting greater affinity for the latter. After these first observations, we started to study the capacity of **CP8** as an anion receptor. Initially, we carried out titration experiments followed by ^{1}H NMR between **CP8** and tetrabutylammonium chloride and fluoride salts. In these experiments, we could see that the addition of these salts caused the disappearance of **CP8** signals in favor of the formation of another set of signals that we attribute to the complexed species. Furthermore, we envisage that the complexes with chloride and fluoride would have a great structural similarity, since the ^{1}H NMR spectra of both complexes were very similar, except for the chemical shift of the amide proton, which was larger in the case of fluoride. A detailed analysis of the two-dimensional spectra of the complexes allowed us to reach the conclusion that the skeleton of **CP8** underwent a serious reorganization to accommodate, in some way, the anions. To investigate

the nature of the complex formed, we carried out two experiments in which, prior to the addition of the halides, we formed the heterodimeric species **D8-10** or **D8-11**. We wanted to check if the heterodimers were able to accommodate the anions, like **CP8** was, but what we observed was that, after the addition of the salt, disassembly of the heterodimers occurred in favor of the formation of complexes between **CP8** and chloride or fluoride. From these experiments we also concluded that neither **CP5**, nor **CP10,** nor **CP11** were able to accommodate these anions, since when the titration experiments were carried out with these species as "receptors", we did not appreciate noticeable changes. In addition, we also noticed that water had a fundamental role in the formation of the complexes, since drying the samples with molecular sieves led to the free species **CP8/D8**. We obtained the crystalline structures of the complexes with fluoride and chloride, and they showed, indeed, that both experimental observations were based on the type of assembly that was formed. A cluster composed by three anions and a variable number of water molecules was embedded between two **CP8** monomers. Furthermore, the skeleton of **CP8** was completely reorganized compared to the crystalline structure of **D8**, since the monomers adopted a trigonal pyramid shape, where the leucine chains were at the vertices of the imaginary triangle, and the *tris*-triazolic cap served as the apex. After these findings, we verified that other halides that in our initial studies did not promote the formation of any complex with **CP8** (bromide and iodide), did do so when a small amount of extra water was added to the samples. Other anions, such as AcO^-, NO_3^-, N_3^-, also promoted the formation of similar complexes with **CP8**, although in these cases, we ignore the number of water molecules that participate in the formation of the clusters. Following these results, we decided to study the transporter activity of **CP8**. Through the lucigenin assay, we verified that it could promote H^+/Cl^- (or Cl^-/OH^-) exchange, something that we confirmed with the HPTS assay, which informed us that chloride transport was associated with a basification of the intravesicular media. Furthermore, **CP8** was able to transport I^- and Br^- more efficiently than Cl^-. On the other hand, the transport efficiency of NO_3^- was similar to that of Cl^-, while for the rest of the anions studied, the efficiency was lower. On the other hand, studies with **CP9** showed that this peptide is selective for the recognition of F^-. Although, in this case, we do not have information provided by crystal structures, the NMR studies carried out show a behavior very similar to **CP8**, and then, we predict that the recognition mechanism must be similar. Regarding **CP12**, which shares the same cap as **CP9**, but with the Ach peptide backbone, it is not only unable of recognizing anions, but also is uncapable of homodimerizing to form **D12**, although we could verify that it can assemble with **CP5** to form the **D5-12** heterodimer. Predictably, the rigidity of **CP12** prevents it from rearranging its skeleton to properly orient the C=O and N-H groups for the formation of hydrogen bonds with another **CP12** molecule. However, the flexibility of **CP5** does allow its adaptation to **CP12** in order to form the heterodimeric species.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. Introducción

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1 La búsqueda humana de conocimiento

Que el hombre se ha encargado larga y obstinadamente de buscar comprensión a cerca de la vasta diversidad de sucesos del mundo en el que habita lo muestran los numerosos mitos y metáforas que ha elucubrado para explicar la existencia del mundo, de la vida y la muerte, del movimiento de los cuerpos celestes, del día y la noche y, por supuesto, de sí mismo.

La inquietud por el conocimiento es inherente al ser humano. Podríamos decir que es en la Antigua Grecia cuando surge la ciencia que busca entender *cómo* es el mundo y *por qué* es así: la filosofía. Del griego *philos* ("amor") y *sophia* ("pensamiento, sabiduría"), el término filosofía abarcaba, en la Antigua Grecia, mucho más que pensar sobre qué somos, a dónde vamos o de dónde venimos. En la Escuela de Atenas, fundada por Platón, discípulo de Sócrates, había a la entrada un grabado que decía *"No entre nadie que no sepa geometría"*. Aristóteles fue, a su vez, discípulo de Platón, y de sobra son conocidas sus aportaciones en lógica, metafísica, física, astronomía o biología, entre otras.[1] Puede parecer extraño que, tiempo atrás, hubiese hombres con tan amplio espectro de erudición, pero eso era, realmente, dedicarse por entero al saber.

Lo cierto es que, al echar la vista atrás y leer sobre cómo algunos científicos antiguos concebían la realidad que ante ellos se abría paso, algunos ponen el grito en el cielo. Y es que muchas han sido las piezas que han ido componiendo el puzle de la realidad que hoy conocemos. Todas esas piezas fueron cuidadosamente estudiadas en su tiempo, antes de consolidarse como claves para el entendimiento, pero para ello, otras hipótesis, por locas que puedan parecernos actualmente, se barajaron, e incluso se dieron en algún momento por ciertas.[2]

En la época de Galileo, era conocido que una bomba aspirante que funcionaba por medio de un pistón podía extraer agua de un pozo a través de un tubo, pero que no podía elevar el agua más de 34 pies por encima de la superficie del pozo. Galileo había intentado sin éxito dar una explicación a este hecho. Fue su discípulo, Torricelli, quién propuso una explicación. La tierra estaba rodeada por un *mar de aire*, cuyo peso ejerce presión sobre la superficie de la tierra. Esa misma presión, ejercida sobre la superficie del pozo, debía ser la que obligaba al agua a subir por el tubo cuando se hacía subir el pistón. Torricelli argumentó que, *si* la conjetura era verdadera, *entonces* la presión de ese *mar de aire* sería capaz de sostener una columna de mercurio proporcionalmente más corta. Era conocido que la gravedad específica del mercurio era aproximadamente 14 veces la del agua, por lo que aquella columna, según sus cálculos, debía subir 34/14 pies. Para su experimento, hizo uso de un ingenioso aparato que pasó luego a ser conocido como el barómetro de mercurio. El pozo de agua se sustituyó por un recipiente abierto que contenía mercurio; el tubo de la bomba aspirante fue sustituido por un tubo de cristal, que estaba cerrado por un extremo. Llenó el tubo de mercurio, y utilizó su pulgar para cerrar el extremo abierto. A continuación, invirtió el tubo, sumergiendo el extremo abierto en el recipiente con mercurio. La columna de mercurio descendió hasta alcanzar exactamente la

[1] Jaeger. W.; *Aristóteles*, Fondo de cultura económica de España, Madrid, 1999, traducido por Gaos. J.
[2] Hempel, Carl.G. *Filosofía de la ciencia natural*, Alianza Editorial, Madrid, 1973, traducido por Deaño. A.

altura que él había previsto. Ante estas observaciones, su contemporáneo, Pascal, le escribió sugiriendo que, *si* en realidad el barómetro estaba contrapesado por la presión del aire sobre el recipiente abierto, *entonces* la altitud afectaría a la longitud de la columna, puesto que el peso del aire es menor cuanto mayor es la altura. Le instó a repetir el experimento a los pies de la montaña Puy-de-Dôme y también en la cima. Además, en aquel tiempo, la acción de las bombas aspirantes era explicada por la idea del *horror vacui* (horror al vacío) de la naturaleza. A Pascal le pareció que aquel experimento de diferencia de altura constituiría una refutación decisiva de que tal *horror vacui* no existía, y así se lo hacía saber en la carta que le escribió:

"…Si ocurriera que la altura del mercurio fuera menor en la cima que en la base de la montaña…se seguiría necesariamente que el peso y la presión del aire es la única causa de esta suspensión del mercurio, y no el horror al vacío: porque es obvio que hay mucho más aire ejerciendo presión al pie de la montaña que en la cumbre, y no se puede decir que la naturaleza tenga más horror al vacío al pie de la montaña que en la cumbre."

Torricelli envío a su cuñado Périer, quien midió la longitud de la columna a los pies de la montaña, de unos 4800 pies. Repitió la medida en la cumbre de la montaña, y la altura de la columna era más de tres pulgadas menor que su medida previa, a los pies de la montaña. En el informe que le envió a Torricelli escribía:

"…Lo intenté, por tanto, cinco veces más, con gran cuidado, en diferentes lugares de la cima, una vez bajo techado, en la capilla que hay allí, otra vez al aire libre, otra vez en el refugio, otra vez al viento, otra vez con buen tiempo y otra vez en medio de la lluvia y la niebla que sobrevienen a veces, teniendo cuidado siempre de liberar el aire del tubo; y en todos los ensayos encontré que la altura del mercurio era la misma…; este resultado me dejó completamente satisfecho."

Con su experimento, Torricelli demostró que el aire tiene peso y su hallazgo se enuncia bajo el principio de Torricelli, la unidad de presión *Torr* se nombró en su memoria. Además, fue concluyente para desterrar el concepto de *horror vacui*.

Los experimentos de Torricelli y Périer ilustran el uso de la experimentación como método de contrastación y nos muestra que los buscadores de conocimiento están dispuestos a abandonar o modificar cualquier hipótesis previamente aceptada. También, que debemos evitar introducir argumentos *ad hoc* en nuestros razonamientos, esto es, argumentos que tienen como único propósito salvar una hipótesis seriamente amenazada por una observación experimental adversa.

Desde el tiempo de Torricelli hasta el nuestro, los científicos han trabajado en ir completando cada vez más ese puzle de la realidad, de lo conocido, en ir encontrando respuestas bajo la premisa de que la ciencia, después de todo, se ocupa de desarrollar una concepción del mundo que tenga una relación clara y lógica con nuestra experiencia y sea, por tanto, susceptible de contrastación objetiva.[3]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[3] Kuhn, T.S; *La estructura de las revoluciones científicas*, Fondo de cultura económica de España, Madrid, 2006, traducido por Solis, C.

La concepción de la ciencia que tenemos hoy en día, y más aún, la visión periférica de la misma, donde hay cientos de disciplinas bajo su paraguas, es el resultado de un trabajo cooperativo, donde unos ponen las bases que asientan lo que otros descubrirán mañana. De igual modo ha sucedido con la disciplina que constituye la esencia de esta tesis doctoral: la química supramolecular.

4.2 La química supramolecular

En 1873, Johanes Diderik van del Waals, postulaba en su tesis doctoral una ecuación de estado que incluía, por primera vez, tanto el estado gaseoso como el líquido, tratando de demostrar que ambos tienen la misma naturaleza.[4] Los trabajos previos de Rudolf Clausius sobre termodinámica y de Thomas Andrews sobre las transiciones de fase, despertaron el interés de van der Waals por el calor como un fenómeno del movimiento. Con las apreciaciones de sus contemporáneos, tuvo el ingenio suficiente para apreciar la necesidad de tener en cuenta los volúmenes de las moléculas y las fuerzas de atracción entre las mismas. Se conoce, por tanto, como fuerzas de van der Waals a un tipo de fuerzas intermoleculares atractivas o repulsivas, diferentes de aquellas que generan los enlaces atómicos (iónico, metálico o covalente) o a la atracción electrostática entre iones y otras moléculas. En 1910, van der Waals obtuvo el premio Nobel de Física por sus aportaciones sobre la ecuación de los gases reales. Por su parte, en 1894, Alfred Werner introdujo las ideas fundamentales de la química de coordinación.[5] Hablaba ya de la existencia de dos tipos de valencias, la primaria o unión ionizable (número de oxidación) y la secundaria o unión no ionizable (número de coordinación). Postulaba que la valencia secundaria o número de coordinación estaba dirigida hacia posiciones determinadas en el espacio. Werner siguió trabajando extenuadamente en perfilar su teoría y en 1914 preparó el $\{Co[(OH)_2Co(NH_3)_4]_3\}^{6+}$ para demostrar que la actividad óptica no era una propiedad exclusiva de las moléculas con átomos de carbono en su estructura.[6] Por sus aportaciones en la química de la coordinación recibió el premio Nobel de Química en 1913.

Paralelamente a los trabajos de Werner, Emil Fischer postuló en 1894 el *modelo de la llave-cerradura* para explicar el modo de acción de las enzimas.[7] Según este modelo, la cavidad de la enzima presenta una forma y tamaño específicos que han de ser complementarios a los del sustrato, y ninguno de ellos influía en la forma o tamaño del otro, si no que encajaban. Sobre este terreno, no sería hasta 1958 cuando Daniel Koshland refinaría este modelo incluyendo el término de *adaptación inducida* (*induced fit model*) que proponía que la conformación del sitio activo de la enzima es maleable y que la unión del sustrato induce cambios en ese sitio activo con el fin de amoldarse mejor.[8] Poco después, en 1965, Monod, Wyman y Changeux introducen una modificación a este modelo, la *selección conformacional*.[9] Argumentaban que ese cambio conformacional del sitio activo se produce antes de la unión del ligando, y no durante o después, como propone el modelo de adaptación inducida. Para llevar a cabo ese salto de postulados, fueron fundamentales los trabajos de Bohr y Hill que dieron origen al término

[4] Van der Waals, K. D. *On the Continuity of the Gaseous and Liquid States*, Universiteit Leiden, Leiden, **1873**.
[5] Werner, A. *Zeitschr. Anorg. Chem.* **1893**, *3*, 267-330.
[6] Werner, A. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, *40*, 2103-2125.
[7] Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985-2993.
[8] Koshland, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, *44*, 98-104.
[9] Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J. P. *J. Mol. Biol.* **1965**, *12*, 88-118.

cooperatividad.[10] En 1904 Bohr estudiaba la unión del oxígeno a la hemoglobina. Al representar sus resultados observó que la variación de la saturación de hemoglobina con respecto a la presión parcial de oxígeno se obtenía una curva con forma sigmoidal.[11] Esto es, cuanto más oxígeno se unía a la hemoglobina, más fácil era la unión de más oxígeno, hasta saturar todos los sitios de unión. La primera descripción de unión cooperativa a una proteína con varios sitios de unión fue hecha por Hill, en 1910, cuando, basándose en las observaciones de Bohr sugirió la que conocemos como ecuación de Hill.[10]

Durante los más de setenta años que transcurrieron desde los postulados de Werner hasta el modelo de selección conformacional, otros científicos hicieron aportaciones que supusieron un cambio de rumbo en la manera de entender las interacciones entre moléculas.[12]

En torno a 1900, se intentaba explicar el comportamiento anómalo que presentaban algunas sustancias, por ejemplo, puntos de ebullición elevados en comparación con su baja masa molecular. En 1912, T.S. Moore y T.F. Winmill usaron el enlace de hidrógeno para justificar el hecho de que el hidróxido de trimetilamonio sea una base más débil que el hidróxido de tetrametilamonio.[13] La descripción formal de enlace de hidrógeno la introdujeron Latimer y Rodebush en 1920.[14] En ese artículo, reconocieron lo siguiente respecto a su colega Maurice Loyal Huggins:

"El Sr. Huggins de este laboratorio, en un trabajo aún no publicado, ha usado la idea de núcleo de hidrógeno sostenido entre dos átomos como una teoría con respecto a cientos de compuestos orgánicos."

Se define como enlace de hidrógeno a un tipo de unión no covalente que involucra la atracción electrostática entre un átomo de hidrógeno y un átomo electronegativo que posee un par de electrones solitario. Para que se produzca esta interacción el hidrógeno también debe estar unido a un átomo electronegativo. Es la interacción que sostiene la estructura de la doble hélice de ADN, descrita en 1953 por Francis Crick y James Watson,[15] con la contribución de Maurice Wilkins y Rosalind Franklin.[16] Un poco más tarde que la descripción del enlace de hidrógeno, se completa la definición de fuerzas de van der Waals, con las aportaciones de Keesom y la interacción dipolo-dipolo (1953),[17] Debye y la interacción dipolo permanente-dipolo inducido (1920),[18] y las fuerzas de dispersión de London o dipolo instantáneo-dipolo inducido (1937).[19] A la par que estas aportaciones, Karl Lothar Wolf introduce el término

[10] Hill, A. V. *J. Physiol.* **1910**, *40*, 4-7.
[11] Bohr, C.; Hasselbalch, K.; Krogh, A. *Skand. Arch. Physiol.* **1904**, *16*, 402-412.
[12] a) Hirota, H.A. *History of Modern Chemistry*, Kyota Univ. Press, Kyota, **2016**. b) J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 3rd edn., **2022**.
[13] Moore, T. S.; Winmill, T. F. *J. Chem. Soc. Trans.* **1912**, *101,* 1635-1676.
[14] Latimer, W. M.; Rodebush, W. H. *J. Am. Chem. Soc*. **1920**, *42*, 1419-1433.
[15] Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
[16] a) Wilkins, M. H. F.; Stokes, A. R.; Wilson, H. R. *Nature* **1953**, *171*, 738-740; b) Franklin, R. E.; Gosling, R. G. *Nature* **1953**, *171*, 740-741.
[17] Keesom, W. H. *Proc. Royal Netherlands Acad. Art. Sci.* **1915**, *18*, 636-646.
[18] Debye, P. *Physikalische Zeitschrift.* **1920**, 21, 178-187.
[19] London, F. *Tran. Faraday Soc.* **1937**, *33*, 8-26.

supermolécula (en alemán *Übermoleküle*) para referirse a los dímeros de ácido acético unidos por enlaces de hidrógeno.

A finales de la década de 1960 y principios de 1970, Cram, Pedersen y Lehn llevaron a cabo los primeros trabajos que supusieron el inicio de la química supramolecular como disciplina de estudio dentro de la química. En mayo de 1959 Charles Pedersen preparó dos poliéteres cíclicos y estudió su capacidad para coordinar iones metálicos (Figura 1A).[20] Siendo consciente de que lo que había encontrado era, ciertamente, relevante, pocos meses después, publicó un segundo trabajo donde ampliaba el estudio con casi cincuenta nuevos poliéteres, a los que ya, en este segundo artículo, bautizó como *éteres corona*.[21] Sobre las condiciones necesarias para la formación de los complejos y los factores que influían en la estabilidad de los mismos, anotaba lo siguiente:

1 -Los tamaños relativos de los iones y el hueco del anillo de poliéter.
2 -El número de átomos de oxígeno del anillo de poliéter.
3 -La coplanaridad de los átomos de oxígeno.
4 -El emplazamiento simétrico de los átomos de oxígeno.
5 -La basicidad de los átomos de oxígeno.
6 -El impedimento estérico del anillo de poliéter.
7 -La tendencia del ion a asociarse con el disolvente.
8 -La carga eléctrica de ion.

Con estas observaciones, se aprecian ya algunas de las nociones fundamentales de lo que Donald Cram pasaría, años más tarde, a describir como *química anfitrión-huésped,* de la que se hablará más adelante. Así mismo, a los éteres corona les siguieron los diaza-polioxa macrobiciclos que se engloban bajo el término *criptandos* (Figura 1B). Fueron preparados por Jean-Marie Lehn,[22] como evolución de los éteres corona fusionados con el concepto de las diaminas macrobicíclicas, de las que ya se sabía que tenían propiedades complejantes.[23] A diferencia de los éteres corona, en los que el catión queda bidimensionalmente coordinado, en el caso de los criptandos, las tres cadenas de poliéter rodean tridimensionalmente al catión. Las siguientes estructuras descritas en esta línea de coordinación con cationes fueron los *esferandos* (Figura 1C), los que Cram, quien los preparó por primera vez, definió como el primer sistema de ligando completamente organizado *durante* la síntesis, y no *a través de* la complejación. [24] Es decir, era un sistema preorganizado. Así justificaba en un artículo posterior que estos ciclohexa–[*meta*-arilenos] fuesen mejores complejantes para Li^+ y Na^+ que los éteres corona o criptandos, debido a que su rigidez y planaridad los predisponía a la complejación (Figura 1C).[25] Es en este trabajo cuando hace una puntualización explícita sobre dos términos

[20] Pedersen, C. J. *J Am Chem Soc* **1967**, *89*, 2495-2496.
[21] Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017-7036.
[22] a) Dietrich, B.; Lehn, J.-M.; J. P. Sauvage. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 2885-2888; b) Dietrich, B.; Lehn, J.-M.; Sauvage, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 2889-2892.
[23] a) Simmons, H. E.; Park, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2428-2429; b) Park, C. H.; Simmons, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2429-2431; c) Park, C. H.; Simmons, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2431-2432.
[24] Trueblood, K. N.; Knobler, C. B.; Maverick, E.; Helgeson, R. C.; Brown, S. B.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103,* 5594-5596. CCDC: 1121106.
[25] Artz, S. P.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106,* 2160-2171.

que, ya estaban siendo tenidos en cuenta en las estructuras publicadas previamente por otros científicos, aunque aún no habían sido rigurosamente definidos. Se trata de los términos *preorganización* y *complementariedad*. Sobre ellos aclara:

"El principio de complementariedad establece que, en complejos de estabilidad sustancial, los sitios de unión del anfitrión y el huésped deben estar en contacto y atraerse simultáneamente. El principio de preorganización establece que, cuanto más organizados están el anfitrión y el huésped para la unión y para la solvatación antes de su complejación, más estable será su complejo."

En 1974, Cram utiliza el término "*host-guest" chemistry*, en un artículo que lleva ese mismo título, y que a continuación suscribe *"Los complejos entre compuestos orgánicos simulan la selectividad de las enzimas por los sustratos"*.[26] Evidencia, por tanto, la claridad con que, desde los comienzos de la química supramolecular se advierte la similitud entre el funcionamiento del sitio activo de las enzimas y la acomodación de un anfitrión a su huésped, o viceversa. En esta publicación, Cram manifiesta que, *en la química "host-guest", la molécula anfritriona reconocerá con mayor afinidad a aquel huésped que presente estructura, sitios de unión y especificidades estéricas que la complementen*.

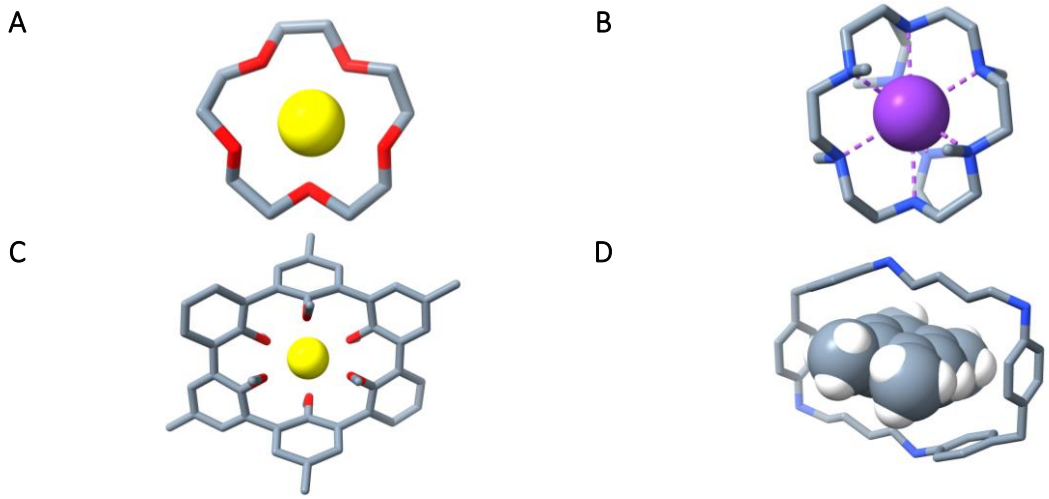


Figura 1. A) 15-corona-5 complejado con Na^+;[27] B) Criptando complejado con K^+;[28] C) Esferando complejado con Na^+;[23] D) Ciclofano ocupado por una molécula de 1,2,4,5-tetrametilbenceno.[29]

Por ser los pioneros de la química supramolecular, Cram, Pedersen y Lehn recibieron el premio Nobel de Química en 1987. En su discurso, Lehn definió la química supramolecular como "*la química más allá de la molécula"*, aunque el término ya había sido introducido por él mismo con anterioridad.[30] A raíz de este galardón, Cram publicó una recopilación de los trabajos que, entre los tres, habían abierto las puertas a esta nueva disciplina, además de

[26] Cram, D. J.; Cr, J. M. *Science* **1974**, *183*, 803-809.
[27] Buchanan, G. W.; Gerzain, M.; Bensimon, C. *Acta Cryst.* **1994**, *50*, 1016-1019. CCDC: 1205866.
[28] Kim, J.; Ichimura, A. S.; Huang, R. H.; Redko, M.; Phillips, R. C.; Jackson, J. E.; Dye, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10666-10667. CCDC: 137814.
[29] Odashima, K.; Itai, A.; Iitaka, Y.; Koga, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2054-2055. CCDC: 1100928.
[30] a) Lehn, J.-M. *Acc. Chem. Res*. **1978**, *11*, 49-57. b) Lehn, J. M. *Pure Appl. Chem.* **1978**, *50*, 871-892.

resaltar ciertos conceptos claves en este ámbito. Nombraba entonces el término *reconocimiento estructural* como algo embebido dentro de la química anfitrión-huésped.[31] El paraguas de la química supramolecular engloba, principalmente, dos ramas bien diferenciadas, el reconocimiento molecular (o química *anfitrión-huésped*) y el autoensamblaje. La diferencia entre estas dos áreas es una cuestión de tamaño y forma.

El reconocimiento molecular implica la unión selectiva de un sustrato a un receptor para formar una especie supramolecular. Este proceso depende de la información molecular almacenada en las especies que interactúan.[32] A su vez, dicha información molecular engloba aspectos conformacionales, de tamaño, rigidez, polaridad, grupos funcionales presentes en las estructuras y aspectos electrónicos, entre otros. Se define entonces el sitio de unión entre ambos como un hueco o región, de cualquiera de los dos, cuya forma, geometría y naturaleza química son complementarios.[33] En los procesos de reconocimiento molecular, el anfitrión es una molécula de mayor tamaño que el huésped. Además, el anfitrión, mayoritariamente, es una molécula covalente, no un ensamblado, aunque capaz de establecer interacciones no covalentes con el huésped.

Los procesos de autoensamblaje van un pasó más allá y suponen la organización de un mayor número de componentes para dar lugar a una supraestructura. Requieren, por tanto, un grado superior de complementariedad para poder llevar a cabo esa organización siguiendo un plan definido basado en numerosos eventos de reconocimiento molecular.[30] En los procesos de autoensamblaje no hay, normalmente, una diferencia significativa de tamaño entre los componentes y tampoco se puede decir que unas moléculas sean las receptoras y otras los huéspedes. Es un sistema en equilibrio entre dos o más componentes para producir una estructura agregada, que, por supuesto, depende altamente de la complementariedad entre los componentes o bloques de construcción (*building blocks*).[31]

Un sistema basado en el reconocimiento molecular presente en la naturaleza, son las enzimas naturales, como se ha comentado previamente. Por ejemplo, la nitrito oxidoreductasa, que se clasifica dentro de las molibdoenzimas, presenta un sitio activo con un ion molibdeno unido a cuatro tiolatos de dos moléculas de pterina. La esfera de coordinación del molibdeno se completa con la cadena lateral de ácido aspártico (Figura 2A). Esta enzima se encuentra en la bacteria *Kuenenia stuttgartiensis*. Cataliza la transformación de nitrito y amonio en nitrato y N_2.[34] La molécula de nitrato, que actúa como sustrato (*guest*) se une al sitio activo por medio del ion modibdeno. Viéndolo desde otra perspectiva, otro fenómeno natural que tiene su analogía en el reconocimiento molecular, o más quizás en la encapsulación, es la endocitosis, un proceso crucial para que las células puedan internalizar macromoléculas y partículas utilizando vesículas de transporte que aíslan una sustancia del entorno mediante encapsulación.[35]

[31] a) Cram, D. J. *Science* **1988**, *240*, 760-767. b) Cram, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1009-1020
[32] Jean-Marie, L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **1990**, *29*, 1304-1319.
[33] Steed, J. W.; Turne, D. R.; Wallace, K. J. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, **2007**.
[34] Castiglione, N.; Rinaldo, S.; Giardina, G.; Stelitano, V.; Cutruzzolà, F. *Antiox. Redox Signal.* **2012**, *17*, 684-716.
[35] Conner, S. D.; Schmid, S. L. *Nature* **2003**, *422*, 37-44.

Por otra parte, un ejemplo clásico de estructura autoensamblada en la naturaleza es la doble hebra de ADN (Figura 2B), donde dos hebras complementarias se enrollan por medio de interacciones de enlace de hidrógeno y π- π stacking, dando lugar al producto autoensamblado más estable termodinámicamente. Así, adenina y timina son bases nitrogenadas complementarias, al igual que citosina y guanina. Creciendo en el nivel de complejidad, se encuentra el ensamblado de proteínas para dar lugar a estructuras cuaternarias ocurre de modo similar.[36] Otro ejemplo muy conocido en este sentido, es el del virus del mosaico del tabaco, donde una sola cadena de ARN guía el enrollamiento de más de 2000 unidades de proteína en torno a ella.[37]

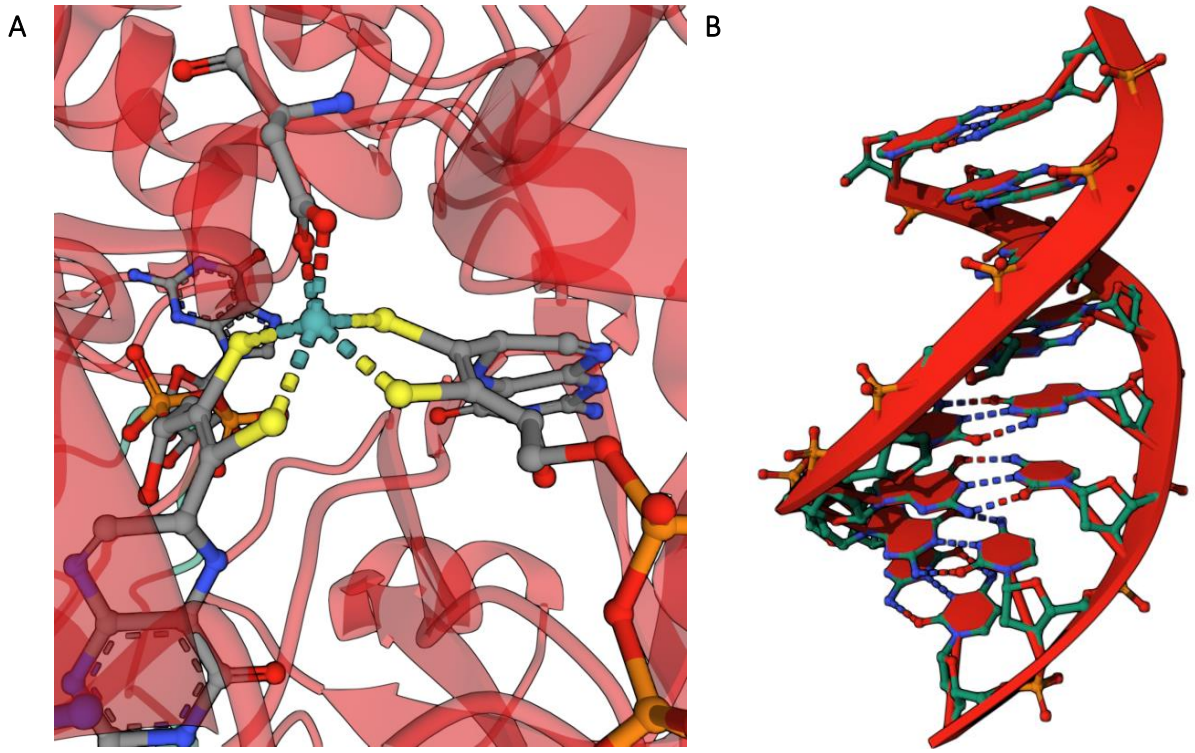


Figura 2. A) Sitio activo de la nitrito oxidorreductasa de la bacteria anammox *Kuenenia stuttgartiensis*.[38] B) Doble hebra de ADN.[39]

[36] Perham, R. N. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **1975**, *272*, 123-136.

[37] a) Larson, S. B.; Koszelak, S.; Day, J.; Greenwood, A.; Dodds, J. A.; McPherson. *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 375-391. b) Larson, S. B.; Day, J.; Greenwood, A.; Mcpherson, A. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 37-59. c) Larson, S. B.; Day, J. S.; Mcpherson, A. *Acta Cryst.* **2014**, *70,* 2316-2330.

[38] Chicano, T. M.; Dietrich, L.; de Almeida, N. M.; Akram, M.; Hartmann, E.; Leidreiter, F.; Leopoldus, D.; Mueller, M.; Sánchez, R.; Nuijten, G. H. L.; Reimann, J.; Seifert, K. A.; Schlichting, I.; van Niftrik, L.; Jetten, M. S. M.; Dietl, A.; Kartal, B.; Parey, K.; Barends, T. R. M. *Nat. Microbiol.* **2021**, *6*, 1129-1139. PDB: 7b04

[39] Shakked, Z.; Guerstein-Guzikevich, G.; Eisenstein, M.; Frolow, F.; Rabinovich, D. *Nature* **1989**, *342*, 456-460. PDB: 2D94.

Las estructuras autoensambladas se estudian ampliamente por sus potenciales aplicaciones en diversas áreas como la medicina,[40] industria de plásticos,[41] almacenamiento de energía,[42] materiales ópticos,[43] entre otros. Sin embargo, no serán abordadas en detalle en la introducción de esta tesis, al no ser este el foco del trabajo contenido en la misma. Se hará una revisión por la química anfitrión-huésped (*host-guest*).

4.3 Química anfitrión-huésped

4.3.1 Conceptos fundamentales

A lo largo de esta introducción, y también en la discusión sobre la investigación que ha dado lugar a esta tesis doctoral, recurriremos a términos frecuentemente empleados para describir sistemas supramoleculares. Se recogen a continuación una breve descripción de algunos de ellos:

Constante de asociación (K_a). La estabilidad termodinámica de un complejo *"host-guest"* en un disolvente y temperatura concretos, se mide a través de su contante de asociación K_a. Esta se define como el cociente entre la concentración del complejo Receptor-Sustrato (RL) y el producto de las concentraciones de Receptor (R) y Sustrato (L) (Eq.1) y suele expresarse en M^{-1}, para complejos 1:1.[44]

$$R + L \rightleftharpoons RL$$

$$K_a = \frac{[RL]}{[R][L]} \quad \boldsymbol{Eq.1}$$

Este parámetro es la principal herramienta para evaluar la afinidad entre receptor y huésped en disolución. Por tanto, cuando mayor sea el valor de K_a, mayor será la concentración del complejo en disolución, ya que el equilibro estará desplazado hacia su formación. El disolvente en el cual se determina el valor de K_a es fundamental para poner en contexto la fortaleza de las interacciones no covalentes que participan en la formación del complejo. Se suele distinguir entre disolventes que compiten por los enlaces de hidrógeno, como H_2O, MeOH, DMF o DMSO y disolventes no competitivos, como hexano, $CHCl_3$, CH_2Cl_2 o CH_3CN.

[40] a) Ghitman, J.; Voicu, S. I. *Carbohydr. Polym. Tech. App*. 2023, *5*, 1-22. b) Seaberg, J.; Clegg, J. R.; Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. *Mat. Today*. 2023, *62*, 1190-224. c) Correia, C.; Reis, R. L.; Pashkuleva, I.; Alves, N. M. *Biomat. Adv*. 2023, *151*, 213439. d) Ferreira, F. V.; Souza, A. G.; Ajdary, R.; de Souza, L. P.; Lopes, J. H.; Correa, D. S.; Siqueira, G.; Barud, H. S.; Rosa, D. dos S.; Mattoso, L. H. C.; Rojas, O. J. *Bioact. Mater*. 2023, *29*, 151-176. e) Xu, J.; Hsu, S. hui. *J. Biomed. Sci*. 2023, *30*, 43.

[41] a) Yao, Y.; Xiao, M.; Liu, W. *Macromol. Chem. Phys.* 2021, *222,* 2100002. b) Liu, Q.; Gao, S.; Zhao, Y.; Tao, W.; Yu, X.; Zhi, M. *J. Mat. Sci*. 2021, *56*, 9605-9643. c) Paolillo, S.; Bose, R. K.; Santana, M. H.; Grande, A. M. *Polymers*. 2021, *13*, 201. d) Zhang, W.; Sani, M. A.; Zhang, Z.; McClements, D. J.; Jafari, S. M. *Int. J. Biol.l Macromol*. 2023, *230*, 123188.

[42] a) Zhang, B.; Li, Y.; Bai, H.; Jia, B.; Liu, D.; Li, L. *Nano Research*. 2023, *16*, 10597-10616. b) Menge, H. G.; Kim, M. W.; Lee, S.; Park, Y. T. *ACS Appl. Energy Mater.* 2023, 6, 7650-7657.

[43] a) Ma, Y. X.; Yin, H. L.; Yang, J.; Lin, H. T.; Chen, S. H.; Zhou, J.; Zhuo, S. P.; Wang, X. D. *Adv. Opt. Mat.* 2022, *11*, 2201000. b) Yamamoto, Y.; Yamagishi, H.; Huang, J. S.; Lorke, A. *Acc. Chem. Res.* 2023, *56*, 1469-1481.

[44] K. A. Connors, *Binding Constants*, John Wiley & Sons, New York, ChiChester, 1987.

Normalmente, las constantes de asociación para un mismo proceso son mayores cuando se miden en disolventes no competitivos, ya que no interfieren en las interacciones que dan lugar al complejo receptor-huésped. En cuanto a la determinación del valor de K_a, se suele recurrir a experimentos de valoración, donde el valorado es normalmente el receptor, y el valorante, el huésped. Para ello, se mide el cambio en alguna propiedad química o física de uno de ellos, de ambos, o del complejo que se forma. Las técnicas más empleadas son la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectroscopía UV-Vis. Este cambio está directamente relacionado con la concentración de alguna de las especies involucradas en el equilibro. Los datos experimentales pueden ajustarse a un modelo matemático si se conoce la estequiometría del equilibrio, a partir del cual se extrae el valor de K_a.[45]

Efecto hidrofóbico y efecto de Hofmeister. Estos dos efectos son esenciales para entender el comportamiento de los sistemas supramoleculares en medio acuoso. El efecto hidrofóbico se relaciona con la dificultad de las moléculas apolares para ser solvatadas, y su tendencia a aglomerarse. Este efecto juega un papel importante a la hora de acomodar moléculas orgánicas en cavidades hidrofóbicas, donde las moléculas de agua no están estabilizadas.[46] Por su parte, el efecto de Hosfmeister[47] explica cómo ciertas sales pueden interactuar directamente con un soluto y modificar su comportamiento en la disolución acuosa.[48] Por un lado, están los aniones hidrofílicos (kosmotrópicos) que provocan una fuerte ordenación del agua a su alrededor. Aumentan la tensión superficial y provocan la precipitación de moléculas apolares. Por otro lado, están los aniones hidrofóbicos (caotrópicos) que aumentan la solubilidad de moléculas apolares sin estar altamente hidratadas.[49]

Serie de Hofmeister (aniones)

Hidrofóbicos *Hidrofílicos*

ClO_4^- > I^- > SCN^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- >> F^- > IO_3^- > $CH_3CO_2^-$ > CO_3^{2-} > HPO_4^{2-} > SO_4^{2-} > citrato^{3-}

Contribución Entálpica *vs* Entrópica en la formación de un complejo *host-guest.* Una vez conocida la interacción entre dos moléculas para dar lugar al complejo, además de la constante de asociación, es posible determinar el resto de los parámetros termodinámicos del proceso. La variación de K_a con la temperatura se relaciona con ΔH y ΔS a través de la ecuación de van't Hoff (Eq. 2).[50] El valor de estos dos parámetros permite dilucidar la naturaleza del proceso de complejación.[51]

$$\ln K_a = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad \boldsymbol{Eq.2}$$

[45] Thordarson, P. *Chem. Soc. Rev.* 2011, *40*, 1305–1323

[46] Murray, J.; Kim, K.; Ogoshi, T.; Yao, W.; Gibb, B. C. *Chem. Soc. Rev*. 2017, *46*, 2479-2496.

[47] Hofmeister, F. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 1888, *24*, 4–5.

[48] Okur, H. I.; Hladílková, J.; Rembert, K. B.; Cho, Y.; Heyda, J.; Dzubiella, J.; Cremer, P. S.; Jungwirth, P. *J. Phys. Chem. B*. 2017, 121, 1997-2014.

[49] Gibb, C. L. D.; Gibb, B. C. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, *133*, 7344-7347.

[50] van't Hoff, M. J. H., *Etudes de Dynamique Chimique*, Frederik Müller, Amsterdam, 1884.

[51] Atkins, P.; Paula, J. de; Keeler, J. *Atkins' Physical Chemistry*, 12th ed., Oxford University Press, Oxford, 2022.

En disolución, los fenómenos de complejación compiten con la solvatación, teniendo en cuenta, además, que el disolvente se encuentra en gran exceso en comparación con el número de moléculas de receptor y huésped. Imaginando un sistema donde R y L se unen para dar lugar al complejo RL, primero ha de producirse la desolvatación total o parcial de ambos, entrópicamente favorable, pero entálpicamente desfavorable. Si el receptor no está preorganizado, debe producirse entonces la reorganización de este, que tiene un coste tanto entrópico como entálpico. Posteriormente, tiene lugar la unión entre R y L, que suele ser muy favorable entálpicamente. Por último, el complejo RL queda solvatado, lo cual se asocia con una penalización entrópica, pero es entálpicamente favorable. Aunque hay excepciones, cuando hablamos de complejos donde prima la contribución entálpica, nos referimos a que las interacciones que se establecen entre el receptor y el huésped son la ''fuerza'' que impulsa la formación del complejo. Sin embargo, cuando hablamos de una gran contribución entrópica, normalmente nos referimos a que la desolvatación del anfitrión y/o del sitio de unión del huésped, favorecen en mayor medida la complejación.

Cooperatividad. En el ejemplo de complejación más simple que podemos imaginar, la unión 1:1 de un receptor con un huésped, cuanto mayor es el número de interacciones favorables entre ambos componentes, mayor es la estabilización del sistema en su conjunto con respecto a las partes por separado. Decimos que entre ellos hay complementariedad. Sin embargo, cuando un huésped presenta dos o más sitios de unión para unirse a un huésped, hablamos de cooperatividad. Si la estabilidad del complejo es mayor que la suma de las energías de interacción del huésped con cada sitio de unión por separado, se dará un proceso de cooperatividad positiva. Esto ocurre cuando se produce la unión de un receptor con más de un huésped y la coordinación con el primero favorece la unión del segundo y/o siguientes. En el ejemplo de la hemoglobina que hemos mencionado previamente, la unión del oxígeno a los grupos hemo opera bajo un régimen de cooperatividad positiva.[52] La unión de la primera molécula de O_2 induce un plegamiento de la proteína que facilita la unión de las otras tres moléculas. Contrariamente, si los efectos estéricos o electrónicos tras la unión del primer huésped causan que la estabilidad del complejo formado sea menor que la suma de sus partes, estaremos ante un caso de cooperatividad negativa. Aplicamos este término cuando la unión del primer huésped es favorable, pero dificulta la coordinación del segundo.[53]

Plantilla molecular. El concepto plantilla molecular es la traducción directa del inglés *molecular templating*, que hace referencia a los procesos donde la presencia del huésped desencadena la reorganización del receptor, que se dispone en torno a él.[54] Este concepto se ha investigado en la formación de complejos supramoleculares.[55] También se aplica en la

[52] Eaton, W. A.; Henry, E. R.; Hofrichter, J.; Mozzarelli, A. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 1999, *6*, 351-358.

[53] a) von Krbek, L. K. S.; Schalley, C. A.; Thordarson, P. *Chem. Soc. Rev.* 2017, *46*, 2622-2637. b) Hunter, C. A.; Anderson, H. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, *48*, 7488-7499.

[54] a) Dietrich-Buchecker, C. O.; Sauvage, J. P. *Chem. Rev.* 1987, *87*, 795-810. b) Ashton, P. R.; Goodnow, T. T.; Kaifer, A. E.; Reddington, M. V.; Slawin, A. M. Z.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Vicent, C.; Williams, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1989, *28*, 1396-1399.

[55] a) Foyle, É. M.; White, N. G. *Chem. Asian. J.* 2021, *16*, 575-587. b) Liang, L.; Zhao, W.; Yang, X.-J.; Wu, B. *Acc. Chem. Res.* 2022, *55*, 3218-3229.

síntesis de moléculas de gran tamaño, guiada a través por la interacción con un huésped, [56] que puede quedar finalmente atrapado en el interior.[57]

Tras esta breve revisión de algunos términos, en los siguientes apartados se abordarán los receptores moleculares atendiendo al tipo de enlace que los conforma. Diferenciaremos entre aquellos receptores formados mediante enlaces covalentes cinéticamente estables, enlaces covalentes dinámicos, enlaces de coordinación, y, por último, interacciones no covalentes.

4.3.2 Receptores formados a través de enlaces covalentes cinéticamente estables.

Atendiendo a los primeros ejemplos de receptores sintéticos supramoleculares, brevemente descritos en el apartado 2, fueron preparados empleando química tradicional donde cada átomo del receptor estaba unido a otros a través de enlaces puramente covalentes.

Tras las aproximaciones más sencillas a través de los éteres corona, criptandos y ciclofanos, Cram propone diseñar receptores con cavidades cóncavas donde el huésped quedase mejor acomodado, a los que llamó cavitandos. Además, aludía a la preorganización de estos sistemas, pues la cavidad ya está formada previamente a la presencia del huésped.[58] En base a estos principios, se comenzó utilizando derivados del resorcin[4]areno (Figura 3), aunque posteriormente evolucionaron a otras unidades fundamentales, englobándose todos bajo el nombre de calix[4]arenos.[59] Uno de los primeros ejemplos en este área es el que está formado por la unidad de resorcin[4]areno como base de la cavidad, y que incorpora *"paredes"* de quinoxalina.[60] Su interacción con diferentes huéspedes fue estudiada por Dalcanale y colaboradores, que determinaron que las interacciones de tipo dipolo-dipolo y CH···π eran determinantes para la acomodación del huésped.[61]

Mediante la incorporación de cuatro grupos hidroxilo en los extremos de las paredes, Rebek y colaboradores fueron capaces de preparar un cavitando soluble en agua, que poseía afinidad por sustratos hidrofóbicos.[62] Se observó que alcanos de entre cinco y diez carbonos se disponían de manera helicoidal para disminuir el contacto de la cadena con el disolvente,[63] debiendo su comportamiento, fundamentalmente, al efecto hidrofóbico. Cuando se intentaron encapsular dos conocidos surfactantes (SDS y DPC), se observó que los grupos polares quedaban orientados hacia la apertura de la cavidad (donde se sitúan los grupos hidroxilo del anfitrión), mientras que la cadena hidrocarbonada quedaba ocupando el fondo de la cavidad. Cuando se preparó un derivado de la estructura previamente descrita, pero que presentaba tendencia a encapsular haluros de alquilo, se comprobó que estos huéspedes tendían a moverse como un *"yo-yo"* en la cavidad, prefiriendo ocupar el fondo hidrofóbico de la misma.

[56] a) Sanders, J. K. M. *Pure Appl. Chem.* 2000, *72*, 2265-2274. b) Erichsen, A.; Peters, G. H. J.; Beeren, S. R. *J. Am. Chem. Soc.* 2023, *145*, 4882-4891.
[57] Frank, M.; Johnstone, M. D.; Clever, G. H. *Chem. Eur. J.* 2016, *22*, 14104-14125.
[58] Cram, D. J. *Science* 1983, *219*, 1177-1183.
[59] Gutsche, C. D.; Muthukrishnan, R. *J. Org. Chem.* 1978, *43, 4905-4906.*
[60] Moran, J. R.; Karbach, S.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, *104*, 5826–5828.
[61] Soncini, P.; Bonsignore, S.; Dalcanale, E.; Ugozzoli, F. *J. Org. Chem.* 1992, *57*, 4608-4612.
[62] Trembleau, L.; Rebek, J. Science, 2003, *301*, 1219-1220.
[63] Hooley, R. J.; Biros, S. M.; Rebek, J. *Chem. Commun.* 2006, 509-510.

Comparando cloruro, bromuro y yoduro de alquilo, el más hidrofóbico, yoduro, fue el que presentó menos tendencia a ocupar la zona media de la cavidad, alejándose, por tanto, del contacto con el agua.[64]

En la misma tendencia de estudio de plegamiento de moléculas en la cavidad del cavitando, Rebek ha incorporado bencimidazolonas *N*-metiladas como paredes del cavitando, con el objetivo de impedir su dimerización y estudiar cómo se pliegan los huéspedes de diferentes longitudes (Figura 3, centro).[65]

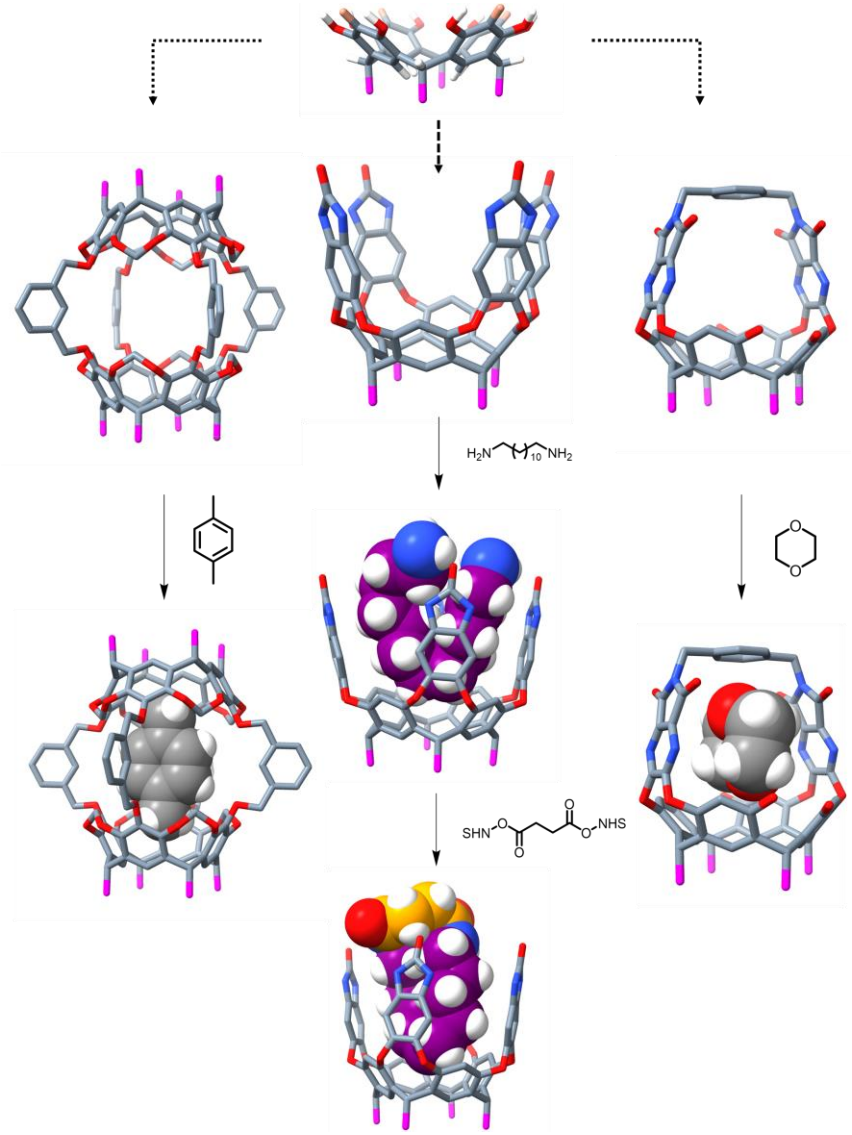


Figura 3. Receptores preparados a partir de la unidad de calix[4]areno. Izquierda: encapsulado de *p*-xileno en la cavidad de un hemicarcerando. (CCDC: 2047476).[67] Centro: macrociclación de diaminas con ésteres di-NHS del ácido succínico en el seno de un cavitando.[65,66] Derecha: 1,4-dioxano encapsulado en la cavidad de una estructura tipo *''molecular basket''*.[68] Los sustituyentes sobre los espaciadores de metileno (magenta) han sido omitidos por claridad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[64] Hooley, R. J.; Gavette, J. V.; Mettry, M.; Ajami, D.; Rebek, *J. Chem. Sci.* **2014**, *5*, 4382-4387.
[65] Zhang, K. D; Ajami, D.; Gavette, J. V.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5264-5266.

Coherentemente con sus observaciones previas, según los análisis de RMN, encontraron que alcanos de cadena corta (C_6-C_{11}) muestran la suficiente libertad conformacional en la cavidad como para girar rápidamente y dar lugar a entornos simétricos. Sin embargo, las cadenas largas (C_{13}-C_{14}) adoptan disposición de V, en la que los CH_2 centrales están próximos a la base de la cavidad, mientras que los metilenos de los extremos se encuentran cercanos entre sí en el espacio, y cercanos al borde superior del cavitando. Este comportamiento fue aprovechado más tarde para llevar a cabo reacciones de ciclación dentro de la cavidad, encontrando rendimientos cuatro veces mayores a los comparados con las ciclaciones llevadas a cabo en ausencia del receptor (Figura 3, centro).[66]

Utilizando también como unidad básica el resorcin[4]areno, otros autores han desarrollado receptores que encierran a huéspedes de manera tridimensional. Por ejemplo, utilizando un derivado que presenta un grupo hidroxilo en *para-*, Dyker y colaboradores han preparado recientemente hemicarcerandos que actúan como receptores esféricos capaces de encapsular diversos sustratos de forma reversible (Figura 3, izquierda).[67] Aunque la base de la caja es rígida, los conectores flexibles de *m*-xileno permiten al hemicarcerando adaptar su cavidad a diferentes huéspedes, además de orientarlos de manera que haya *match* entre los potenciales electrostáticos del huésped y el anfitrión. Diederich y colaboradores han estudiado la síntesis de receptores tipo cesta (*molecular basket*) incorporando puentes rígidos a la unidad de resorcin[4]areno.[68] Las interacciones de dispersión y C–H···π, además de las interacciones polares como C–O···C=O o S···π, estabilizan los complejos de inclusión con una variedad de anillos heterocíclicos pequeños (Figura 3, derecha).

Otro tipo de cavitandos ampliamente estudiados, además de los calixarenos, son los calixpirroles (Figura 4). Los receptores preparados a partir de la unidad de calix[4]pirrol, además de aportar una cavidad hidrofóbica, presentan también la capacidad de formar enlaces de hidrógeno en el fondo de la mismos, a través de las subunidades de pirrol, siendo, por tanto, magníficos receptores de aniones. El grupo de Ballester ha estudiado ampliamente este tipo de receptores.[69] En uno de sus últimos trabajos han preparado una serie de cavitandos derivados de esta estructura, que presentan unidades *arilo-superextendidas* como paredes. En el extremo de estas paredes, cercanos al borde superior, introdujeron grupos ionizables (carboxilato) o cargados (piridinio o 1-metil-imidazolio) que les otorgaban solubilidad en medio acuoso. Todos ellos eran capaces de albergar N-óxidos con constantes de asociación superiores a 10^5 M^{-1}.[70] Por un lado, el extremo N-O^- queda estabilizado en el fondo de la cavidad formando enlaces de hidrógeno con los NH de los pirroles, cuyo macrociclo adopta una conformación de cono (Figura 4, derecha). Por otra parte, las paredes aromáticas extendidas, como consecuencia de esta forma cónica, se aproximan a la molécula atrapada formando interacciones π-π con ella. Además, el efecto hidrofóbico y las interacciones CH··· π también contribuyen en la estabilización del complejo de inclusión. El derivado que incluye ocho subunidades de piridinio es capaz de formar complejos 1:1 en agua con bis-isonitrilos, bis-formamidas y formamida-

[66] a) Mosca, S.; Yu, Y.; Gavette, J. V.; Zhang, K. D; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 114582-14585. b) Shi, Q.; Masseroni, D.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10846-10848.
[67] Danielsiek, D.; Dyker, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 1026-1034. CCDC: 9747581.
[68] Fankhauser, D.; Kolarski, D.; Grüning, W. R.; Diederich, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 3575-3583.
[69] Escobar, L.; Sun, Q.; Ballester, P. *Acc. Chem. Res.* **2023**, *56*, 500-513.
[70] Escobar, L.; Ballester, P. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 1738-1748.

isonitrilos. El grupo formamida que queda próximo al fondo de la cavidad, tiende a orientarse en su conformación *cis*, favoreciendo la formación de cuatro enlaces de hidrógeno entre el oxígeno del grupo carbonilo del huésped y los cuatro NHs de los pirroles del anfitrión. En el atrapado de bis-isonitrilos, se observó que al tratar con medio ácido para obtener el producto de hidrólisis, solo se obtenían mono-formamidas (Figura 4, izquierda), ya que solo el isonitrilo expuesto en el borde de la cavidad era hidrolizado, quedando el segundo isonitrilo *"protegido"* en el fondo del cavitando.[71] El mismo grupo ha empleado reacciones de acoplamiento C-C o alquino-azida para unir dos calixpirroles con dos brazos cada uno, cerrando así la cavidad de estos receptores.[72] También han recurrido a la química de coordinación para cerrar por la parte superior los calixpirroles de cuatro brazos, gracias a la incorporación de piridinas en el extremo de los mismos.[73]

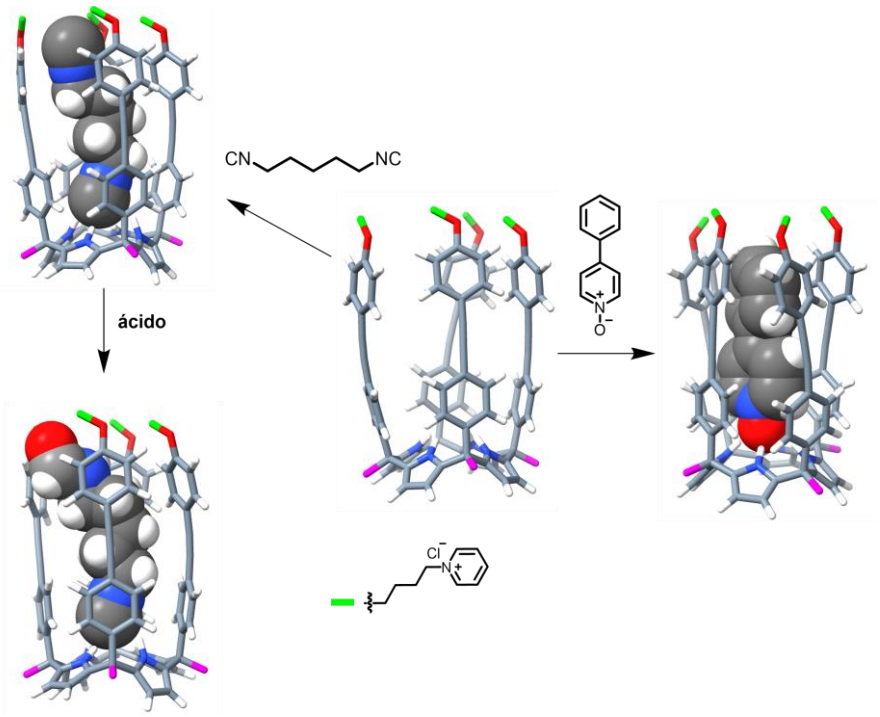


Figura 4. Cavitando preparado a partir de la unidad de calix[4]pirrol, capaz de albergar en su interior diferentes N-óxidos de piridinio, ilustrado con el derivado *p*-fenilo (derecha) y de promover la monohidrólisis de bis-isonitrilos alquílicos (izquierda).[70,71]

Un área bastante explorada de receptores covalentes son las lectinas sintéticas. Las lectinas son glicoproteínas capaces de unirse a azúcares con una elevada especificidad,[74] siendo las interacciones CH···π las que juegan el rol más importante en la estabilización del complejo de reconocimiento con el carbohidrato,[75] además de los enlaces de hidrógeno con los grupos

[71] Sun, Q.; Escobar, L.; Ballester, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 10359-10365.
[72] a) Valderrey, V.; Escudero-Adán, E. C.; Ballester, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10733-10736. b) Molina-Muriel, R.; Aragay, G.; Escudero-Adán, E. C.; Ballester, P. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 13507-13514.
[73] a) Escobar, L.; Escudero-Adán, E. C.; Ballester, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 16105-16109. b) Sun, Q.; Escobar, L.; de Jong, J.; Ballester, P. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 13469-13476.
[74] Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674.
[75] a) Ramírez-Gualito, K.; Alonso-Ríos, R.; Quiroz-García, B.; Rojas-Aguilar, A.; Díaz, D.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18129-18138. b) Vyas, N. K.; Vyas, M. N.; Quiocho, F. *Science* **1988**, *242*, 1290-1295

hidroxilo del azúcar. Sus imitadores sintéticos suelen ser cajas de tipo prisma cuadrangular o trigonal donde las caras superior e inferior incluyen motivos aromáticos, a través de los cuales estabilizan al sustrato mediante interacciones CH···π. Estas caras están unidas por lados de isoftalamida que contribuyen también a la estabilización mediante enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo de los carbohidratos. Para dar solubilidad en medio acuoso, en la posición *para*- de las isoftalamidas, que queda dispuesta hacia el exterior del receptor, se introducen grupos policarboxilato. El grupo del profesor Davis ha realizado multitud de trabajos en este campo, dando a conocer que, respecto del componente aromático de las caras superior e inferior, cuando más rica en electrones es este, más fuertemente se une el azúcar.[76] Además, aumentado su longitud, es posible albergar disacáridos o polisacáridos.[77] También se ha estudiado el número óptimo de unidades carboxilato de este tipo de receptores, encontrándose que 18 unidades (Figura 5, R_3) son las idóneas para favorecer el reconocimiento sin entorpecer la entrada del disacárido por motivos estéricos o de repulsión electrostática (Figura 5, R_4).[78] En cuanto a la síntesis, el grupo de Davis ha desarrollado diversas variantes en a las que las dos subunidades que componen el receptor se unen mediante enlaces amida.[76]

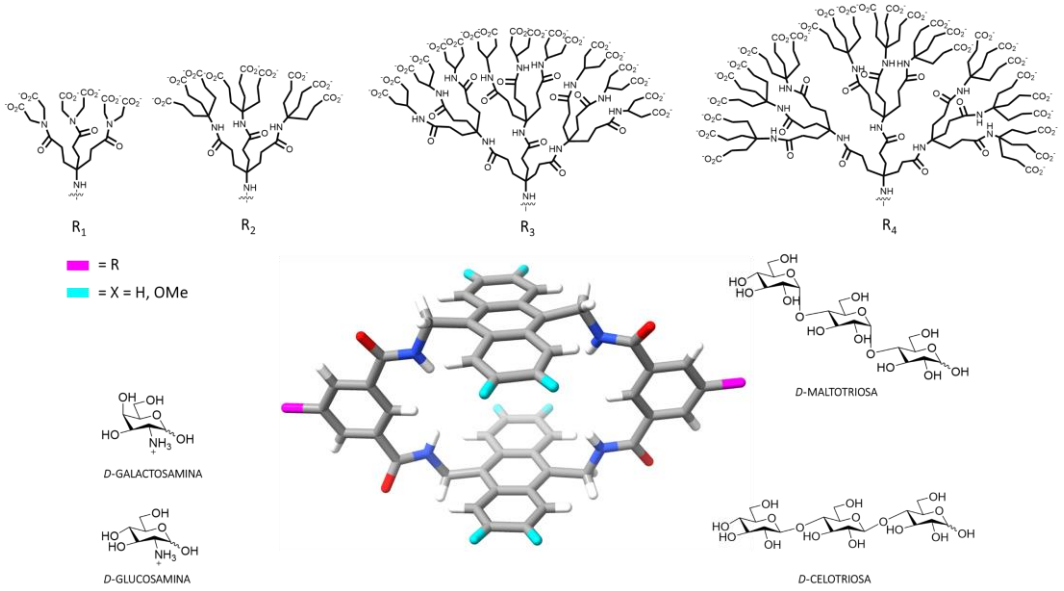


Figura 5. Lectina sintética capaz de reconocer *D*-galactosamina y *D*-glucosamina con mayor afinidad cuando está funcionalizada en sus laterales con R_3 (siendo X=H),[78] así como *D*-maltotriosa y *D*-celotriosa cuando está funcionalizada con R_2 (siendo X=OMe).[79]

Por otro lado, la química de *cross-coupling* también es una herramienta útil para la síntesis de cápsulas. En este caso, generalmente se preparan receptores compuestos únicamente por dos subunidades (Figura 6), ya que los acoplamientos C-C son, generalmente, poco eficientes cuando el número de enlaces que se pretenden formar simultáneamente es elevado. Chen y colaboradores prepararon, a través de acoplamientos Sonogashira y Eglington-Glaser, una

[76] Barwell, N. P.; Davis, A. P. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6548-6557.
[77] Sookcharoenpinyo, B.; Klein, E.; Ferrand, Y.; Walker, D. B.; Brotherhood, P. R.; Ke, C.; Crump, M. P.; Davis, A. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4586-4590.
[78] Destecroix, H.; Renney, C. M.; Mooibroek, T. J.; Carter, T. S.; Stewart, P. F. N.; Crump, M. P.; Davis, A. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2057-2061.
[79] Stewart, P.; Renney, C. M.; Mooibroek, T. J.; Ferheen, S.; Davis, A. P. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 8649-8652.

estructura compuesta exclusivamente por átomos de carbono e hidrógeno, dónde una subunidad de tripticeno actúa como cúspide y como base (Figura 6C).[80] Esta estructura daba lugar a empaquetamientos microporosos en estado sólido. Algunas variantes poseían, además, capacidad de adsorción de gases.[81] Estructuras aún más rígidas, compuestas por anillos de benceno en su totalidad, han sido preparadas a través de acoplamientos Suzuki-Miyaura y homoacoplamientos mediados por níquel. La estrategia se basa en preparar precursores menos rígidos que incluyen anillos de ciclohexano, y una vez que la arquitectura ya está formada, someterla a una última etapa de aromatización, quedando entonces una caja compuesta por anillos bencénicos unidos entre sí (Figura 6D).[82,83] Siguiendo una estrategia similar, Tanaka y colaboradores han preparado una caja con simetría terciaria compuesta por ocho anillos de benceno. Las propiedades fotofísicas de estas estructuras cambian con el número de anillos que las componen, ya que cuanto menor es el número de estos, menor es el gap HOMO-LUMO (Figura 6A).[84] Otra metodología empleada para preparar este tipo de estructuras es el uso de la química de coordinación. Yamago y colaboradores han preparado una estructura similar a la de Tanaka, pero con una base triangular. Su precursor es una caja octaédrica, donde cada vértice está ocupado por un átomo de platino, que, tras una eliminación reductora, deja como producto la caja aromática (Figura 6B).[85]

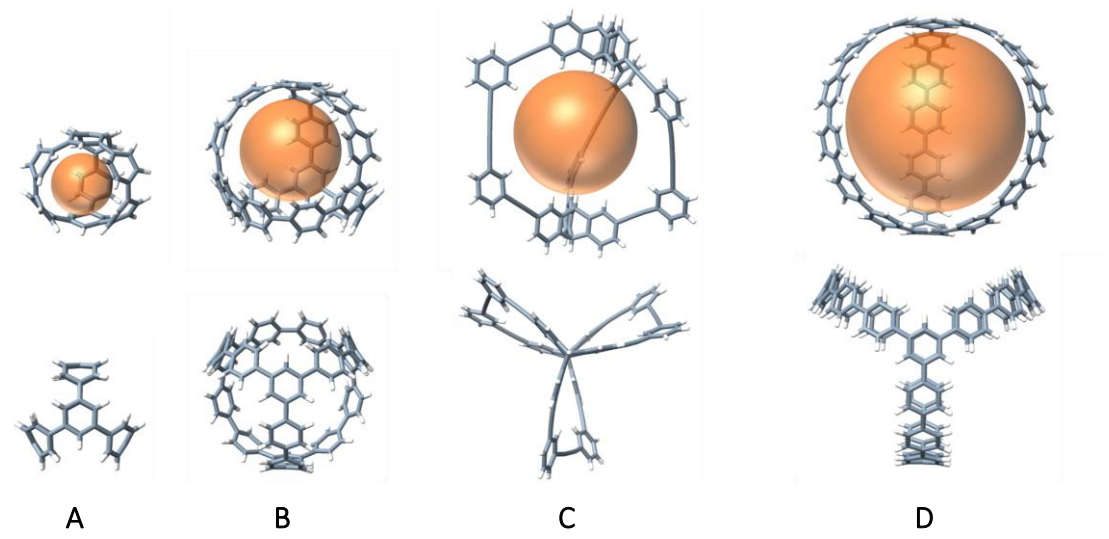


Figura 6. Cajas con simetría *C3* preparadas a través de formación de enlaces C-C. A) caja constituida exclusivamente por anillos de benceno, la más pequeña hasta el momento, con una capacidad interna de 50 Å^3;[84] B) caja preparada por eliminación reductora de platino en su precursor octaédrico, con una capacidad interna de 300 Å^3;[85] C) caja helicoidal quiral debido a la presencia de la subunidad de tripticeno que actúa como cima y base, con una capacidad interna de 410 Å^3 ;[80] D) caja constituida por 20 anillos de benceno utilizando la estrategia de aromatización de ciclohexanos, con una capacidad interna de 1150 Å^3.[82]

[80] Zhang, C.; Chen, C. F. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9339-9341. CCDC: 673193.
[81] a) Avellaneda, A.; Valente, P.; Burgun, A.; Evans, J. D.; Markwell-Heys, A. W.; Rankine, D.; Nielsen, D. J.; Hill, M. R.; Sumby, C. J.; Doonan, C. J. *Angw. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3746-37549. b) Burgun, A.; Valente, P.; Evans, J. D.; Huang, D. M.; Sumby, C. J.; Doonan, C. J. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 8850-8853.
[82] Matsui, K.; Segawa, Y.; Namikawa, T.; Kamada, K.; Itami, K. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 84-88.
[83] Matsui, K.; Segawa, Y.; Itami, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16462-16458.
[84] Hayase, N.; Nogami, J.; Shibata, Y.; Tanaka, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 9439-9442. CCDC: 1893157.
[85] Kayahara, E.; Iwamoto, T.; Takaya, H.; Suzuki, T.; Fujitsuka, M.; Majima, T.; Yasuda, N.; Matsuyama, N.; Seki, S.; Yamago, S. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2694. CCDC: 924350.

Las estrategias presentadas previamente para la síntesis de receptores a través de enlaces covalentes cinéticamente estables presentan, en mayor o menor medida, el inconveniente de los bajos rendimientos alcanzados en su preparación. Esto se debe a que se suelen requerir de varias etapas sintéticas y a que, en la etapa final, se suelen formar polímeros en mayor rendimiento que la propia estructura objetivo. Además, pese a que estas estructuras pueden ser muy buenos anfitriones para determinados huéspedes y la investigación en esta línea continúa vigente, el hecho de ser estructuras altamente estables, que no permiten correcciones, ha alimentado la búsqueda de alternativas para preparar receptores dinámicos capaces de desensamblarse. De este modo, en determinadas condiciones podrían, por ejemplo, liberar al sustrato con mayor facilidad.

4.3.3 Receptores formados a través de enlaces covalentes dinámicos.

Los enlaces covalentes dinámicos se producen mediante reacciones reversibles donde las uniones formadas son relativamente fuertes, pero pueden romperse y volverse a formar en una escala de tiempo suficientemente corta, de manera que la distribución del producto o productos en equilibrio está controlada termodinámicamente.[86] Generalmente se trata de reacciones de condensación. Así, se recurre a la unión entre aminas y aldehídos para formar iminas, entre hidracinas y aldehídos para formar hidrazonas o a ácidos borónicos para formar ésteres de boronato. También se ha explotado el potencial de las cicloadiciones, los puentes disulfuro o la formación de acetales para este fin,[87] aunque en menor medida.

En cuanto a los receptores preparados mediante enlaces dinámicos, Cram también fue pionero, preparando en 1991 una cápsula compuesta por dos subunidades de calix[4]areno funcionalizadas con aldehídos en las posiciones *para*-, condensadas con cuatro *m*-fenilendiaminas aromáticas, formando ocho enlaces imina.[88] Este proceso era, además, dependiente del pH. Años más tarde, junto con Stoddart, indagaron sobre la naturaleza dinámica de este sistema (Figura 7). Para ello prepararon una estructura análoga, pero utilizando otra fenilendiamina sustituida en su posición 5 con una cadena marcada con ^{13}C (amina B). Fueron capaces de demostrar, mediante experimentos de RMN, que, si sobre esa especie se adicionaba la amina menos impedida, la *m*-fenilendiamina (amina A) se producía el intercambio de las cuatro diaminas sustituidas por las cuatro no sustituidas. Además, encapsulando previamente ferroceno, evidenciaron que el proceso de intercambio era precedido por una apertura de *"ventana"* en la estructura. La presencia de la amina A provocaba primero la ruptura de uno de los enlaces imina de B con el cavitando, quedando ese aldehído libre para condensarse con A y dejando, por tiempo suficiente, un hueco en la estructura por el que el ferroceno era capaz de escapar. Posteriormente se producía la salida de todas las aminas B para dejar a A ocupando su lugar.[89]

[86] Zhang, W.; Jin, Y. *Dynamic Covalent Chemistry: Principles, Reactions, and Applications*, John Wiley & Sons Ltd. 2017.

[87] a) Jin, Y.; Yu, C.; Denman, R. J.; Zhang, W. *Chem. Soc. Rev.* 2013, *42*, 6634-6654. b) Jin, Y.; Wang, Q.; Taynton, P.; Zhang, W. *Acc. Chem. Res.* 2014, *47*, 1575-1586.

[88] Quan, M. L. C.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, *113*, 2754-2755.

[89] Ro, S.; Rowan, S. J.; Pease, A. R.; Cram, D. J.; Stoddart, J. F. *Org. Lett.* 2000, *2*, 2411-2414.

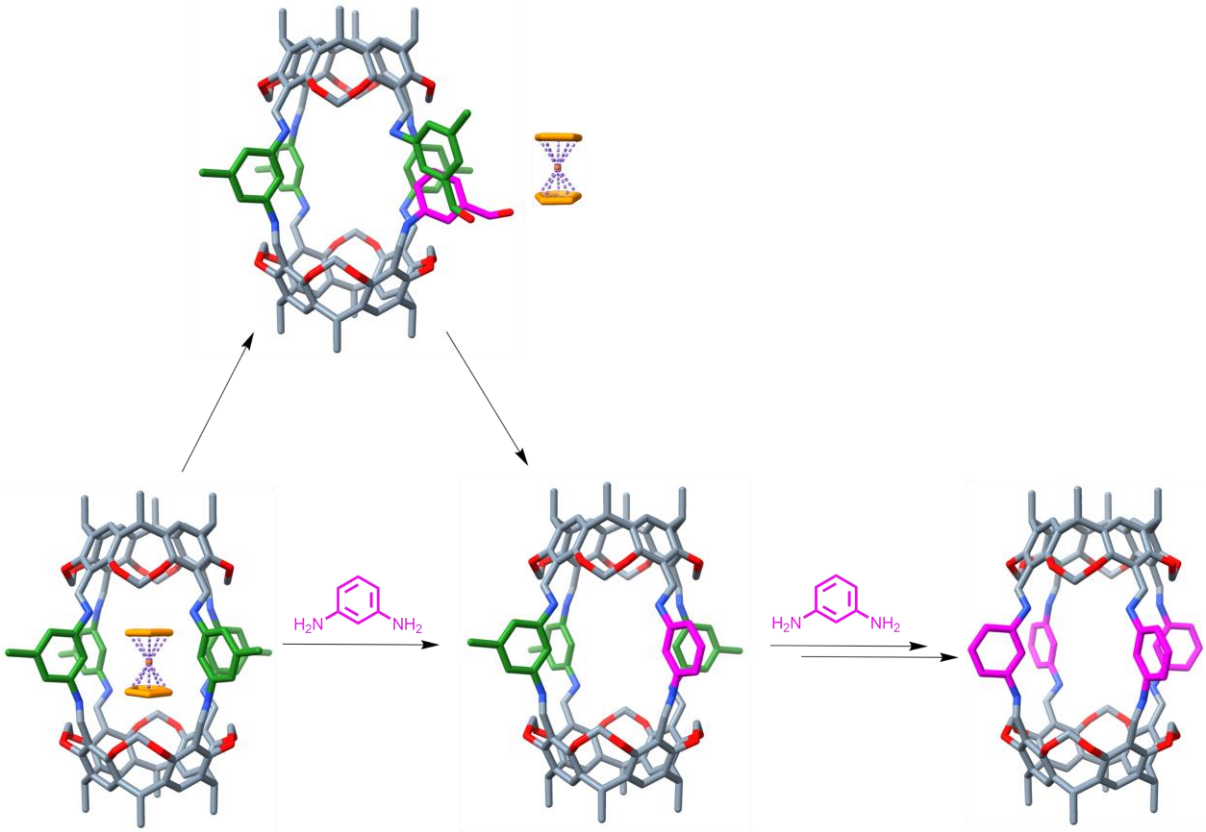


Figura 7. Esquema de intercambio de aminas en una estructura tipo hemicarcerando. El intercambio de la amina B (verde) por la amina A (magenta) se produce permitiendo la liberación del ferroceno encapsulado.[89]

En el abanico de estructuras supramoleculares preparadas a través de enlace imina, sobresalen especialmente la cantidad de ejemplos donde se utilizan como bloques de construcción las unidades de tris(2-aminoetil)amina (*"TREN"*) o benceno-1,3,5-triamina (o benceno-1,3,5-tricarbaldehído) y derivados de las mismas (Figura 8) . Combinando estas estructuras con otros bloques, que varían principalmente en su rigidez y longitud, se han preparado multitud de receptores de distintos tamaños, geometrías y, consecuentemente, distinta capacidad para la encapsulación. Sobre la construcción de estas arquitecturas, es fundamental poner atención sobre el ángulo y la direccionalidad de los grupos reactivos para conseguir una alineación óptima que dé lugar a la geometría deseada. Se observa que la incorporación de la benceno-1,3,5-triamina (y también sus derivados alquilados en las posiciones 2, 4 y 6) da lugar, en general, a estructuras más abiertas, con mayor distancia entre el resto de los bloques de construcción (Figura 8A-F), posiblemente como consecuencia de la direccionalidad de sus grupos amino y la rigidez del anillo aromático, que no permite formar estructuras con vértices muy agudos. Sin embargo la incorporación de la tris(2-aminoetil)amina pude dar lugar a estructuras con ángulos pequeños en los vértices (Figura 8G y 8H), pero también a otras donde se encuentra completamente extendida (Figura 8I y 8J), pasando por un término intermedio para dar lugar a estructuras tipo criptando (Figura 8K-N). En esta línea, Lehn y colaboradores estudiaron la condensación de la TREN con diferentes dialdehídos para formar una variedad de cajas [2 + 3] tipo criptando.[90] Observaron que la presencia de un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[90] Kołodziejski, M.; Stefankiewicz, A. R.; Lehn, J. M. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 1836-1843.

heteroátomo en el *core* aromático del dialdehído favorecía la formación de la caja mediante interacciones atractivas electrostáticas y enlace de hidrógeno (Figura 8K). Además, los bloques de construcción con mayores rendimientos fueron aquellos más flexibles. Otros trabajos han reforzado la idea de que las interacciones intramoleculares favorables, benefician la formación de unos receptores en detrimento de otros. Mukherjee y colaboradores prepararon una caja compuesta por la TREN y unidades de aldehídos aromáticos no sustituidos. La presencia de aldehídos análogos, pero con un grupo hidroxilo en *orto*- al grupo carbonilo, desplazó los aldehídos no sustituidos (Figura 8L y 8M),[91] lo que se atribuyó a una estabilización por enlaces de hidrógeno. Cuando se enfrentó un mismo dialdehído rígido a la condensación con ambas triaminas por separado, también se observaron preferencias que van en consonancia con la direccionalidad previamente comentada. Solo se formó el producto de condensación de la TREN con dicho dialdehído rígido (Figura 8N), mientras que la benceno-1,3,5-triamina prefirió un dialdehído más flexible en lo que se puede catalogar como un proceso de *self-sorting*.[92] También se han podido preparar estructuras mediante el acoplamiento de más de dos componentes distintos, es el caso de la estructura tipo *"mancuerna"* preparada en el grupo de Cooper, a través de la condensación de un derivado de la benceno-1,3,5-triamina con dos dialdehídos diferentes. Los aldehídos más cortos forman la estructura de la jaula, mientras que el más largo y rígido sería la "barra" de la mancuerna, actuando de *linker* entre las dos cajas (Figura 8B).[93]

La combinación de trialdehídos aromáticos con triaminas da lugar a los productos [4 + 4] con forma tetraédrica. Se ha observado que los productos mayoritarios son aquellos en los que, aparentemente, la formación del producto final viene dirigió por la maximización de fuerzas atractivas de tipo CH···π y π···π (Figura 8G y 8H).[94,95]

En cuanto a su cavidad, puede presentar carácter hidrófobo en estructuras con paredes aromáticas sin grupos dadores de enlace de hidrógeno o con vértices muy cerrados que no permiten el alojamiento de un huésped (Figura 8G, 8H, 8L-N). Sin embargo, aquellas cajas que incorporan aldehídos con heteroátomos en su estructura son capaces de estabilizar huéspedes en su interior gracias a una combinación enlaces de hidrógeno e interacciones π-π. Algunas de ellas, incluso se han empleado para catalizar la transformación de pequeñas moléculas orgánicas aromáticas (Figura 8A y F).[96,97] o en la adsorción de gases (Figura 8C).[98] Otras cajas con geometría más abierta, permiten el contacto entre el huésped y los nitrógenos de la imina, permitiendo así la estabilización de moléculas polares (Figura 8D y E).[99,100]

[91] Acharyya, K.; Mukherjee, P. S. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 1646-1657. CCDC (L): 957158; CCDC (M): 957160.
[92] Acharyya, K.; Mukherjee, S.; Mukherjee, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 554-557.
[93] Greenaway, R. L.; Santolini, V.; Szczypiński, F. T.; Bennison, M. J.; Little, M. A.; Marsh, A.; Jelfs, K. E.; Cooper, A. I. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 3718-3722
[94] Jiao, T.; Wu, G.; Chen, L.; Wang, C. Y.; Li, H. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 12404-12410. CCDC: 1506258.
[95] Jiao, T.; Qu, H.; Tong, L.; Cao, X.; Li, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 9852-9858. CCDC: 2053628.
[96] Verma, A.; Tomar, K.; Bharadwaj, P. K. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 1003-1006.CCDC: 1883649.
[97] Chen, H. Y.; Gou, M.; Wang, J. B. D. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 3524-3526. CCDC: 1527258
[98] Wang, F.; Sikma, E.; Duan, Z.; Lei, C.; Zhang, Z.; Humphrey, S. M.; Sessler, J. L. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2020**, *24*, 424-431. CCDC: 1952295.
[99] Li, A.; Xiong, S.; Zhou, W.; Zhai, H.; Liu, Y.; He, Q. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 4496-4499. CCDC: 2072390.
[100] Lauer, J. C.; Pang, Z.; Janßen, P.; Rominger, F.; Kirschbaum, T.; Elstner, M.; Mastalerz, M. *ChemistryOpen* **2020**, *9*, 183-190.CCDC: 1970309.

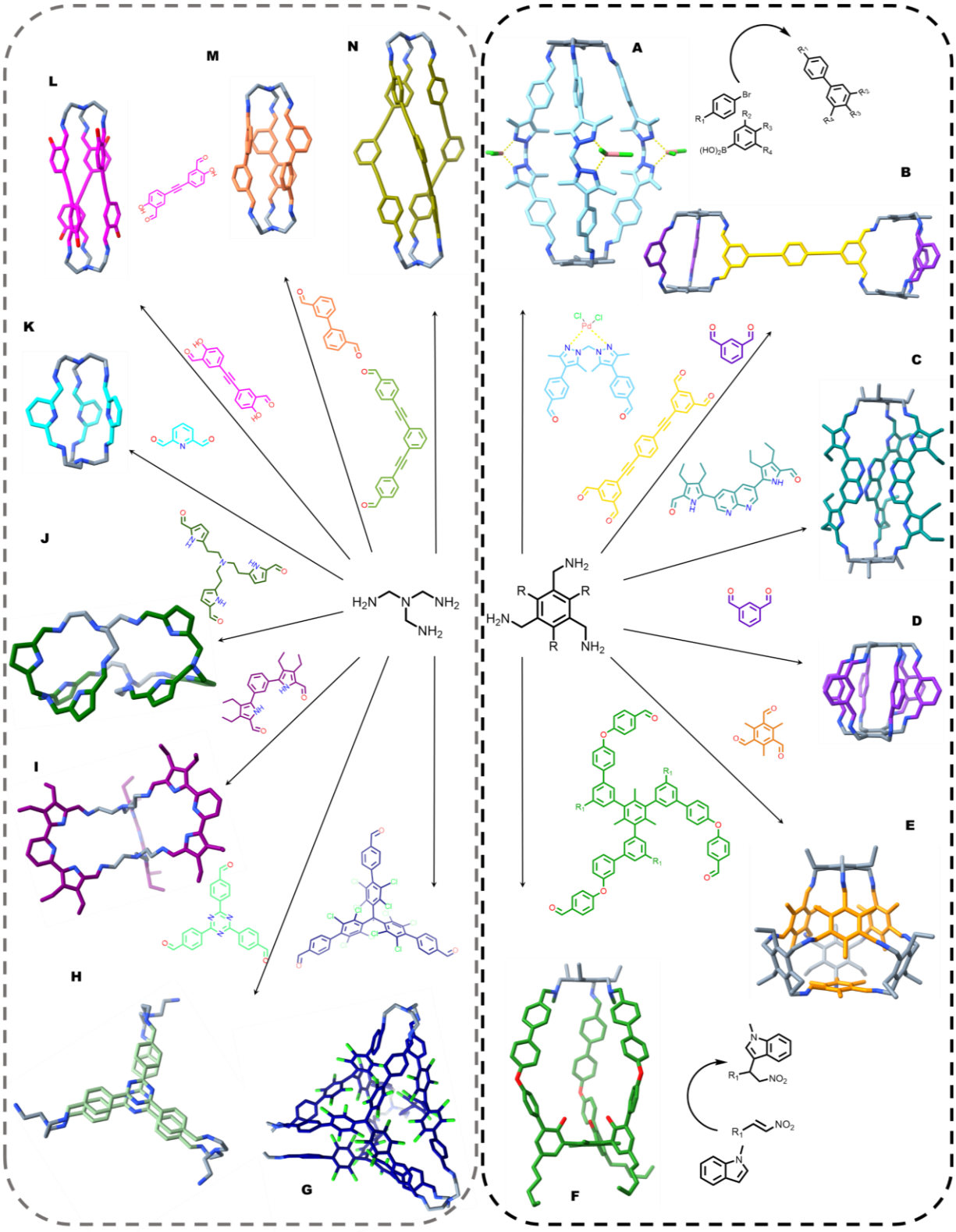


Figura 8. Cápsulas preparadas a partir de la condensación de la tris(2-aminoetil)amina o la benceno-1,3,5-triamina (también benceno-1,3,5-tricarbaldehído y derivados) con una variedad de aldehídos aromáticos, estando construidas, por tanto, mediante enlaces imina.[90-100]

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El enlace imina es el más utilizado dentro de las aproximaciones covalentes dinámicas, y hay una amplia variedad de ejemplos además de los aquí mencionados.[101] Otras alternativas como los enlaces hidrazona, los ésteres de boronato o los puentes disulfuro también se han utilizado en la construcción de cajas supramoleculares.

El enlace hidrazona es termodinámica y cinéticamente más estable que el enlace imina, aunque ambos son reversibles en medio ácido. La unidad de resorcin[4]areno, en su gran versatilidad como bloque de construcción para formar cajas supramoleculares, también se ha usado para formar estas estructuras a través de este tipo de enlaces. Szumna y colaboradores han preparado una caja hexámerica donde cada subunidad de resorcin[4]areno está unida a otras cuatro mediante enlace hidrazona (Figura 10A y 9B).[102] Con un volumen interno de 1460 $Å^3$, sus "ventanas moleculares" son suficientemente grandes para dejar pasar moléculas pequeñas sin necesidad de que se tenga que romper ninguno de los enlaces. Además, esta molécula es quiral debido a la disposición direccional de los grupos hidrazona, que exhiben el mismo giro helicoidal en cada unidad de resorcinareno.

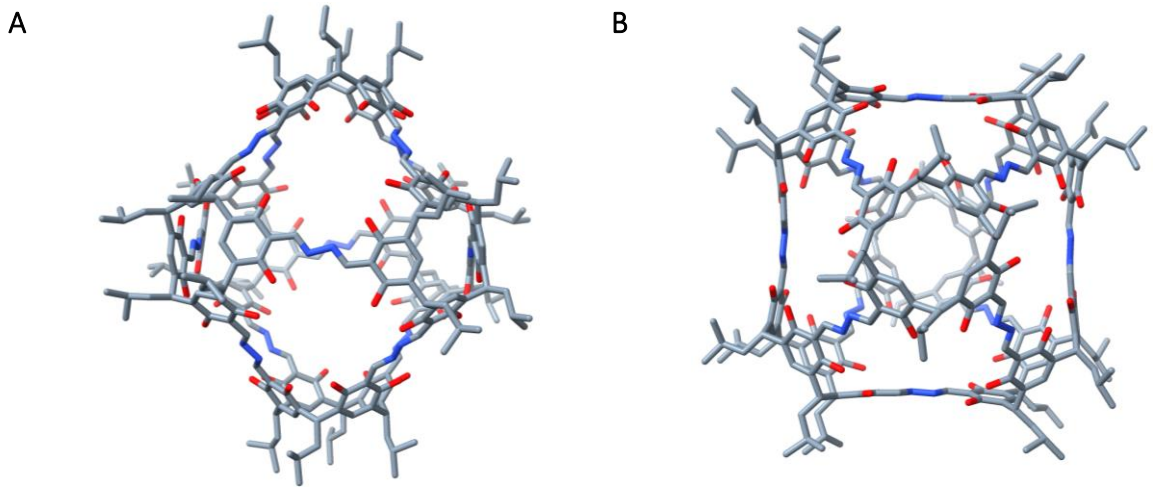


Figura 9. Vistas frontal (A) y superior (B) del hexámero formado por unidades de resorcinareno unidas mediante enlace hidrazona.[102]

Alternativamente, este mismo grupo fue capaz de encapsular una unidad de C_{70} en una estructura dimérica cuyos dos subcomponentes principales estaban unidos mediante enlaces disulfuro (Figura 10A y 10B).[103] Los enlaces hidrazona y disulfuro han encontrado una amplia apliación en química supramolecular, aunque no principalmente para la formación de cajas.[104,105]

[101] a) Mastalerz, M. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2411-2422. b) Gayen, K. S.; Das, T.; Chatterjee, N. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 861-876. c) Huang, H. H.; Song, K. S.; Prescimone, A.; Aster, A.; Cohen, G.; Mannancherry, R.; Vauthey, E.; Coskun, A.; Šolomek, T. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 5275-5285.

[102] Wierzbicki, M.; Głowacka, A. A.; Szymański, M. P.; Szumna, A. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 5200-5203. CCDC: 1539623.

[103] Jędrzejewska, H.; Wielgus, E.; Kaźmierski, S.; Rogala, H.; Wierzbicki, M.; Wróblewska, A.; Pawlak, T.; Potrzebowski, M. J.; Szumna, A. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 1558-1566. CCDC: 11937566.

[104] Betancourth, J. G.; Castaño, J. A.; Visbal, R.; Chaur, M. N. *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, e202200228.

[105] Phan, N. M.; Percástegui, E. G.; Johnson, D. W. *ChemPlusChem* **2020**, *85*, 1089-1364.

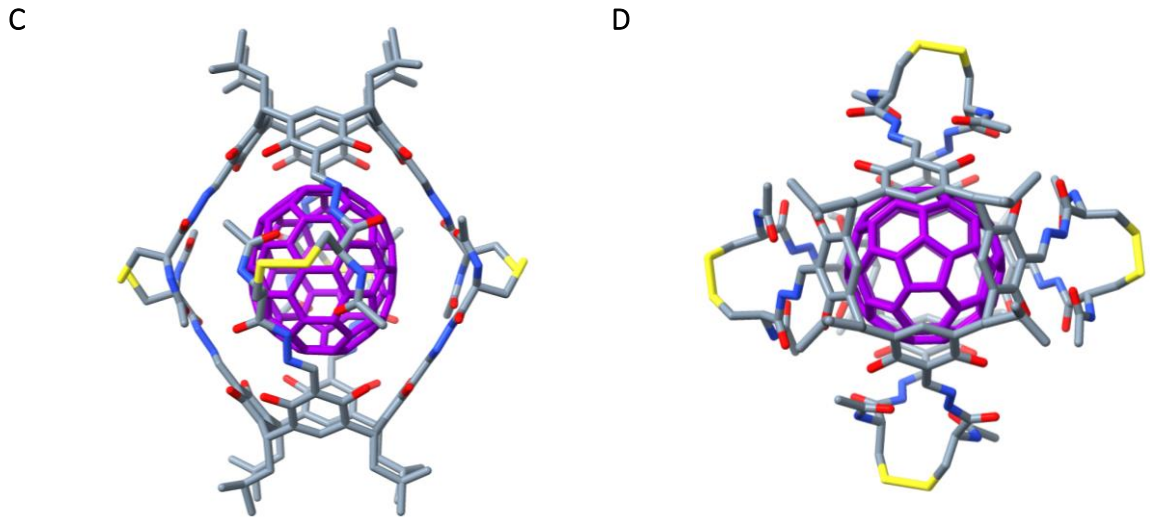


Figura 10. Vista frontal (A) y superior (B) del dímero de resorcinareno capaz de encapsular una molécula de C_{70}.[103]

En cuanto a las cápsulas formadas mediante ésteres boronato, la mayoría de los ejemplos se basan en el uso de derivados de catecol y ácidos aril-borónicos, dada la complementariedad de estos grupos funcionales.[106] Beuerle y colaboradores han demostrado que, usando un hexaol (tres subunidades de catecol) derivado del tribenzotriquinaceno como bloque de construcción base, es posible obtener productos de condensación de diferentes geometrías si se selecciona cuidadosamente el ácido borónico ditópico. De este modo, se obtuvo el producto [2 + 3] como una bipirámide trigonal al realizarse la condensación con un ácido borónico angular cuando $\alpha \approx 45°$, mientras que se formó el producto [4 + 6] como un tetraedro cuando $\alpha \approx 60°$, y el producto [8 + 12] como un cubo cuando se utilizó el ácido *p*-bencenodiborónico.[107] Haciendo uso de estos resultados, Mastalerz y colaboradores utilizaron un hexaol derivado bromado del tripticeno y *p*-bencenodiborónico para preparar una caja octaédrica mediante una condensación [4 + 6]. Además, usando derivados fluorados del *p*-bencenodiborónico (Figura 11A) se observó una disminución del tiempo de reacción y una cristalización en diferentes grupos espaciales de unas cajas con respecto a otras. Ambos fenómenos se atribuyeron a la alteración de las interacciones π-π y los enlaces de halógenos cuando hay fluoruro en la estructura (en azul).[108] Haciendo uso por primera vez del enlace dativo B-N entre ésteres boronato y trisaminas, Severin y colaboradores prepararon una caja tipo prisma triangular capaz de albergar una molécula de coroneno en su cavidad (Figura 11B, en rosa). Una subunidad rígida de trispiridina actúa como cara superior e inferior y es a la vez la fuente de nitrógeno para el enlace B-N, el ácido *p*-bencenodiborónico actúa una vez más como fuente de

[106] a) Klotzbach, S.; Scherpf, T.; Beuerle, F. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12454-12457; b) Zhang, G.; Presly, O.; White, F.; Oppel, I. M.; Mastalerz, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1451-1708; c) Dhara, A.; Beuerle, F. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 17133-17515.

[107] a) Klotzbach, S.; Beuerle, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10356-10360; b) Leonhardt, V.; Fimmel, S.; Krause, A. M.; Beuerle, F. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 8409-8415.

[108] Elbert, S. M.; Regenauer, N. I.; Schindler, D.; Zhang, W. S.; Rominger, F.; Schröder, R. R.; Mastalerz, M. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 11443-11443. CCDC: 1839254.

boro. Cuando este último es sustituido por el 4,4'-difenilborónico, haciendo la cavidad un poco más ancha, dos moléculas de coroneno ocupaban su cavidad interior.[109]

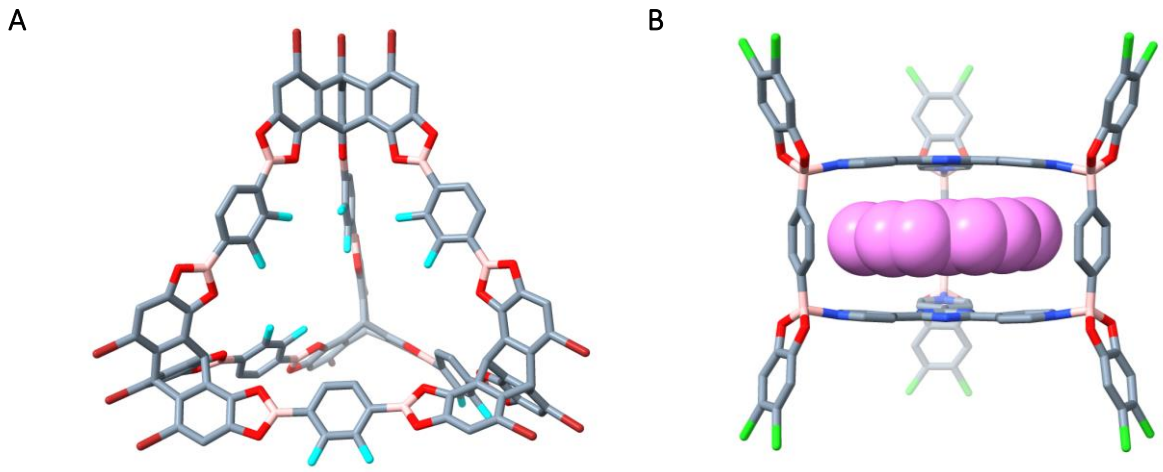


Figura 11. Cajas supramoleculares formadas a través de ésteres borónicos.[108,109]

4.3.4 Receptores autoensamblados mediante interacciones no covalentes.

El uso de interacciones intermoleculares débiles como fuerza impulsora en el autoensamblado de dos o más componentes para formar un receptor supramolecular, supone el gran salto a la hora de concebir la creación de nuevos tipos de estructuras impracticables hasta el momento. Además, la interacción más recurrida para este propósito, por su direccionalidad y fuerza modulable, es el enlace de hidrógeno, aunque otros ejemplos basados en enlace halógeno también se han desarrollado en los últimos años, como veremos más adelante.

En 1993, Rebek publicó un trabajo pionero en este campo, dando a conocer una estructura dimérica donde dos subunidades de glucolurilo unidas por un anillo aromático, quedaban ensambladas mediante enlaces de hidrógeno. Se bautizó a esta estructura como "pelota de tenis" (Figura 12).[110] Poco después, utilizando monómeros de mayor longitud cuyo ensamblaje daba lugar a una cavidad más grande que en el trabajo anterior, fueron capaces de encapsular diferentes huéspedes.[111] Mientras que la unión del 1,3,5,7-tetrametiladamantanotenía una K_a= 6.7 M^{-1}, el ácido 1-adamantanocarboxílico se unía con una K_a= 780 M^{-1}, siendo esto una evidencia de que el mejor huésped es aquel cuyos grupos funcionales y tamaño complementan al receptor. En este caso, la complementariedad reside en los enlaces de hidrógeno que se forman entre el 1-adamantanocarboxílico y la "pelota", pero que no pueden tener lugar con el 1,3,5,7-tetrametiladamantano, así como la notable diferencia de tamaño entre ambos

[109] Icli, B.; Sheepwash, E.; Riis-Johannessen, T.; Schenk, K.; Filinchuk, Y.; Scopelliti, R.; Severin, K. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1719-1721. CCDC: 827249.
[110] Wyler, R.; de Mendoza, J.; Rebek, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1699-1701.
[111] Meissner, R. S.; Rebek, J.; De Mendoza, J. *Science* **1995**, *270*, 1485-1488.

huéspedes. Indagando más sobre estas observaciones, llegaron a lo que se conoce como "regla del 55%", que establece el porcentaje de ocupación óptimo de un receptor.[112]

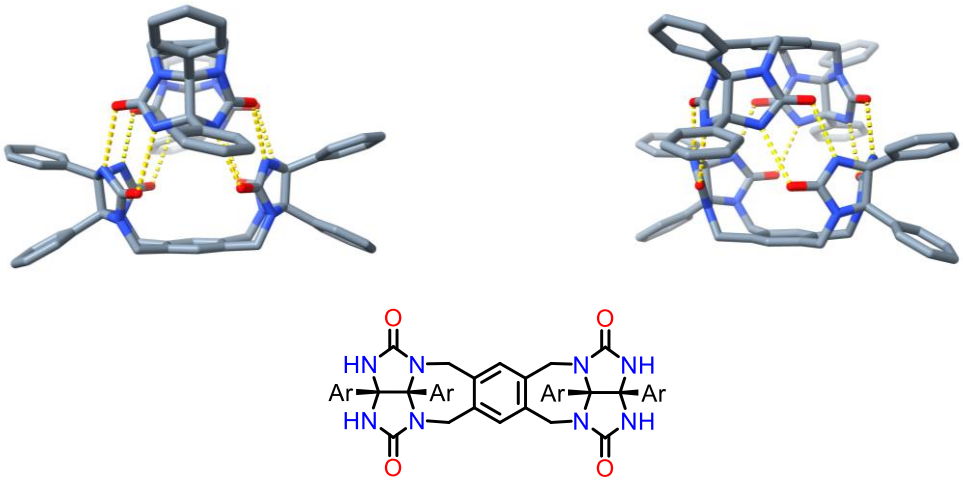


Figura 12. Vistas frontal y lateral de la primera "pelota de tenis" preparada en el grupo de Rebek a partir del derivado del bis-glucolurilo. Los enlaces de hidrógeno aparecen como líneas discontinuas en amarillo.[110]

Siguiendo en la línea del estudio de receptores ensamblados mediante enlace de hidrógeno, posteriormente se prepararon las primeras cápsulas cilíndricas, que se sostenían por medio de estas interacciones. Usando el resorcin[4]areno, del que ya se habían preparado homodímeros y heterodímeros mediados por interacciones solvofóbicas y dipolo-dipolo,[113] se preparó un derivado por acoplamiento con la amida del ácido 5,6-dicloropirazina-2,3-dicarboxílico (Figura 13). Este producto resultante era capaz de formar dímeros cuando el disolvente utilizado era apropiado para alojarse en su cavidad. Los monómeros se unían entre sí mediante enlaces de hidrógeno bifurcados en los bordes del cavitando. Cada hidrógeno de la imida de una molécula se encontraba interaccionando con dos oxígenos carbonílicos de la otra, dejando las paredes del cavitando intercaladas.[114] Ambos monómeros quedaban entonces unidos por 16 enlaces de hidrógeno formando un "cinturón de ureas". Además de alojar moléculas de disolvente, también eran capaces de acomodar cadenas alquílicas, que propiciaban la dimerización. Cuando se estudió el efecto de la presencia de un hidrocarburo de 14 carbonos, se observó que la cadena se enrollaba en el fondo del cavitando para preservar los contactos C=O···H-N que mantenían la estructura dimérica. Sin embargo, cuando se adicionaba glucolurilo, se observó que este podía comportarse como espaciador, incrementando el tamaño del receptor. Para ello, se insertaban cuatro unidades como una franja ecuatorial entre cavitandos, lo que aumentaba la longitud de la cavidad, y consecuentemente, permitía a la cadena de C_{14} extenderse por completo (Figura 13). Al precipitar el glucolurilo en medio ácido, el proceso se revertía y la cadena se volvía a replegar.[115] También se comprobó que con la cadena de C_{20}, en cuyo caso, ni la extensión provocada por

[112] Mecozzi, S.; Rebek, J. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1016-1022.
[113] Cram, D. J.; Choi, H. J.; Bryant, J. A.; Knobler, C. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7748-7765.
[114] Heinz, T.; Rudkevich, D. M.; Rebek, J. *Nature* **1998**, *394*, 764-766.
[115] Ajami, D.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15038-15039.

los cuatro espaciadores dispuestos en una franja es suficiente para albergar esta molécula, los cuatro glucolurilos se disponían dos a dos, en dos alturas diferentes, haciendo de "doble cinturón" y permitiendo así la entrada de la cadena más larga.[116]

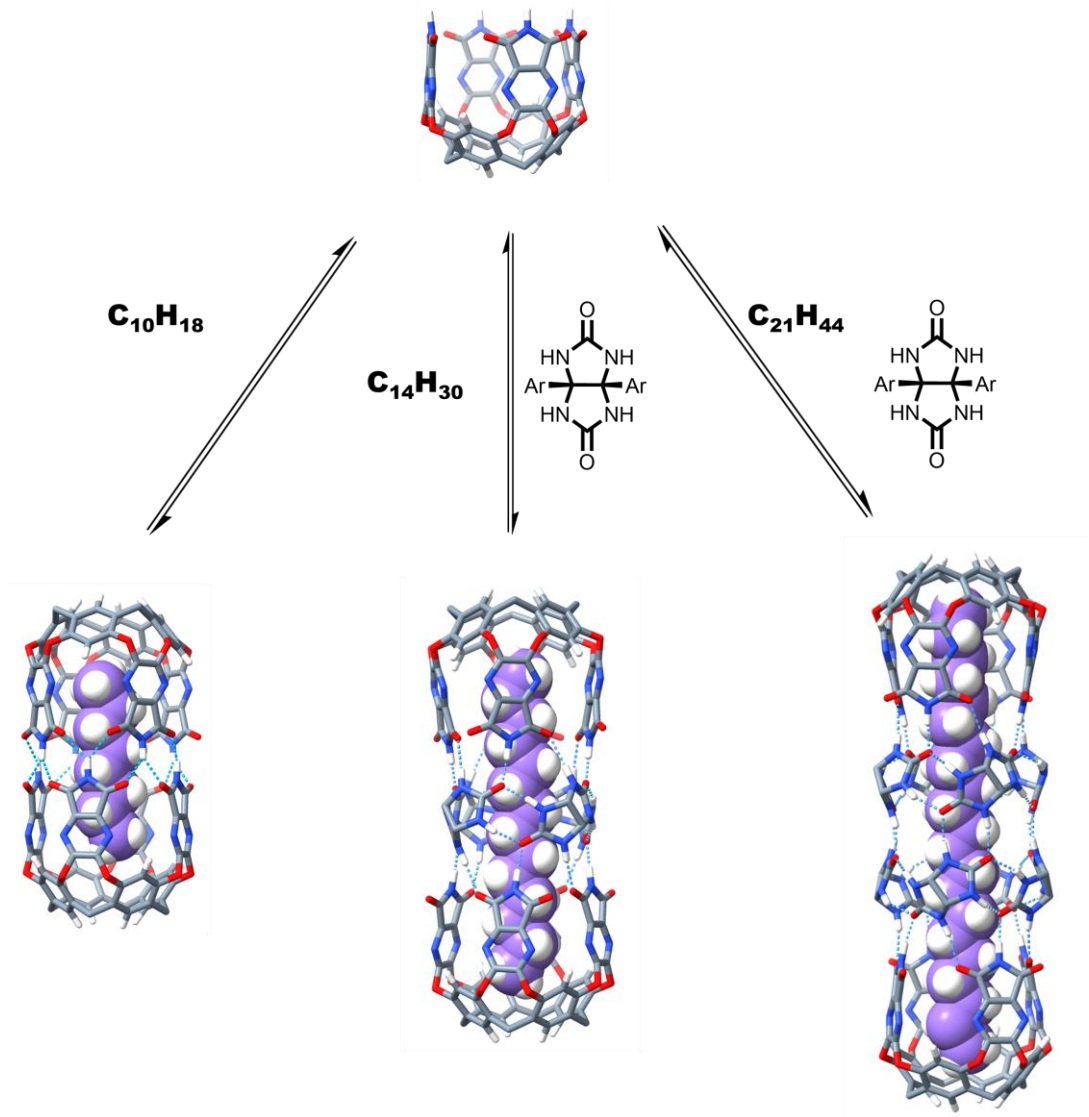


Figura 13. Cápsulas preparadas por Rebek capaces de albergar cadenas alquílicas en su interior. Gracias a la incorporación de subunidades de glucolurilo ordenadas en "cinturones", pueden alargar su extensión para ser ocupadas por cadenas más largas.[114-116]

En años posteriores, el grupo de Rebek ha ido añadiendo complejidad a estas estructuras mediante la incorporación de hasta tres cinturones de glucolurilo (12 unidades) que alargan la cavidad desde los 15 Å del dímero sin cinturón a los 35 Å del que contiene tres.[117] Además de esto, la sustitución del glucolurilo como espaciador por un derivado de la propanodiurea, y la elección cuidadosa de los huéspedes, dio lugar a la formación de receptores con formas nunca

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[116] Ajami, D.; Rebek, J. *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 87-90.
[117] Ajami, D.; Rebek, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9283-9286.

antes observadas.[118] Mientras que cuando se escogió como huésped el *n*-$C_{14}H_{30}$, este se encontró dentro de la especie cilíndrica con cuatro propanodiureas como espaciadores en un solo cinturón, el *n*-$C_{18}H_{38}$ quedó complejado dentro de un receptor angular o tipo "banana" con dos cinturones, de cuatro y dos unidades de propanodiurea, respectivamente. Sorprendentemente, el *n*-$C_{21}H_{44}$ dio lugar a la formación de un receptor con forma de "S", con ocho propanodiureas dispuestas en dos cinturones. A diferencia de las estructuras donde el glucolurilo es el espaciador, donde la formación de un segundo cinturón se propiciaba cuando la diferencia de átomos de carbono entre unos huéspedes y otros era en torno a cinco, la unidad de propanodiurea muestra mayor adaptabilidad. Solo con dos o tres carbonos de diferencia, se produce la incorporación de un cinturón extra. Los autores lo relacionan con una mayor capacidad de adaptación inducida tanto del anfitrión como del huésped.

Inspirado en las estructuras de Rebek, Diederick ha preparado cápsulas análogas que dimerizan por medio del enlace halógeno o calcógeno (Figura 14). En el caso de aquellas formadas mediante enlace halógeno, son estructuras heterodiméricas, ya que una de las subunidades incorpora tetrafluorohalofenilos como dador de enlace halógeno, mientras que la otra subunidad contiene lutidina como aceptor (Figura 14A).[119] En presencia de 1,4-dioxano o 1,4-ditiano, se formaban las especies diméricas unidas por cuatro enlaces X···N (X= Br, I). Al contrario que en las estructuras estudiadas por Rebek, las paredes de ambos cavitandos apuntan unas directamente a otras, con un ángulo de 180°. Dos moléculas de dioxano o ditiano ocupan la cavidad de la estructura, actuando las hendiduras de los cavitandos como dos compartimentos diferenciados. Sobre este tipo de estructuras demostraron que aumentar el carácter dador del enlace halógeno tiene un mayor impacto favorable sobre la dimerización que aumentar el carácter aceptor del derivado nitrogenado.[120] El mismo grupo también ha sido el primero en utilizar los enlace calcógenos para el mismo fin, a través de la introducción del 2,1,3-benzotelurodiazol o el 2,1,3-benzoditiazol en las paredes del cavitando. En el caso del teluro, las paredes de los cavitandos quedaban entrelazadas, mediante 16 interacciones fuertes Te···N, formando una estructura cilíndrica. Sin embargo, en el caso de la interacción más débil, S···N, se obtuvo el producto ensamblado en forma de S, donde ambos cavitandos estaban desplazados uno con respecto del otro en el plano horizontal. Esta estructura se mantenía mediante 12 interacciones S···N. Se encontró que las paredes del cavitando estaban más cerradas, ya que establecían interacciones π···π más fuertes con el huésped aromático, lo cual se atribuyó como factor de estabilización de la forma de S encontrada.[121] En cuanto a los derivados con selenio, dimerizan de forma similar a aquellos con teluro ($d_{Te\cdots N}$= 2.7 Å y $d_{Se\cdots N}$= 2.9 Å) y son capaces de formar tanto complejos 2:2 con huéspedes pequeños, como complejos 2:1 con cadenas alquílicas de longitud media (C_9H_{20}).[122]

[118] Tiefenbacher, K.; Ajami, D.; Rebek, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12003-12007.

[119] Dumele, O.; Trapp, N.; Diederich, F. Halogen Bonding Molecular Capsules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12339-12344

[120] Dumele, O.; Schreib, B.; Warzok, U.; Trapp, N.; Schalley, C. A.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1152-1157. CCDC: 1500751.

[121] Riwar, L. J.; Trapp, N.; Root, K.; Zenobi, R.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 17259-17264. CCDC (Te): 1873512, CCDC (S): 1873519.

[122] Rahman, F. U.; Tzeli, D.; Petsalakis, I. D.; Theodorakopoulos, G.; Ballester, P.; Rebek, J.; Yu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 5876-7883.

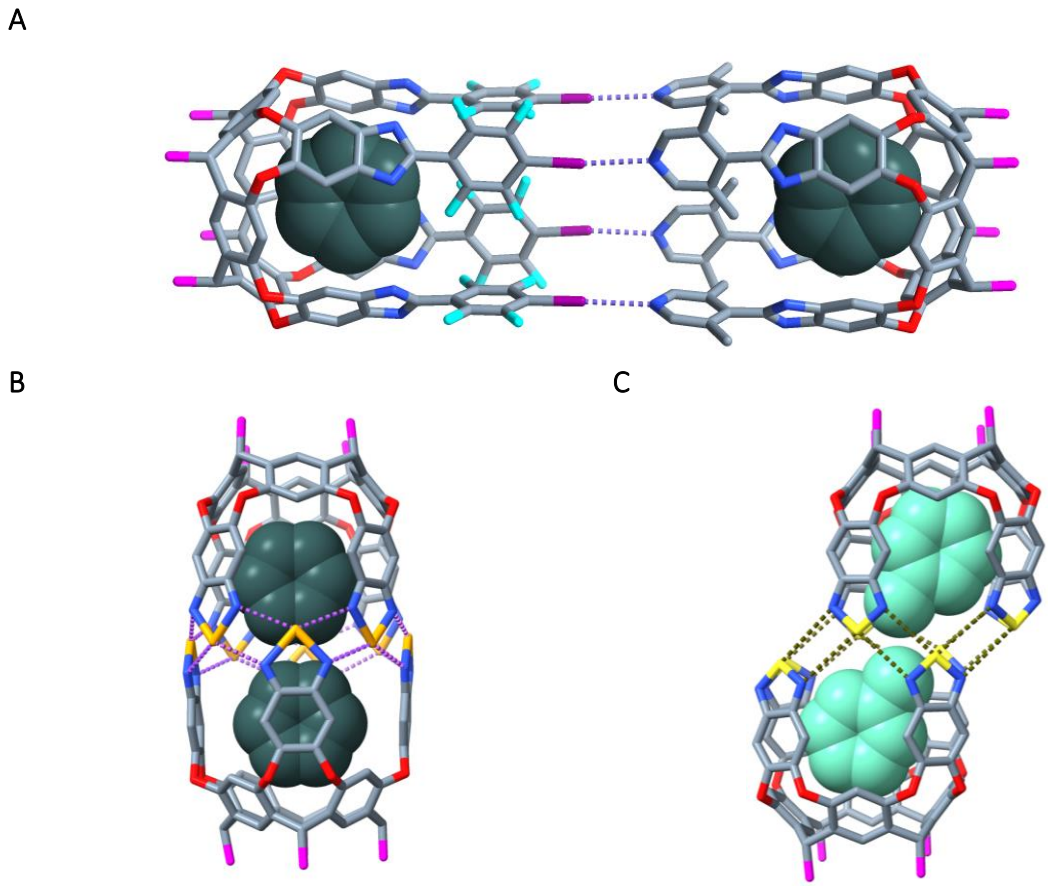


Figura 14. Cápsulas no covalentes de resorcin[4]areno formadas mediante enlace A) halógeno I···N,[120] B) calcógeno Te···N[121] y C) calcógeno S···N.[121] En verde oscuro, moléculas de benceno. En verde claro, tolueno.

Volviendo al enlace de hidrógeno, Atwood demostró que era posible crear ensamblados de mayor tamaño usando el resorcin[4]areno, cuando los grupos hidroxilo de los cuatro anillos están libres. Sus estudios corroboraron que, tanto en estado sólido como en disolución, se formaba un hexámero a través de 60 enlaces de hidrógeno entre seis resorcinarenos y ocho moléculas de agua que se encontraban ocupando los espacios entre ellos (Figura 15).[123] Modificaciones posteriores permitieron comprobar que la estructura hexamérica se mantiene al remplazar seis moléculas de agua por 2-etilhexanol,[124] pero que se ve ligeramente distorsionada en el caso del 1-propanol, que separa las unidades de cavitando haciendo aumentar el volumen interno de la cavidad (de 1375 Å^3 a 1769 Å^3).[125] La amplitud de la cavidad de esta cápsula, además de los espacios de entrada que deja (a través de los huecos entre los bloques de construcción) propiciaron el estudio de diferentes transformaciones químicas en su interior, sobre las que se discutirá en el apartado 5.2.

[123] MacGillivray, L. R.; Atwood, J. L. *Nature* **1997**, *389*, 469-472. CCDC: 1207879
[124] Ugono, O.; Holman, K. T. *Chem. Commun.* **2006**, 2144-2146.
[125] Payne, R. M.; Oliver, C. L. *CrystEngComm* **2018**, *20*, 1919-19222.

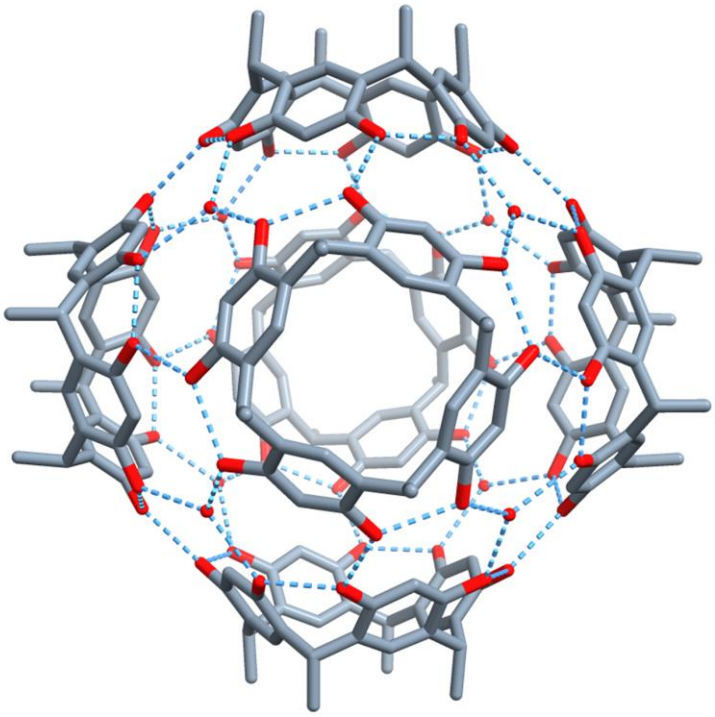


Figura 15. Hexámero preparado por Atwood, que se sostiene mediante 60 enlaces de hidrógeno y que incorpora ocho moléculas de agua.[123]

Recientemente se han encapsulado complejos de coordinación que rompen la simetría del hexámero. La cápsula se desensambla para permitir la entrada de estos complejos con ligandos aromáticos. Una vez dentro, el huésped queda acomodado mediante interacciones catión-π y la formación de pares iónicos con la cavidad. De los estudios de RMN se concluye que se produce la encapsulación, dado que las subunidades de resorcinareno ya no son químicamente equivalentes.[126]

Siguiendo en la línea del uso del resorcin[4]areno como bloque de construcción, Rebek también fue pionero en introducir una unidad de urea como espaciador a lo largo de las paredes del cavitando. Con esta estrategia preparó una cápsula en la que las cuatro paredes de uno de los cavitandos quedaban interpenetradas entre las cuatro del otro cavitando a través de enlaces de hidrógeno entre las unidades de urea que incorporaban.[127] Este concepto de cremalleras fue aprovechado más tarde por Bömer y colaboradores. En un magnífico ejemplo de preorganización, fueron capaces de unir covalentemente las paredes de dos calixarenos para formar catenanos (Figura 16A y 16B). Para ello, introdujeron cadenas alquílicas de longitud media (C_8) y una olefina terminal en las posiciones meta de los anillos aromáticos que ocupaban el borde de las paredes de los cavitandos. Guiando previamente la dimerización con benceno, sometieron a la cápsula a una reacción de metátesis, quedando unidas aquellas cadenas orientadas de manera complementaria.[128,129] Ballester ha estudiado la presencia de la urea en

[126] Horiuchi, S.; Yamaguchi, T.; Tessarolo, J.; Tanaka, H.; Sakuda, E.; Arikawa, Y.; Meggers, E.; Clever, G. H.; Umakoshi, K. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 155.
[127] Shimizu, K. D.; Rebek, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1995**, *92*, 12403-12407.
[128] Vysotsky, M. O.; Bolte, M.; Thondorf, I.; Böhmer, V. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3375-3382.
[129] Wang, L.; Vysotsky, M. O.; Bogdan, A.; Bolte, M.; Böhmer, V. *Science* **2004**, *304*, 1312-1314. CCDC: 230612

las cadenas de calixpirrol (Figura 16C y 16D), observando la misma tendencia a la interpenetración,[130] pero también la formación de heterodímeros calixpirrol/calixareno. Se observó que en presencia de CH_2Cl_2, la formación del homodímero de calixpirrol estaba desfavorecida, pero que, si se adicionaba un huésped apropiado, como un N-óxido, por el cual los calixpirroles tienen gran afinidad (Figura 4), se inducía la formación del heterodímero.[131] Yendo un paso más allá en la funcionalización de las paredes del cavitando, Ballester ha incorporado grupos azobenceno como unidad fotoisomerizable. El dímero *all-trans* es capaz de albergar un catión tetrametilfosfato en su interior. Sin embargo, cuando se produce la isomerización y consiguiente formación del isómero *cis*, se induce el desensamblaje de la cápsula y el huésped queda liberado.[132]

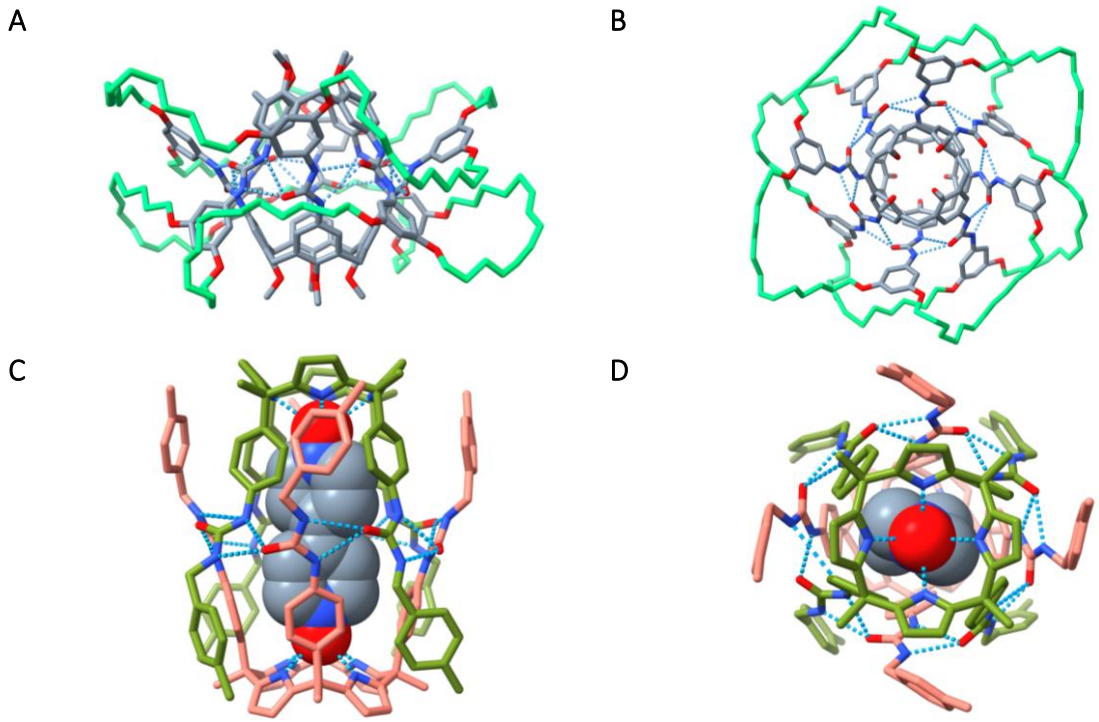


Figura 16. Cavitandos formando estructuras diméricas a través de enlaces de hidrógeno. Un cinturón de ureas entrelaza las paredes de ambos cavitandos. A) vista frontal y B) vista superior del catenano formado mediante la unión covalente entre las paredes de los cavitandos.[129] C) vista frontal y D) vista superior de un dímero de calixareno. Además del cinturón de urea, la encapsulación de un bis-N-óxido aumenta la estabilidad de la estructura a través de los ocho enlaces de hidrógeno NH···$^{-}$O=N^{+} que se forman.[130a]

El patrón de dimerización de estas cápsulas con cremalleras de urea está regido por la complementariedad de las cadenas al establecer enlaces de hidrógeno. Con esta idea, pero sustituyendo las ureas por cadenas peptídicas, Szumna y colaboradores han desarrollado varios trabajos donde la incorporación de los aminoácidos se llevaba a cabo mediante una reacción de Mannich. Observaron que, cuando se incoporaba una fenilalanina, se observaba la

[130] a) Ballester, P.; Gil-Ramírez, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2009**, *106*, 10455-10459. b) Gil-Ramírez, G.; Chas, M.; Ballester, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2520-2521.
[131] Chas, M.; Gil-Ramírez, G.; Ballester, P. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3402-3405.
[132] Arroyave, F. A.; Ballester, P. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 10866-10873.

formación preferente de las cápsulas heteroquirales, donde un cavitando portaba aminoácidos de quiralidad *L* y el otro de quiralidad *D*. Esto se debía a motivos estéricos, ya que, al interpenetrarse las cadenas, las cápsulas homoquirales daban lugar a contactos desfavorables que no se producían en las heteroquirales (Figura 17A y 17B).[133]

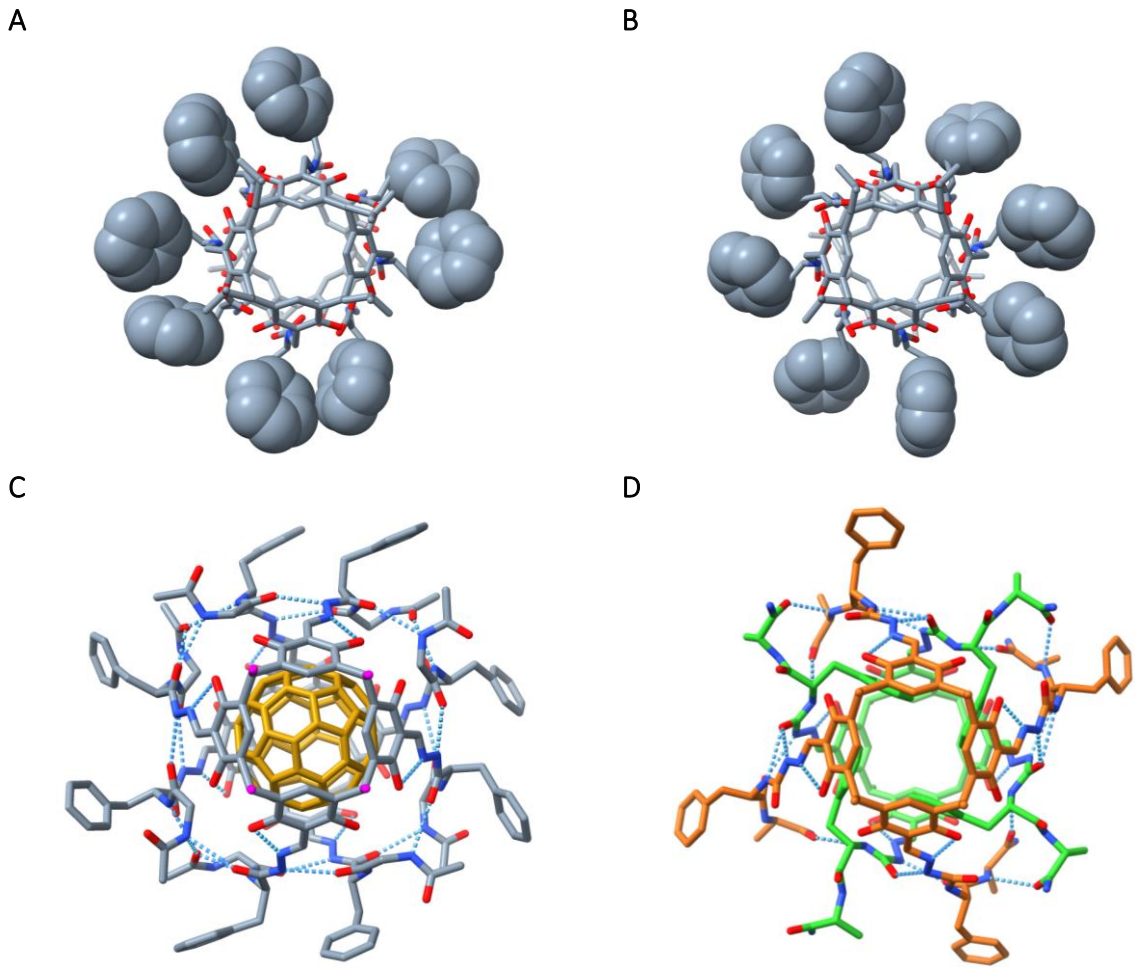


Figura 17. Dímeros de calix[4]areno formados a través de los enlaces de hidrógeno entre las cadenas peptídicas unidas al cavitando. A) Dímero homoquiral y B) heteroquiral de un cavitando que incorpora fenilalanina en sus paredes; C) C_{60} encapsulado dentro de un dímero homoquiral.[135]; D) Dímero homoquiral donde la cadena peptídica heteroquiral (AzaGly-*L*-Phe-*D*-Ala-NH_2) orienta hacia el interior el anillo aromático de fenilalanina de uno de los cavitandos (en verde) para maximizar los enlaces de hidrógeno que mantienen la estructura.[136]

Cuando se varía la longitud empleando di-, tri- o tetra- péptidos (todos con la misma quiralidad), se observa que la complementariedad de las cadenas, de manera que puedan formar el máximo número de enlaces de hidrógeno entre ellas, predomina sobre el componente estérico. En los casos con un número impar de residuos (uno o tres), se obtuvieron preferentemente los ensamblados heteroquirales, mientras que con di- y tetrapeptidos, se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[133] Wierzbicki, M.; Szumna, A. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3860-3862. CCDC (HOMO): 710772. CCDC (HETERO): 918981.

obtuvieron los homoquirales.[134] De este modo, la introducción de una glicina terminal conduce a ensamblados homodímericos que encapsulan C_{60} en su interior (Figura 17C).[135] Con un delicado trabajo en la optimización de la quiralidad de las secuencias peptídicas, su longitud, así como haciendo uso de química covalente dinámica (a través de semicarbazoles o grupos azo como espaciadores) para la introducción de estas cadenas, han logrado obtener estructuras que emulan a los barriles-β de ocho hebras. Las cadenas peptídicas no se encuentran del todo compactadas entre sí, por tanto, la cavidad no queda completamente sellada, permitiendo así el flujo de huéspedes del interior al exterior. Además, alternando la quiralidad en las secuencias peptídicas de un mismo cavitando, las cadenas laterales pueden quedar orientadas hacia el interior de la cavidad (Figura 17D), otorgándole carácter hidrofóbico o hidrofílico.[136]

4.3.5 Cajas de coordinación.

Como se ha comentado brevemente en la introducción, la química de coordinación se encuentra, en cierta medida, dentro del paraguas de recursos para la construcción de estructuras supramoleculares, dado su carácter dinámico y en muchas ocasiones, su reversibilidad. La combinación de iones metálicos con ligandos orgánicos produce, de manera termodinámicamente favorable, cajas de coordinación tridimensionales. Estas estructuras se basan en la formación de enlaces dativos reversibles L→ M cuya energía (10-15 Kcal/mol) está próxima al rango de las fuerzas intermoleculares (0.5-10 Kcal/mol). Esta fortaleza permite la reorganización mediante el control termodinámico que media en estos procesos. Los metales de la serie de transición son los que protagonizan la mayor variedad de los ejemplos de cajas de coordinación descritas en la bibliografía.[137]

Atendiendo a los iones metálicos, estos guían, junto a los ligandos, la geometría de estas cajas auto-ensambladas. Los centros metálicos se disponen normalmente en los vértices y, a través de su número de coordinación, dirigen la geometría de las estructuras obtenidas. De esta manera, en una caja de coordinación hay más de un complejo metálico y en la mayoría de los casos, todos son iguales, es decir, químicamente equivalentes, debido a la simetría de la caja. La mayoría de complejos metálicos son tetra- o hexacoordinados, aunque el empleo de metales de tierras raras como Eu ha permitido estudiar la coordinación en estructuras más complejas.[138] Para los complejos hexacoordinados, la geometría obtenida puede ser octaédrica o de prisma trigonal. En el caso de los octaedros, seis ligandos se disponen a 90° uno del otro, alrededor del centro metálico. Se suele diferenciar entre posiciones axiales (cima y base) y ecuatoriales. En el caso de los prismas trigonales, los ligandos se disponen en los vértices de ambos triángulos y el metal ocupa el centro del prisma. En cuanto a los complejos tetracoordinados, pueden ser planocuadrados o tetraédricos. Prácticamente todos los metales de la primera y segunda serie de transición pueden formar complejos octaédricos. Sin embargo,

[134] Jędrzejewska, H.; Wierzbicki, M.; Cmoch, P.; Rissanen, K.; Szumna, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13760-13764.
[135] Szymański, M.; Wierzbicki, M.; Gilski, M.; Jędrzejewska, H.; Sztylko, M.; Cmoch, P.; Shkurenko, A.; Jaskólski, M.; Szumna, A. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 3148-3155. CCDC: 1060619.
[136] Jędrzejewska, H.; Szumna, A. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4412-4421. CCDC: 1883373.
[137] a) Rizzuto, F. J.; von Krbek, L. K. S.; Nitschke, J. R. *Nat. Rev. Chem*. **2019**, *3*, 204-222. b) McTernan, C. T.; Davies, J. A.; Nitschke, J. R. *Chem. Rev*. **2022**, *122*, 10393-10437.
[138] Tang, X.; Chu, D.; Gong, W.; Cui, Y.; Liu, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 9099-9105.

algunos como Zn^{II} o Ag^{I}, solo forman complejos tetraédricos ya que, al disminuir el tamaño de los metales, estos tienden a lograr menor número de coordinación debido a las repulsiones electrónicas. La geometría planocuadrada se extiende principalmente en los metales d^8 como Rh^{I}, Ir^{I}, Ni^{II}, Pd^{II} o Pt^{II}. Por su parte, los ligandos también juegan un papel fundamental, determinado por su rigidez, capacidad coordinante, carácter dador, quiralidad, riqueza aromática o propiedades espectroscópicas, entre otras, para crear cajas con una amplia variedad de características.

La primera caja de coordinación autoensamblada fue preparada por Saalfrank en 1988. De manera accidental obtuvieron una caja tetraédrica mediante la coordinación de cuatro Mg^{II}, que ocupaban los vértices del tetraedro, con seis ligandos malonato bis-bidentados (Figura 18A).[139] Poco después, Fujita, cuyo nombre se repetirá a lo largo de este apartado debido a sus numerosas aportaciones, demostró que utilizando $[Pd(en)]^{2+}$ y combinándolo con un ligando tris-piridiltriazina, se formaba una caja octaédrica de tipo $[Pd_6L_4]^{12+}$ (Figura 18B).[140] Los cuatro ligandos se coordinaban simultáneamente a tres centros metálicos, de manera que solo cuatro caras del tetraedro estaban ocupadas. El mismo tipo de estructura se puede obtener si se varía la $[Pd(en)]^{2+}$ por otros complejos de Pd^{II} o Pt^{II} con dos sitios de coordinación orientados en *cis*, tales como $[Pd(ciclohex)]^{2+}$ o $[Pd\ (bipi)]^{2+}$.[141,142] Un poco después de darse a conocer las cajas octaédricas $[M_6L_4]^{n+}$, Raymond desarrolló un ejemplo tetraédrico $[M_4L_6]^{12-}$ (Figura 18C).[143] Utilizó ligandos catecolamida bis-bidentados con un espaciador de naftaleno para evitar la formación de hélices M_2L_3.[144] En esas condiciones, se obtenía una mezcla racémica (ΔΔΔΔ o ΛΛΛΛ) de la caja tetraédrica formada a través de los enlaces O-M^{III} entre los ligandos catecolato y el metal.

[139] Saalfrank, R. W.; Stark, A.; Peters, K.; von Schnering, H. G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 851-853. CCDC: 1167842.

[140] Fujita, M.; Oguro, D.; Miyazawa, M.; Oka, H.; Yamaguchi, K.; Ogura, K. *Nature* **1995**, *378*, 469-471. CCDC: 1271853.

[141] Kusukawa, T.; Fujita, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124,* 13576-13582.

[142] Nishioka, Y.; Yamaguchi, T.; Kawano, M.; Fujita, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8160-8161.

[143] Caulder, D. L.; Powers, R. E.; Parac, T. N.; Raymond, K. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1840-1842. CCDC: 100947.

[144] Caulder, D. L.; Raymond, K. N. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1440-1442.

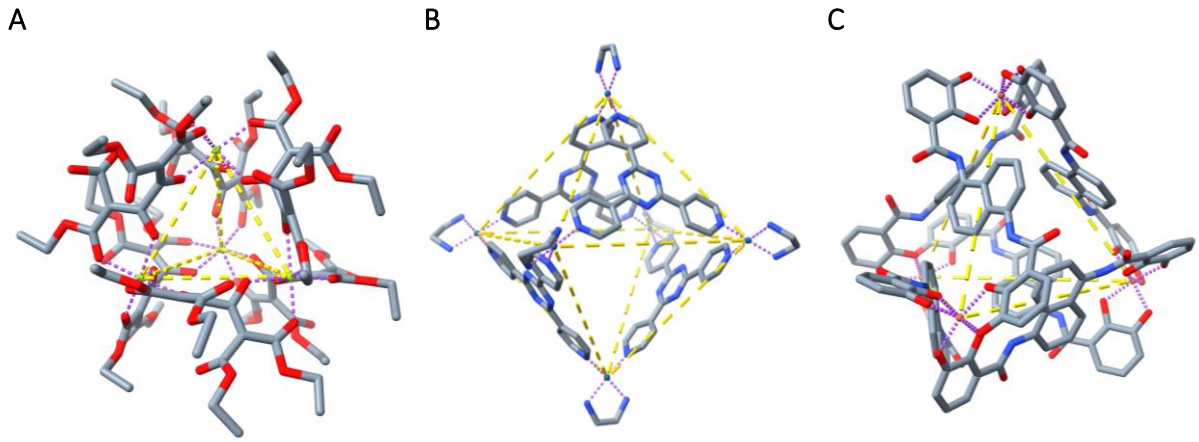


Figura 18. Primeros ejemplos de cajas de coordinación. Los ejes de simetría están marcados por la línea amarilla discontinua, y los enlaces de coordinación, por una línea violeta discontinua. A) caja tetraédrica preparada por Saalfrank. Cada Mg^{II} está hexacoordinado con tres ligandos malonato bidentados;[139] B) Caja octaédrica preparada por Fujita. Cada Pd^{II} se encuentra tetracoordinado formando un complejo *cis*-planocuadrado.[140] C) Caja tetraédrica preparada por Raymond.[143] En este caso, cada Fe^{III} está hexacoordinado con tres catecolatos bidentados. El espaciador de naftaleno impide que se den enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los catecolatos, lo que daría lugar a estructuras en forma triple hélice dinucleares.

Para la preparación de este tipo de cajas es habitual utilizar como ligandos moléculas aromáticas rígidas di- o politópicas (también bi- o polidentadas) debido a que contribuyen favorablemente en la obtención de productos con alto grado de simetría al aportar preorganización. Haciendo uso de una misma fuente metálica, pero combinándola con ligandos rígidos, pero de diferente forma, longitud o capacidad coordinante, se obtienen geometrías completamente distintas, un concepto introducido por Fujita y que denominó *molecular panneling* (Figura 19).[145]

Las cajas resultantes de esta metodología suelen tener carácter iónico, con cavidades altamente hidrofóbicas capaces de encapsular moléculas aromáticas y generalmente rígidas. Especialmente aquellas estructuras con simetría de prisma trigonal, donde un ligando aromático tritópico actúa de base (Figura 19E), han demostrado ser capaces de albergar unidades apiladas de huéspedes aromáticos planos,[146] mediante la introducción de ligandos ditópicos de bipiridina cada vez más largos en los lados del prisma. Así se han conseguido preparar apilados homotrópicos, donde varias moléculas, hasta cinco unidades,[147] de la misma especie quedan apiladas, aunque los apilados más estables se obtienen cuando se alteran unidades dadoras y aceptoras en apilados heterotrópicos.[148]

[145] Fujita, M.; Tominaga, M.; Hori, A.; Therrien, B. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 369-378. CCDC (A): 143854; CCDC (B): 1148187; CCDC (C): 1148700; CCDC (D); 238929; CCDC (E): 205062; CCDC (F): 157344; CCDC (G): 186880; CCDC (H): 1211914.
[146] Klosterman, J. K.; Fujita, M.; Yamauchi, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38,* 1714-1725.
[147] Yamauchi, Y.; Yoshizawa, M.; Akita, M.; Fujita, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 960-966.
[148] Osuga, T.; Murase, T.; Fujita, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51,* 12199-12201.

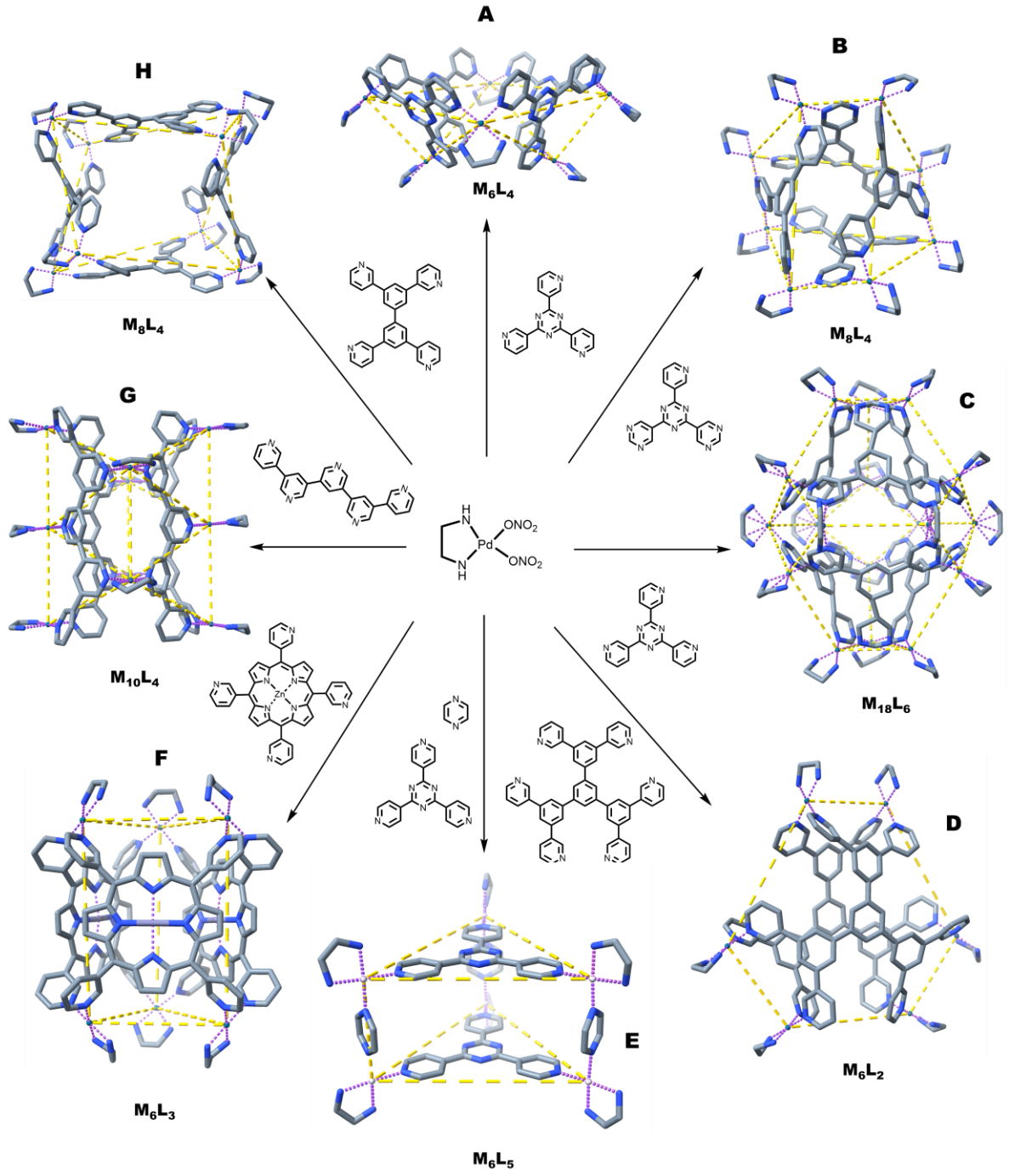


Figura 19. Diferentes estructuras obtenidas de la combinación del mismo complejo planocuadrado de paladio, con dos lugares de coordinación formando ángulos de 90°, y empleando diferentes bloques que actúan de paneles aromáticos.[145]

Además del ensamblado directo entre los componentes, el grupo de Nitschke introdujo la posibilidad de preparar cajas de coordinación través de la formación *in situ* de ligandos piridil-imina.[149] A partir de los precursores adecuados, y haciendo uso de la formación de enlaces covalentes dinámicos, principalmente iminas, se forman de manera simultánea los enlaces N→M y C=N en un proceso guiado por la geometría de coordinación del metal. De este modo, se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[149] Zhang, D.; Ronson, T. K.; Nitschke, J. R. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2423-2436.

obtiene un ligando quelatante, donde el nitrógeno de la recién formada imina y el de la piridina terminal se coordinan al metal estabilizando el complejo más que si de un ligando monodentado se tratase. Los metales que encajan en esta aproximación son aquellos que pueden coordinarse tetraédrica u octaédricamente, como Fe^{II}, Co^{II}, Ni^{II}, Zn^{II} y Cu^{II}. En el primer ejemplo estudiado por el grupo, utilizaron la 2-formilpiridina para condensarla con el ácido 4,4'-diaminobifenil-2,2'-disulfónico. En presencia de sulfato de hierro e hidróxido de tetrametilaamonio, se formó una caja tetraédrica como mezcla racémica, que era soluble en agua gracias a los grupos sulfonato (Figura 20A).[150]

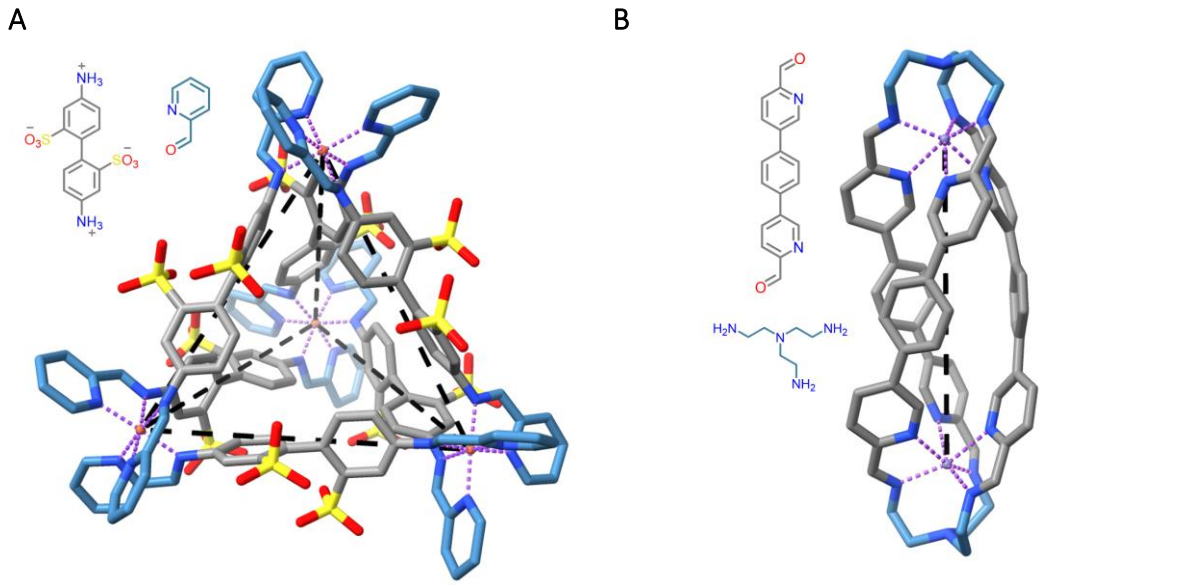


Figura 20. A) Primera cápsula preparada mediante la formación de iminas *in situ* y coordinación octaédrica al centro metálico;[150] B) Estructura triple hélice donde el Zn^{II} se coordina pseudooctaédricamente gracias a la estabilidad que aporta el ligando quelatante TREN.[152] Los ejes de simetría están marcados por la línea negra discontinua.

En estudios previos, habían demostrado que la formación de complejos mononucleares de Cu^{I} (tetraédricos) y Fe^{II} (pseudooctaaédricos) con iminas en medio acuoso estaba mediada por la estabilización mutua, ya que las iminas actuaban como ligandos quelatantes para el metal, y su coordinación las protegía de la hidrólisis.[151] La formación de la primera caja de coordinación a través de este método, fue la confirmación de que lo que se había observado en complejos mononucleares era extensible a estructuras con mayor grado de ensamblaje. También comprobaron que la presencia de ciclohexano en el medio de reacción provocaba su encapsulación en la caja. La adición de TREN provocaba el desensamblado de la caja y la consecuente liberación del huésped. Este desensamblado obedecía a razones entálpicas, ya que la TREN aportaba riqueza en electrones además de capacidad quelatante, y entrópicas, debido al aumento en el número de partículas. En el grupo de Nitschke han estudiado ampliamente la formación y estabilidad de este tipo de complejos en agua. Utilizando metales

[150] Mal, P.; Schultz, D.; Beyeh, K.; Rissanen, K.; Nitschke, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8297-8301. CCDC: 688687.

[151] a) Nitschke, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43,* 3073-3075. b) Schultz, D.; Nitschke, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2453-2456.

de la primera serie de transición y diferentes ligandos para promover ensamblados de diferente simetría, han observado que la estabilidad de estos complejos sigue la serie $Ni^{II} > Fe^{II} > Co^{II} > Zn^{II} > Cd^{II}$. Mientras que Ni^{II} y Fe^{II} forman complejos donde el agua no es capaz de competir por la esfera de coordinación, los complejos de Zn^{II} y Cd^{II} se degradan en apenas unos minutos, aunque empleando aminas tritópicas se consiguió aislar la triple hélice formada gracias a la estabilización del efecto quelato (Figura 20B).[152]

Con la idea introducida por Nitschke se han preparado multitud de cajas, con diferentes metales, ligandos, simetrías y características de encapsulado. Por ejemplo, utilizando *p*-tetraaminoporfirinas y 2-formilpiridina, junto con $Fe(OTf)_2$ se ha preparado una estructura de simetría cúbica Fe_8L_6 (Figura 21A), que encapsula preferentemente huéspedes aromáticos como C_{60} o coroneno cuando el centro metálico de la porfirina estaba ocupado por níquel.[153] Sin embargo, al intercambiar el contraión por SO_4^{2-} y metalar las porfirinas con Zn, la caja resultó ser capaz de encapsular moléculas biológicamente relevantes como cafeína, inosina o testosterona gracias a su solubilidad en medio acuoso.[154] Una estructura muy similar se ha probado recientemente como inhibidora de la degradación enzimática de la tripsina proteasa sobre ciertos péptidos. Se observó que aquellos péptidos que contenían histidinas quedaban encapsulados en la caja a través de la coordinación con el zinc que actúa como centro metálico de las porfirinas, protegiéndose así de la actividad proteasa.[155] Al sustituir la 2-formilpiridina del primer ejemplo por 2-formilfenantrolina, junto con $Co(NTf)_2$, se formó un cuboctaedro $Co_{12}L_6$ (Figura 21B). La adición de C_{60} provocó la reconfiguración de la estereooquímica del metal para optimizar las interacciones *host-guest*, pasando de una estructura de simetría O a S_6 al acomodar dos unidades del huésped.[156] Ligandos lineales de menor tamaño ofrecen mayor versatilidad en el tipo de simetría de los autensamblados, ya que han sido utilizados para preparar cajas tetraédricas,[157] cúbicas[158] o incluso de tipo prisma pentagonal (Figura 21C).[159] En el caso de ligandos tritópicos, se acomodan preferentemente en tetraedros (Figura 21D).[160]

[152] Percástegui, E. G.; Mosquera, J.; Ronson, T. K.; Plajer, A. J.; Kieffer, M.; Nitschke, J. R. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 2006-2018. CCDC: 1837546.

[153] Meng, W.; Breiner, B.; Rissanen, K.; Thoburn, J. D.; Clegg, J. K.; Nitschke, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3479-3483.CCDC: 780771.

[154] Percástegui, E. G.; Mosquera, J.; Nitschke, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 9136-9140.

[155] Mosquera, J.; Szyszko, B.; Ho, S. K. Y.; Nitschke, J. R. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14882.

[156] Rizzuto, F. J.; Nitschke, J. R. *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 903-908. CCDC: 1510851.

[157] a) Yi, S.; Brega, V.; Captain, B.; Kaifer, A. E. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10295-10297. b) Bolliger, J. L.; Belenguer, A. M.; Nitschke, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7958-7962.

[158] Whitehead, M.; Turega, S.; Stephenson, A.; Hunter, C. A.; Ward, M. D. *Chem Sci* **2013**, *4*, 2744-2751.

[159] Zarra, S.; Clegg, J. K.; Nitschke, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4837-4840. CCDC: 905900.

[160] Bolliger, J. L.; Ronson, T. K.; Ogawa, M.; Nitschke, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14545-14553. CCDC: 976921.

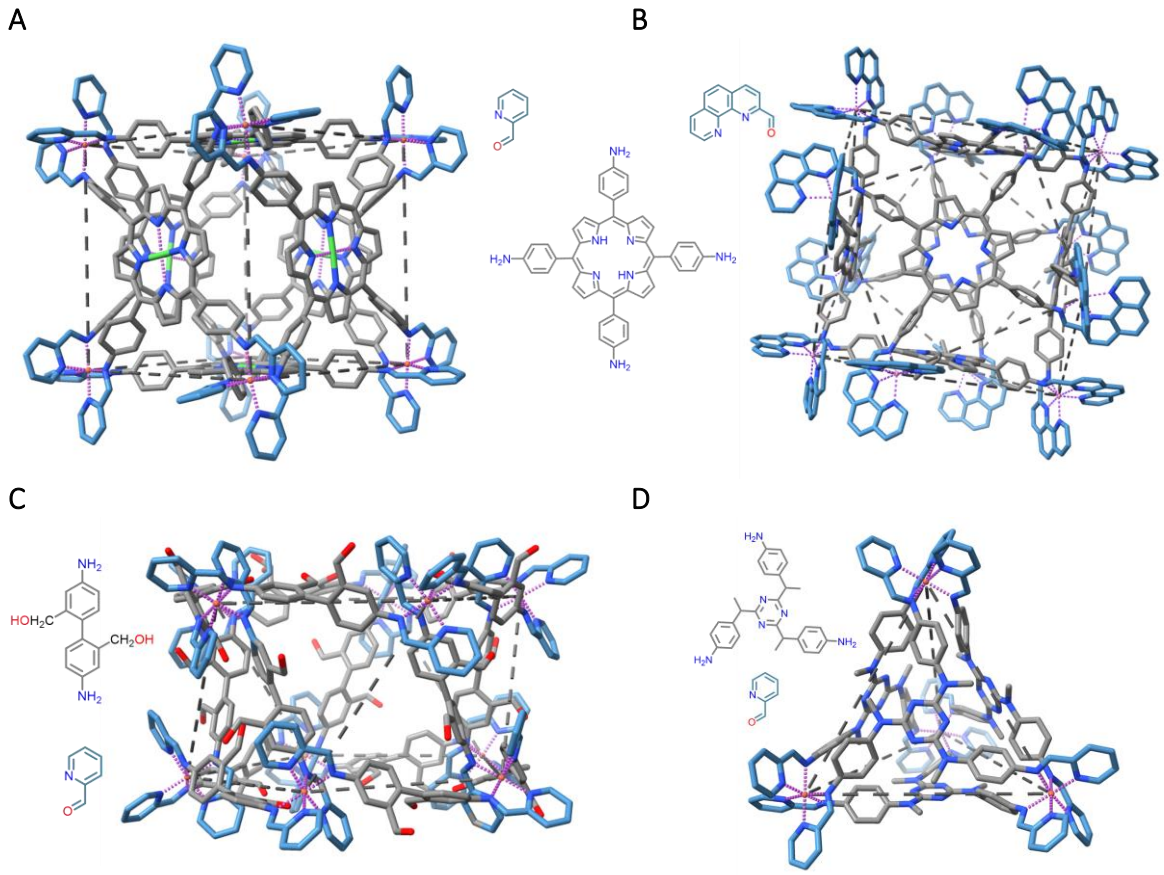


Figura 21. Cajas de diferentes simetrías obtenidas a través de la coordinación de iminas con Fe^{II} en el caso de A,[153] C[159] y D,[160] y con Co^{II} para la caja cuboctaédrica B.[156]

En los ejemplos que se han citado, la capacidad interna de la caja está delimitada por la longitud de los ligandos involucrados, donde un mismo ligando va de un vértice a otro cubriendo la esfera de coordinación de dos o más centros. Sin embargo, para preparar cajas de mayor volumen interno se requieren ligandos más grandes, lo que conlleva un gran esfuerzo sintético en su preparación y un gran incremento entrópico. Como aproximación supramolecular, algunos investigadores han introducido las cajas heterometálicas, donde un metal sostiene la simetría de la caja colocándose en los vértices, y otro mantiene los complejos que forman las paredes de la misma. En esta línea Su y colaboradores han conseguido evolucionar las cajas octaédricas ideadas por Fujita que emplean ligandos tridentados y complejos planocuadrados de Pd^{II} o Pt^{II}. Para ello prepararon previamente el complejo metálico que haría de bloque de construcción utilizando Ru^{III} y un ligando que tenía un extremo de fenantrolina, funcionalizada en su anillo central, que termina en una *p*-piridina (Figura 22). El Ru^{III} forma un complejo octaédrico al coordinarse con tres ligandos a través del extremo fenantrolina. Posteriormente, el Pd^{II} se coordina para formar complejos planocuadrados con cuatro de estos ligandos por medio de la *p*-piridina libre.[161] La caja resultante es un octaedro truncado de volumen interno 5350 $Å^3$, más de diez veces mayor que los 462 $Å^3$ de la caja octaédrica publicada en 1995 por Fujita.[140] La estrategia contraria se ha empleado para

[161] Li, K.; Zhang, L. Y.; Yan, C.; Wei, S. C.; Pan, M.; Zhang, L.; Su, C. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4456-4459. CCDC: 963394.

agrandar el tamaño de cajas cúbicas. En este caso, se utiliza un metal de coordinación planocuadrada como Pt^{II} para formar el complejo que se ubicará como bloque en las caras del cubo, coordinándose al mismo tiempo, a través de su otro extremo, a un metal de coordinación octaédrica que ocuparía el vértice. De este modo, en un proceso de auto-selección o *self-sorting*, se ensamblan todos los componentes en una reacción *one-pot* mediada por la preferencia de simetrías en la coordinación de los dos metales que participan en el proceso, así como por la estabilidad de los enlaces dativos que se forman.[162] El aumento en la cavidad de estas estructuras repercute directamente en los tipos de huéspedes que pueden albergar. Sin embargo, la presencia de ese segundo metal también se puede aprovechar para modular las propiedades de la cavidad. En el caso de la caja preparada por Su se confirmó que los huéspedes encapsulados quedaban protegidos de la radiación UV gracias a la presencia de Ru^{II}. Además, el tiempo que tardaban en degradarse era cuatro veces mayor que los que no estaban encapsulados, pero sí en presencia del ligando de Ru^{II}.

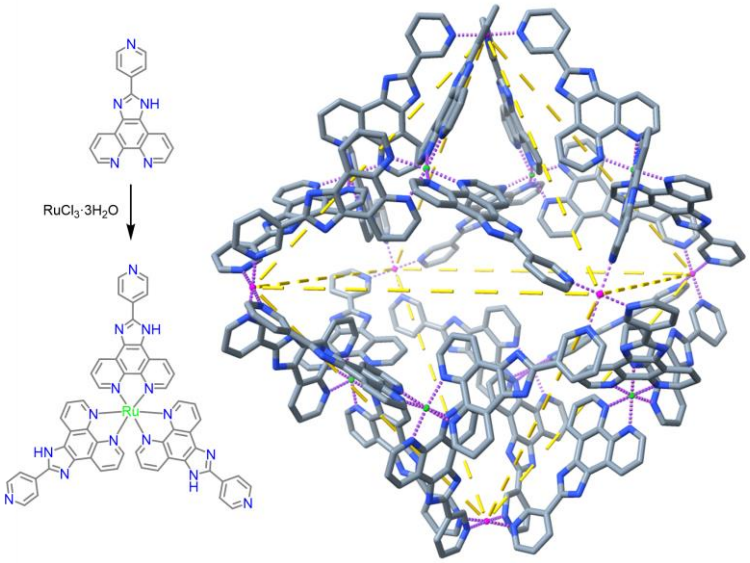


Figura 22. Caja cuboctaédrica heterometálica. Los complejos de Ru^{II} (verde lima) ocupan las caras del prisma. Los vértices están definidos por complejos planocuadrados de Pd^{II} (fucsia).[161]

Como metodología para modular las propiedades del interior de las cajas de coordinación, Fujita ha sido pionero en la funcionalización interna de estas estructuras en lo que se conoce como *endohedral functionalization*. Mediante el uso de ligandos angulares con un centro aromático portador de un grupo reactivo (OH-), puedo introducir una amplísima variedad de sustituyentes de distinta longitud y carácter químico para transformar las cavidades. Aunque se han desarrollado algunos ejemplos de funcionalización de cavidades pequeñas,[163,164] la gran mayoría de los estudios se basan en la modificación del interior de cajas $M_{12}L_{24}$. Con objetivo de incrementar la hidrofilia de las cavidades, en los primeros ejemplos desarrollados en el

[162] Ramsay, W. J.; Szczypiński, F. T.; Weissman, H.; Ronson, T. K.; Smulders, M. M. J.; Rybtchinski, B.; Nitschke, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5636-56640.

[163] Ngai, C.; Wu, H. T.; da Camara, B.; Williams, C. G.; Mueller, L. J.; Julian, R. R.; Hooley, R. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202117011.

[164] Platzek, A.; Juber, S.; Yurtseven, C.; Hasegawa, S.; Schneider, L.; Drechsler, C.; Ebbert, K. E.; Rudolf, R.; Yan, Q. Q.; Holstein, J. J.; Schäfer, L. V.; Clever, G. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202209305.

grupo de Fujita se introdujeron cadenas de poliéteres[165] y cadenas fluoradas (Figura 23A y 22B).[166] La funcionalización con azobenceno (Figura 23C) permitía modificar la hidrofilia del interior de la cavidad a través de la irradiación. La caja con *trans*-azobenceno era capaz de albergar pireno gracias al bolsillo hidrofóbico que creaba el azobenceno, sin embargo, su forma *cis* no era capaz de mantener esos contactos estabilizadores y el huésped quedaba liberado de la cavidad tras la isomerización.[167] Empleando también una cápsula $M_{12}L_{24}$ con un bolsillo hidrofóbico, formado por 24 unidades de coroneno (Figura 23D), se consiguió solubilizar C_{60} en medio acuoso, ya que la caja era soluble en agua, pero tiene un interior altamente hidrofóbico.[168]

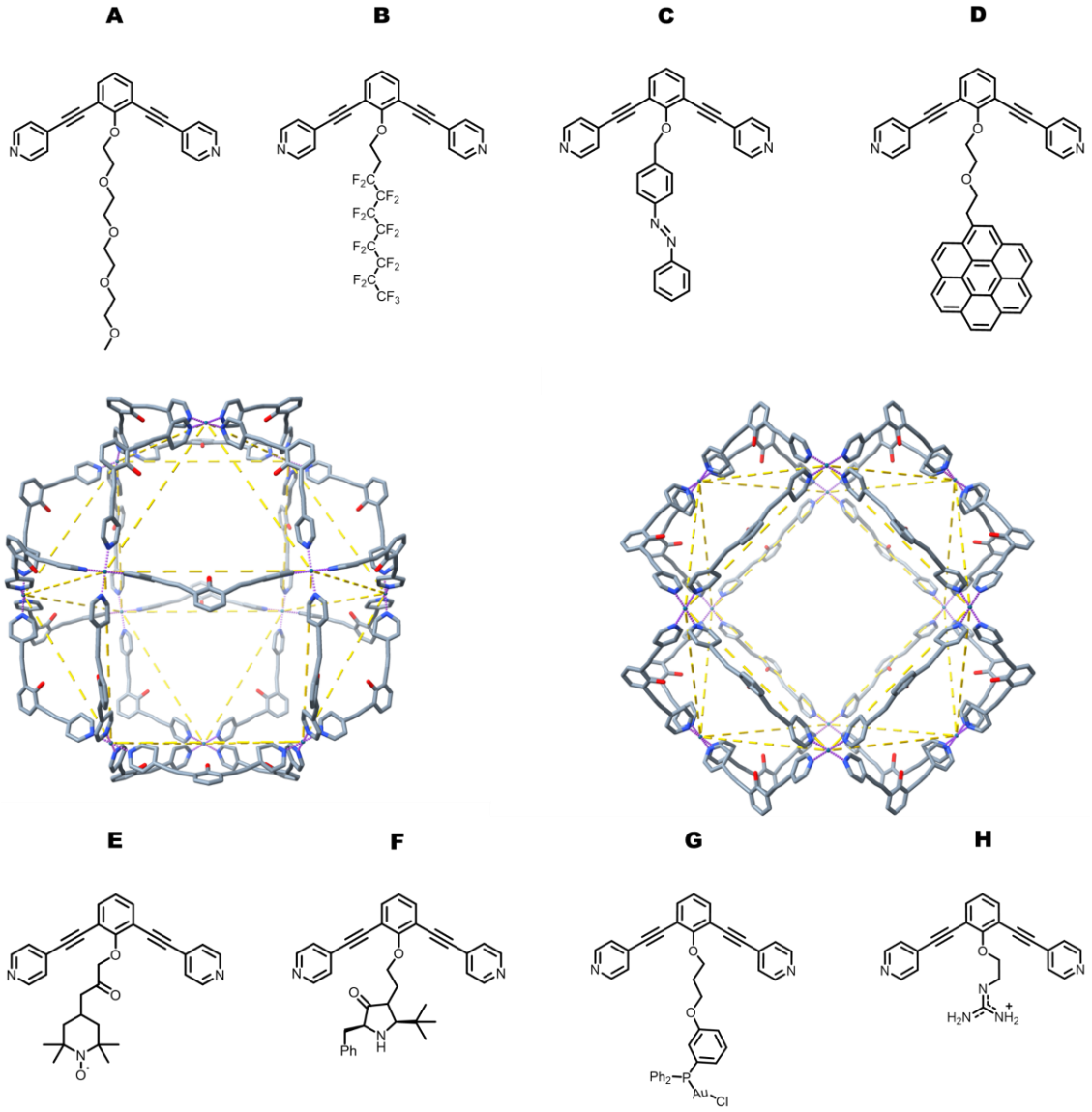


Figura 23. Diferentes funcionalizaciones internas de la estructura $M_{12}L_{24}$.[165-168,170,172]

[165] Tominaga, M.; Suzuki, K.; Murase, T.; Fujita, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11950-11951.
[166] Sato, S.; Iida, J.; Suzuki, K.; Kawano, M.; Ozeki, T.; Fujita, M. *Science,* **2006**, *313*, 1273-1276.
[167] Murase, T.; Sato, S.; Fujita, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5133-5136.
[168] Suzuki, K.; Takao, K.; Sato, S.; Fujita, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10652-10653.

En posteriores trabajos, continuando en la misma línea, el grupo de Fujita fue capaz de anclar la proteína ubiquitina y construir posteriormente la caja, dejándola confinada en su interior de forma irreversible.[169] La proteína retiene su actividad catalítica incluso en medios no convencionales. Dado que la estrategia ofrece una amplia variedad de funcionalizaciones, han desarrollado un proceso catalítico en cascada empleando dos cajas diferentes.[170] Una de ellas estaba funcionalizada con moléculas de TEMPO (Figura 23E), y la otra con un catalizador quiral de imidazolidinona (Figura 23F), también conocida como el catalizador de MacMillan.[171] Gracias a esta combinación, pudieron llevar a cabo un proceso de oxidación de un alcohol alílico, cuyo derivado aldehídico a continuación sufría una cicloadición de Diels-Alder enantioselectiva en el segundo contenedor gracias a la presencia del organocatalizador de McMillan.

Inspirados por estos trabajos, otros investigadores también han ido sumando en la variedad de funcionalizaciones accesibles. El grupo de Reek consiguió cargar la cavidad con 24 átomos de Au^{I} mediante la coordinación con una triarilfosfina (Figura 23G), lo que la dotaba de una alta concentración de catalizador.[172] Se comprobó la eficacia de esta estructura en reacciones de cicloisomerización intramolecular con buenos resultados. Evolucionando este concepto, introdujeron grupos guanidinio (Figura 23H) que eran capaces de unirse a un catalizador de Au ($TPPMSAu^{+}$) mediante enlace de hidrógeno con el grupo sulfato presente en el esqueleto del catalizador. De este modo lograban una alta carga de catalizador dentro de la cápsula, cuya actividad se estudió frente a la ciclación del ácido 4-pentinoico. Curiosamente, la actividad del catalizador dependía de la basicidad del medio para poder establecer enlaces de hidrógeno tanto con el sustrato como con el guanidinio que lo mantenía anclado al soporte (paredes internas de la cavidad). Gracias a estos resultados pudieron estudiar los detalles del mecanismo de reacción sustituyendo el complejo de Au^{I} por Cu^{I}-Xantphos, utilizando también el guanidinio para la estabilización.[173]

Además de la elección adecuada de los bloques de construcción y de poder funcionalizarlos para modular las características del interior de la cavidad, también es posible realizar modificaciones estructurales una vez generado el esqueleto principal en lo que se conoce como *post-assembly modifications* (PAM).[174] Con este tipo de aproximación es posible, por ejemplo, cambiar las preferencias de encapsulado. Así lo ha estudiado en el grupo de Nitschke empleando una caja tetraédrica con paneles de triarilfosfina. Cuando se sometió a la caja a reacciones de oxidación, alquilación, o a la coordinación con AuCl, se comprobó que se modificaba su selectividad frente a diferentes huéspedes (Figura 24A). Aunque las tres variantes presentaron afinidad por aniones, la caja con óxido de triarilfosfina en su estructura (carga total +8) mostró ser la menos selectiva por albergar tanto a aniones de pequeño como de medio tamaño. La caja P-metilada, a pesar de tener cargas positivas en sus paneles, lo que

[169] Fujita, D.; Suzuki, K.; Sato, S.; Yagi-Utsumi, M.; Yamaguchi, Y.; Mizuno, N.; Kumasaka, T.; Takata, M.; Noda, M.; Uchiyama, S.; Kato, K.; Fujita, M. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1093.
[170] Ueda, Y.; Ito, H.; Fujita, D.; Fujita, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6090-6093.
[171] Ahrendt, K. A.; Borths, C. J.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4243-42444.
[172] Gramage-Doria, R.; Hessels, J.; Leenders, S. H. A. M.; Tröppner, O.; Dürr, M.; Ivanović-Burmazović, I.; Reek, J. N. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13380-13384.
[173] Gonell, S.; Caumes, X.; Orth, N.; Ivanović-Burmazović, I.; Reek, J. N. H. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 1316-1321.
[174] Zeng, H.; Stewart-Yates, L.; Casey, L. M.; Bampos, N.; Roberts, D. A. *ChemPlusChem*. **2020**, *85*, 1249-1269.

en principio le conferirá mejor capacidad de encapsulado de aniones, se veía afectada por las repulsiones entre cargas positivas (carga total +12) y el consecuente empobrecimiento en electrones de los extremos coordinantes, lo que la hacía menos estable en presencia de halogenuros. La caja con AuCl fue la única capaz de reconocer cianuro, presumiblemente a través de un intercambio de Cl^- por CN^-.[175] En un ejemplo de elevada sofisticación y diseño racional, este grupo ha desarrollado transformaciones en cascada de unas cajas en otras mediante la combinación de PAM, intercambio de subcomponentes a través de enlaces covalentes dinámicos, y la introducción de aniones como guías para la reorganización del ensamblaje.[176] En otro tipo de enfoque, Beves y colaboradores han utilizado el ligando ensamblado para funcionalizarlo de manera regioselectiva y liberarlo posteriormente de la esfera de coordinación.[177] El tetrakis-(4-aminofenil)eteno (4-amino-TPE) involucra solo a dos de sus grupos imina en la condensación con la 2-formilpiridina y posterior coordinación con $FeCl_2$ para formar una estructura tipo helicato (Figura 24B). Posteriormente, los otros dos grupos amino libres fueron funcionalizados mediante la reacción con anhídridos o cloruros de acilo. Los autores usaron la conocida preferencia del Fe^{II} a coordinarse con el ligando quelatante TREN[151] para desensamblar el helicato y liberar al TPE funcionalizado.

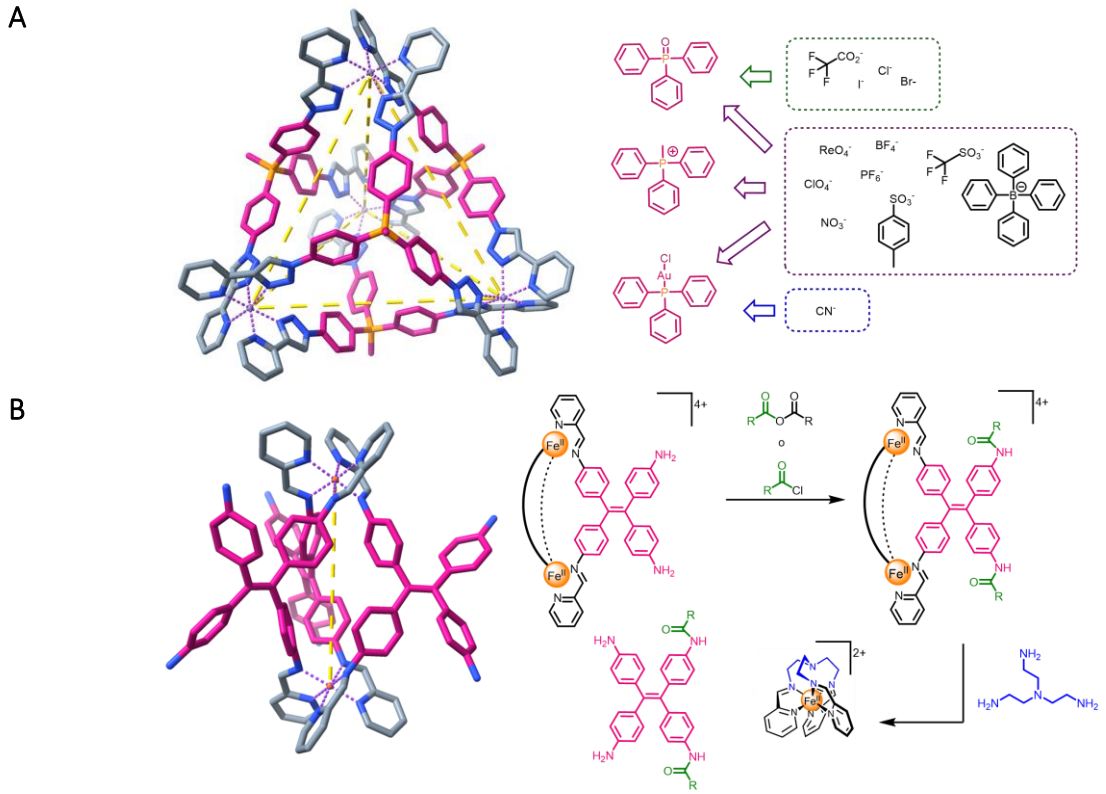


Figura 24. Ejemplos de modificaciones post ensamblaje que afectan a A) preferencias en la encapsulación de huéspedes[175] y B) reactividad sobre los bloques de construcción.[177]

[175] Mcternan, C. T.; Ronson, T. K.; Nitschke, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 6837-6842. CCDC: 1900372

[176] Roberts, D. A.; Pilgrim, B. S.; Sirvinskaite, G.; Ronson, T. K.; Nitschke, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 9616-9623.

[177] Kennedy, A. D. W.; de Haas, N.; Iranmanesh, H.; Luis, E. T.; Shen, C.; Wang, P.; Price, J. R.; Donald, W. A.; Andréasson, J.; Huang, F.; Beves, J. E. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 5708-5718.

Las modificaciones posteriores al ensamblaje también se han utilizado ampliamente para asegurar la estabilidad de especies supramoleculares. Dado que ciertos productos de ensamblado pueden dar lugar a estructuras lábiles, especialmente por la presencia de enlaces covalentes dinámicos, la perturbación de la dilución, la temperatura o la presencia de especies reactivas, desde la química de coordinación se propone un abordaje basado en las PAM. Por ejemplo, el uso de agentes oxidantes en cajas de Co^{II} permite aumentar su estabilidad.[178] Al incrementar la acidez de Lewis con Co^{III}, los enlaces Co-N se ven fortalecidos, todo ello sin cambiar la simetría de la caja ya que tanto Co^{II} como Co^{III} pueden coordinarse octaédricamente. Por otra parte, la introducción de enlaces estables Pt^{II}-N o Ru^{II}-N se ha utilizado para atrapar especies poliméricas en una "trampa cinética" a través de reacciones *cross-link*.[179]

4.4 Cápsulas con porfirinas.

Las porfirinas son macrociclos aromáticos con cuatro anillos de pirrol (posiciones β) unidos por cuatro puentes carbonados (carbonos *meso*) (Figura 25). Su estructura, propuesta por primera vez por Küster en 1912,[180] es plana y contiene 22 electrones π, de los cuales 18 son deslocalizables. Las porfirinas presentan tautomería debido a los protones NH en dos de sus anillos pirrólicos, que pueden ser arrancados fácilmente para incorporar metales en el hueco central, obteniendo así metaloporfirinas. Su espectro de absorción muestra una banda intensa sobre 390-425 nm (dependiendo de si la porfirina está sustituida en las posiciones *meso* o β) llamada banda S, responsable de su intensa coloración, y dos o cuatro bandas mucho más débiles situadas entre 480-700 nm, que se conocen como bandas Q. Ambos tipos de bandas son responsables del intenso color, rojo o púrpura, de estas moléculas. Para explicar este espectro, Gouterman propuso en 1960 un modelo en el que reduce la representación de los orbitales moleculares de las porfirinas a cuatro, dos orbitales HOMO y dos LUMO, que se consideran suficientes para poder explicar de forma general los espectros de absorbancia de las porfirinas.[181] A partir de esos cuatro orbitales se forman tres estados singlete excitados. El estado S_2 es el de mayor energía, resulta de la promoción de un electrón desde un orbital a_{1u} a otro e_g. El estado S_1 resulta de la promoción de un electrón desde un orbital a2u a un orbital e_g. El estado S_0 es el estado electrónico fundamental. La transición $S_0 \rightarrow S_2$ es la responsable de la banda Soret, mientras que las bandas Q se originan por la transición $S_0 \rightarrow S_1$.

Las porfirinas metaladas (si no están sustituidas o si la sustitución es simétrica) presentan simetría D_{4h} y una banda Q. Sin embargo, cuando la porfirina está libre, se produce un descenso de simetría a D_{2h}, lo que provoca el desdoblamiento vibracional del estado S_1, observándose dos o cuatro bandas Q. Además, las porfirinas metaladas se subdividen en convencionales e

[178] a) Nishino, T.; Yamada, Y.; Akine, S.; Sugimoto, K.; Tanaka, K. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 3831-3837. b) Burke, B. P.; Grantham, W.; Burke, M. J.; Nichol, G. S.; Roberts, D.; Renard, I.; Hargreaves, R.; Cawthorne, C.; Archibald, S. J.; Lusby, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 16877-16881.

[179] a) Zhang, Y.; Li, N.; Delgado, J.; Gao, Y.; Kuang, Y.; Fraden, S.; Epstein, I. R.; Xu, B. *Langmuir* **2012**, *28*, 3063-3066. b) Zheng, W.; Wang, W.; Jiang, S. T.; Yang, G.; Li, Z.; Wang, X. Q.; Yin, G. Q.; Zhang, Y.; Tan, H.; Li, X.; Ding, H.; Chen, G.; Yang, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 583-591. c) Tan, L.; Tan, B. *Chem. Soc. Rev*. **2017**, *46,* 3322-3356.

[180] Küster, W. *Biol. Chem.* **1912**, *82*, 463-483.

[181] a) Gouterman, M. *J. Mol. Spectrosc.* **1961**, *16*, 138-163. b) Gouterman, M.; Wagnière, G. H.; Snyder, L. C. *J. Mol. Spectrosc.* **1963**, *11*, 108-127. c) Weiss, C.; Kobayashi, H.; Gouterman, M. *J. Mol. Spectrosc.* **1965**, *16*, 415-450.

hipsoporfirinas. Las primeras son aquellas en las que el metal es de capa cerrada (d^{10}), como Zn^{II}. Los orbitales d llenos son bajos en energía y la retrodonación a los orbitales π^* no afecta al gap π-π* de la porfirina. Por este motivo, la metalación de porfirinas con Zn^{II} no tiene efectos en el color púrpura del macrociclo. Sin embargo, los metales d^m (donde m=6-9) presentan orbitales d de mayor energía que aumentan el gap π-π* de la porfirina. Por tanto, las transiciones energéticas ocurren a mayor energía o menor longitud de onda y se produce un desplazamiento hipsocrómico, de ahí que las porfirinas de Fe^{II} o Fe^{III} sean naranjas/rojizas o que las de manganeso sean verdosas.[182]

Respecto a la síntesis de porfirinas, la primera metodología descrita fue la de Fischer en 1929, donde se formaba el macrociclo a partir de bromuros de dipirrometano calentando a 220 °C.[183] MacDonald perfeccionó esta aproximación usando formildipirrometanos sustituidos en el conocido como método [2 + 2], con condiciones mucho más suaves que las que se utilizaban previamente.[184] En cuanto a las porfirinas *meso* sustituidas, Rothemund propuso en 1935 la condensación a partir de pirrol y un aldehído.[185] En 1941, utilizando ese método, se preparó por primera vez la α,β,γ,δ-Tetrafenilporfirina (TPP), aunque también requería de condiciones severas de temperatura y presión.[186] Alder y Longo hicieron mejoras considerables al proponer usar ácido propanoico como disolvente y catalizador para la ciclación, en condiciones de reflujo, llegándose a obtener rendimientos del 20%. En caso de formarse el subproducto tetrafenilclorina, se podía oxidar fácilmente con DDQ para obtener la TPP.[187] En 1987, Lindsay planteó la síntesis basada en dos etapas que aún se sigue utilizando a día de hoy para la preparación de porfirinas *meso*-sustituidas.[188] A temperatura ambiente, usando CH_2Cl_2 o $CHCl_3$ como disolvente y BF_3 o TFA como catalizadores, se prepararon diferentes TPP, con rendimientos del 30-40%. Debido a las suaves condiciones de reacción, esta síntesis es aplicable a una amplia variedad de aldehídos. Para la preparación de porfirinas sustituidas en sus posiciones β también se han desarrollado otros protocolos.[189]

[182] a) Fleischer, E. B. *Acc. Chem. Res.* **1970**, *3*, 105-112. b) Zoltan, T.; Vargas, F.; Rivas, C.; López, V.; Perez, J.; Biasutto, A. *Sci. Pharm.* **2010**, *78*, 767-789. c) Cook, L.; Brewer, G.; Wong-Ng, W. *Crystals* **2017**, *7*, 223. d) Ogawa, K.; Umetsu, Y.; Kamimura, K. *J. Chem. Res.* **2020**, *44*, 613-617. e) Sun, T.; Zhang, Z.; Xu, J.; Liang, L.; Mai, C. L.; Ren, L.; Zhou, Q.; Yu, Y.; Zhang, B.; Gao, P. *Dyes and Pigments* **2021**, *193*, 109469.

[183] Fischer, H.; Zeile, K. *Ann. Chem.* **1929**, *468*, 98-116.

[184] Arsenault, G. P.; Bullock, E.; MacDonald, S. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4384-4389.

[185] Rothemund, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57, 2010-2011.

[186] Rothemund, P.; Menotti, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 267-270.

[187] Alder, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 476.

[188] Lindsey, J. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 82-836.

[189] Smith, K. M. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 5644-5649.

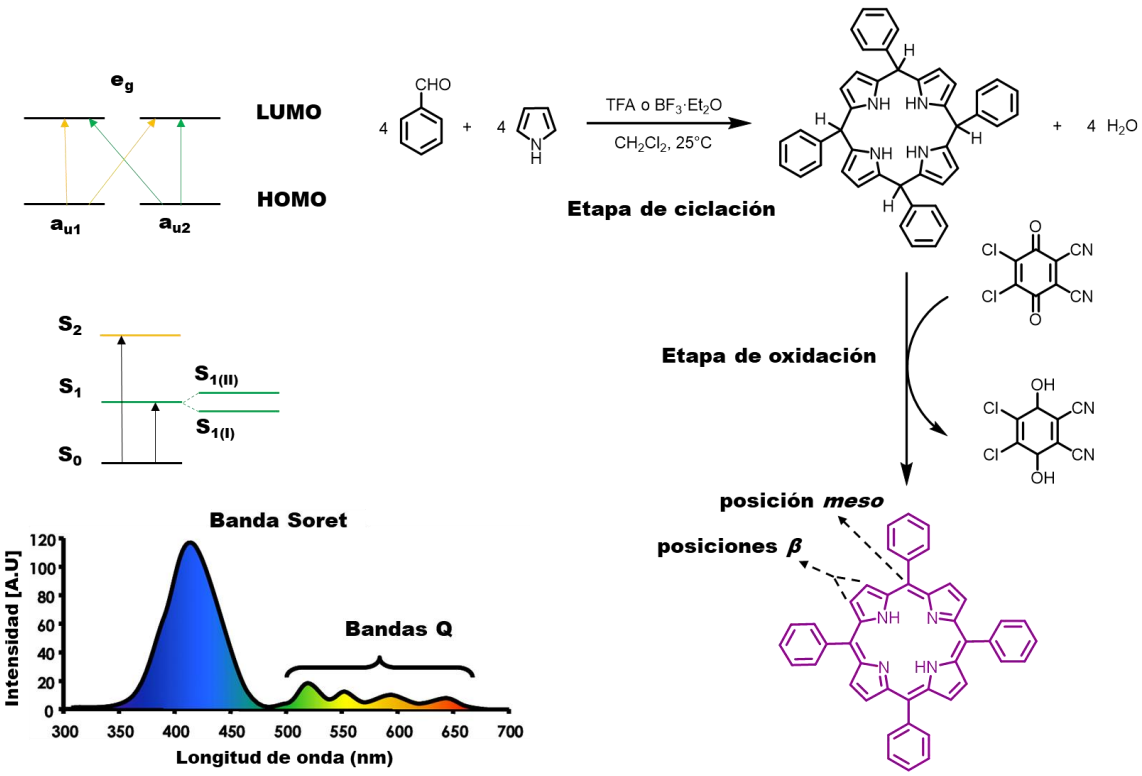


Figura 25. A la derecha, síntesis de la TPP basada en el método de Lindsay.[188] A la izquierda, reducción de los orbitales moleculares de la porfirina, transiciones responsables de las bandas S y Q.

Las características ópticas y la capacidad redox de las porfirinas han sido aprovechadas por la naturaleza, por lo que constituyen el esqueleto de moléculas imprescindibles a nivel biológico. Además, su desempeño en esos procesos biológicos es íntimamente dependiente de la coordinación con un metal (Figura 26). Por ejemplo, la clorofila, una porfirina con un centro de magnesio, cumple la función de antena luminosa al capturar fotones en las regiones del ultravioleta cercano (400 nm) y rojo (650 nm). En este proceso, tanto los sustituyentes periféricos como el metal modulan la absorción, de manera que se da en la zona precisa para la captación eficiente de fotones. Además, el magnesio es un centro que coordina agua, que se utiliza como fuente de electrones en el proceso fotosintético. El flujo de electrones desde la clorofila conlleva la oxidación de moléculas de agua con la consiguiente producción de oxígeno. En los mamíferos, la molécula encargada del transporte de oxígeno es la hemoglobina, una proteína que contiene cuatro grupos hemo. El grupo hemo es una porfirina de Fe^{II} capaz de unirse reversiblemente al oxígeno. De esa manera se permite el transporte de oxígeno a través de la sangre, o su almacenamiento en el tejido muscular por la mioglobina. La combinación del macrociclo hemo y el entorno de la hemoglobina cambia el potencial redox del hierro para inhibir su oxidación a Fe^{III} en presencia de aire y agua. Además de estos dos ejemplos, hay otras porfirinas que forman parte de proteínas o enzimas en organismos vivos, como son los citocromos, la peroxidasa o la catalasa.[190]

[190] a) de Oliveira, F. K.; Santos, L. O.; Buffon, J. G. *Food Res. Int.* **2021**, *143*, 110266. b) Nicholls, P.; Fita, I.; Loewen, P. C. *Adv. Inorg. Chem*. **2000**, *51*, 51-106. c) Imlay, J. A. *Annu. Rev. Microbiol*. **2003**, *57*, 395-418.

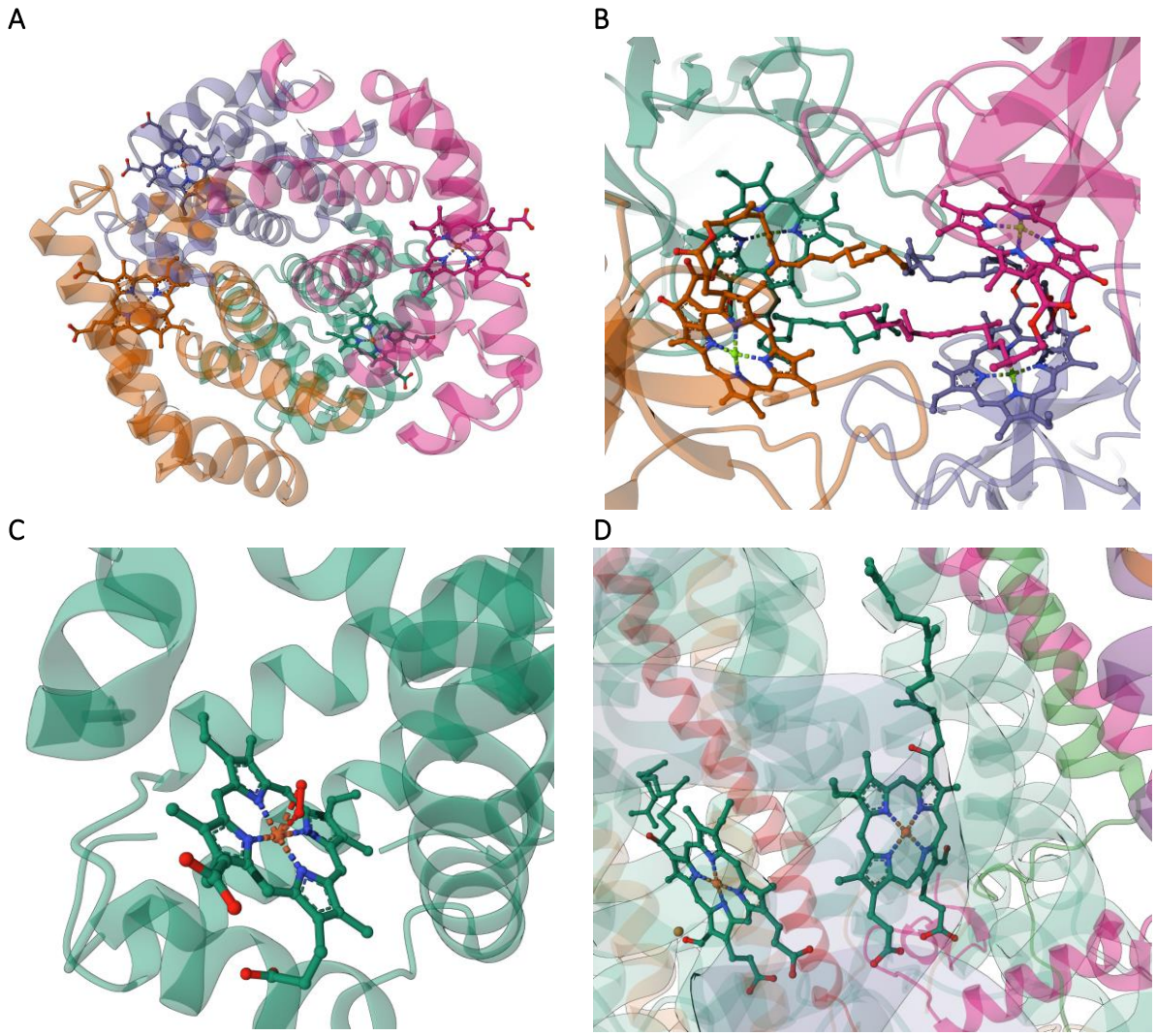


Figura 26. Porfirinas en organismos vivos. A) hemoglobina humana (PDB: 1A3N); B) Clorofila de *Lepidium virginicum* (PDB: 2DRE); C) Mioglobina humana. El hierro se encuentra coordinado a O_2 (PBD: 1MNO); D) Citocromo C oxidasa humana (PDB: 2Z62).

La presencia de porfirinas en la naturaleza ha inspirado a los químicos, especialmente a aquellos investigadores que estudian la preparación de cápsulas supramoleculares, a incluir estos macrociclos como unidad estructural y funcional en sus diseños, o para abordar comprobar su actividad como enzimas artificiales.[191] Tras la breve introducción sobre algunos aspectos básicos de las porfirinas, se tratará de reseñar los tipos de cápsulas que se han preparado incluyendo este motivo, diferenciando entre aquellas que contienen una porfirina en su estructura, dos, o múltiples.

[191] a) Mamardashvili, G. M.; Zh Mamardashvili, N.; Koifman, O. I. *Rus. Chem. Rev*. **2005**, *74*, 765-780. b) Chino, M.; Leone, L.; Zambrano, G.; Pirro, F.; D'Alonzo, D.; Firpo, V.; Aref, D.; Lista, L.; Maglio, O.; Nastri, F.; Lombardi, A. *Biopolymers* **2018**, *109*, e23107.

En cuanto a las cápsulas que solo contienen una porfirina, normalmente se encuentran ancladas a otras moléculas de las que se conoce que forman cavidades, aunque no completamente cerradas. Es el caso de las ciclodextrinas,[192] ciclofanos,[193] calixarenos[194] o la molécula de glucolurilo (Figura 27).[195] La unión de la porfirina cierra tridimensionalmente el bolsillo aportando selectividad a la cavidad.

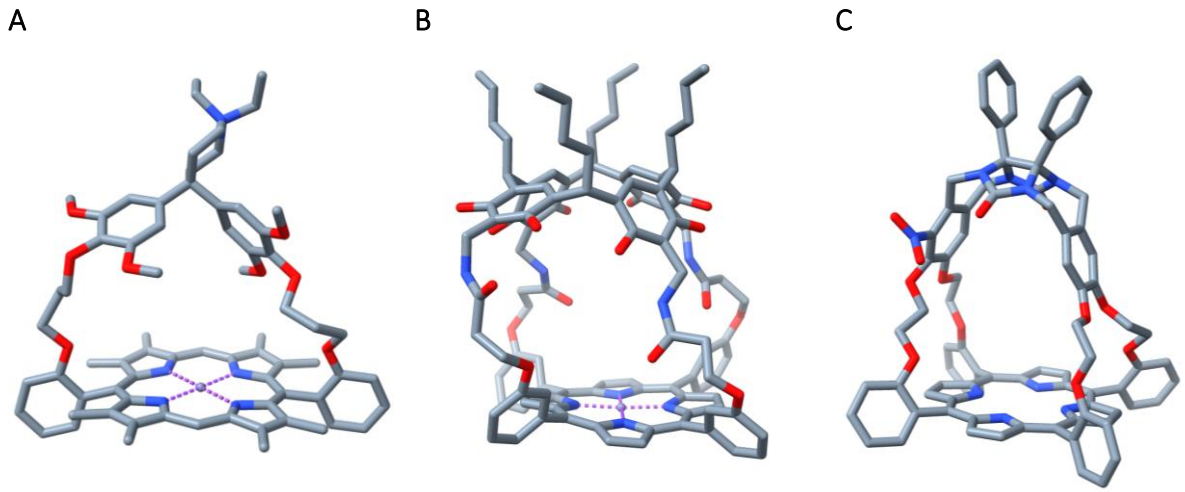


Figura 27. Cápsulas formadas mediate la unión de una porfirina a A) un ciclofano;[193a] B) un calixareno[194b] y C) un derivado quiral del glucolurilo.[200a]

De los soportes mencionados, quizás sean las estructuras formadas por la unión de glucolurilo (y sus derivados) con porfirinas (Figura 27C), las que más interés han despertado. Rowan fue el primero es describir la síntesis de un receptor de este tipo, en colaboración con Nolte y Stoddart.[196] Estudiaron su comportamiento frente a la presencia de huéspedes 4,4'-bipiridinio, más conocidos como viológenos, que penetraban en la cavidad de manera longitudinal, quedando los anillos aromáticos del huésped frente a las paredes del receptor. Gracias a la combinación de las interacciones electrostáticas entre los espaciadores de oxietileno del receptor y las cargas positivas del huésped, interacciones π-π y los enlaces de hidrógeno débiles entre los grupos carbonilo de la urea del receptor y los protones 3 y 3' del bipiridinio, se observaron K_a de entre 10^5 y 10^6 M^{-1}. La presencia de Zn como centro metálico permitía, además, la unión de manera axial con piridinas, que también estaba estabilizada por interacciones π-π.[197] El grupo de Nolte se ha centrado durante años en el estudio de las propiedades de reconocimiento de esta estructura y sus derivados, así como de sus

[192] a) Zhang, H.; Zhang, B.; Zhu, M.; Grayson, S. M.; Schmehl, R.; Jayawickramarajah, J. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4853-4855. b) Kryjewski, M.; Goslinski, T.; Mielcarek, J. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *300*, 101-120. c) Zhang, Q. W.; Elemans, J. A. A. W.; White, P. B.; Nolte, R. J. M. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 5586-5589.

[193] a) Benson, D. R.; Valentekovich, R.; Knobler, C. B.; Diederich, F. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2401-2422. CCDC: 1283912. b) Staab, H. A.; Weikard, J.; Rückemann, A.; Schwögler, A. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2703-2712.

[194] Starnes, S. D.; Rudkevich, D. M.; Rebek, J. *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 4659-4669. b) Middel, O.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3998-4005. c) Kishimoto, K.; Nakamura, M.; Kobayashi, K. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2629-2633. d) Al-Azemi, T. F.; Vinodh, M.; Alipour, F. H. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 76482-76489.

[195] Elemans, J. A. A. W.; Nolte, R. J. M. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 9590-9605.

[196] Rowan, A. E. *Chem. Commun.* **1998**, 611-612.

[197] Elemans, J. A. A. W.; Claase, M. B.; Aarts, P. P. M.; Rowan, A. E.; Schenning, A. P. H. J.; Nolte, R. J. M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7009-7016.

aplicaciones (Figura 28).[195] Cuando prepararon la cápsula con dos cavidades, esto es, dos derivados de glucolurilo conectados a una misma porfirina por sus dos caras, observaron que, ante la presencia de más de un huésped, la unión de estos estaba controlada por un proceso de cooperatividad alostérica. La entrada del primer huésped provocaba un ensanchamiento de la cavidad donde este se alojaba, en detrimento del tamaño de la segunda cavidad. Este cambio conformacional repercutía de manera negativa en la unión de un segundo huésped en el caso de los metilviológenos (K_{a1} =7·10^7 M^{-1} y K_{a2} =5·10^4 M^{-1}), que no encontraban hueco suficiente para alojarse cómodamente. Sin embargo, en el caso de la piridina como huésped, se observó lo contrario, un proceso de cooperatividad alostérica positiva, donde la entrada del primer huésped (K_{a1} =2.2·10^4 M^{-1}) facilitaba la entrada del segundo (K_{a2} =1.1·10^5 M^{-1}).[198] Los autores lo han relacionado con que, en el caso de la piridina, un espacio más pequeño lleva a interacciones π-π más fuertes, que estabilizan a este segundo huésped en mayor medida que al primero. A pesar del comportamiento observado en la cápsula con dos cavidades, en el caso de aquella que solo contiene una unidad de glucolurilo, y, por tanto, una única cavidad, se comprobó que la unión de dos ligandos diferentes, metilviológeno y *p*-tercbutilpiridina contribuían a la unión alostérica positiva de uno y otro. En este caso, la piridina se coordina por fuera, ya que el espacio entre el glucolurilo y la porfirina lo ocupa preferentemente el metilviológeno (Figura 28 parte superior izquierda). Se comprobó que, tanto como si se producía primero la unión del viológeno como de la piridina, la entrada del segundo huésped estaba favorecida.[199] Además, atendiendo a la capacidad de coordinación de la porfirina, era posible obtener estructuras diméricas o tetraméricas cuando se usaban como huéspedes DABCO (Figura 28 izquierda) o tetrapiridilporfirina, respectivamente, en un proceso donde el huésped actúa como plantilla, guiando la formación del bolsillo adecuado en cada caso.[199a]

Cuando se introduce quiralidad en el receptor, mediante la incorporación de un centro estereogénico en los dos metilenos que conectan la porfirina con el glucolurilo (Figura 27C, grupo nitro), se induce el reconocimiento de huéspedes viológeno de manera enantioselectiva. Sin embargo, solamente para aquellos huéspedes con carbonos quirales en sus extremos se observó esa tendencia, ya que es ahí donde tiene lugar el primer contacto entre receptor y huésped. Para aquellos huéspedes donde los carbonos quirales se sitúan en el esqueleto central, se comprobó que el receptor no era capaz de discriminar entre enantiómeros.[200]

Por otra parte, la sustitución de Zn^{II} como centro metálico por Mn^{II} o Ru^{II}, confiere al receptor la capacidad de llevar a cabo reacciones de epoxidación y acoplamientos C-C, respectivamente. En el caso del receptor con manganeso, la coordinación axial previa con la piridina activaba al manganeso y era capaz de disociar un átomo de oxígeno de una molécula

[198] a) Thordarson, P.; Bijsterveld, E. J. A.; Elemans, J. A. A. W.; Kasák, P.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1186-1187. b) Thomassen, P. J.; Varghese, S.; Bijsterveld, E. J. A.; Thordarson, P.; Elemans, J. A. A. W.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 5246-5253.

[199] a) Thordarson, P.; Coumans, R. G. E.; Elemans, J. A. A. W.; Thomassen, P. J.; Visser, J.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4755-4759. b) Deutman, A. B. C.; Monnereau, C.; Moalin, M.; Coumans, R. G. E.; Veling, N.; Coenen, M.; Smits, J. M. M.; De Gelder, R.; Elemans, J. A. A. W.; Ercolani, G.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2009**, *106*, 10471-10476.

[200] a) Ouyang, J.; Swartjes, A.; Geerts, M.; Gilissen, P. J.; Wang, D.; Teeuwen, P. C. P.; Tinnemans, P.; Vanthuyne, N.; Chentouf, S.; Rutjes, F. P. J. T.; Naubron, J.-V.; Crassous, J.; Elemans, J. A. A. W.; Nolte, R. J. M. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4776. CCDC: 1989978. b) Gilissen, P. J.; Slootbeek, A. D.; Ouyang, J.; Vanthuyne, N.; Bakker, R.; Elemans, J. A. A. W.; Nolte, R. J. M. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 1661-1667.

de hipoclorito e insertarlo en un alqueno, formando un epóxido. Esta transformación tenía lugar por la cara externa de la porfirina, ya que la cavidad de la cápsula estaba ocupada por la piridina. Sin embargo, con piridinas voluminosas, que no podían ser albergadas en la cavidad y se coordinaban por la cara externa, la cara interna quedaba libre para actuar como bolsillo reactivo epoxidante (Figura 28 derecha).[201] Dados estos prometedores resultados, posteriormente se comprobó que, bloqueando la cara externa con una piridina voluminosa, un polímero susceptible de sufrir epoxidación, como el polibutadieno, podía insertarse longitudinalmente en la cavidad, de manera que el catalizador (la cápsula porfirina-glucolurilo) se desplazaba a lo largo de la cadena transformando los dobles enlaces en epóxidos (Figura 28 parte inferior derecha).[202] Cuando el centro metálico es Ru^{II}, esta molécula era capaz de catalizar la homodimerización de diazoacetatos. El producto queda atravesado en cavidad, formando un rotaxano con el receptor (Figura 28 parte superior derecha).[203] Recientemente se ha estudiado el derivado metalado con Fe^{II}, que promueve la reducción electroquímica de CO_2 a CO, con la previa unión de K^+ a la cavidad del huésped, que altera el potencial electroquímico del mismo (Figura 28 parte superior centro).[204]

Recientemente, en el grupo de Nolte, en colaboración con Feringa, se han preparado derivados de la cápsula porfirina-glucolurilo que incorporan uno o dos motores moleculares en sus paredes, lo que influye en el atrapado de viológenos.[205] La introducción de estos bloques aromáticos da lugar a una mezcla de diastereoisómeros. En aquellos donde el motor se coloca bloqueando la entrada a la cavidad, el reconocimiento de viológenos está impedido. Sin embargo, este bloqueo puede ser revertido mediante isomerización fotoquímica, liberando así el acceso a la cavidad (Figura 28 parte inferior izquierda).

La variabilidad que ofrece esta estructura, ya que puede albergar distintos tipos de huéspedes, se ha intentado explotar también mediante la unión covalente de dos cápsulas. Para ello se utiliza un alquino como sustituyente en uno de los anillos aromáticos de la porfirina que se acopla con una cadena alquílica con azidas en sus extremos. De esta forma se obtuvo una estructura tipo pinza que presenta dos cavidades separadas.[206] Mediante la adición de DABCO, que se coordina a los Zn de ambas porfirinas simultáneamente, la pinza se cierra y las cavidades quedan alineadas, pudiendo ser albergadas por distintos huéspedes. En este caso, se observó que el receptor era capaz de epoxidar a dos cadenas de butadieno simultáneamente.

[201] a) Elemans, J. A. A. W.; Bijsterveld, E. J. A.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *Chem. Commun.* **2000**, 2443-2444. b) Elemans, J. A. A. W.; Bijsterveld, E. J. A.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 751-757.
[202] Thordarson, P.; Bijsterveld, E. J. A.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *Nature* **2003**, *424*, 915-918.
[203] van den Boomen, O. I.; Coumans, R. G. E.; Akeroyd, N.; Peters, T. P. J.; Schlebos, P. P. J.; Smits, J.; de Gelder, R.; Elemans, J. A. A. W.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E. *Tetrahedron* **2017**, *73*, 5029-5037.
[204] Surendran, A. K.; Tripodi, G. L.; Pluhařová, E.; Pereverzev, A. Y.; Bruekers, J. P. J.; Elemans, J. A. A. W.; Meijer, E. J.; Roithová, J. *Nat. Sci.* **2023**, *3*, e20220019.
[205] a) Gilissen, P. J.; White, P. B.; Berrocal, J. A.; Vanthuyne, N.; Rutjes, F. P. J. T.; Feringa, B. L.; Elemans, J. A. A. W.; Nolte, R. J. M. *Nat. Commun.* **2020**, *11,* 5291. b) Gilissen, P. J.; Vanthuyne, N.; Feringa, B. L.; Elemans, J. A. A. W.; Nolte, R. J. M. *Nat. Sci.* **2022**, *2*, e20210046.
[206] Stout, K.; Peters, T. P. J.; Mabesoone, M. F. J.; Visschers, F. L. L.; Meijer, E. M.; Klop, J.; van den Berg, J.; White, P. B.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M.; Elemans, J. A. A. W. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, *2020*, 7087-7100.

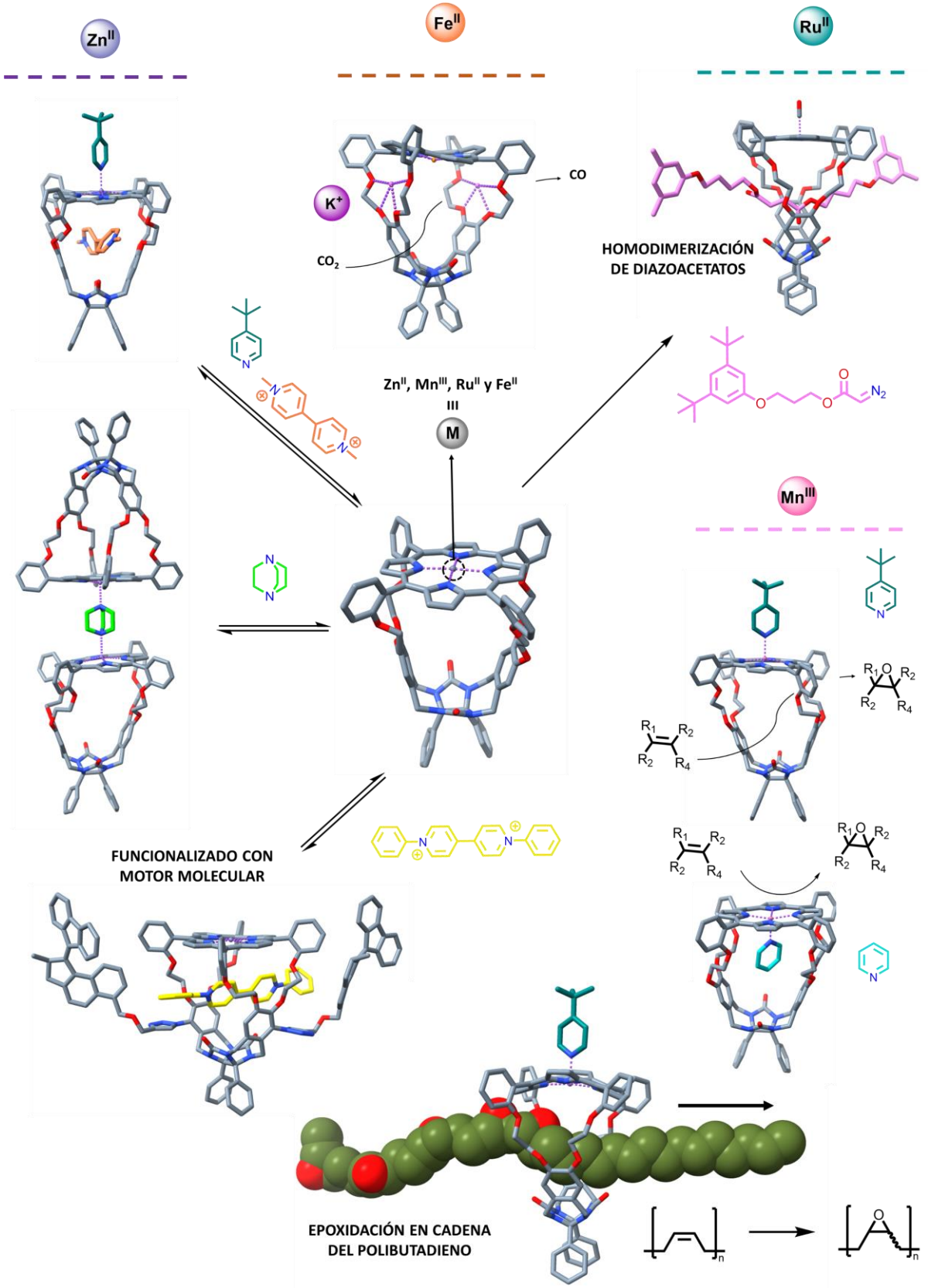


Figura 28. Imagen ilustrativa de la coordinación de la cápsula porfirina-glucolurilo con diferentes metales, estudios *host-guest* y catálisis. [201-205]

La idea de dos porfirinas unidas por un espaciador en una estructura tipo pinza u horquilla ha sido aplicada por diversos investigadores.[207-211] Cuando el ligando es de longitud apropiada

se coordina a ambas porfirinas mediado por el cerrado de la pinza si el conector es flexible. Se han empleado diversos tipos de espaciadores: rígidos,[207] flexibles,[208] cortos[209] o largos.[210] También se ha observado que, introduciendo quiralidad en estos espaciadores, se induce el reconocimiento enantioselectivo.[211] Sin embargo, esta categoría de pinzas moleculares no se comentará con detalle ya que no son, propiamente, cápsulas.

En cuanto a las cápsulas covalentes con dos porfirinas, suelen ser estructuras simétricas donde ambas porfirinas están unidas mediante dos o cuatro conectores. La primera caja cofacial de este tipo fue preparada en el grupo de Kagan, en 1977 (Figura 29A).[212] Primero se sintetizó una tetrafenilporfirina que se funcionalizó, en una segunda etapa, con cuatro cadenas terminadas en *p*-benzaldehído. En la etapa final, con pirrol y ácido propanoico, se indujo la formación de una segunda porfirina por condensación de los cuatro benzaldehídos de la primera con el pirrol.

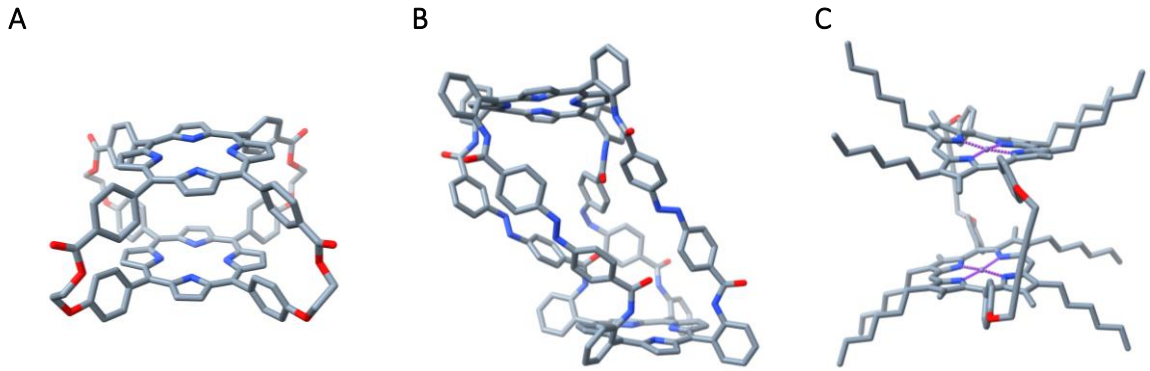


Figura 29. Primeras cajas biporfirínicas preparadas por A) Kagan,[212] B) Neumann y Vögtle[213] y C) Aida.[214]

Diez años más tarde, Neumann y Vögtle fueron los primeros en unir dos porfirinas preparadas por separado.[213] Lo hicieron mediante la condensación de una porfirina con cuatro cloruros de ácido aromáticos con otra que portaba cuatro *orto*-anilinas. La primera incluía, además, unidades de azobenceno como espaciadores en sus brazos, lo que supuso la primera caja fotoisomerizable (Figura 29B). Posteriormente, Takuzo Aida utilizó un acoplamiento Glaser para unir ambos monómeros, de manera que las porfirinas quedaban unidas por un 1,3-diino (Figura 29C).[214] Hupp y Nguyen utilizaron una reacción de metátesis de olefinas para preparar

[207] a) Koifman, O. I.; Mamardashvili, N. Z. *Russ. Chem. Bull.* **2013**, *62*, 123-132. b) Mamardashvili, N. Z.; Koifman, M. O.; Koifman, O. I. *Russ. J. Org. Chem.* **2014**, *50*, 559-566.
[208] Johnston, M. R.; Latter, M. J.; Warrener, R. N. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2165-2168.
[209] Brahma, S.; Ikbal, S. A.; Dey, S.; Rath, S. P. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4070-4072.
[210] Murphy, R. B.; Norman, R. E.; White, J. M.; Perkins, M. V.; Johnston, M. R. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 8707-8720.
[211] Saha, B.; Ikbal, S. A.; Rath, S. P. *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 7795-7809.
[212] Kagan, N. E.; Mauzerall, D.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99,* 5484-5486.
[213] Neumann, K. H.; Vögtle, F. *J. Chem. Soc., Chemm. Commun.* **1988**, 520-522.
[214] Tashiro, K.; Aida, T.; Zheng, J. Y.; Kinbara, K.; Saigo, K.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9477-9478.

estructuras simulares a las de Aida.[215] Observaron que el grado de saturación de las paredes afectaba a la capacidad del receptor para catalizar la descomposición de ésteres trifosfato, siendo aquella con las paredes saturadas la que mejor actividad presentaba. Ballester también estudió el comportamiento de cajas muy similares, con dos conectores, en unos casos insaturados y en otros saturados.[216] Aquellas con conectores saturados, más flexibles, eran capaces de albergar tanto C_{60} como C_{70} (Figura 30A), sin embargo, las más rígidas no fueron capaces de acomodar C_{70}. En cambio, cuando se refuerzan las interacciones estabilizadoras, también es posible encerrar C_{70} en una caja bisporfirínica de paredes rígidas. Así lo han comprobado en el grupo de Stoddart con una caja con cuatro paredes de viológeno, donde las interacciones π-π y catión-π juegan un papel fundamental (Figura 30B).[217]

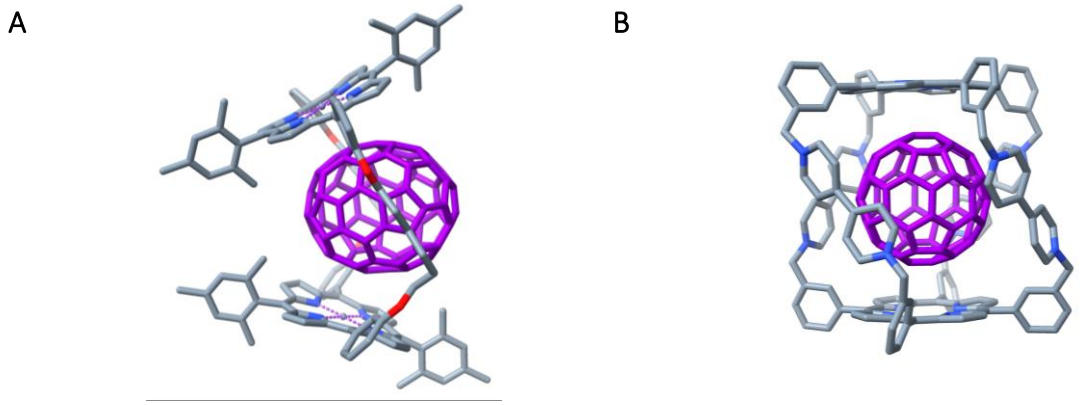


Figura 30. Cajas con dos porfirinas capaces de albergar C_{70} gracias a A) su flexibilidad[216] y B) refuerzo de interacciones favorables con el huésped.[217]

Uno de los inconvenientes que se presenta en la formación de estos dímeros, es la formación de oligómeros o polímeros. Para minimizar este problema, algunos investigadores han introducido en el medio de reacción un ligando bidentado, como 4,4'-bipiridina o DABCO, que guía la dimerización ya que acerca los extremos reactivos cuando se coordina a ambas porfirinas. Sander y colaboradores han utilizado esta estrategia para unir ambos monómeros mediante puentes disulfuro (Figura 31A),[218] así como los grupos de Heitz y Li para preparar el dímero unido por cuatro conectores generados mediante reacción de metátesis de alquenos (Figura 31B).[219] Zhang y colaboradores, en ausencia de ligandos guía, también han conseguido preparar las cajas bisporfirínicas unidas por cuatro conectores covalentes empleando metátesis de alquinos.[220] En la misma línea de construcción de los dímeros mediante nuevos enlaces C-C,

[215] Totten, R. K.; Ryan, P.; Kang, B.; Broadbelt, L. J.; Snurr, R. Q.; Hupp, J. T.; Nguyen, S. B. T. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4178-4180.
[216] Hernández-Eguía, L. P.; Escudero-Adán, E. C.; Pintre, I. C.; Ventura, B.; Flamigni, L.; Ballester, P. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14564-14577. CCDC: 825890
[217] Shi, Y.; Cai, K.; Xiao, H.; Liu, Z.; Zhou, J.; Shen, D.; Qiu, Y.; Guo, Q.-H.; Stern, C.; Wasielewski, M. R.; Diederich, F.; Goddard, W. A.; Stoddart, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 13835-13842. CCDC: 1840375.
[218] a) Kieran, A. L.; Pascu, S. I.; Jarrosson, T.; Sanders, J. K. M. *Chem. Commun.* **2005**, 1276-1278. b) Kieran, A. L.; Bond, A. D.; Belenguer, A. M.; Sanders, J. K. M. *Chem. Commun.* **2003**, 2674-2675. CCDC: 218740.
[219] a) Taesch, J.; Heitz, V.; Topić, F.; Rissanen, K. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5118-5120. CCDC: 867933.b) Zhu, B.; Chen, H.; Lin, W.; Ye, Y.; Wu, J.; Li, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15126-15129.
[220] Zhang, C.; Wang, Q.; Long, H.; Zhang, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20995-21001.

Wu y colaboradores han preparado una caja bisporfirínica con aromaticidad extendida a través de sus cuatro brazos (Figura 32A). Para ello emplearon un acoplamiento de Yamamoto para unir los cuatro brazos de los monómeros, que consistían en bromoditiofenos, a través de un enlace sencillo C-C. Este método dejaba cuatro tiofenos en cada brazo de la estructura dimérica. La posterior oxidación con DDQ de los enlaces sencillos a dobles, permitía la deslocalización de electrones a lo largo de las tres dimensiones de la molécula, lo que le confiere un potencial de reconocimiento de huéspedes único.[221]

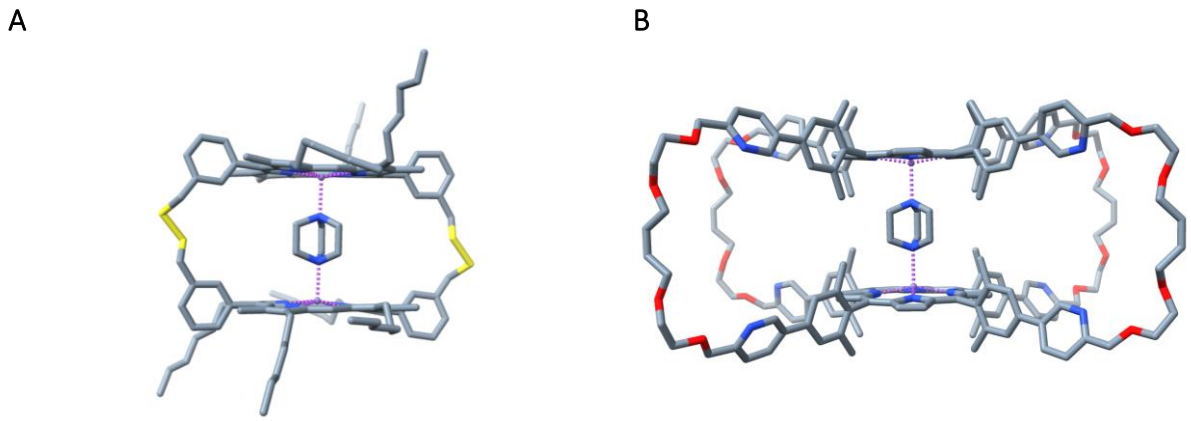


Figura 31. Cajas preparadas usando el ligando bidentado DABCO para guiar la formación de los nuevos enlaces S-S[218b] y C=C.[219a]

Otro recurso empleado para la preparación de estos receptores es la cicloadición tipo *click*.[222] El grupo de Li fue el primero en hacer uso del acoplamiento alquino-azida para conseguir preparar estos dímeros con cuatro conectores (Figura 32B). La corta distancia entre ambas porfirinas, además de la presencia de los cuatro triazoles, hacía que esta cápsula fuese selectiva en el reconocimiento del anión azida.[223] Aunque la formación de cuatro enlaces de manera simultánea es un reto, la elección de espaciadores cortos y la preorganización colaboran en el proceso, obteniéndose, en algunos casos, rendimientos de en torno al 50-60% para estos acoplamientos. La presencia de triazoles en los brazos de este tipo de receptores puede tener un papel funcional además de estructural. Heitz y colaboradores comprobaron que el protón ácido de los triazoles en cajas bisporfirínicas de Co^{III} podía mediar en la activación de CO_2 para la formación de carbonatos cíclicos a partir de CO_2 y epóxidos.[224] Por su parte, el par de electrones solitarios de los nitrógenos del triazol también puede actuar como punto de coordinación extra en las cajas que tienen dos triazoles en cada uno de sus brazos.[225]

[221] Ren, L.; Han, Y.; Hou, X.; Ni, Y.; Wu, J. *Chem* **2021**, *7*, 3442-3453. CCDC: 2080996
[222] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1983-2181.
[223] Zhang, J.; Li, Y.; Yang, W.; Lai, S. W.; Zhou, C.; Liu, H.; Che, C. M.; Li, Y. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3602-33604. CCDC: 853794
[224] Schoepff, L.; Monnereau, L.; Durot, S.; Jenni, S.; Gourlaouen, C.; Heitz, V. *ChemCatChem* **2020**, *12*, 5569-5833.
[225] Sánchez-Resa, D.; Daidone, I.; Djemili, R.; Adrouche, S.; Durot, S.; Heitz, V.; Zanetti-Polzi, L.; Ventura, B. *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126*, 3450-3459.

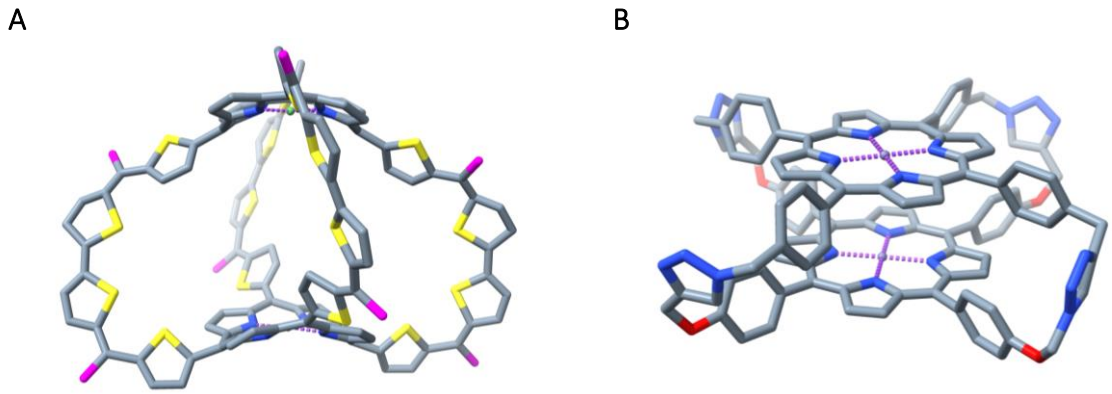


Figura 32. A) Caja biporfirínica con aromaticidad 3D extendida gracias a sus conectores de tetratiazol. Los sustituyentes *p*-tecbutilbenceno se han omitido por claridad (fucsia);[221] B) Primer ejemplo de una caja bisporfirínica preparada mediante una reacción de cicloadición alquino-azida.[223]

El uso de la química de coordinación para unir ambos monómeros da lugar a las correspondientes cápsulas con rendimientos mucho mayores (70-90%) y, además, permite incorporar espaciadores más largos sin que ello suponga mayor probabilidad de obtener estructuras poliméricas. En las aproximaciones más sencillas, los brazos contienen una piridina u otro motivo de coordinación terminal, de manera que dos o cuatro centros metálicos mantienen la estructura dimérica. Como se ha visto en el apartado de cajas de coordinación, se recurre frecuentemente a Pd^{II} para formar complejos de coordinación con piridinas. Shinkai y colaboradores conectaron los cuatro extremos de los monómeros de porfirina mediante la formación de complejos lábiles planocuadrados de Pd^{II} (Figura 33A). Estudiaron su capacidad para coordinarse con ligados bidentados de bipiridina, representando uno de los primeros ejemplos del atrapado de este tipo de ligandos en cápsulas de porfirinas mediante la coordinación simultánea con ambas.[226] Para dar mayor estabilidad al ensamblado, se ha recurrido a metales con capacidad de formar complejos octaédricos con ligandos quelatantes como terpiridinas (Figura 33B).[227]

[226] Ikeda, A.; Ayabe, M.; Shinkai, S.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3707-3710.
[227] Li, M.; Shi, Y.-Q.; Gan, X.; Su, L.; Liang, J.; Wu, H.; You, Y.; Che, M.; Su, P.; Wu, T.; Zhang, Z.; Zhang, W.; Yao, L.-Y.; Wang, P.; Xie, T.-Z. *Inorg. Chem.* **2023**, *62*, 4393-4398. CCDC: 2218015.

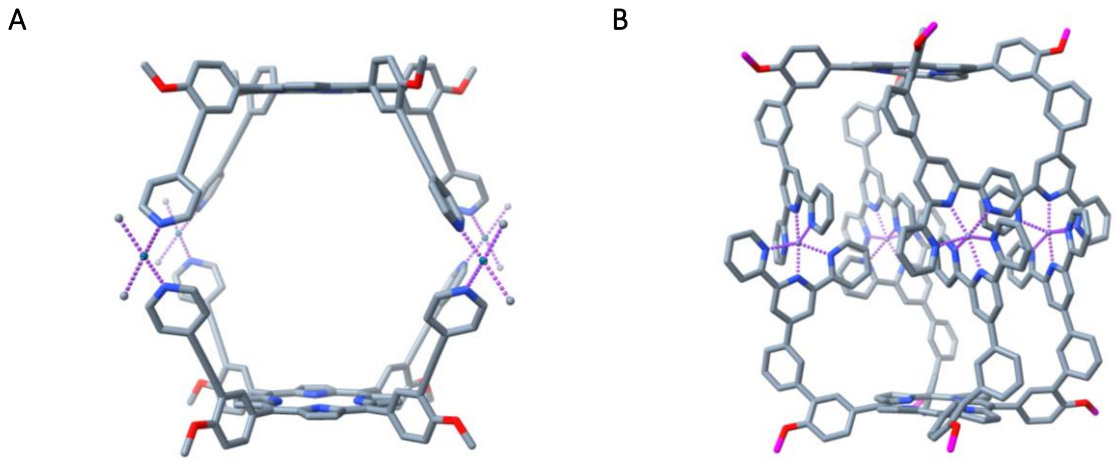


Figura 33. Cajas biporfirícas donde los cuatro brazos conectores se unen mediante la formación de complejos metálicos A) planocuadrados de Pd^{II},[226] y B) octaédricos de Zn^{II}.[227] En la figura A los ligandos aromáticos del complejo planocuadrado orientados hacia fuera de la cavidad se han omitido por claridad, así como las cadenas alquílicas en los anillos aromáticos *meso* de la porfirina en la figura B (fucsia).

Para la preparación de cápsulas que contienen un mayor número de porfirinas, la construcción de más de cuatro nuevos enlaces en una misma etapa de reacción se vuelve extremadamente complicada, es por ello que la mayoría de los ejemplos que encontramos en la bibliografía recurren a la química de coordinación o al uso de moléculas que hacen de plantilla para forzar que los extremos reactivos se encuentren en el espacio y faciliten la formación de los enlaces deseados. Sin embargo, hay algunas excepciones a estas dos vertientes principales que hacen uso de la preorganización de otras moléculas, como los calixarenos,[228] de la complementariedad con otros bloques de construcción como TREN[229] y anillos de benceno-1,3,5-funcionalizados[230] o de otras moléculas que ofrecen más de un punto de anclaje orientado apropiadamente.[231] Un ejemplo que ilustra el resultado de un buen diseño racional para la construcción de un ensamblado de mayor complejidad es la cápsula preparada por Osuka en 2006 (Figura 34). El bloque de construcción principal son dos porfirinas metaladas, unidas covalentemente por una de sus posiciones meso. Cada una de ellas estaba funcionalizada con una 3,4-piridindicarboximida (Figura 34, en azul turquesa), a través de su nitrógeno imídico y que, por tanto, dejan la piridina libre. Cada una de esas piridinas se coordina con el Zn^{II} de una porfirina de otro dímero, hasta que cinco bloques de construcción quedan encadenados formando un anillo pentagonal.[232]

[228] a) Ikeda, A.; Sonoda, K.; Shinkai, S. *Chem. Lett.* **2000**, *29*, 1120-1121. b) Kawaguchi, M.; Ikeda, A.; Shinkai, S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3725-3728.

[229] Felluga, F.; Tecilla, P.; Hillier, L.; Hunter, C. A.; Licini, G.; Scrimin, P. *Chem. Commun.* **2000**, 1087-1088.

[230] Mori, G.; Aratani, N.; Osuka, A. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7916-7925.

[231] Yang, W.; Wang, C.; Liu, K.; Liu, C.; Jiang, J. *New. J. Chem.* **2022**, *46*, 11782-11787.

[232] Kamada, T.; Aratani, N.; Ikeda, T.; Shibata, N.; Higuchi, Y.; Wakamiya, A.; Yamaguchi, S.; Kim, K. S.; Yoon, Z. S.; Kim, D.; Osuka, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7670-7678. CCDC: 281544.

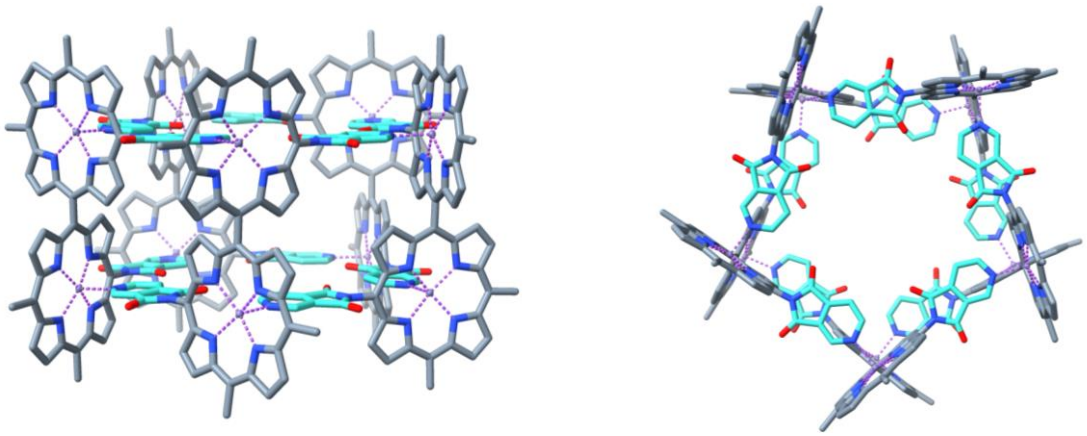


Figura 34. Vista frontal (izquierda) y superior (derecha) del anillo preparado por Osuka.[232]

Como se comentaba previamente, no son abundantes los ejemplos de cajas multipofirínicas que no recurren a herramientas supramoleculares para su construcción. Estas herramientas son, principalmente, la química de la coordinación y las plantillas moleculares. De la primera ya se ha comentado algún ejemplo con porfirinas en el apartado 3.5, aunque se enlazan aquí algunos de los últimos trabajos de esta área.[233]

En cuanto al uso de moléculas como plantilla molecular, los primeros ejemplos son de principios de los 2000 de la mano de Sanders y Konishi. Sanders utilizó un derivado de la triazina o una porfirina, ligandos tri y tetradentados terminados en piridinas, para conseguir unir hasta cuatro porfirinas en un ciclo, mediante puentes disulfuro.[218b] Konishi, por su parte, preparó un nanocluster de oro sobre el que ancló 16 unidades de piridina, que lo rodeaban tridimensionalmente. El tamaño y la capacidad de coordinación de este clúster fueron óptimos para envolverlo en seis porfirinas, que fueron unidas covalentemente empleando metátesis de alquenos.[234] En 2011, Anderson fue el primero en inducir la formación de un anillo de seis porfirinas usando un ligando hexapiridínico en forma de estrella, a través de un acoplamiento oxidativo de alquinos (Figura 35 centro).[235] Un poco más tarde, Li utilizó una estrategia similar, pero las porfirinas se unían entre ellas empleando metátesis de alquenos.[236] Tras estos primeros pasos, han sido los trabajos del profesor Anderson los que han supuesto un antes y un después en la preparación de anillos de porfirinas mediante el uso de moléculas que guían el proceso.[237] En su trayectoria se evidencia un diseño preciso de todos los sistemas desarrollados, de manera que los bloques de construcción hacen *match*, impulsando el proceso cooperativo. Con ligandos hexadentados aromáticos han preparado multitud de estructuras

[233] a) Iizuka, F.; Ube, H.; Sato, H.; Nakamura, T.; Shionoya, M. *Chem. Lett.* **2020**, *49*, 323–326. b) Percástegui, E. G.; Jancik, V. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *407*, 213165. c) Smith, P. T.; Kim, Y.; Benke, B. P.; Kim, K.; Chang, C. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 4902-4907. d) Mouarrawis, V.; Bobylev, E. O.; de Bruin, B.; Reek, J. N. H. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2021**, *2021*, 2890-2898. e) Mouarrawis, V.; Bobylev, E. O.; de Bruin, B.; Reek, J. N. H. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 8390-8397.

[234] Inomata, T.; Konishi, K. *Chem. Commun.* **2003**, 1282-1283.

[235] Sprafke, J. K.; Kondratuk, D. V.; Wykes, M.; Thompson, A. L.; Hoffmann, M.; Drevinskas, R.; Chen, W. H.; Yong, C. K.; Kärnbratt, J.; Bullock, J. E.; Malfois, M.; Wasielewski, M. R.; Albinsson, B.; Herz, L. M.; Zigmantas, D.; Beljonne, D.; Anderson, H. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17262-17273. CCDC: 860774.

[236] Zhu, B.; Chen, H.; Lin, W.; Ye, Y.; Wu, J.; Li, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15126-15129.

[237] Bols, P. S.; Anderson, H. L. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2083-2092.

donde el número de porfirinas que componen el macrociclo aumenta al incrementarse la longitud de los brazos de la plantilla molecular. De esta forma, han sido capaces de formar macrociclos constituidos por cinco porfirinas, el ejemplo más pequeño,[238] siete cuando emplearon un ligando de ciclodextrina,[239] y hasta doce cuando se alarga el ligando tipo estrella (Figura 35 parte superior).[240] Cuando se incorpora más de un ligando cooperando en el proceso, se pueden obtener estructuras ovaladas[241] o en forma de ocho (Figura 35 parte inferior derecha).[242] Con esta última estrategia han conseguido preparar su aducto más grande, formado por 24 porfirinas. Cuatro ligandos hexaporfirínicos guiaron la formación de una estructura con forma de doble ocho, con un ligando en cada cavidad. En presencia de DABCO, la estructura de doble ocho se desensambla liberándose de su estado de rigidez, quedando como dos macrociclos de 24 porfirinas cada uno, conectados por 24 moléculas de DABCO en un complejo tipo sándwich.[243] Recientemente, han preparado un ciclo con el mismo número de porfirinas, pero esta vez, a partir de una estructura lineal donde las porfirinas están directamente conectadas por sus posiciones meso, sin ningún espaciador. Finalmente, el cierre del ciclo se realizó mediante el acoplamiento C-C entre dos acetilenos.[244] Llevando este último trabajo al límite, han conseguido cerrar un macrociclo de 18 porfirinas sin recurrir al acoplamiento entre acetilenos, siendo todo enlaces directos porfirina-porfirina.[245] Para ello, prepararon un ligando lineal aromático, con tres porfirinas unidas linealmente en sus extremos, que recuerda a una mancuerna. El ligando contiene, además, un alquino en su parte central. La formación de la superestructura se basa en la trimerización de tres alquinos para formar un anillo de benceno, catalizada por cobalto. Como cada ligando tiene tres porfirinas en cada extremo y son tres ligandos los que se fusionan, la estructura final tiene 18 porfirinas en bloques de tres. Una última etapa de oxidación conecta todos los anillos porfirínicos entre sí.

Otra de sus estructuras más brillantes es el anillo concéntrico o estructura *matrioshka*, donde utilizan dos moléculas plantilla distintas. Mediante el empleo de un ligando hexadentado se obtuvo primero el macrociclo de seis porfirinas. Posteriormente se une, por la cara externa, otro ligando que presenta como motivos de coordinación un ácido carboxílico en un extremo, por el que se coordina en primer lugar, y dos imidazoles en el otro. Los imidazoles quedan libres para coordinarse, en una etapa posterior, con dos porfirinas. La estructura final está formada

[238] Liu, P.; Hisamune, Y.; Peeks, M. D.; Odell, B.; Gong, J. Q.; Herz, L. M.; Anderson, H. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8358-8362.
[239] Liu, P.; Neuhaus, P.; Kondratuk, D. V.; Balaban, T. S.; Anderson, H. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7770-7773.
[240] O'Sullivan, M. C.; Sprafke, J. K.; Kondratuk, D. V.; Rinfray, C.; Claridge, T. D. W.; Saywell, A.; Blunt, M. O.; O'Shea, J. N.; Beton, P. H.; Malfois, M.; Anderson, H. L. *Nature* **2011**, *469*, 72-75.
[241] Liu, S.; Kondratuk, D. V.; Rousseaux, S. A. L.; Gil-Ramírez, G.; O'Sullivan, M. C.; Cremers, J.; Claridge, T. D. W.; Anderson, H. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5355-5359.
[242] Kondratuk, D. V.; Sprafke, J. K.; O'Sullivan, M. C.; Perdigao, L. M. A.; Saywell, A.; Malfois, M.; O'Shea, J. N.; Beton, P. H.; Thompson, A. L.; Anderson, H. L. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 12826-12834.
[243] Kondratuk, D. V.; Perdigao, L. M. A.; O'Sullivan, M. C.; Svatek, S.; Smith, G.; O'Shea, J. N.; Beton, P. H.; Anderson, H. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6800-6803.
[244] Gotfredsen, H.; Deng, J. R.; Van Raden, J. M.; Righetto, M.; Hergenhahn, J.; Clarke, M.; Bellamy-Carter, A.; Hart, J.; O'Shea, J.; Claridge, T. D. W.; Duarte, F.; Saywell, A.; Herz, L. M.; Anderson, H. L. *Nat. Chem.* **2022**, *14*, 1436-1442.
[245] Majewski, M. A.; Stawski, W.; Van Raden, J. M.; Clarke, M.; Hart, J.; O'Shea, J. N.; Saywell, A.; Anderson, H. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202302114.

por un anillo de 12 porfirinas que contiene otro de 6 (Figura 35 parte inferior izquierda).[246] Los macrociclos preparados en este grupo exhiben propiedades electrónicas, tanto por la aromaticidad de las porfirinas como por la comunicación electrónica con las moléculas plantilla y, en el caso de la estructura *matrioshka*, la comunicación entre anillos. En algunas de sus publicaciones han discutido sobre la aromaticidad de estos sistemas, distinguiendo entre global y local,[247] así como de las propiedades eléctricas o magnéticas que de ello derivan.[248]

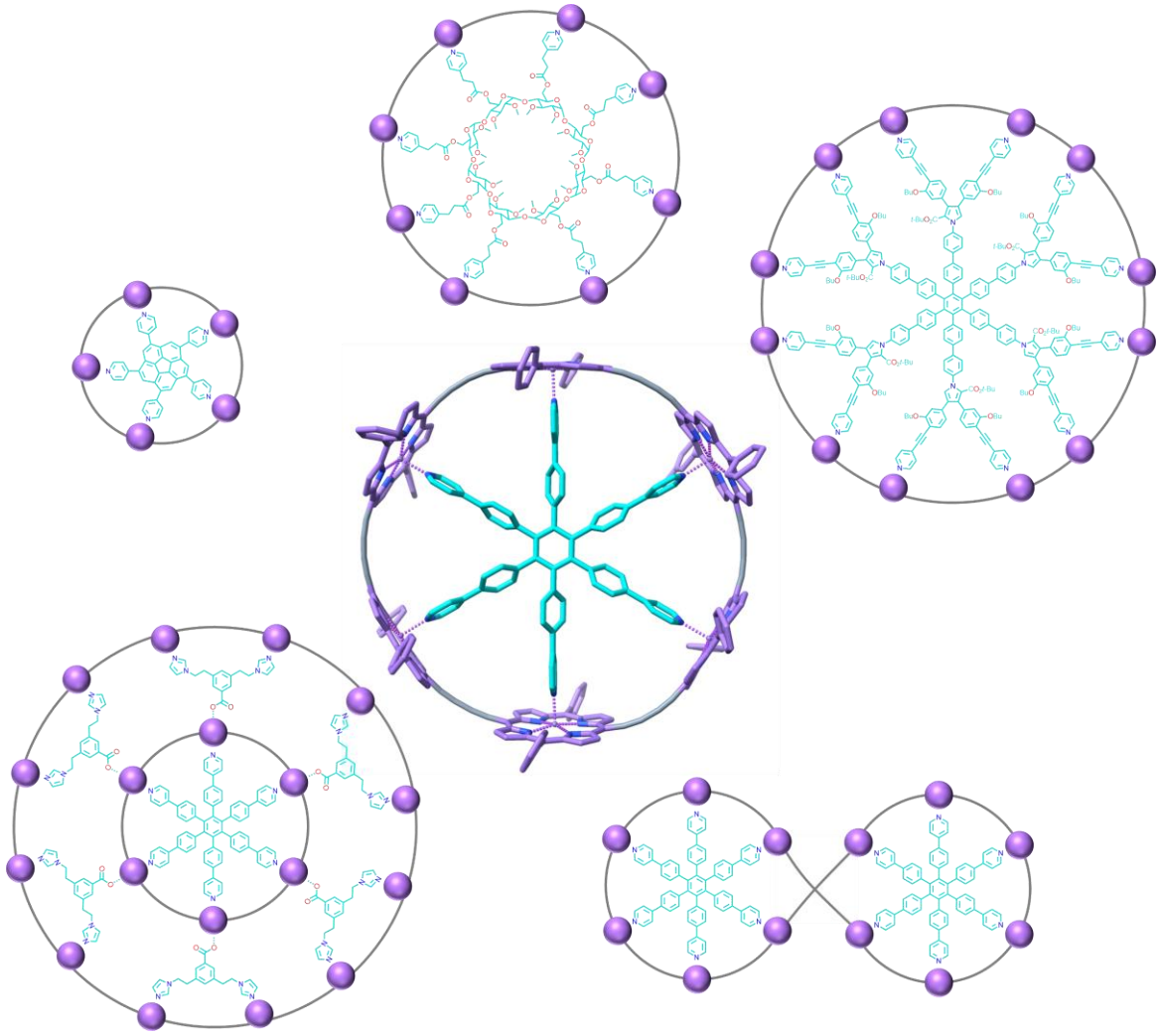


Figura 35. Macrociclos de porfirinas desarrollados por el profesor Anderson.[238-246]

[246] Rousseaux, S. A. L.; Gong, J. Q.; Haver, R.; Odell, B.; Claridge, T. D. W.; Herz, L. M.; Anderson, H. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 12713-12718.

[247] a) Casademont-Reig, I.; Guerrero-Avilés, R.; Ramos-Cordoba, E.; Torrent-Sucarrat, M.; Matito, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 24080-24088. b) Deng, J. R.; Bradley, D.; Jirásek, M.; Anderson, H. L.; Peeks, M. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, 61, e2022012. c) Bradley, D.; Jirásek, M.; Anderson, H. L.; Peeks, M. D. *Chem. Sci.* **2023**, *14*, 1762-1768. d) Merino, G.; Solà, M.; Fernández, I.; Foroutan-Nejad, C.; Lazzeretti, P.; Frenking, G.; Anderson, H. L.; Sundholm, D.; Cossío, F. P.; Petrukhina, M. A.; Wu, J.; Wu, J. I.; Restrepo, A. *Chem. Sci.* **2023**, 14, 5569-5576.

[248] a) Tejerina, L.; Rapidis, A. G.; Rickhaus, M.; Murto, P.; Genene, Z.; Wang, E.; Minotto, A.; Anderson, H. L.; Cacialli, F. *J. Mater. Chem. C Mater.* **2022**, *10*, 5929-5933. b) Bellamy-Carter, A.; Roche, C.; Anderson, H. L.; Saywell, A. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 20388. c) Mahmood, A.; Dimitrova, M.; Wirz, L. N.; Sundholm, D. *J. Phys. Chem. A* **2022**, *126*, 1936-1945.

4.5 Transformaciones en espacios confinados

Como se ha comentado al principio de esta introducción, el funcionamiento de las enzimas naturales ha sido fuente de inspiración para los químicos supramoleculares a la hora de desarrollar su trabajo.[249] Durante la trayectoria de esta rama de la química, se han diseñado diversas estructuras que intentan imitar el comportamiento de las enzimas teniendo en cuenta tres focos principales.[250] El primero de ellos es el atrapado del sustrato de la reacción. Para ello, lo primordial es que el tamaño y el ambiente de la cavidad sean idóneos para el huésped que se desea encapsular, acelerando así la primera etapa de la reacción, que es la formación del complejo *host-guest*. Cuando el huésped queda complejado, la concentración efectiva es mucho mayor a la que sería en un matraz, favoreciendo el choque de partículas y, por tanto, acelerando la velocidad de reacción. El catalizador (huésped) disminuye la energía de activación de la reacción ($\Delta G^{\ddagger}_{cat}$) comparado con el proceso en ausencia de este ($\Delta G^{\ddagger}$) (Figura 36A). Este punto, un cambio mínimo en los bloques de construcción del huésped puede ser de enorme trascendencia para acelerar o retardar esta etapa. Imaginemos, por ejemplo, que las paredes de la cavidad contienen grupos funcionales dadores o aceptores de enlace de hidrógeno que apuntan a su interior. Esta característica tendrá, muy probablemente, un impacto en el tipo de huésped que prefiere acomodarse en ese espacio. Si se reduce el número de estos grupos funcionales o se elimina, la tendencia a la encapsulación de ese huésped se verá empeorada, lo que se traducirá en un proceso más lento o inviable. Por otra parte, la presencia de componentes quirales en el huésped puede traducirse en transformaciones enantioselectivas.

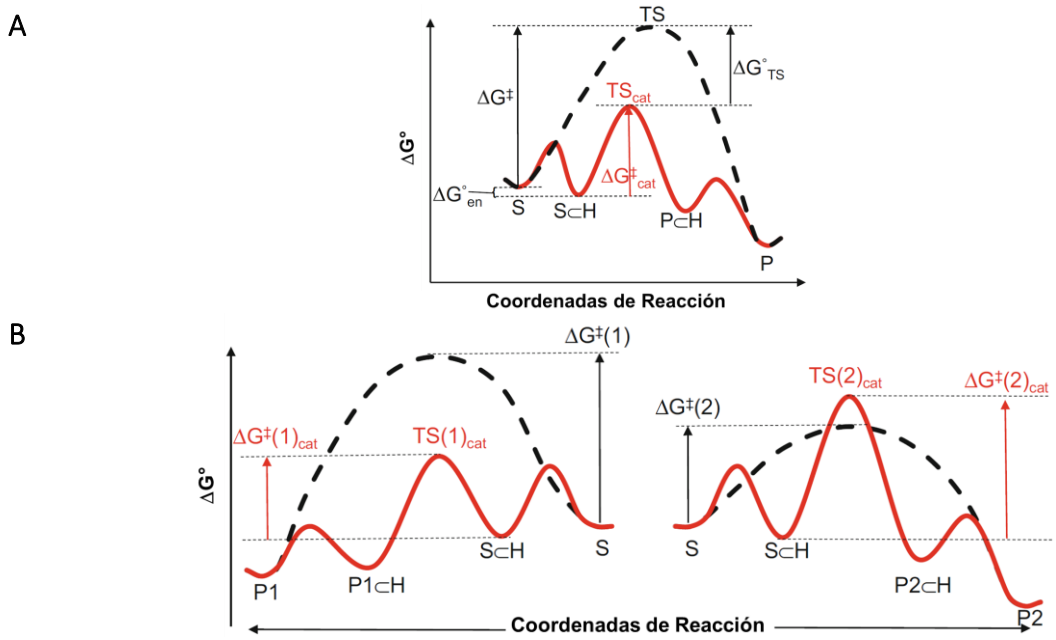


Figura 36. A) Diagrama energético típico de un ciclo catalítico; B) Selectividad en la obtención de producto debido al confinamiento. La presencia (derecha) o ausencia (izquierda) de la cápsula afecta a la formación de un estado de transición u otro. Imagen adaptada con permiso de la ref. 250. *Copyright ©2017 Springer Nature.*

[249] Raynal, M.; van Leeuwen, P. W. *Supramolecular Catalysis: New Directions and Developments*, Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2021**.

[250] Bolliger, J. L. *Self-Assembled Coordination Cages and Organic Capsules as Catalytic Supramolecular Reaction Vessels*. In *Effects of Nanoconfinement in Catalysis*; Poli, R., Ed.; Springer International Publishing: Cham, **2017**; pp 17-48.

El segundo punto clave es la estabilización del estado de transición en la segunda etapa, que es la que limita el transcurso de la reacción. El huésped debe unirse con mayor afinidad al estado de transición que al sustrato. Aquí se manifiesta el buen diseño racional de una enzima artificial, ya que las interacciones deben ser muy precisas en dirección, número y fortaleza para que la estabilización del estado de transición ocurra y se forme el producto. El tercer eje en el diseño de enzimas artificiales es la liberación del producto de la cavidad. Este suele ser el talón de Aquiles de las enzimas sintéticas, ya que, si el producto y el sustrato son químicamente similares en términos de polaridad, grupos funcionales o tamaño, es probable que el receptor también presente afinidad por esta molécula, ralentizando su liberación al medio. Esto se traduce en la no reciclabilidad del catalizador y, por tanto, un bajo número de ciclos catalíticos (*catalytic turnover*). Aquí se advierte, una vez más, la importancia de la especificidad del sitio de unión. Una estrategia empleada para forzar la salida del producto de la cavidad es someterlo a otra transformación para cerrar el ciclo catalítico y que el huésped quede libre para repetir el proceso.

Una peculiaridad de las transformaciones en cavidades supramoleculares es la posibilidad de obtener productos diferentes de los que resultarían de realizar el mismo tipo de reacción sobre el sustrato no confinado. En estos casos, el sustrato debe adoptar un plegamiento o conformación distintos al quedar atrapado en ese bolsillo, lo que, en conjunto con las nuevas interacciones que establecería con el huésped, pueden llevar a la estabilización de un estado de transición alternativo (Figura 36B). Diríamos que esta enzima artificial ofrece una nueva selectividad en la formación del producto.

En esta introducción se ha desglosado el conjunto de receptores supramoleculares descritos en bibliografía agrupándolos según el tipo de enlaces empleados en su construcción. Receptores preparados mediante enlaces covalentes cinéticamente estables, enlaces covalentes dinámicos, interacciones intermoleculares y mediante enlaces de coordinación. Estos cuatro grupos han sido estudiados en relación con su capacidad para actuar como enzimas artificiales. Por sus características químicas como el tipo de enlaces, los bloques de construcción utilizados, porosidad o polaridad de su cavidad, cada uno de estos grupos presenta ventajas e inconvenientes a la hora de ser empleado como catalizador.

En cuanto a los receptores formados a través de enlaces covalentes cinéticamente estables, los ejemplos de aplicaciones en catálisis son escasos, ya que sus cavidades son más propicias para la adsorción o de gases (Figura 6) o no permiten un atrapado tridimensional del sustrato al no ser cápsulas. Aun así, algunos ejemplos de transformaciones en el seno de calixarenos y calixpirroles se han descrito en el apartado 3.2 (Figuras 3 y 4, respectivamente).

4.5.1 Transformaciones en cápsulas autoensambladas mediante enlaces de hidrógeno.

La sensibilidad del enlace de hidrógeno a condiciones ácidas y básicas, así como los disolventes u otras moléculas ajenas al receptor que puedan competir por estos enlaces, hacen que las cápsulas ensambladas mediane enlaces de hidrógeno hayan sido poco estudiadas en cuanto a su actividad como catalizadores. Por otra parte, suelen presentar problemas a la hora de liberar el producto, lo que requiere cantidades estequiométricas de receptor y esto lo aleja del término estricto de catalizador.

Rebek utilizó tanto los ensamblados tipo *pelota de tenis* como las cápsulas cilíndricas para catalizar reacciones de cicloadición. En el caso de la pelota de tenis, se preparó un análogo estructural al primer diseño (Figura 12) que incorporaba un espaciador más largo entre los glucolurilos de cada monómero, con el objetivo de agrandar la cavidad (Figura 37).[251] Además, las interacciones que mantiene la estructura en forma de pelota están reforzadas con respecto al diseño original, formando 16 enlaces de hidrógeno en lugar de 8. Cuando se estudió el transcurso de reacciones Diels-Alder en su interior, se comprobó que, con *p*-benzoquinona y ciclohexadieno se obtenía el aducto, observándose una clara aceleración en el proceso. Sin embargo, no era liberado de la cavidad porque también era afín a ella (inhibición por el producto). Cuando un derivado metilado del dióxido de tiofeno se utilizó como dieno, se comprobó que el producto sí era liberado eficientemente de la cavidad ya que mantenía interacciones más débiles con esta de las que mantenía el material de partida (*p*-benzoquinona), que lo desplazaba al medio externo.[252] El producto se obtenía con un 75% de rendimiento tras cuatro días de reacción. Esta cinética lenta se relacionó con una mayor tendencia de la cavidad a contener dos moléculas de *p*-benzoquinona frente a una molécula de dióxido de tiofeno y otra de *p*-benzoquinona, siendo la entrada del dieno a la cavidad era un proceso lento, que limitaba la velocidad de la reacción.

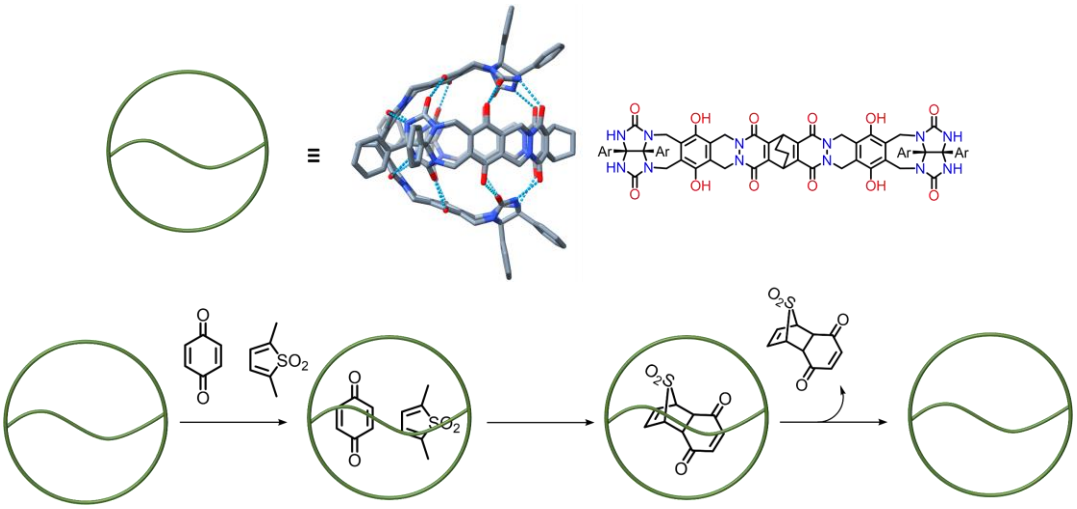


Figura 37. Cicloadición dentro de una estructura tipo *pelota de tenis*.[251,252]

El dímero cilíndrico basado en resorcin[4]areno se ha utilizado, principalmente, para estudiar la reactividad de pequeñas moléculas aromáticas, como la reacción entre ácidos carboxílicos e isonitrilos,[253] o la cicloadición 1,3-dipolar entre la fenilazida y el fenilacetileno (Figura 38).[254] En este último caso, la cavidad era capaz de albergar tanto dos moléculas de fenilazida, dos moléculas de fenilacetileno o una molécula de cada uno de ellos, desplazándose el equilibrio hacia esta última combinación. Además, la orientación relativa de ambas moléculas dentro de la cavidad llevaba a la formación exclusiva del 1,4-triazol en lugar de una mezcla de 1,4- y 1,5-triazoles, que se formaba en ausencia del receptor. Esta regioselectividad tiene su origen en la preferencia de ambos sustratos a exponer sus grupos polares (alquino y azida) en

[251] Kang, J.; Rebek, J. *Nature* **1997**, *385*, 50-52.
[252] Kang, J.; Santamaria, J.; Hilmersson, G.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7389-7390.
[253] Hou, J. L.; Ajami, D.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7810-7811.
[254] Chen, J.; Rebek, J. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 327-329.

la zona donde ambos calixarenos se conectan mediante enlaces de hidrógeno, quedando así estabilizados, mientras que los anillos aromáticos ocupan el fondo de cada uno de los cavitandos.[255] La inclusión de las dos moléculas dentro de la cavidad, además de dirigir la reacción regioselectivamente, también la aceleraba, al aumentar la concentración efectiva de los sustratos. Esto no pasó cuando se utilizaron azidas voluminosas, que no pudieron ser encapsuladas conjuntamente con el fenilacetileno. El principal inconveniente de este catalizador supramolecular es que no es capaz de liberar el producto, ya que las fuerzas que mantienen el dímero son más fuertes que las posibles repulsiones estéricas con el producto que provocarían la ruptura de dicho dímero para liberarlo. Las interacciones favorables de la encapsulación de otras dos nuevas moléculas de ambos sustratos tampoco son lo suficientemente fuertes como para que se produzca dicho intercambio.

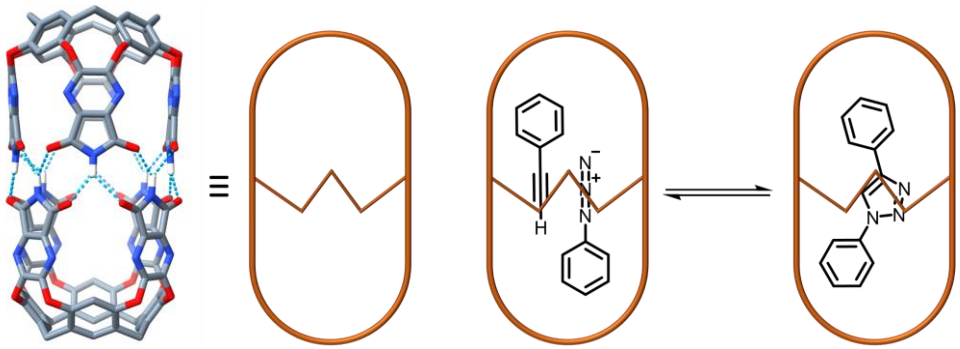


Figura 38. Cicloadición 1,3-dipolar dentro de la caja cilíndrica de Rebek.[254]

Una estructura ensamblada mediante enlaces de hidrógeno que sí ha sido ampliamente estudiada como catalizador, por numerosos investigadores y en diferentes tipos de reacciones, es el hexámero de Atwood (Figura 39).[256] Como se comentó anteriormente, este hexámero está formado por seis unidades de resorcin[4]areno, cuyas interacciones están mediadas por ocho moléculas de agua, que se colocan en los huecos entre estos, ocupando vértices de un cubo imaginario. De entre estas ocho moléculas de agua, cuatro de ellas se encuentran donando sus dos hidrógenos y acepando uno de un grupo OH- del calixareno. Las otras cuatro moléculas solo involucran uno de sus hidrógenos para ser donado, mientras que son aceptoras de dos. Esto quiere decir que en esta estructura hexamérica hay cuatro moléculas de agua que tienen aún un protón libre para establecer enlaces de hidrógeno adicionales. Esta peculiaridad ha es fundamental para la estabilización de ciertos sustratos o intermedios de reacción en el interior de la cápsula. Además, presenta una ventaja muy significativa respecto a las estructuras cilíndricas de Rebek, y es la presencia de seis "ventanas" (las cavidades de los resorcinarenos) por las que los sustratos pueden entrar y los productos salir sin que se produzca el desensamblado del hexámero. Además, su mayor volumen interno permite estudiar las trasformaciones en las que intervienen dos o más especies.

En algunos ejemplos, la cápsula no actúa propiamente como catalizador, si no como nanorreactor, esto es, no tiene un papel activo en el transcurso de la reacción, pero interviene

[255] Daver, H.; Harvey, J. N.; Rebek, J.; Himo, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15494-15503.

[256] a) Gaeta, C.; Talotta, C.; De Rosa, M.; La Manna, P.; Soriente, A.; Neri, P. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 4899-4913. b) Iuliano, V.; Della Sala, P.; Talotta, C.; De Rosa, M.; Soriente, A.; Gaeta, C.; Neri, P. *Curr. Opin. Colloid. Interface. Sci.* **2023**, *65*, 101692.

al permitir la entrada a unos sustratos y discriminar a otros. Este es el caso de la hidratación de alquinos estudiada por Reek.[257] Se observó que la encapsulación de un catalizador de oro, del cual ya se conocía su actividad en la hidratación de alquinos, llevaba a la obtención de productos no esperados. Mientras que en ausencia del hexámero se obtenía solamente el producto Markovnikov, cuando la reacción tenía lugar en el seno del receptor, se obtenían ambos, Markovnikov y anti Markovnikov, además de un producto de ciclación inusual. La entrada del catalizador al interior de la cavidad lo aísla del disolvente (benceno) y altera tanto su reactividad como su regioselectividad. Los estudios realizados con diversos sustratos permitieron relacionar el tamaño de estos con los rendimientos obtenidos. Los más largos daban lugar a bajas conversiones (Figura 39 superior izquierda, moléculas en verde y rojo) debido a que encajan peor en la cavidad del resorcinareno.[258] En la misma línea de modulación de la actividad del catalizador, Reek estudió más tarde cómo la presencia del hexámero desactivaba un catalizador de oro dinuclear.[259] En disolución, la especie dinuclear forma dos especies mononucleares que actúan ambas, a modo de activación dual, en el ciclo catalítico. La encapsulación del complejo mononuclear inhibe este modo de acción y desactiva el catalizador.[260] La presencia de un huésped que presente mayor afinidad por la cavidad que el complejo de oro, libera a este último, devolviéndole al modo funcional.

Como se ha mencionado unas líneas arriba, el hexámero tiene cuatro moléculas de agua con una valencia libre como dadoras de enlace de hidrógeno. Esta característica se utilizó en el grupo de Placido Neri para llevar a cabo bencilaciones de Friedel-Crafts.[261] La reacción entre el cloruro de bencilo y el *N*-metilpirrol no da lugar al producto en un medio de reacción convencional. La encapsulación de ambas especies en el seno del hexámero acelera la reacción debido al confinamiento, a la vez que activa el enlace C-Cl mediante enlaces de hidrógeno, para favorecer la salida de cloruro. Además, se forma el producto β-bencilado en lugar del α, que es el que se suele formar preferentemente. Los autores proponen un mecanismo en el que, debido a la encapsulación, la estabilización de un intermedio alternativo da lugar a este producto inesperado (Figura 39 inferior izquierda).

Además de los ejemplos donde la cavidad actúa como nanorreactor, también se ha estudiado su capacidad como catalizador, por ejemplo, en la formación de iminas por condensación de aldehídos y aminas primarias (Figura 39 inferior derecha). Se demostró que, usando sustratos aromáticos poco voluminosos, las moléculas de agua son las responsables de la formación preferente del producto cinético. Al mezclar dos aldehídos con una sola amina, en presencia del hexámero, uno de los aldehídos establece interacciones de enlace de hidrógeno más favorables que el otro. Por tanto, se acumula más en el interior de la cavidad y eso da lugar a que se acelere su condensación con la amina.[262]

[257] Cavarzan, A.; Scarso, A.; Sgarbossa, P.; Strukul, G.; Reek, J. N. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2848-2851.
[258] Cavarzan, A.; Reek, J. N. H.; Trentin, F.; Scarso, A.; Strukul, G. *Catal. Sci. Technol.* **2013**, *3*, 2898-2901.
[259] Jans, A. C. H.; Gómez-Suárez, A.; Nolan, S. P.; Reek, J. N. H. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 14836-14839.
[260] Adriaenssens, L.; Escribano-Cuesta, A.; Homs, A.; Echavarren, A. M.; Ballester, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1494-1500.
[261] La Manna, P.; Talotta, C.; Floresta, G.; De Rosa, M.; Soriente, A.; Rescifina, A.; Gaeta, C.; Neri, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5423-5428.
[262] Gambaro, S.; Talotta, C.; Della Sala, P.; Soriente, A.; De Rosa, M.; Gaeta, C.; Neri, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 14914-14923.

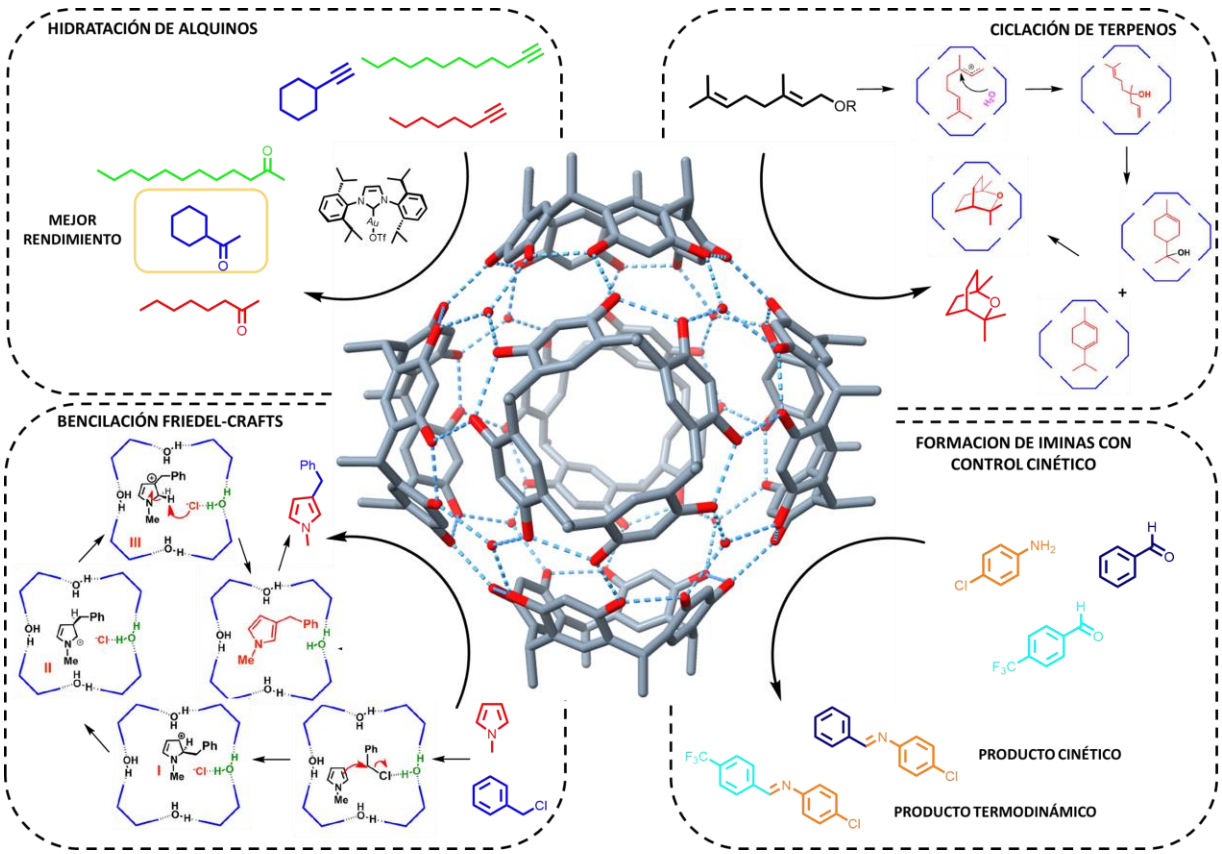


Figura 39. Transformaciones químicas en el interior del hexámero de Atwood.[258,261-263] Las imágenes que ilustran los mecanismos de la bencilación de Friedel-Crafts y ciclación de terpenos han sido adaptadas con permiso de ref. 256a. *Copyright © 2019 John Wiley and Sons.*

Un último punto respecto a la catálisis dentro del esta cavidad es su capacidad para actuar como ácido de Brønsted en la ciclación de terpenos (Figura 39 superior derecha)[263] y sesquiterpenos,[264] habiéndose comparado con la enzima ciclasa natural. La presencia de trazas de ácido activa al hexámero para actuar en la transferencia de un protón al sustrato, formándose un carbocatión alílico. Posteriormente, la cavidad aromática estabiliza al intermedio mediante interacciones catión-π. En estos procesos, se ha observado que el tamaño de la entrada a la cavidad, a través de los calixarenos, también controla estéricamente la formación de determinados productos.[264a]

4.5.2 Transformaciones en cápsulas preparadas mediante enlaces covalentes dinámicos.

Como se ha descrito en el apartado 3.3, el tipo de enlace covalente dinámico más utilizado en la síntesis de cápsulas es el enlace imina. Sin embargo, dada la labilidad del enlace imina, frecuentemente este tipo de cajas se suelen someter a reacciones de aminación reductora para

[263] a) Zhang, Q.; Tiefenbacher, K. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 197-202. b) Zhang, Q.; Catti, L.; Pleiss, J.; Tiefenbacher, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11482-11492.

[264] a) Zhang, Q.; Rinkel, J.; Goldfuss, B.; Dickschat, J. S.; Tiefenbacher, K. *Nat. Catal.* **2018**, 609-615. b) Zhang, Q.; Tiefenbacher, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 12688-12695. c) Syntrivanis, L. D.; Némethová, I.; Schmid, D.; Levi, S.; Prescimone, A.; Bissegger, F.; Major, D. T.; Tiefenbacher, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 5894-5900.

incrementar su estabilidad. Esta conversión, además de transformarlas en modelos cinéticamente estables, también aportan una mayor robustez y protones amina que pueden estabilizar determinados sustratos o intermedios de reacción mediante enlaces de hidrógeno.

Aun así, hay algunos ejemplos donde sí se conservan las uniones imina, sobre todo cuando son objetivo de transformaciones con condiciones muy suaves o fotocatalíticas. Este último es el caso de la caja preparada por Zhang y colaboradores, generada por condensación [2 + 4] de un tetraaldehído derivado del tetrafenileteno y una perilendiimida enantiopura.[265] La cápsula es fluorescente ya que sus dos bloques de construcción son cromóforos. Además, la riqueza electrónica y la planaridad de sus componentes hace que las interacciones π-π sean el principal motor de estabilización de huéspedes. Por ello y por su marcada absorción en la zona del visible, se probó su capacidad para fotocatalizar reagrupamientos de Smiles de ácidos 2-ariloxibenzoicos libre de metales, llegando a obtener conversiones del 93%. Los sustituyentes en el anillo fueron estudiados para optimizar las interacciones electrostáticas con el huésped, que, según sus estudios mecanísticos (Figura 40A), eran determinantes para la estabilización del intermedio de reacción radicalario.

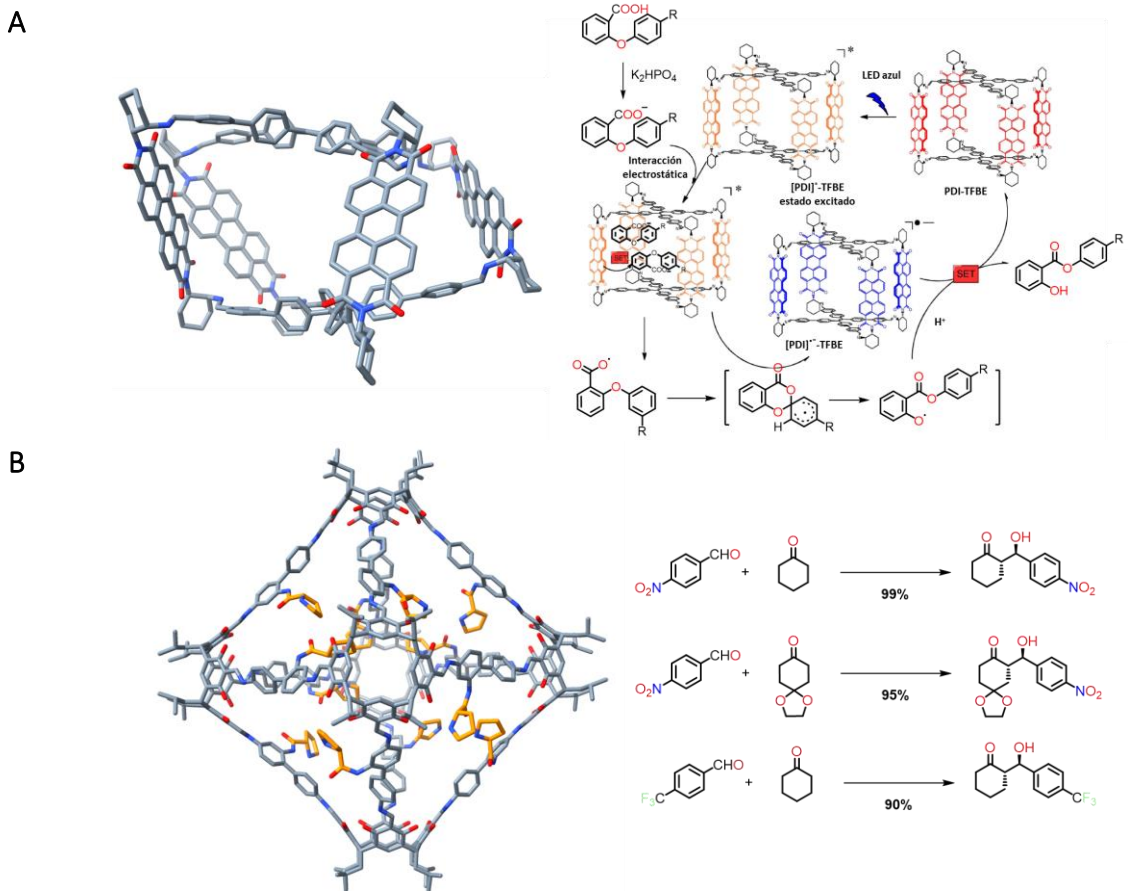


Figura 40. Transformaciones dentro de cápsulas formadas por enlaces imina.[265,266] Para la Figura 40A, la imagen ha sido adaptada con permiso de la ref. 265. *Copyright © 2019 John Wiley and Sons.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[265] Feng, X.; Liao, P.; Jiang, J.; Shi, J.; Ke, Z.; Zhang, J. *ChemPhotoChem* **2019**, *3*, 1014-1019.

Otro ejemplo es la estructura recientemente preparada por Yuan y colaboradores,[266] donde utilizaron un tetraformil-resorcin[4]areno y un derivado de la prolina para obtener dos aductos diferentes, el tetramérico [4 + 8] y el hexamérico [6 + 12]. Como resultado de esta condensación, numerosas prolinas con actividad organocatalítica quedan ubicadas en lumen de la caja (Figura 40B, en naranja). Gracias a ello, la cavidad catalizaba condensaciones aldólicas asimétricas, específicamente, entre la ciclohexanona y el *p*-nitrobenzaldehído, obteniendo una conversión del 99% hacia el producto enantiopuro (92% ee)

Las cajas imina sometidas a reducción para obtener los derivados amina soportan condiciones algo más severas, en cuanto a presión y temperatura, así como la presencia de ácidos, bases o nucleófilos, que pueden provocar la disociación de las cajas preparadas mediante enlaces imina. Wang y colaboradores sintetizaron una caja de simetría terciaria que presenta en su base tres grupos hidroxilo que pueden formar enlaces de hidrógeno con el sustrato. Tras reducir las iminas, los autores decidieron metilar los grupos amina para modular la flexibilidad de la estructura resultante. El estudio catalítico se evaluó empleando una reacción de alquilación de Friedel-Crafts entre el 1-metilindol y el *trans*-β-nitroestireno (Figura 41A).[97] El mejor rendimiento se obtuvo empleando DCM como disolvente, lo que sugiere que la eficiencia de los enlaces de hidrógeno entre el huésped y el receptor, favorecidos en disolventes apróticos, era uno de los factores determinantes en la formación del producto. Cuando estudiaron la reacción utilizando nitroestirenos voluminosos, los rendimientos se redujeron de manera drástica, lo que señala la selectividad inducida por la cavidad.

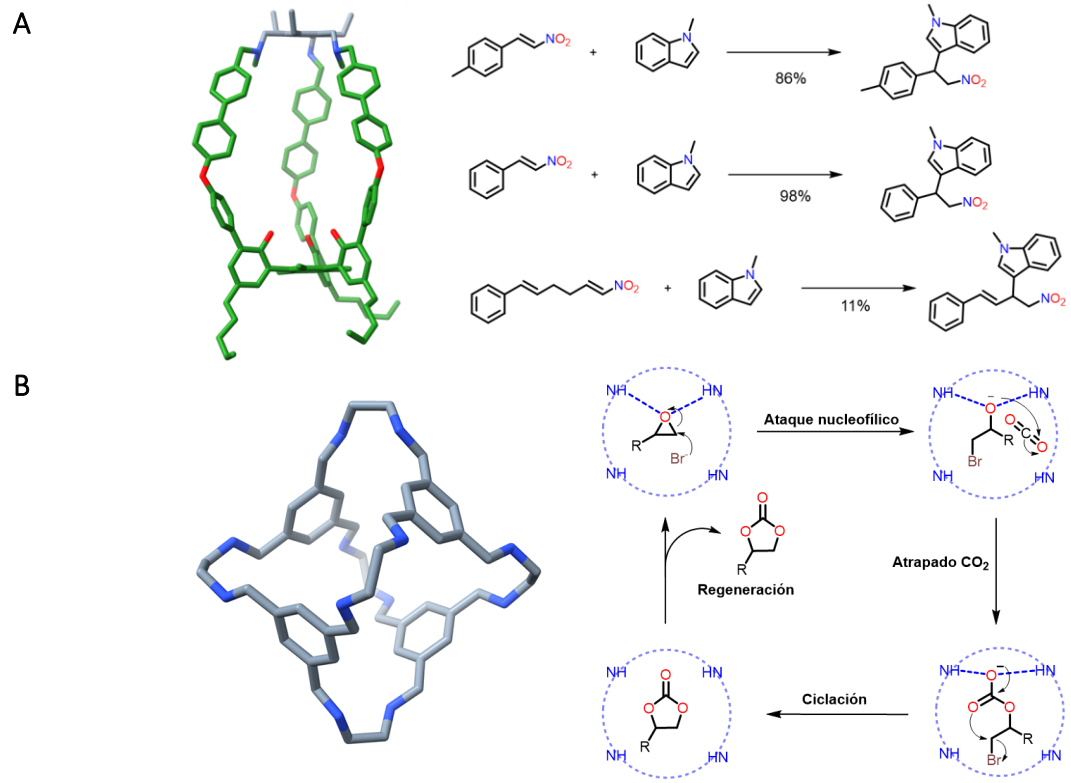


Figura 41. Transformaciones dentro de cápsulas ensambladas mediante enlace amina.[266,97]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[266] Xu, N.; Su, K.; El-Sayed, E. S. M.; Ju, Z.; Yuan, D. *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 3582-3588.

Utilizando la misma estrategia de reducir las cápsulas con uniones imina, Petra y colaboradores han empleado una caja porosa en reacciones de cicloadición de CO_2 en estado sólido.[267] Se conocía que esta caja era apropiada para el atrapado de CO_2 (3.9 wt%) y que los protones NH de sus paredes intervenían en este proceso, formando enlaces de hidrógeno con el oxígeno del epóxido. Gracias a esto, el óxido de propileno se transformaba en el carbonato de propileno cíclico. En condiciones de 2.5 atmósferas de presión y con TBABr como cocatalizador, dicho producto se obtenía en un 52% de rendimiento. Cuando usaron la cápsula imina como catalizador, el rendimiento se vio reducido al 18%. En el mecanismo propuesto por los investigadores (Figura 41B), el epóxido es activado mediante enlaces de hidrógeno con los NHs del huésped, que ayudan, a su vez, a estabilizar el intermedio oxoaniónico que se forma tras el ataque nucleofílico del bromuro.

Estos tipos de cajas covalentes que han sufrido la aminación reductora se han empleado también en catálisis, pero desde una perspectiva diferente, ya que no participan activamente en la transformación que tiene lugar. Son simplemente el seno que alberga un conjunto de nanopartículas de oro, plata o paladio en su interior, que son las que actúan de catalizador. Por tanto, el papel de la caja es de soporte para el crecimiento y estabilización de estas nanopartículas con determinado tamaño y forma, además de su solubilización. La presencia de grupos como aminas, tioles o tioéteres, favorece la nucleación, que es la primera etapa de la formación del aglomerado. Las sales metálicas empleadas ($HAuCl_4$, $AuCl_3$, $Pd(OAc)_2$ o AgOTf, entre otros) se reducen, en una última etapa, con $NaBH_4$ normalmente, para obtener las nanopartículas metálicas en su estado de oxidación M^0.

Siguiendo esta aproximación Mukherjee y colaboradores han estudiado la actividad como fotocatalizador heterogéneo de nanopartículas de oro dentro de una caja preparada por enlaces covalentes dinámicos.[268] La condensación de un trialdehído derivado de la fenotiazina con una diamina quiral, el (*S*,*S*)-1,2-diaminociclohexano, dio como resultado una caja prismática triangular que, posteriormente, se sometió a una etapa de reducción. La presencia de los tioéteres determina que presente varios sitios de nucleación. Una vez formadas las nanopartículas, usando $AuCl_3$ como fuente de oro, se estudió su capacidad para la conversión de compuestos nitroarenos en azoderivados (Figura 42A). Para ello emplearon medio básico y luz ultravioleta, registrando rendimientos de hasta el 99%. Además, este catalizador evita la formación de productos secundarios, así como el empleo de condiciones de presión y temperatura elevadas. En otro caso, haciendo crecer nanopartículas de paladio dentro de una cavidad tubular, Jiang y colaboradores estudiaron la conversión del ácido 4-nitrofenilborónico en 4-nitrofenol (Figura 42B).[269] La caja se sometió también a una etapa de reducción previa a la formación de nanopartículas de Pd^0. Una vez más, tanto los protones de las aminas secundarias como los tiazoles cooperaban en la nucleación. La presencia de tres benzotiazoles confiere actividad fotocrómica a la cápsula, que mediante la irradiación de luz LED azul convirtió el ácido 4-nitrofenilborónico en 4-nitrofenol a través de oxidación aeróbica. Tras una etapa posterior de reducción, se formó la 4-hidroxianilina con un 95% de rendimiento. Cuando la

[267] Hussain, MD. W.; Giri, A.; Patra, A. *Sustain. Energy Fuels* **2019**, *3*, 2567-2571. CCDC: 707056
[268] Mondal, B.; Mukherjee, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 12592-12601.
[269] Sun, N.; Wang, C.; Wang, H.; Yang, L.; Jin, P.; Zhang, W.; Jiang, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 18011-18016. CCDC: 1935950.

reacción se probó usando solo la caja, sin nanopartículas, como catalizador, solo se obtuvieron trazas de producto.

En algunos casos, tras el proceso de formación de nanopartículas en presencia de estas cajas orgánicas, se ha observado que no es la cavidad la que actúa de soporte, si no que varias unidades del receptor se agrupan rodeando a las nanopartículas. De esta manera, exponen sus puntos de nucleación (principalmente las aminas secundarias) en contacto con las partículas metálicas. El resultado es que el agregado de nanopartículas y caja tiene una mayor superficie, que favorece la actividad catalítica.[270]

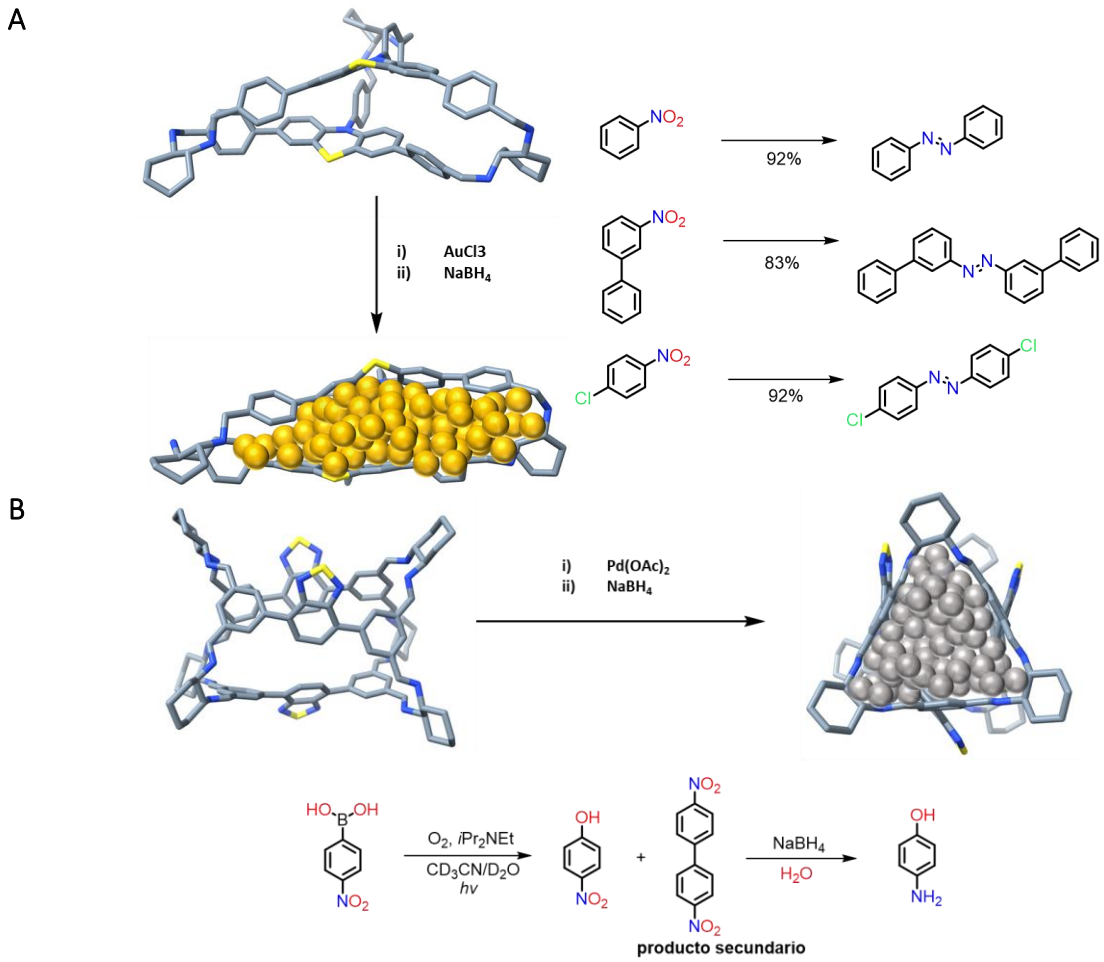


Figura 42. Cajas preparadas mediante la formación de enlaces imina, que tras aminación reductora sirven como soporte para la formación de nanopartículas y presentan actividad catalítica.[268,269]

[270] a) Zhang, Y.; Xiong, Y.; Ge, J.; Lin, R.; Chen, C.; Peng, Q.; Wang, D.; Li, Y. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 2796-2799. b) Bhandari, P.; Mondal, B.; Howlader, P.; Mukherjee, P. S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2022**, *2022*, e202100986.

4.5.3 Transformaciones en cajas de coordinación

Las cajas de coordinación son los tipos de receptores supramoleculares que más se han estudiado como catalizadores. Entre sus ventajas se encuentra su rápida y eficiente preparación y la presencia de cationes metálicos que cambian las propiedades electrónicas del sistema. Como se discutió en el apartado 3.5, la síntesis se basa en la coordinación, en una sola etapa, de todos los bloques de construcción, dando como resultado el producto termodinámico. De modo que, aunque en algunas ocasiones los propios bloques de construcción entrañen mayor complejidad sintética, los buenos rendimientos en la preparación de estas cajas y la facilidad para cambiar los ligandos o el metal si fuese necesario, favorecen el empleo de cajas de coordinación como espacios donde estudiar las trasformaciones confinadas. Además, existe una variedad amplísima de ligandos y fuentes metálicas entre los que elegir, dependiendo de la geometría que se quiera obtener, el carácter químico de la cavidad que se considere idóneo para albergar el sustrato de interés o del tamaño de los orificios de entrada que permitirán la incorporación de dicho sustrato. Sin embargo, estas estructuras también presentan sus inconvenientes, que limitan el rango de reacciones químicas que se estudian dentro de ellas. Suele ser necesario evitar ácidos y bases, ya que pueden degradar fácilmente el enlace L→M, así como algunos nucleófilos o cocatalizadores. Tampoco toleran bien las condiciones elevadas de presión y/o temperatura. Otro de los inconvenientes que se presenta, al igual que con otras cápsulas supramoleculares, es la dificultad para liberar el producto una vez formado, habiéndose desarrollado algunas excepciones.

La caja octaédrica de Fujita y algunas de sus variaciones se han estudiado con éxito en reacciones de fotodimerización, fotoadición y Diels-Alder, entre otras.[271] En estas transformaciones hay varios factores que juegan a favor de la formación del producto dentro de la caja. Por una parte, el bolsillo hidrofóbico favorece la internalización de los sustratos, además de las interacciones de transferencia de carga en algunos casos. Luego, las dimensiones de la cavidad obligan a los sustratos a colocarse con una determinada orientación para minimizar los contactos desfavorables con las paredes de la caja, lo que, en algunos casos, resulta en la formación de productos inesperados o de diferente regioselectividad. Por otro lado, la caja protege a algunos productos de reacción de ser oxidados en el medio externo. El octaedro preparado en 1995[140] se estudió inicialmente en la fotoadición de pireno con *N*-ciclohexilmaleimida. Los arenos como el pireno, el fenantreno o perileno, entre otros, no son altamente reactivos frente a estas transformaciones. Precisamente, un elemento muy característico de estas cajas de Fujita es el de inducir en estas moléculas, transformaciones que en un matraz de reacción son entálpicamente desfavorables debido a la pérdida de aromaticidad. El carácter hidrofóbico de la caja secuestra, en primer lugar, al pireno del medio acuoso.[272] Según los cálculos computaciones de los autores, la organización relativa de ambos sustratos dentro de la caja está gobernada por el sustituyente de la maleimida. La ciclohexilamina es bastante voluminosa, por lo que el doble enlace de la maleimida se dispone próximo a los carbonos C_4-C_5 del pireno, quedando la ciclohexilamina en dirección contraria (Figura 43A). Esta orientación es la adecuada para dar lugar al producto de fotoadición [2+2]. Si este sustituyente voluminoso se intercambia por otro menos demandante estéricamente, la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[271] Saha, R.; Mondal, B.; Mukherjee, P. S. *Chem. Rev.* 2022, *122*, 12244-12307.
[272] Nishioka, Y.; Yamaguchi, T.; Yoshizawa, M.; Fujita, M. *J. Am. Chem. Soc*. 2007, *129*, 7000-7001.

reacción no tiene lugar porque ya no existe la restricción de movimiento que obligaba a ambos sustratos a colocarse en esa orientación relativa.

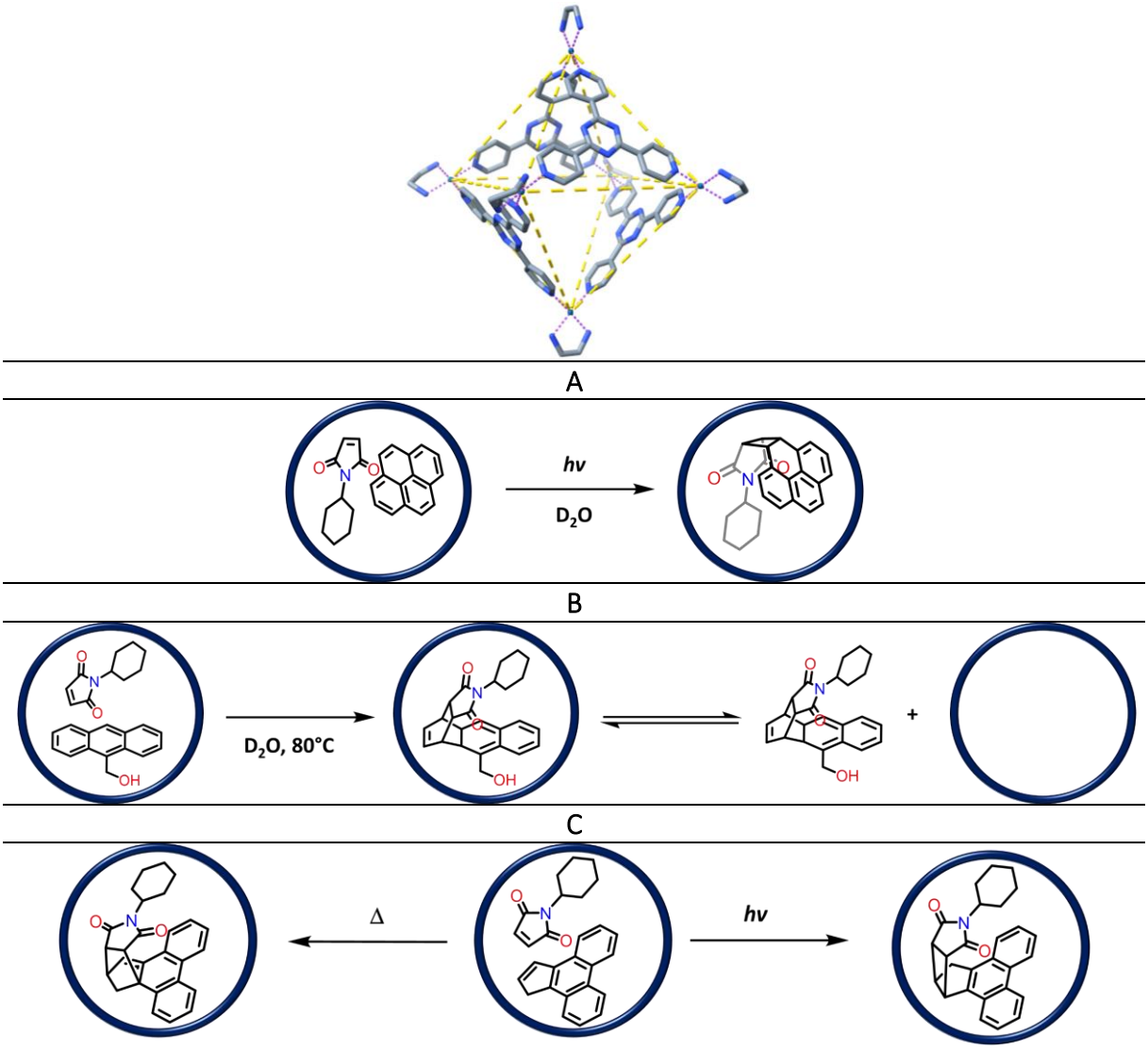


Figura 43. Cicloadiciones en el octaedro de Fujita.[272-276]

Sin duda, la cicloadición Diels-Alder es la más estudiada dentro del octaedro. Cuando la *N*-ciclohexilmaleimida y un naftaleno sustituido se calentaron a 100 °C durante 8 h en presencia de esta caja, se formó estereoselectivamente el aducto *syn*. Además, la reacción ocurre sobre el anillo no sustituido del naftaleno, siendo también regioselectiva ya que, debido al confinamiento, los sustratos se disponen para formar el intermedio *exo*.[273] Tras el naftaleno, se estudiaron el perileno y trifenileno, también inertes frente a la reacción de Diels-Alder, pero que dentro del octaedro dieron lugar al producto *syn*.[274] El caso del 9-hidroximetilantraceno es especialmente particular. La cicloadición no tiene lugar sobre el anillo aromático central del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[273] Murase, T.; Horiuchi, S.; Fujita, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2866-2867.
[274] Horiuchi, S.; Murase, T.; Fujita, M. *Chem. Asian. J.* **2011**, *6*, 1839-1847.

antraceno, ya que la demanda estérica de la *N*-ciclohexilmaleimida no le permite colocarse correctamente para dar el producto de adición sobre los carbonos C_9-C_{10}, sino sobre C_1-C_4 (Figura 43B). Además, es uno de los pocos ejemplos donde el aducto es liberado de la cavidad en favor de la encapsulación de los sustratos de partida.[275] En otro estudio posterior demostraron que los mismos sustratos encapsulados, pueden dar lugar al fotoaducto [2 + 2] o al aducto Diels-Alder [2 + 4] según se controle la reacción de manera fotoquímica o térmica, respectivamente (Figura 43C).[276] En una aproximación muy diferente, Lusby y colaboradores han conseguido también llevar a cabo reacciones de Diels-Alder en el interior de una caja Pd_2L_4 (Figura 44).[277] En este caso, la caja encapsula quinona mediante la formación de enlaces de hidrógeno con los protones *orto* de la piridina, quedando la quinona activada para la cicloadición con el dieno. Este último no se encuentra encapsulado, si no que se aproxima por fuera y el cicloaducto formado es posteriormente liberado.

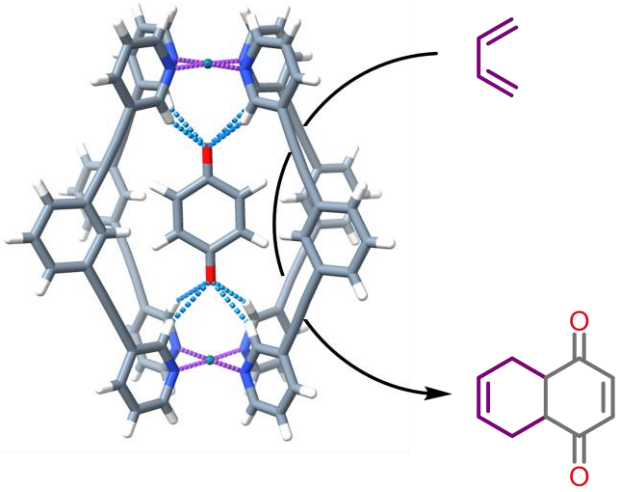


Figura 44. Cicloadición por estabilización del sustrato mediante enlace de hidrógeno CH···O en una caja Pd_2L_4.[277]

En la caja octaédrica también se han estudiado otras transformaciones como la hidratación de alquinos,[278] la foto-oxidación de hidrotriquinaceno[279] o la condensación de Knoevenagel,[280] esta última al sustituir las paredes de piridiltriazina por imidazoiltriazina. Otros trabajos han estudiado cómo algunas moléculas se acomodan de una manera excepcional en la cavidad,[281] tratando de maximizar las interacciones favorables y eso las lleva a presentar una reactividad inusual. Así se vio que los diterpenoides adoptaban forma de U dentro de estos receptores y eso exponía al doble enlace C=C no terminal a ser atacado por electrófilos, aun habiendo un doble enlace terminal en la molécula, pero que quedaba protegido al orientarse hacia el interior de la cavidad (Figura 45A).[282] En la misma línea de adaptación a la cavidad, cuando se estudió la encapsulación de arilamidas secundarias, se comprobó que la caja es capaz de albergar dos

[275] Yoshizawa, M.; Tamura, M.; Fujita, M. *Science* **2006**, *312*, 251-254.
[276] Horiuchi, S.; Nishioka, Y.; Murase, T.; Fujita, M. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3460-3462.
[277] Martí-Centelles, V.; Lawrence, A. L.; Lusby, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2862-2868. CCDC: 1492902.
[278] Murase, T.; Takezawa, H.; Fujita, M. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10960-10962.
[279] Murase, T.; Nishijima, Y.; Fujita, M. *Chem. Asian. J.* **2012**, *7*, 826-829.
[280] Murase, T.; Nishijima, Y.; Fujita, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 162-164.
[281] Takezawa, H.; Fujita, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **2021**, *94*, 2351-2369.
[282] Takezawa, H.; Kanda, T.; Nanjo, H.; Fujita, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 5112-5115. CCDC: 1885685.

unidades (Figura 45B). Se determinó que la conformación de ambas moléculas encapsuladas dependía de la maximización de las interacciones π-π entre las arilamidas y las paredes de la caja.[283] Por tanto, unas parejas quedaban ambas en *cis*, otras ambas en *trans*, y otras eran mezcladas.

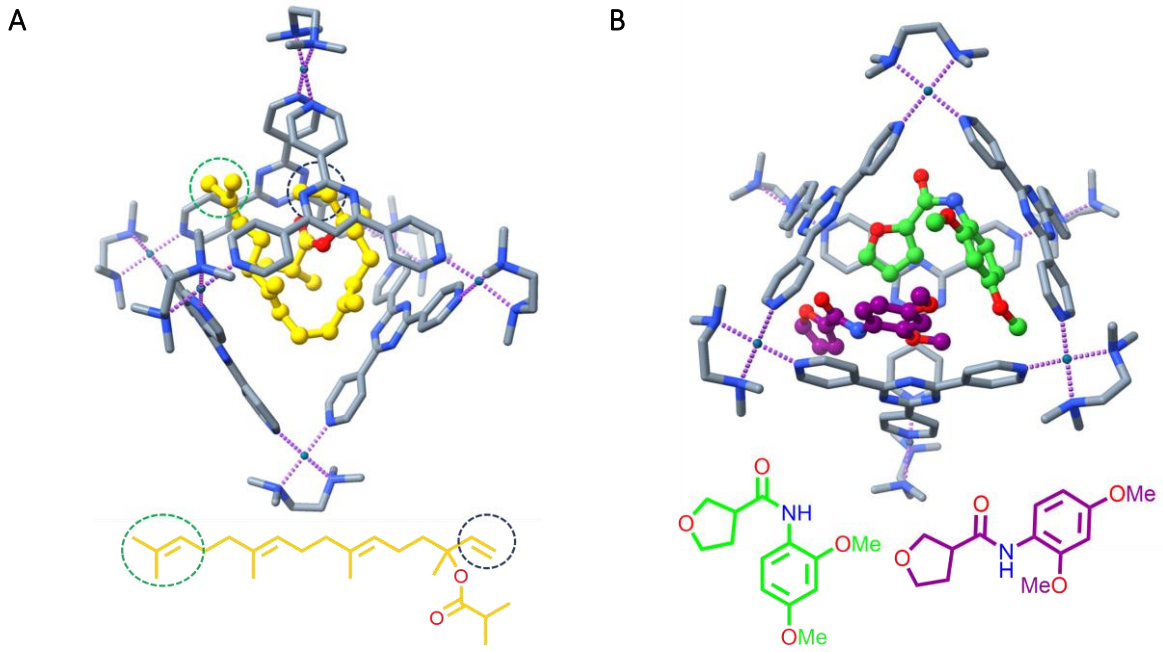


Figura 45. Acomodamiento de A) diterpenoides[282] y B) arilamidas[283] a la cavidad del octaedro de Fujita. Al organizarse para maximizar las interacciones hidrofóbicass con las paredes de la caja, cambia su reactividad ya que exponen o esconder sus grupos reactivos.

Además de las cajas octaédricas, otras cajas con diferentes geometrías también han sido objeto de estudio en catálisis, teniendo muy presente que estos cambios están ligados a un volumen interno diferente que repercute en el tamaño de los sustratos que la cavidad puede albergar. Este es el caso de los ejemplos derivados tetraédricos, cuyos sustratos suelen ser moléculas más pequeñas. Otra gran diferencia con respecto al octaedro de Fujita es la carga de la caja, determinante en la preferencia por acomodar unos huéspedes u otros. Las cajas octaédricas mencionadas anteriormente son catiónicas, al igual que los tetraedros formados por la coordinación del metal con iminopiridinas, sin embargo, los tetraedros como los de Raymond (Figura 18C) son aniónicos. Es por ello que la caja de Raymond se ha utilizado para catalizar reacciones que ocurren mediante la formación de intermedios catiónicos, como, por ejemplo, la ciclación de Nazarov. Se comprobó que la carga total de -12 de la caja estabilizaba el carbocatión alílico intermedio formado previamente a la electrociclación.[284] Para solventar el problema de la inhibición del producto, los autores sometieron al producto resultante a una etapa posterior de cicloadición Diels-Alder (Figura 46A). El producto formado es estéricamente incompatible con la cavidad, por lo que es liberado. Cuando se intercambió Ga^{III} por Si^{IV},

[283] Takezawa, H.; Shitozawa, K.; Fujita, M. *Nat. Chem.* **2020**, *12*, 574-578. CCDC: 1949149.
[284] a) Hastings, C. J.; Pluth, M. D.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6938-6940. b) Hastings, C. J.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3966-3973.

reduciendo la carga total de -12 a -8, y como consecuencia, la velocidad de reacción aumentaba 680 veces. Los autores atribuyen este cambio a una mejor estabilización de ese intermedio carbocatiónico.[285]

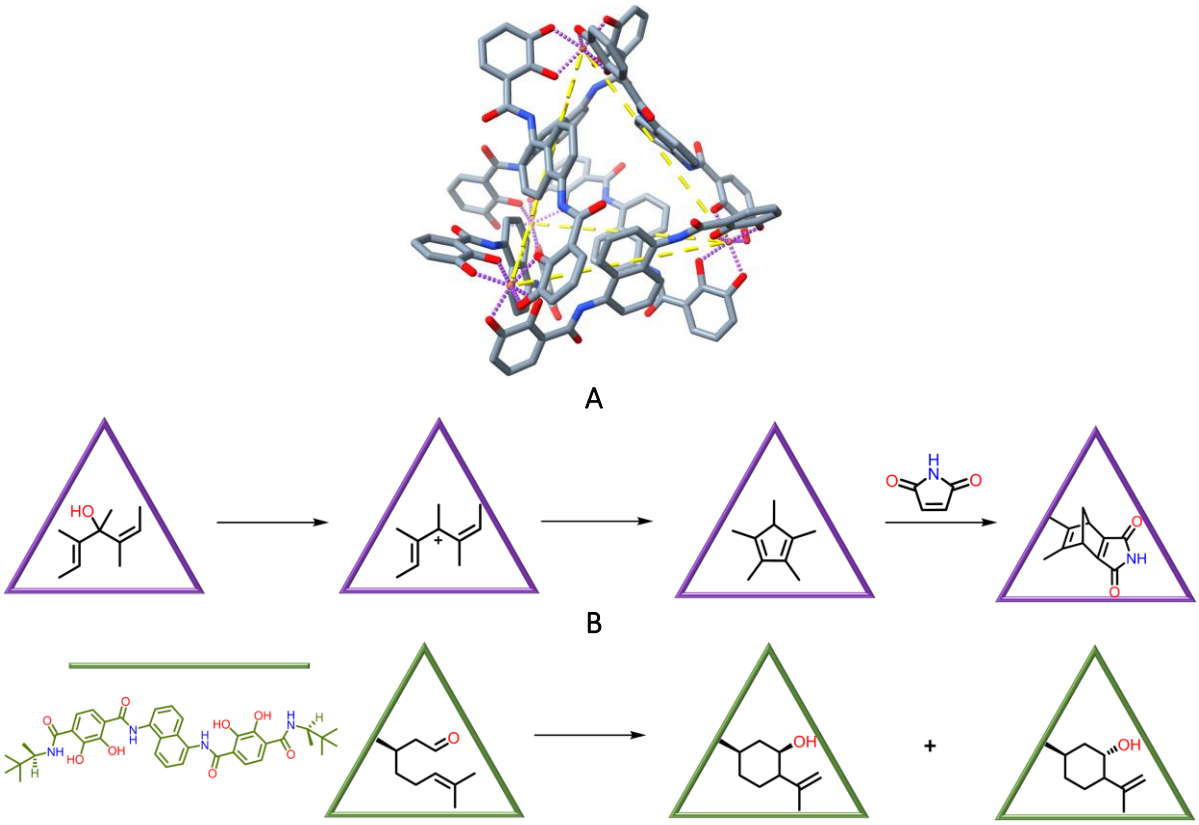


Figura 46. Ciclación de A) Nazarov[284] y B) Prins en la cavidad del tetraedro de Raymond.[287]

En la formación del producto de ciclación de Prins dentro la cavidad de la caja de Raymond se advirtió que como consecuencia del confinamiento, el sustrato adoptaba una conformación que impedía la formación de los subproductos, de deshidratación o dimerización, que aparecen al intentarlo en ausencia de la caja.[286] Además, la posibilidad de preparar la caja enantiopura (Figura 46B), mediante el uso de ligandos de una quiralidad específica, ofrece altas diastereo- y enantioselectividades.[287,288] Haciendo uso de las ventajas que ofrece la modificación de los ligandos para inducir la estabilización de ciertos sustratos, Hooley y colaboradores prepararon una caja que orienta 12 ácidos carboxílicos libres hacia su interior, y estudiaron su capacidad para catalizar la desprotección de acetales.[289] La presencia de todos estos grupos aumentaba

[285] Hong, C. M.; Morimoto, M.; Kapustin, E. A.; Alzakhem, N.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N.; Toste, F. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 6591-6595.
[286] Hart-Cooper, W. M.; Clary, K. N.; Toste, F. D.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17873-17876.
[287] Zhao, C.; Sun, Q. F.; Hart-Cooper, W. M.; Dipasquale, A. G.; Toste, F. D.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18802-18805.
[288] Miyamura, H.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N.; Toste, F. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 19327-19338.
[289] Holloway, L. R.; Bogie, P. M.; Lyon, Y.; Ngai, C.; Miller, T. F.; Julian, R. R.; Hooley, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 8078-8081.

la velocidad de la reacción por mil en comparación con el proceso modelo, en el que se empleaba solamente el ligando, que únicamente contiene dos ácidos carboxílicos.

Además de actuar como catalizadores, las cajas de coordinación también pueden actuar como nanorreactores. En estos trabajos se encapsula al catalizador, aumentando así su actividad, no solo por el espacio reducido del contenedor, sino porque se previene su degradación. Así se aumenta el número de ciclos catalíticos que puede llevar a cabo una misma molécula de catalizador. Un ejemplo significativo en este sentido es el complejo organometálico de rutenio encapsulado dentro de la caja de Raymond, que soporta hasta mil ciclos de isomerización de alcoholes alílicos sin degradarse.[290] Esta idea se puede aplicar a distintos tipos de catalizadores para realizar una variedad de transformaciones como adiciones oxidativas,[291] hidrogenaciones[292] o hidroformilaciones,[293] entre otras.

La relación entre la caja y este catalizador protegido también puede ser simbiótica. Esto es, la caja no solo realiza un papel pasivo albergando al catalizador, sino que puede estar implicada en la esfera de coordinación de este, interviniendo así activamente en su capacidad para transformar un sustrato en otro. Un ejemplo que ilustra este concepto es el trabajo desarrollado por Xavi Ribas. En su grupo han preparado una caja tipo prisma tetragonal donde los vértices están ocupados por Pd^{II} en coordinación planocuadrada. Listones moleculares de bifenilo ocupan los lados de la caja, aportando rigidez, mientras que las caras superior e inferior están ocupadas por porfirinas metaladas con zinc. Este ambiente hidrofóbico era responsable de encapsular C_{60} gracias a la flexibilidad de los enlaces Pd-carboxilato, que permiten una variabilidad en la distancia entre porfirinas que oscila de los 11 a 14 Å.[294] Con la elección de ligandos bipiridínicos apropiados, teniendo en cuenta la distancia entre porfirinas y el volumen interno de la cavidad, se consiguió que un ligando quedase coordinado a ambas porfirinas por su cara interna, dentro de la cápsula. Además, con ligandos adecuadamente funcionalizados, se creó el hueco apropiado para que un complejo organometálico quiral de rodio se coordinase a ellos (Figura 47).[295] Esta coordinación altera la segunda esfera de coordinación del metal, lo que aumenta su enantioselectividad en la hidroformilación del estireno.

[290] Brown, C. J.; Miller, G. M.; Johnson, M. W.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc* .2011, *133*, 11964-11966.
[291] Bender, T. A.; Morimoto, M.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N.; Toste, F. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2019, *141*, 1701-1706.
[292] Bender, T. A.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N.; Toste, F. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2019, *141*, 11806-11810.
[293] Bender, T. A.; Morimoto, M.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N.; Toste, F. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2019, *141*, 609-620.
[294] García-Simón, C.; Garcia-Borràs, M.; Gómez, L.; Parella, T.; Osuna, S.; Juanhuix, J.; Imaz, I.; Maspoch, D.; Costas, M.; Ribas, X. *Nat. Commun.* 2014, *5*, 5557. CCDC: 1027670.
[295] García-Simón, C.; Gramage-Doria, R.; Raoufmoghaddam, S.; Parella, T.; Costas, M.; Ribas, X.; Reek, J. N. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, *137*, 2680-2687.

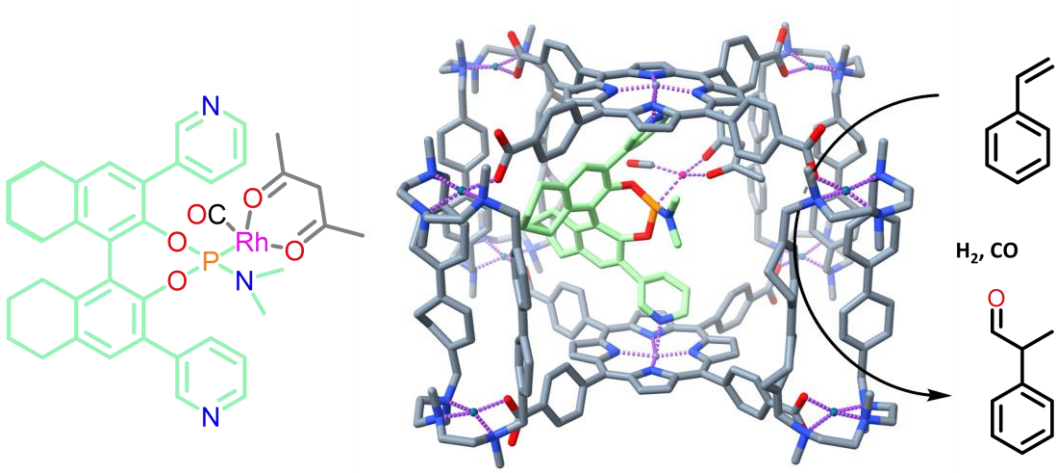


Figura 47. Caja biporfirínica capaz de coordinar un ligando (verde) con dos piridinas en su interior. Este ligando permite la introducción de un complejo de rutenio que lleva a cabo la hidroformilación del estireno.[295]

4.5.4 Metaloenzimas

En el último ejemplo descrito en el apartado previo, es posible encontrar semejanzas con las metaloenzimas naturales. Esta categoría cubre aquellas enzimas cuya actividad está mediada por la coordinación de un metal. Las cadenas peptídicas que forman las enzimas contienen residuos que son propensos a la coordinación, como la histidina, triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico o cisteína, ente otros. Cuando estas cadenas se pliegan para formar la estructura terciaria de las proteínas, de manera asombrosa, los residuos que forman parte del bolsillo de la enzima quedan cercanos en el espacio, en un hueco perfecto para coordinarse con el metal. Este metal es el actor principal, gracias a su presencia se puede convertir un sustrato en un producto que quedará liberado posteriormente. Así, aunque haya residuos muy lejanos en la estructura lineal de la cadena peptídica, estos quedan a unos pocos angstroms de distancia tras el plegamiento. Aunque el resto de las cadenas peptídicas de la enzima no estén implicadas activamente en el proceso catalítico, son el armazón que sostiene el sitio activo en una localización precisa. Salvando las distancias, la caja preparada en el grupo de Xavi Ribas tiene similitudes con este concepto. Las paredes rígidas de la caja no intervienen en la catálisis, pero aportan la infraestructura necesaria para que ese espacio central quede libre. Ese espacio será luego ocupado por el ligando, gracias a la presencia de las porfirinas metaladas con zinc. A su vez, la incorporación del ligando permite la coordinación del complejo de rutenio, que es el que tiene el papel protagonista. Esto es, de manera premeditada se organiza un sistema para que cumpla una función. En ese sistema, todos los componentes juegan un papel y no se deja nada al azar.

En los organismos vivos y, en concreto, en los seres humanos, hay numerosos procesos regulados por metaloenzimas. En concreto, se desglosarán más en detalle aquellas donde el zinc juega un papel fundamental. El ion Zn^{II} está involucrado en la estructura y actividad catalítica de más de 300 enzimas.[296] El bolsillo donde se coordina este ion Zn^{II} suele contener

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[296] Sanna, A.; Firinu, D.; Zavattari, P.; Valera, P. *Nutrients* **2018**, *10*, 68.

entre uno y tres residuos de histidina (Figura 48). Otros residuos como ácido aspártico o cisteína también forman parte de la esfera de coordinación del metal.

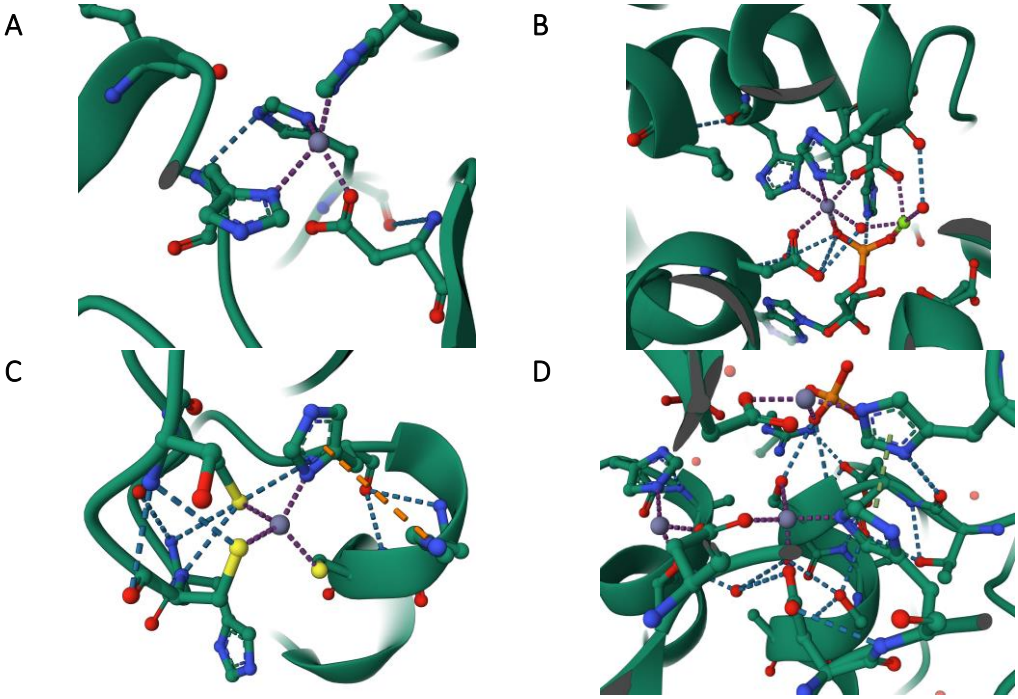


Figura 48. Sitio de coordinación de Zn^{II} en algunas metaloenzimas. A) Superóxido dismutasa (PDB: 1HL4), B) Fosfodiesterasa (PDB: 1TB7), C) Proteína quinasa C (PDB: 1PTR) y D) Fosfatasa alcalina (PDB: 1ANI).

El zinc es mediador en procesos de regulación de la actividad antioxidante, debido a su presencia en la superóxido dismutasa, donde su coordinación con tres histidinas y un ácido aspártico (Figura 48A) promueve cambios estructurales en la enzima que llevan a su activación.[297] También está implicado en procesos de regulación inflamatoria al activar la función de las metaloproteinasas de matriz[298] o inhibir la función de la fosfodiesterasa (Figura 48B),[299] así como en la regulación del sistema inmune a través de la proteína quinasa C (Figura 48D).[300] Algunas enzimas necesitan de la coordinación de más de un ion en su sitio activo para realizar su función, como es el caso de la fosfatasa alcalina. En centro activo de esta enzima tiene tres sitios de unión donde, en ocasiones, uno de ellos está ocupado por magnesio, aunque alcanza su máxima actividad cuando es el zinc el que ocupa las tres posiciones (Figura 48E).[301] Esta enzima cataliza la hidrólisis de ésteres monofosfato y promueve la síntesis de ADN.[302] La

[297] Wu, C. Y.; Steffen, J.; Eide, D. J. *PLoS One* **2009**, *4*, e7061.
[298] Laronha, H.; Caldeira, J. *Cells* **2020**, 9, 1076.
[299] a) Ke, H. *Int. J. Impot. Res.* **2004**, *16*, S24-S27. b) Jarosz, M.; Olbert, M.; Wyszogrodzka, G.; Młyniec, K.; Librowski, T. *Inflammopharmacology* **2017**, *25*, 11-24.
[300] Gopalakrishna, R.; Jaken, S. *Free. Radic. Biol. Med.* **2000**, *28*, 1349-1361.
[301] Coleman, J. E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, 21, 441-483.
[302] Zaher, D. M.; El-Gamal, M. I.; Omar, H. A.; Aljareh, S. N.; Al-Shamma, S. A.; Ali, A. J.; Zaib, S.; Iqbal, J. *Archiv. Pharm.* **2020**, *353*, e2000011.

alteración de la cantidad de zinc disponible para la coordinación impide el buen funcionamiento de las enzimas, dando lugar a diversas patologías.[303]

En el caso de la anhidrasa carbónica, esta metaloenzima es la encargada de catalizar la interconversión entre CO_2 y HCO_3^-. Hay seis familias genéticas de anhidrasa carbónica (α-, β-, γ-, δ-,ζ- y η-) y no todas presentan los mismos residuos en el centro activo,[304] siendo la α-CA la que está presente en los humanos y el resto de los mamíferos. Su centro activo está conformado por tres histidinas coordinadas a un ion Zn^{II}, aunque es sustituido frecuentemente por Co^{II}. Una molécula de agua completa la esfera de coordinación.[305] En la activación del ciclo catalítico esta molécula de agua transfiere un protón al medio, formándose un hidróxido metálico que actúa como nucleófilo y ataca a una molécula de CO_2, que será transformada en HCO_3^- (Figura 49).[304] La etapa limitante en este proceso suele ser la desprotonación del agua y está mediada por los residuos vecinos de histidina que no participan en la coordinación con zinc.[306] A este conjunto de residuos de histidina se los conoce como activadores de la CA.[307] Hay dos tipos de mecanismos para la inhibición de esta enzima.[308] Por un lado, la presencia de moléculas que presentan afinidad por el ion Zn^{II}, tales como las sulfonamidas, los carboxilatos o los ditiocarbamatos, entre otros. Estas moléculas se acomodan bien con los residuos hidrofóbicos o hidrofílicos del bolsillo. El otro mecanismo consiste en la interacción, mediante enlace de hidrógeno, de otra molécula con el agua coordinada al zinc, quedando el complejo "inmovilizado" para su activación.

En mamíferos, la CA está involucrada en procesos fisiológicos como la regulación del pH, la regulación de la concentración de CO_2 o la descomposición de ácido carbónico en CO_2 y agua en los pulmones. También tiene un papel en las funciones de reabsorción del riñón y la síntesis y secreción de ácido clorhídrico en el estómago.[309]

[303] Cheng, Y.; Chen, H. *Nutrients* **2021**, *13*, 4456.
[304] Supuran, C. T. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 2023-2032.
[305] Aggarwal, M.; Boone, C. D.; Kondeti, B.; McKenna, R. *J Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2012**, 28, 267-277.
[306] Rains, J. G. D.; O'Donnelly, K.; Oliver, T.; Woscholski, R.; Long, N. J.; Barter, L. M. C. *ACS Catal.* **2019**, *9*, 1353-1365.
[307] Briganti, F.; Mangani, S.; Orioli, P.; Scozzafava, A.; Vernaglione, G.; Supuran, C. T. *Biochem.* **1997**, *36*, 10384-10392.
[308] Supuran, C. T. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 345-360.
[309] Frost, S. C. *Subcell. Biochem.* **2014**, *75*, 9-30.

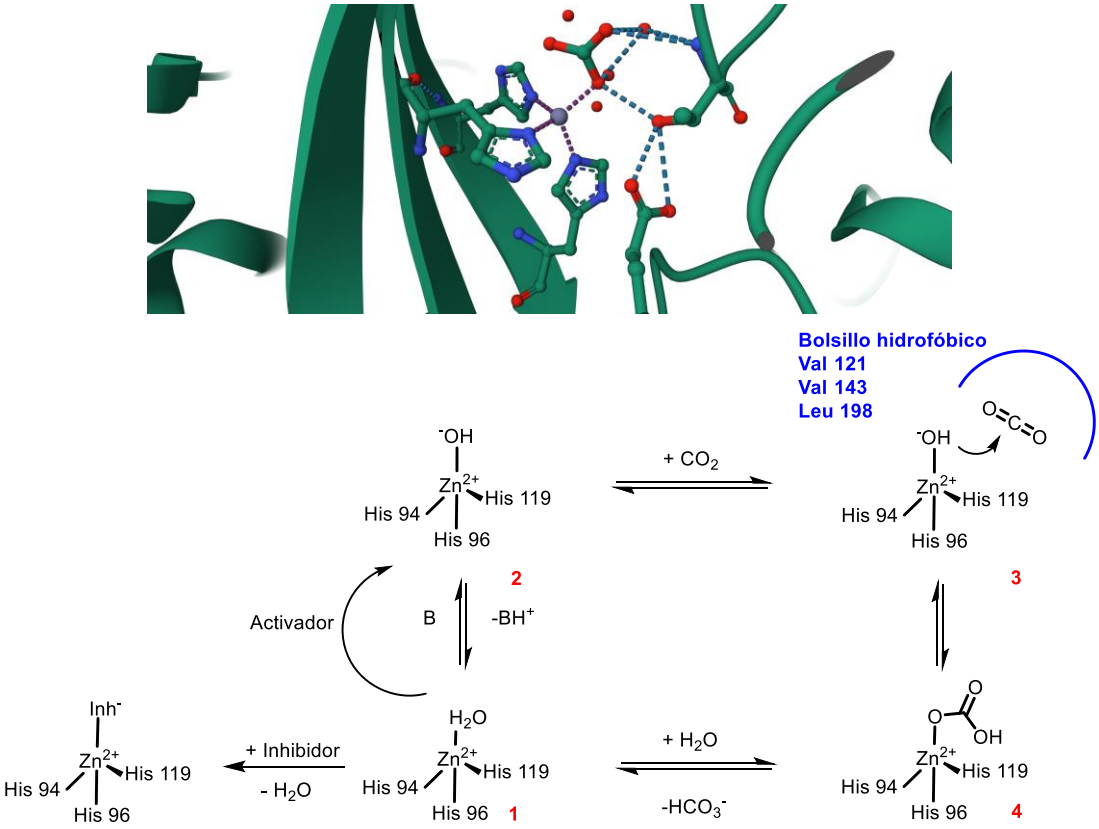


Figura 49. Arriba: sitio de coordinación de Zn^{2+} en la anhidrasa carbónica II (PDB: 2VVB). Una molécula de bicarbonato se encuentra coordinada. Abajo: Mecanismo catalítico de la α-CA.[304]

En los últimos años numerosos científicos han tratado de modificar químicamente las CA o preparar bioimitadores, o metaloenzimas artificiales, con el fin de entender su estructura y modo de acción que permitan curar problemas metabólicos debido al mal funcionamiento de las metaloenzimas.[310] Una herramienta muy útil construir modelos de enzimas sintéticas son los soportes supramolecular clásicos como ciclodextrinas, calixarenos, etc. En esta área son muy conocidos los trabajos de Reinaud,[311] quien, utilizando como apoyo las estructuras cíclicas de calixarenos y ciclodextrinas, ha funcionalizado con un número variable de imidazoles o piridinas, generalmente tres, para su posterior coordinación con iones Cu^{II} o Zn^{II}. La preorganización conferida por estos macrociclos predispone a estos heteroanillos para la coordinación, ya que los deja cerca en el espacio, como si de una proteína plegada se tratase. Posteriormente, aún quedan una o dos posiciones de coordinación vacantes (en el caso de zinc y cobre, respectivamente) que pueden ser ocupadas por huéspedes. Para inducir la incorporación del huésped por la cara interna, esto es, por dentro del soporte, se refuerzan las interacciones favorables con el mismo. En los calixarenos, las paredes aromáticas que hacen de bolsillo hidrofóbico también permiten la estabilización por interacciones anión-π o catión-π. Además, el oxígeno del éter que porta el imidazol, también puede jugar un papel estabilizador

[310] a) Lin, Y. W. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *336*, 1-27. b) Davis, H. J.; Ward, T. R. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5*, 1120-1136. c) Reetz, M. T. *Chem. Rec.* **2012**, *12*, 391-406. d) Piazzetta, P.; Marino, T.; Russo, N.; Salahub, D. R. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *345*, 73-85.

[311] Rebilly, J. N.; Colasson, B.; Bistri, O.; Over, D.; Reinaud, O. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 467-489.

(Figura 50A).[312] Por otra parte, se puede funcionalizar la cara opuesta del soporte para que aporte interacciones complementarias con el huésped (Figura 50A y 49B),[313] o bloquear la cara superior (Figura 50C y 49D) para encerrar al huésped de manera más eficiente.[314]

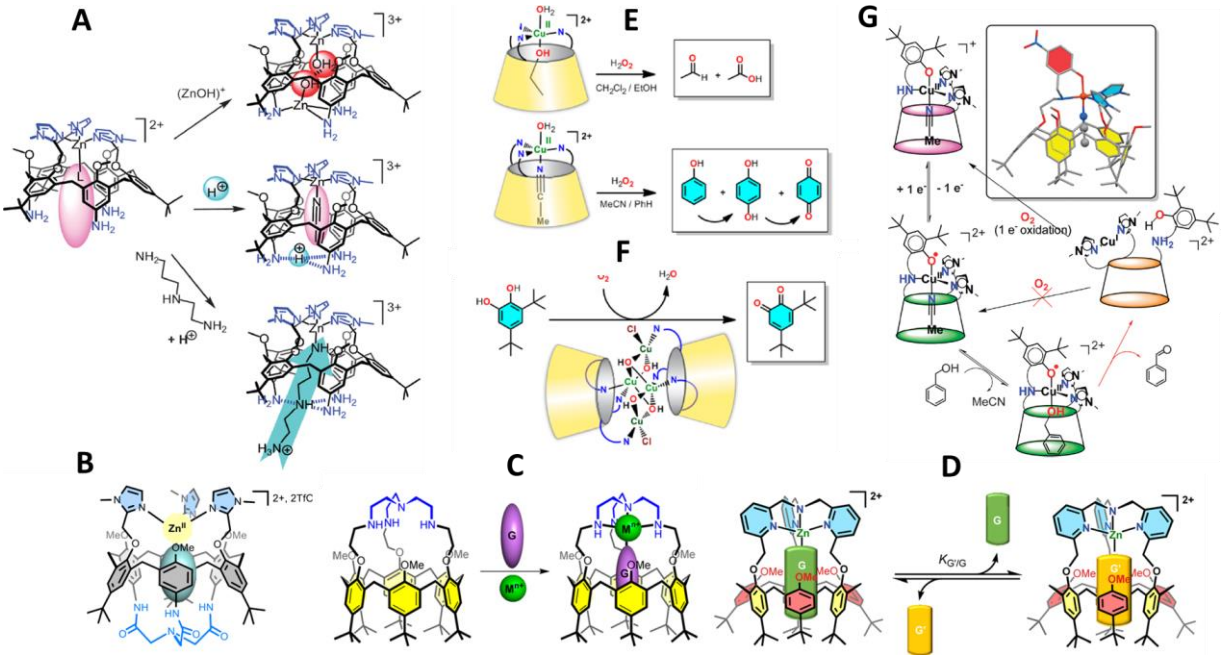


Figura 50. Estructuras tripodales preparadas en el grupo de Reinaud.[311-320] Imágenes adaptadas con permiso de las ref. 311, *Copyright ©2015, Royal Society of Chemistry*; ref. 313, *Copyright ©2021, American Chemical Society*; ref. 314a, *Copyright ©2017, American Chemical Society*; ref. 317, *Copyright ©2015, American Chemical Society.*

Los autores demostraron que la cavidad de estas estructuras era capaz de coordinar moléculas que portan átomos con pares de electrones libres como aminas,[312] nitrilos,[314b] acetatos[315] y, recientemente, haluros.[316] También se ha estudiado su capacidad para imitar la actividad de algunas enzimas,[317] como la catecolasa,[318] oxidasa[319] o galactosa oxidasa[320] (Figura

[312] Coquìre, D.; De La Lande, A.; Parisel, O.; Prangé, T.; Reinaud, O. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15,* 11912-11917.
[313] Nyssen, N.; Ajami, D.; Ardelean, A.; Desroches, F.; Li, J.; Luhmer, M.; Reinaud, O.; Jabin, I. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 12075-12083.
[314] a) De Leener, G.; Over, D.; Smet, C.; Cornut, D.; Porras-Gutierrez, A. G.; López, I.; Douziech, B.; Le Poul, N.; Topić, F.; Rissanen, K.; Le Mest, Y.; Jabin, I.; Reinaud, O. *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 10971-10983. b) Nyssen, N.; Giraud, N.; Wouters, J.; Jabin, I.; Leherte, L.; Reinaud, O. *Inorg. Chem. Front.* **2023**, *10,* 5772-5781.
[315] Parrot, A.; Collin, S.; Bruylants, G.; Reinaud, O. *Chem Sci* **2018**, *9*, 5479-5487.
[316] Aoun, P.; Nyssen, N.; Richard, S.; Zhurkin, F.; Jabin, I.; Colasson, B.; Reinaud, O. *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e20220294.
[317] Le Poul, N.; Le Mest, Y.; Jabin, I.; Reinaud, O. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2097-2106
[318] Sénèque, O.; Campion, M.; Douziech, B.; Giorgi, M.; Riviére, E.; Journaux, Y.; Le Mest, Y.; Reinaud, O. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 2007-2014.
[319] Le Clainche, L.; Rondelez, Y.; Sénèque, O.; Blanchard, S.; Campion, M.; Giorgi, M.; Duprat, A. F.; Le Mest, Y.; Reinaud, O. *C. R. Acad. Sci., Ser. IIc: Chim* **2000**, *3*, 811-819. DOI: 10.1016/S1387-1609(00)01161-0
[320] Sénèque, O.; Campion, M.; Douziech, B.; Giorgi, M.; Le Mest, Y.; Reinaud, O. *Dalton Trans.* **2003**, 4216-4218.

50E, 50F y 50G, respectivamente). Sin embargo, las eficiencias alcanzadas aún distan de las enzimas naturales.

El patrón de tres imidazoles convergiendo en un mismo espacio en las estructuras sintéticas que imitan a las enzimas es muy recurrido, puesto que, como se ha comentado anteriormente, se encuentra de manera muy frecuente en sus análogos naturales. En el grupo de Otte se preparó una cápsula tripodal donde, en cada una de sus paredes, un imidazol unido covalentemente apunta al centro de la cavidad.[321] Los tres imidazoles se pueden coordinar con Cu^{I}, formando un bolsillo en el que el metal está protegido por las paredes aromáticas de la caja. Las dimensiones de la cavidad, junto con el complejo activo, permitieron la oxidación de alcoholes bencílicos de pequeño tamaño a los correspondientes benzaldehídos, llegando a conseguir rendimientos del 88%, empleando únicamente un 10% mol del catalizador (Figura 51 izquierda). En un trabajo posterior, sustituyeron uno de los triazoles por un carboxilato.[322] Como se ha comentado anteriormente, esta tríada también es común en enzimas naturales. Con esta nueva estructura, observaron que era posible la coordinación con Fe^{II}, y que cuando un α-cetogluratarato se incorpora a la esfera de coordinación, el Fe^{II} reacciona más rápidamente a la presencia de O_2, tal y como ocurre en la Fe-desoxigenasa natural. En su último trabajo sobre esta estructura han demostrado que, al coordinar cobre en ese bolsillo modificado, el complejo formado es capaz de catalizar la oxidación de hidroquinonas, imitando la actividad de la metano-monooxigenada particulada (Figura 51 derecha).[323]

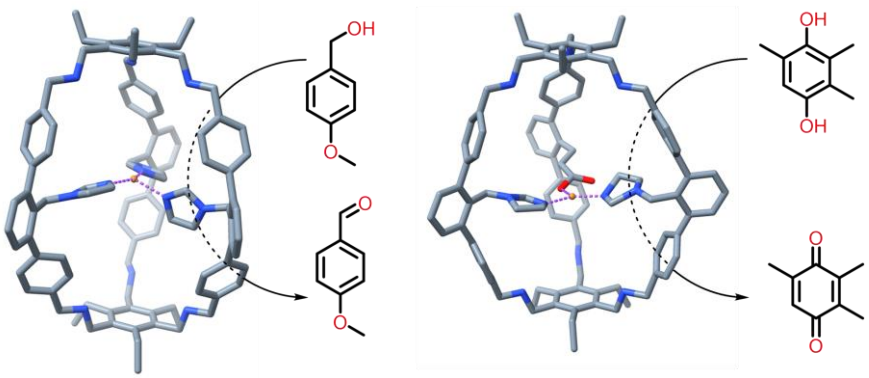


Figura 51. Bolsillos artificiales localizados en la cavidad de las cápsulas imidazólicas de Otte.[321-323]

Tanto en este ejemplo como en los receptores preparados por Reinaud, nos encontramos con estructuras orgánicas pequeñas que imitan un único centro activo, incluso se han preparado otros modelos mucho más sencillos (en términos estructurales), en este caso, de la anhidrasa carbónica.[324] Sin embargo, en estos últimos años también han aparecido nuevas aproximaciones para simular a las enzimas con la ventaja de poseer numerosos sitios activos. Esto ocurre con los MOFs o COFs (Metal o Covalent Organic Framework) que se han preparado

[321] Chen, J.; Huang, L.; Wang, Q.; Wu, W.; Zhang, H.; Fang, Y.; Dong, S. *Nanoscale* **2019**, *11*, 5960-5966. CCDC: 1986236.

[322] Bete, S. C.; Otte, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 118582-18586.

[323] Bete, S. C.; May, L. K.; Woite, P.; Roemelt, M.; Otte, M. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202206120. CCDC: 2165314.

[324] a) Saha, M.; Bandyopadhyay, S. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 3294-3297. b) Huang, Y.; Zhang, S.; Chen, H.; Zhao, L.; Zhang, Z.; Cheng, P.; Chen, Y. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 9916-9921.

con este fin, que pueden contener desde varios[325] hasta cientos de sitios de unión.[326] Por lo general, estos materiales se utilizan como catalizadores heterogéneos y presentan multitud de unidades imidazólicas coordinadas de tres en tres a iones Zn^{II}. Recientemente se ha desarrollado un ejemplo que va un poco más allá y utiliza como bloques de construcción el imidazol y un aminoácido con cadena lateral hidrófoba (Figura 52),[327] con el objetivo de imitar el bolsillo natural de la anhidrasa carbónica (Figura 49). De todos los aminoácidos probados (Ala, Gly, Ile, Leu y Val), los autores destacan que los mejores resultados se encontraron con aquellos que forman un bolsillo más hidrófobo, leucina e isoleucina, ya que imitan mejor las condiciones naturales de la anhidrasa carbónica. Para comprobar la eficiencia catalítica, se sometió al ensamblado en cuestión al ensayo de hidrólisis de *p*-NPA (*para*-nitrofenilacetato),[328] muy empleado para estudiar la actividad de esterasa de los imitadores de la CA.

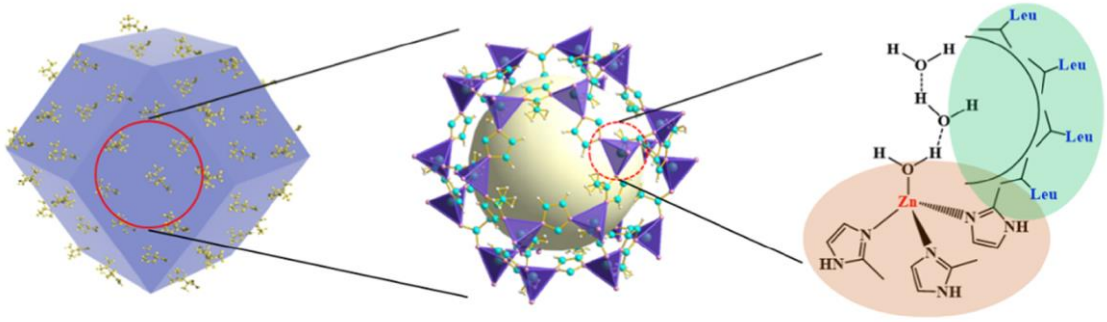


Figura 52. ZIF (*Zeolitic Imidazolate Framework*) con actividad esterasa optimizada mediante la incorporación de aminoácidos con cadena lateral hidrófoba.[327] Imagen adaptada con permiso de la ref. 327 *Copyright ©2022, American Chemical Society*.

Finalmente, cabe señalar el uso de cadenas peptídicas ricas en histidina, y sus ensamblados para crear estos sitios activos, así como la introducción de anillos de piridina en dichas cadenas, que en presencia de dichos metales forman ensamblados con actividad catalítica.[329] Das y colaboradores han desarrollado unos β-amiloides tubulares, en los que los residuos de histidina quedaban próximos a los de lisina, siendo capaces de hidrolizar cetoésteres con gran eficiencia. Este proceso se basaba en la formación de iminas de Schiff con el grupo carbonilo lo que aproximaba al grupo éster al centro reactivo de la histidina (Figura 53A).[330] Otro trabajo relevante son los estudios realizados con estructuras de tipo fibra obtenidas mediante el fotoensamblado de cadenas peptídicas que contienen azobencenos en el extremo *N*-terminal del péptido. La isomerización de *cis* a *trans,* supone un cambio estructural que determina que dos histidinas queden próximas en el espacio y catalicen la hidrólisis del *p*-PNA (Figura 53B).[331] Ghalei y colaboradores sintetizaron un bolanfifilo compuesto por una cadena alquílica central

[325] Wright, A. M.; Wu, Z.; Zhang, G.; Mancuso, J. L.; Comito, R. J.; Day, R. W.; Hendon, C. H.; Miller, J. T.; Dincă, M. *Chem* **2018**, *4*, 2894-201.
[326] a) Jin, C.; Zhang, S.; Zhang, Z.; Chen, Y. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 2169-2174. b) Chen, J.; Huang, L.; Wang, Q.; Wu, W.; Zhang, H.; Fang, Y.; Dong, S. *Nanoscale* **2019**, *11*, 5960-5966.
[327] Sun, S.; Zhang, Z.; Xiang, Y.; Cao, M.; Yu, D. *Langmuir* **2022**, *38*, 1621-1630.
[328] Peng, Y.; Fu, S.; Liu, H.; Lucia, L. A. *Bioresouces* **2016**, *11*, 10099-10111.
[329] Dong, J.; Liu, Y.; Cui, Y. *J Am Chem Soc* **2021**, *143*, 17316-17336.
[330] Sarkhel, B.; Chatterjee, A.; Das, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 4098-4103.
[331] Zhao, Y.; Lei, B.; Wang, M.; Wu, S.; Qi, W.; Su, R.; He, Z. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 2444-2449.

con histidinas y carboxilatos en sus extremos. Este anfifilo se autoensambla para formar nanopartículas que son capaces de incorporar numerosos iones Zn^{II} en su seno mediante coordinación con los imidazoles y carboxilatos. Estas nanopartículas se incorporaron en membranas compuestas por elastómeros, mediante la formación de enlaces de hidrógeno. La afinidad de las nanopartículas por CO_2, permitió que este gas atravesase la membrana, y reaccionase con una molécula de H_2O formándose HCO_3^- (Figura 53C).[332]

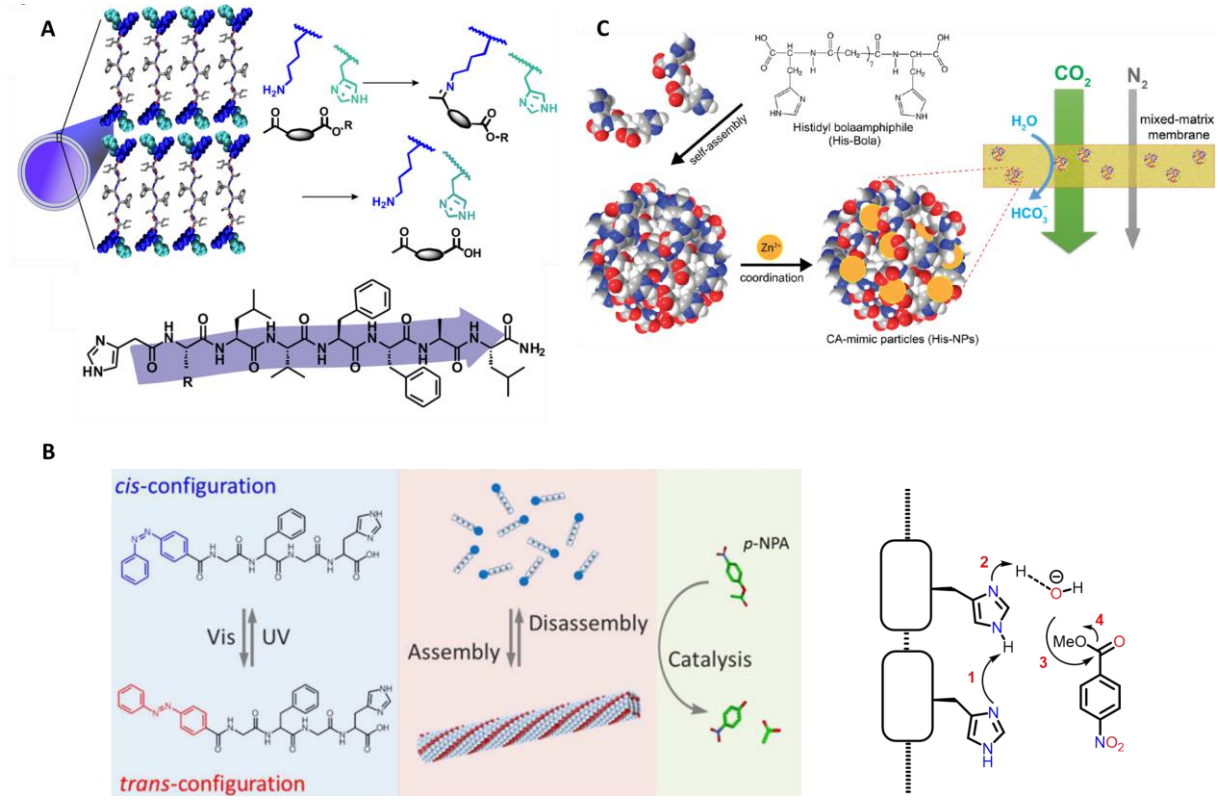


Figura 53. Ensamblados peptídicos con actividad esterasa.[330-332] Imágenes adaptadas con permiso de las ref. 330, *Copyright ©2020, American Chemical Society*; ref. 331, *Copyright ©2018, Royal Society of Chemistry*; ref. 332, *Copyright ©2022, American Chemical Society.*

[332] Nilouyal, S.; Karahan, H. E.; Isfahani, A. P.; Yamaguchi, D.; Gibbons, A. H.; Ito, M. M. M.; Sivaniah, E.; Ghalei, B. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 37595-37607.

4.6 Reconocimiento de aniones

A lo largo de esta introducción se ha hablado de receptores supramoleculares desde diferentes perspectivas. Cuando se diseña un receptor, sea cual sea la aproximación sintética elegida para su preparación, se buscan unas características estructurales concretas que están íntimamente relacionadas con el tipo de huésped que se desea incorporar en su cavidad. Así como se comentaba la elección cuidadosa de los bloques de construcción cuando se pretende utilizar la cavidad como nanorreactor o catalizador, de igual modo, se requieren otras especificidades cuando el objetivo es otro, en el caso que se discutirá en este apartado, el reconocimiento de aniones. La interacción recurrida preferentemente cuando se desea preparar una molécula con capacidad para acomodar uno o varios aniones es el enlace de hidrógeno. Es por ello que entre los receptores sintéticos que se han preparado hasta el día de hoy, la enorme mayoría incorporan varios grupos dadores de enlace de hidrógeno orientados de forma que puedan interaccionar con el anión. Muy frecuentemente se trata de aminas, amidas, o sus tioderivados. Recientemente se han incorporado otros tipos de interacciones para conseguir complejar aniones en un bolsillo definido, como enlaces halógeno o calcógeno, entre otros. Una de las moléculas que la naturaleza ha moldeado para ser un magnífico receptor de cloruro es la prodigiosina, que contiene tres indoles en su estructura y dos de ellos en su forma protonada.[333] Su estructura química está directamente relacionada con su capacidad para inducir la apoptosis de células cancerosas en un mecanismo mediado por el trasporte de Cl^- y H^+ a través de la membrana lipídica.[334]

En el área del reconocimiento de aniones, como en otras disciplinas, los investigadores se sirven del ejemplo de las moléculas destinadas naturalmente a este cometido. Además, el creciente interés por los receptores de aniones se debe a su variedad de aplicaciones. En el terreno biológico, es un hecho comprobado que algunas enfermedades tienen su causa en un transporte deficiente de iones a través de la membrana lipídica, se denominan canalopatías.[335] En concreto, mutaciones genéticas o alteraciones en el normal funcionamiento de canales de cloruro (ClC) llevan a la aparición de enfermedades como la fibrosis cística (canal CFTR), síndrome de Bartter (canales ClC-Kb y ClC-Ka) o miotonía (canal ClC-1),[336] aunque también se estudia su posible relación con enfermedades neurodegenerativas.[337] El reconocimiento de aniones también se aplica en otras áreas[338] como la detección de analitos[339] o el tratado de aguas contaminadas.[340]

[333] a) Williams, R. P.; Hearn, W. R. *Biosynthesis* **1967**, 410-432.

[334] a) Darshan, N.; Manonmani, H. K. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 5393-5407. b) Seganish, J. L.; Davis, J. T. *Chem. Commun.* **2005**, 5781-5783. c) Francisco, R.; Pérez-Tomás, R.; Gimènez-Bonafé, P.; Soto-Cerrato, V.; Giménez-Xavier, P.; Ambrosio, S. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *572*, 111-119.

[335] Hatta, S.; Sakamoto, J.; Horio, Y. *Med. Electon Microsc*. **2002**, *35*, 117-126.

[336] Hübner, C. A.; Jentsch, T. J. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 2435-2445.

[337] a) Thei, L.; Imm, J.; Kaisis, E.; Dallas, M. L.; Kerrigan, T. L. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 676. b) Cojocaru, A.; Burada, E.; Bălșeanu, A. T.; Deftu, A. F.; Cătălin, B.; Popa-Wagner, A.; Osiac, E. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1239.

[338] Busschaert, N.; Caltagirone, C.; Van Rossom, W.; Gale, P. A. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8038-8155.

[339] a) Tay, H. M.; Beer, P. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 4652-4677. b) Dey, N.; Bhattacharya, S. *Chem. Asian J.* **2020**, *15*, 1759-1779.

[340] Moyer, B. A.; Delmau, L. H.; Fowler, C. J.; Ruas, A.; Bostick, D. A.; Sessler, J. L.; Katayev, E.; Dan Pantos, G.; Llinares, J. M.; Hossain, M. A.; Kang, S. O.; Bowman-James, K. *Adv. Inorg. Chem.* **2006**, 59, 175-204.

En el desarrollo de receptores de aniones, la incorporación de motivos de urea y tiourea es muy efectiva.[341] Los dos protones que contiene la urea pueden establecer enlaces de hidrógeno con el anión, donde la direccionalidad de estas interacciones y los sustituyentes en el armazón juegan un papel fundamental (Figura 54, moléculas **1**-**5**).[342] El aumento del carácter ácido de estos protones, preparando los derivados de tiourea, aumenta la fortaleza del enlace, y la afinidad por el anión (Figura 54, moléculas **6**, **7**, **10** y **11**).[343] Por otro lado, el aumento del grado de preorganización, incorporando una parte central rígida que dirige la orientación de los brazos que portan los grupos dadores, también suele aumentar la afinidad (Figura 54, moléculas **6**-**11**).[344] En este caso, cuando se trata de receptores dipodales, recientemente se ha relacionado la conformación de las amidas con la afinidad que presenta el receptor. Según los estudios realizados, la conformación *anti-anti* es preferida por ureas y escuaramidas, mientras que tioureas y tioescuaramidas suelen encontrase en su forma *syn-syn* o *syn-anti*. La conformación *anti-anti* predispone al receptor para la unión con el anión, de manera que, si ha de producirse un cambio conformacional para que este evento tenga lugar, eso se traduce en una penalización energética que se ve reflejada en la afinidad (K_a).[345]

La posterior evolución del grado de preorganización de estos receptores condujo a la preparación los derivados tripodales basados en la tapa de TREN. Con esta aproximación se consigue un mejor encapsulado de anión a través de seis posibles enlaces de hidrógeno, lo que también se traduce en mejores afinidades (Figura 54, moléculas **12** y **13**).[346] Además, alargando los brazos moleculares con la incorporación de más unidades de urea, se han llegado a encapsular dos aniones simultáneamente. El receptor dispone de doce NHs y puede acomodar dos aniones en dos regiones diferentes utilizando seis protones amídicos para estabilizar a cada uno de ellos (Figura 54, molécula **14**).[347]

[341] a) Kundu, S.; Egboluche, T. K.; Hossain, Md. A. *Acc. Chem. Res.* **2023**, *56*, 1320-1329. b) Macreadie, L. K.; Gilchrist, A. M.; McNaughton, D. A.; Ryder, W. G.; Fares, M.; Gale, P. A. *Chem* **2022**, *8*, 46-118. c) Amendola, V.; Fabbrizzi, L.; Mosca, L. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3889-3915

[342] a) (**1**) Boiocchi, M.; Del Boca, L.; Gómez, D. E.; Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Monzani, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16507-16514; b) (**2** y **4**) Amendola, V.; Fabbrizzi, L.; Mosca, L.; Schmidtchen, F.P. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5972-5981. c) (**3**) Wu, X.; Small, J. R.; Cataldo, A.; Withecombe, A. M.; Turner, P.; Gale, P. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 15142-15147. d) (**5**) Li, H.; Valkenier, H.; Thorne, A. G.; Dias, C. M.; Cooper, J. A.; Kieffer, M.; Busschaert, N.; Gale, P. A.; Sheppard, D. N.; Davis, A. P. *Chem. Sci.* **2019**, 10, 9663-9672.

[343] a) (**6** y **7**)[342d] b) (**10** y **11**) Manna, U.; Portis, B.; Egboluche, T. K.; Nafis, M.; Hossain, M. A. *Front. Chem.* **2021**, *8*, 575701. c) Emami Khansari, M.; Johnson, C. R.; Basaran, I.; Nafis, A.; Wang, J.; Leszczynski, J.; Hossain, M. A. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 17606-17614.

[344] a) (**8**) Carroll, C. N.; Berryman, O. B.; Johnson, C. A.; Zakharov, L. N.; Haley, M. M.; Johnson, D. W. *Chem. Commun.* **2009**, 2520-2522. b) (**9**) [342d]

[345] Sandler, I.; Larik, F. A.; Mallo, N.; Beves, J. E.; Ho, J. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 8074-8084.

[346] a) (**12**)[342d.] b) (**13**) Pramanik, A.; Thompson, B.; Hayes, T.; Tucker, K.; Powell, D. R.; Bonnesen, P. V.; Ellis, E. D.; Lee, K. S.; Yu, H.; Hossain, M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4444-4447. c) (**13**) Jia, C.; Wu, B.; Li, S.; Huang, X.; Zhao, Q.; Li, Q. S.; Yang, X. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 486-490. d) (**13**) Pramanik, A.; Powell, D. R.; Wong, B. M.; Hossain, M. A. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 4274-4284.

[347] Emami Khansari, M.; Mirchi, A.; Pramanik, A.; Johnson, C. R.; Leszczynski, J.; Hossain, M. A. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6032.

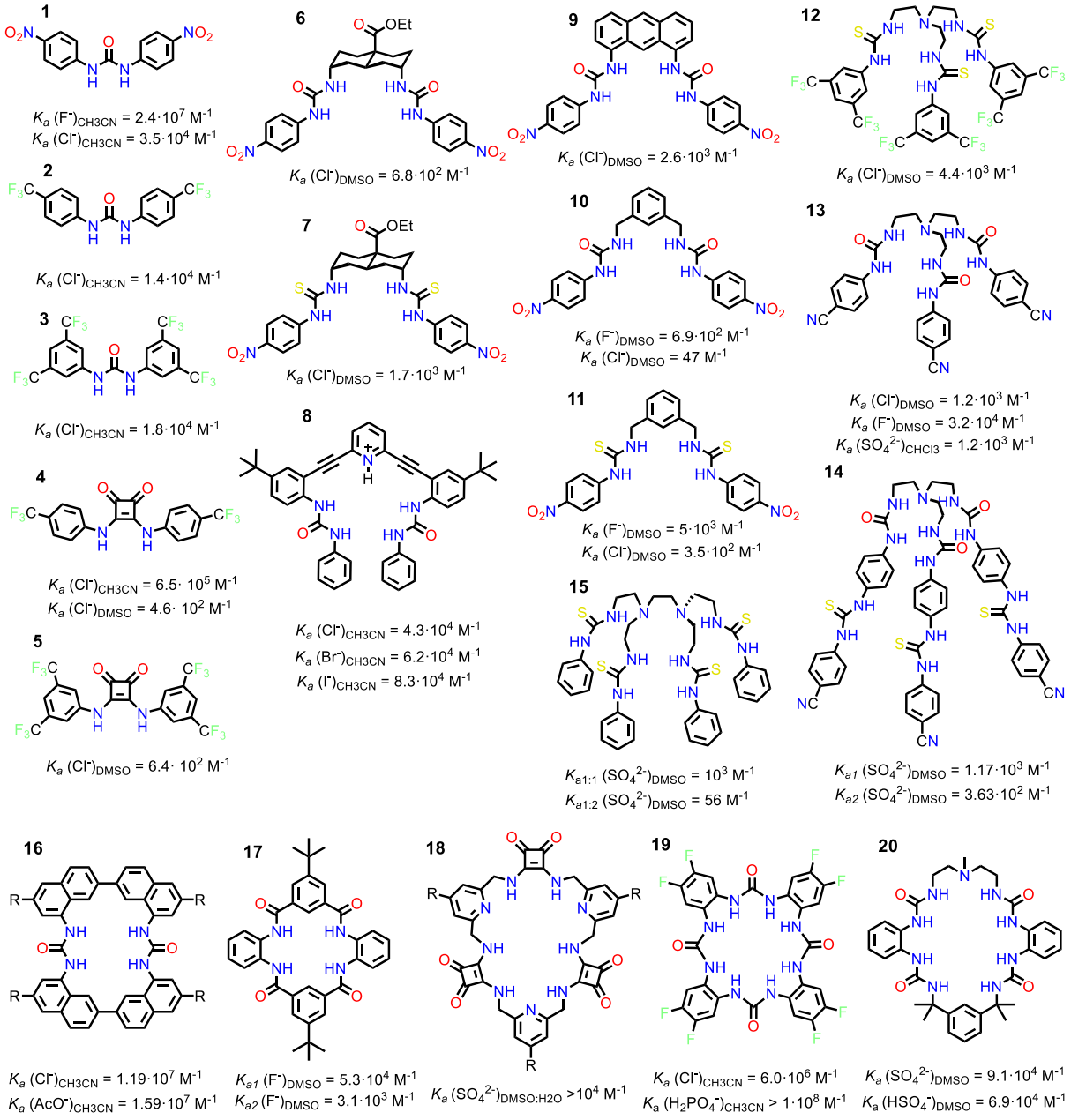


Figura 54. Receptores de aniones basados en la presencia de grupos urea y derivados que actúan como dadores de enlace de hidrógeno.[342-352]

En el grupo de Gale, cuyas aportaciones en el área de reconocimiento y transporte de aniones son numerosísimas,[348] han preparado recientemente receptores tetrapodales que pueden acomodar dos aniones y que protegen mejor al anión del medio externo (Figura 54, molécula **15**).[349] Estos receptores tipo "paraguas" son especialmente eficientes en el reconocimiento de oxoaniones gracias a que poseen un elevado número de grupos dadores de

[348] Chen, L.; Berry, S. N.; Wu, X.; Howe, E. N. W.; Gale, P. A. *Chem* **2020**, *6*, 61-141.
[349] Gilchrist, A. M.; Chen, L.; Wu, X.; Lewis, W.; Howe, E. N. W.; Macreadie, L. K.; Gale, P. A. *Molecules* **2020**, *25*, 5179.

enlace hidrógeno, lo cual le permite compensar la penalización derivada de la deshidratación del anión.[350,346c]

El grado más elevado de preorganización se alcanza con receptores cíclicos, que orientan los motivos de urea, tiourea o análogos hacia el interior (Figura 53, moléculas **16**-**20**). La modulación del diámetro y el número de grupos dadores permite obtener mejores afinidades por aniones pequeños, como halogenuros,[351] u otros de mayor tamaño como oxoaniones o carboxilatos.[352]

Sin duda, los receptores que incluyen ureas para inducir el reconocimiento del anión son los más abundantes y, además, muchos de los que se han comentado en estas líneas, facilitan el transporte de aniones, de lo que se hablará más adelante. Como recurso para enriquecer al receptor en dadores de enlace de hidrógeno, también se han utilizado extensamente los anillos de la familia de los azoles.[353] Esta familia está compuesta por seis miembros: pirrol, imidazol, pirazol, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol y tetrazol, siendo el imidazol y el 1,2,3-triazol los más utilizados en esta área, así como sus derivados catiónicos, el imidazolio y triazolio. El protón ácido de estos anillos puede formar enlaces de hidrógeno con el anión, estabilizando así la formación de un complejo. Esta acidez puede modularse con los sustituyentes. Además, en el caso del imidazolio y triazolio, las interacciones electrostáticas también actúan en favor de la complejación.[354]

En estos receptores con anillos azólicos, tal y como sucedía en la familia mencionada anteriormente de los receptores con urea, el número de interacciones favorables a la unión del huésped y el grado de organización, repercuten directamente en la respuesta obtenida, en términos de afinidad (Figura 55). Así, receptores flexibles o que aportan un número menor de motivos estabilizadores (Figura 55, moléculas **21** y **22**)[355] coordinan al anión de manera menos efectiva. Cuando entran en juego factores como la cooperatividad, para organizar dos moléculas de receptor en torno al anión (Figura 55, moléculas **23** y **24**),[356] la combinación con otras interacciones o un mayor número de dadores de enlace de hidrógeno (Figura 55, molécula **25**),[357] la respuesta a la presencia del anión se ve reforzada.

---

[350] a) Basaran, I.; Emami Khansari, M.; Pramanik, A.; Wong, B. M.; Hossain, M. A. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 115-118.

[351] a) (**16**) Satake, A.; Ishizawa, Y.; Katagiri, H.; Kondo, S. I. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 9848-9857. b) (**17**) Liu, W.; Oliver, A. G.; Smith, B. D. *J. Org. Chem.* **2019**, *84,* 4050-4057.

[352] a) (**18**) Qin, L.; Wright, J. R.; Lane, J. D. E.; Berry, S. N.; Elmes, R. B. P.; Jolliffe, K. A. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 12312-12315. b) (**18**) Osawa, K.; Tagaya, H.; Kondo, S. I. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 6623-6630. c) (**19**) [342c] d) (**20**) Kaur, S.; Day, V. W.; Bowman-James, K. *Cryst. Growth Des.* **2020**, *20*, 4212-4216.

[353] Kashyap, S.; Singh, R.; Singh, U. P. *Coord. Chem Rev.* **2020**, *417*, 213369.

[354] Hu, Y.; Long, S.; Fu, H.; She, Y.; Xu, Z.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 589-618.

[355] a) (**21**) García, F.; Aragó, J.; Viruela, R.; Ortí, E.; Sánchez, L. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 765-772. b) (**22**) Cao, Q.-Y.; Pradhan, T.; Kim, S.; Kim, J. S. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4386-4389.

[356] a) (**23**) Yamakado, R.; Sakurai, T.; Matsuda, W.; Seki, S.; Yasuda, N.; Akine, S.; Maeda, H. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 626-638. b) (**24**) McDonald, K. P.; Qiao, B.; Twum, E. B.; Lee, S.; Gamache, P. J.; Chen, C.-H.; Yi, Y.; Flood, A. H. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13285-13288.

[357] Yang, L.; Wang, Y.; Che, Y.; Jiang, H. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 7747-7752.

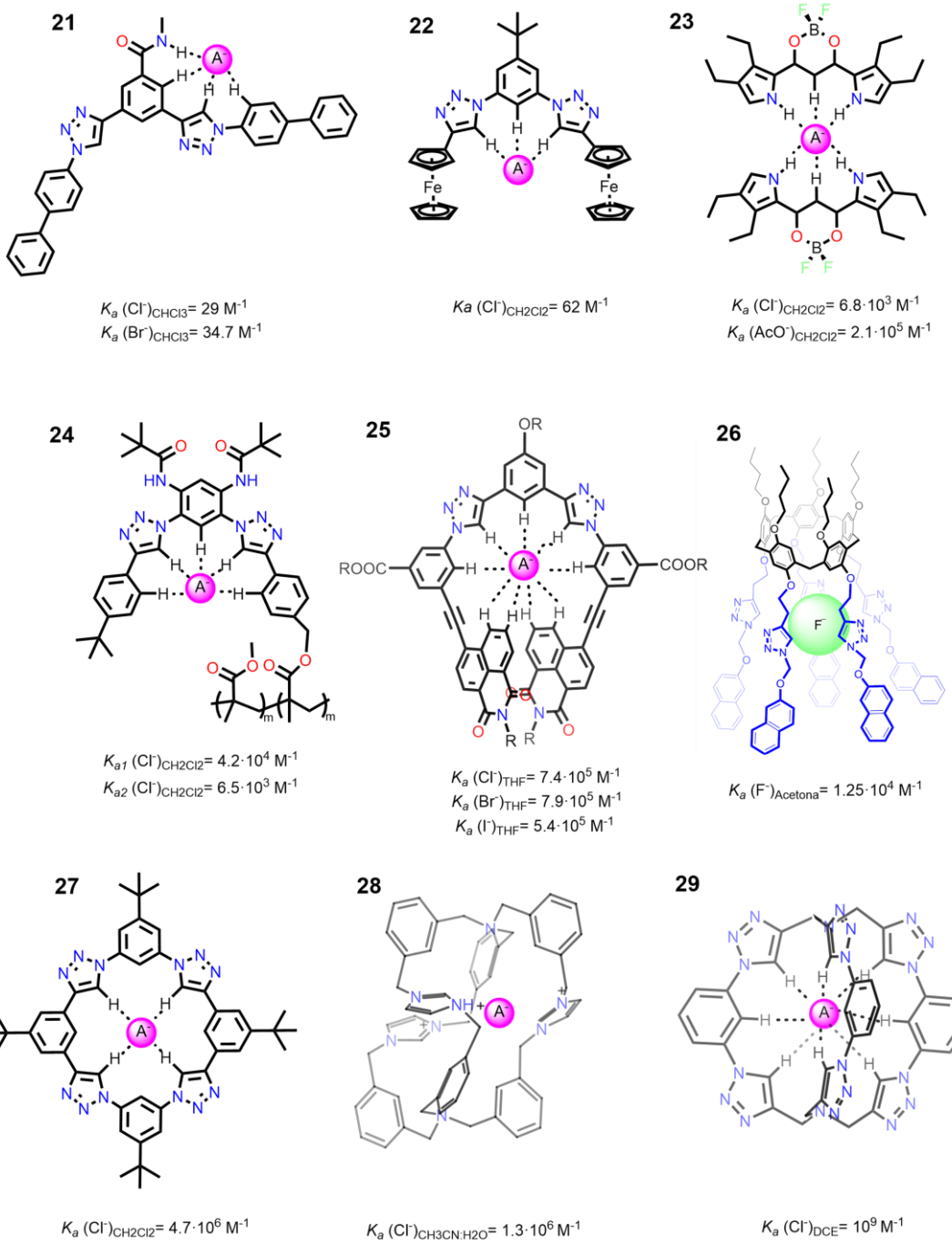


Figura 55. Receptores de aniones que incorporan anillos de triazol, imidazol y pirrol como dadores de enlace de hidrógeno.[355-363] Para la molécula 26, la imagen ha sido adaptada con permiso de la ref. 358, *Copyright ©2022 Elsevier*.

Los triazolofanos desarrollados en el grupo de Flood representan un ejemplo del aumento en la preorganización de estos sistemas azólicos.[359] Son macrociclos planos y rígidos cuyo hueco central se comporta como un buen bolsillo para el atrapado de aniones (Figura 55, molécula

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[358] Xiong, S.; Nanda Kishore, M. V.; Zhou, W.; He, Q. *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *461*, 214480.
[359] Flood, A. H. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 611-627.

27).[360] Variaciones más flexibles de estos macrociclos también son capaces de acomodar aniones, estando involucradas, adicionalmente, interacciones anión-π.[361] Cuando se rodea al anión tridimensionalmente (Figura 55, molécula **26**)[362] y además la estructura que lo rodea ya está establecida como una caja, esto se traduce a valores de K_a cada vez mayores (Figura 55, moléculas **28** y **29**),[363] incluso en disolventes muy competitivos, como es el caso de algunas estructuras con imidazolios.[354]

Aunque el enlace de hidrógeno es la interacción empleada por excelencia en los receptores de aniones, también se recurre a otras, a veces como soporte o a veces como fuerza principal para la complejación con el anión. El primero es el caso de las interacciones anión-π, que se ilustra en los diversos ejemplos, alguno ya comentado, en los que se emplean paredes aromáticas para incrementar la afinidad por el anión.[364] En ocasiones en las que los aniones estudiados no forman enlaces de hidrógeno fuertes (Figura 56A y 56B),[365,366] esta interacción cobra importancia, aunque también puede ser, como se ha mencionado antes, una interacción "de apoyo" (Figura 56C).[367] Cuanto más pobre en electrones es ese armazón aromático, más fuertemente unido quedará el anión.[368]

Otra interacción que va ganando relevancia en el área del reconocimiento de aniones es el enlace halógeno.[369] En estos casos se emplean halógenos polarizables como sustituyentes de anillos aromáticos pobres en electrones. El principio por el cual un halógeno unido covalentemente a una molécula pobre en electrones es capaz de establecer una interacción favorable con una molécula cargada negativamente obedece a la distribución desigual de la densidad electrónica de este halógeno. En dirección opuesta al eje de enlace, se genera un área pobre en densidad electrónica, que se denomina *σ-hole*. La introducción de sustituyentes aceptores de electrones sobre este anillo aromático al que se encuentra unido el halógeno, aumenta el carácter electropositivo de este "agujero" y favorecen la formación de enlaces halógenos con un anión.[370] La serie de los calcógenos también presenta un comportamiento análogo y por ello también se ha usado como base para preparar estructuras que acogen aniones.[371] Recientemente, en el grupo de Beer, otro gran destacado en el área del

[360] Hua, Y.; Ramabhadran, R. O.; Uduehi, E. O.; Karty, J. A.; Raghavachari, K.; Flood, A. H. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 312-321.
[361] Sessler, J. L.; Cai, J.; Gong, H.-Y.; Yang, X.; Arambula, J. F.; Hay, B. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14058-14060.
[362] Yu, G.; Zhang, Z.; Han, C.; Xue, M.; Zhou, Q.; Huang, F. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2958-2960.
[363] a) (**28**) Aletti, A. B.; Miljkovic, A.; Toma, L.; Bruno, R.; Armentano, D.; Gunnlaugsson, T.; Bergamaschi, G.; Amendola, V. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 4221-4228. b) (**29**) Liu, Y.; Zhao, W.; Chen, C. H.; Flood, A. H. *Science* **2019**, *365*, 159-161.
[364] Plais, R.; Clavier, G.; Salpin, J.; Gaucher, A.; Prim, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2023**, *26, e202201281.*
[365] Schneebeli, S. T.; Frasconi, M.; Liu, Z.; Wu, Y.; Gardner, D. M.; Strutt, N. L.; Cheng, C.; Carmieli, R.; Wasielewski, M. R.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13100-12104. CCDC: 958572
[366] Tuo, D. H.; Ao, Y. F.; Wang, Q. Q.; Wang, D. X. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7158-7162. CCDC: 1935343.
[367] Oh, J. H.; Kim, J. H.; Kim, D. S.; Han, H. J.; Lynch, V. M.; Sessler, J. L.; Kim, S. K. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 4336-4339. CCDC: 1908189.
[368] Chifotides, H. T.; Dunbar, K. R. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 894-906.
[369] a) Tepper, R.; Schubert, U. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 6004-6016. b) Cavallo, G.; Metrangolo, P.; Pilati, T.; Resnati, G.; Sansotera, M.; Terraneo, G. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3772-3783.
[370] Gilday, L. C.; Robinson, S. W.; Barendt, T. A.; Langton, M. J.; Mullaney, B. R.; Beer, P. D. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7118-7195.
[371] Hein, R.; Beer, P. D. *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 7098-7125.

reconocimiento de aniones, se han preparado tres receptores equipados con diferentes grupos para reconocer simultáneamente Na^+ y I^-. Son estructuras dipodales donde cada brazo contiene un triazol que termina en un éter corona. La previa coordinación de Na^+ mejora la afinidad por el anión, lo que se achaca a una preorganización del sistema y a un efecto electroatractor. El derivado que interacciona con I^- mediante enlace halógeno fue el que mejor afinidad presentaba, seguido de aquel capaz de formar enlaces calcógeno.[372] El reconocimiento de pares iónicos como el que se acaba de mencionar es un área en expansión en el que el uso de éteres corona para la complejación de los cationes es el motivo más empleado.[373]

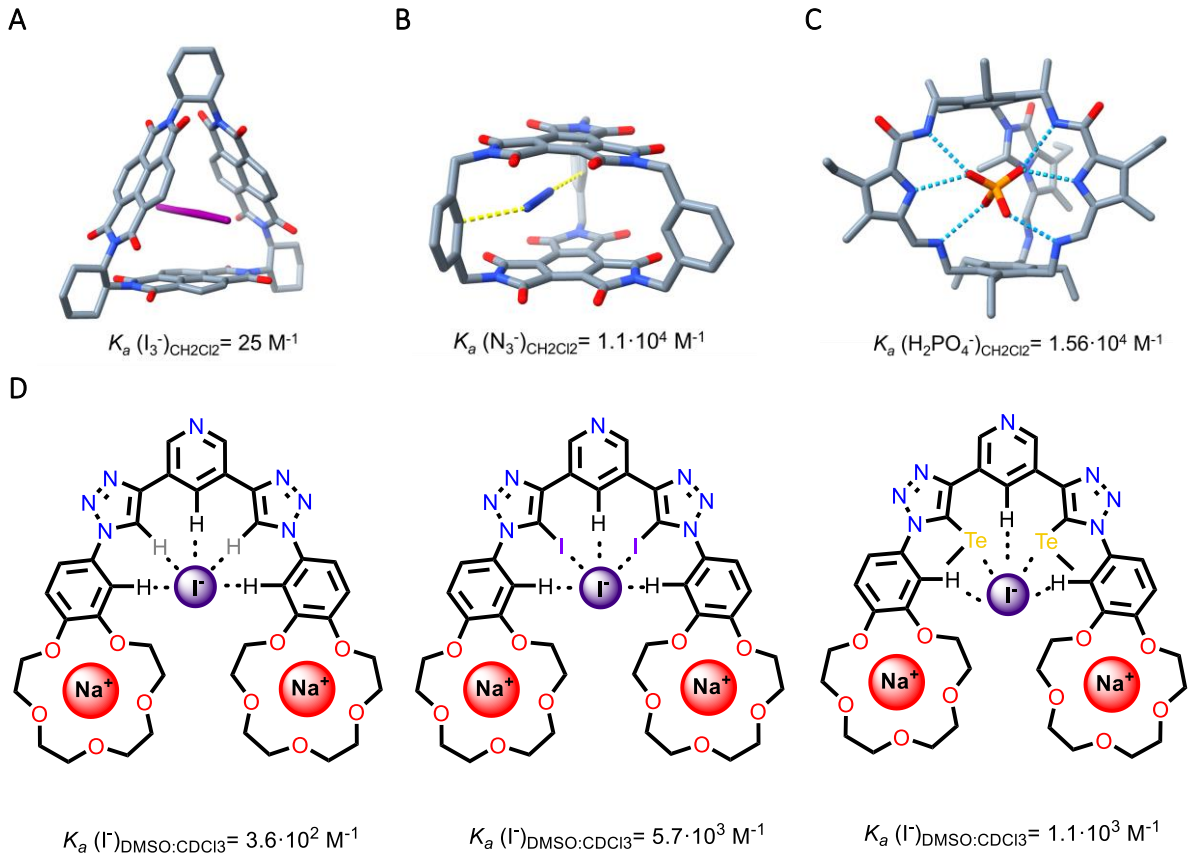


Figura 56. Receptores de aniones influenciados por interacciones anión-π y enlace halógeno.[365-367,372]

A lo largo de toda la introducción y, específicamente en este apartado sobre reconocimiento de aniones, se ha mencionado numerosas veces la palabra preorganización. Son abundantes los ejemplos dentro de la química supramolecular y específicamente, en el estudio de receptores, que muestran la importancia de una estructura bien definida para ahorrar el costo entrópico de la reorganización.[374] Sin embargo, también existen ejemplos

[372] Bunchuay, T.; Docker, A.; Eiamprasert, U.; Surawatanawong, P.; Brown, A.; Beer, P. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 12007-12012.
[373] McConnell, A. J.; Docker, A.; Beer, P. D. *ChemPlusChem* **2020**, *85*, 1824-1841.
[374] a) Goto, K., *The Concept of Preorganization*. In *Comprehensive Supramolecular Chemistry II,* Elsevier, **2017**, 61-71. b) Parks, F. C.; Sheetz, E. G.; Stutsman, S. R.; Lutolli, A.; Debnath, S.; Raghavachari, K.; Flood, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 1274–1287.

donde la presencia del anión es la fuerza motora que desencadena un cambio conformacional en el receptor para acomodar mejor al anión y formar el complejo. En estos casos queda patente que, en ocasiones, las interacciones favorables que establece el anión con el receptor son tan fuertes como para empujar un cambio estructural notable.[375] Se dice que el anión actúa aquí como plantilla (*template*). Así lo observaron Flood y colaboradores con una estructura que era capaz de dimerizar en forma de hélice, enrollándose sobre un anión cloruro.[376] En esta estructura hay cuatro imidazoles apuntando hacia el interior de la hélice, donde se sitúa anión, en una disposición tal que los azobencenos los protegen frente a la competencia del disolvente acuoso (Figura 57A). Las dos subunidades de receptor establecen fuertes interacciones π-π que estabilizan la conformación enrollada.

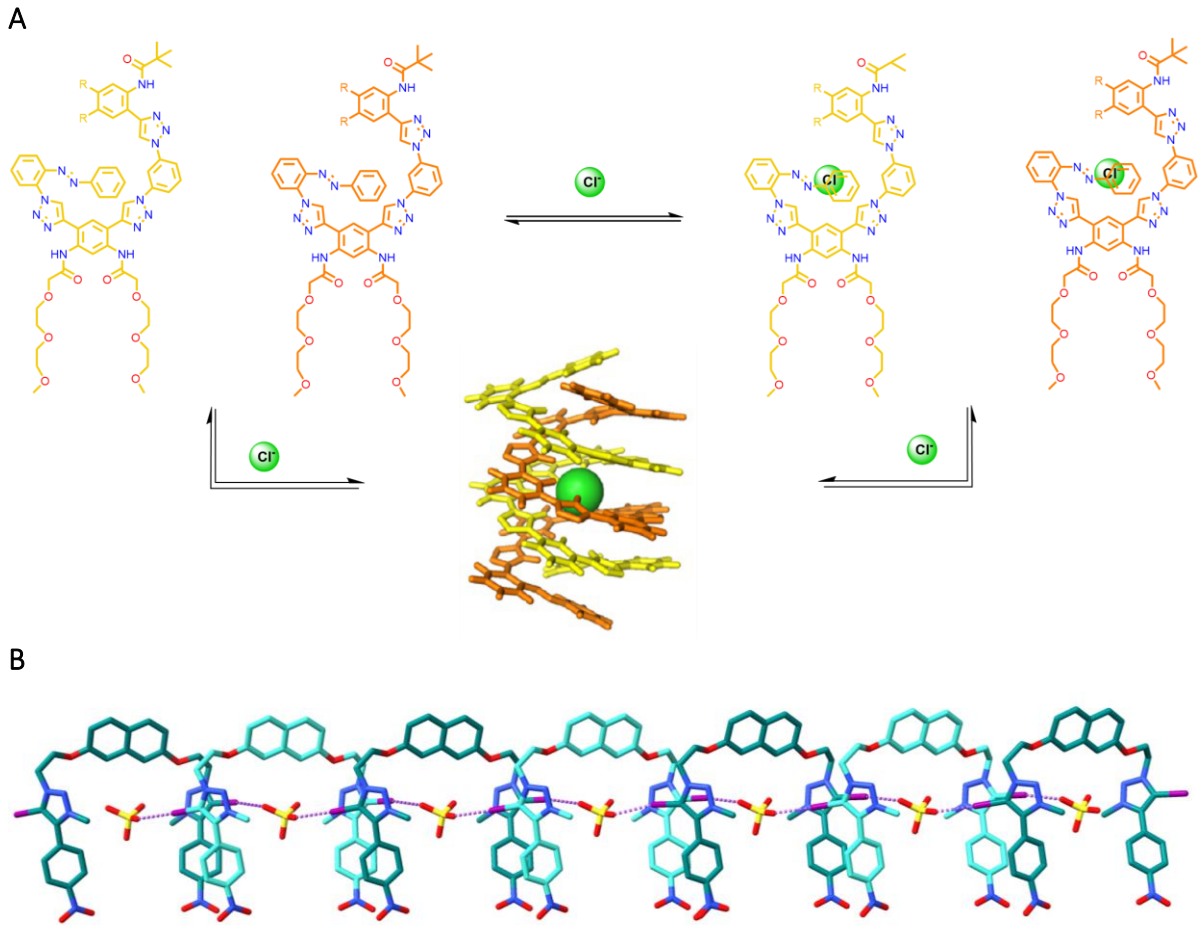


Figura 57. Activación de receptores de aniones a través de la presencia del anión.[376,377] Para la Figura 57A, la imagen ha sido adaptada con permiso de la ref. 376, *Copyright ©2013 American Chemical Society.*

Molina y colaboradores, cuyos trabajos están enfocados al reconocimiento mediante enlace halógeno en imidazolios, han descrito una estructura polimérica donde el anión es el

[375] a) Liang, L.; Zhao, W.; Yang, X.-J.; Wu, B. *Acc. Chem. Res.* **2022**, *55*, 3218-3229. b) Foyle, É. M.; White, N. G. *Chem. Asian. J.* **2021**, *16*, 575-587.
[376] Hua, Y.; Liu, Y.; Chen, C. H.; Flood, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14401-14412.

hilo conductor del ensamblado (Figura 57B). El anión, en lugar de colocarse en la parte central de la estructura con forma de herradura, como es usual para este tipo de receptores (Figura 56D) provoca el giro de los brazos del receptor de manera que cada haloimidazol apunta en dirección contraria al otro. De esta forma, el anión establece interacciones con los bromos de dos moléculas de receptor diferentes, asistido también por interacciones electrostáticas y anión-π.[377]

El uso de receptores flexibles permite desarrollar sistemas dinámicos y reversibles. De esta forma, en algunas ocasiones la aplicación de un estímulo externo es lo que lleva al receptor a adoptar su forma activa o a deshabilitarlo en su forma "OFF". Este control suele venir de la mano de cambios de pH o irradiación de luz.[378] Bhosale y colaboradores prepararon un receptor con dos unidades de naftalendiimida unidas por un azobenceno. La fotoisomerización de *trans* a *cis* permite la incorporación de un anión fluoruro entre los dos bloques aromáticos (Figura 58A). Se produce la cesión de un electrón del fluoruro a uno de los bloques, formándose una especie radicalaria estable que, posteriormente, es capaz de aceptar otro anión. Solamente mediante el tratamiento con un agente oxidante, y no por acción de la luz, el sistema es revertido a su estado inicial.[379]

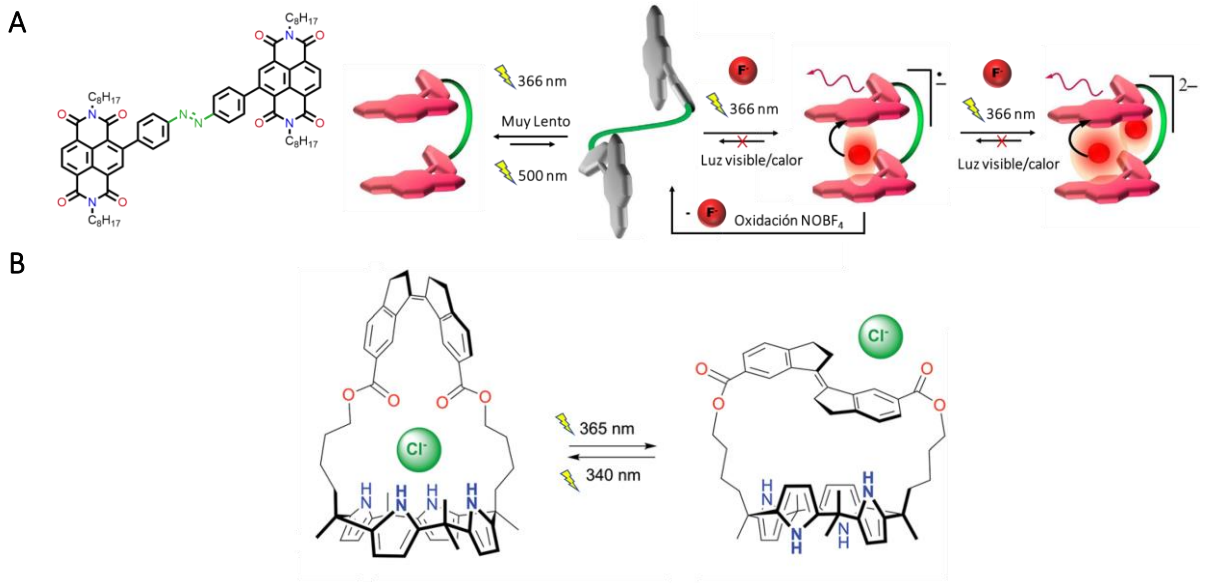


Figura 58. Activación de receptores de aniones a través de la fotoisomerización.[379,380]

Un ejemplo opuesto a este fue estudiado recientemente por Wezenberg y colaboradores.[380] Haciendo uso de la conocida tendencia de los calixpirroles por moléculas aniónicas,[381] complejaron cloruro en una estructura de este tipo, pero que incorpora una tapa

[377] Zapata, F.; González, L.; Caballero, A.; Bastida, A.; Bautista, D.; Molina, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2041-2045. CCDC: 1577010.
[378] de Jong, J.; Bos, J. E.; Wezenberg, S. J. *Chem. Rev.* **2023**, *123*, 8530-8574.
[379] Rananaware, A.; Samanta, M.; Bhosale, R. S.; Kobaisi, M. Al; Roy, B.; Bheemireddy, V.; Bhosale, S. V.; Bandyopadhyay, S.; Bhosale, S. V. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22928.
[380] Villarón, D.; Siegler, M. A.; Wezenberg, S. J. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 3188-3193.
[381] Valderrey, V.; Escudero-Adán, E. C.; Ballester, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6898-6902.

fotoisomerizable que permite revertir la asociación del anión. La isomerización de *cis* a *trans* lleva consigo un cambio conformacional del macrociclo que impide a los pirroles orientarse adecuadamente para interaccionar con el anión (Figura 58B).

En este apartado sobre receptores de aniones se han citado numerosos ejemplos donde el anión que se reconoce es un haluro, especialmente cloruro. No es casual que sean superiores en número los receptores capaces de acomodar eficientemente este anión. Como se ha comentado en párrafos anteriores, la estructura del receptor es fundamental para favorecer el proceso de reconocimiento. Sin embargo, el anión también juega un importante papel en cuanto a su tamaño, carga, polarizabilidad y tendencia a la hidratación. Generalmente, se acepta que la hidratación del anión entorpece su complejación,[382] aunque a día de hoy no está suficientemente esclarecido el papel del agua en los procesos de reconocimiento molecular.[383] Por ello, es normal observar que las constantes de afinidad disminuyen cuanto mayor es la energía de hidratación, ya que el reconocimiento de aniones suele implicar que se le despoje del número de moléculas de agua que rodean su esfera de coordinación.[384] Este es el motivo por el cual dichas constantes de afinidad también se ven reducidas en medio acuoso, que dificulta la deshidratación del anión, compite por establecer enlaces de hidrógeno con el receptor y, en ocasiones, ocupa el hueco destinado para el anión.

Sin embargo, si miramos una vez más hacia los ejemplos que nos brinda la naturaleza, se puede observar que las enzimas desplazan o conservan las moléculas de agua dependiendo de las circunstancias. En un estudio con la anhidrasa carbónica II, Whitesides y colaboradores comprobaron que el sitio de unión y las moléculas de agua que en él se albergan, sufren cambios tras la adición de ciertos aniones. Esos cambios son diferentes dependiendo de la afinidad del anión por la formación de un par iónico con el Zn^{II} y de la energía libre de desolvatación.[385] Esto nos muestra cómo la enzima responde a la presencia del huésped evolucionando a un estado de menor energía y expulsando moléculas de agua del centro activo si es necesario. Pero, por otro lado, esas moléculas de agua pueden ser claves para mantener la estructura proteica en la conformación necesaria, jugando un rol proactivo.[386] Esto ocurre, por ejemplo, en el dominio catalítico de la proteína kinasa. Su conformación activa conserva seis moléculas de agua (Figura 59 Aw-Fw) que, aunque no intervienen en el mecanismo de transferencia de fosfato, trabajan de manera cooperativa para que los residuos catalíticos queden orientados de manera que la enzima cumpla su función.[387]

---

[382] a) Yan, L.; Saha, A.; Zhao, W.; Neal, J. F.; Chen, Y.; Flood, A. H.; Allen, H. C. *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 4283-4294. b) Damyanov, D.; Nikolova, V.; Angelova, S.; Dudev, T. *J. Mol. Liq.* **2021**, *335,* 166160. c) Neal, J. F.; Saha, A.; Zerkle, M. M.; Zhao, W.; Rogers, M. M.; Flood, A. H.; Allen, H. C. *J. Phys. Chem. A* **2020**, *124*, 10171-10180.

[383] a) Kubik, S. *ChemistryOpen* **2022**, *11, e2022000.* b) Cremer, P. S.; Flood, A. H.; Gibb, B. C.; Mobley, D. L. *Nat. Chem.* **2017**, *10*, 8-16. c) Conti Nibali, V.; Havenith, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12800-12807.

[384] a) Sun, C. Q.; Huang, Y.; Zhang, X. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, 268, 1-24. b) Ge, L.; Bernasconi, L.; Hunt, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 13169. c) Teychené, J.; Balmann, H. R.; Maron, L.; Galier, S. *J. Mol. Liq.* **2019**, *294*, 111394. d) Zhan, C. G.; Dixon, D. A. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 2020-2029.

[385] Fox, J. M.; Kang, K.; Sherman, W.; Héroux, A.; Sastry, G. M.; Baghbanzadeh, M.; Lockett, M. R.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3859-3866.

[386] Valero-González, J.; Leonhard-Melief, C.; Lira-Navarrete, E.; Jiménez-Osés, G.; Hernández-Ruiz, C.; Pallarés, M. C.; Yruela, I.; Vasudevan, D.; Lostao, A.; Corzana, F.; Takeuchi, H.; Haltiwanger, R. S.; Hurtado-Guerrero, R. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 240-246.

[387] Knight, J. D. R.; Hamelberg, D.; McCammon, J. A.; Kothary, R. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **2009**, *76*, 527-535.

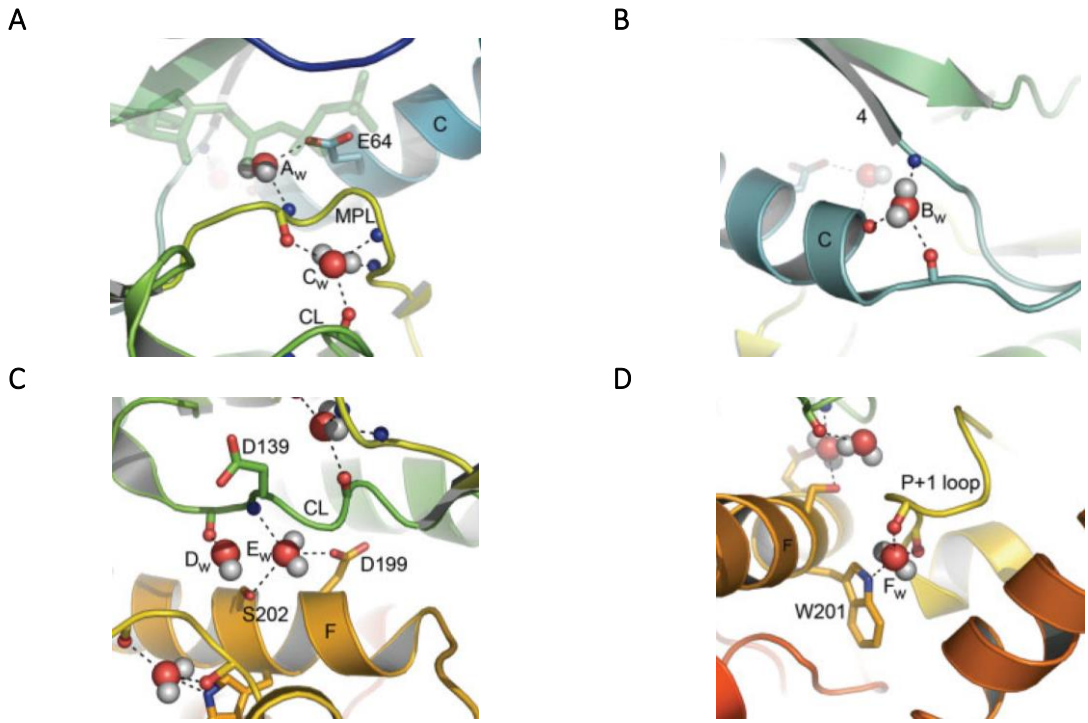


Figura 59. Moléculas de agua conservadas en el sitio catalítico de la proteína kinasa.[387] Imagen adaptada con permiso de la ref. 387, *Copyright ©2009 John Wiley and Sons.*

En los receptores sintéticos es muy poco frecuente observar que al agua juegue un papel activo en el sitio de unión, ya que normalmente es expulsada de este en favor de la interacción directa con el anión. Incluso el receptor puede presentar distintos modos de unión según se enfrente a un anión con mayor o menor tendencia a la solvatación.[388] Sin embargo hay algunas excepciones en las que se ha podido comprobar que el agua de hidratación sigue formando parte de la esfera de coordinación del anión tras la complejación, o que su presencia favorece la formación del ensamblado.[389] Gosh y colaboradores prepararon un receptor tripodal basado en una areno-triimida que dimerizaba en el proceso de encapsulación del anión, siendo capaz de acomodar dos nitratos o dos fluoruros. En el caso del fluoruro observaron que seis moléculas de agua permanecían en el interior de la cavidad formando un clúster.[390] En un trabajo posterior, han comprobado que el derivado hexapodal acoge cuatro aniones fluoruro en un entramado con seis moléculas de agua, donde los monómeros del receptor se encuentran desplazados uno con respecto al otro (Figura 60A).[391] Posteriormente, Gibb y colaboradores también describieron una estructura tipo calixareno extendido que acomoda aniones solvatados. En este caso, han comprobado que el número de moléculas de agua que siguen unidas al anión depende de lo fuertemente hidratados que estén estos (Figura 60B).[392]

[388] Wu, Y.; Zhang, C.; Fang, S.; Zhu, D.; Chen, Y.; Ge, C.; Tang, H.; Li, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202209078.
[389] Manna, U.; Das, G. *CrystEngComm* **2017**, *19*, 5622-5634.
[390] Arunachalam, M.; Ghosh, P. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 943-951.
[391] Chakraborty, S.; Dutta, R.; Wong, B. M.; Ghosh, P. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 62689-62693. CCDC: 996874.
[392] Sokkalingam, P.; Shraberg, J.; Rick, S. W.; Gibb, B. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 48-51.

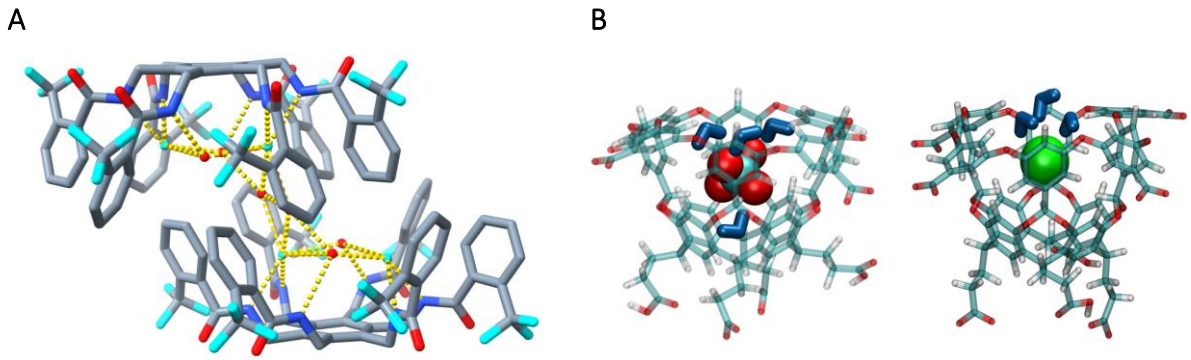


Figura 60. Complejos receptor-anión·n(H_2O). En la estructura representada en A, los enlaces de hidrógeno aparecen como líneas discontinuas en amarillo.[391,392] Para la Figura 60B, imagen adaptada con permiso de la ref. 392, *Copyright ©2016 American Chemical Society*

El papel del agua en los procesos de ensamblado y reconocimiento de aniones es un tema sobre el que aún queda mucho por esclarecer ya que su participación tiene un impacto multifactorial. Los investigadores intentan desentrañar estas contribuciones aproximándose todo lo posible a aquellos modelos naturales que sirven de estudio, pues operan coordinando aniones bajo un régimen acuoso. Estos modelos naturales son los transportadores de aniones a través de las membranas biológicas. Al principio de este apartado sobre reconocimiento de aniones se han comentado muy brevemente las diferentes aplicaciones que tienen estos receptores, una de ellas, que continúa en creciente auge debido a su importancia biológica, es el desarrollo de moléculas capaces de unirse al anión y transportarlo a través de membranas lipídicas.

4.6.1 Transporte de aniones

En la gran mayoría de organismos vivos, especialmente en aquellos en los que existe la compartimentalización, se producen fenómenos de transporte a través de las membranas lipídicas. Estas membranas son selectivas ya que solo dejan pasar cierto tipo de moléculas.[393] A su vez, la entrada o salida de estos analitos es fundamental para que el engranaje biológico funcione de manera adecuada, ya que otros procesos se desencadenarán a partir de su desplazamiento. Las células de los organismos vivos recurren a diferentes mecanismos de transporte según las características del analito. Así, las moléculas cargadas de gran tamaño entran y salen de las células siguiendo, principalmente, vías de secreción o endocíticas, como es el caso de las proteínas, oligosacáridos o ácidos nucleicos.[394] En el caso de los analitos polares o moléculas cargadas de pequeño tamaño, es necesaria la intervención de moléculas que actúan de mediadoras del proceso de transporte, que en términos exactos son proteínas transmembrana.[395] Estas proteínas, estructuralmente hablando, poseen una superficie externa hidrófoba que queda en contacto con los lípidos de la membrana. El canal interno,

[393] a) Hwang, S. T. *Korean J. Chem. Eng.* **2011**, *28*, 1-15. b) Pomorski, T.; Hrafnsdóttir, S.; Devaux, P. F.; Van Meer, G. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2001**, *12*, 139-148.

[394] a) Yang, N. J.; Hinner, M. J. *Methods Mol. Bio.* **2015**, *1266*, 29-53. b) Miaczynska, M.; Stenmark, H. *J. Cell Biol.* **2008**, *180*, 7-11.

[395] a) Altenbach, C.; Marti, T.; Khorana, H. G.; Hubbell, W. L. *Science* **1990**, *248*, 1088-1092. b) Saier, M. H. *J. Membr. Biol.* **2000**, *175*, 165-180.

generalmente hidrófilo, por el que transita la molécula transportada proporciona los sitios de unión específicos afines a esa molécula. Es posible diferenciar entre dos grandes grupos dentro de los transportadores, aquellos que trabajan en modo activo o los que actúan de forma pasiva, dependiendo de si requieren o no del consumo de energía. Los transportadores activos, son aquellos que trabajan en contra del gradiente osmótico, y por tanto requieren del aporte exterior de energía.[396] Su actividad genera una diferencia de potencial a ambos lados de la membrana y suelen denominarse como "bombas".[397] Por otro lado están los transportadores que realizan un transporte pasivo, a favor del gradiente de concentración, migrando las especies desde el lado de la membrana donde están más concentradas (Figura 61).[398]

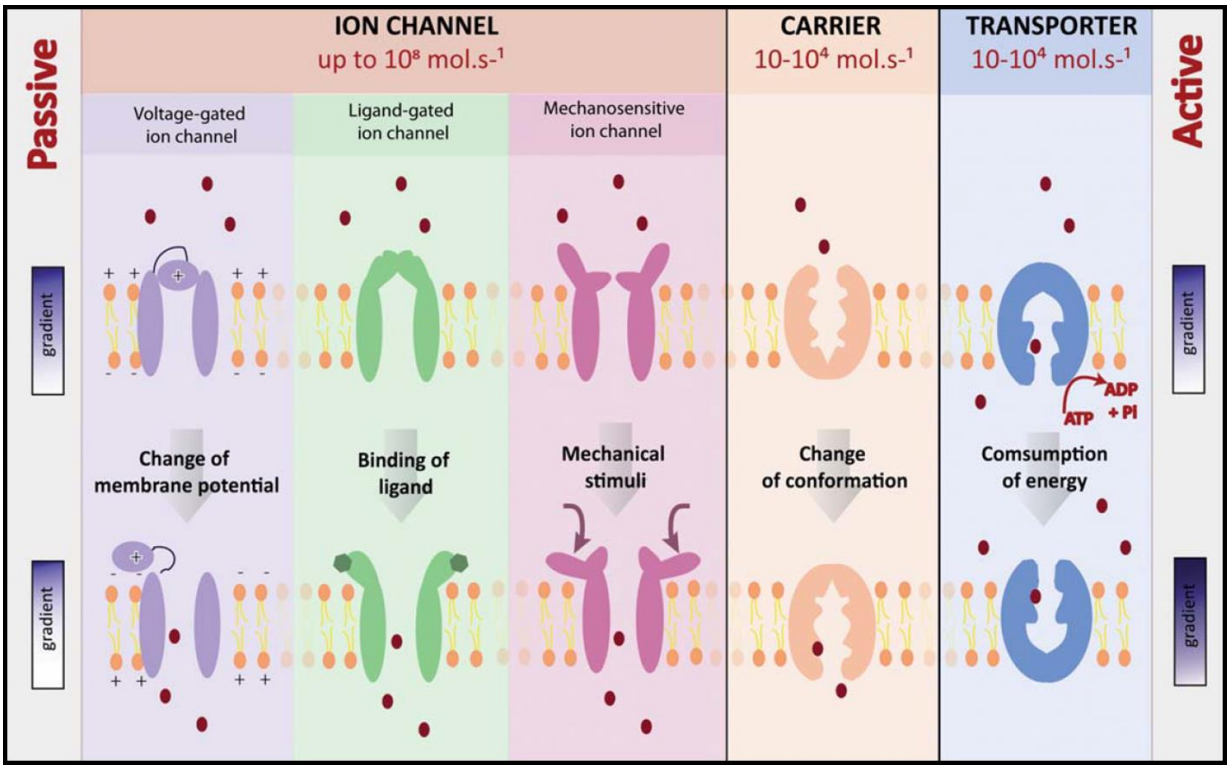


Figura 61. Diferentes tipos de transportadores.[399] Imagen adaptada con permiso de la ref. 399, *Copyright ©2011, Royal Society of Chemistry.*

[396] a) Kyte, J. *Nature* **1981**, *292*, 201-204. b) Forrest, L. R.; Krämer, R.; Ziegler, C. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2011**, *1807*, 168-188.

[397] a) Olesen, C.; Picard, M.; Winther, A. M. L.; Gyrup, C.; Morth, J. P.; Oxvig, C.; Møller, J. V.; Nissen, P. *Nature* **2007**, *450*, 1036-1042. b) Hernández, J. A.; Chifflet, S. *J. Membr. Biol.* **2000**, *176*, 41-52. c) Morth, J. P.; Pedersen, B. P.; Buch-Pedersen, M. J.; Andersen, J. P.; Vilsen, B.; Palmgren, M. G.; Nissen, P. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 60-70. d) Nishi, T.; Forgac, M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 94-103.

[398] a) Bernhardt, I.; Weiss, E. *Passive Membrane Permeability for Ions and Membrane Potential*. In *Red cell membrane transport in health and disease*, Springer, Heidelberg, Germany, **2003**, 83-119. b) Cocucci, E.; Kim, J. Y.; Bai, Y.; Pabla, N. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2017**, 101, 122-129. c) Tomkins, M.; Hughes, A.; Morris, R. J. *Plant. Physiol.* **2021**, *187*, 1973-1984.

[399] Demarche, S.; Sugihara, K.; Zambelli, T.; Tiefenauer, L.; Vörös, J. *Analyst* **2011**, *136*, 1077-1089.

Otra manera de clasificar los transportadores es por el número de analitos que transportan. Así, aquellos que transportan una sola molécula se denominan uniportadores, mientras que los que transportan dos especies en la misma dirección (generalmente una con carga positiva y otra con carga negativa) son simportadores y los que transportan dos analitos (ambos con la misma carga) en direcciones contrarias son antiportadores. Enfocando estos conceptos a los transportadores de aniones presentes en el organismo, especialmente al transporte de cloruro, nos encontramos con diferentes escenarios. Por un lado, tenemos la llamada familia de canales de cloruro, ClC, compuesta por nueve miembros (ClC 1-7, ClC-Ka y ClC-Kb).[400] La actividad transportadora de los canales de iones, en general, suele estar regulada por estímulos externos, que pueden ser mecánicos, involucrar la unión de un ligando, o la aplicación de voltaje (Figura 61). En el caso de la familia de los ClC (*chloride channels*), se activan por cambios de voltaje que induce un cambio conformacional hacia forma activa. Mientras que cinco de ellos son simportadores H^+/Cl^- (ClC 3-7), los otros cuatro son uniportadores de Cl^-. Las anomalías en su normal funcionamiento producen patologías, como la enfermedad de Bartter asociada a desajustes en los canales ClC-Ka y ClC-Kb.[401] Por otro lado, los canales de cloruro activados por calcio (CaCC) también son uniportadores y están relacionados con el buen funcionamiento del riñón y el corazón, ente otros tejidos.[402] El Maxi-Canal de cloruro tiene un poro de aproximadamente 1.3 nm que permite el paso de cloruro y otros aniones de mayor tamaño. Se caracteriza por una gran conductancia monocanal (esto es el potencial que abre el canal) de 300 a 400 pS, que se satura entre 580 y 640 pS al aumentar la concentración de Cl^-.[403] Otros tipos de canales de cloruro están regulados por el volumen de la célula (VRAC) o la fuerza iónica intracelular para ser activados como unitransportadores.[404] Posiblemente la enfermedad más comúnmente conocida derivada de un mal funcionamiento o mutación de una proteína transportadora de aniones es la fibrosis quística, que se produce por una alteración en el regulador transmembranal (CFTR).[405]

Esta proteína se encuentra embebida en la membrana lipídica y consta de dos dominios NBD (*nucleotide-binding domains*). Cuando una molécula de ATP se une a cada dominio, se produce la dimerización de los NBD y el canal CFTR se encuentra en su estado abierto (Figura 62), permitiendo el transporte de cloruro.[406] La mutación más común de esta proteína es la ΔF508, que conlleva la supresión de un residuo de fenilalanina. Esto se traduce en que la proteína se une peor a la membrana lipídica y el proceso de apertura del canal se ve dificultado.[407] Debido a esta disfunción, se producen problemas severos de obstrucción de las vías respiratorias

[400] a) Accardi, A.; Picollo, A. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2010, 1798, 1457-1464. b) Dutzler, R. *FEBS Lett.* 2007, *581*, 2839-2844.
[401] Jentsch, T. J. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2008, *43*, 3-36.
[402] Hartzell, C.; Putzier, I.; Arreola, J. *Annu. Rev. Physiol.* 2005, 67, 719-758.
[403] Sabirov, R. Z.; Okada, Y. *J. Physiol. Sci.* 2009, *59*, 3-21.
[404] Okada, Y.; Sato, K.; Numata, T. *J. Physiol.* 2009, 58, 2141-2149.
[405] Cuthbert, A. W. *Br. J. Pharmacol.* 2011, *163*, 173-183.
[406] Farkas, B.; Tordai, H.; Padányi, R.; Tordai, A.; Gera, J.; Paragi, G.; Hegedűs, T. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020, *77*, 765-778.
[407] Jih, K. Y.; Li, M.; Hwang, T. C.; Bompadre, S. G. R. *J. Physiol.* 2011, *589*, 2719-2731.

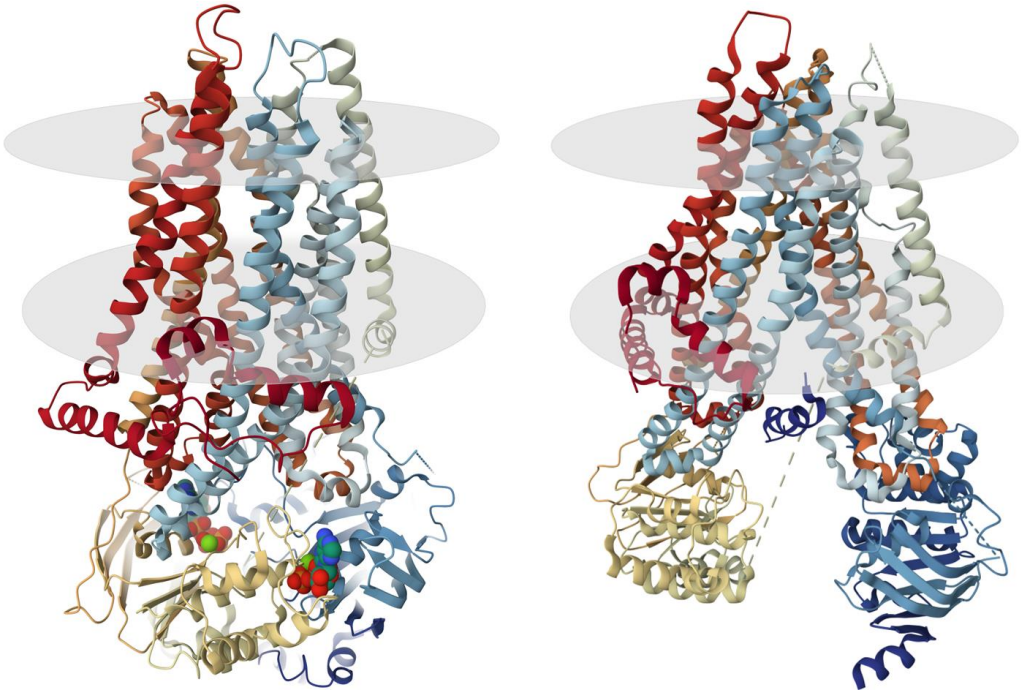


Figura 62. Regulador transmembranal de la fibrosis quística en sus estados abierto (izquierda, PDB: 5W81) y cerrado (derecha, PDB: 5UAK). Los discos representados en gris translúcido simbolizan la membrana lipídica. Las moléculas de ATP están representadas en modelo CPK.

Estos ejemplos que se han descrito son ilustrativos del transporte a través de canales transmembranales. Las proteínas están insertadas en la membrana y el analito cruza a través de su poro central. Por otra parte, moléculas mucho más sencillas que las proteínas también tienen su papel en el transporte, aunque mediante otro tipo de mecanismo. Hablamos de los ionóforos, que son moléculas de mucho menor tamaño que se unen al ion y lo ayudan a atravesar las membranas.[408] Este tipo de mecanismo es típico de las moléculas que actúan como antibióticos, como es el caso de la prodigiosina, comentada previamente.

Estos dos mecanismos naturales, pese a operar de manera diferente, evidencian un patrón similar en la manera óptima de permitir el paso del anión a través de la membrana. Se concluye que la exposición de residuos hidrófobos al contacto con los fosfolípidos, así como la agrupación de residuos hidrófilos en torno al anión, es positiva en términos de transporte eficiente. Se trata, por tanto, de minimizar las interacciones desfavorables, dejando al anión lo más encerrado posible dentro de un bolsillo hidrofílico adecuado, normalmente rico en dadores de enlaces de hidrógeno. Por su parte, el envoltorio hidrófobo del transportador se encarga del contacto favorable con las cadenas alquílicas de los fosfolípidos mientras atraviesa la membrana. Estas son dos de las premisas de un buen transportador, por ello los científicos que trabajan en el desarrollo de nuevas estructuras con este perfil buscan un comportamiento similar. Por tanto, será frecuente encontrar estructuras ricas en dadores de enlace de hidrógeno, pero con una parte hidrófoba. Además de esto, hay otros factores que influyen en el transporte, aunque aún se desconocen los detalles relativos a dicha influencia. Por ejemplo, cuando el transportador llega a la membrana, aunque tenga su parte hidrófila ocupada en la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[408] Rutkowski, J.; Brzezinski, B. *BioMed Res. Int.* **2013**, 162513.

complejación con el anión, debe producirse un primer contacto favorable con los extremos hidrófilos de los fosfolípidos, antes de insertarse en la parte central lipófila. Esto quiere decir que el transportador, de alguna manera, debe favorecer ese contacto, y si no es capaz, se traducirá, presumiblemente, en una disminución de su actividad. Otro aspecto a tener en cuenta es la afinidad del receptor por el anión. Entre los transportadores sintéticos más eficientes, es un denominador común su alta afinidad por el anión. Sin embargo, la eficiencia del transporte no siempre está ligada a una elevada afinidad.[409] Esto quiere decir que, tan importante es que el receptor se una de manera eficiente al anión como que pueda liberarlo en el momento apropiado. En términos cinéticos, hablamos de los parámetros K_{on} y K_{off}.[410] El primero engloba la capacidad del transportador para unirse al anión y llevarlo de un lado a otro de la membrana, mientras que el segundo manifiesta la reversibilidad del proceso y, por tanto, la capacidad del transportador para liberar al anión una vez transportado.

En cuanto a la parte técnica sobre cómo se determina si una molécula es capaz de transportar iones a través de una membrana, así como la eficiencia del transporte, se usan modelos que emulan a las bicapas lipídicas. Estos modelos son vesículas preparadas a partir de fosfolípidos, principalmente POPC, aunque también se pueden usar mezclas lipídicas o incluir colesterol para aportar rigidez y estabilidad. Experimentalmente, se crea una diferencia en el gradiente osmótico entre el medio intra- y extravesicular, y se comprueba si el transportador es capaz de equilibrar ese gradiente, recogiendo medidas de concentración de un ion involucrado en el proceso (si se utiliza un electrodo selectivo) o medidas de emisión de fluorescencia (si se utiliza un fluoróforo sensible a cambios en la concentración del ion involucrado). El experimento permitirá determinar la concentración del transportador que promueve el 50% del transporte, EC_{50}, y cuanto menor sea su valor, más eficiente será la especie estudiada. En la tercera sección de los resultados de esta tesis se detalla más ampliamente este tema, así como los diferentes experimentos para determinar ante qué tipo de transportador nos encontramos.

Con respecto a los transportadores artificiales que se han descrito, los más estudiados y que a la vez muestran muy buenas eficiencias en el transporte, son los derivados de la urea, que se mencionaron al principio del apartado 6.0 (Figura 54). La enorme mayoría de transportadores artificiales preparados hasta la fecha se han ideado para ser aptos para el transporte H^+/Cl^-, intentando alcanzar la eficiencia del ionófono natural prodigiosina (Figura 63, molécula **30**).[411] Además de la importancia a nivel biológico del cloruro, tiene una energía de hidratación moderada (ΔG= -315 kJ/mol), que lo hace más accesible que otros como SO_4^{2-} (ΔG= -1080 kJ/mol), $H_2PO_4^-$ (ΔG= -465 kJ/mol) o F^- (ΔG= -435 kJ/mol) para el transporte.[412] Algunos derivados bencimidazólicos de la prodigiosina, llamados perenosinas (Figura 63, moléculas **31**

[409] Behr, J. P.; Kirch, M.; Lehn, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 241-246. b) Gale, P. A.; Garric, J.; Light, M. E.; McNally, B. A.; Smith, B. D. *Chem. Commun.* **2007**, 1736-1738. c) Judd, L. W.; Davis, A. P. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2227-2229.

[410] Kampf, J. P.; Kleinfeld, A. M. *Physiology* **2007**, *22*, 7-14.

[411] a) Valkenier, H.; Akrawi, O.; Jurček, P.; Sleziaková, K.; Lízal, T.; Bartik, K.; Šindelář, V. *Chem* **2019**, *5*, 429-444. b) Van Rossom, W.; Asby, D. J.; Tavassoli, A.; Gale, P. A. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 2645-2650. c) Wu, X.; Judd, L. W.; Howe, E. N. W.; Withecombe, A. M.; Soto-Cerrato, V.; Li, H.; Busschaert, N.; Valkenier, H.; Pérez-Tomás, R.; Sheppard, D. N.; Jiang, Y. B.; Davis, A. P.; Gale, P. A. *Chem* **2016**, *1*, 127-146.

[412] Marcus, Y. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1991**, *87*, 2995-2999.

y **32**), son altamente eficientes, encontrándose en estudio como tratamiento experimental contra el cáncer.[413] Entre los receptores de aniones que incorporan urea, las tendencias en afinidad que se han destacado previamente (Figura 54), se ven reflejadas también en su capacidad como transportadores. Frente a un mismo esqueleto, los derivados tiourea son más eficientes (Figura 63, moléculas **33** y **34**).[411c,414] Al cambiar la urea por una escuaramida, la eficiencia se multiplica por 60 (Figura 63, molécula **35**).[411c, 414b] El aumento en el número de puntos de coordinación para el anión, junto con la acidificación de los protones de la urea, hacen que el receptor resulte 250 veces más eficaz frente al transporte H^+/Cl^- (Figura 63, molécula **33** *vs* **36**).[415]

En la línea de los receptores bipodales, Davis y colaboradores han podido comprobar que la longitud de las cadenas hidrofóbicas afecta a su actividad transportadora (similares a Figura 54, moléculas **6** y **7**).[416] Estas cadenas contribuyen, no solo a las interacciones hidrofóbicas con los fosfolípidos, sino también a la orientación de la parte hidrófila del receptor en la bicapa. Cuando las cadenas son muy cortas (C1-C4), se producen contactos entre las cabezas hidrófobas de los fosfolípidos y la parte polar del transportador, que posiblemente ralentizan la penetración del complejo a través de la membrana. Si son muy largas (C8-C10), parece que dificultan el giro del receptor cuando atraviesa la membrana. La longitud óptima se determinó en seis carbonos. Además, las estructuras de este tipo, por portar varios grupos NH, pueden ver modificada su actividad transportadora por cambios en el pH. Gale y Jolliffe lo comprobaron con tioescuaramidas y oxotioescuaramidas,[417] para las cuales encontraron mejores actividades que para sus análogos urea y tiourea.[418] Verificaron que, cuando el pH del medio es inferior a su pKa, estas estructuras tienen su punto álgido en actividad debido a la protonación, que aumenta la afinidad por el anión. Por encima del pKa, si los nitrógenos están completamente desprotonados, la repulsión electrostática con el anión bloquea el transporte (Figura 63, moléculas **37**-**39**).

[413] a) Jowett, L. A.; Howe, E. N. W.; Soto-Cerrato, V.; Van Rossom, W.; Pérez-Tomás, R.; Gale, P. A. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9397. b) Díaz De Greñu, B.; Hernández, P. I.; Espona, M.; Quiñonero, D.; Light, M. E.; Torroba, T.; Pérez-Tomás, R.; Quesada, R. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14074-14083.

[414] Busschaert, N.; Kirby, I. L.; Young, S.; Coles, S. J.; Horton, P. N.; Light, M. E.; Gale, P. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4426-4430.

[415] a) Howe, E. N. W.; Gale, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 10654-10660. b) Karagiannidis, L. E.; Haynes, C. J. E.; Holder, K. J.; Kirby, I. L.; Moore, S. J.; Wells, N. J.; Gale, P. A. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12050-12053.

[416] Edwards, S. J.; Marques, I.; Dias, C. M.; Tromans, R. A.; Lees, N. R.; Félix, V.; Valkenier, H.; Davis, A. P. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2004-20011.

[417] a) Busschaert, N.; Elmes, R. B. P.; Czech, D. D.; Wu, X.; Kirby, I. L.; Peck, E. M.; Hendzel, K. D.; Shaw, S. K.; Chan, B.; Smith, B. D.; Jolliffe, K. A.; Gale, P. A. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3617-3626. b) Elmes, R. B. P.; Busschaert, N.; Czech, D. D.; Gale, P. A.; Jolliffe, K. A. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10107-10110.

[418] Busschaert, N.; Kirby, I. L.; Young, S.; Coles, S. J.; Horton, P. N.; Light, M. E.; Gale, P. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4426-4430.

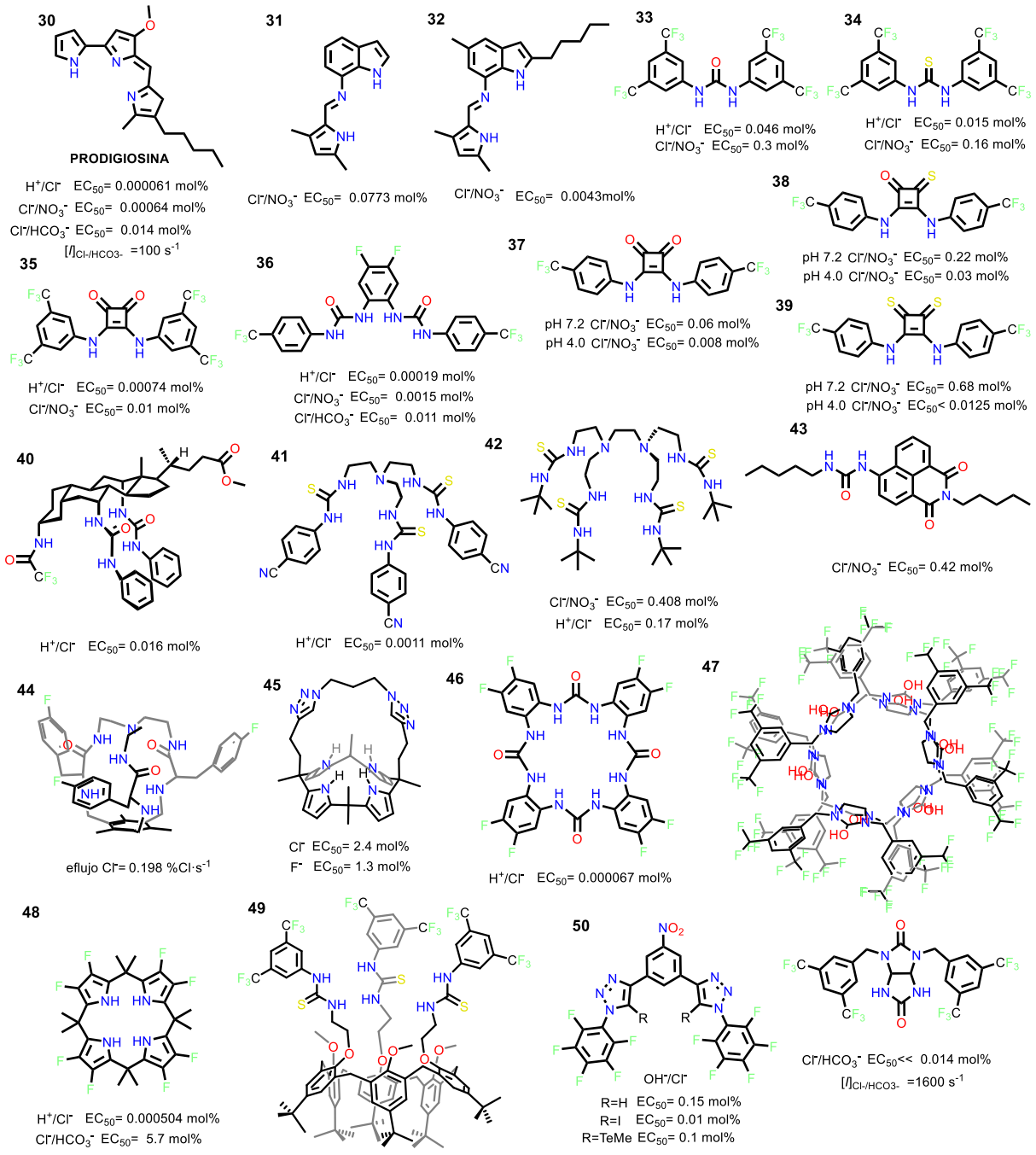


Figura 63. Transportadores de tipo ionóforo.[411-431]

Los transportadores de urea que envuelven al anión tridimensionalmente (Figura 63, moléculas **40**-**42**),[419] también dan lugar a buenos resultados, especialmente con aquellas tioureas tripodales y con grupos electroatractores en sus extremos. Gale y colaboradores han introducido fluoróforos en los transportadores con el objetivo de seguir su localización dentro de la célula (Figura 63, molécula **43**). Las cadenas alifáticas incorporadas ayudan a la permeación en la bicapa lipídica. Derivados con esqueleto similar son capaces de inducir la apoptosis en células tumorales de pulmón mediante su acción transportadora, gracias al

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[419] a) (**40** y **41**)[411c], c) (**42**)[349]

cambio de pH asociado a la misma.[420] Alfonso y colaboradores han estudiado recientemente una estructura tipo caja capaz de transportar de manera eficiente H^+/Cl^- (Figura 63, molécula **44**). Su actividad es dependiente del pH, mostrando una tasa de eflujo de cloruro de 0.121 $\%Cl \cdot s^{-1}$ a pH 7.2 y de 0.198 $\%Cl \cdot s^{-1}$ a pH 6.2, presumiblemente debido a la protonación de las aminas.[421] Como se ha comentado, no son abundantes los ejemplos de transportadores de aniones que tienen altos costes asociados a la deshidratación, sin embargo, cabe mencionar que en el grupo de Gale han preparado una estructura derivada del calixpirrol que incorpora una cadena alquílica con dos triazoles actuando de tapa, y que presenta selectividad $F^- > Cl^-$. Esta selectividad depende de la longitud de la cadena alquílica de la tapa (Figura 63, molécula **45**).[422] El mismo grupo ha sido capaz de preparar el transportador sintético de H^+/Cl^- más eficiente hasta la fecha (Figura 63, molécula **46**), una estructura macrocíclica que combina todos los puntos clave de los transportadores preparados en el grupo: varias unidades de urea, preorganización y grupos electroatractores.[423] Sobre esta estructura ya conocían su elevada afinidad por Cl^- (Figura 54, molécula **19**), este es un caso ilustrativo donde una alta afinidad está estrechamente relacionada con la eficiencia del transporte, aproximándose a la eficiencia que presenta la prodigiosina.

El transporte de bicarbonato a través de las membranas también suscita interés por su importancia a nivel biológico.[424] Por ejemplo, el canal CFTR y la prodigiosina son capaces de llevar a cabo su transporte. Sin embargo, el transporte Cl^-/HCO_3^- resulta más arduo que H^+/Cl^- y que Cl^-/NO_3^-, debido a que la deshidratación de bicarbonato supone un mayor coste energético que la de nitrato (ΔG_{NO3^-}= -300 kJ/mol y ΔG_{HCO3^-}= -335 kJ/mol). Este es el motivo por el cual, para los transportadores estudiados en ambos escenarios, la eficiencia Cl^-/NO_3^- es mayor que Cl^-/HCO_3^- (Figura 63, moléculas **30** y **36**). A pesar de esta dificultad, diversos investigadores han preparado estructuras capaces de transportar bicarbonato.[425] El más eficiente hasta la fecha, que supera con creces la actividad de la prodigiosina, es un bambisurilo decorado con múltiples grupos CF_3 (Figura 63, molécula **47**) preparado por Bartik y colaboradores.[411a] Los autores aducen que su actividad es tan alta que impedía determinar el valor de EC_{50}, aunque sí fue posible determinar la velocidad. A pesar de que, por su forma, se esperaba que se trate de un transportador formador de canales, los autores proponen un mecanismo tipo *carrier*, dado que, el aumento del porcentaje de colesterol en las membranas afectaba gravemente al transporte. Otro transportador de tipo macrocíclico, pero de mucho menor tamaño (Figura 63, molécula 48), fue probado en el grupo de Gale para el antiporte Cl^-/HCO_3^-.[426] Aunque es capaz de llevar a cabo el intercambio Cl^-/HCO_3^-, es más de 10.000 veces

[420] Berry, S. N.; Soto-Cerrato, V.; Howe, E. N. W.; Clarke, H. J.; Mistry, I.; Tavassoli, A.; Chang, Y. T.; Pérez-Tomás, R.; Gale, P. A. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5069-5077.

[421] Tapia, L.; Pérez, Y.; Bolte, M.; Casas, J.; Solà, J.; Quesada, R.; Alfonso, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 12465-12468.

[422] Clarke, H. J.; Howe, E. N. W.; Wu, X.; Sommer, F.; Yano, M.; Light, M. E.; Kubik, S.; Gale, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 16515-16522.

[423] Wu, X.; Small, J. R.; Cataldo, A.; Withecombe, A. M.; Turner, P.; Gale, P. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 15142-15147.

[424] Cordat, E.; Casey, J. R. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 423-439.

[425] Martínez-Crespo, L.; Valkenier, H. *ChemPlusChem* **2022**, *87*, e2022002.

[426] Gale, P. A.; Tong, C. C.; Haynes, C. J. E.; Adeosun, O.; Gross, D. E.; Karnas, E.; Sedenberg, E. M.; Quesada, R.; Sessler, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *13*, 3240-3241.

más eficiente para el simporte H^+/Cl^-,[427] lo cual desencadena la apoptosis por estrés osmótico en diferentes líneas celulares cancerígenas.

Respecto al transporte de pares iónicos, los requerimientos para que una sola molécula pueda llevar a cabo esta tarea son mucho más exigentes, ya que ha de poseer dos bolsillos con diferente carácter químico. Esto es, deben permitir la unión de una especie cargada negativamente y otra positivamente. Para el reconocimiento de los cationes, se suelen emplear esqueletos tipo éter corona, mientras que para el reconocimiento del anión, se recurre a calixpirroles o ureas.[428] Davis, Jabin, Bartik y colaboradores han usado un calix[6]areno para acoger al catión, y gracias a que estaba dotado de tres brazos con tioureas (Figura 63, molécula 49), también podía reconocer aniones, siendo capaz de transportar $PrNH_3^+Cl^-$ de manera eficiente.[429]

También cabe destacar el creciente uso del enlace halógeno como facilitador del transporte de aniones, siendo pioneros en este campo los trabajos de Matile.[430] La hidrofobicidad de los dadores de enlace halógeno juega a favor del transporte ya que se elimina el problema de la interacción desfavorable con la parte hidrófila de las membranas o con el agua, lo que reduce la eficiencia del transporte. En el grupo de Langton también estudian el transporte empleando este tipo de interacciones.[431] Han comprobado que el mismo esqueleto es 15 veces más activo para el transporte Cl^-/OH^- cuando actúa mediante enlace halógeno que cuando lo hace mediante enlace de hidrógeno (Figura 63, molécula **50**).[431b] Los autores argumentan que dada la baja basicidad de los triazoles como anionóforos, ($pk_{AH} \approx 0$-1), el transporte H^+/Cl^- es altamente improbable, lo que fue confirmado por diferentes ensayos de transporte, que también revelaron selectividad $Cl^- > OH^-$. El transportador es 5.3 veces más eficiente para Cl^- que para OH^-.

En las estructuras comentadas e ilustradas en la Figura 63, es recurrente el uso de átomos de flúor o grupos CF_3 en su estructura. Esta tendencia no es casual y obedece a dos motivos. Por un lado, acidifican los grupos dadores de enlace de hidrógeno, aumentando la afinidad por el anión, lo que en la mayoría de los casos se traduce en mejores eficiencias del transporte. Por otro lado, la presencia de esos grupos favorece la penetración del transportador a través de la membrana, ya que interaccionan de manera favorable con las cabezas polares de los fosfolípidos, y de esta forma abren paso a la entrada en la parte hidrófoba de la membrana.

[427] Park, S.-H.; Park, S.-H.; Howe, E. N. W.; Hyun, J. Y.; Chen, L.-J.; Hwang, I.; Vargas-Zuñiga, G.; Busschaert, N.; Gale, P. A.; Sessler, J. L.; Shin, I. *Chem* **2019**, *5*, 2079-2098.

[428] a) Kim, D. S.; Sessler, J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 532-546. b) Park, I. W.; Yoo, J.; Kim, B.; Adhikari, S.; Kim, S. K.; Yeon, Y.; Haynes, C. J. E.; Sutton, J. L.; Tong, C. C.; Lynch, V. M.; Sessler, J. L.; Gale, P. A.; Lee, C. H. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 2514-2523. c) Lee, J. H.; Lee, J. H.; Choi, Y. R.; Kang, P.; Choi, M. G.; Jeong, K. S. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 6403-6409. d) Zhu, J.; Wang, X. D.; Luo, J.; Ao, Y. F.; Wang, Q. Q.; Wang, D. X. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 8586-8590.

[429] Grauwels, G.; Valkenier, H.; Davis, A. P.; Jabin, I.; Bartik, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58,* 6921-6925.

[430] a) Jentzsch, A. V.; Emery, D.; Mareda, J.; Nayak, S. K.; Metrangolo, P.; Resnati, G.; Sakai, N.; Matile, S. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 905. b) Vargas Jentzsch, A.; Matile, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5302-5303.

[431] a) Bickerton, L. E.; Sterling, A. J.; Beer, P. D.; Duarte, F.; Langton, M. J. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 4722-4729. b) Bickerton, L. E.; Docker, A.; Sterling, A. J.; Kuhn, H.; Duarte, F.; Beer, P. D.; Langton, M. J. *Chemistry* **2021**, *27*, 11738-11745. c) Docker, A.; Langton, M. J. *Trends Chem.* **2023**, *5*, 792-794.

Por otra parte, además de los transportadores tipo ionóforo que fluctúan entre ambas caras de la membrana al realizar el transporte, se encuentran los transportadores formadores de canales, que operan bajo un mecanismo diferente. Se insertan en la membrana y permiten el paso del ion de manera, generalmente, electrogénica. Esto es, generando o disipando una diferencia de potencial. Poseen una estructura con un poro lo suficientemente grande como para actuar de canal para el paso de estos iones. La técnica comúnmente utilizada para detectar la formación de estos canales es el uso del *voltaje-clamp* sobre membranas planas. Con esta técnica, se crea una diferencia de potencial constante a ambos lados de la membrana lipídica que, induciendo el movimiento de iones, permite medir el flujo de corriente a través del canal formado por el transportador.[432]

Algunos de los sistemas empleados en la formación de canales se basan en el apilamiento de moléculas pequeñas, como se ilustra en los trabajos de Barboiu y Talukdar,[433] donde los monómeros establecen interacciones entre sí y con el ion formando una estructura que se extiende atravesando la membrana (Figura 64A). Alternativamente, el apilamiento de una sola estructura, gracias a la preorganización, ya puede dar lugar a ese canal, como observó Gong para un macrociclo aromático con funcionalización interna capaz de transportar HCl.[434] Recientemente, Leigh ha demostrado que la estructura bautizada como Estrella de David (Figura 64B) es capaz de formar canales transmembranales para transportar diferentes pares iónicos (M^+Cl^-). En concreto, transporta KCl con una actividad similar a algunos antibióticos.[435] Otros ejemplos se basan en una sola estructura que es capaz de atravesar por completo la membrana. Kim y colaboradores usaron una macrocaja con paredes de porfirina para inducir el transporte electrogénico de ioduro a través de la membrana (Figura 64C).[436] Riccardis, Tecilla e Izzo propusieron la formación de canales de 25-35 Å de longitud empleando un calixareno como unidad estructural básica. Dicho calixareno estaba decorado con largas cadenas de ácido cólico que facilitaban el transporte de Na^+.[437] Inspirados en estos trabajos, Wang y colaboradores han preparado una molécula de características estructurales similares, pero funcionalizada para el transporte de cloruro, intentando emular la capacidad de los canales de cloruro naturales (Figura 64D).[438]

[432] Chui, J. K. W.; Fyles, T. M. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 148-175.

[433] a) Saha, T.; Gautam, A.; Mukherjee, A.; Lahiri, M.; Talukdar, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 16443-16451. b) Zheng, S. P.; Jiang, J. J.; van der Lee, A.; Barboiu, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 18920-18926. c) Malla, J. A.; Umesh, R. M.; Yousf, S.; Mane, S.; Sharma, S.; Lahiri, M.; Talukdar, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 7944-7952.

[434] Wei, X.; Zhang, G.; Shen, Y.; Zhong, Y.; Liu, R.; Yang, N.; Al-Mkhaizim, F. Y.; Kline, M. A.; He, L.; Li, M.; Lu, Z. L.; Shao, Z.; Gong, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 2749-2754.

[435] August, D. P.; Borsley, S.; Cockroft, S. L.; Della Sala, F.; Leigh, D. A.; Webb, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 18859-18865.

[436] Benke, B. P.; Aich, P.; Kim, Y.; Kim, K. L.; Rohman, M. R.; Hong, S.; Hwang, I. C.; Lee, E. H.; Roh, J. H.; Kim, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7432-7435.

[437] Maulucci, N.; De Riccardis, F.; Botta, C. B.; Casapullo, A.; Cressina, E.; Fregonese, M.; Tecilla, P.; Izzo, I. *Chem. Commun.* **2005**, 1354-1356.

[438] Huang, W. L.; Wang, X. D.; Ao, Y. F.; Wang, Q. Q.; Wang, D. X. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 13273-13277.

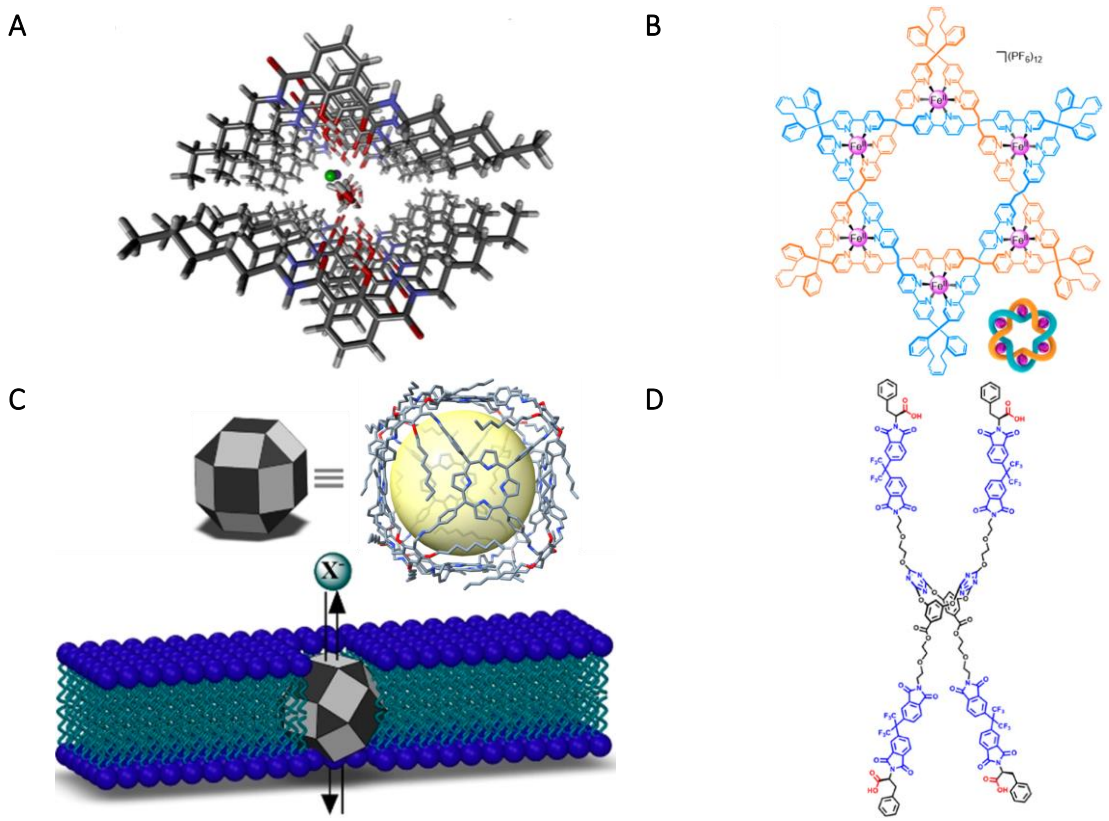


Figura 64. Transportadores formadores de canales transmembranales.[433c,435,436,438]. Imágenes adaptadas con permiso de ref. 433c, *Copyright © 2020 John Wiley and Sons*; ref. 436, *Copyright ©2017 American Chemical Society*; ref. 438, *Copyright ©2020 American Chemical Society.*

Por último, cabe mencionar el esfuerzo realizado por algunos investigadores por conseguir preparar transportadores cuya actividad pueda modularse mediante la aplicación de un estímulo.[439] Este es el escenario ideal en el que transcurren los procesos de transporte a nivel biológico. Aun estando presente el transportador, por ejemplo, en el caso de las proteínas formadoras de canales, este no se activa para su función hasta que no es necesario (Figura 61).

Los primeros autores en estudiar un transportador con actividad fotorregulada fueron Jeong y colaboradores, en 2014.[440] Mediante la irradiación de luz lograban la conversión de un isómero a otro con rendimientos >95%. El transporte solo se observaba en el caso del isómero *cis*, que dispone a ambos grupos dadores de enlace de hidrógeno orientados para la interacción con el ion (Figura 65A, izquierda). Langton ha usado la misma idea en una estructura donde sustituye urea por escuaramida. En este caso, los rendimientos de la isomerización son más bajos, aun así, el isómero *cis* presenta tres veces más actividad que el *trans* (Figura 65A, centro).[441] Recientemente, Gale ha estudiado este tipo de comportamiento usando el Stiff-estilbeno. Tras la irradiación, logran una conversión del 93% hacia el isómero *trans*, viéndose la eficiencia del transporte multiplicada por 30 (Figura 65A, derecha).[442]

[439] Langton, M. J. *Nat. Rev. Chem*. **2021**, *5*, 46-61.
[440] Choi, Y. R.; Kim, G. C.; Jeon, H. G.; Park, J.; Namkung, W.; Jeong, K. S. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15305-15308.
[441] Kerckhoffs, A.; Langton, M. J. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 6325-6331.
[442] Wezenberg, S. J.; Chen, L. J.; Bos, J. E.; Feringa, B. L.; Howe, E. N. W.; Wu, X.; Siegler, M. A.; Gale, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 331-338.

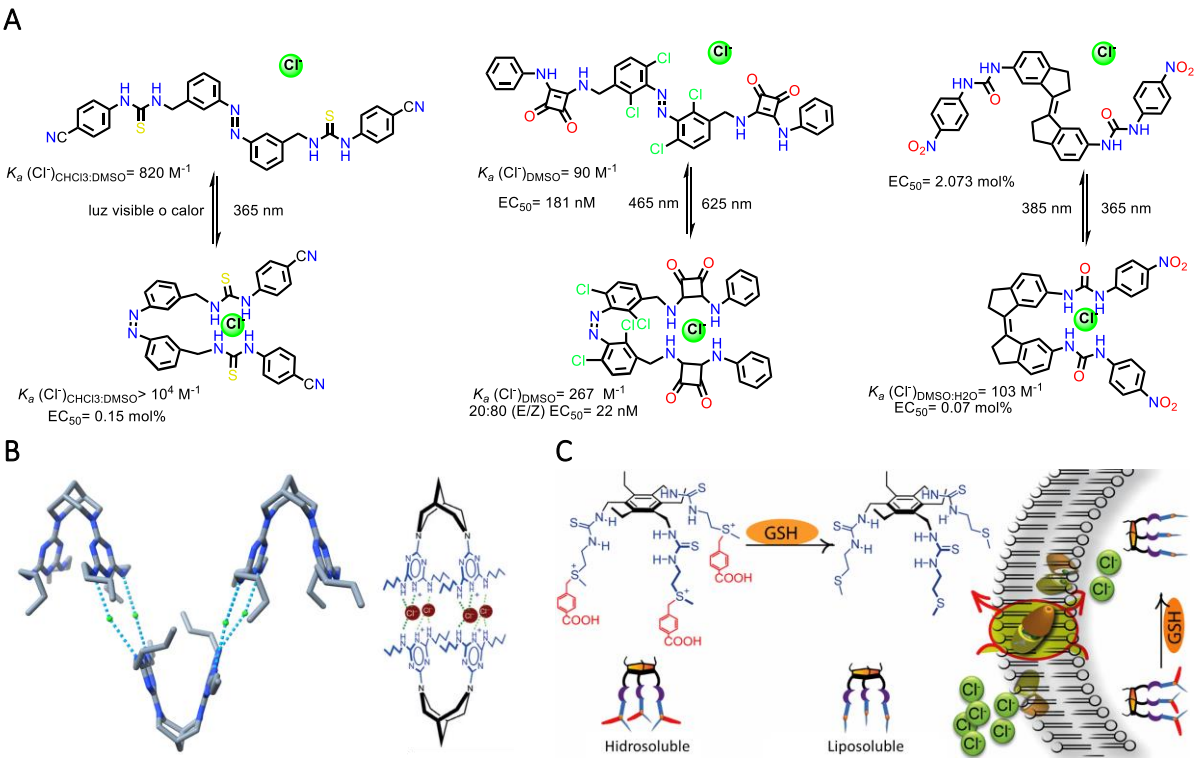


Figura 65. Transportadores con actividad modulable mediante diferentes estímulos.[440-444a] Para la figura 64B, imagen adaptada con permiso de la ref. 443, *Copyright © 2017 John Wiley and Sons*, y para la figura 64C, adaptada con permiso de ref. 444a, *Copyright ©2019 American Chemical Society.*

Otra manera de modular la actividad es mediante cambios en el pH como se comentó anteriormente para las oxo-, tio- y oxotioescuaramidas (Figura 63, moléculas **37**-**39**). Talukdar y colaboradores han publicado recientemente una bis(melamina) cuya capacidad de transporte es altamente dependiente del pH.[443] En la estructura cristalina que obtuvieron en presencia de HCl, se aprecia un ensamblado en forma de V, donde cuatro cloruros actúan de puente con los monómeros vecinos (Figura 65B). Para su actividad como transportador, según los resultados obtenidos del análisis de Hill, los autores proponen un modelo dimérico, donde el nitrógeno de la melamina más próximo a las aminas secundarias estaría protonado, favoreciendo la estabilización del anión. El pH óptimo para el transporte es de 7, ya que, a pH menor, el número de nitrógenos protonados en la triazina se incrementa, provocando repulsiones electrostáticas. Con el objetivo de activar el transporte solo en células cancerosas, Manna y colaboradores incluyen grupos protectores sensibles a glutatión a lo que llaman pro-transportadores, que es una *tris*-tiourea tripodal (Figura 65C).[444] Estos grupos protectores (*p*-carboxibenzaldehído) confieren al pro-transportador una elevada solubilidad en medio acuoso, por lo que, a pesar de poder acomodar al anión, no es capaz de insertarse en la membrana y llevar a término el transporte. En células cancerosas, debido a su elevada concentración de glutatión, se produce la desprotección, formándose el transportador liposoluble. Más recientemente, han

[443] Shinde, S. V.; Talukdar, P. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4238-4242.

[444] a) Akhtar, N.; Pradhan, N.; Saha, A.; Kumar, V.; Biswas, O.; Dey, S.; Shah, M.; Kumar, S.; Manna, D. *Chem. Commun.* **2019**, *55,* 8482-8485. b) Srimayee, S.; Badajena, S. R.; Akhtar, N.; Kar, M. K.; Dey, S.; Mohopatra, P.; Manna, D. *Chem. Commun.* **2023**, *59,* 12759-12762.

desarrollado nuevos transportadores donde combinan este tipo de estímulo con la fotoactivación mediante la incorporación de un grupo nitro en los grupos bencílicos.[445]

Finalmente, un conjunto de estructuras que se han estudiado tanto en el reconocimiento como en el transporte de iones son los ciclopéptidos (CPs) y pseudoderivados de ellos, estando el término ciclopéptido restringido a macrociclos con una secuencia unidireccional continua de aminoácidos a lo largo del anillo. Un ejemplo natural de este tipo de receptores es la valinomicina. Es un ciclo(pseudo)péptido compuesto por residuos de *D*- y *L*-valina, ácido α-*D*-hidroxiisovalérico y ácido *L*-láctico.[446] Es capaz de coordinarse con K^+ organizando su esqueleto de manera que seis oxígenos carbonílicos complejan al catión (Figura 66A, izquierda).[447] Actúa como transportador selectivo de este ion a través de un mecanismo tipo *carrier*, lo que le confiere actividad antibiótica.[448] Inspirado en la valinomicina, De Riccardis ha preparado un peptoide (estructura preparada mediante la *N*-sustitución en oligómeros de glicina[449]) cíclico que incorpora un residuo de *N*-bencilalanina como portador del único centro estereogénico en los seis residuos del anillo.[450] El ciclo adopta diferentes conformaciones en disolución, sin embargo, en presencia de Na^+, todos los grupos carbonilo se orientan hacia el interior en una conformación *all-trans*, complejando al catión (Figura 66A, derecha), algo que los autores relacionan con la preorganización que aporta el centro quiral. Así como estos dos ejemplos ilustran la capacidad para coordinar cationes de los esqueletos ciclopeptídicos, algunos investigadores han introducido modificaciones estructurales que potencian su capacidad como receptores de aniones.[451] En esta área, son especialmente relevantes los trabajos del profesor Stefan Kubik.[452] En su grupo, han explotado el reconocimiento de aniones mediante el uso de CPs que incluyen residuos de prolina, ácido 6-aminopicolínico o triazoles. En presencia del anión, el esqueleto peptídico se deforma en favor de la coalescencia de todos los hidrógenos amídicos en torno al anión. De este modo, han sido capaces de formar complejos donde dos unidades de CP envuelven a aniones como ioduro,[453] sulfato[454] o dihidrógenofosfato[455] (Figura 66B) en medios acuosos. Los ciclopéptidos estudiados por Kubik no se autoensamblan formando dímeros, ya que no cumplen el requisito de alternancia de quiralidad de los aminoácidos que conforman el macrocilo. Las características de los CPs autoensamblables se discutirán en detalle en la siguiente sección de esta introducción.

---

[445] a) Das, S.; Biswas, O.; Akhtar, N.; Patel, A.; Manna, D. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 9246-9252. b) Akhtar, N.; Biswas, O.; Manna, D. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 7446-7459.

[446] a) Pinkerton, M.; Steinrauf, L. K.; Dawkins, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, *35*, 512-518. b) Duax, W. L.; Hauptman, H.; Weeks, C. M.; Norton, D. A. *Science* **1972**, *176*, 911-914.

[447] Pletnev, V. Z.; Tsygannik, I. N.; Fonarev, I. D.; Mikhailova, I. I.; Kulikov, I. V.; Ivanov, V. T.; Langs, D. A.; Duax, W. L. *Bioorg. Khim.* **1995**, *21*, 828-833. CCDC: 1268637.

[448] a) Pressman, B. C.; Harris, E. J.; Jagger, W. S.; Johnson, J. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1967**, *58*, 1949-1956. b) Daniele, R. P.; Holian, S. K. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1976**, *73,* 3599-3602.

[449] Shin, S. B. Y.; Yoo, B.; Todaro, L. J.; Kirshenbaum, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3218-3225.

[450] D'Amato, A.; Pierri, G.; Costabile, C.; Della Sala, G.; Tedesco, C.; Izzo, I.; De Riccardis, F. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 640-643.

[451] Elmes, R. B. P.; Jolliffe, K. A. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4951-4968.

[452] Kubik, S. *Molecules* **2022**, *27*, 2821.

[453] Kubik, S.; Goddard, R.; Kirchner, R.; Nolting, D.; Seidel, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40,* 2648-2651. CCDC: 156899.

[454] Rodriguez-Docampo, Z.; Pascu, S. I.; Kubik, S.; Otto, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11206-11210. CCDC: 273684.

[455] Mungalpara, D.; Valkonen, A.; Rissanen, K.; Kubik, S. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 6005-6013. CCDC: 1555958

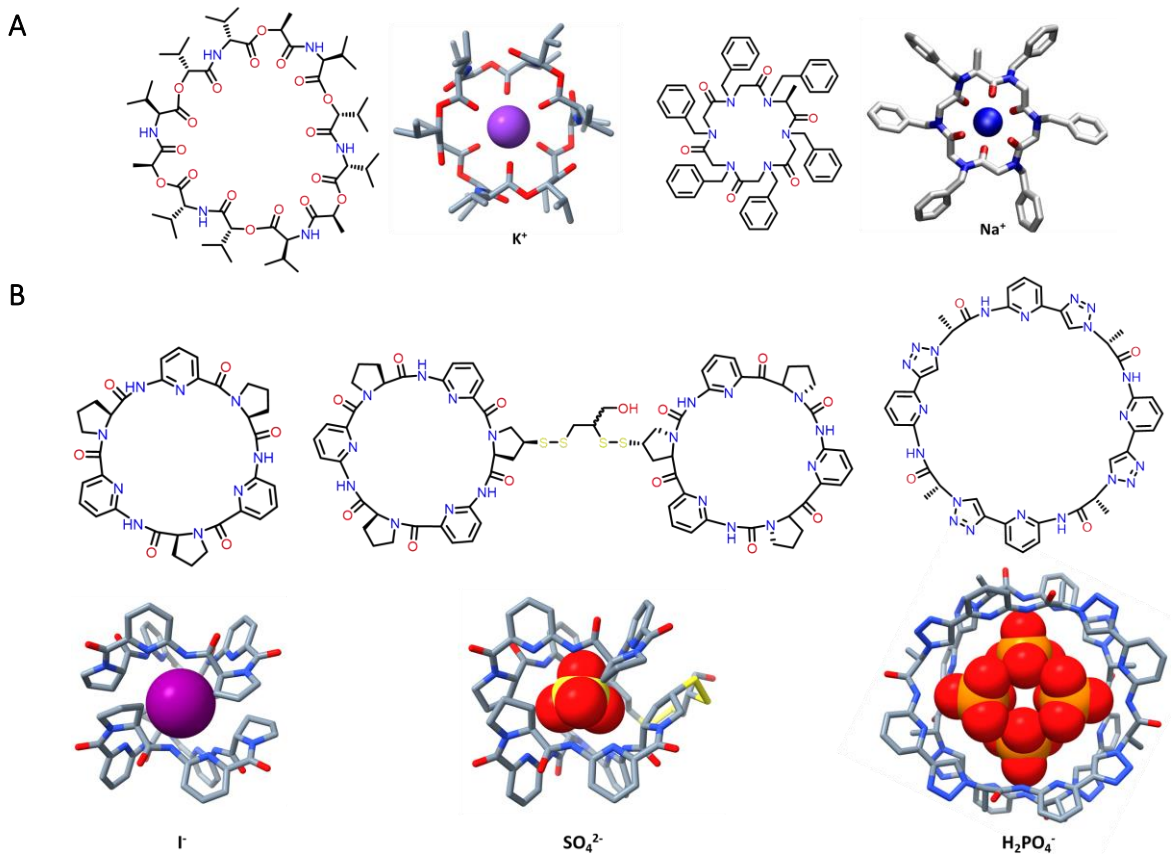


Figura 66. Ciclopéptidos receptores y/o transportadores de iones.[447,450,453-455]

4.7 Ciclopéptidos

La andadura de los ciclopéptidos como unidades autoensamblables comienza en 1974, cuando De Santis propone, en base a sus cálculos teóricos sobre la estructura helicoidal de la gramicidina, que las secuencias peptídicas con un número par de α-aminoácidos (α-Aa) de quiralidad alternada (entre *D* y *L*), deberían adoptar una conformación plana que facilitase el apilamiento de unos sobre otros.[456] Esto se basaba en que la dirección de los enlaces C=O y N-H era perpendicular al plano del anillo. Gracias a esto, era posible establecer enlaces de hidrógeno intermoleculares entre anillos. El apilamiento de las sucesivas unidades daría lugar a estructuras cilíndricas huecas. Posteriormente, en los trabajos experimentales de Lorenzi donde implementaron esta alternancia de quiralidad en tetrapéptidos, observaron por IR que las bandas para el protón amídico vibraban sobre los 3270-3290 cm^{-1}. Esto suponía que los protones amídicos deberían estar involucrados en la formación de enlaces de hidrógeno fuertes. Sin embargo, debido a la poca solubilidad de los ciclotetrapéptidos preparados, no se pudieron recoger más evidencias que confirmasen la hipótesis de De Santis.[457] El primer trabajo que demuestra la formación de estos ensamblados fue realizado en el grupo de Ghadiri, en 1993.[458] En este trabajo se empleó un ciclooctapéptido cuya secuencia incluía dos residuos de ácido glutámico, el *c*-[(*L*-Gln-*D*-Ala-*L*-Glu-*D*-Ala)$_2$]. Se partió de una disolución alcalina donde el

[456] De Santis, P.; Morosetti, S.; Rizzo, R. *Macromolecules* **1974**, *7*, 52-58.
[457] Tomasic, L.; Lorenzi, G. P. *Helv. Chim. Acta.* **1987**, *70*, 1012-1016.
[458] Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, *366*, 324-327.

péptido era completamente soluble debido a que los glutámicos estaban desprotonados. En estas condiciones no se formaban ensamblados debido a las repulsiones electrostáticas entre las cadenas de glutámico. La acidificación controlada de la disolución daba lugar a la aparición de microagujas que, tras ser analizadas por técnicas de microscopía, revelaron estar formadas por agrupaciones de nanotubos peptídicos alineados paralelamente. Cada CP se colocaba encima de otro con una distancia de ≈ 4.7 Å y, a su vez, la separación lateral entre nanotubos era de 14.9 Å. Este dato de distancia interpeptídica de 4.7 Å, sumado a la comparación del espectro de IR (amida I 1628 cm^{-1} y 1688 cm^{-1}, amida II 1540 cm^{-1} y tensión NH 3277 cm^{-1}) con el de la Gramicidina A (amida I 1630 cm^{-1} y 1685 cm^{-1}, amida II 1539 cm^{-1} y tensión NH 3285 cm^{-1}), de la que ya se conocía que era una hélice β antiparalela, llevaron a la conclusión de que los CPs se apilaban formando láminas β antiparalelas (Figura 67). El diámetro del poro, relacionado directamente con el número de residuos, era de entre 7-8 Å.

Poco después publicaron un segundo trabajo con una secuencia similar, pero esta vez con doce residuos, lo que proporcionaba nanotubos con un diámetro interno de 13 Å.[459] En estos dos casos, las cadenas laterales de glutamina cooperaban en el ensamblaje mediante enlaces de hidrógeno intra- e intertubulares (simbolizadas con R en la Figura 67, centro), por lo que estos residuos se mantuvieron en diseños posteriores, aunque sí se modificó el tipo de residuo hidrofóbico, lo que resultó no afectar a la formación de nanotubos, aunque sí a sus propiedades.[460]

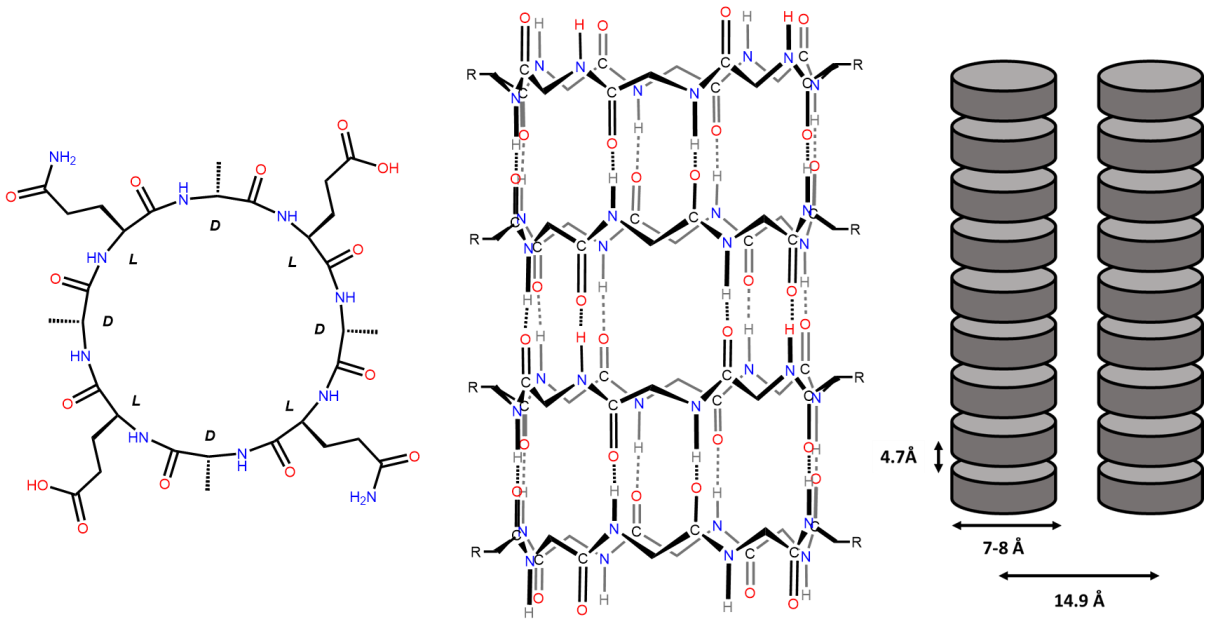


Figura 67. Primer nanotubo descrito a partir de un *D*,*L*-α-CP.[458]

El trabajo de Ghadiri pronto despertó el interés de otros investigadores en los ciclopéptidos capaces de formar nanotubos. Como se ha comentado, la condición necesaria para que un CP forme dímeros es que los enlaces C=O y N-H se dispongan perpendicularmente

[459] Khazanovich, N.; Granja, J. R.; McRee, D. E.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6011-6012.

[460] Hartgerink, J. D.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 43-50.

al plano del anillo. Aunque en el estudio original de Ghadiri los CPs estaban formados exclusivamente por α-Aas, estos no son el único tipo de aminoácidos que pueden dar lugar a CPs autoensamblables. Seebach estudió la formación de nanotubos a partir de β-CPs, empleando el ácido 3-aminobutanoico como único residuo para preparar un tetrapéptido. En este estudio, se prepararon tres CPs diastereoméricos. Uno de ellos contenía el mismo enantiómero repetido cuatro veces (*S*-*S*-*S*-*S*, Figura 68A), el segundo tenía quiralidad alternante (*S*-*R*-*S*-*R*), y el tercero tenía quiralidades repetidas dos a dos (*S*-*S*-*R*-*R*).[461] Solo uno de los CPs (el isómero *S*-*S*-*S*-*S*) adoptaba la conformación extendida esperada. Sin embargo, todos ellos eran capaces de formar nanotubos. Dado que los grupos NH y CO están separados por dos carbonos, ambos se orientan en sentido contrario, por lo que se obtienen láminas β paralelas. Aunque dos de los CPs no quedaban completamente extendidos, sino un poco deformados, la presencia del grupo metileno en β otorgaba mayor flexibilidad al CP para adoptar una conformación propicia para el apilamiento. Por tanto, se demostró que para los β-Aa, no era necesario el requisito de la alternancia de la quiralidad para que el CP resultante fuese capaz de autoensamblarse. Los β-CPs homoquirales hidrofóbicos son capaces de actuar como canales transmembrana,[462] tal como se había demostrado previamente para los *D*,*L*-α-CPs.[463] En todos estos casos, las cadenas laterales de triptófano eran importantes por sus interacciones con los grupos polares de la membrana (Figura 68B). Posteriormente, en el grupo de Kimura prepararon otros β-CPs homoquirales (Figura 68C-E) utilizando anillos rígidos de seis miembros derivados de azúcares,[464] los cuales permitían al nanotubo interaccionar con lectinas.[465] Con esta estrategia llegaron a preparar hexapéptidos, que también formaban nanotubos. Presumiblemente, los anillos de piranosa que incluyen estos diseños ayudan al CP a adoptar la conformación plana necesaria para ensamblarse.[466]

[461] Seebach, D.; Matthews, J. L.; Meden, A.; Wessels, T.; Baerlocher, C.; McCusker, L. B. *Helv. Chim. Acta.* **1997**, *80*, 173-182.

[462] Clark, T. D.; Buehler, L. K.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656.

[463] a) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. *Nature* **1994**, *369*, 301-304. b) Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785-10786.

[464] Fujimura, F.; Hirata, T.; Morita, T.; Kimura, S.; Horikawa, Y.; Sugiyama, J. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2394-2400.

[465] Fujimura, F.; Horikawa, Y.; Morita, T.; Sugiyama, J.; Kimura, S. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 611-616.

[466] Hirata, T.; Fujimura, F.; Horikawa, Y.; Sugiyama, J.; Morita, T.; Kimura, S. *Pept. Sci.* **2007**, *88*, 150-156.

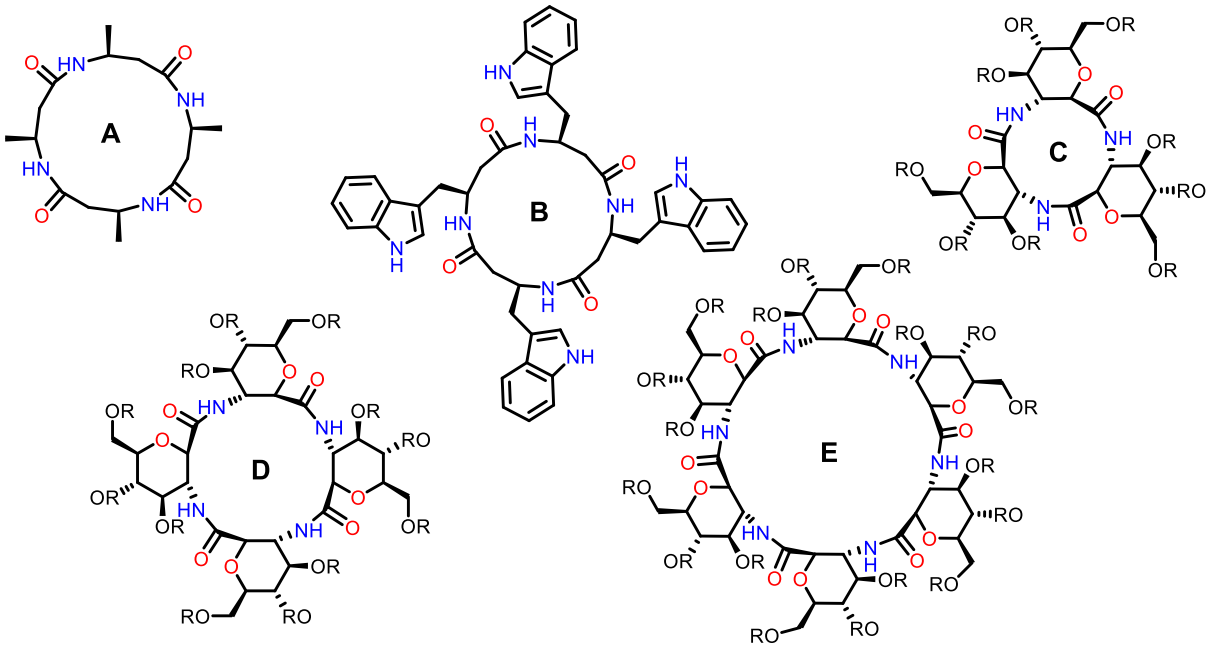


Figura 68. β-CPs homoquirales preparados por Seebach, Ghadiri y Kimura, todos ellos capaces de formar nanotubos.[461,463-466]

Desde estas primeras investigaciones sobre los CPs autoensamblables hasta la actualidad, ha habido un amplio recorrido en el estudio sobre sus propiedades, sobre los efectos que tiene realizar ciertas modificaciones en su estructura y, por supuesto, también sobre sus aplicaciones.[467] En la mayoría de ejemplos que podemos encontrar en bibliografía se emplean *D*,*L*-α-CPs para llevar a cabo estos estudios, ya que son, sintéticamente, más accesibles. Además, algunos *D*,*L*-α-CPs anfipáticos catiónicos presentan actividad antimicrobiana, relacionada íntimamente con su capacidad para apilarse.[468] Atendiendo al mecanismo de acción, un conjunto de CPs apilados se insertan en la membrana horizontalmente o de manera *carpet-like*, provocando su desestabilización por el aumento de la permeabilidad. Muchos de estos péptidos poseían una baja solubilidad, dificultando su utilización. Para solventar este problema en el grupo del profesor Juan Granja se diseñaron un conjunto de CPs constituidos por dos dominios bien definidos, uno con residuos hidrofóbicos y otro con residuos hidrofílicos, que presentaban buena actividad antimicrobiana (Figura 69A, $\mathbf{CP_A}$ *vs* $\mathbf{CP_B}$).[469] Esta distribución de los residuos favorece el contacto tanto con la parte polar de la membrana, como con las cadenas fofolipídicas, facilitando su inserción en las membranas.

[467] Song, Q.; Cheng, Z.; Kariuki, M.; Hall, S. C. L.; Hill, S. K.; Rho, J. Y.; Perrier, S. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 13936-13995.
[468] Fernandez-Lopez, S.; Kim, H.-S.; Choi, E. C.; Delgado, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Kraehenbuehl, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxen, K. M.; Ghadiri, M. R. *Nature* **2001**, *412*, 452-455.
[469] a) Claro, B.; González-Freire, E.; Calvelo, M.; Bessa, L. J.; Goormaghtigh, E.; Amorín, M.; Granja, J. R.; Garcia-Fandiño, R.; Bastos, M. *Colloids. Surf., B* **2020**, *196,* 111349. b) Claro, B.; Peón, A.; González-Freire, E.; Goormaghtigh, E.; Amorín, M.; Granja, J. R.; Garcia-Fandiño, R.; Bastos, M. *Colloids Surf., B* **2021**, *208*, 112086. c) González-Freire, E.; Novelli, F.; Pérez-Estévez, A.; Seoane, R.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 3029-2038. d) Claro, B.; González-Freire, E.; Granja, J. R.; Garcia-Fandiño, R.; Gallová, J.; Uhríková, D.; Fedorov, A.; Coutinho, A.; Bastos, M. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2022**, *1864*.

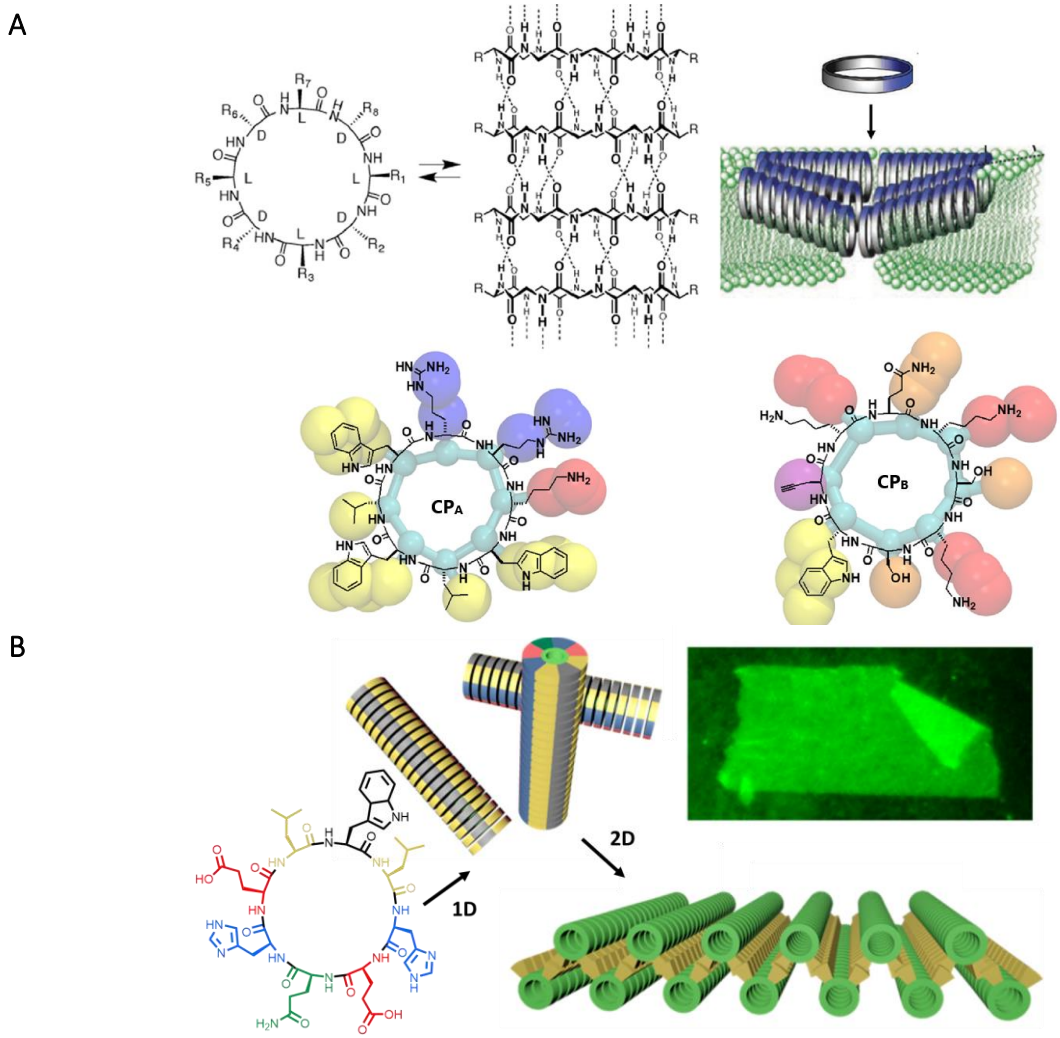


Figura 69. A) Esquema representativo del mecanismo *carpet-like* mediate el cual los CPs provocan la desestabilización de la membrana lipídica, que les confiere actividad antimicrobiana. **CP_A** mostró mayor actividad antimicrobiana que **CP_B**.[469a] Imagen adaptada con permiso de la ref. 469a, *Copyright © 2020 Elsevier.* B) *D*,*L*-α-CPs capaces de autoensamblarse para formar láminas.[470a] Imagen adaptada con permiso de la ref. 470a, *Copyright ©2020 American Chemical Society*.

En relación a la trascendencia que tiene la secuencia de residuos del CP, recientemente se ha descubierto que los *D*,*L*-α-CPs también pueden dar lugar a ensamblados bidimensionales por el apilamiento de hileras de nanotubos sobre otros, formando láminas (Figura 69B).[470] Según los estudios realizados, la correcta elección de la secuencia peptídica es fundamental para que tenga lugar tal proceso de ensamblaje. Son fundamentales los residuos hidrofóbicos que permiten el crecimiento 2D, así como residuos ácidos y básicos que conforman la coraza polar del ensamblado. Del mismo modo, los autores remarcan que el orden de estos residuos tampoco es trivial, ya que los dominios hidrofóbico e hidrofílico deben estar correctamente dispuestos para una interacción óptima entre CPs.

[470] a) Insua, I.; Montenegro, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 300-307. b) Díaz, S.; Insua, I.; Bhak, G.; Montenegro, J. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 14765-14770. c) Insua, I.; Bergueiro, J.; Méndez-Ardoy, A.; Lostalé-Seijo, I.; Montenegro, J. *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 3057-3068.

La estructura de los CPs ofrece diversas posibilidades de modificación estructural, sin embargo, la que más extensamente se ha explotado es la modificación de las cadenas laterales. Esta adaptación no impide su apilamiento, pero puede llegar a tener una enorme trascendencia en sus propiedades. De este modo, se han incorporado, por ejemplo, unidades aromáticas que favorece el ensamblaje peptídico por interacciones entre ellas. Así se ha observado en la formación de nanotubos con CPs que incorporan naftalenocarboxidiimida,[471] pireno,[472] fullereno[473], o tetratiafulvaleno (en estos ejemplos, no todos los CPs están compuestos exclusivamente por α-Aas) en sus cadenas laterales.[474] De los derivados con pireno se comprobó que pueden formar materiales híbridos por acoplamiento con nanotubos de carbono, servir de soporte para el crecimiento de clústeres de plata, o alinearse con proteínas tras la liberación de la plantilla aromática. Los CPs que contienen fullereno, naftalenocarboxidiimida o tetratiafulvaleno pueden explotarse como hilos conductores atendiendo a sus capacidades electrónicas.

Recientemente se han estudiado una variedad de *D*,*L*-α-CPs que incorporan naftleno, antraceno o pireno como fragmento aromático para la formación de hidrogeles a partir de nanotubos peptídicos. La formación de estos geles responde a cambios de pH, ya que la presencia de histidinas protonadas guía la formación de enlaces de hidrógeno entre tubos (Figura 70A).[475] Los estudios comparativos entre las tres unidades aromáticas, de manera que un CP incluye una o dos unidades del mismo areno, mostraron que el grado de hidrofobicidad era determinante en las propiedades viscoelásticas del gel formado, así como para el crecimiento de nanotubos, cuya longitud favorecía la formación de redes fibrosas más densas.[476] Por otra parte, en un estudio con un *D*,*L*-α,β-CP funcionalizado con antraceno, se ha demostrado que es posible inducir curvatura en los nanotubos haciendo uso de la irradiación.[477] El apilamiento de este CP llevaba al contacto π-π de los antracenos, de manera que quedaban predispuestos para la fotodimerización. Tras la irradiación, se observó que los nanotubos se curvaban (Figura 70B), como consecuencia de la cicloadición [4+4] de los anillos antracénicos inducida por la luz, cuyo cicloaducto ocupaba un volumen diferente a los de los apilados aromáticos.

[471] Ashkenasy, N.; Horne, W. S.; Ghadiri, M. R. *Small* **2006**, *2*, 99-102.
[472] a) Montenegro, J.; Vázquez-Vázquez, C.; Kalinin, A.; Geckeler, K. E.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2484-2491. b) Cuerva, M.; García-Fandiño, R.; Vázquez-Vázquez, C.; López-Quintela, M. A.; Montenegro, J.; Granja, J. R. *ACS Nano* **2015**, *9*, 100834-10843. c) Priegue, J. M.; Louzao, I.; Gallego, I.; Montenegro, J.; Granja, J. R. *Org. Chem. Front.* **2022**, *9*, 1226-1233.
[473] Reiriz, C.; Brea, R. J.; Arranz, R.; Carrascosa, J. L.; Garibotti, A.; Manning, B.; Valpuesta, J. M.; Eritja, R.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11335-11337.
[474] Uji, H.; Kim, H.; Imai, T.; Mitani, S.; Sugiyama, J.; Kimura, S. *Biopolymers* **2016**, 275-282.
[475] Méndez-Ardoy, A.; Granja, J. R.; Montenegro, J. *Nanoscale Horiz.* **2018**, *3*, 391-396.
[476] Bayón-Fernández, A.; Méndez-Ardoy, A.; Alvarez-Lorenzo, C.; Granja, J. R.; Montenegro, J. *J. Mater. Chem. B* **2022**, *11*, 606-617.
[477] Novelli, F.; Vilela, M.; Pazó, A.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 18838-18844.

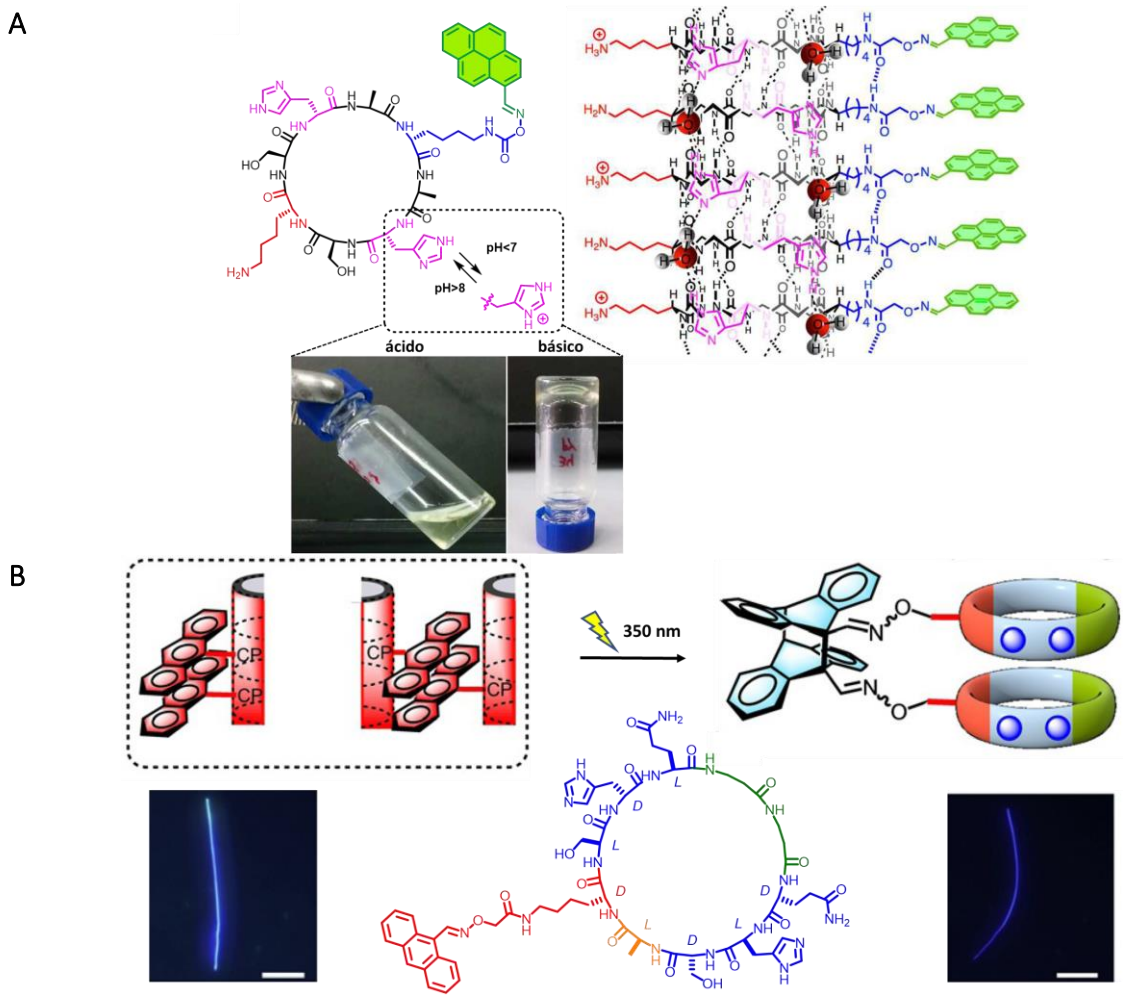


Figura 70. Estructuras obtenidas a partir de los nanotubos formados por CPs que incluyen motivos aromáticos en sus cadenas laterales, modificando así su cara externa.[475,477] Imágenes adaptadas con permiso de ref. 475, *Copyright ©2018 Royal Society of Chemsitry* y ref. 477, *Copyright ©2021 John Wiley and Sons.*

Como se comentaba previamente en el caso de los CPs con actividad antimicrobiana, la correcta disposición de los residuos les permite interaccionar con la membrana lipídica. Desde hace años, se conoce que algunos CPs pueden cruzar la membrana lipídica y acumularse en ciertas regiones de la célula, sin provocar, por ellos mismos, su muerte. Esto ha despertado el interés de muchos investigadores en emplear los CPs como transportadores de fármacos (*drug delivery*) o en preparar bioconjugados entre el CP y el fármaco que puedan incrementar la actividad que este último tendría por separado.[478] De este modo, el fármaco suele anclarse covalentemente al péptido a través de sus cadenas laterales. Perrier, Jolliffe y Stenzel llevaron a cabo el primer estudio donde se ponía a prueba este concepto, incorporando varias unidades de un complejo anticancerígeno de rutenio en cada CP. Los nanotubos que se formaban por el apilado de estos CPs mostraron 10 veces más eficiencia que el agente anticancerígeno por

[478] a) Peraro, L.; Kritzer, J. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 11868-11881. b) Dougherty, P. G.; Sahni, A.; Pei, D. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 10241-10287. c) Dougherty, P. G.; Wen, J.; Pan, X.; Koley, A.; Ren, J. G.; Sahni, A.; Basu, R.; Salim, H.; Appiah Kubi, G.; Qian, Z.; Pei, D. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 10098-10107.

separado.[479] Alternativamente, también se recurre a diferentes estímulos para provocar la liberación del fármaco una vez dentro de la célula. También en el grupo de Perrier se ha llevado a cabo, recientemente, un trabajo que ilustra esta posibilidad, a la vez que muestra la elevada sofisticación de los ensamblados peptídicos que se pueden llegar a conseguir a través de un diseño racional de su estructura. Para ello se empleó un CP que contenía, principalmente residuos hidrofóbicos, y dos residuos de lisina situados en regiones opuestas del macrociclo, a través de los cuales se introdujeron una cadena hidrofílica y otra hidrofóbica. Se comprobó que el CP resultante era capaz de formar tubisomas formados por nanotubos (Figura 71), y que este ensamblado era biocompatible.

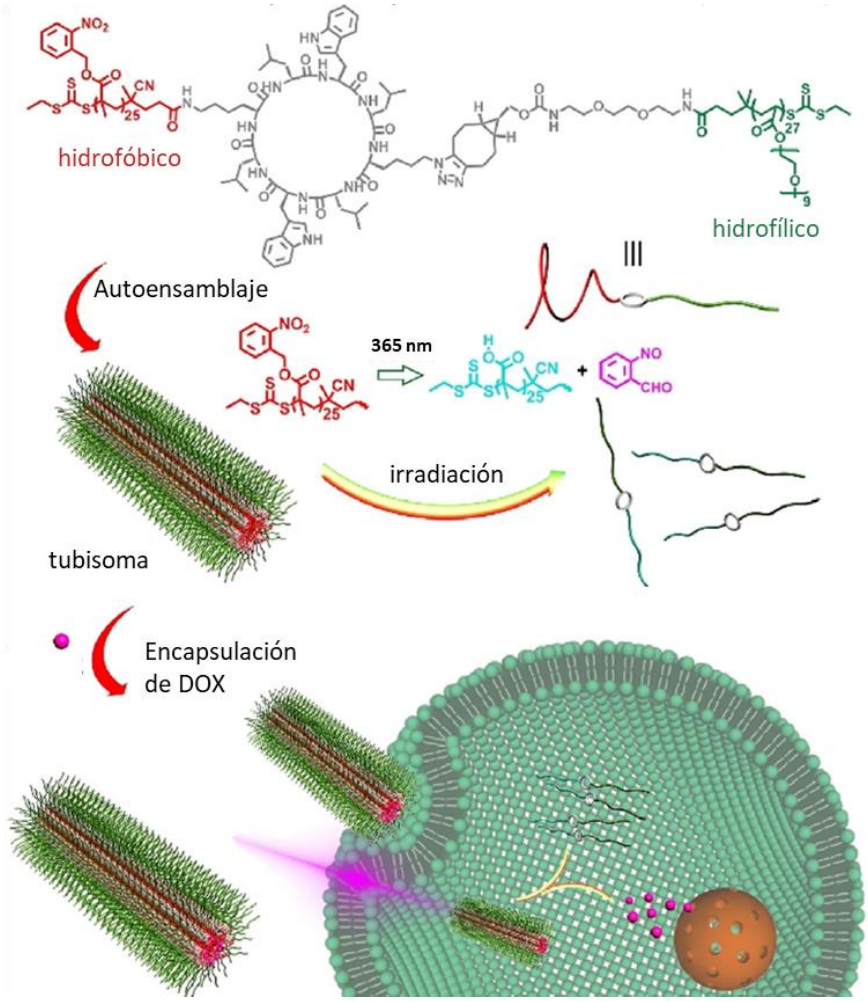


Figura 71. Sistema *drug-delivery* de doxorrubicina desarrollado en el grupo de Perrier.[481] Figura adaptada con permiso de la ref. 481, *Copyright ©2021 John Wiley and Sons.*

Las hileras de nanotubos se agrupaban entre sí dejando las cadenas hidrófobicas orientadas hacia el interior del tubisoma, de manera que, tanto los enlaces de hidrógeno como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[479] Blunden, B. M.; Chapman, R.; Danial, M.; Lu, H.; Jolliffe, K. A.; Perrier, S.; Stenzel, M. H. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 12745-12749.

el efecto hidrofóbico cooperaban en la formación de este ensamblado.[480] Posteriormente, demostraron que el interior del tubisoma era apropiado para albergar doxorrubicina, un conocido agente anticancerígeno, mediante interacciones hidrofóbicas.[481] En esta ocasión, la cola hidrofóbica del CP era fotosensible, gracias la incorporación de 2-nitrobencil-metacrilato. De este modo, la irradiación del ensamblado a 365 nm provocaba una alteración irreversible en el carácter químico del interior del tubisoma, que ya no mantenía su hidrofobicidad (Figura 71). Esto provocaba su desensamblado y la consecuente liberación de la doxorrubicina en el interior celular.

El potencial que deriva de la capacidad de los CPs de autoensamblarse en nanotubos, continúa siendo objeto de estudio, siendo sus aplicaciones biológicas el terreno más explorado,[467] dado que, dependiendo de su estructura, pueden ser biocompatibles. Sin embargo, otros investigadores han desarrollado líneas de trabajo donde examinan el potencial de las estructuras derivadas del nanotubo más sencillo posible, un dímero formado por el ensamblaje de dos únicas unidades ciclopeptídicas.

Esta área de investigación comienza a raíz del interés que surge en el grupo de Ghadiri, tras haber confirmado que los *D*,*L*-α-CPs eran capaces de formar nanotubos, en poder estudiar el proceso de ensamblaje entre los ciclopéptidos llevándolo al más sencillo nivel. Del patrón de ensamblaje de los CPs (Figura 67) se puede observar que los grupos NH y C=O de residuos de la misma quiralidad quedan todos orientados hacia la misma cara. De este modo, la sustitución de los protones amídicos por un grupo metilo en residuos homoquirales deshabilita una de las caras del CP para poder formar enlaces de hidrógeno. Esto implica que no se formará un nanotubo sino un dímero. Así se comprobó experimentalmente cuando se obtuvo la estructura cristalina del dímero formado a partir del *c*-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}*N*-Ala)$_4$] (**1**) (Figura 72).[482] Para este ciclopéptido se encontró en disolución ($CDCl_3$) una mezcla de dímero y monómero, cuya relación dependía de su concentración y que se diferenciaban claramente debido al desplazamiento químico de los protones NH de ambas especies, situándose a 6.98 ppm para el monómero y 8.73 para el dímero. Además, se comprobó por FTIR que la banda para los enlaces N-H vibraba a 3312 cm^{-1}, lo que indicaba la formación de enlaces de hidrógeno fuertes. Estudiando la distribución entre ambas especies dependiendo de la temperatura, se observó que los enlaces de hidrógeno intermoleculares hacían que el proceso de dimerización fuese favorable entálpicamente ($\Delta H°_{298}$= -11.0 kcal/mol) y compensaba el coste entrópico ($\Delta S°_{298}$= -2.37·10^{-3} kcal/mol). El apilamiento dimérico del *c*-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}*N*-Ala)$_4$] (**1**) daba lugar a una estructura de lámina-β antiparalela, ya que solo podía darse la interacción homodimérica. Para comprobar la estabilidad relativa con la lámina-β paralela, se preparó el enantiómero *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-Ala)$_4$] (**2**) (Figura 72) y se mezcló equimolarmente con el *c*-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}*N*-Ala)$_4$] (**1**) para dar lugar a la especie heterodimérica (**1-2**). El protón NH de este heterodímero (paralelo) resonaba a 8.49 ppm, revelando un enlace algo más débil que el homodimérico (8.73 ppm). Los estudios termodinámicos determinaron que la estructura paralela era menos estable que los correspondientes homodímeros por una diferencia de en torno a 0.8 kcal/mol en el valor de

[480] Brendel, J. C.; Sanchis, J.; Catrouillet, S.; Czuba, E.; Chen, M. Z.; Long, B. M.; Nowell, C.; Johnston, A.; Jolliffe, K. A.; Perrier, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 16678-16682.

[481] Yang, J.; Song, J. I.; Song, Q.; Rho, J. Y.; Mansfield, E. D. H.; Hall, S. C. L.; Sambrook, M.; Huang, F.; Perrier, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 8860-8863.

[482] Ghadiri, M. R.; Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Chadha, R. K.; McRee, D. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 93-95.

$\Delta G°_{293}$. Además, esta menor estabilidad no estaba influida por las cadenas laterales, como demostraron incluyendo alaninas en la secuencia.[483] La incorporación de las alaninas lleva a un CP de menor simetría, que puede formar dos heterodímeros diferentes, siendo diastereoisómeros entre sí. Estos dímeros se diferencian en el apilamiento relativo de los aminoácidos. En uno de ellos, los residuos de fenilalanina de los dos monómeros quedan apilados entre sí, así como los residuos de alanina. Sin embargo, en el otro diasteroisómero, los residuos de fenilalanina se encuentran formando enlaces de hidrógeno con los de alanina. Ambos dímeros se obtuvieron en una relación equimolecular, lo que sugería que la interacción entre las cadenas laterales no jugaba un papel determinante. Para el homodímero (lámina antiparalela) se determinó una constante de $2.54 \cdot 10^3$ M^{-1}, mientras que, para el heterodímero (lámina paralela), el valor fue de $6.40 \cdot 10^2$ M^{-1}, ambos en $CDCl_3$.

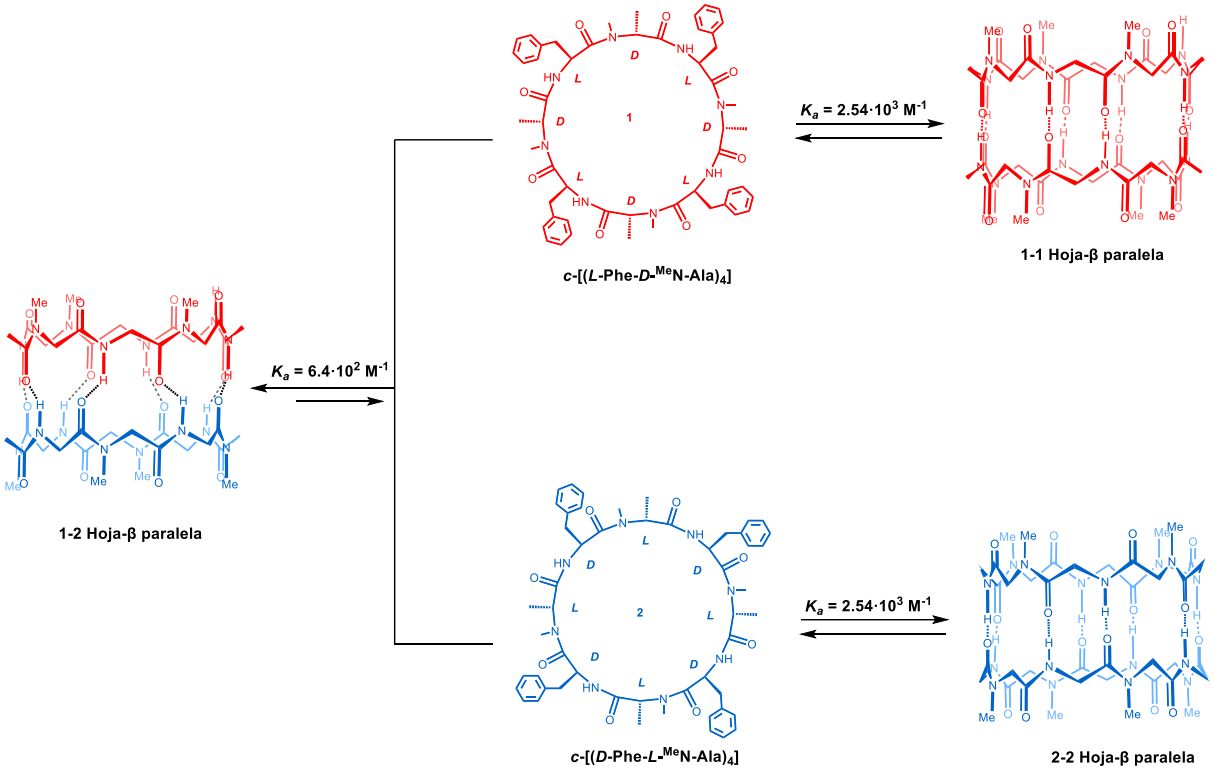


Figura 72. Dimerización entre los enantiómeros *c*-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}*N*-Ala)$_4$] (**1**) y *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-Ala)$_4$] (**2**). Los homodímeros dan lugar a una estructura tipo hoja-β antiparalela, mientras que la heterodimerización da lugar al análogo paralelo.[482]

Años más tarde, los dímeros ciclopeptídicos fueron estudiados en el grupo de Juan Granja, en este caso, empleando *D*,*L*-α,γ-CPs. La investigación comenzó tomando el ácido 3-aminociclohexanocarboxílico (nos referiremos a él como Ach), que presenta tres carbonos entre sus grupos amino y carbonilo, tratándose por tanto de un γ-Aa. Al contrario que los β-Aa, este aminoácido, una vez incorporado en el esqueleto ciclopeptídico, orientaría sus grupos C=O y NH hacia la misma cara del CP, de manera análoga a los α-Aa. Además, dejaría un grupo metileno apuntando al interior de la cavidad del ensamblado resultante. Debido a la rigidez que aporta el aminoácido no natural, se decidió combinar el isómero (1*R*,3*S*) con un α-Aa de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[483] Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 95-98. CCDC: 157105.

quiralidad *R* (*D*-) para que adoptase la conformación plana que permite el ensamblaje. Fue por ello por lo que se decidió denominar al isómero (1*R*,3*S*) del ácido-3-aminociclohexanocarboxílico como *L*-γ-Ach-OH. La alternancia de residuos en los *D*,*L*-α,γ-CPs hace que todos los grupos C=O y NH de los *D*-α-Aa estén orientados hacia una de las caras del CP, y los del *L*-γ-Aa, hacia la contraria. Esto determina que estos anillos tengan dos caras diferentes, α y γ, según qué grupos amida quedan expuestos para formar los enlaces de hidrógeno. Considerando la diferente separación entre los grupos dadores (NH) y aceptores (C=O) de estos residuos, se consideró que las caras γ interaccionarían con otras caras γ, y que, del mismo modo, se produciría la interacción α-α. Por lo tanto, el apilamiento debería dar lugar a láminas antiparalelas. Para estudiar esto, se decidió preparar modelos sencillos usando CPs *N*-metilados (Figura 73).[484] De esta forma, el empleo de γ-Ach metilado permitió estudiar las interacciones entre caras α, del mismo modo que el empleo de ^{Me}*N*-Ala permitió el estudio de las interacciones a través de las caras γ.

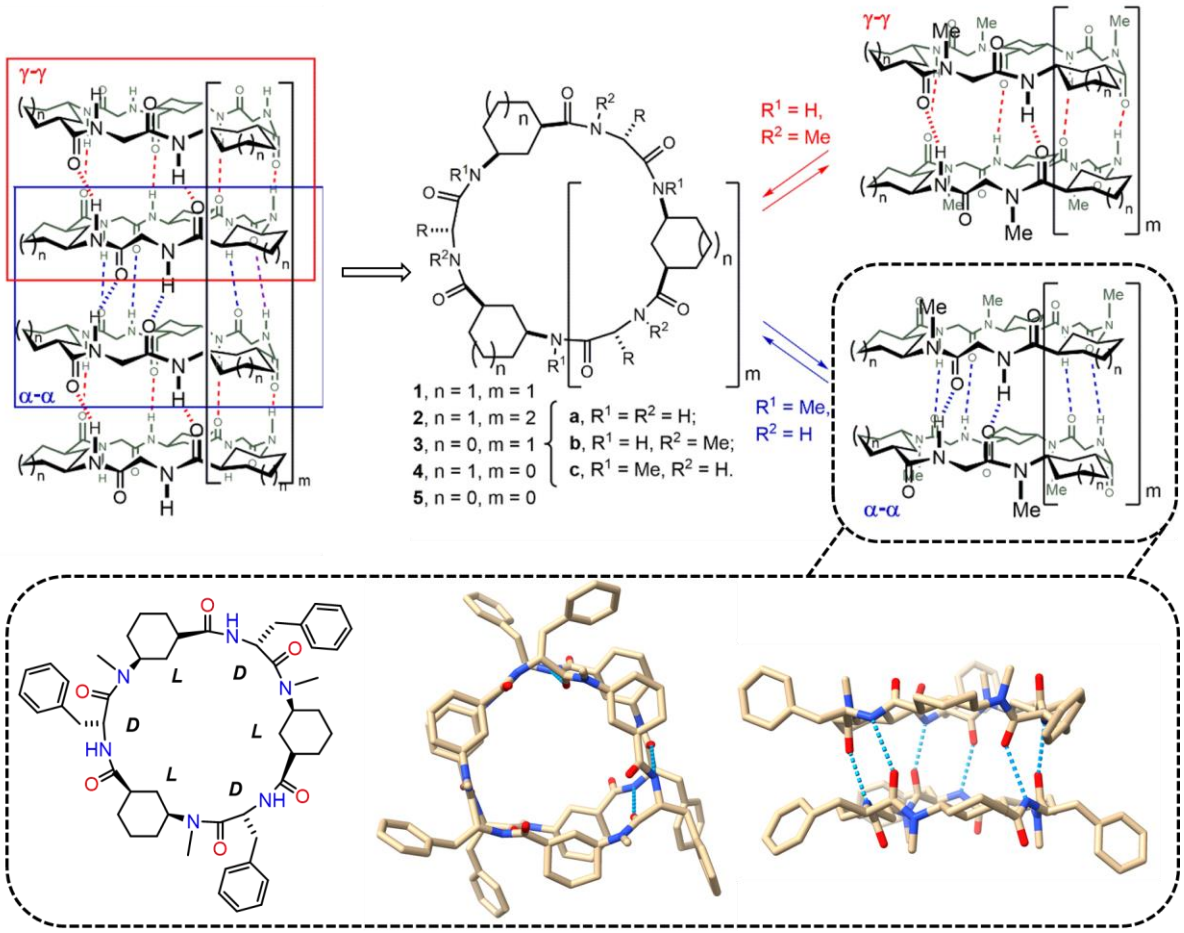


Figura 73. Arriba: Modos de dimerización α-α (azul) o γ-γ (rojo) en los *D*,*L*-α,γ-CP. Abajo: Estructura cristalina del dímero formado por el *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-Ach)$_3$]; varias moléculas de $CDCl_3$ cristalizaron en su cavidad, evidenciando el carácter hidrofóbico de la misma.[484a]

[484] a) Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845. CCDC: 207028. b) Amorín, M.; Villaverde, V.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2005**, *15*, 87-92.

El estudio de estos modelos permitió determinar que la interacción α-α era más favorable que la γ-γ.[484b] Para la interacción γ-γ del *c*-[(*L*-Ach-*D*-^{Me}*N*-Ala)$_3$] se obtuvo una $K_a \approx 10^2$ M^{-1}, mientras que en el caso de *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-Ach)$_3$], con interacción α-α, $K_a \approx 10^5$ M^{-1}, todos ellos en $CDCl_3$. Al reducir el tamaño del CP, la rigidez del Ach tenía mayor repercusión, pudiéndose determinar un valor de K_a= 15 M^{-1} para el tetrapéptido *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-Ach)$_2$].[485] La energía liberada en el proceso permitió determinar que los enlaces de hidrógeno que sostienen la estructura dimérica son más débiles que los de sus análogos hexa- y octapeptídicos.[486] Un estudio computacional también reveló que los NHs de los α-Aa están más polarizados que los de los γ-Aa, y que para este último caso, es posible la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares en algunas conformaciones del CP.[487] Por tanto, la menor afinidad obtenida de las interacciones γ-γ no se debe a que los enlaces de hidrógeno formados sean más débiles, sino a que el proceso de dimerización, para el cual es necesaria la conformación extendida del CP, compite con la formación de conformaciones monoméricas plegadas, debido a esas interacciones intramoleculares. Por tanto, estos resultados vendrían a explicar teóricamente la observación experimental respecto a la mayor estabilidad de los dímeros α-α. Respecto del ensamblado en nanotubos de los *D*,*L*-α,γ-CPs, estudios recientes han demostrado que, en contra de lo esperado, la interacción más favorable es la de las láminas paralelas, al contrario de lo que ocurre con los *D*,*L*-α-CPs.[488] Según los estudios computacionales realizados, esta mayor estabilidad de la lámina paralela tendría su origen en la disposición relativa de los protones axiales del anillo de ciclohexano, que están sometidos a una menor congestión estérica en la estructura antiparalela, que repercute positivamente en la estabilidad.

Posteriormente se introdujo en los diseños un anillo de cinco miembros a través del ácido 3-aminociclopentanocarboxílico (nos referiremos a él como Acp). Este residuo es menos rígido que su análogo de seis miembros (Ach), a lo que contribuye el mayor ángulo de apertura de los enlaces C_α-CO y C_γ-CO, que es de 140° para Acp frente a los 120° para Ach. Siguiendo la misma estrategia, al combinar este γ-Acp con otros α-Aa, se han preparado multitud de CPs de distinto diámetro. Desde los más pequeños, los ciclotetrapéptidos[485] pasando por los análogos de seis[489] y ocho residuos[490], hasta los más grandes como deca-, dodeca-[490a] y hexadecapéptidos cíclicos.[491] Incluso para los más grandes se encontró que $K_a > 10^5$ M^{-1} para los CPs con los γ-residuos *N*-metilados, mientras que los CPs con α-Aa *N*-metilados, se plegaban adoptando conformaciones que impedían la dimerización, debido a la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares.

[485] a) Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Lett.* 2005, *7*, 4681-4684. b) Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Heterocycles* 2006, *67*, 575-583.

[486] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* 2005, *11*, 6543-6551.

[487] García-Fandiño, R.; Castedo, L.; Granja, J. R.; Vázquez, S. A. *J. Phys. Chem. B* 2010, *114*, 4973-4983.

[488] Calvelo, M.; Lamas, A.; Guerra, A.; Amorín, M.; Garcia-Fandino, R.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* 2020, *26*, 5846-5858.

[489] a) Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, *44*, 5710-5713. CCDC: 272987. b) Reiriz, C.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Pept. Sci.* 2008, *14*, 241-249.

[490] a) Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Commun.* 2007, 3267-3269. b) Brea, R. J.; Pérez-Alvite, M. J.; Panciera, M.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Asian. J.* 2011, *6*, 110-121.

[491] R. J. Brea, *Diseño, Síntesis y aplicaciones de sistemas supramoleculares homo- y heterodiméricos selectivos y eficientes basados en α,γ-ciclopéptidos* (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (2013).

En el estudio de las interacciones que favorecían la formación de estos dímeros, se llevaron a cabo experimentos de heterodimerización, en los que se mezclaba equimolarmente CPs constituidos por Ach con aquellos que incorporaban Acp, siendo ambos *D*,*L*-α,γ-CPs. Además, ambos péptidos habían sido bloqueados para la dimerización por su cara γ mediante la *N*-metilación de los γ-Aa. Se observó que la especie más estable era el heterodímero (Figura 74). El proceso se siguió por RMN, donde la señales del homodímero del Acp desaparecían tras la adición del homodímero de Ach, en favor de la formación de un nuevo conjunto de señales que no pertenecían a ninguno de ellos, sino al dímero formado por ambos CPs.[489a] La comparación de las estructuras cristalinas de ambos homodímeros y el heterodímero mostró una distancia ligeramente más corta para los enlaces de hidrógeno en este último caso. Para el dímero Acp-Ach, la distancia N····O rondaba los 2.82-2.90 Å, mientras que para los dímeros Acp-Acp o Ach-Ach estaba alrededor de 2.88-2.98 Å. Estudios computacionales arrojaron que la energía de interacción es más fuerte para el heterodímero.[487]

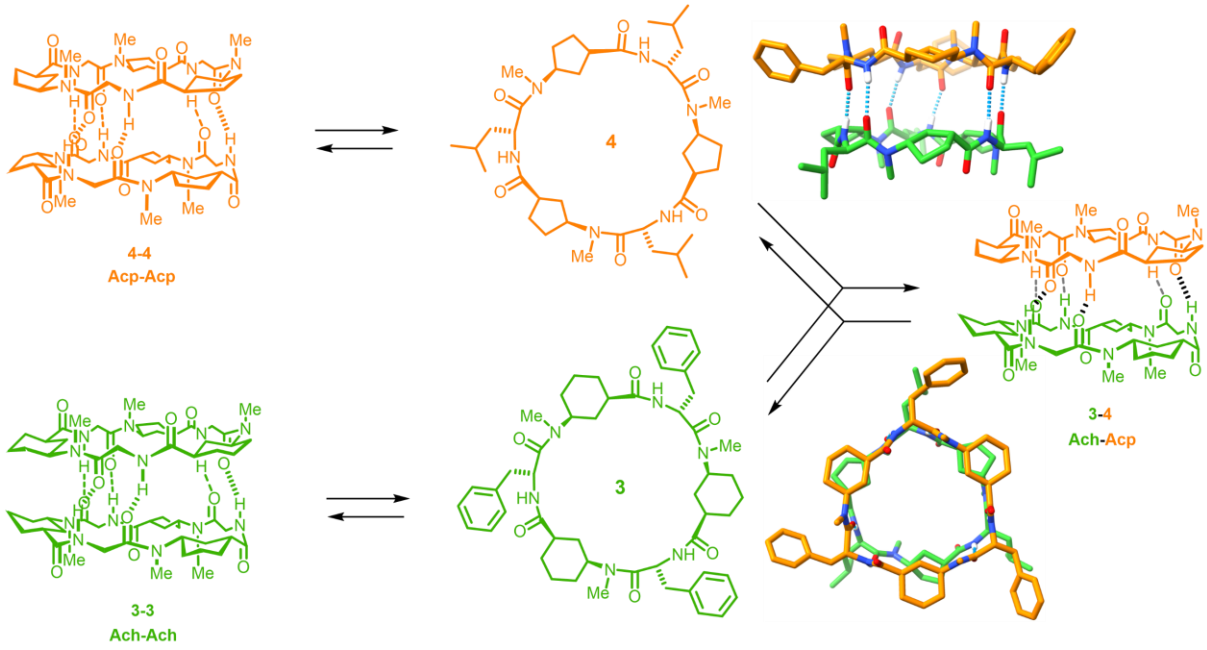


Figura 74. Heterodimerización Acp-Ach.[489a]

La preferencia de los *D*,*L*-α,γ-CPs de ensamblarse formando heterodímeros se ha utilizado en este grupo de investigación para desarrollar sistemas multicomponente de transferencia electrónica. En este caso, no solo se modifica la estructura restringiéndola a la formación de dímeros, si no que se hace uso también de la posibilidad de modificar las propiedades de la cara externa del CP a través de las cadenas laterales de los α-Aa. Con esta estrategia se desarrolló un sistema multicomponente donde la fluorescencia se podía controlar empleando un sistema FRET entre pireno (anclado en el CP de Ach) y dapoxilo (anclado en el CP de Acp).[492] La especie homodimérica resultante del CP que solo contenía pireno daba lugar a un excímero por el apilamiento de estas dos unidades aromáticas. Sin embargo, la adición del CP funcionalizado con dapoxilo desplazaba el equilibro hacia la formación del heterodímero, para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[492] Brea, R. J.; Eugenio Vázquez, M.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129,* 1653-1657.

el que se encontró que pireno y dapoxilo formaban un par FRET (Figura 75A). Por tanto, la emisión de fluorescencia podía controlarse dependiendo de las especies presentes en la disolución. Con una idea similar, se han preparado complejos de transferencia de carga incorporando en uno de los CPs una molécula dadora, mientras que el otro portaba una molécula aceptora de electrones. Este concepto se ha estudiado escogiendo el fullereno como aceptor de electrones, y combinándolo con tetratiafuvaleno π-extendido (Figura 75B)[493] o una metaloporfirina como entidades dadoras de electrones.[494]

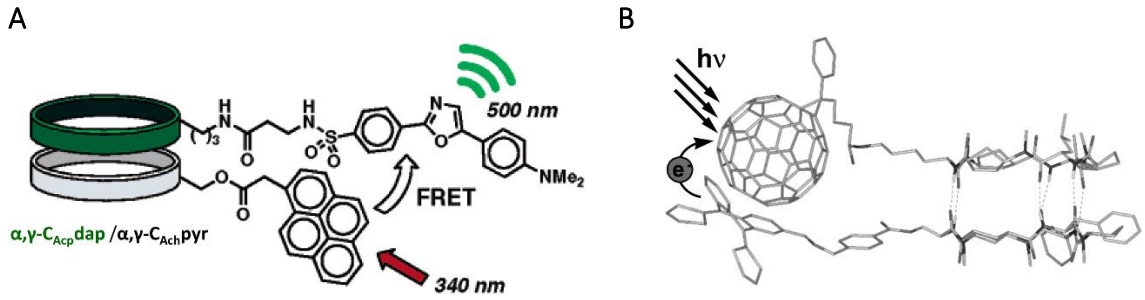


Figura 75. Complejos de transferencia electrónica en estructuras heterodímericas preparadas a partir de los α,γ-CPs.[492,493] Para la figura 74A, la imagen ha sido adaptada con permiso de la ref. 492. *Copyright ©2007 American Chemical Society.*

La funcionalización externa de los *D*,*L*-α,γ-CPs también se ha explorado en aquellos CPs que pueden formar nanotubos, ya que no están bloqueados por ninguna de sus caras. En los ejemplos que han desarrollado para este caso, los ensamblados resultantes variaban en sus propiedades dependiendo enormemente de la funcionalización introducida, habiéndose estudiado la incorporación de pireno,[472] fullereno[473] y diferentes dendrímeros.[495]

Por otro lado, la incorporación de los γ-aminoácidos aporta una propiedad única en los ciclopéptidos, una posición β apuntado al interior de la cavidad. Cuando se trata de un metileno, confiere un carácter hidrófobo a la cara interna de los *D*,*L*-α,γ-CPs. Además, se abre la posibilidad de realizar modificaciones internas mediante la funcionalización de esta posición, alternativa que se ha explorado en este grupo. Para ello, se utilizó como precursor del γ-Aa la *D*-xilosa, para dar lugar al ácido 4-amino-3-hidroxitetrahidrofuran-2-carboxílico (γ-Ahf). Este γ-Ahf se pudo incorporar exitosamente en el esqueleto de un tetrapéptido, estando el grupo OH protegido con bencilo, lo que impedía la dimerización. Al desproteger este grupo, el CP quedaba habilitado para dimerizar y provisto de una cavidad hidrofílica.[496] Cuando se introdujeron dos γ-Ahf en un octapéptido, las interacciones intramoleculares que propiciaban los dos grupos hidroxilo impedían la planaridad del anillo. Precisamente debido a esta característica, fue capaz de replegarse para acomodar CO_3^{2-} en clústeres tetra- o hexaméricos

[493] Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R.; Herranz, M. Á.; Sánchez, L.; Martín, N.; Seitz, W.; Guldi, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, *104*, 5291-5294.

[494] Aragay, G.; Ventura, B.; Guerra, A.; Pintre, I.; Chiorboli, C.; García-Fandiño, R.; Flamigni, L.; Granja, J. R.; Ballester, P. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3427-3438.

[495] Amorín, M.; Pérez, A.; Barberá, J.; Ozores, H. L.; Serrano, J. L.; Granja, J. R.; Sierra, T. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 688-690.

[496] Reiriz, C.; Amorín, M.; García-Fandiño, R.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4358-4361.

(Figura 76A), así como transportar este anión a través de membranas lipídicas.[497] En contraste con estos resultados, cuando sobre este aminoácido con el grupo hidroxilo estaba N-metilado, el octapéptido era capaz de autoensamblarse formando el correspondiente dímero. Además, la esterificación con el ácido picolínico, conducía a un CP cuyo dímero dejaba las dos piridinas en su cavidad, correctamente dispuestas para la coordinación con plata (Figura 76B).[498] Otro ejemplo relacionado con el concepto de combinar el ensamblaje peptídico con el recurso de la coordinación metálica, es aquel en el que se introdujo un ácido carboxílico en la cavidad de un CP, a través del γ-Ahf. La dimerización permitía que los grupos ácido quedaran en orientación apropiada para formar un complejo de *cis*-platino, que mostraba una actividad anticancerígena modificada que no era tan susceptible a la resistencia a dicho complejo.[499]

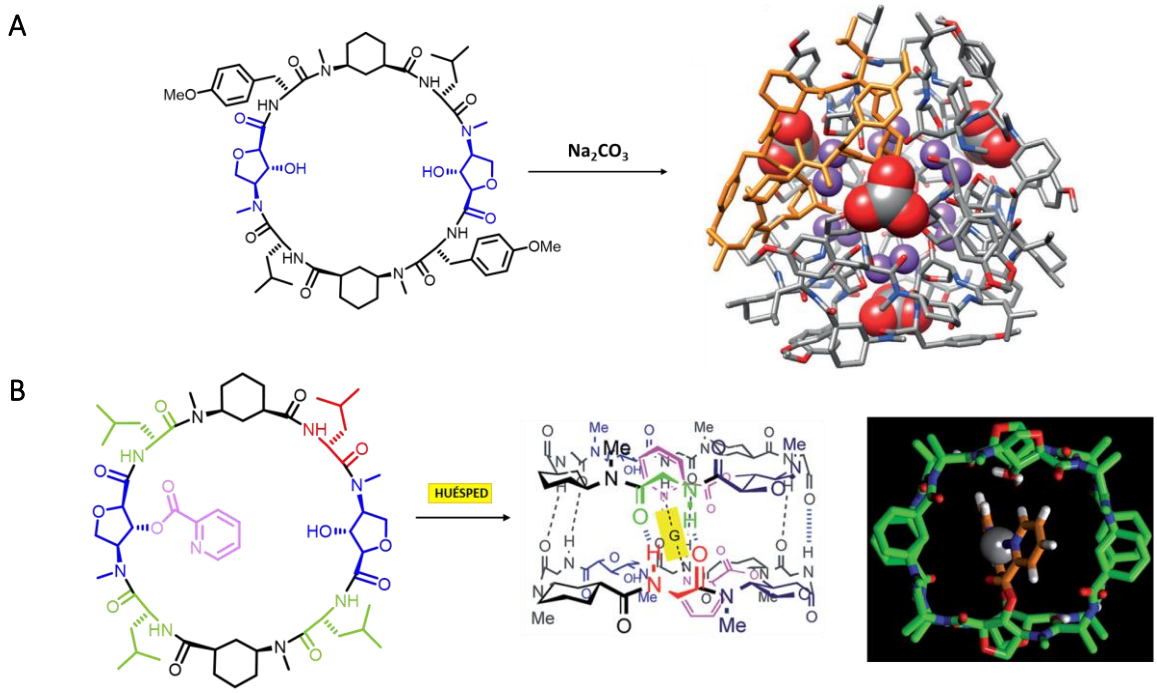


Figura 76. Ensamblados supramoleculares obtenidos a partir de la funcionalización del C_β del γ-aminoácido en el γ-aminoácido de los α,γ-CPs.[497,498] Para la figura 75A, la imagen ha sido adaptada con permiso de la ref. 497, *Copyright ©2016 John Wiley and Sons*.

Tras haber abordado varios ejemplos que ilustran las posibilidades de modificación externa e interna de los CPs, comentaremos algunos trabajos que se enfocan en la tercera alternativa para modular las propiedades del ensamblado, que reside en la funcionalización de los grupos amida. Aunque ya se ha mencionado el empleo de aminoácidos *N*-metilados para impedir la formación de nanotubos, este recurso ha sido explorado más ampliamente en este grupo de investigación a través de la incorporación de cadenas con grupos reactivos sobre las amidas. La incorporación de cadenas alquílicas o tapas sobre los grupos amida no es trivial, ya

[497] Rodríguez-Vázquez, N.; Amorín, M.; Alfonso, I.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 4504-4508.
[498] Rodríguez-Vázquez, N.; García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 183-187.
[499] Rodríguez-Vázquez, N.; García-Fandiño, R.; Aldegunde, M. J.; Brea, J.; Loza, M. I.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 2560-2563.

que un exceso de longitud, volumen o rigidez puede acabar perturbando la capacidad del CP para formar dímeros. Otro aspecto a tener en cuenta es la ortogonalidad. La estrategia que se sigue para preparar los CPs *N*-funcionalizados es introducir una cadena que porta un grupo funcional terminal que, tras llevar a cabo la etapa de ciclación del péptido, brindará la oportunidad de hacer modificaciones para potenciar las capacidades del CP. Estas cadenas se incorporan en el γ-Aa, normalmente, en etapas previas al acoplamiento con el α-Aa. Por tanto, los grupos que porten la cadena introducida deben ser resistentes a todas las etapas de protección y desprotección empleadas en la síntesis del CP. Una alternativa que encaja perfectamente con estos requerimientos es el uso de alquinos o azidas en estas cadenas para realizar acoplamientos entre ellos catalizados por cobre, conocidos bajo el nombre de acoplamientos tipo *click*. Con esta aproximación, se han desarrollado ensamblados tipo Venturi, donde se juega, no solo con la unión covalente entre CPs mediante reacciones *click*, sino con las capacidades de dimerización según su tamaño (Figura 77).[500] De este modo, se introdujeron dos cadenas de propargilo en un α,γ-octapéptido de Acp, y dos propilazidas en un α,γ-tetrapéptido de Ach. La unión covalente de ambos dio como resultado una estructura donde ambos CPs tenían una de sus caras (la α) libre para poder autoensamblarse. La menor tendencia de los ciclotetrapéptidos para formar dímeros (en comparación con sus análogos de mayor tamaño), junto con la capacidad de los α,γ-CPs para formar heterodímeros, fueron dos características que se aprovecharon para inducir la formación de diferentes tipos de ensamblado en el sistema.

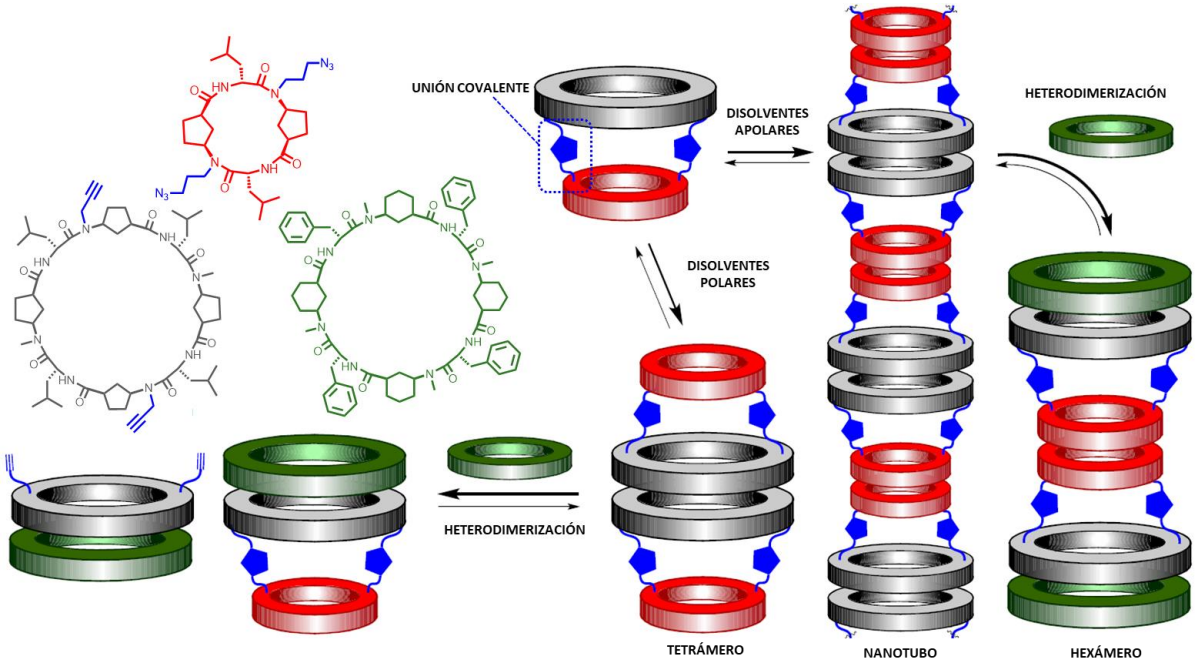


Figura 77. Nanotubos tipo Venturi desarrollados a través del empleo de acoplamientos *click* sobre ciclopéptidos *N*-funcionalizados.[500] Imagen adaptada con permiso de la ref.500, *Copyright ©2017 Royal Society of Chemistry.*

La alternativa de la *N*-funcionalización también se ha explorado introduciendo brazos o tapas moleculares que, junto con el esqueleto peptídico, dan lugar a una cavidad cerrada

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[500] Fuertes, A.; Ozores, H. L.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Nanoscale* **2017**, *9*, 748-753.

tridimensionalmente. Como se ha comentado previamente en otras secciones de esta introducción, por ejemplo, en los trabajos de Reinaud, los bloques de construcción cíclicos aportan una base sólida para desarrollar análogos de las enzimas naturales. En ese caso, la incorporación de anillos heterocíclicos como piridinas o imidazoles les permitía estudiar su capacidad para coordinar iones y, progresivamente, su actividad como catalizadores. Con esta consideración en mente, se utilizó de nuevo la estrategia *click-chemistry* para funcionalizar un α,γ-ciclohexapétido con tres *orto*-piridinas. El dímero formado se estudió exitosamente para el transporte de pares iónicos, esto es, como simportador (Figura 78). En uno de los monómeros, el nitrógeno de las tres piridinas se coordina con el catión. Presumiblemente, el otro monómero utiliza las interacciones anión-π entre las piridinas y el anión como fuente de estabilización, aunque también se valora la interacción de los pares solitarios del nitrógeno con las moléculas de agua de solvatación de este anión.[501] En el caso de estos CPs como transportadores, aunque el medio acuoso desfavorece la dimerización, al llegar a la membrana fosfolipídica sucede lo contrario, la formación del dímero se ve impulsada de nuevo. Por ello no se obtuvieron los mismos resultados cuando se utilizó este dímero (con seis piridinas en total) que su forma heterodimérica, donde solo uno de los monómeros estaba funcionalizado.

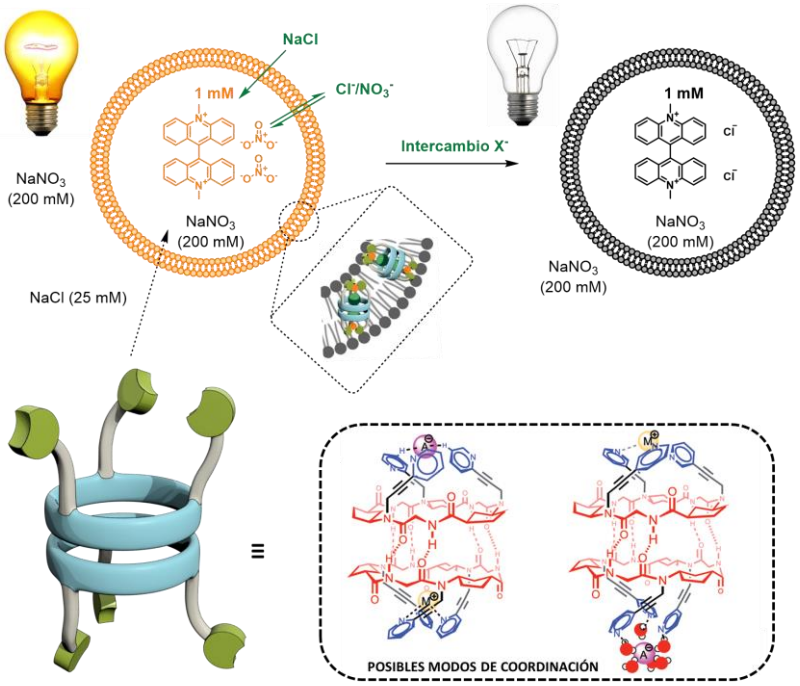


Figura 78. Transportadores de iones a través de membranas lipídicas desarrollados mediante la incorporación de brazos moleculares de piridina sobre un *D*,*L*-α,γ-CP.[501] Imagen adaptada con permiso de la ref. 501, *Copyright ©2019 Royal Society of Chemistry.*

Por último, se ha utilizado esta alternativa para introducir cubiertas en los CPs, concretamente, porfirinas metaladas (Figura 79) como método para formar receptores cerrados a modo de cápsulas supramoleculares. Se recurrió a las hidrazonas como buenos candidatos para incorporar estas tapas debido a su naturaleza covalente dinámica, ortogonalidad y fácil formación. La reversibilidad de estas uniones es especialmente útil en la

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[501] Fuertes, A.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Chem. Commun.* **2019**, *56*, 46-49.

corrección de errores que conduzcan al producto termodinámicamente más estable, evitando así la formación de polímeros. Para esta idea se optó por un ciclopéptido de ocho residuos ya que se pretendía estudiar la capacidad de la cápsula para internalizar ligandos bipiridínicos. Los estudios de espectroscopía de absorción y RMN revelaron una clara relación entre la distancia que separaba las dos porfirinas, y la afinidad encontrada para los ligandos probados. También arrojaron luz sobre el mecanismo de internalización, que sugiere la necesidad de que se produzca la disociación del dímero para permitir la entrada del ligando.[502]

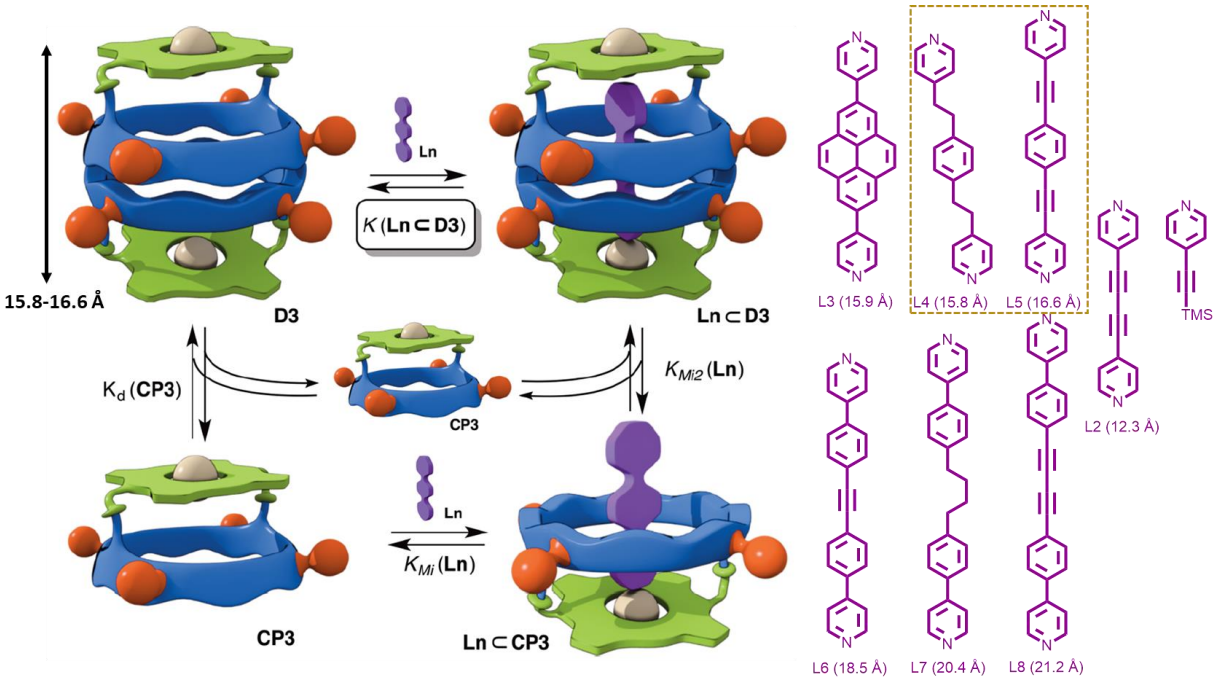


Figura 79. Cápsula supramolecular preparada mediante la unión covalente dinámica de un *D,L*-α,γ-CP con una metaloporfirina, que le confiere capacidad para encapsular ligandos bipiridínicos.[502] Imagen adaptada con permiso de la ref. 502, *Copyright ©2017 American Chemical Society.*

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[502] Ozores, H. L.; Amorín, M.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 776-784.

5. *Objetivos*

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El objetivo general de esta tesis doctoral es el desarrollo de receptores supramoleculares haciendo uso de los ciclopéptidos como unidad estructural fundamental. Este propósito está impulsado por los resultados prometedores que se han descrito en el grupo de Juan Granja, empleando péptidos cíclicos en los que todos los aminoácidos de la misma quiralidad tienen grupos amino secundarios que permiten incorporar brazos o tapas moleculares funcionales. En este trabajo se pretende describir nuestros esfuerzos por explotar este recurso para revolucionar las aplicaciones de estos CPs como receptores moleculares supramoleculares. Pretendemos diseñar estructuras supramoleculares donde cada subcomponente introduce un factor selectivo que operará, junto con el resto, en la respuesta frente a la presencia del huésped. Para ello, haremos uso de la química *click*, cuyo desarrollo y aplicaciones biológicas ha sido recientemente motivo del galardón con el premio Nobel de Química para los profesores Bertozzi, Mendal y Sharpless.[503] Para tal fin, se sintetizarán derivados ciclopeptídicos con diferentes grupos alquinos terminales que permitan incorporar, mediante una de estas reacciones bioortogonales, unas tapas moleculares con propiedades y estructuras determinadas para el proceso de reconocimiento y enlace con unos tipos específicos de sustratos.

Como se ha mencionado en la última sección de la introducción, en el grupo se ha desarrollado recientemente una cápsula supramolecular en la que una porfirina anclada en la "boca de entrada" de un ciclooctapéptido, actúa como el cierre de la cavidad del CP. Es bien conocida la capacidad de las metaloporfirinas de Zn^{II} para coordinarse a un quinto ligando. Especialmente, las piridinas son magníficos ligandos para estos centros metálicos, a través de coordinación axial. La capacidad de este CP para autoensamblarse dio lugar a la cápsula propiamente dicha, delimitada por dos porfirinas a ambos extremos. Por tanto, estas cápsulas están cuidadosamente diseñada para reconocer 4,4'-bipiridinas. La posible cooperatividad entre estas interacciones metal-ligando puede actuar en favor del reconocimiento de aquellos ligandos capaces de coordinarse a las dos porfirinas simultáneamente. Este proceso de encapsulación estaba favorecido, por tanto, para aquellos ligandos cuya longitud encajaba con la distancia entre los dos centros metálicos de las porfirinas. Impulsados por estos resultados preliminares, para esta tesis, se propuso un nuevo objetivo que consistía en incrementar el tamaño de la cavidad de la cápsula de tal forma que lo transformase en un contenedor molecular estructuralmente viable para actuar como nanorreactor con actividad catalalítica.[504] Con este objetivo, se planteó, en primer lugar, recurrir a un decapéptido en lugar del octa, para dejar espacio interior para albergar la *maquinaria* necesaria para la catálisis. Además, decidimos sustituir las conexiones originales con la porfirina, las uniones hidrazona, ya que nos parecía que no eran las más apropiadas dada su inestabilidad en determinadas condiciones de reacción. Necesitábamos una alternativa más estable pero que, de igual forma, nos permitiese unir ambos componentes al final de la síntesis de una forma ortogonal y cuantitativa. Por ello, se propuso emplear dos cadenas de propilazida en el CP y conectarlo a la porfirina a través de

[503] The Nobel Committee for Chemistry. Click Chemistry and Bioorthogonal Chemistry. *The Royal Swedish Academy Of Sciences,* 2022.

[504] a) Petrosko, S. H.; Johnson, R.; White, H.; Mirkin, C. A. *J. Am. Chem. Soc*. 2016, 138, 7443-7445. b) Sinha, I.; Mukherjee, P. S. *Inorg. Chem.* 2018, *57*, 4205-4221.

una reacción *click*. Por su parte, la porfirina estaría equipada con dos alquinos terminales en dos de los anillos aromáticos de sus posiciones *meso*.

Para estudiar el proceso catalítico, pretendemos utilizar ligandos que, además de poseer las piridinas terminales para poder coordinarse con las dos tapas porfirínicas, tengan una parte central capaz de coordinarse con un complejo metálico activo. Este último sería el responsable de catalizar las potenciales transformaciones en la cavidad (Figura 80). El confinamiento de este complejo metálico en el interior de la cavidad, debería no solo protegerlo sino también redefinir la selectividad de dicha especie catalítica. Sintética y funcionalmente, pensamos en utilizar un centro de 2,2'-bipiridina como ese núcleo central apto para la coordinación. En términos de longitud, la incorporación del anillo de triazol en el que se emplean siete átomos entre la porfirina y el CP, incrementa la separación entre los centros metálicos de Zn, por lo que los ligandos a preparar deberían poseer una mayor longitud.

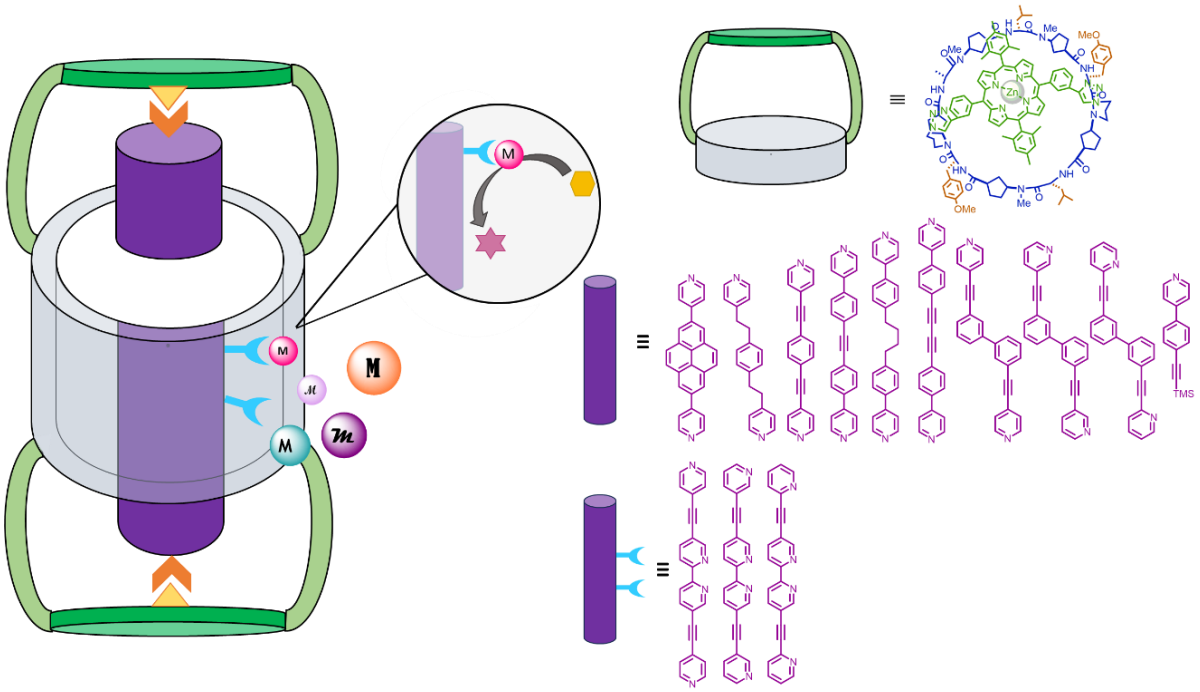


Figura 80. Representación gráfica del nanorreactor peptídico propuesto como primer objetivo de este trabajo.

En base a todo lo enumerado anteriormente, decidimos optar, inicialmente, por un α,γ-ciclodecapéptido. El empleo de un decapéptido en el que la tapa de porfirina no está situada en el centro de la entrada del dímero, sino ligeramente desplazada, le confiere una flexibilidad que tal vez pudiese ser empleada para atrapar diferentes tipos de ligandos de diferente forma o longitud. Incluso se visualizó que ligandos con *meta*-piridinas situadas en sus extremos también serían susceptibles de coordinarse en el interior de la cápsula. Para estudiar estas posibilidades se propuso preparar una pequeña quimioteca de ligandos con diferente longitud, flexibilidad e isomería estructural en las piridinas terminales, a fin de establecer un patrón de afinidad que nos permita seleccionar los mejores candidatos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El primer diseño de cápsula molecular se estudió en el grupo en procesos catalíticos empleando porfirinas de Mn y Fe para llevar a cabo reacciones de oxidación. Sin embargo, la cara externa de estas porfirinas debe bloquearse para asegurar que el proceso catalítico tiene lugar dentro de la cavidad. A pesar del empleo de ligandos voluminosos que bloqueaban la cara exterior de la porfirina, los resultados obtenidos fueron discretos y poco claros. En una aproximación alternativa hacia las cavidades reactivas de porfirinas, se pretende desarrollar una estructura en la que el CP actúe de armazón que la protege y aporte selectividad. Es una idea con un enfoque similar a las cápsulas porfirina-glucolurilo desarrolladas principalmente por Nolte (Figura 28).[195]

En estos nuevos diseños, es el propio centro metálico de la porfirina el que debe actuar activamente en las transformaciones, pero que, al quedar ubicada al fondo de la cavidad, ésta ejerza un papel fundamental en la entrada del sustrato al centro activo, aportando selectividad a la reacción. Este diseño se basaría en unir dos ciclopéptidos covalentemente a una porfirina central, de tal forma que protejan tanto su cara superior como inferior. Para este fin, emplearemos una porfirina con cuatro grupos funcionales y dos CPs con dos grupos complementarios a los de las porfirinas. En este caso, usaremos un enlace hidrazona ya que, al pretender formar cuatro nuevos enlaces, pensamos que una estrategia covalente dinámica gobernada por la termodinámica sería más apropiada para evitar la polimerización. La reacción entre estas dos subunidades daría lugar a una estructura tipo sándwich donde la porfirina quedaría en el medio (Figura 81)

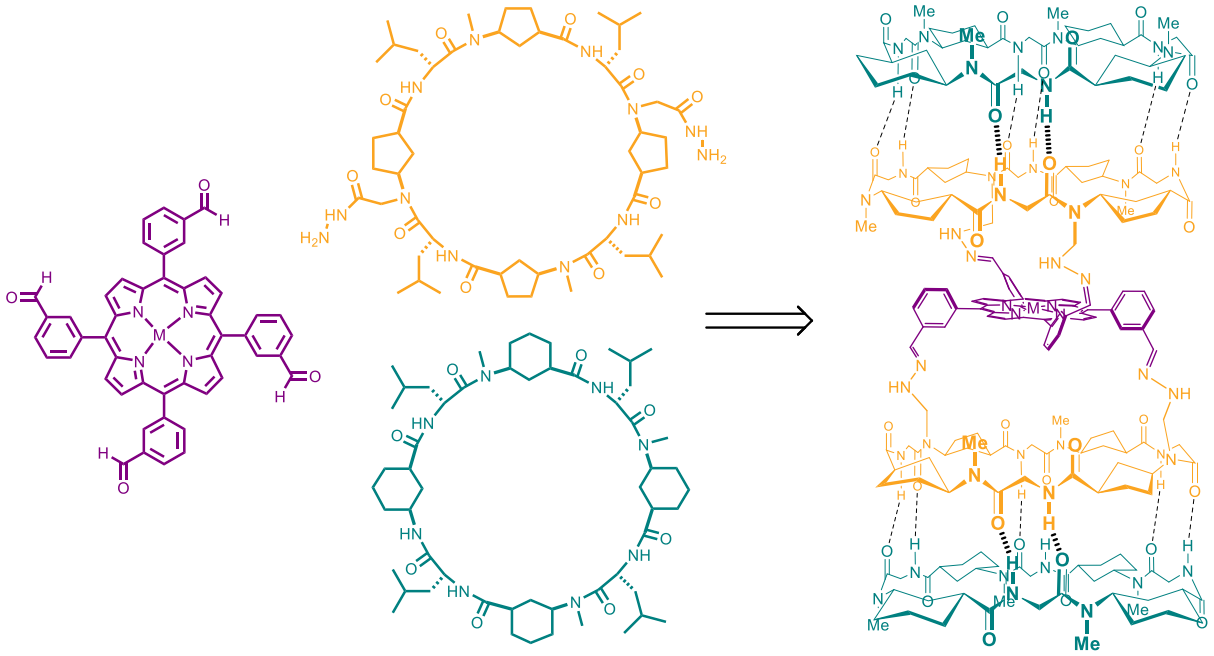


Figura 81. Modelo gráfico de canales catalíticos basados en metaloporfirínas que quedaría emparedada entre cuatro ciclopeptídos, y estructura de los diferentes componentes.

Esta estrategia presenta como principal limitación que el CP, a través de la cara no enlazada a la porfirina, se encuentra libre para auto-ensamblarse. Esto daría lugar a una estructura polimérica cilíndrica que, probablemente, presentaría problemas de solubilidad y haría impracticable su aplicación como catalizador. Afortunadamente creemos que es posible prevenir esta polimerización recurriendo a la conocida capacidad de los α,γ-CPs para formar heterodímeros más estables que los correspondientes homodímeros.[489a] El objetivo sería

estudiar la reacción de condensación porfirina/CP con el heterodímero preformado, lo que debería conducir a la formación de un complejo formado por cuatro CPs y una porfirina (Figura 81). Quedaría, por tanto, una especie de "sándwich con doble pan" en el que el "doble pan" se correspondería con el heterodímero. Con esta estrategia se pretende dotar a la porfirina de un sólido armazón que solo permitirá la coordinación de ciertos sustratos, intentando emular el bolsillo de una metaloenzima. Creemos que posteriores modificaciones del CP complementario nos podría permitir incorporar grupos funcionales que modulen la selectividad de estos canales catalíticos, así como la incorporación de diferentes centros metálicos nos permitiría cambiar la reactividad.

El segundo objetivo de esta tesis también gira en torno al desarrollo de cavidades peptídicas con aplicación en catálisis. Sin embargo, en esta ocasión, pretendemos centrarnos en el propio CP como elemento reactivo. Concretamente, la idea consiste en imitar la actividad esterasa de la anhidrasa carbónica,[557] sobre la que se ha discutido en la introducción, y cuyo sitio activo presenta tres imidazoles coordinados a un ion Zn^{II}. Por ello abarcaremos el reto sintético de introducir tres imidazoles sobre un ciclohexapéptido, de manera que estos anillos, gracias al soporte del CP, quedarían orientados de forma adecuada para su coordinación con el metal. La complejidad de este objetivo reside en varios aspectos. Por un lado, es necesario proteger el NH del imidazol para no entorpecer la síntesis peptídica. Por otro lado, ese grupo protector debe ser ortogonal con los empleados en la síntesis del péptido y debe cumplir unos requerimientos de reactividad para permitir la incorporación del imidazol al esqueleto peptídico. Finalmente, debe ser posible llevar a cabo su desprotección para estudiar la actividad esterasa de este nuevo CP. En un trabajo previo del grupo, se demostró que un α,γ-ciclohexapéptido dotado con tres brazos de piridina anclados al esqueleto peptídico era capaz de coordinarse con iones metálicos y transportar pares iónicos a través de membranas lipídicas.[501] Esto nos permitió concluir que el diámetro de un ciclohexapéptido es adecuado para que sus tres brazos confluyan en el mismo punto de la cavidad central. Por ello, en este nuevo diseño, haremos uso de un esqueleto peptídico de similares características para preparar derivados con actividad de esterasas sintéticas. Los resultados obtenidos en el trabajo previo nos inspiraron a plantear la síntesis de dos CPs distintos para este fin (Figura 82).

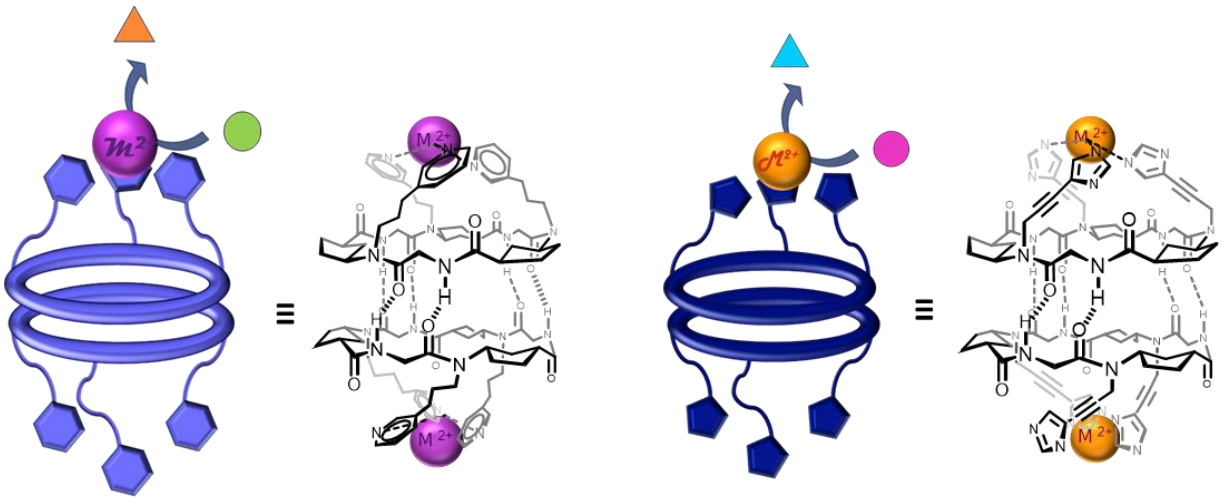


Figura 82. Diseño estructural para dos CPs tripodales como potenciales metaloenzimas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El primero, como se ha comentado, estaría dotado de tres imidazoles, mientras que el segundo incorporaría tres piridinas, pero esta vez, para incrementar su densidad electrónica, el conector estaría saturado (1,3-propileno). El motivo de este cambio obedece a un interés en comprobar si la flexibilidad de la cadena y la riqueza electrónica actúa en favor de la coordinación con el metal y de la catálisis. Una vez preparados ambos CPs, se estudiará su capacidad para coordinar iones metálicos y se evaluará su actividad catalítica.

En el último objetivo de esta tesis doctoral, pretendemos hacer uso de la conocida capacidad de los triazoles para interaccionar con aniones, en este caso, en un bolsillo de simetría *C3*.[505] La incorporación del motivo *tris*-triazólico se podría realizar de forma simple mediante una reacción *click* entre el ciclohexapéptido portador de tres alquinos terminales y una tapa con tres brazos azida. Así, los tres triazoles quedarían apuntando a la cavidad que se crea entre el CP y su tapa, lo que, en principio, generaría un bolsillo adecuado para coordinar aniones de pequeño tamaño. Para estudiar el grado de involucración de los dos subcomponentes, el péptido y la tapa, en estos procesos de reconocimiento de aniones se decidió preparar dos CPs y dos tapas.

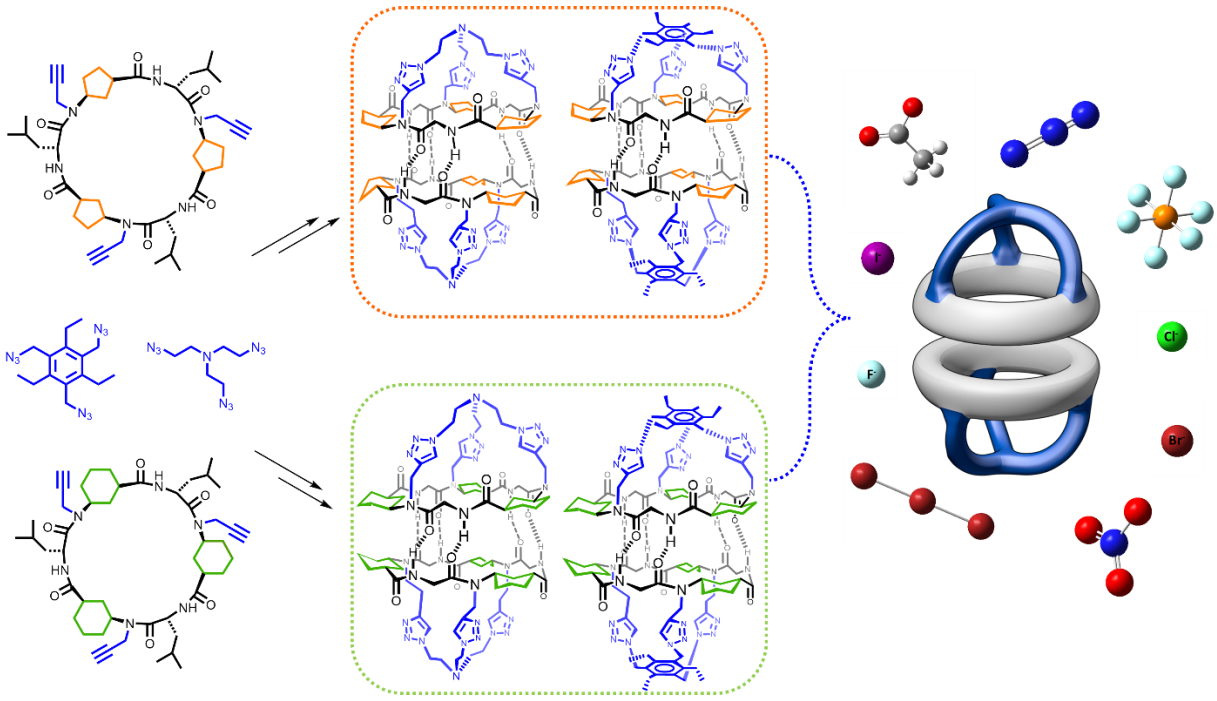


Figura 83. Estructuras objetivo como potenciales receptores y transportadores de aniones.

Por un lado, se pretenden preparar el *c*-[(*D*-Leu-*L*-^{propargil}*N*-Acp)$_3$] y el *c*-[(*D*-Leu-*L*-^{propargil}*N*-Ach)$_3$]. Esto nos permitiría estudiar cómo afecta la rigidez del γ-aminoácido y por tanto del CP a su capacidad para albergar aniones en su cavidad. En cuanto a las tapas, nos decantamos por dos con notables diferencias estructurales, una básica, la tris(2-azidoetil)amina y otra aromática y apolar, el 1,3,5-tris(azidometil)benceno. La primera de menor tamaño y mayor flexibilidad, mientras que la segunda es más rígida. Se propuso, por tanto, estudiar las cuatro cápsulas derivadas de estos acoplamientos. Se considera interesante entender los efectos que tiene la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[505] Dey, S. K.; Basu, A.; Chutia, R.; Das, G. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 26568-26589.

introducción de la tapa sobre la dimerización del CP, y si este efecto es diferente dependiendo de la rigidez del péptido. Por otra parte, nos planteamos explorar si esta rigidez, o el tamaño de la cavidad que propicia cada tapa, está relacionado con una capacidad para reconocer aniones, por ejemplo, en función de su tamaño. Gracias a trabajos previos en el grupo (Figura 78),[501] es posible que, si estas estructuras pueden albergar aniones en su cavidad, sean también capaces de transportarlos a través de membranas lipídicas, donde la hidrofobicidad favorece el estado dimérico. Estudiaremos, también, su actividad transportadora, teniendo en cuenta el creciente interés en torno al desarrollo de transportadores artificiales. Este interés responde a un intento de arrojar luz sobre la problemática que se presenta a raíz de los diagnósticos de canalopatías, de las que ya se ha comentado en la introducción sobre cómo afectan al correcto desempeño de determinadas funciones fisiológicas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. Resultados

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.1 SIMBIOSIS ENTRE CICLOPÉPTIDOS Y PORFIRINAS EN RECEPTORES SUPRAMOLECULARES CON POTENCIAL CATALÍTICO.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.1 Simbiosis entre ciclopéptidos y porfirinas en receptores supramoleculares con potencial catalítico.

La incorporación del macrociclo de porfirina como tapa molecular en los péptidos cíclicos es una buena alternativa para la preparación de cápsulas supramoleculares. La unión de estas dos subunidades da lugar a una estructura que dimeriza y en la que ambos componentes colaboran aportando selectividad al encapsulado de huéspedes. La metalación de la porfirina introduce, además, la coordinación con el metal como nuevo elemento de construcción supramolecular. En este capítulo abordaremos la preparación de dos sistemas que tienen en común la presencia de estos dos fragmentos, ciclopéptidos y porfirinas, pero con el objetivo de desarrollar sistemas catalíticos diferentes. El primero de ellos está enfocado a la síntesis de una cápsula peptídica que pueda ser capaz de actuar como nanorreactor, conteniendo en su interior la maquinaria catalítica necesaria para ello, por lo que se empleará un péptido de mayor tamaño en relación con el diseño previo. En nuestra segunda aproxiamción, pretendemos usar los ciclopéptidos como armazón protector de una porfirina, que se incorpora para llevar a cabo transformaciones en un espacio confinado.

6.1.1 Cápsula molecular basada en un α,γ-ciclodecapéptido con tapas porfirínicas: síntesis y estudio de un sistema multicomponente.

Como se ha comentado en las secciones de introducción y objetivos, en el grupo del profesor Juan Granja se ha desarrollado recientemente un trabajo que demuestra la viabilidad de la introducción de las porfirinas como tapas moleculares en dímeros ciclopeptídicos. En este trabajo se conectó exitosamente un α,γ-ciclooctapéptido con un derivado de la tetrafenilporfirina mediante dos enlaces hidrazona. Esa estructura se estudió para el encapsulado de ligandos con piridinas terminales, ya que la porfirina que incorporaba el diseño se encontraba metalada con Zn^{II}. Los ligandos se introducían en el interior de la cavidad mediante la coordinación simultánea de las piridinas con ambos iones Zn^{II} de las porfirinas. Posteriormente a la obtención de esta primera cápsula péptido-porfirina preparada en el grupo,[502] se sustituyeron los iones metálicos por Mn^{IV} y Fe^{III} con el fin de aplicarlas en procesos catalíticos de oxidación (epoxidación, hidroxilación de enlaces C-H) o ciclopropanación. Desafortunadamente, no fue posible determinar si las transformaciones estudiadas tenían lugar por la cara externa o interna del centro activo, esto es, dentro o fuera de la cápsula.

En este capítulo planteamos un nuevo diseño con el objetivo de permitir que la cavidad de la cápsula pueda albergar una especie activa que lleve a cabo la transformación química de pequeñas moléculas. Nuestro planteamiento implicaría el uso, tal como se comentó, de ligandos 4,4'-bipiridínicos, capaces de coordinarse de manera simultánea a ambos centros metálicos. Estos ligandos deberían portar, además, otro elemento estructural que le permitiese la coordinación de un catalizador metálico, para lo cual se pensó en 2,2'-bipiridinas en su parte central. De esta manera, se presenta un diseño multicomponente, donde cada uno de los elementos que lo conforman juega un papel específico. Para conseguir este propósito se decidió incorporar dos modificaciones estructurales importantes con respecto al diseño previo (Figura 84). Por un lado, necesitamos incrementar el tamaño de la cápsula para poder albergar ese complejo metálico. Para ello, optaremos por emplear un α,γ-CP de diez residuos en lugar del de ocho. Preveíamos que este mayor diámetro no dificultaría el ensamblaje molecular, ya que los estudios precedentes ya habían mostrado que deca-, dodeca- y hexadecapéptidos seguían formando los correspondientes dímeros.[488,490a,491] Los decapéptidos deberían tener

una cavidad interna suficientemente grande para albergar en su interior al ligando, al complejo metálico y a un sustrato de pequeño tamaño. Por otro lado, decidimos utilizar una reacción de cicloadición alquino/azida para conectar los dos bloques principales, el ciclopéptido y la porfirina. Con este cambio, se pretendía aportar una mayor estabilidad química a la estructura y prevenir su degradación en determinadas condiciones de reacción, así como incrementar la longitud de los conectores y abrir un espacio o modo de "ventana" por la que puedan entrar los sustratos de la catálisis sin tener que disociar las dos unidades ciclopeptídicas. Para tal fin, introduciremos dos cadenas de propilazida en el esqueleto peptídico, a través de la *N*-aquilación de los residuos de Acp. Por su parte, la porfirina será la portadora de los alquinos terminales. Con estos requisitos, se propuso la preparación de **CP1**, en el que los aminoácidos con los conectores propilazida se ubicaban en las posiciones 1 y 3 (contando únicamente los residuos γ-Acp), con el fin de que la tapa molecular pudiese quedar ubicada sobre la entrada de la cavidad del dímero. Esperábamos que el incremento de la longitud de los conectores entre el CP y la porfirina no repercutiese sobre la planaridad del ciclopéptido.

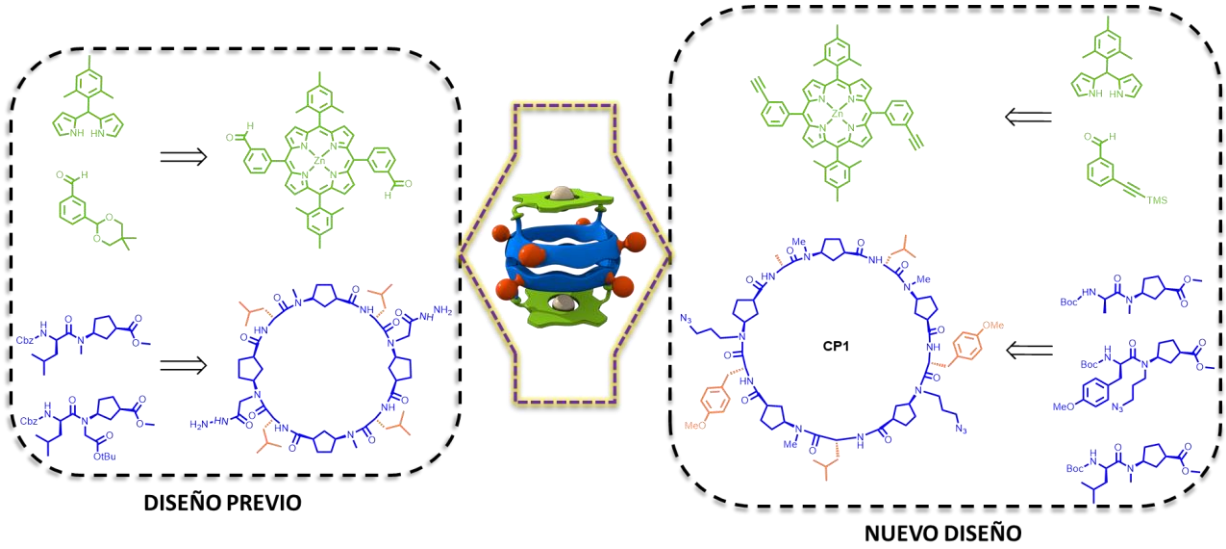


Figura 84. Cambios estructurales introducidos en el nuevo diseño de la cápsula porfirínica.

6.1.1.1 Síntesis de los ligandos.

El siguiente paso fue preparar los ligandos que usaremos para estudiar su interacción con el receptor. Se prepararon un total de 13 ligandos con piridinas terminales, que difieren en varios aspectos de su estructura (Figura 85). Utilizando los precedentes existentes en el grupo, decidimos comenzar por preparar aquellos que ya se habían estudiado en el otro modelo (**L1**-**L8**). Adicionalmente, también decidimos preparar otro grupo de ligandos que nos permitieran estudiar si la cápsula también era capaz de acomodar ligandos que no tienen sus extremos coordinantes alineados. Esto es, ligandos que obligarían a las porfirinas del receptor a colocarse con diferente orientación relativa, o a promover la formación mayoritaria de un determinado rotoisómero. Para ello incorporan un núcleo de bifenilo sustituido en las posiciones 3 y 3' (**L9**-**L11**, Figura 85). Los ligandos de esta serie se diferencian en sus extremos, ya que consideramos que sería interesante investigar cómo varía la afinidad si empleamos los anillos de piridina sustituidos en las posiciones *meta*- u *orto*-. Por último, se preparó también un grupo de ligandos que incorporaban en su parte central un núcleo de bipiridina (**L12**-**L14**), que podríamos estudiar posteriormente dentro del nanorreactor. En este caso también preparamos los derivados con *para*-, *meta*- y *orto*-piridinas terminales con el objetivo de estudiar cómo influye la rigidez del

ligando en la capacidad del receptor para reconocerlos. Nótese que no hay ningún ligando con el código **L2**, aunque sí se había preparado en el trabajo previo (Figura 79). Este ligando, dada su longitud de 12.3 Å, se descartó de estos estudios por ser demasiado corto. Aun así, mantuvimos la misma nomenclatura para mantener la analogía.

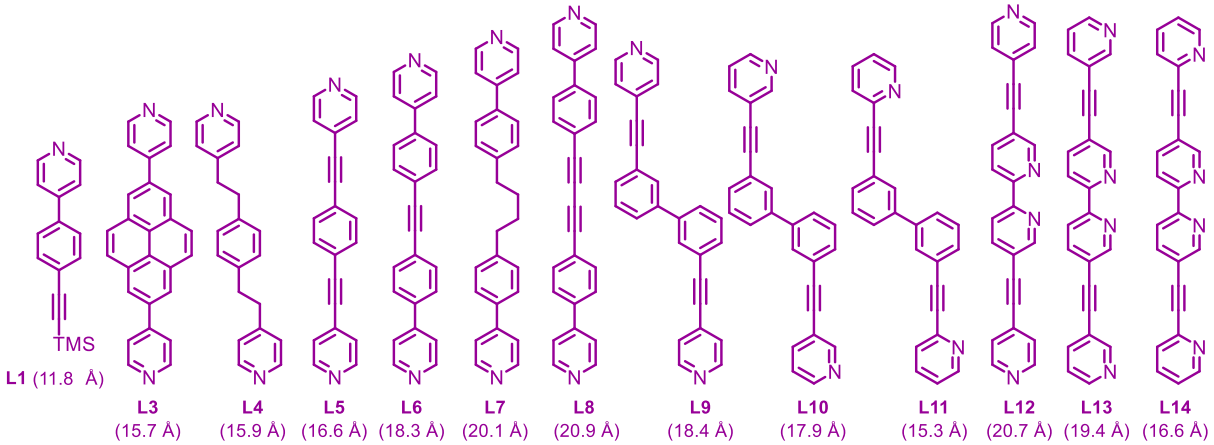


Figura 85. Serie de ligandos preparados para su estudio frente a la encapsulación en la cavidad de la cápsula objetivo. Se tomó la longitud de cada uno como la distancia N-N entre las piridinas terminales, que se obtuvo a través de la optimización de geometría de cada ligando con B3LYP/6-21G(d,p)/LANL2DZ.

La síntesis de esta quimioteca de ligandos se llevó a cabo empleando, mayoritariamente, reacciones de *cross-coupling* (Figura 86). El ligando monodentado **L1** se preparó mediante un acoplamiento de Suzuki entre el ácido 4-piridilborónico y el 1-bromo-4-iodobenceno, seguido del acoplamiento de Sonogashira con el trimetilsililacetileno. Por otra parte, el producto del acoplamiento de Suzuki, la 4-(*p*-bromofenil)piridina se hizo reaccionar con el 4-(4-etinilfenil)piridina, resultante de la desililación de **L1** bajo típicas condiciones de Sonogashira para obtener **L6**. A su vez, el producto de desililación de **L1** también se sometió a un acoplamiento acetilénico de Hay,[506] obteniéndose **L8**. La posterior hidrogenación catalizada por paladio de este último dio lugar al ligando flexible **L7**. La síntesis de **L3** no se llevó a cabo en el transcurso de esta investigación, sino que se había preparado previamente en el grupo mediante el doble acoplamiento de Suzuki entre la 4-iodopiridina y el 2,7-dibromopireno. Por otro lado, cuando la 4-iodopiridina se sometió al acoplamiento de Sonogashira con el 1,4-dietinilbenceno, se obtuvo como producto **L5**, cuya posterior hidrogenación condujo a **L4**. Para la síntesis de **L9**, **L10** y **L11**, se partió del [1,1'-bifenil]-3,3'-dicarbaldehído, que se transformó en el derivado diacetilénico al someterlo a las condiciones Bestman-Ohira.[507] Consecutivamente, el acoplamiento de Sonogashira con la 4-iodo, 3-iodo o 2-iodopiridina dio lugar a los compuestos deseados. Por último, se partió de la 5,5'-dibromo-2,2'-bipiridina para preparar **L12**,[508] **L13** y **L14**. Primero se llevó a cabo el acoplamiento de Sonogashira con el

[506] Su, L.; Dong, J.; Liu, L.; Sun, M.; Qiu, R.; Zhou, Y.; Yin, S. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12348-12351.
[507] a) Müller, S.; Liepold, B.; Roth, G. J.; Bestmann, H. J. *Synlett* **1996**, 521-522; b) Brusilowskij, B.; Schalley, C. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *3*, 469-477; c) Brusilowskij, B.; Dzyuba, E. V.; Troff, R. W.; Schalley, C. A. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 12089-12096; d) Kaae, B. H.; Harpsøe, K.; Kvist, T.; Mathiesen, J. M.; Mølck, C.; Gloriam, D.; Jimenez, H. N.; Uberti, M. A.; Nielsen, S. M.; Nielsen, B.; Bräuner-Osborne, H.; Sauerberg, P.; Clausen, R. P.; Madsen, U. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 440-451.
[508] He, Z.; Li, M.; Que, W.; Stang, P. J. *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 3120-3124.

trimetilsililacetieno. Posteriormente se llevó a cabo la etapa de desililación. Finalmente se realizó otro acoplamiento de Sonogashira con las iodopiridinas correspondientes. Cabe resaltar que, en esta última etapa, resultó crucial la elaboración del crudo reacción con una disolución acuosa de KCN. Los lavados con NH_4Cl no fueron eficientes en atrapar el cobre de la disolución, ya que, presumiblemente, este se encontraba coordinado en el núcleo de bipiridina de los ligandos, lo que provocaba la pérdida del producto. Siguiendo estos procedimientos pudimos obtener doce ligandos de diferentes características para poder estudiar el comportamiento de la cápsula en presencia de ellos.

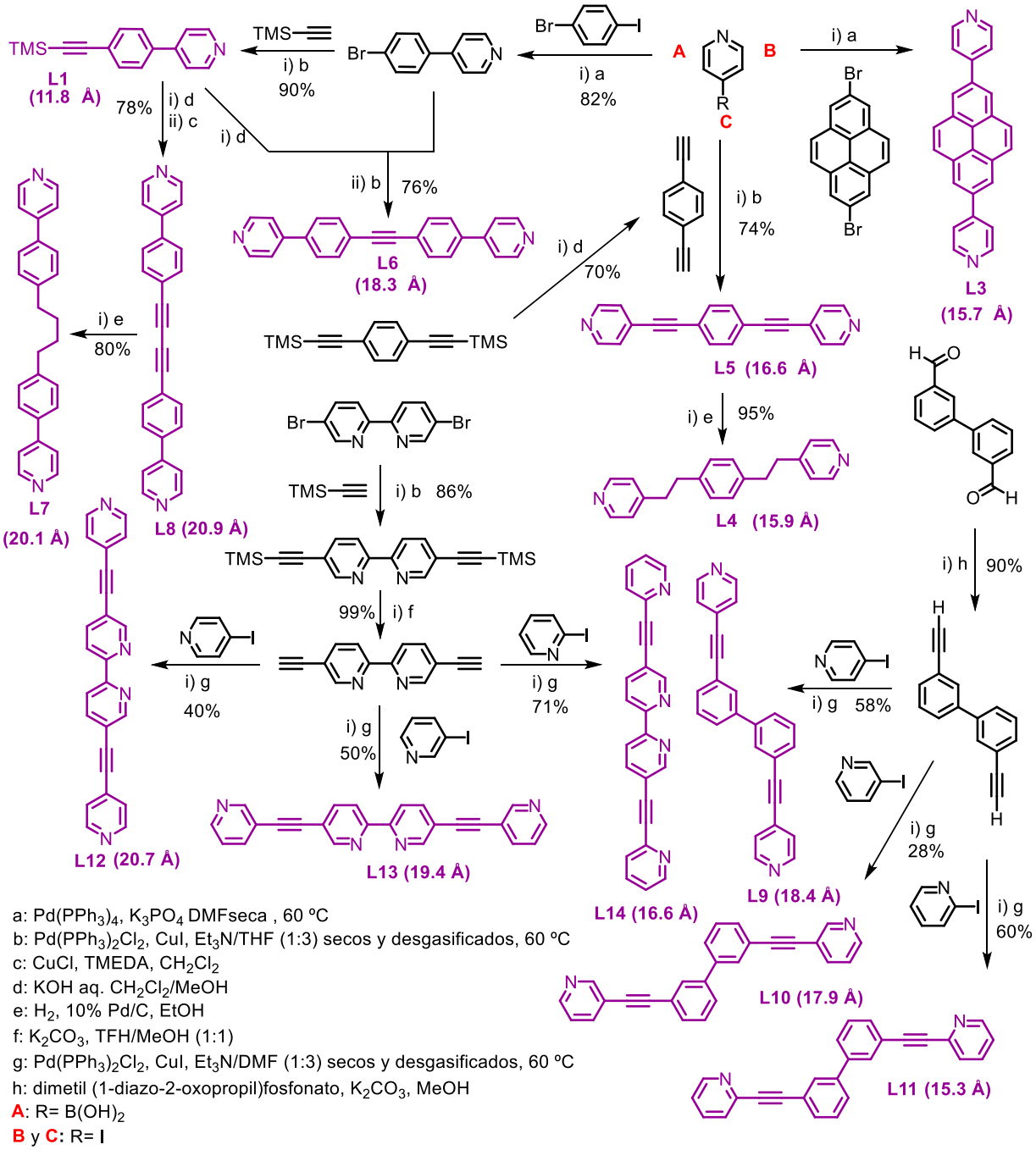


Figura 86. Ruta sintética para la preparación de los ligandos **L1-L14**.

6.1.1.2 Síntesis de la cápsula.

Para la síntesis de la capsula se programó una estrategia convergente que implicaba la conexión de la tapa y el ciclopéptido en la última etapa del proceso. Por tanto, ambos componentes se prepararon por separado. En cuanto a la construcción del esqueleto peptídico, se llevó a cabo un proceso sintético en disolución, también convergentem que comienza con la obtención del precursor del γ-Aa enantioméricamente puro (Figura 87). Este se prepara partiendo de la lactama de Vince. Tras la apertura de esta, seguida de la protección con anhídrido de Boc, y posterior resolución enantiomérica emplenado una amina quiral, se obtiene el Boc-*L*-Ace-OH (el derivado que aún mantiene el doble enlace de la lactama de partida). La hidrogenación de este último da lugar al Boc-*L*-Acp-OH con excesos enantiómeros superiores al 98%.

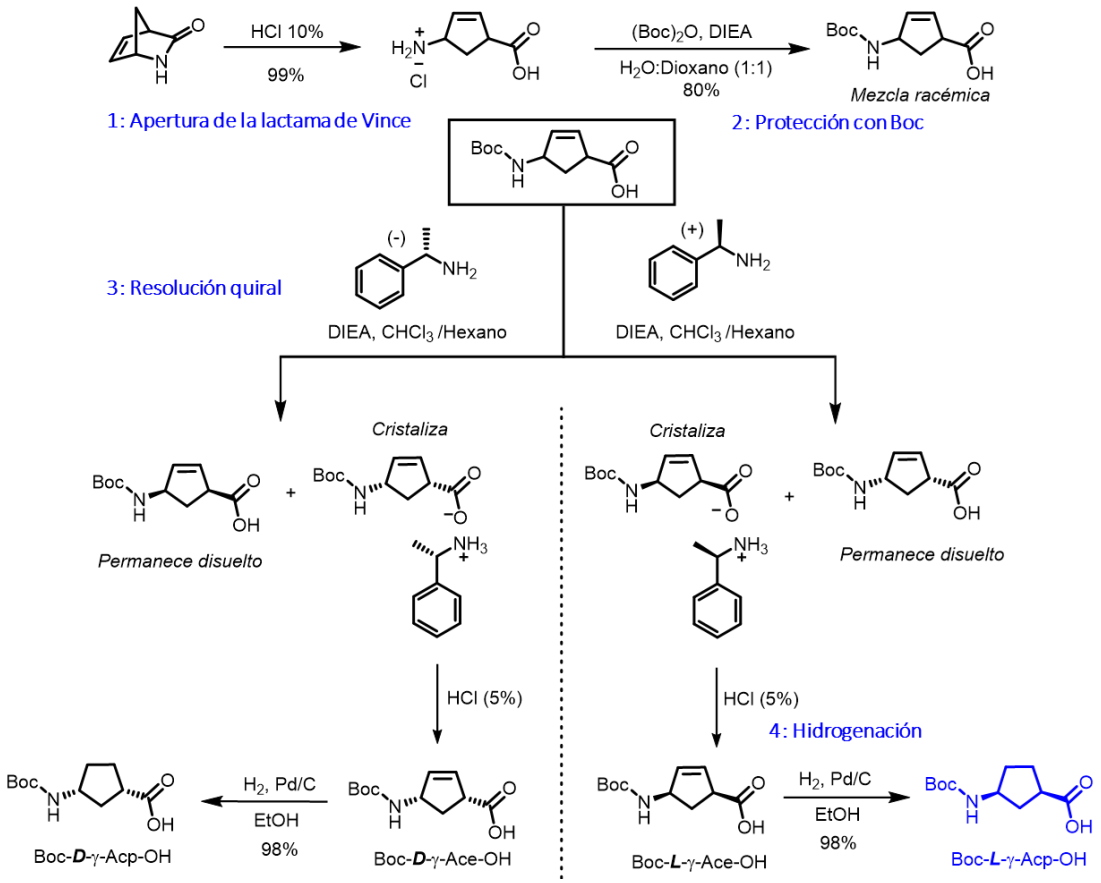


Figura 87. Obtención del Boc-*L*-Acp-OH a partir de la lactama de Vince.

Como se mencionó en la introducción dedicada a los ciclopéptidos, la capacidad de los CPs para autoensamblarse está íntimamente ligada a la conformación plana del macrociclo, que viene dada por la alternancia de quiralidad de los residuos que lo forman. Por tanto, el empleo de una metodología eficiente para la obtención de los γ-Aa enantioméricamente puros es una etapa muy importante para el desarrollo de todo el trabajo posterior. La resolución de la mezcla racémica con la (*R*)-1-feniletanamina conduce al Boc-*L*-Ace-OH con un 99% de exceso enantiomérico, tal como se determina mediante las técnicas de polarimetría y SFC quiral. El único inconveniente de esta metodología es el tiempo requerido para resolver completamente la mezcla, pues son necesarias varias resoluciones, generalmente tres, consecutivas, para conseguir el producto con la riqueza enantiomérica necesaria.

Para la preparación del α,γ-ciclodecapéptido se emplearán cinco residuos de *L*-γ-Acp y cinco *D*-α-Aa. En este trabajo la dimerización tendrá lugar a través de las caras α, por lo que todos los residuos *L*-γ-Acp estarán *N*-alquilados. De esos cinco *L*-γ-Acp, dos de ellos estarán funcionalizados con la cadena de 3-azidopropilo que emplearemos, posteriormente, en la incorporación de la tapa porfirínica. Los otros tres estarán *N*-metilados ya que no tienen ningún papel estructural añadido. Por tanto, se prepararán dos derivados, el Boc-*L*-^{Me}*N*-Acp-OMe y el Ns-*L*-^{propilazida}*N*-Acp-OMe (Figura 88). La elección de los grupos protectores se hizo en base a la ortogonalidad durante todo el proceso sintético, pero también atendiendo a demandas estéricas y modificación de la reactividad.

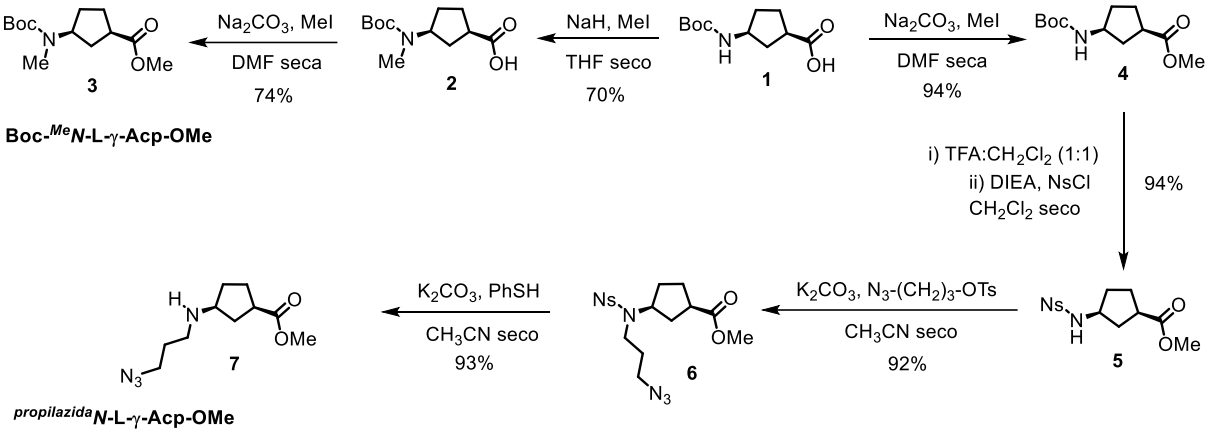


Figura 88. Síntesis de los derivados Boc-*L*-^{Me}*N*-Acp-OMe y Ns-*L*-^{propilazida}*N*-Acp-OMe.

Para preparar los ^{Me}*N*-Acp, empleamos los grupos Boc- y éster metílico para proteger los extremos amino y carboxilo, respectivamente. Esta combinación, además de ser ortogonal, no interfiere con la reactividad de la cadena alquílica que introducimos y la metilación del grupo amino transcurre con buenos rendimientos (≈70%) cuando se utilizan bases fuertes (NaH). Sin embargo, cuando se pretenden usar electrófilos más voluminosos o menos reactivos, esta estrategia no es la adecuada ya que requiere de tiempos de reacción largos que provocan la epimerización del Cα ($pKa_{H\alpha} \approx 25$). Por tanto, para la incorporación de la cadena de la propilazida optamos por utilizar el grupo nosilo (*orto*-nitrobencenosulfónico) para proteger y activar el grupo amino. El uso de esta sulfonamida aromática pobre en electrones se conoce como la estrategia de Fukuyama,[509] y aumenta la acidez del protón de la amina, por lo que es posible utilizar bases más débiles (DIEA) que reducen el problema de la epimerización. La desprotección de este grupo se realiza con tioles en medio básico (K_2CO_3) y es compatible con los ésteres metílicos. Esta desprotección implica una sustitución nucleófica sobre el anillo aromático, que tiene lugar a través de un intermedio Meisenheimer, generándose un tioéter, SO_2 y la amina libre. Las cadenas alquílicas que hemos escogido como *N*-sustituyentes no son sensible a los medios fuertemente ácidos y básicos que usaremos en la secuencia de desprotecciones.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[509] Kan, T.; Fukuyama, T. *Chem. Commun.* **2004**, *4*, 353-359.

En cuanto a los α-Aa seleccionados, todos tienen cadenas laterales hidrófobas para facilitar la solubilidad de los CPs en los medios no polares donde pretendemos realizar los estudios. Decidimos introducir el residuo de *D*-Tyr(OMe) para facilitar el seguimiento de la cadena peptídica por RMN y espectroscopía UV. La distinción entre *D*-Leu y *D*-Ala como los otros dos α-Aa utilizados se hizo con el objetivo de facilitar la identificación de los cinco posibles rotoisómomeros, algo sobre lo que entraremos en detalle más adelante. Como se comentó, la síntesis de **CP1** se programó de forma convergente para ir construyendo pequeños componentes sintéticos que fuesen creciendo mediante su combinación programada hasta la construcción del decapéptido lineal, el cual se ciclaría antes de llevar a cabo la conjugación con la tapa porfirínica. Por tanto, a partir de estos aminoácidos (Figura 88), se prepararon tres dipéptidos distintos mediante los típicos acoplamientos peptídicos (Figura 89).

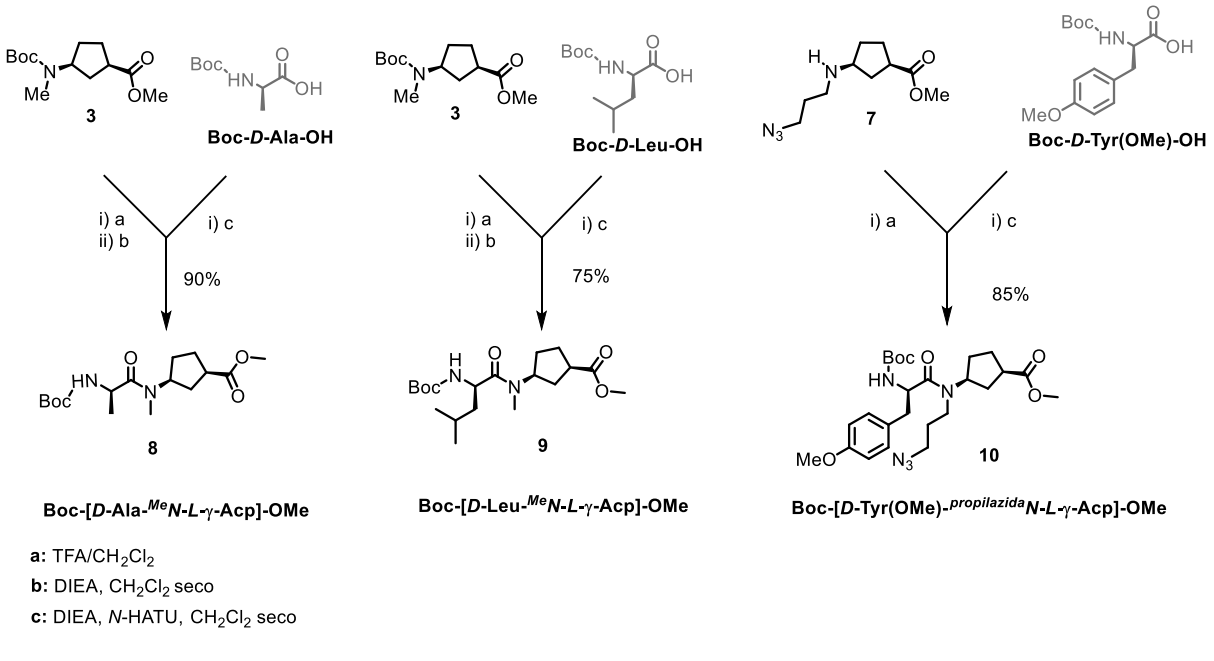


Figura 89. Síntesis de los tres dipéptidos que conforman en esqueleto peptídico.

A partir de estos tres dipéptidos se continuaría con la combinación de estos para hacer crecer la cadena peptídica. En la metodología desarrollada en el grupo, se suelen emplear agentes de acoplamiento basados en sales de guanidinio/uronio que forman intermedios activos (ésteres activos) que reaccionan con nucleófilos (aminas libres) y dan lugar al nuevo enlace peptídico. Las reacciones se llevan a cabo en presencia de una base impedida estéricamente para reducir la epimerización de los aminoácidos. Esta arranca el protón del ácido que reacciona con el grupo guanidinio para formar *in situ* una especie reactiva que rápidamente reacciona con el hidroxibenzotriazol para formar el éster activo (Figura 90). Una vez formado el éster activo, aumenta la acidez de la posición α, siendo el momento crítico en la posible epimerización. De este modo, a la hora de proceder experimentalmente, se agita durante 5 minutos el péptido o aminoácido *C*-desprotegido con el agente de acoplamiento, en medio básico. Posteriormente se adiciona a la mezcla una disolución del sustrato *N*-desprotegido, también en medio ligeramente básico. Normalmente, se recurre a distintos agentes de acoplamiento dependiendo de la reactividad del grupo amino y del tiempo de reacción. Para la síntesis de dipéptidos, acoplamos el extremo amino del γ-Aa con el extremo carboxilo del α-Aa. Se trata de un acoplamiento con una amina secundaria, por lo que al ser

menos reactiva que una amina primaria, recurrimos al agente de acoplamiento más reactivo de la serie, *N*-HATU.[510]

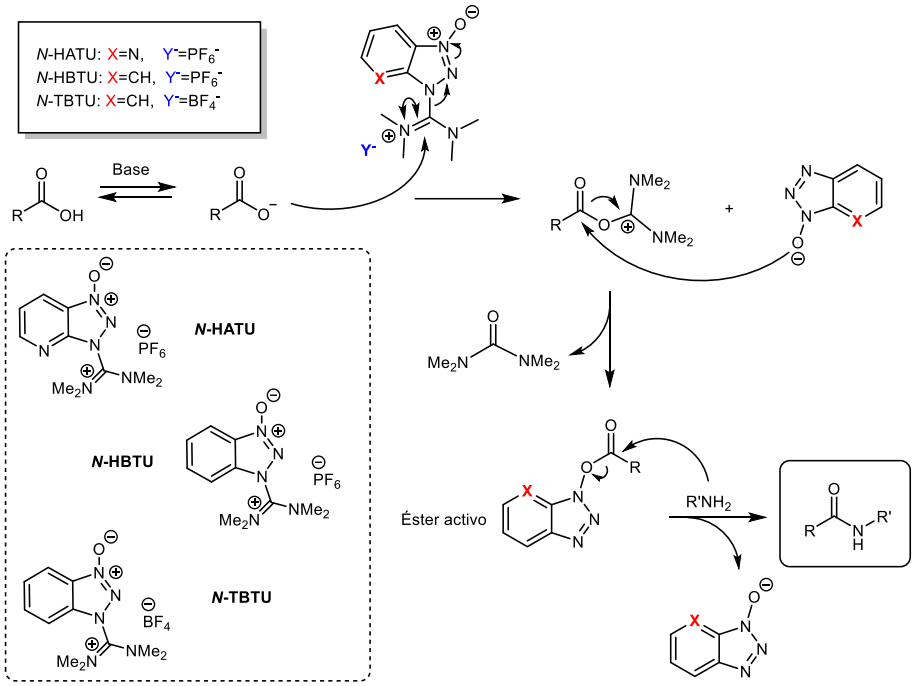


Figura 90. Formación de enlaces peptídicos mediante el uso de agentes de acoplamiento que favorecen la formación de ésteres activos.

Seguidamente a la preparación de los dipéptidos, se inicia una secuencia de acoplamientos sucesivos hasta obtener el α,γ-ciclodecapéptido deseado **CP1** (Figura 91), mediante la obtención sucesiva de los tetra- y hexapéptidos (**11** and **12**, respectivamente) y a partir de estos dos, el decapéptido lineal (**13**). Para ello se van acoplando el extremo amino del α-Aa de un dipéptido con el ácido carboxílico del γ-Aa del otro. En estos casos, al ser acoplamientos con aminas primarias, utilizamos *N*-HBTU como agente activante. Aunque su reactividad es menor que la del *N*-HATU, es suficientemente reactivo para obtener buenos rendimientos (> 80%) y tiene la ventaja de un menor coste y mayor estabilidad en disolución. En la etapa de ciclación, recurrimos al *N*-TBTU por presentar un mayor tiempo de vida media en disolución, lo que incrementa los rendimientos en reacciones más lentas como estas macrociclaciones. En esta última etapa se realiza un acoplamiento intramolecular, por lo que recurrimos a condiciones de alta dilución (10^{-3} M) para evitar los procesos intermoleculares. Esto implica tiempos de reacción mucho más largos que para los acoplamientos mencionados previamente. Hablamos de 10-20 h para la ciclación de tetra- o hexapéptidos, y hasta varios días cuando aumenta el número de residuos de la cadena (siendo necesario añadir más agente acoplante con el paso del tiempo), como es el caso de **CP1**. Con estas consideraciones, se obtuvo **CP1** en un 52% de rendimiento para la etapa de ciclación.

En cuanto a la purificación de los compuestos **1-13**, se llevó a cabo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice. Sin embargo, las etapas de ciclación son las que suelen producir

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[510] El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev*. **2011**, *111*, 6557-6602.

más productos secundarios de polaridad muy similar al CP. Por ello, se hace necesaria la purificación por HPLC.

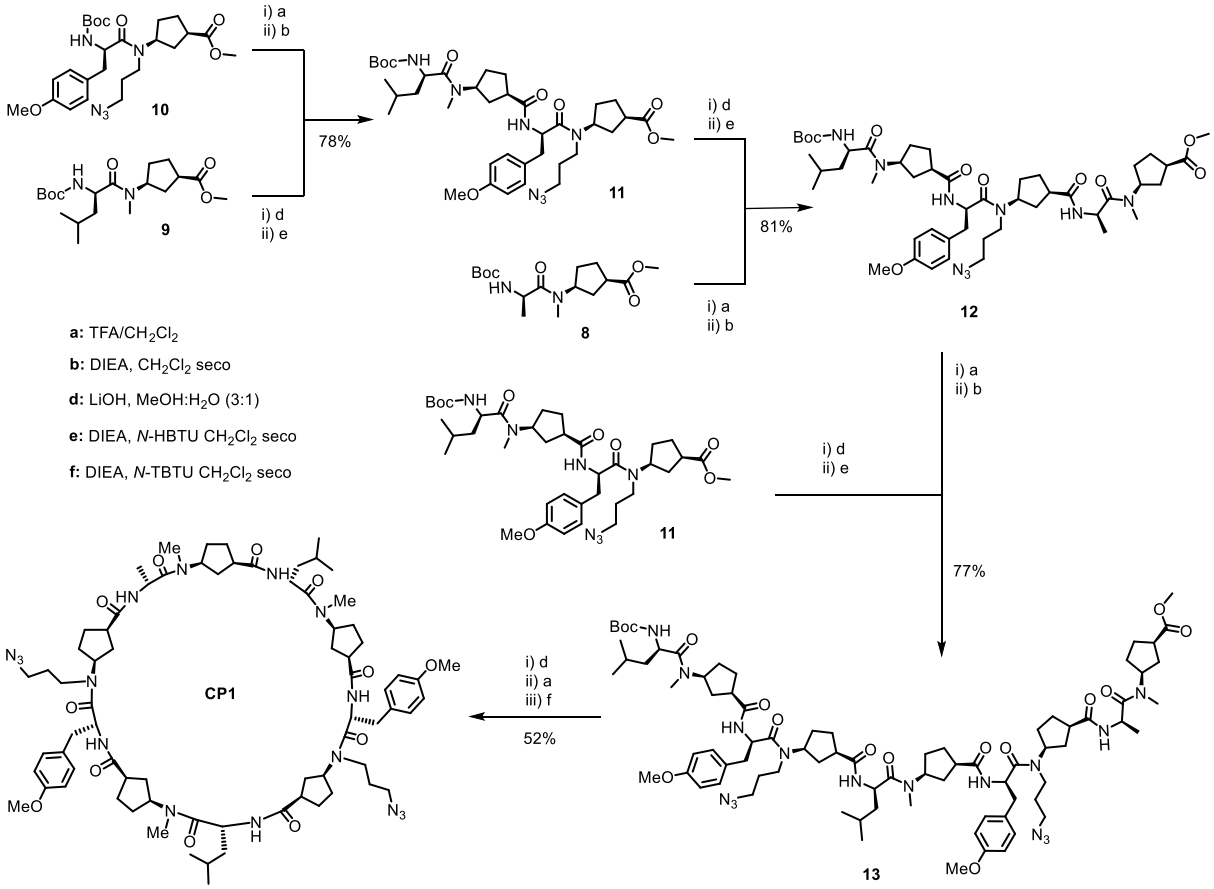


Figura 91. Secuencia sintética seguida para la obtención de **CP1**.

Tras la purificación de **CP1**, se caracterizó por espectrometría de masas [1415.8562 m/z ([**CP1**]$^{+}$)], RMN y FTIR. En su espectro de IR se observaban las bandas características de tensión del enlace NH (3302 cm^{-1}), así como las correspondientes a los carbonilos de las amidas (1623, 1614, 1532, 1542 y 1514 cm^{-1}), así como el pico de la tensión N≡N para el grupo azida a 2098 cm^{-1}. En relación con el análisis mediante RMN, **CP1** posee diez residuos y ninguno de ellos es químicamente equivalente, lo que da lugar a un espectro complejo (Figura 92A). Esta complejidad se ve agravada debido a la formación de hasta cinco dímeros no equivalentes a los que denominamos como rotoisómeros, ya que se pueden interconvertir entre ellos simplemente rotando uno de los CPs con respecto al otro a través del eje de crecimiento del nanotubo. Cuando los α,γ-CPs forman dímeros, los residuos α-Aa de un CP se aparean con los α-Aa del otro CP, dejando, por consiguiente a los γ-Acp también enfrentados entre sí (Figura 92B). Dado que todos los α-Aa de **CP1** son diferentes químicamente, existen cinco posibilidades de organizarse. En el espectro de RMN COSY de **CP1**, se pueden advertir al menos 9 picos de cruce (Figura 92C) entre la zona donde aparecen los protones amida (8.2-8.8 ppm) y los Hα de los α-Aa (5.1-5.4 ppm). Esto nos indica que, al menos, hay más de un rotoisómero. En la figura 89B se muestra uno de esos dímeros en el que los Acp marcados con el número 4 están apilados uno sobre el otro. Como consecuencia de que se trata de una lámina antiparalela, ninguno de los otros residuos se aparea con su equivalente. Los restantes dímeros se obtendrían de rotar el CP superior con respecto al inferior que dejaríamos fijo.

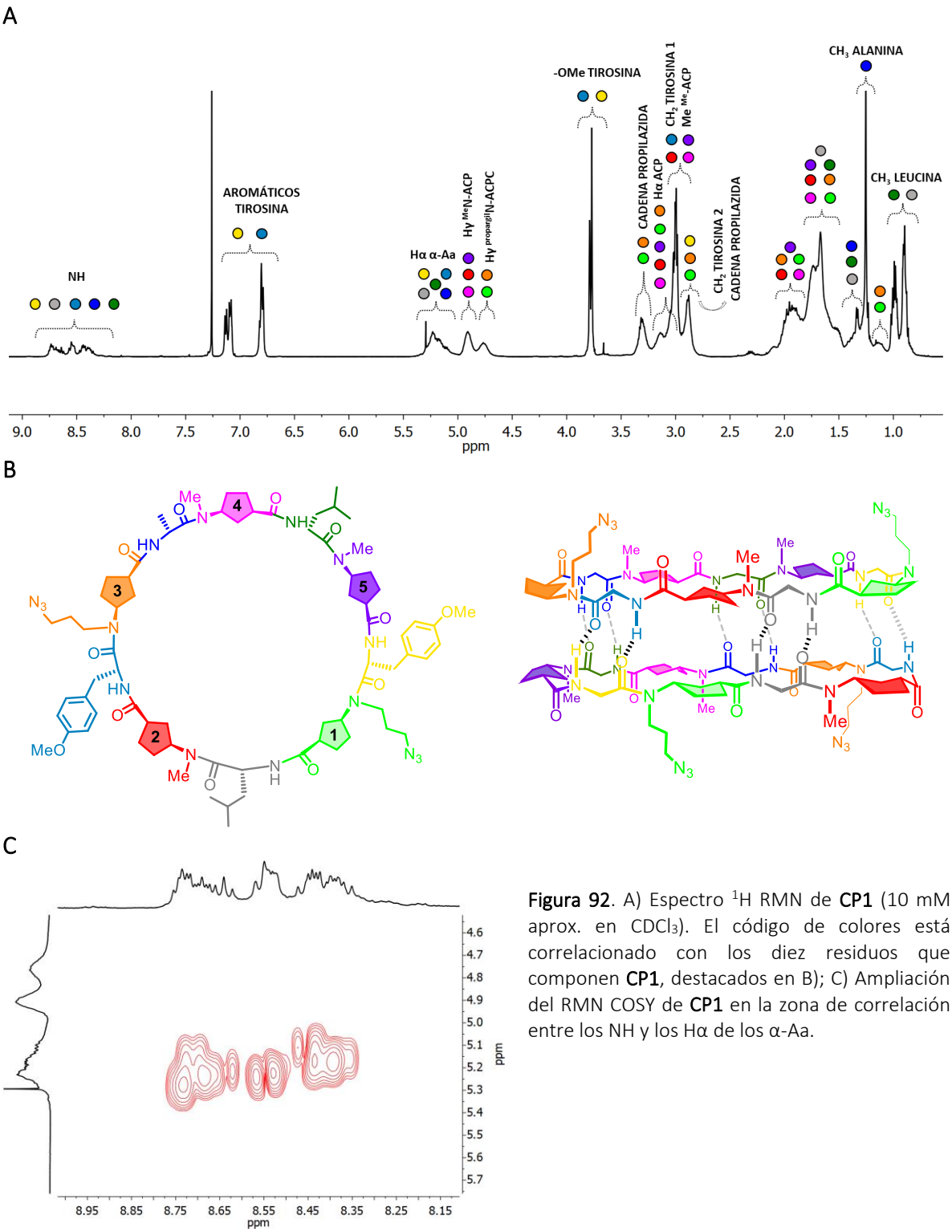


Figura 92. A) Espectro ^{1}H RMN de **CP1** (10 mM aprox. en $CDCl_3$). El código de colores está correlacionado con los diez residuos que componen **CP1**, destacados en B); C) Ampliación del RMN COSY de **CP1** en la zona de correlación entre los NH y los Hα de los α-Aa.

En la Figura 93A se representan dichos dímeros con modelos más sencillos en los que el color de los Acp sirve como referencia para visualizar las diferencias. Una rotación en el sentido de las agujas del reloj dejaría en el siguiente dímero (Figura 93A, R2) el Acp 1 apareado consigo mismo (en verde lima). En el siguiente (Figura 93A, R3), se aparearían los residuos marcados con el número 3 (en naranja) y así sucesivamente hasta generar los cinco isómeros. Para estudiar sobre ello, realizamos un profundo examen de **CP1** mediante RMN. El análisis conjunto de los datos aportados por COSY, TOCSY y NOESY nos permite identificar las señales

correspondientes a todos los residuos (Figura 92A). Pudimos identificar dos residuos de tirosina diferentes, así como dos residuos de leucina. Sin embargo, no pudimos distinguir entre los dos ^{propilazida}*N*-Acp presentes en la estructura, y tampoco entre los tres ^{Me}*N*-Acp. Sí que pudimos delimitar los grupos de señales que pertenecen en conjunto a los dos ^{propilazida}*N*-Acp, así como también aquellas de ^{Me}*N*-Acp. Por tanto, pudimos distinguir entre ^{propilazida}*N*-Acp y ^{Me}*N*-Acp. Por otra parte, identificamos dos alaninas que no son químicamente equivalentes, cosa que aludimos al efecto de la rotoisomería.

Como hemos comentado, existen cinco posibilidades distintas en cuanto a la orientación relativa de una subunidad de **CP1** con respecto a la otra (Figura 93A). Para estudiar la rotoisomería de **CP1** en disolución, analizamos su espectro de NOESY, a fin de tratar de encontrar correlaciones que nos indiquen la posible existencia de algún isómero que sea mayoritario. En este sentido, cabe destacar que el espectro de ^{1}H NMR de **CP1** presenta varias zonas donde las señales aparecer solapadas. Esto dificulta la asignación de las correlaciones de nOe y, en algunos casos, debemos asumir que no es posible asegurarlas completamente. Empezando por las correlaciones encontradas para los protones de la amida (Figura 93B), para los dos sistemas claramente diferenciados de tirosina, se encuentra que uno de ellos (señal a 8.53 ppm) tiene un pico nOe con el NH de alanina (8.69 ppm) y, a su vez, también con un NH de leucina (8.37 ppm). Para el otro sistema de tirosina, el NH (8.73 ppm) presenta nOe con el NH de una alanina (8.49 ppm) que no es químicamente equivalente a la mencionada previamente. A su vez, se aprecia nOe entre los dos sistemas de tirosina (8.73:8.56 ppm). También encontramos nOe entre el NH de una de las leucinas con otro de la alanina (8.62:8.44). Atendiendo a estas observaciones, no podemos descartar ninguno de los rotoisómeros, porque todos ellos darían lugar al menos a uno de estos picos de cruce. El rotoisómero 5 (Figura 93A) podría dar lugar a todos los nOe mencionados, exceptuando a aquel entre tirosinas, ya que ninguna queda superpuesta con otra.

Si analizamos los nOe encontrados para las cadenas laterales, vemos que los protones *orto* y *meta* del anillo de tirosina presentan nOe con el CH_2 de la leucina (Figura 93C). A la misma vez, también vemos un pico de cruce entre los CH_3 de la leucina con el CH_2 de la tirosina y con el CH_3 de la alanina (Figura 93D). De nuevo, el rotoisómero 5 podría dar lugar a estas señales de manera simultánea, aunque podrían deberse a la cercanía en el espacio de esos residuos en distintos rotoisómeros dentro de la mezcla.

Por último, encontramos nOe entre los Hγ del ^{propilazida}*N*-Acp con los Hα del ^{Me}*N*-Acp, así como la correlación inversa (Figura 93E). Esto indica la presencia de rotoisómeros donde estos Acp distintamente alquilados no se enfrentan con ellos mismos, sino que ^{propilazida}*N*-Acp quedaría superpuesto sobre ^{Me}*N*-Acp, y viceversa. En **R1** y **R4**, ninguno de los ^{propilazida}*N*-Acp se superpone consigo mismo, mientras que en **R2** y **R3**, solo uno de ellos queda sobre un ^{Me}*N*-Acp. Sin embargo, solo **R1**, **R3** y **R4** dejan dos residuos de tirosina apilados, lo que encaja con el nOe NH tirosina- NH tirosina observado.

La conclusión de este análisis es que no es posible determinar la presencia de un rotoisómero de manera mayoritaria, y que **CP1**, tal como habíamos previsto en el diseño, fotm distintos dímeros en disolución. Consideramos esta situación como una ventaja a la hora de acomodar los diferentes ligandos que prepararemos para estudiar su interacción con la cápsula porfirínica. En esta estructura, la distancia y orientación relativa entre las dos porfirinas variará dependiendo del rotoisómero. Pensamos que esa variabilidad puede jugar a nuestro favor

haciendo que la cápsula sea capaz de acomodar ligados de diferente longitud de manera eficiente, de manera que los ligandos podrían discriminar entre rotoisómeros.

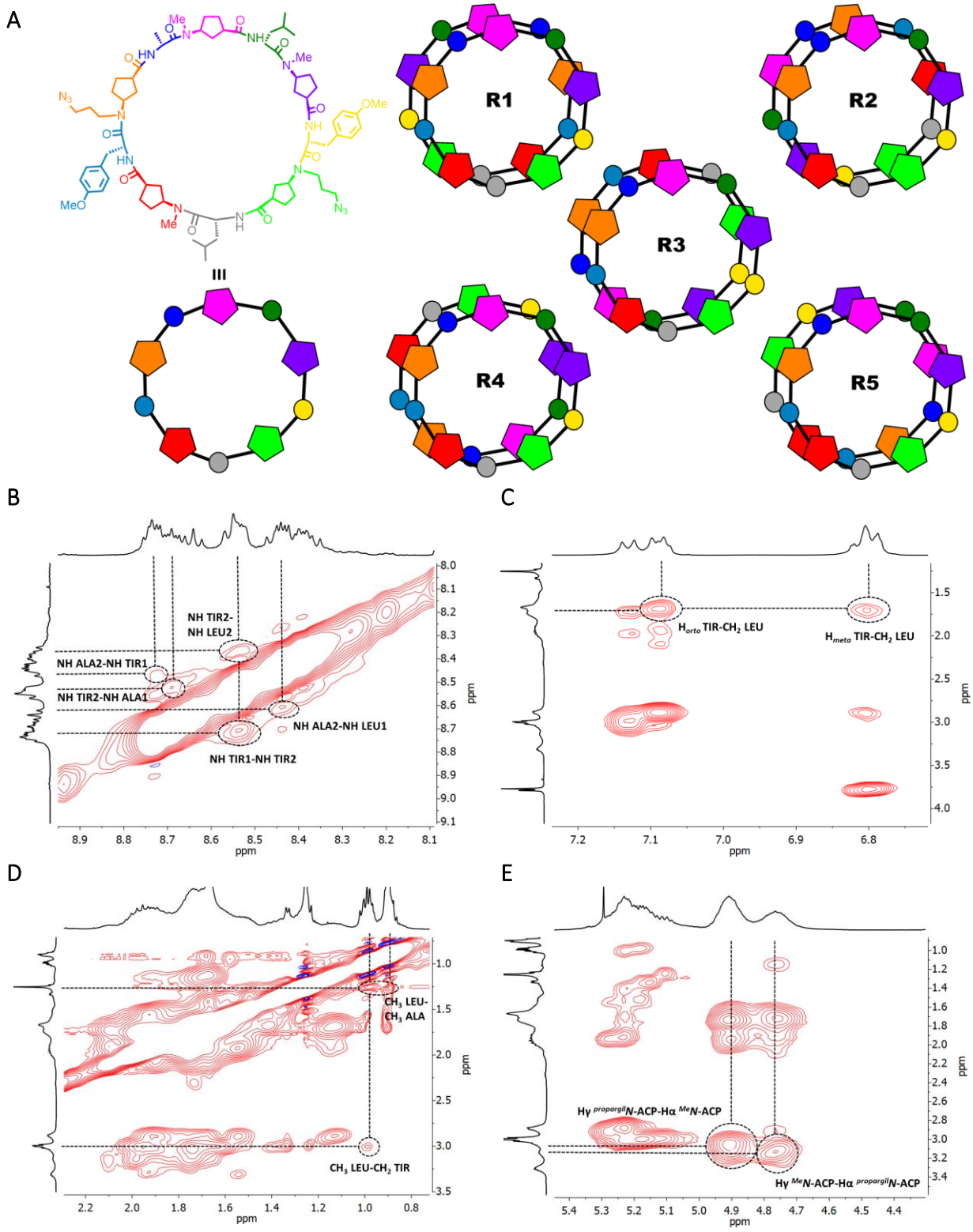


Figura 93. A) Cinco posibles rotoisómeros derivados de la dimerización de **CP1**. Nótese el apilamiento de **CP1** siguiendo una estructura tipo hoja β antiparalela; B-F) Picos de cruce resaltados en el espectro de ROESY RMN de **CP1** para los protones B) NH, C) anillo aromático de los residuos de tirosina, D) Metilos de los residuos de leucina y E) Hγ y Hα de los anillos de Acp.

Simultáneamente a la síntesis de **CP1**, se preparó la porfirina que pretendemos acoplar mediante química *click* con este. Esta molécula, a la cual nos referiremos como **P1**, fue descrita por Lindsay en 2001 para ser el bloque de construcción de un hexámero de porfirinas unidas mediante acoplamiento C-C.[511] Para su preparación, se siguió una metodología que él mismo había desarrollado anteriormente para la síntesis de *trans*-porfirinas *meso*-sustituidas.[512] Esto es, tienen dos sustituyentes distintos en sus posiciones meso, que además quedan en posiciones enfrentadas. El macrociclo formado presenta, por tanto, simetría *C2*. La estrategia sintética se basa en la condensación de dipirrometanos estéricamente impedidos con un aldehído, con el objetivo de impedir la formación de otros isómeros, lo que resulta en mezclas de productos extremadamente difíciles de separar. En el estudio de Lindsay, el 5-mesitildipirrometano dio muy buenos resultados para la obtención de estas *trans*-porfirinas *meso*-sustituidas, dando lugar a rendimientos muy competitivos de entre 30-40%, sin que se observase la formación de mezclas isoméricas. Además, el anillo de mesitileno aporta solubilidad a la porfirina.

La síntesis de **P1** consta de cinco pasos (Figura 94). El primero de ellos es la preparación del 5-mesitildipirrometano (**14**), que tiene lugar mediante la condensación en medio ácido del mesitaldehído con pirrol.[513] La correcta purificación del producto es un paso crucial para el rendimiento del paso posterior de macrociclación. Tras la purificación por columna de **14**, fue necesario llevar a cabo una cristalización en hexano, que permitió la obtención del dipirrometano como un sólido ligeramente grisáceo en un rendimiento del 23%. Paralelamente, se preparó el aldehído con el cual pretendemos condensar el 5-mesitildipirrometano. Se trata del 3-((trimetilsilil)etinil)benzaldehído (**15**), que se obtuvo mediante el acoplamiento de Sonogashira del 3-bromobenzaldehído con etiniltrimetilsilano. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de macrociclación entre el dipirrometano (**14**) y el aldehído (**15**), usando $BF_3{\cdot}Et_2O$ como catalizador y añadiendo posteriormente DDQ como oxidante. Tras la purificación, obtuvimos un sólido púrpura en el que encontramos que, desafortunadamente, había cinco porfirinas distintas. La polaridad extremadamente similar de todas ellas nos impidió realizar la separación en esta etapa. Decidimos avanzar a las etapas siguientes esperando que la diferencia de polaridad se acentuase y pudiéramos aislar la porfirina deseada. La desprotección de los alquinos terminales se llevó a cabo recurriendo a TBAF sobre sílice,[514] ya que el uso de TBAF en disoluciones comerciales o de K_2CO_3 llevaba a desprotonación de los NH pirrólicos (lo cual se aprecia por el cambio de coloración de morado a verde), tras lo cual no era posible recuperar el producto. Bajo estas condiciones se obtenía la porfirina **16** con excelentes rendimientos. La última etapa fue la metalación con Zn^{II}, para lo que empleamos $Zn(OAc)_2{\cdot}2H_2O$ en una mezcla CH_2Cl_2:MeOH que nos permitió solubilizar tanto la porfirina como la sal de zinc. Afortunadamente, la metalación de la mezcla de porfirinas aumentó considerablemente la diferencia de polaridad entre ellas, lo que nos permitió separar **P1** del resto de porfirinas de manera eficiente. La cantidad de producto obtenido nos permitió estimar que alrededor de un 50% de esa mezcla era la porfirina deseada, obteniendo entonces

[511] Yu, L.; Lindsey, J. S. *J. Org. Chem.* **2001**, *6*, 7402-7419
[512] Littler, B. J.; Ciringh, Y.; Lindsey, J. S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2864-28722.
[513] Littler, B. J.; Miller, M. A.; Hung, C. H.; Wagner, R. W.; O'Shea, D. F.; Boyle, P. D.; Lindsey, J. S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1391-1396.
[514] Wagner, R. W.; Johnson, T. E.; Lindsey, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11166-1180.

un rendimiento global del 7%. Pudimos corroborar la pureza de **P1** por espectrometría de masas usando la técnica de (MALDI, 808.2 m/z, $[M]^+$), además de su espectro ^{1}H RMN.

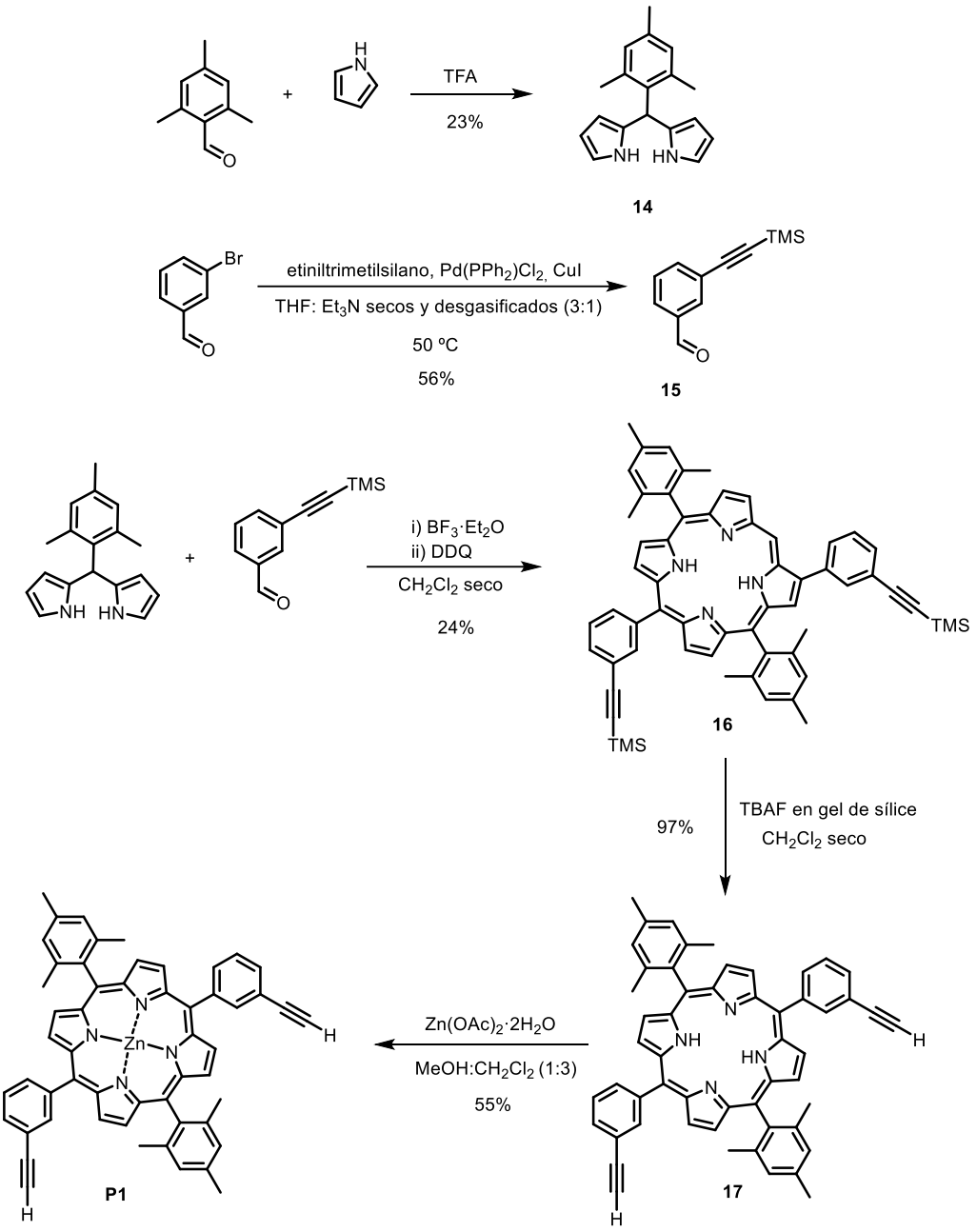


Figura 94. Esquema sintético para la obtención de **P1**.

Una vez preparados ambos sustratos, **CP1** y **P1**, procedimos con la cicloadición catalizada por cobre entre ambos. La versatilidad de esta reacción y sus aplicaciones en multitud de áreas, pero especialmente en el terreno biológico, llevaron a Sharpless, Meldal y Bertozzi a recibir el premio Nobel de Química en el año 2022 por sus aportaciones en este terreno.[515] Actualmente,

[515] a) Meldal, M.; Diness, F. *Trends Chem.* **2020**, 2, 569-584. b) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1983-2181. c) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discov. Today* **2003**, 8, 1128-1137. d) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C.

existen multitud de condiciones estudiadas para este tipo de acoplamiento que modifican el disolvente, la base utilizada y la fuente de cobre con el objetivo de encontrar la combinación óptima para cada tipo de sustrato.[516] En nuestro caso, trabajamos con moléculas insolubles en medio acuoso, lo que hizo que nos decantásemos por unas condiciones descritas en el grupo de Beer para un doble acoplamiento *click* utilizando CH_2Cl_2 como disolvente.[517] Recurrieron al $[Cu(MeCN)_4PF_6]$ como fuente de cobre y DIEA como base. El catalizador $[Cu(MeCN)_4PF_6]$ es conocido por su alta tendencia a la oxidación, lo que limitaría la primera etapa del mecanismo del acoplamiento, que consiste en la formación de un complejo dinuclear de Cu^{I}.[518] Es por ello que se recurre al uso de TBTA, un ligando *tris*-triazólico para protegerlo de la oxidación a través de la coordinación.[519] Estudios mecanísticos sugirieron que este ligando tritópico se coordina simultáneamente a los dos iones Cu^{I} en la estabilización de los intermedios de reacción,[520] aunque recientemente se ha demostrado que se forman intermedios di- y trinucleares de Cu^{I}, estabilizados por una sola molécula de TBTA (Figura 95).[521] Los autores señalan que la proporción de di-Cu/tri-Cu acetiluros depende de la proporción Cu/Ligando.

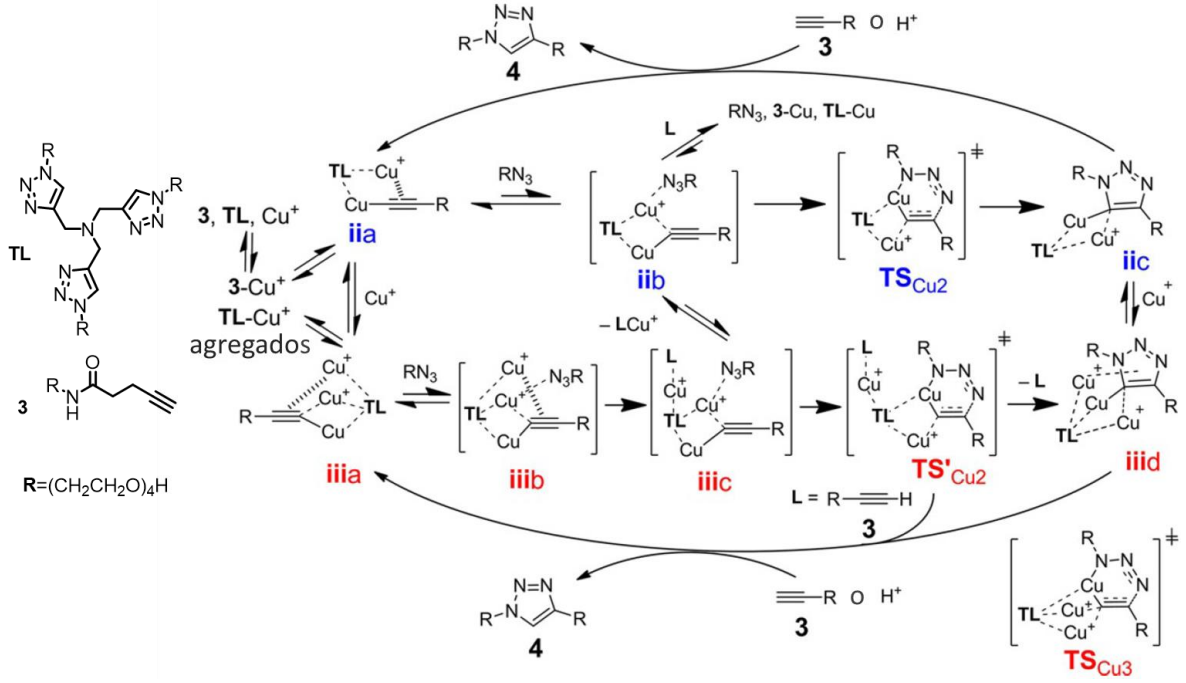


Figura 95. Mecanismo propuesto para el acoplamiento *click* con ligandos *tris*-triazólicos. La imagen ha sido adaptada con permiso de la ref. 521, *Copyright ©2017 John Wiley and Sons*.

R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, *104*, 16793-16797. e) Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690. f) Eeftens, J. M.; van der Torre, J.; Burnham, D. R.; Dekker, C. *BMC Biophys* **2015**, *8*, 9.

[516] a) Wang, C.; Ikhlef, D.; Kahlal, S.; Saillard, J.-Y.; Astruc, D. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *316*, 1-20. b) Meldal, M.; Tomøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, 2952-3015.

[517] Picot, S. C.; Mullaney, B. R.; Beer, P. D. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6230-6237.

[518] Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science* **2013**, *340, 457-460.*

[519] Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.

[520] Berg, R.; Straub, B. F. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2715-2750.

[521] Chen, H.; Cai, C.; Li, S.; Ma, Y.; Luozhong, S.; Zhu, Z. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 4730-4735.

Decidimos, por tanto, emplear la combinación de $[Cu(MeCN)_4PF_6]$ con TBTA y DIEA, usando CH_2Cl_2 como disolvente, lo que nos permitió obtener **CP2** en un 43% de rendimiento como un sólido púrpura (Figura 96A). La purificación de este producto se llevó a cabo mediante cromatografía en columna, ya que no fue posible utilizar métodos HPLC debido a fenómenos de agregación. Para seguir la reacción de *click* en la formación de **CP2**, comparamos su espectro de IR con el de **CP1**, observando que la banda característica del grupo azida (2008 cm^{-1}) había desaparecido por completo al cabo de 12h (Figura 96B), confirmando que la reacción había transcurrido con la consumición total de la sustancia de partida. La presencia de **CP2** [2225.1 m/z ([**CP2**]$^+$)] y su dímero **D2** [4449.3 m/z ([**D2**]$^+$)] se pudo corroborar mediante MALDI.

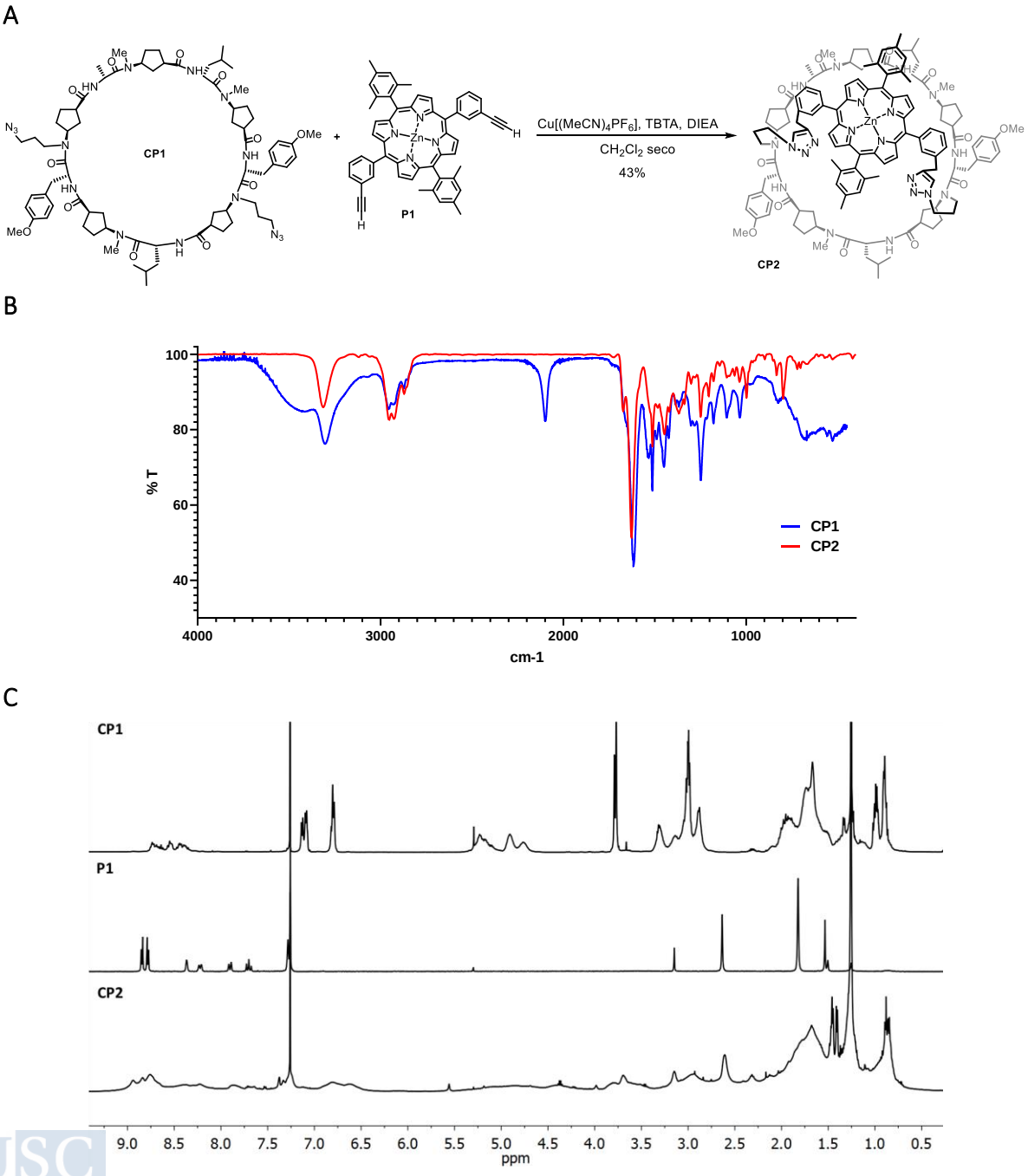


Figura 96. A) Acoplamiento *click* para la obtención de **CP2**; B) Comparación entre los espectros FTIR de **CP1** y **CP2**; C) Comparación entre los espectros de ^{1}H RMN de **CP1**, **P1** y **CP2** en $CDCl_3$.

Además, al comparar es espectro de IR de ambas especies, **CP1/D1** y **CP2/D2**, se aprecia que las bandas de tensión para los enlaces N-H de **D1** y **D2** vibran a frecuencias similares (3305 cm^{-1} para **D1** y 3310 cm^{-1} para **D2**), lo que podría ser indicativo de que la introducción de la tapa porfirínica apenas afecta a la fortaleza de los enlaces de hidrógeno interpeptídicos. Tal como se puede corroborar en la Figura 95C, el espectro de ^{1}H RMN de **CP2** está compuesto por un conjunto de picos anchos y poco definidos que impide realizar apropiadamente la asignación de todas las señales, así como también utilizar posteriormente como herramienta de la técnica de RMN para estudiar la interacción con los ligandos de bipiridina. La rotoisomería anteriormente mencionada para **D2** hace que las señales que vemos sean un promedio de todos los distintos isómeros en disolución, aunque sí que se aprecian señales que se pueden asignar a cada uno de los dos componentes empleados. A pesar de ello, estábamos convencidos de haber conseguido el producto deseado, por lo que decidimos continuar con nuestros planes de estudiar **D2** como un posible nanorreactor.

6.1.1.3 Seguimiento de la coordinación porfirina-ligando a través de UV-Vis.

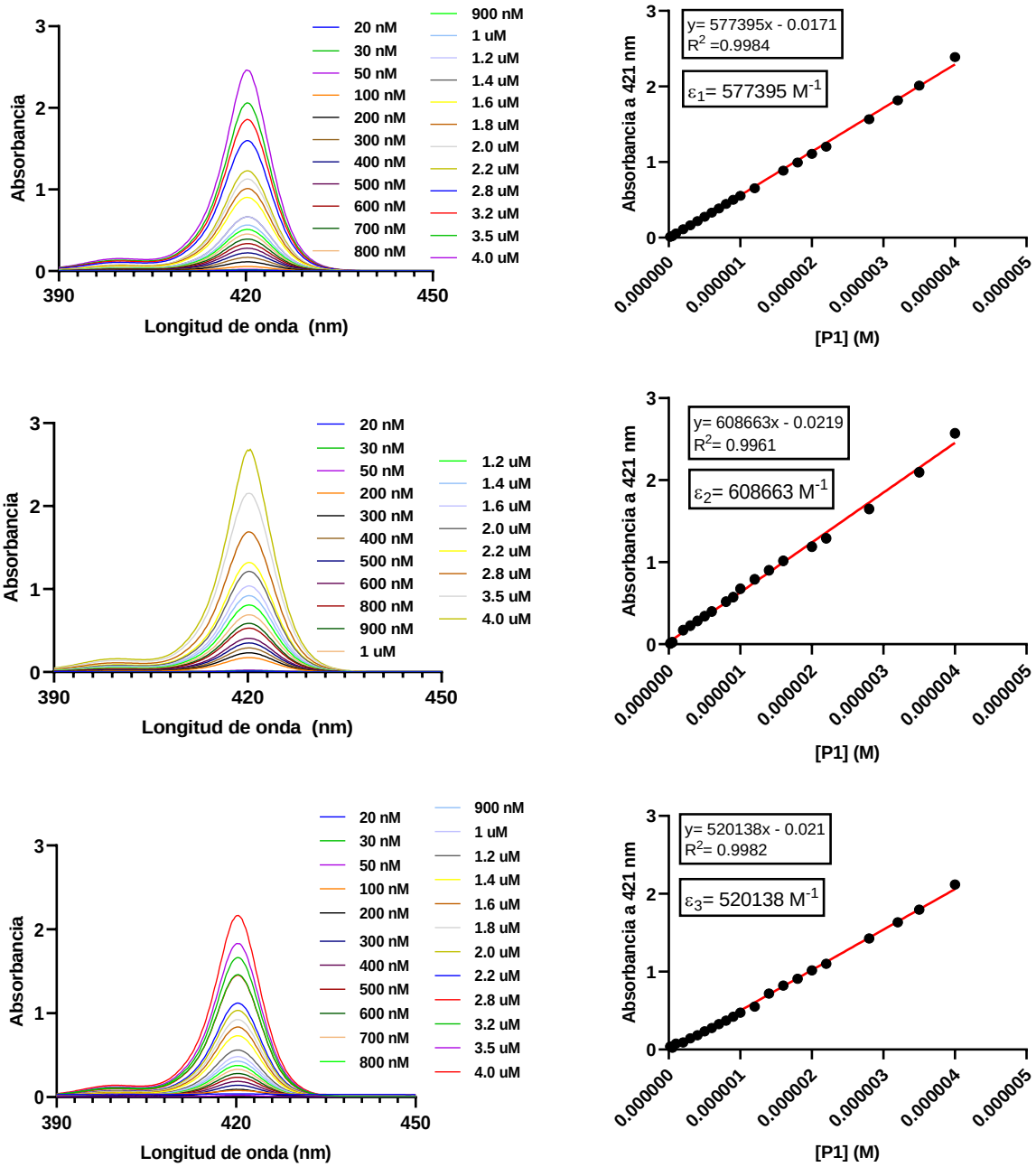
Como se ha detallado en la introducción, en la sección dedicada a cápsulas con porfirinas (sección 4), es conocida la afinidad de estos macrociclos por el nitrógeno de las piridinas cuando se emplean porfirinas de zinc. Para las tetrafenilporfirinas de zinc, la banda Soret aparece a 420 nm. En trabajos donde se ha estudiado su interacción con diferentes ligandos como las piridinas, se ha visto que se produce un desplazamiento al rojo de la banda Soret hasta los 430 nm.[522] Este desplazamiento se relaciona con la donación electrónica del par de electrones libres de la piridina al macrociclo de la porfirina a través del metal.[523] Esta transferencia electrónica lleva a la disminución del gap π-π^* de la porfirina, lo que se traduce en el desplazamiento batocrómico de la banda Soret. De este modo, la intensidad del desplazamiento batocrómico tiene que ver con la carga y polarizabilidad del ligando, ya que cuantos mayores sean estos, más fuerte será la interacción con el metal, y mayor será el desplazamiento. Por consiguiente, decidimos seguir la coordinación porfirina-piridina a través del mencionado desplazamiento de la banda Soret para poder determinar la afinidad de los ligandos bipiridínicos por la cápsula **D2**. Comenzamos por determinar el coeficiente de extinción de la porfirina metalada **P1** (Figura 97). A pesar de la ligera modificación que sufren dos de los sustituyentes en sus posiciones meso tras el acoplamiento con **CP1/D1**, consideraremos que no se producen cambios electrónicos relevantes en la porfirina presente en **D2** con respecto a **P1**. Por ello utilizaremos indistintamente el valor de ε obtenido tanto para los experimentos con **P1** como para aquellos con **D2**.

De acuerdo con la ley de Lambert-Beer,

$$\boldsymbol{A = \varepsilon \cdot b \cdot c}$$

[522] a) Takahashi, K.; Terashima, T.; Komura, T.; Imanaga, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1989**, *62*, 3069-3074. b) Hunter, C. A.; Sarson, L. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 2313-2316. c) Armaroli, N.; Diederich, F.; Echegoyen, L.; Habicher, T.; Flamigni, L.; Marconi, G.; Nierengarten, J. F. *New J. Chem.* **1999**, *23*, 77-83. d) El-Khouly, M. E.; Gadde, S.; Deviprasad, G. R.; Fujitsuka, M.; Ito, O.; D'Souza, F. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2003**, *7*, 413-422.
[523] Nappa, M.; Valentine, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5075-5080.

donde A es la absorbancia, b es la longitud de la celda de medida, y c es la concentración. Por tanto, hay una relación lineal entre la absorbancia y la concentración. Realizamos tres experimentos separados donde preparamos muestras de diferente concentración de **P1** (0.01-5 µM) en $CHCl_3$ desacidificado. Representamos el valor de la absorbancia a 421 nm de cada muestra con respecto a la concentración, obteniendo una recta cuya pendiente es el valor de ε (Figura 97).



$$\left.\begin{aligned} \varepsilon_1 &= 577395\ M^{-1} \\ \varepsilon_2 &= 608663\ M^{-1} \\ \varepsilon_3 &= 520138\ M^{-1} \end{aligned}\right\} \bar{\varepsilon} = 568732\ M^{-1}$$

Figura 97. Rectas de calibrado para la determinación de valor de ε para **P1** a 421 nm.

Utilizamos el promedio de los tres valores obtenidos como ε_{P1_421nm}, que es 568732 M^{-1}. En el caso de la especie **D2**, ya que posee dos porfirinas en su estructura, ε_{D2_421nm} = 1137464 M^{-1}. Tras determinar el valor de ε, procedimos con los experimentos de valoración. En este trabajo, pretendemos estudiar si **D2** es capaz de encapsular los ligandos preparados a través de una serie de experimentos de valoración seguidos por espectroscopía UV-Vis. Los datos obtenidos tras esos estudios serán posteriormente ajustados para obtener la constante de asociación efectiva K_E (Figura 98) para cada uno de ellos, que posiblemente englobaría los procesos de reorganización del receptor para acomodar a los huéspedes **Ln**. Para determinar la influencia de la cooperatividad, se obtuvo previamente las constantes de asociación con la molécula modelo **P1**.

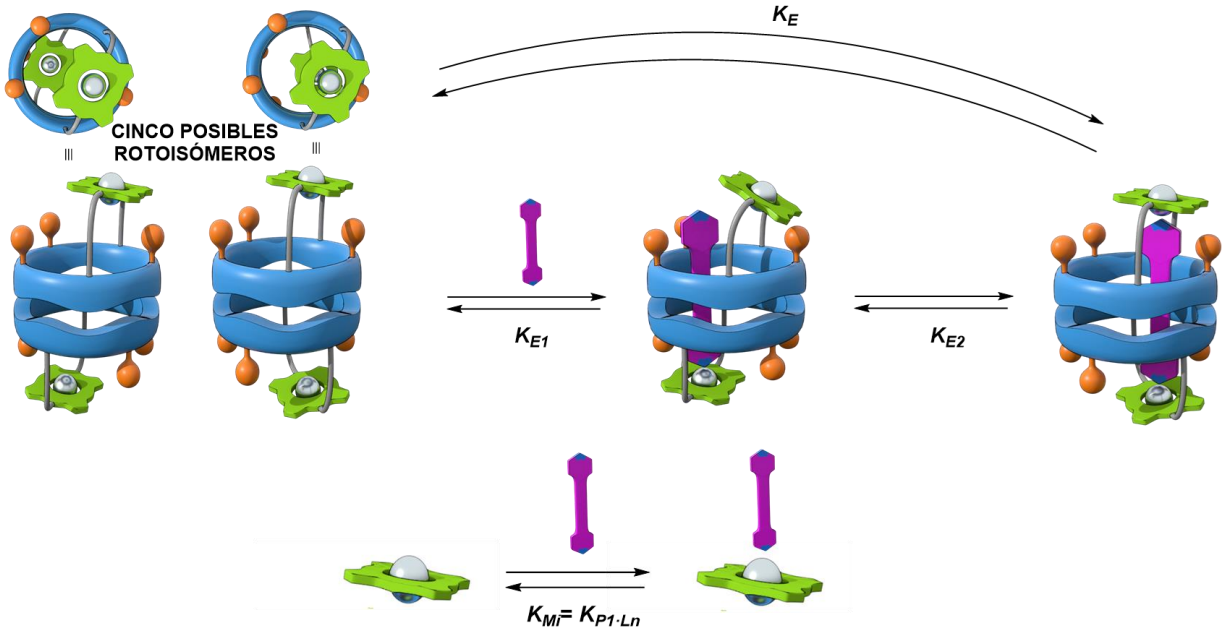


Figura 98. Representación esquemática del proceso de encapsulación de **Ln** en la cavidad de **D2** (arriba) y sistema modelo con **P1** (abajo).

De este modo, primero enfrentamos los ligandos a **P1**, para comprobar que, efectivamente, había coordinación y poder tener la referencia de los valores de asociación en un proceso donde no intervienen efectos de cooperatividad. En este caso, la coordinación de los ligandos (**Ln**) se planteó como un equilibrio 1:1 para formar el complejo **P1·Ln** (Figura 98), dado que, aun tratándose de ligandos bidentados, las concentraciones empleadas hacen más factible este equilibrio que una segunda coordinación. La formación de este complejo desplaza la banda Soret hasta 431 nm. Se prepararon muestras que difieren en la concentración de ligando, mientras que la concentración de porfirina se mantiene constante (250-500 nM). Representando la intensidad de la absorbancia a 431 nm frente a la concentración de ligando, pudimos ajustar estos valores para obtener $K_{P1\cdot Ln}$ (Figura 99 y Figura 100). Observamos que el valor del coeficiente de extinción a 431 nm varía dependiendo del ligando, lo que está relacionado con efectos electrónicos, por ello también se determinó para cada uno de ellos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

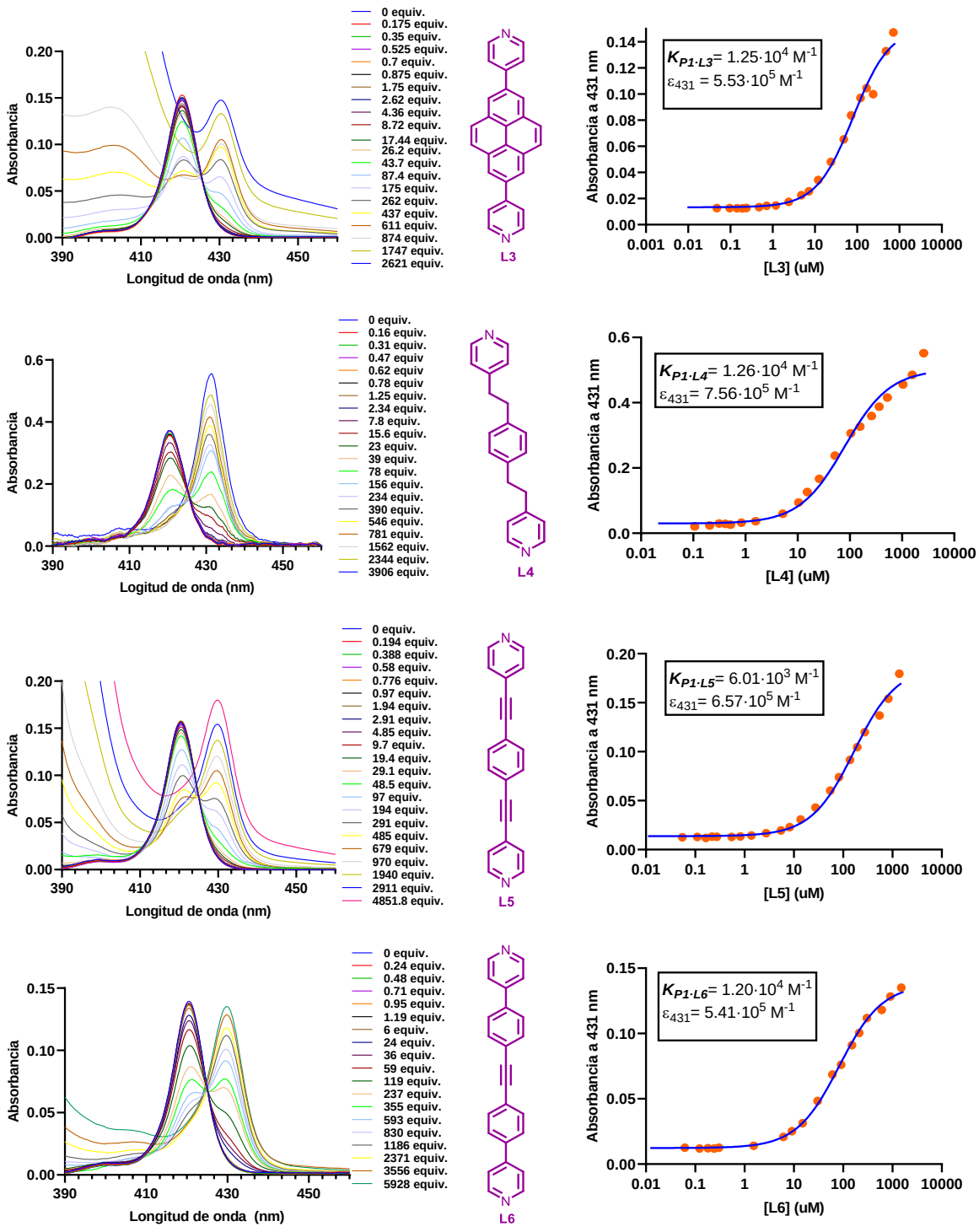


Figura 99. Seguimiento de la valoración de **P1** con **L3**-**L6** mediante UV-Vis y ajuste de los datos obtenidos a un equilibrio 1:1, utilizando la intensidad de la banda a 431 nm frente a los equivalentes de ligando añadido.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

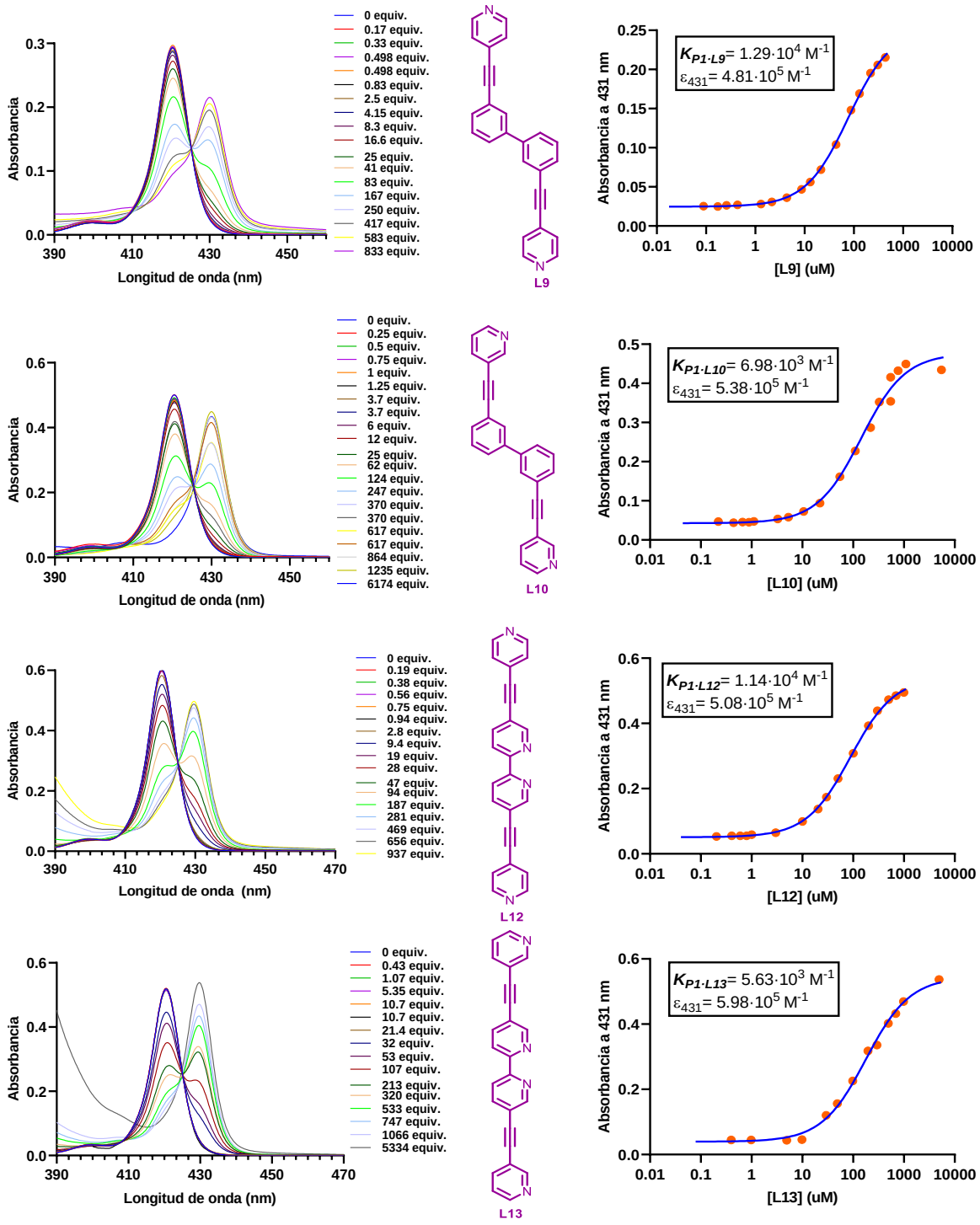


Figura 100. Seguimiento de la valoración de **P1** con **L9**, **L10**, **L12** y **L13** mediante UV-Vis y ajuste de los datos obtenidos a un equilibrio 1:1, utilizando la intensidad de la banda a 431 nm frente a los equivalentes de ligando añadido.

Los valores de $K_{P1·Ln}$ no distan de manera significativa entre sí, tal como cabría esperar, dado que estamos evaluando la coordinación de un ligando bidentado de piridina con la misma porfirina de Zn^{II}. Sin embargo, es posible apreciar que los ligandos con piridinas más pobres en electrones, tal como **L5**, presentan constantes de asociación más bajas que los análogos de mayor riqueza electrónica (**L3**, **L4**, **L6**) y que al incorporar centros aromáticos en esqueletos similares a **L5**, el valor de la constante vuelve a aumentar (**L8**, **L12**). Los valores más

sorprendentes los encontramos para los ligandos **L12** y **L13**, con un acetileno (grupo que retira carga) unido a la piridina y que además tiene un anillo central de bipiridina, también atractor de electrones. Por ello, esperábamos para ambos valores inferiores, sin embargo, son comparables con los obtenidos con grupos aromáticos. Una posible explicación es que los anillos de piridina centrales también puedan intervenir en la coordinación con **P1**, y por tanto se podría tratar de ligandos tetradentados y no bidentados. Por otro lado, también resalta la disminución de afinidad que presentan los ligandos con *meta*-piridinas terminales (**L10** y **L13**), lo que puede estar relacionado con un efecto inductivo atractor de electrones del grupo acetilénico, además de motivos estéricos derivados de la posición del nitrógeno en *meta*. Estas tendencias se pueden apreciar también al comparar el número de equivalentes necesarios de cada ligando para alcanzar la relación ~1:1 entre las bandas de absorción de las especies complejada y libre (Figura 101 y Figura 102). Aunque posiblemente estos valores no tengan ningún significado físico/químico como consecuencia de los diferentes coeficientes de extinción de ambas especies y del solapamiento con otras bandas de absorción de los ligandos, véase, por ejemplo, los experimentos con los ligandos **L3**, **L5** o **L13**. A modo de resumen, todos los datos obtenidos en estos experimentos con la molécula modelo **P1** se han recopilado en la Tabla 1.

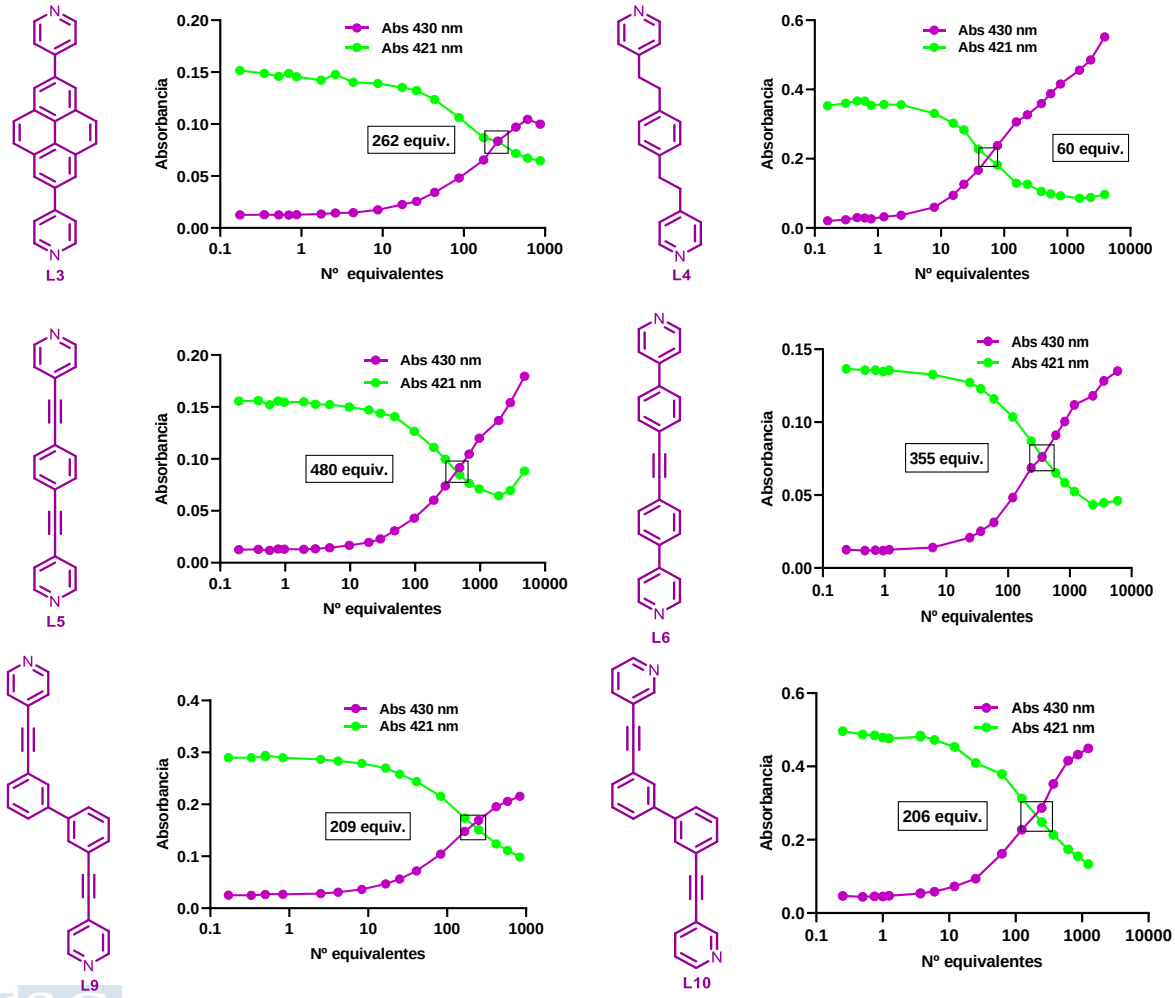


Figura 101. Nº de equivalentes adicionados de los ligandos **L3-L10** para alcanzar la proporción 1:1 de porfirina **P1** complejada (Soret 431 nm) *versus* libre (Soret 421 nm).

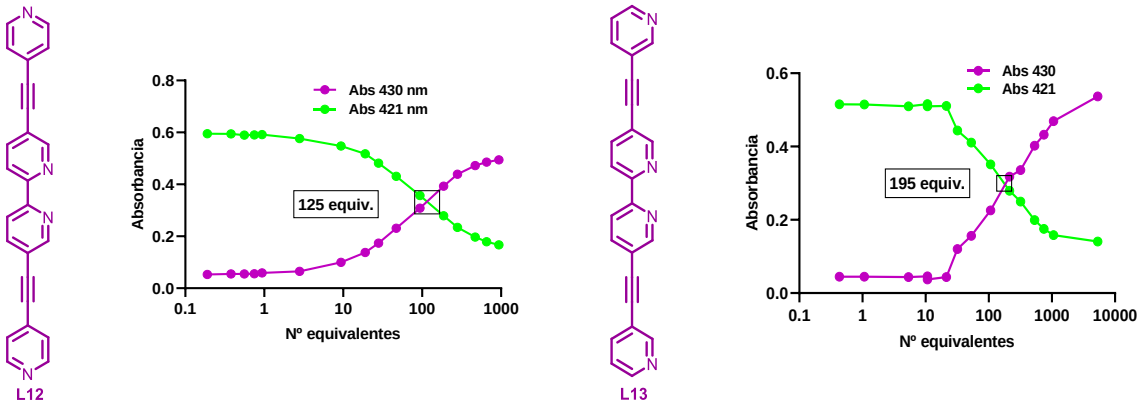


Figura 102. Nº de equivalentes adicionados de los ligandos **L12** y **L13** para alcanzar la proporción 1:1 de porfirina **P1** complejada (Soret 431 nm) *versus* libre (Soret 421 nm).

	Longitud (Å)	$K_{P1\cdot Ln}$ (M^{-1})	ε_{431} (M^{-1})	N
L3	15.7	1.25×10^4	5.53×10^5	262
L4	15.9	1.26×10^4	7.56×10^5	60
L5	16.6	6.01×10^3	6.57×10^5	480
L6	18.3	1.20×10^4	5.41×10^5	355
L9	18.4	1.29×10^4	4.81×10^5	209
L10	17.9	6.98×10^3	5.38×10^5	206
L12	20.7	1.14×10^4	5.08×10^5	125
L13	19.4	5.63×10^3	5.98×10^5	195

Tabla 1. Recopilación de los datos recogidos tras los experimentos de valoración de **P1** con los diferentes **Ln.** El valor **N** simboliza el número de equivalentes necesario para alcanzar la relación molar 1:1 entre las especies **P1** y **P1·Ln**.

6.1.1.4 Seguimiento de la coordinación cápsula-ligando a través de UV-Vis.

Una vez estudiado el comportamiento de los ligandos con la porfirina modelo **P1**, habiendo podido confirmar su afinidad, decidimos llevar a cabo el mismo tipo de experimentos con **D2**. De este modo, pretendíamos identificar las diferencias en sus afinidades para relacionarlo con la posible cooperatividad de la encapsulación. Como en los casos anteriores, se comprobó que se producía también ese desplazamiento de la banda Soret de 421 a 431 nm cuando se incrementaba la cantidad de ligando (Figura 103-Figura 106), excepto para los ligandos **L11** y **L14** (derivados con las piridinas terminales *orto*-orientados), que no provocaron ningún cambio tras la adición de hasta 1000 equivalentes. Estos ligandos tampoco dan respuesta con **P1** y, por tanto, lo atribuimos a que las *orto*-piridinas no eran capaces de coordinarse con el centro metálico por razones estéricas.

En el trabajo previo del grupo donde se había desarrollado una cápsula con características estructurales similares a **D2** (Figura 79 y Figura 84),[502] se observó que era necesario un tiempo de equilibrado de 12h para obtener valores de absorción constantes con respecto a las bandas a 421 y 431 nm, dado que la relación entre ambas (Abs_{421nm}/Abs_{431nm}) se reducía con el tiempo. Este fenómeno se atribuyó a un proceso de encapsulación lento debido a que era necesario la

disociación del dímero para poder atrapar el ligando. Sin embargo, esto no ocurría con **D2**, donde esta relación (Abs_{421nm}/Abs_{431nm}) no variaba con el tiempo. Como hemos detallado en el apartado de síntesis de este capítulo, en este diseño hemos apostado por aumentar la longitud de los conectores entre la porfirina y el péptido con el objetivo principal de poder hospedar ligandos de mayor tamaño que permitiesen la incorporación de un centro de coordinación extra y que además dejase un espacio para el flujo de los sustratos y productos. Esta decisión tiene consecuencias en cuanto a la libertad de movimiento de la tapa molecular y al espacio que queda entre péptido y porfirina, que se ven ambos incrementados. Pensamos que este es el motivo por el cual los ligandos pueden entrar a la cavidad de **D2** sin necesidad de que se desensamble, sino que acceden por las "ventanas" moleculares que deja la estructura.

Para realizar los cálculos y ajustes, utilizaremos los valores de ε_{431} y ε_{421} que habíamos obtenido previamente en los experimentos de valoración con **P1**, teniendo en cuenta que el receptor **D2** contiene dos porfirinas en su estructura. Además, tanto para **P1** como para **D2** tuvimos en cuenta la absorción inicial a 431 nm debido a la cola de la banda a 421 nm. Empezamos las valoraciones con **L1**, que se usará como modelo para comparar con los demás ligandos (Figura 103). Para este caso, se realizó el ajuste de los datos a un modelo 1:1, representativo de la formación de **D2·L1** (una constante), y también el ajuste al modelo 1:2, representativo la formación **D2·L1₂** (dos constantes), aunque en ambos en ambos casos se obtuvo el mismo valor de K_a. **L1** es un ligando monodentado, por lo que no puede coordinarse simultáneamente a las dos porfirinas de un mismo receptor **D2**. Lo que vemos es la coordinación de dos moléculas de **L1** con una molécula de **D2** en un proceso que no está influido por efectos de cooperatividad o alosterismo. Esto se ve claramente reflejado en el valor de su constante de asociación (K_a = 7.6 x 10^3 M^{-1}) en comparación al resto de ligados. Se requiere la adición de casi 25.000 equivalentes de **L1** para la completa desaparición de la banda a 421 nm. Los experimentos realizados con el resto de ligandos muestran que pequeñas adiciones de estos ligandos ya dan lugar a incrementos apreciables en la banda del complejo, mientras que con el ligando **L1** estos cambios se empiezan a observar tras la adición de más de 100 equivalentes (Figura 104-Figura 106). Tras una primera evaluación de los datos obtenidos, se pudo constatar que este modelo no era representativo de la interacción entre **D2** y algunos de los ligandos, pues el ajuste se desviaba en gran medida.

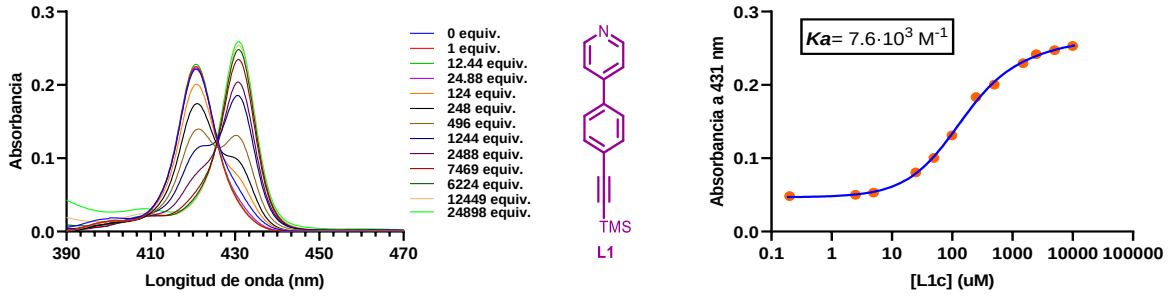


Figura 103. Seguimiento de la valoración de **D2** con **L1** mediante UV-Vis y ajuste de los datos obtenidos a un equilibrio 1:2 para la formación de **D2·L1₂** ($K_{a1}=K_{a2}=K_a$) utilizando la intensidad de la banda a 431 nm frente a los equivalentes de ligando añadido.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

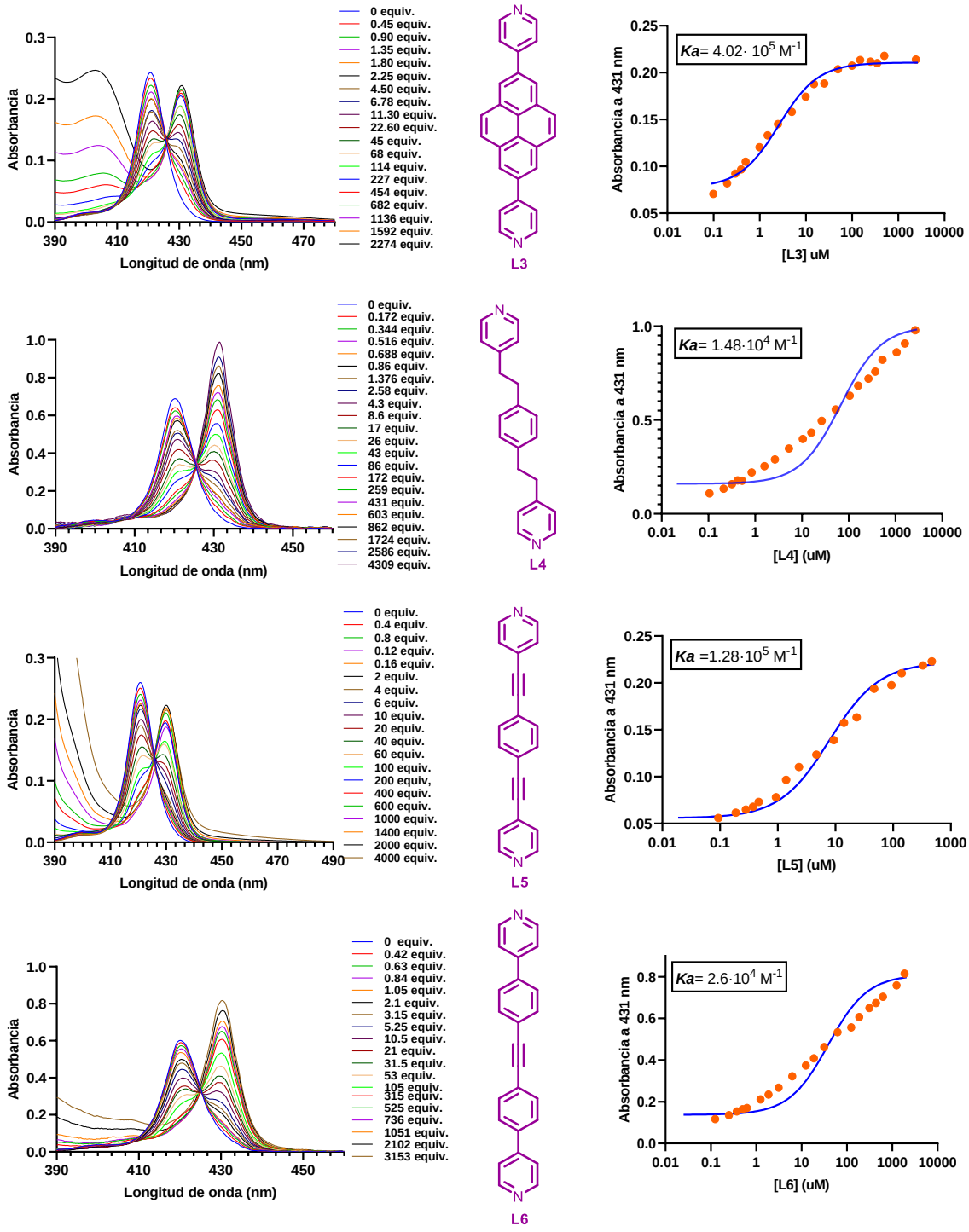


Figura 104. Seguimiento de la valoración de **D2** con **L3-L6** mediante UV-Vis y ajuste de los datos obtenidos a un equilibrio 1:1, utilizando la intensidad de la banda a 431 nm frente a los equivalentes de ligando añadido.

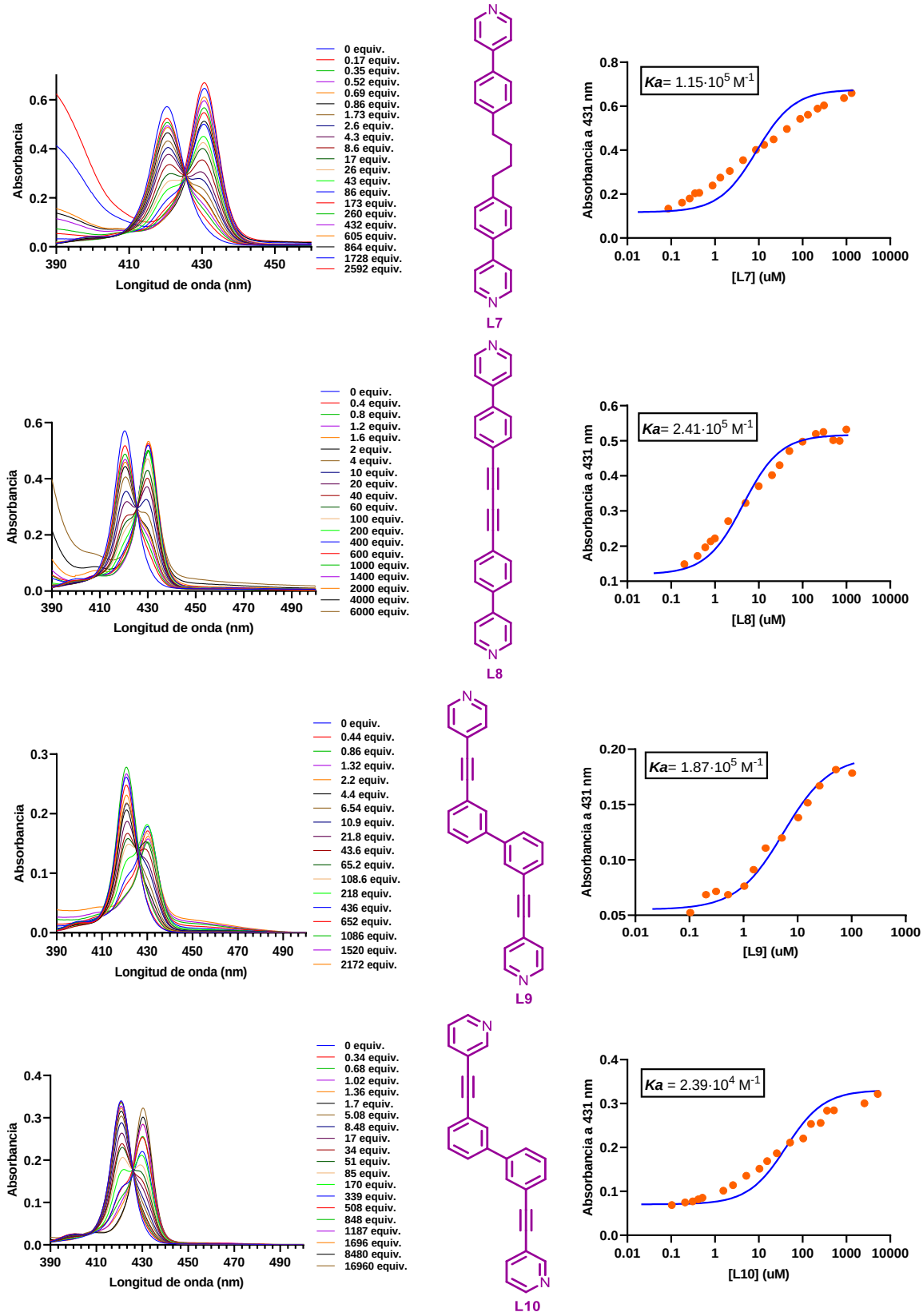


Figura 105. Seguimiento de la valoración de **D2** con **L7-L10** mediante UV-Vis y ajuste de los datos obtenidos a un equilibrio 1:1, utilizando la intensidad de la banda a 431 nm frente a los equivalentes de ligando añadido.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

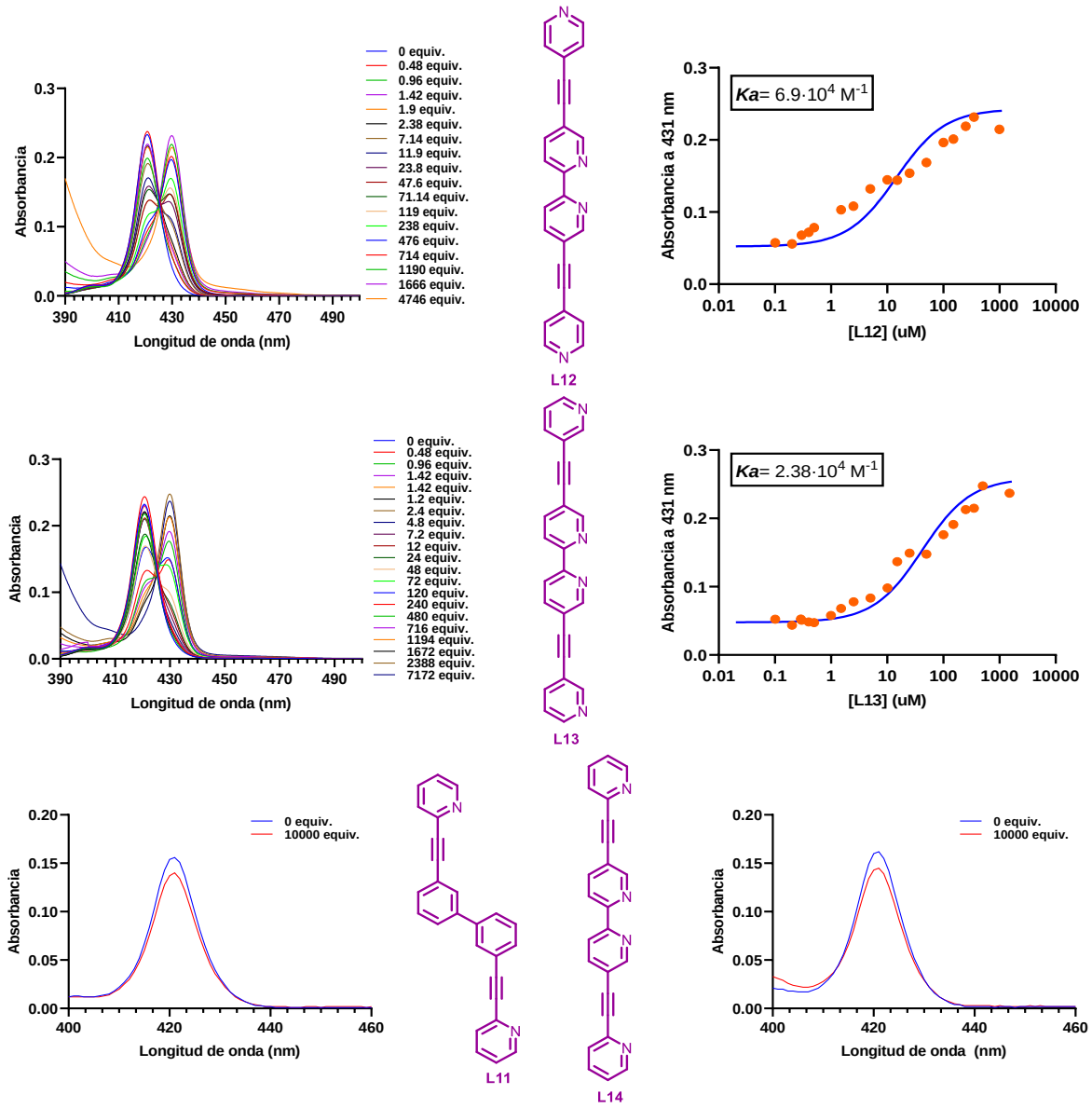


Figura 106. Seguimiento de la valoración de **D2** con **L12-L14** mediante UV-vis y ajuste de los datos obtenidos a un equilibrio 1:1, utilizando la intensidad de la banda a 431 nm frente a los equivalentes de ligando añadido.

Tras llevar a cabo este primer ajuste de los datos de todos los ligandos al modelo 1:1, se pudo constatar que algunos ligandos no parecen ajustarse adecuadamente. Sin embargo, desde el principio se aprecia una diferencia muy clara entre los resultados obtenidos cuando se enfrentaron los mismos ligandos a **P1** o a **D2**. Esto puede apreciarse claramente en el número de equivalentes adicionados para alcanzar la relación molar 1:1 de **D2** libre *versus* **D2** complejado con **Ln** (Figura 107 y Figura 108). Mientras que en el caso de **P1**, estos valores están en la ventana de 100-500 equivalentes (Figura 101 y Figura 102), en el caso de **D2**, hablamos de 8-100 equivalentes. Por ejemplo, si comparamos el ligando **L5**, fueron necesarios 480 equivalentes cuando se enfrentó a **P1** para llegar a una proporción 1:1 entre la porfirina libre y complejada, mientras que solo se necesitaban 50 equivalentes de **L5** para llegar al mismo punto con **D2**. Del mismo modo, hablamos de unas diferencias de 262 *vs* 18 equivalentes para **L3**, o de 355 *vs* 21 para **L6**. Estas diferencias nos indican que el proceso que está teniendo lugar cuando **D2** es el receptor no tiene las mismas características, en términos supramoleculares, que en el caso de **P1**, lo cual apunta a la encapsulación de los ligandos en la cavidad de **D2**.

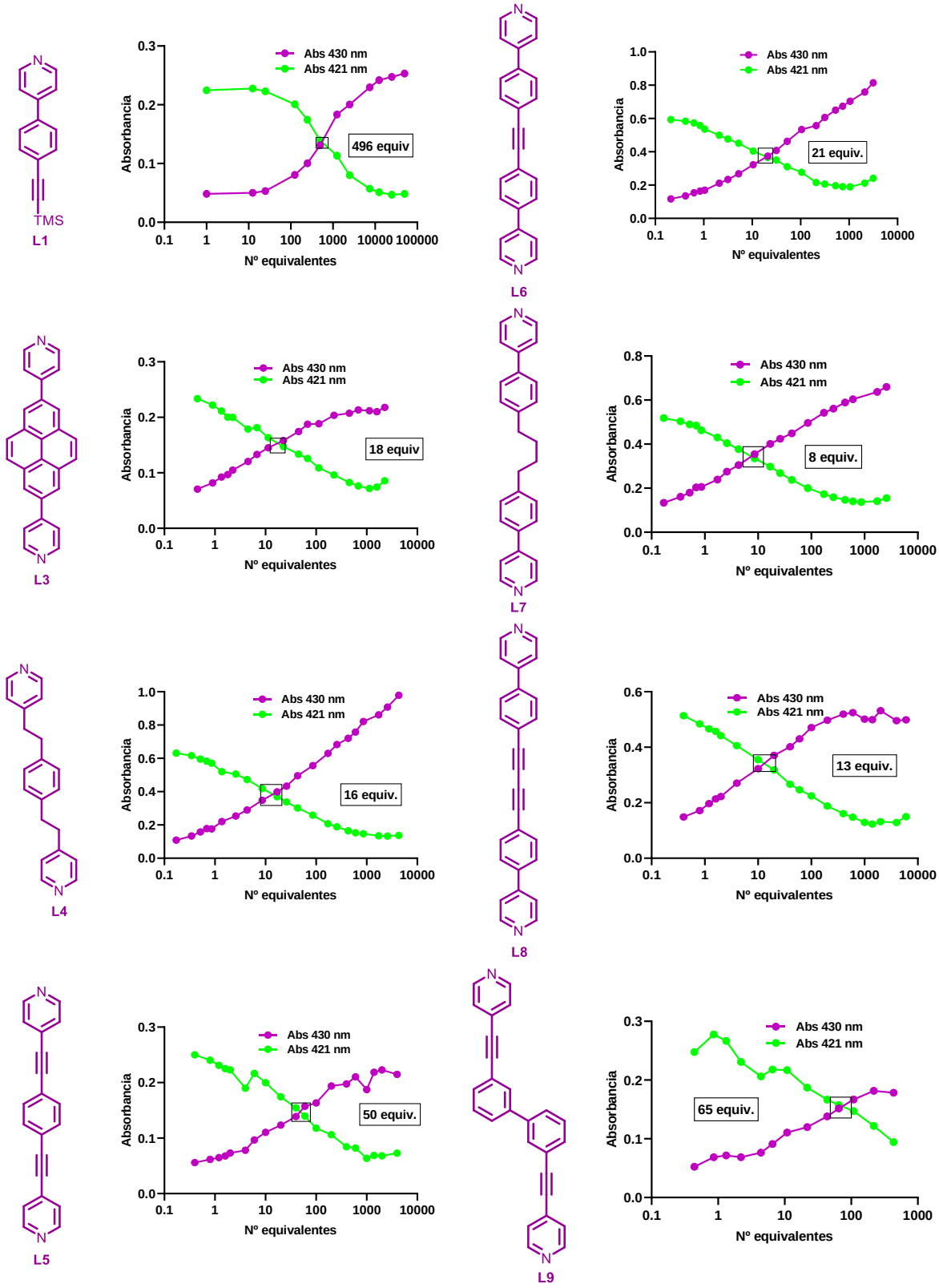


Figura 107. Nº de equivalentes adicionados de cada ligando para alcanzar la proporción 1:1 de receptor **D2** complejado (Soret 431 nm) *versus* libre (Soret 421 nm) para los ligandos **L1-L9**.

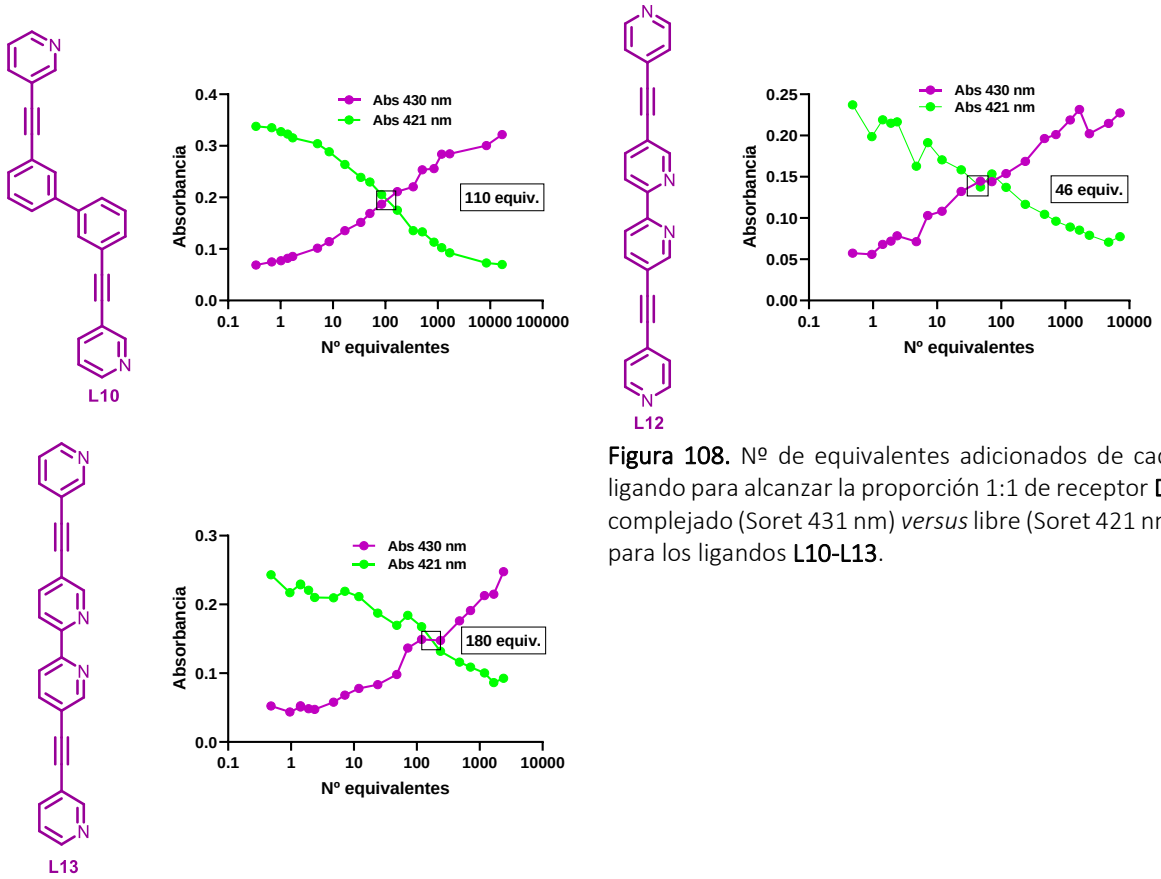


Figura 108. Nº de equivalentes adicionados de cada ligando para alcanzar la proporción 1:1 de receptor **D2** complejado (Soret 431 nm) *versus* libre (Soret 421 nm) para los ligandos **L10-L13**.

Los datos experimentales obtenidos con los ligandos bidentados **L3**, **L5**, **L8** y **L9** se ajustan al modelo 1:1 comentado (Figura 98), en el que una molécula de **D2** hospeda una molécula de **Ln**. De estos ligandos, **L3** es el que presenta la mejor afinidad (K_a = 4.02 x 10^5 M^{-1}) y la menor corresponde a **L5** (K_a = 1.28 x 10^5 M^{-1}), aunque estos ligandos poseen similares longitudes, considerando las distancia N-N entre las dos piridinas de los extremos (15.7 Å para **L3**, 16.6 Å para **L5**). Para el resto de los ligandos (**L4**, **L6**, **L7**, **L10** y **L12**) se observaba una seria desviación de este modelo. Nos planteamos que dicha desviación podría deberse a una contribución notable de otros equilibrios, que se ilustran en la Figura 109. El mayor inconveniente a la hora de dilucidar qué equilibro contribuye en mayor medida en el proceso global, es que todas las posibles interacciones entre **D2** y **Ln** dan lugar a la misma respuesta macroscópica, el aumento de la intensidad de absorbancia a 431 nm. Pensamos que para los ligandos **L3**, **L5**, **L8** y **L9**, el equilibrio dominante sería la formación de los complejos **Ln⊂D2**, representado como el mecanismo 1 en la Figura 109. Por tanto, el valor de K_a para estos ligandos representaría la constante de asociación efectiva o K_E, que es lo mismo que $K_{Ln⊂D2}$. La valoración con el ligando **L13** también se ajusta al modelo 1:1, aunque su afinidad es notablemente menor. Pensamos que el hecho de que se ajuste a este modelo, junto con la baja constante que presenta, podría deberse a que no está encapsulado en **D2**, sino que, mayoritariamente, se coordina a las porfirinas del receptor por su cara externa, como ilustra el mecanismo 5 de la Figura 109. De este modo, para **L1**, **L3**, **L5**, **L8**, **L9** y **L13** calculamos el valor de la molaridad efectiva (EM) (Tabla 2) que se define como $K_{Ln⊂D2}/(K_{P1\cdot Ln})^2$ y nos aporta información sobre la disponibilidad de ligando para la coordinación con **D2**. El producto $K_{Ln⊂D2}$·EM refleja qué ligandos se unen más favorablemente. **L1** y **L13** presentan muy bajos valores de $K_{Ln⊂D2}$·EM, lo que apoya nuestra idea de que **L13** no es capaz de ocupar la cavidad de **D2** mediante la coordinación simultánea con las dos porfirinas. **L3** es el que presentan mejor valor de $K_{Ln⊂D2}$·EM. En general los valores de la

EM son bajos sugiriendo una baja cooperatividad en la doble coordinación de estos ligandos Proponemos que **L3**, **L5**, **L8** y **L9** podrían operar bajo un modelo 1:1 con **D2** (mecanismo 1, Figura 109), mientras que con **L1** y **L13** no hay cooperatividad, y el ligando se une preferentemente por fuera (mecanismo 5, Figura 109).

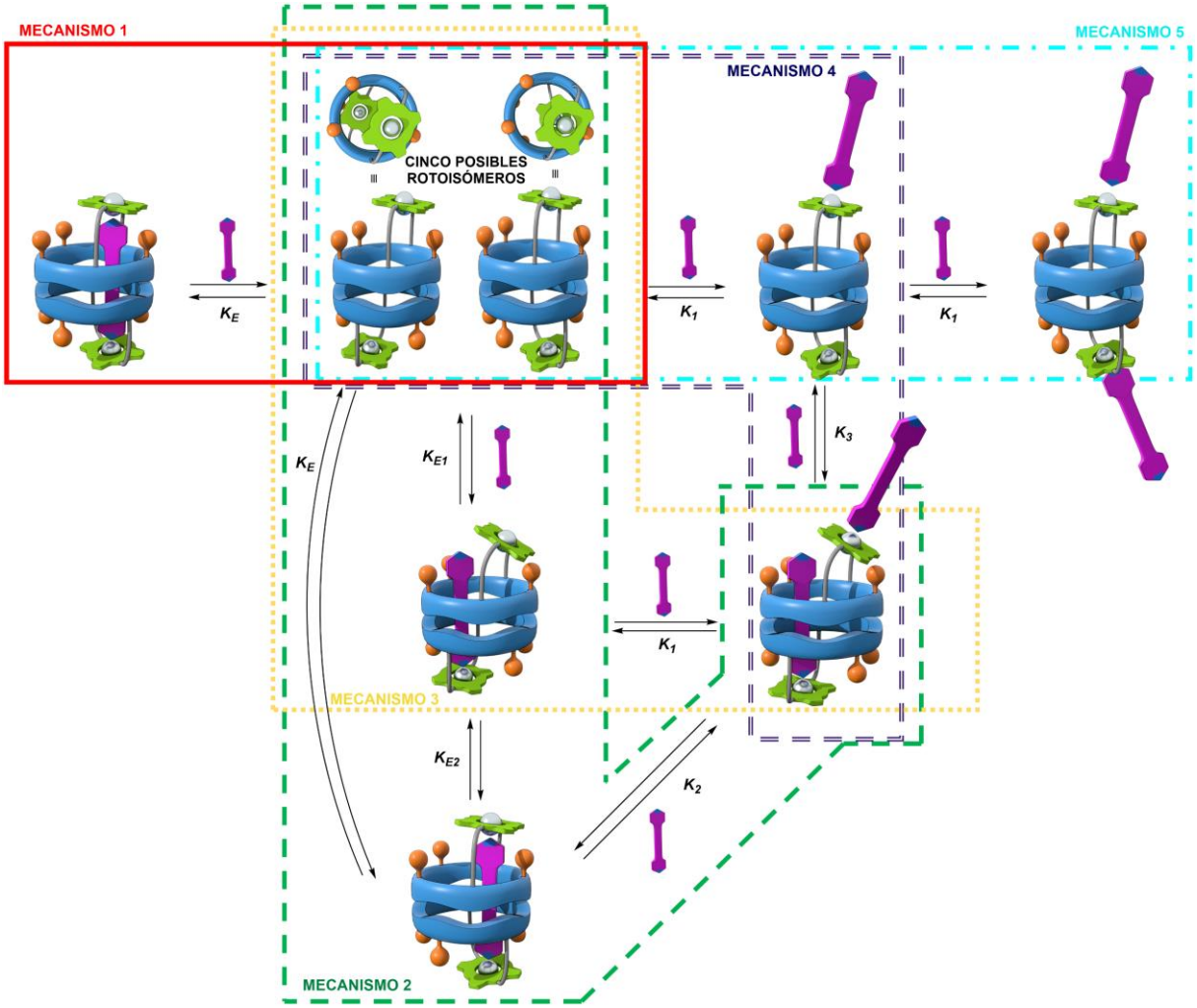


Figura 109. Propuestas mecanísticas para la interacción entre **D2** y **Ln**.

	$K_{P1\cdot Ln}$ (M^{-1})	$K_{Ln\subset D2}$ (M^{-1})	EM (M)	$K_{Ln\subset D2}\cdot$EM	N
L1	3.8×10^{3a}	7.60×10^{3}	5.26×10^{-4}	4	496
L3	1.25×10^{4}	4.20×10^{5}	2.69×10^{-3}	1.13×10^{3}	18
L5	6.01×10^{3}	1.28×10^{5}	3.54×10^{-3}	4.54×10^{2}	50
L8	7.60×10^{4b}	2.41×10^{5}	4.17×10^{-3}	1.01×10^{3}	13
L9	1.29×10^{4}	1.87×10^{5}	1.12×10^{-3}	2.10×10^{2}	65
L13	5.36×10^{3}	2.38×10^{4}	8.28×10^{-3}	19.7	180

Tabla 2. Valores obtenidos tras el ajuste al modelo 1:1 de los ligandos **L1**, **L3**, **L5**, **L8**, **L9** y **L13** con **D2**.[a] El valor de $K_{L1\cdot P1}$ se tomó del valor obtenido de valoración de **L1** con **D2** dividido entre dos, ya que **P1** tiene la mitad de sitios de coordinación que **D2**. [b] Para **L8** tomamos el valor de $K_{L8\cdot P1}$ como el doble del valor obtenido para **L1**, dada su similitud electrónica. El valor **N** simboliza el número de equivalentes necesario para alcanzar la relación molar 1:1 entre las especies **D2** y **Ln⊂D2**.

Para intentar indagar sobre el tipo de interacción entre **D2** y el resto de los ligandos, decidimos ajustar los datos experimentales a un modelo 1:2 (Figura 110 y Figura 111). Aún con las desviaciones observadas, las diferencias, para los mismos ligandos, con la porfirina modelo nos hacían pensar que su interacción con **D2** sí estaba teniendo lugar bajo los efectos de la cooperatividad, y que, por tanto, debía haber coordinación por la cara interna del receptor.

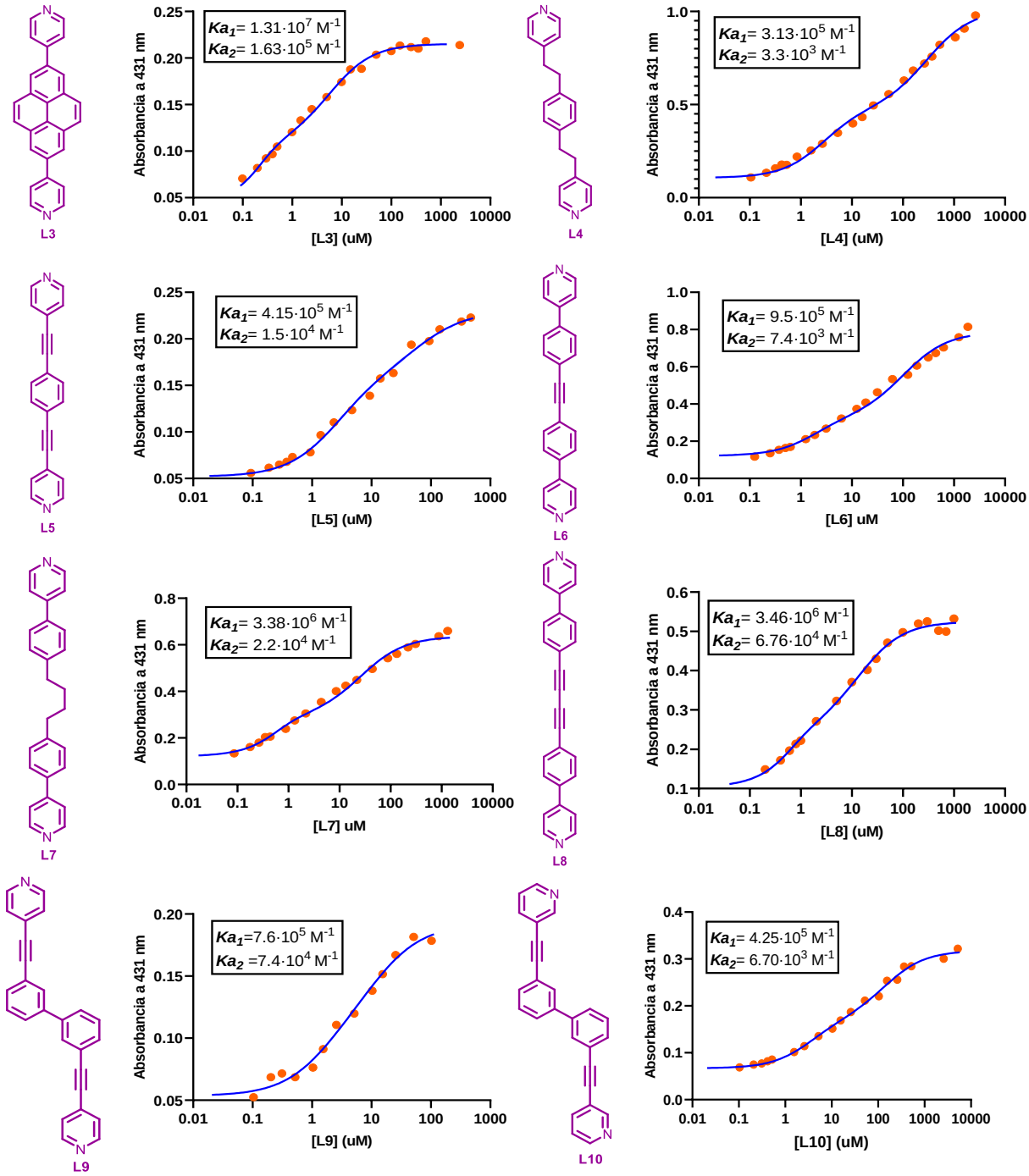


Figura 110. Ajuste de los datos obtenidos tras la valoración de **D2** con **L3-L10** al modelo 1:2, utilizando la intensidad de la banda a 431 nm frente a los equivalentes de ligando añadido.

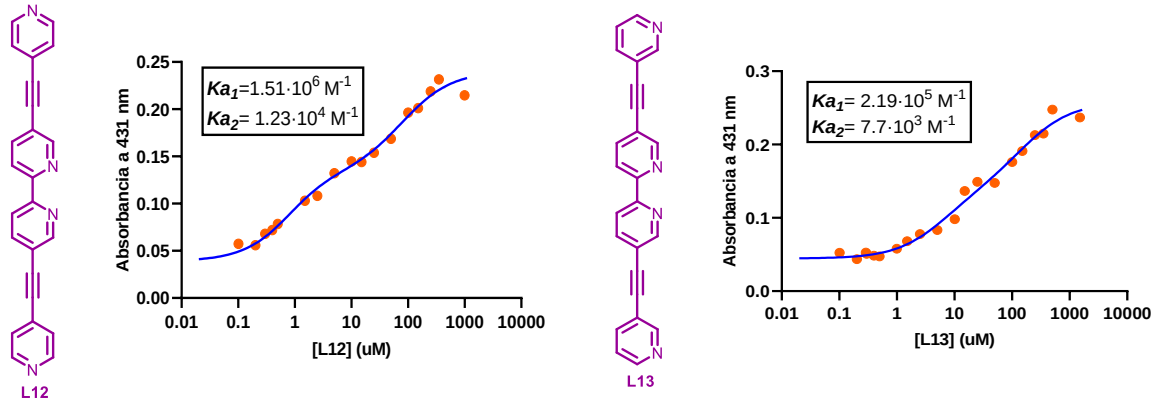


Figura 111. Ajuste de los datos obtenidos tras la valoración de **D2** con **L12** y **L13** al modelo 1:2, utilizando la intensidad de la banda a 431 nm frente a los equivalentes de ligando añadido.

Las constantes obtenidas para este ajuste 1:2 siguen un patrón en el que el valor de la segunda constante de asociación es dos órdenes de magnitud inferior a la primera. Esto, *a priori*, es contradictorio con un proceso de encapsulación, ya que, cuando se produce la coordinación con **Ln** por uno de sus extremos, el otro extremo queda cercano en espacio a la segunda porfirina, por lo que este segundo evento de coordinación no debería estar impedido, sino facilitado. Pensamos que la situación observada puede deberse a un *mismatch* estructural entre cápsula y ligando. Debido a que la primera constante extraída del ajuste es mayor que la segunda, descartamos la posibilidad de que el primer equilibrio estuviese representando la unión del ligando a una sola porfirina (Figura 109, mecanismos 3 y 4). Creemos que tiene lugar un primer proceso de encapsulación, pero que el tamaño o la forma del ligando no es lo suficientemente satisfactorio para mantener el doble anclaje entre el ligando y **D2**. La presencia de un exceso de **Ln**, debe empujar al sistema hacia la coordinación con un segundo ligando desplazando al ligando encapsulado hacia el comportamiento de una especie monodentada (Figura 109, mecanismo 2). De este modo, la primera constante extraída del ajuste 1:2 representaría la formación del complejo **Ln⊂D2** y nos referimos a ella como K_E o $K_{Ln⊂D2}$. Aunque no es posible comprobarlo experimentalmente, el proceso de formación de **Ln⊂D2** podría estar afectado por la dificultad para acomodar los ligandos coordinados con ambas porfirinas en el interior de la cápsula, por lo que se necesita reordenar la estructura de **D2**, adoptando una conformación energéticamente menos favorable, para acomodar a **Ln**. De tal forma que el complejo en que **Ln** está internalizado pero coordinado solo con una porfirina, es cada vez más favorable a medida que disminuye el valor de la efectividad molar (cooperatividad negativa), tal como se muestra en la Tabla 3. Esta especie, o la misma **Ln⊂D2**, sufre con facilidad la coordinación con un segundo ligando **Ln** dando lugar al complejo 1:2 **Ln⊂D2·Ln** (Figura 109, mecanismos 2 y 3). De la misma forma que **CP1**, tal como ya comentamos en la sección sobre la síntesis, **CP2** también puede formar cinco dímeros no equivalentes, puesto que se trata un CP de similares características, pero con una tapa de porfirina que, aparentemente, no restringir sus propiedades supramoleculares. Estos cinco dímeros desplazan los centros metálicos entre sí, modificando sus distancias y orientaciones. Es posible entrever que los distintos ligandos tengan preferencia por interaccionar con diferentes dímeros. Desconocemos cuál de los posibles rotoisómeros es el más estable, y cómo afecta esta mezcla de isómeros en disolución a la encapsulación de los ligandos. Por tanto, se debe contemplar la posibilidad de que la reorganización juegue un papel importante en el proceso que estudiamos, tal como ya habíamos previsto cuando se programó este trabajo. La orientación relativa entre porfirinas

depende del tipo de rotoisómero que se forme preferentemente, aunque también, debido a la flexibilidad de las cadenas que actúan como conectores, la libertad de movimiento de estos macrociclos es aparentemente grande para todos los isómeros. Los procesos de reorganización comentados se englobarían dentro de la constante de asociación efectiva o K_E ($K_{Ln\subset D2}$). Posteriormente, la coordinación del segundo ligando por la cara externa de la porfirina de **D2** llevaría a la salida de la esfera de coordinación del metal de una de las piridinas del ligando encapsulado, y está representada por K_2. Este proceso, ha de ser igual o menos favorable que la coordinación de **Ln** por la cara externa cuando la cavidad de **D2** no está ocupada (mecanismo 5, K_1). Por tanto, K_2 ha de ser menor que K_1. Recordemos que la constante K_1 puede ser extraída a partir de las valoraciones, debe ser el doble del valor calculado para P_1 con **Ln**. De este modo, podemos establecer que $K_1 = 2 \times K_{P1\cdot Ln}$, ya que **D2** tiene el doble de sitios de coordinación que **P1**. En efecto, cuando comparamos los valores, observamos que $K_2 < K_1$. Los valores de $K_{Ln\subset D2}$ para este conjunto de ligandos no difieren en gran medida, siendo el de **L7** el más elevado y, además, el que mejor efectividad molar (EM) presenta. Como hemos comentado previamente, el valor de EM se define como $K_{Ln\subset D2}/(K_{P1\cdot Ln})^2$. Esto lo podemos relacionar con el dato experimental de que **L7** es el ligando que más eficientemente promueve el aumento de la intensidad de la banda a 431 nm, siendo necesarios solo 8 equivalentes de este para que las bandas a 421 y 431 nm alcancen la misma intensidad.

	$K_{P1\cdot Ln}$ (M^{-1})	$K_{Ln\subset D2}$ (M^{-1})	EM	$K_{Ln\subset D2}\cdot$EM	K_2 (M^{-1})	K_1 (M^{-1})	K_1/K_2	N
L4	1.26×10^4	3.13×10^5	1.97×10^{-3}	6.16×10^2	3.30×10^3	2.52×10^4	7.64	16
L6	1.20×10^4	9.50×10^5	6.59×10^{-3}	6.26×10^3	7.00×10^3	2.40×10^4	3.43	21
L7	1.20×10^{4a}	3.38×10^6	0.023	7.77×10^4	2.20×10^4	2.40×10^4	1.09	8
L10	6.98×10^3	4.25×10^5	8.72×10^{-3}	3.71×10^3	6.70×10^3	1.40×10^4	2.08	110
L12	1.14×10^4	1.51×10^6	0.01	7.77×10^4	1.23×10^4	2.28×10^4	1.85	46

Tabla 3. Valores obtenidos tras el ajuste al modelo 1:2 de la interacción entre los ligandos **L4**, **L6**, **L7**, **L10** y **L12** y **D2**. [a]- Para **L7** tomamos el valor de $K_{L6\cdot P1}$ como equivalente a $K_{L7\cdot P1}$, debido a las similitudes estructurales de **L7** con **L4** y **L6**, y a que $K_{L6\cdot P1}$ y $K_{L4\cdot P1}$ muestran valores muy similares. El valor **N** simboliza el número de equivalentes necesario para alcanzar la relación molar 1:1 entre las especies **D2** y **Ln⊂D2**.

Los estudios de espectroscopía UV-Vis y los ajustes realizados posteriormente, nos permiten establecer que **D2** se comporta como un receptor, siendo capaz de formar las especies **Ln⊂D2** con los ligandos bidentados. Tras este análisis, proponemos, finalmente, que para los ligandos **L3**, **L5**, **L8** y **L9** prevalece la formación del complejo **Ln⊂D2** sobre otros procesos. Por otra parte, para **L4**, **L6**, **L7**, **L10** y **L12**, la interacción sigue un mecanismo diferente. De los posibles mecanismos propuestos para este sistema (Figura 109), entendemos que, muy probablemente, el proceso se completa con una segunda coordinación de **Ln** por la cara externa del complejo **Ln⊂D2** (mecanismo 2). Sin embargo, es importante resaltar que otros procesos pueden estar operando de manera simultánea para un mismo **Ln** (mecanismos 1, 3, 4 y 5), así como influir de manera asimétrica en la distribución de especies presentes en el equilibrio para los diferentes ligandos. Por otro lado, de nuestros análisis podemos extraer una importante conclusión, y es que el tipo de interacción entre los ligandos **Ln** y **D2** no depende exclusivamente de la longitud, rigidez y propiedades electrónicas de los mismos. Mientras que los ligandos rígidos y de similar longitud **L3** (15.9 Å) y **L5** (16.6 Å) se ajustan ambos al modelo 1:1, no es así para **L6** (18.5 Å), a pesar de ser también un ligando rígido. En un primer momento, podríamos pensar que esto está relacionado con la longitud, sin embargo, otros factores deben

estar contribuyendo en el proceso, ya que la interacción entre **D2** y **L8** (21.2 Å), el ligando más largo de todos, a la vez que rígido, sí que se puede ajustar al modelo 1:1. Los ligandos **L4** (15.8 Å) y **L7** (20.4 Å) se ajustan ambos a un modelo 1:2, y aunque ambos comparten la característica de la flexibilidad, distan ampliamente en longitud. Por otro lado, ligandos con idéntico esqueleto, pero que difieren en la posición del átomo de nitrógeno en sus piridinas terminales, los pares **L9-L10** y **L12-L13**, tampoco parecen operar en consonancia. Mientras que **L9** se ajusta al modelo 1:1, no es así para **L10**. Contrariamente, **L12** se ajusta al modelo 1:2, mientras que para **L13**, lo que vemos mayoritariamente es la coordinación del ligando por la cara externa de las porfirinas de **D2**. Sin embargo, respecto a nuestro planteamiento original de dotar a esta nueva cápsula de mayor longitud y capacidad interna que aquellos de la cápsula bispofirínica preparada previamente en el grupo, podemos decir que los cambios estructurales introducidos han tenido el efecto deseado. Tanto para el ligando más largo, **L8**, como para el más ancho, **L3**, la afinidad se ha incrementado. Para **L8**, desde 6.2 x 10^4 hasta 2.4 x 10^5 M^{-1}, y para **L3**, desde 1.1 x 10^5 hasta 4.0 x 10^5 M^{-1}. Desafortunadamente, los datos experimentales no nos permiten comprender por qué los datos obtenidos para los diferentes ligandos no se ajustan al mismo mecanismo, ni tampoco, cuáles son los factores que determinan el comportamiento observado. Para ahondar en este tema, decidimos realizar una serie de estudios computacionales con dos objetivos. El primero de ellos es estudiar la estructura de mínima energía de **D2**. El segundo es optimizar la estructura de los complejos **Ln⊂D2** para comprobar si existe una relación entre los ligandos que no se ajustan al modelo 1:1 con distorsiones considerables de la estructura de mínima energía de **D2**.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.1.1.5 Cálculos DFT sobre D2 y Ln⊂D2'.

La molécula **D2** está compuesta por 622 átomos, que hacen que el abordaje de la optimización de esta estructura mediante cálculos DFT sea muy demandante en recursos computacionales. Además, esta alta cantidad de átomos agrava el problema de los mínimos locales. Esto implica que, al optimizar **D2**, es muy probable que nos encontremos con numerosos mínimos que presentan diferencias energéticas significativas entre sí. Esto dificulta la tarea de encontrar el mínimo global de energía para la estructura, que, estrictamente, es complicado de garantizar. Dependiendo de lo cerca que esté la estructura de partida de un mínimo local o del mínimo global, encontraremos uno u otro. Por ello, al aumentar el número de átomos, disminuye la posibilidad de partir de una estructura que esté realmente próxima a converger en ese mínimo global. Decidimos comenzar por optimizar los cinco rotoisómeros con B3LYP/3-21G, usando gd3bj como emulador de la dispersión.[524] Seleccionamos este funcional porque habíamos observado que, con moléculas de las que disponíamos de estructuras cristalinas (sección 3 del apartado de resultados de esta tesis), reproducía fielmente la geometría. Aunque es complejo asegurar cuál es el dímero más estable, y probablemente algunos isómeros tengan poca diferencia energética, necesitábamos un punto de partida con el que estudiar los complejos **Ln⊂D2**. Combinar los cinco rotoisómeros con los 11 ligandos (todos menos **L1**) que pretendemos estudiar, resultaría en un número de cálculos inabarcable para este trabajo.

Siguiendo la nomenclatura que habíamos adoptado previamente para los cinco isómeros (Figura 93A), en cuanto a la disposición relativa de las porfirinas, **R1** y **R4** son análogos, así como **R2** y **R3** (ver Figura 93A, cada porfirina se conecta al CP a través de los residuos coloreados en verde lima y naranja), mientras que **R5** es el único donde los cuatro residuos que están unidos a la porfirina quedan superpuestos en el dímero. Para todos ellos, realizamos primero un cálculo de optimización de geometría, seguido de un cálculo *single point* (SP) de la energía con B3LYP/6-31G (d, p). El isómero que convergió a la estructura con menor energía fue **R3** (Figura 112). El resto de isómeros se desvían entre 13 y 46 Kcal/mol de la energía del mínimo obtenido para **R3**. Aunque estos números pueden variar al incrementar el nivel de cálculo o tener en cuenta la solvatación, son diferencias suficientemente significativas como para seleccionar a **R3** como el mejor candidato posible para los estudios posteriores. Las distancias de enlace de hidrógeno ($d_{O\cdots H}$) no varían sustancialmente para los mínimos obtenidos, aunque la más corta es la de **R3** (Figura 112, margen derecho). Sin embargo, sí es posible apreciar una tendencia a desplazar el macrociclo de porfirina lejos del plano paralelo al CP.

De este modo, decidimos utilizar **R3** como isómero modelo para profundizar en la estructura más estable de **D2**. Con el objetivo de acortar el tiempo de cálculo, decidimos reemplazar todos los α-Aa por residuos de alanina, lo que reduce el número de átomos de 622 a 530, en una estructura a la que llamaremos **D2'**. Exploramos cómo afectan algunas modificaciones en la orientación de la tapa molecular a la energía de la estructura obtenida.

USC

[524] a) Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. *J. Chem. Phys*. **2010**, *132*, 154104-154119. b) Grimme, S.; Ehrlich, S.; Goerigk, L. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 1456-1465. c) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789. d) Becke, A. D. *J. Chem. Phys*. **1993**, *98*, 5648-5652.

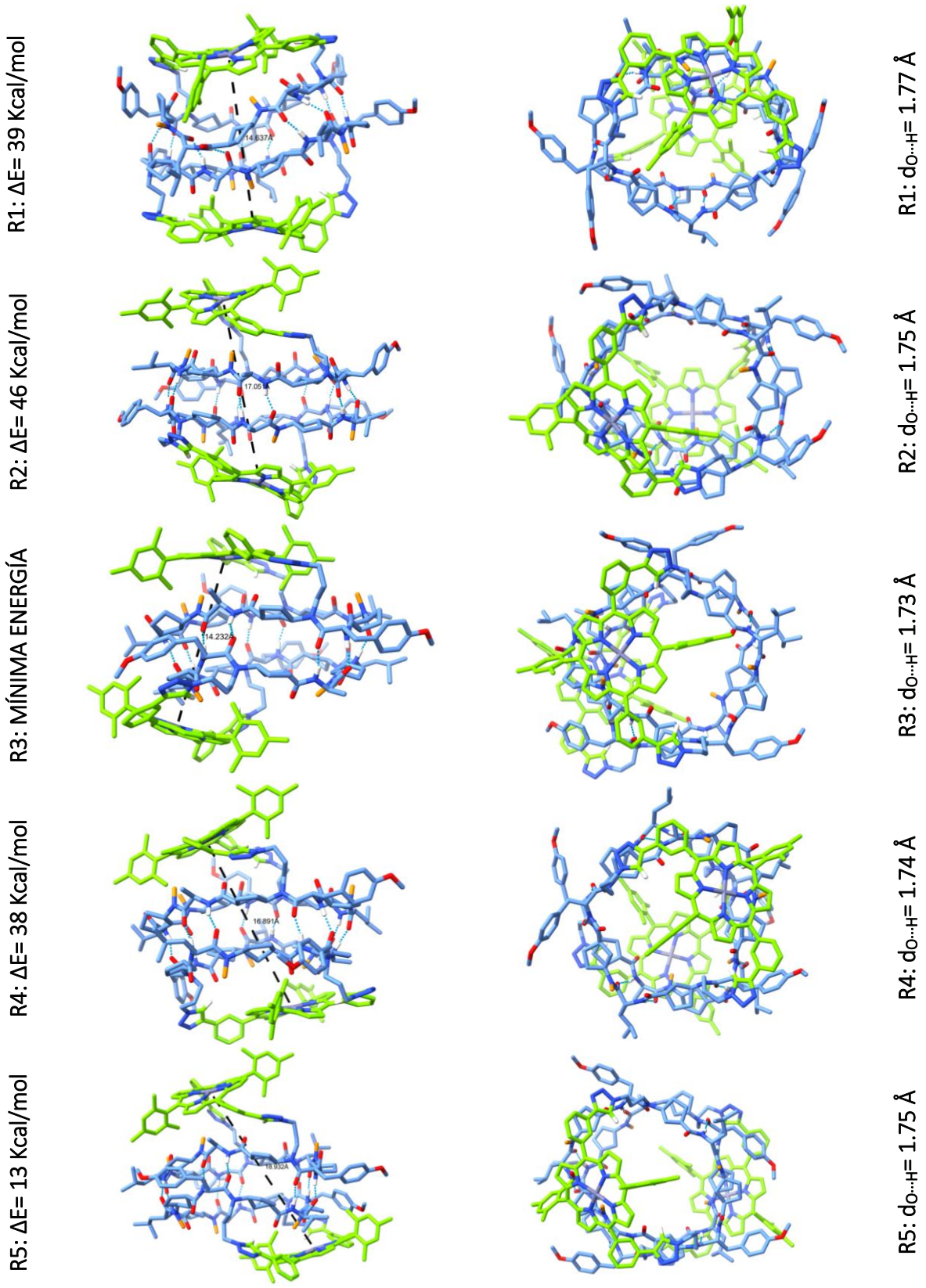


Figura 112. Vistas frontal y superior de las estructuras de mínima energía alcanzadas para los rotoisómeros R1-R5 de la especie **D2**. La nomenclatura de los rotoisómeros es análoga a la de la Figura 93. Nótese que se ha mantenido el código de colores empleado en el esquema de la Figura 109, coloreando el esqueleto peptídico de azul, la porfirina de verde y los sustituyentes metilo de los ^{Me}*N*-Acp en naranja.

En concreto, se estudiaron 20 geometrías distintas donde se introdujeron variaciones en la orientación de los anillos de triazol, de los anillos *meso* de la porfirina unidos a los triazoles, y de la cadena de propileno que une al CP con el triazol con el fin de comprobar si esas variaciones pudieran llevarnos a una conformación de **R3** energéticamente aún más favorable. Las estructuras obtenidas de estas optimizaciones están representadas en las Figuras 199-203, en la sección experimental de este capítulo (páginas 356-360), así como también se indica cuánto se desvía cada una de ellas del mínimo "global" encontrado.

Las características de estos 20 mínimos nos sirvieron para trazar un patrón sobre la orientación preferente de la tapa molecular de **D2** que lleva a geometrías menos energéticas. Pudimos comprobar que cuando la porfirina queda en el centro del ciclopéptido produce una deformación de este, pasando a una forma ovalada, que conlleva un aumento de la energía. A su vez, esto está relacionado con la orientación relativa de los anillos aromáticos de las posiciones *meso*, de manera que cuando ambos se orientan hacia el mismo lado, desplazan la porfirina fuera del plano paralelo al CP, lo cual es favorable energéticamente. Por el contrario, si estos brazos se disponen de manera cruzada, la porfirina tiende a quedar centrada, lo que lleva a la deformación que se ha mencionado previamente. Por otra parte, los anillos triazólicos quedan preferentemente orientados con la posición CH alineada con el protón *orto*- del anillo aromático de la porfirina. Cuando los triazoles se colocan totalmente girados hacia el exterior, la cadena alquílica que actúa de conector queda extendida, lo que aumenta la distancia entre porfirinas. Esta forma también implica un aumento de la energía. Cuando varios de estos factores desfavorables se combinan en una misma estructura, la penalización energética es aún mayor. De entre estos 20 mínimos, la estructura más favorable mantiene los mismos rasgos de la que ya habíamos obtenido previamente incluyendo los α-Aa correspondientes (Figura 112, **R3**), ya que ninguna de las modificaciones introducidas condujo a una estructura más estable.

Tras estas indagaciones, se procedió a la optimización de los complejos entre **D2'** con cada uno de los ligandos, utilizando para ello la conformación de **R3** que da lugar a la estructura más estable. Dado que los dos átomos de zinc presentes en la estructura de **D2'** jugarán ahora un papel fundamental en la interacción con el ligando, escogimos una estrategia de doble conjunto de bases para estos cálculos, manteniendo común el funcional B3LYP. Por un lado, el conjunto de bases LANL2DZ para los átomos de zinc, que se ha usado en cálculos con este metal ya que describe sus electrones de valencia de manera más precisa.[525] Por otro lado, 3-21G para describir los electrones de C, H, O y N. También se incluyó la corrección de dispersión gd3bj. Los resultados obtenidos para los complejos **Ln⊂D2'** muestran disparidad en la geometría que adopta **D2'** para albergar a cada uno de los ligandos, como ilustran las Figura 113Figura 115. Para los ligandos más cortos, (**L3**, **L4** y **L5**), las dos porfirinas quedan inclinadas en la misma dirección, formando una especie de "*C*" con el ligando, que queda deformado (Figura 113). Recordemos que, del estudio computacional previo en ausencia de ligandos, se había observado que esta es la tendencia preferente en cuanto a la orientación de los macrociclos de porfirina.

[525] a) Zhou, C. H.; Zhu, H. Y.; Wang, Y. Y.; Liu, P.; Zhou, L. J.; Li, D. S.; Shi, Q. Z. *J. Mol. Struct.* **2005**, *779*, 61-67. b) Aghabozorg, H.; Manteghi, F.; Ghadermazi, M.; Mirzaei, M.; Salimi, A. R.; Shokrollahi, A.; Derki, S.; Eshtiagh-Hosseini, H. *J. Mol. Struct.* **2009**, *919*, 381-388. c) Yuan, D.; Li, Y.; Li, W.; Li, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 28894-28902. d) He, L. J.; Sun, Y.; Li, W.; Wang, J.; Song, M. X.; Zhang, H. X. *Solar Energy* **2018**, *173*, 283-290.

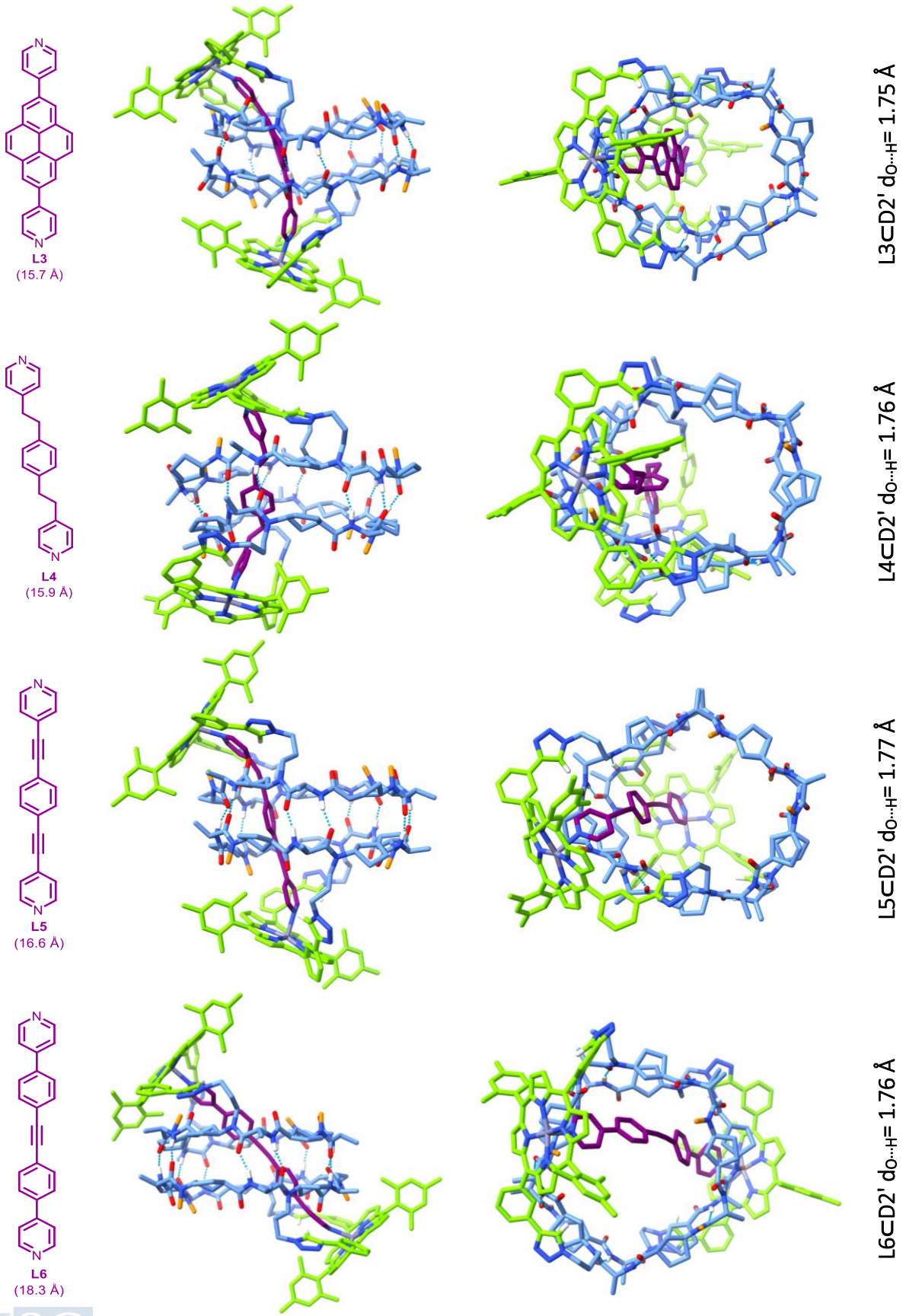


Figura 113. Vistas frontal y superior de las estructuras de mínima energía obtenidas para **L3⊂D2'**, **L4⊂D2'**, **L5⊂D2'** y **L6⊂D2'**.

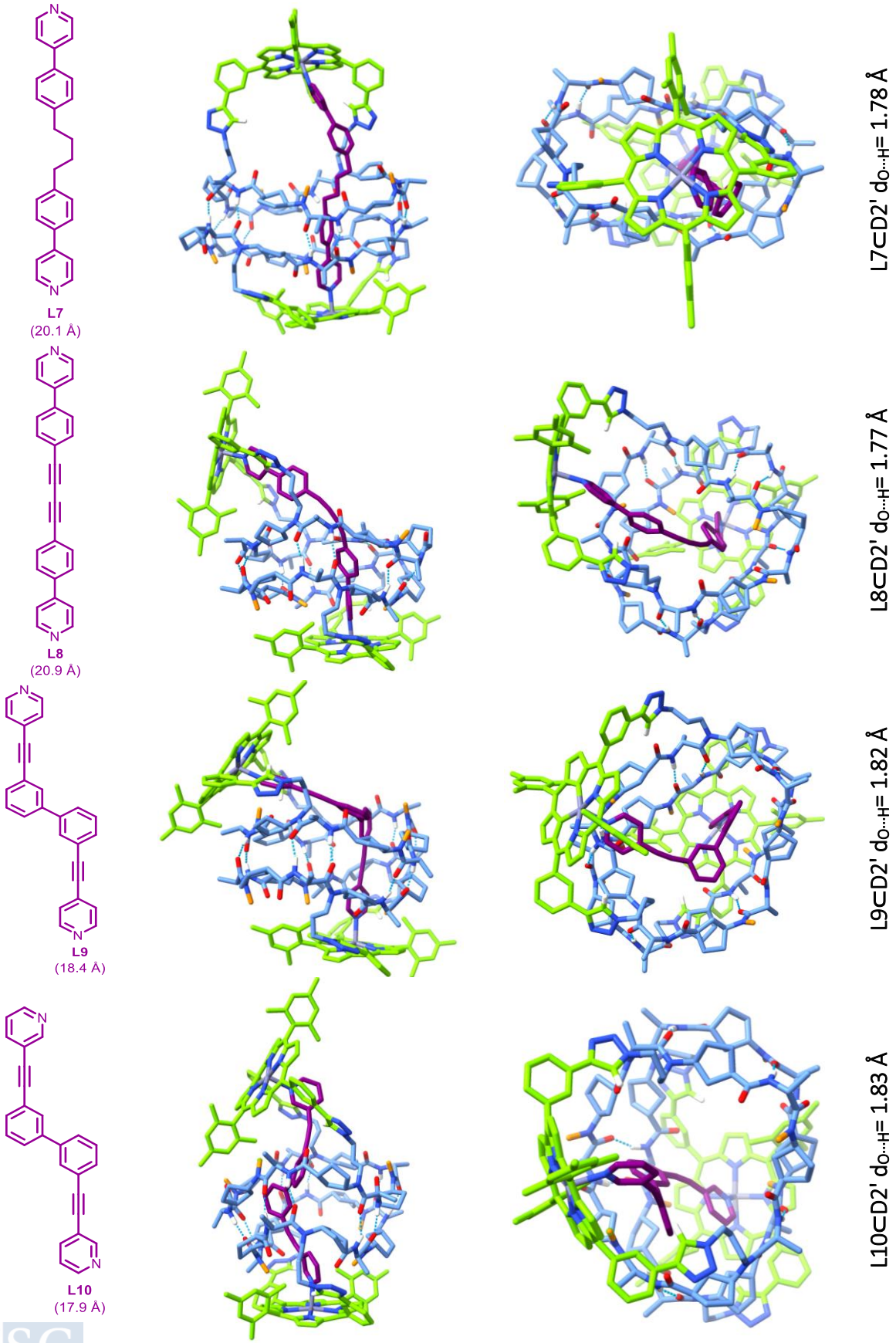


Figura 114. Vistas frontal y superior de las estructuras de mínima energía obtenidas para **L7⊂D2'**, **L8⊂D2'**, **L9⊂D2'** y **L10⊂D2'**.

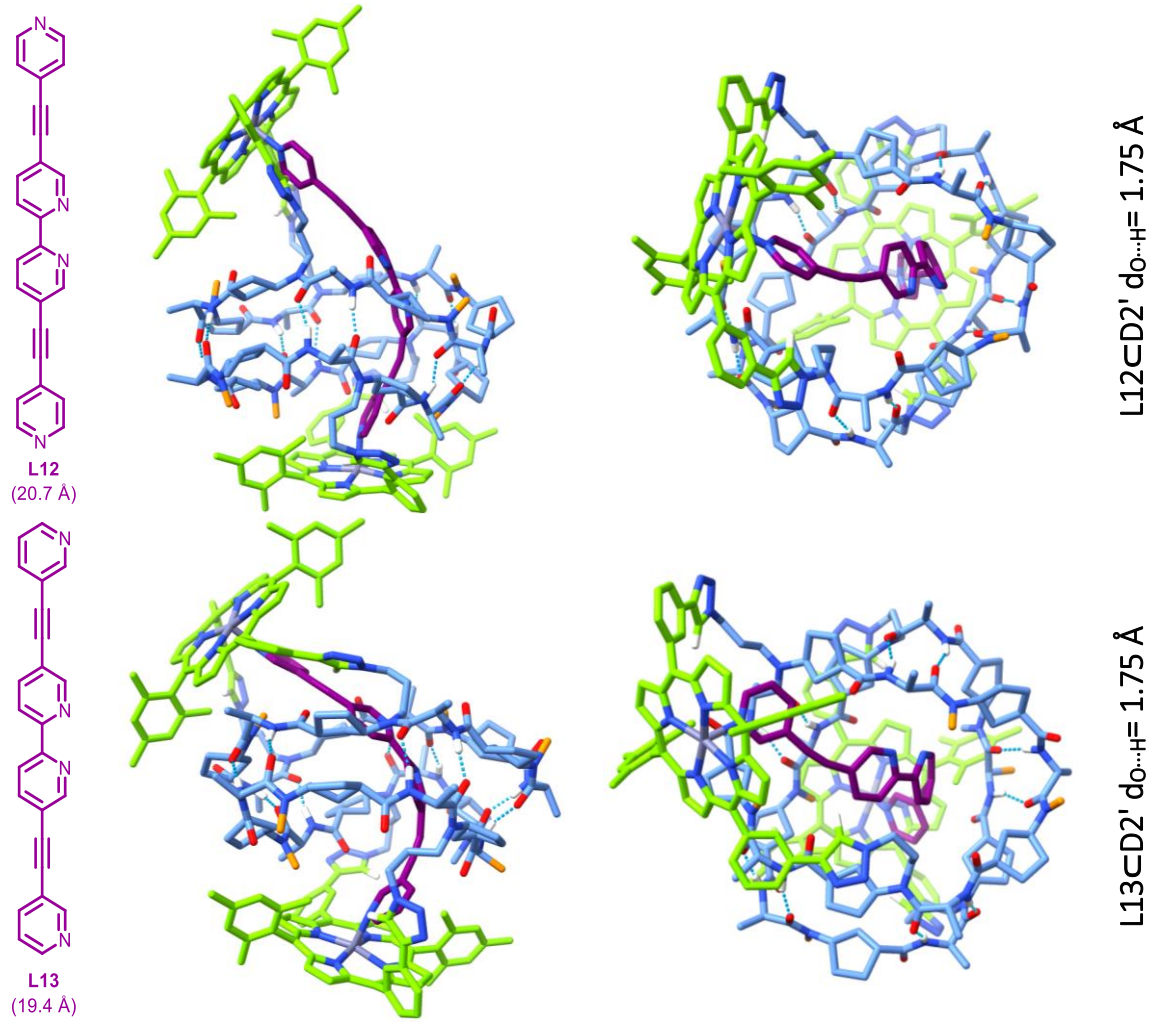


Figura 115. Vistas frontal y superior de las estructuras de mínima energía obtenidas para **L12⊂D2'**, **L13⊂D2'**.

Para el ligando **L6**, de mayor longitud (18.5 Å), vemos, sin embargo, un patrón en forma de "*S*" para la unión con las porfirinas, ya que ambas quedan en extremos opuestos, maximizando así la distancia entre ellas (Figura 113). Sin embargo, para **L7⊂D2'** (20.4 Å) encontramos que el ligando se encuentra completamente estirado verticalmente, dejando a las porfirinas centradas sobre el CP, formando una especie de "I" con el ligando (Figura 114). Al mismo tiempo, el esqueleto peptídico se encuentra, en este caso, notablemente ovalado. Para el resto de los ligandos, **L8-L13**, observamos que una de las porfirinas queda notablemente inclinada, mientras que la otra queda más o menos centrada. Esto hace que el ligando parezca estar formando una "*L*" mediante su coordinación con las porfirinas (Figura 114 y Figura 115). De estas estructuras optimizadas llama la atención que un ligando flexible como es **L7** quede totalmente extendido dentro de la cavidad de **D2'**, mientras que otros con una parte central rígida, como son **L8**, **L12** y **L13**, queden curvados. Pensamos que quizás, la estructura de partida de **D2** que estábamos utilizando podría no ser la más adecuada para acomodar los ligandos más largos y rígidos, ya que, en ausencia de ligandos, dejaba una distancia entre porfirinas relativamente corta de 14.2 Å (Figura 112, **R3**). Debido a esto, decidimos realizar algunas comprobaciones, escogiendo de entre esos 20 mínimos anteriormente estudiados, los que mejor podrían acoger a **L6**, **L8**, y **L12**, en términos de distancia entre porfirinas (empleando la estructura número 6, ilustrada en la Figura 200 de la sección experimental, que deja una distancia Zn-Zn de 20.3 Å, página 357). Similar tratamiento hicimos para **L3** y **L5**, buscando

aquellos mínimos locales que dejaban a las porfirianas en una posición relativa más centrada, que no implicase la deformación del ligando por su parte más rígida (empleando como geometrías de partida las numeradas como 3 y 9, ilustradas en las Figuras 199 y 201, respectivamente, páginas 356 y 358). Es necesario aclarar que estas optimizaciones no se hicieron con otro rotoisómero distinto de **R3**, sino con **R3**, pero con una geometría diferente. Estas nuevas estructuras se volvieron a optimizar. Sin embargo, no fuimos capaces de encontrar ninguna estructura más estable de las que ya teníamos.

Por otra parte, analizando visualmente la deformación que sufre el esqueleto peptídico, los ligandos **L7-L13** son los que más perturbaciones producen sobre su característica forma circular. Sin embargo, la distancia promedio del enlace de hidrógeno no sufre variaciones considerables a lo largo de toda la serie de ligandos (≈ 1.75 Å), con excepción de **L9** y **L10**, cuyos complejos se deforman ligeramente, alargando los enlaces de hidrógeno hasta ≈1.83 Å.

Para poder hacer comparaciones entre los distintos complejos **Ln⊂D2'**, decidimos calcular las energías de interacción y complejación para todos ellos. La energía de interacción se define como la diferencia entre las energías electrónicas de **Ln** y **D2'** por separado, con las mismas geometrías que tienen en el complejo **Ln⊂D2'** (es decir, geometrías congeladas). Las energías de **D2'** y **Ln** se corrigieron para el error de superposición del conjunto de bases (BSSE), utilizando la aproximación *counterpoise*.[526] Para todos los cálculos SP se utilizaron dos bases conjuntamente, LANL2DZ para Zn y 6-31G (d,p) para C, H, O y N, con el objetivo de obtener valores de energía más precisos que con LANL2DZ/3-21G.

La energía de complejación se calculó como la energía del complejo **Ln⊂D2'** menos las energías de **D2'** y **Ln** separados y optimizados. La diferencia entre la energía de complejación y la energía de interacción es la energía de deformación, que afecta tanto al péptido como al ligando, aunque el primero tendrá mayor contribución sobre esta energía de deformación por tener un número mucho mayor de átomos. Por tanto, mientras que la energía de interacción nos aporta información sobre la fortaleza de las interacciones favorables y desfavorables que participan en la formación del complejo, la energía de complejación tiene en cuenta, además, el coste energético de la deformación de la geometría más estable de **D2'** para acomodar a cada ligando. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 4.

En cuanto a la energía de interacción, observamos que se sigue la tendencia que habíamos comentado previamente, donde los ligandos con piridinas más ricas en electrones, como **L4**, **L7**, **L3**, o **L12** tienen mejores valores que aquellos con piridinas más pobres como **L5**, **L6**, **L8** o **L9**. Cabe resaltar que **L7** es, notablemente, el ligando con el valor de E_{inter} más favorable. También resalta que los ligandos con *meta*-piridinas no muestran valores de interacción considerablemente peores que sus análogos con *para*-piridinas terminales. De hecho, el valor de E_{inter} para **L13** (-86.55 Kcal/mol) es ligeramente más favorable que el de **L12** (-85.22 Kcal/mol). Al analizar las energías de complejación, encontramos que para los ligandos **L3-L6**, la tendencia en los valores es análoga a sus respectivas $K_{Ln⊂D2}$, siendo la encapsulación de **L6** la más favorable. Sin embargo, el ligando que mostró la energía de interacción más favorable, **L7**, es uno de los que muestran peor valor para la energía de complejación (-26.22 Kcal/mol). Como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[526] Gray, M.; Bowling, P. E.; Herbert, J. M. *J. Chem. Theory Comput.* **2022**, *18*, 6742-6756.

habíamos comentado previamente, la estructura obtenida para **L7⊂D2'** mostraba una grave deformación del esqueleto peptídico, por lo que muestra un gran coste de deformación ($E_{complejación}$-$E_{interacción}$). Este resultado contrasta, sin embargo, con lo que se encontró experimentalmente en la valoración de **D2** con **L7**, ya que con solo 8 equivalentes (el valor más bajo de todos los ligandos estudiados) ya se alcanzaba la misma intensidad entre las bandas asociadas a las especies **L7⊂D2** y **D2** (Figura 107). Además, el posterior ajuste (Tabla 3), arrojaba para **L7** uno de los valores más favorables de $K_{Ln⊂D2}$ y EM (3.38 x 10^6 M^{-1} y 0.023 M, respectivamente). Para **L8-L10**, los valores de $E_{complejación}$ vuelven a situarse siguiendo la tendencia experimental de sus $K_{Ln⊂D2}$. Llama la atención que para **L10**, que incorpora *meta*-piridinas en sus extremos, se recoge un valor de $E_{complejación}$ ligeramente más favorable que para el ligando análogo con las piridinas en *para*, **L9**, al igual que se apreciaba al comparar su $K_{Ln⊂D2}$. Sorprendentemente, para el caso de **L12** observamos algo similar que con **L7**, una energía de deformación muy alta (55.79 Kcal/mol) que hace que el valor de complejación sea bastante bajo (-29.44 Kcal/mol) y no siga la tendencia de lo encontrado experimentalmente. Sin embargo, para **L13** habíamos obtenido el peor valor de $K_{Ln⊂D2}$ de todos los ligandos bidentados estudiados (2.38 x 10^4 M^{-1}), y a la vez vemos que también arroja el valor más desfavorable para $E_{complejación}$ (-19.58 Kcal/mol).

	$E_{complejacion}$ (Kcal/mol)	$E_{interacción}$ (Kcal/mol)	$E_{complejación}$ - $E_{interacción}$ (Kcal/mol)	$K_{Ln⊂D2}$ (M^{-1})
L3⊂D2'	-43.85	-87.62 (27.4)	43.77	4.20 x 10^5
L4⊂D2'	-39.45	-83.93 (24.9)	44.48	3.13 x 10^5
L5⊂D2'	-29.49	-72.41 (24.5)	42.92	1.28 x 10^5
L6⊂D2'	-40.83	-77.26 (24.2)	36.43	9.50 x 10^5
L7⊂D2'	-26.22	-92.03 (28.9)	65.81	3.38 x 10^6
L8⊂D2'	-33.46	-82.29 (27.5)	48.83	2.41 x 10^5
L9⊂D2'	-40.80	-82.58 (27.4)	41.78	1.87 x 10^5
L10⊂D2'	-46.57	-80.54 (26.7)	33.97	4.25 x 10^5
L12⊂D2'	-29.44	-85.22 (26.2)	55.78	1.51 x 10^6
L13⊂D2'	-19.58	-86.55 (26.6)	66.97	2.38 x 10^4

Tabla 4. Energías de complejación e interacción en la formación de los complejos **Ln⊂D2'**. Aparece entre paréntesis el valor de la corrección BSSE. Se empleó B3LYP como funcional y LANL2DZ/6-31 G(d, p) como bases.

Pese a que los valores obtenidos no reflejan completamente los resultados experimentales, sí que se observan ciertas tendencias similares entre ambos. Sin embargo, no encontramos una relación clara entre la deformación que sufre **D2'** al acomodar cada ligando con lo observado experimentalmente, en cuanto a la falta de homogeneidad en el mecanismo de internalización de los diferentes **Ln**. Esto es, aquellos ligandos cuyos datos experimentales no se ajustan correctamente al mecanismo 1 (Figura 109), que son **L4**, **L6**, **L7**, **L10** y **L12** (Figura 105) según estos cálculos, no son propensos a deformar más el esqueleto de **D2'** que otros ligandos. Incluso en esta misma serie encontramos que **L7** y **L12** tienen elevada penalización de deformación, mientras que **L6** y **L10** tienen los valores más bajos. Por tanto, este estudio computacional no nos permite esclarecer las discrepancias observadas experimentalmente entre los ligandos. Sin embargo, somos conscientes de que, al tratarse de moléculas con un elevado número de átomos, y con la posibilidad añadida de que no todos los ligandos se encuentren complejados en el mismo rotoisómero de **D2**, no sea factible englobar todas las

posibles variables del sistema. De este modo, existe la posibilidad de que los resultados que arrojan los experimentos de espectroscopía UV-Vis estén sujetos a varios factores operando en conjunto, pero que no podemos estudiar por separado. A pesar de ello, podemos concluir que **D2** es capaz de hospedar en su interior a la mayoría de los ligandos bidentados estudiados, mediante la coordinación simultánea de las dos porfirinas con la misma molécula de **Ln** encapsulada. Actualmente, estamos trabajando en introducir complejos metálicos con actividad catalítica sobre el centro de bipiridina de **L12**.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.1.2 Péptidos cíclicos como armazón protector de un centro catalítico de porfirina: Diseño y estrategia sintética.

La capacidad de las metaloporfirinas de catalizar una amplia variedad de reacciones químicas ha sido explorada ampliamente a lo largo de los años. Generalmente, las tetrafenilporfirinas (TPP) metaladas son objeto de dichas investigaciones, debido a su fácil preparación. El descubrimiento de la actividad oxigenasa del citocromo P450 impulsó un creciente interés en el estudio de las porfirinas como catalizadores.[527] El primer proceso catalizado por una porfirina sintéticas que se pudo llevar a escala industrial, fue la oxidación del ciclohexano a ciclohexanona, llevado a cabo por una CuTPP.[528] Las porfirinas se han estudiado en reacciones de epoxidación, hidroxilación o carbonilación, entre otras.[529] Gracias a esos estudios, se conoce que las metaloporfirinas de manganeso y hierro son eficientes como catalizadores en reacciones de oxidación y epoxidación.[530] Igualmente, este tipo de metaloporfirinas también pueden catalizar otro tipo de reacciones como cicloadiciones,[531] reducción de CO_2 a CO,[532] o la halogenación C-H.[533] Además, la variabilidad de transformaciones que pueden catalizar estar estructuras se multiplica cuando tenemos en cuenta otros centros metálicos como Ru^{II}.[534]

Esta diversidad en cuanto al empleo de las metaloporfirinas como catalizadores nos inspiró a diseñar una estructura supramolecular con una porfirina en su centro activo. Si miramos hacia el diseño descrito en el proyecto anterior, en **D2**, el ciclopéptido solo actúa como "filtro molecular" por la cara en que está unido a la porfirina. Las dos caras de la porfirina no son equivalentes, por lo que era necesario bloquear la cara exterior con un ligando voluminoso para que el proceso catalítico tuviese lugar en el ambiente de la cavidad interna de la cápsula. Algo que no dio demasiado buenos resultados en nuestros primeros estudios (no comentados en esta memoria, ya que no forman parte del trabajo desarrollado para esta tesis). Con la idea de introducir selectividad en las potenciales transformaciones que pudiese llevar a cabo la porfirina de nuestro diseño, pensamos que la reacción tendría que poderse lleva exclusivamente en el seno de una cavidad hidrofóbica generada por un dímero. Para ello sería necesario que ambas caras de la porfirina fuesen idénticas. De ese modo, nuestro nuevo diseño

[527] P.B. Danielson, B. S. P. *Curr. Drug. Metab.* **2005**, *3*, 561-597.
[528] Guo, C. C.; Liu, X. Q.; Liu, Q.; Liu, Y.; Chu, M. F.; Lin, W. Y. *J. Porphyr. Phthalocyanines.* **2009**, *13*, 1251-1254.
[529] a) Barona-Castaño, J. C.; Carmona-Vargas, C. C.; Brocksom, T. J.; De Oliveira, K. T.; Graça, M.; Neves, P. M. S.; Amparo, M.; Faustino, F. *Molecules* **2016**, *21*, 310. b) Che, C. M.; Lo, V. K. Y.; Zhou, C. Y.; Huang, J. S. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1950-1975. c) Costas, M. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2912-2932.
[530] a) Chino, M.; Leone, L.; Zambrano, G.; Pirro, F.; D'Alonzo, D.; Firpo, V.; Aref, D.; Lista, L.; Maglio, O.; Nastri, F.; Lombardi, A. *Biopolymers* **2018**, e23107. b) Baglia, R. A.; Zaragoza, J. P. T.; Goldberg, D. P. *Chem. Rev*. **2017**, *117*, 13320-13352. c) Philip, R. M.; Radhika, S.; Abdulla, C. M. A.; Anilkumar, G. *Adv. Synth. and Catal*. **2021**, *363*, 1272-1289. d) Nodzewska, A.; Wadolowska, A.; Watkinson, M. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, 382, 181-216.
[531] Teranishi, S.; Maeda, K.; Kurahashi, T.; Matsubara, S. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 2593-2596.
[532] Mondal, B.; Sen, P.; Rana, A.; Saha, D.; Das, P.; Dey, A. *ACS Catal.* **2019**, *9*, 3895-3899
[533] Liu, W.; Groves, J. T. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1727-1735.
[534] a) Wang, C.; Shalyaev, K. V.; Bonchio, M.; Carofiglio, T.; Groves, J. T. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4769-4782. b) Damiano, C.; Sonzini, P.; Cavalleri, M.; Manca, G.; Gallo, E. *Inorg. Chim. Acta* **2022**, *540*, 121065. c) van den Boomen, O. I.; Coumans, R. G. E.; Akeroyd, N.; Peters, T. P. J.; Schlebos, P. P. J.; Smits, J.; de Gelder, R.; Elemans, J. A. A. W.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E. *Tetrahedron* **2017**, *73*, 5029-5037. d) Intrieri, D.; Carminati, D. M.; Zardi, P.; Damiano, C.; Manca, G.; Gallo, E.; Mealli, C. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25,* 16591-16605.

se basaba en una porfirina que estuviese unida covalentemente, por ambas caras, a dos ciclopéptidos. En este caso, descartamos recurrir a la química *click* por la complejidad que entraña llevar a cabo cuatro acoplamientos en una sola reacción. Decidimos optar por el enlace de hidrazona que ya había funcionado exitosamente en otros proyectos y cuya reversibilidad y formación del producto termodinámicosería más eficiente. Para simplificar los estudios, decidimos emplear el mismo α,γ-ciclooctapéptido que habíamos utilizado como precursor en la primera cápsula peptídica (Figura 84, izquierda).[502] La desprotección de sus dos grupos hidrazida, usando medio ácido, nos permitiría llevar a cabo la posterior condensación de dos de estos CPs con una porfirina tetraformilada. Una de las limitaciones que preveíamos en este trabajo es que el dímero resultante podría auto-ensamblase y dar lugar a estructuras cilíndricas en las que cada dímero estuviese alternado con una porfirina. Para impedir este proceso de polimerización, decidimos recurrir a la formación de un ensamblado heterodimérico, cuya estabilidad es mayor que la de los correspondientes homodímeros.[489a] Para ello necesitamos un α,γ-ciclooctapéptido *N*-metilado basado en residuos de Ach con el fin de promover la formación de la especie heterodimérica, lo cual frenaría la formación de los mencionados polímeros supramoleculares (Figura 116). En este modelo, la metaloporfirina quedaría ubicada al fondo de una doble cavidad simétrica y, por tanto, los reactivos deben entrar en esa cavidad para que se produzca la transformación. Es fácil prever que las modificaciones que se puedan incorporar en el péptido que impide la propagación polimérica (color verde/azulado en la figura), podría alterar la selectividad del proceso, restringiendo o favoreciendo la entrada de ciertos reactivos.

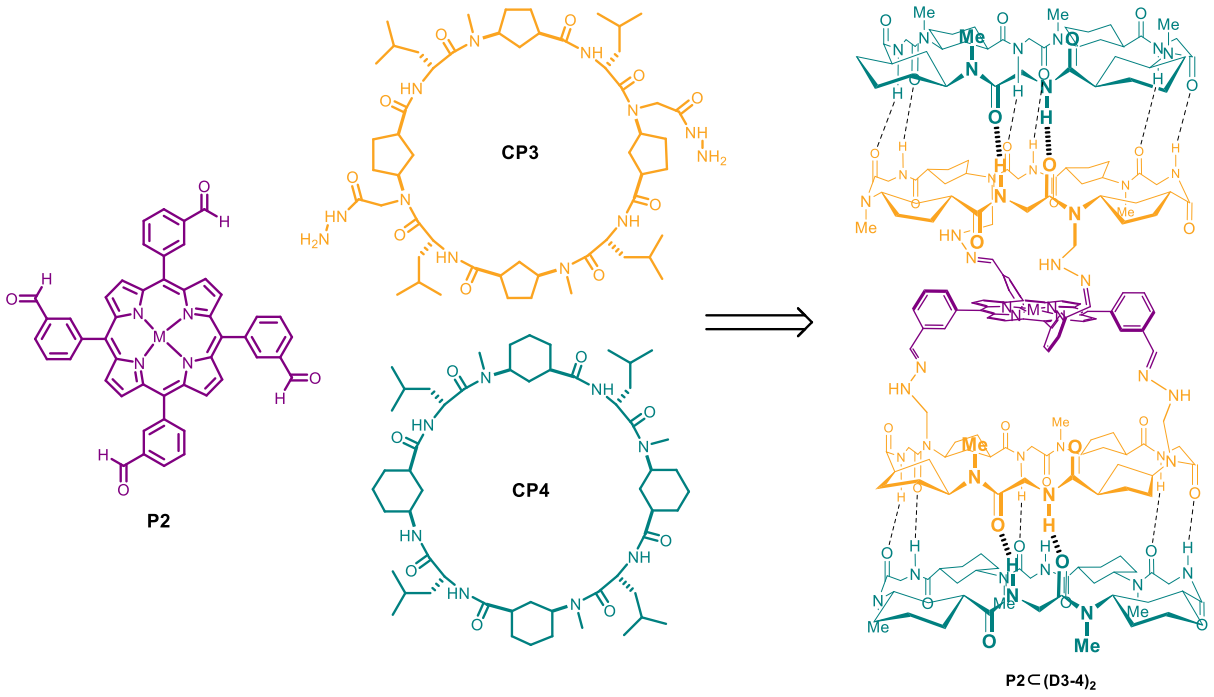


Figura 116. Diseño estructural del armazón protector del centro activo de porfirina a través de la formación del aducto **P2⊂(D3-4)$_2$**.

6.1.2.1 Síntesis de los precursores

Los compuestos **P2** y **CP4** se prepararon específicamente para este proyecto. Sin embargo, ya había sido descrito **CP3** previamente,[502] y no se preparó en el transcurso de esta tesis, por lo que su síntesis no se detalla en esta memoria.

Con respecto a la síntesis de **CP4**, decidimos preparar un α,γ-ciclooctapéptido simétrico y con todos los γ-Aa *N*-metilados (Figura 117). La incorporación de este péptido en el diseño tiene un papel puramente de bloquear la formación del polímero supramolecular. Para ello, solo necesitamos que esté formado por residuos de Ach en lugar de Acp y que la cara γ esté impedida para la dimerización. Por tanto, decidimos minimizar todo lo posible el esfuerzo sintético al no incluir ninguna cadena lateral funcionalizada sobre el grupo amino del Ach (solo Ach *N*-metilado) y escoger un único α-Aa para formar parte de este ciclopéptido, la *D*-Leucina. Además de simplificar la síntesis, la simetría de este CP favorecerá el seguimiento de la formación del aducto final por ^{1}H RMN.

Para la síntesis de **CP4** se partió del ácido comercial *cis*-3-(Boc-amino)ciclohexanocarboxílico en su forma racémica. Para su resolución se sometió al mismo proceso de cristalización ya mencionado anteriormente para la resolución del Boc-Ace-OH (Figura 87). A continuación, el producto enantioméricamente puro Boc-*L*-γ-Ach-OH (**18**) se trató MeI en presencia de NaH para obtener el Boc-^{Me}*N*-*L*-γ-Ach-OH (**19**).[484a] Este último se trató de nuevo con MeI, pero esta vez en presencia de Na_2CO_3 para proteger el extremo *C*-terminal como un éster metílico, dando lugar a Boc-^{Me}*N*-*L*-γ-Ach-OMe (**20**). El acoplamiento de este aminoácido, tras el tratamiento con TFA, con Boc-*D*-Leu-OH, nos permitió obtener el dipéptido Boc-[*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Ach]-OMe (**21**). Este dipéptido es la unidad estructural básica de **CP4**. Para la síntesis de tetrapéptido (**22**) se desprotegió el extremo *C*-terminal de una fracción del dipéptido, mientras que una segunda fracción se trató con hidróxido de litio para desproteger su extremo *N*-terminal. El acoplamiento entre ambos dio lugar al producto deseado. La misma metodología se siguió para la síntesis del octapéptido lineal (**23**) a partir de **22**. Finalmente, el octapéptido lineal se desprotegió por ambos extremos para someterlo posteriormente a la etapa de ciclación, que proporcionó **CP4** en un 81% de rendimiento. La elección de los agentes de acoplamiento se hizo con el mismo criterio que para la síntesis de **CP1**, *N*-HATU se usó en los acoplamientos de aminas secundarias, *N*-HBTU con las aminas primarias, y *N*-TBTU en la etapa de ciclación.[510] La simplicidad en las señales del espectro de ^{1}H RMN de **CP4/D4** (Figura 117) se debe la simetría cuaternaria de este péptido. Al contrario de lo observado en el complejo caso de **CP1** y **CP2**, **CP4** solo forma una especie dimérica. El desplazamiento químico de la señal de los protones amida a 8.34 ppm confirmaba la formación de **D4**, así como la banda de la tensión N-H a 3288 cm^{-1} en su espectro de FTIR. Un aspecto que nos pareció relevante es que las señales de estos protones y aquellas de los $H\alpha_{Leu}$, $H\gamma_{Acp}$ o $H\alpha_{Acp}$, aparecen lo suficientemente diferenciadas como para poder seguir por RMN los experimentos posteriores. El estudio del espectro de IR de **CP4** muestra las señales características de los dímeros apilados en hojas β antiparalelas (bandas para las amidas I y II a 1619 y 1528 cm^{-1}, respectivamente). Por otra parte, la espectrometría de masas también confirma la presencia de **CP4** (1009.7435 m/z, [**CP4**]$^{+}$).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

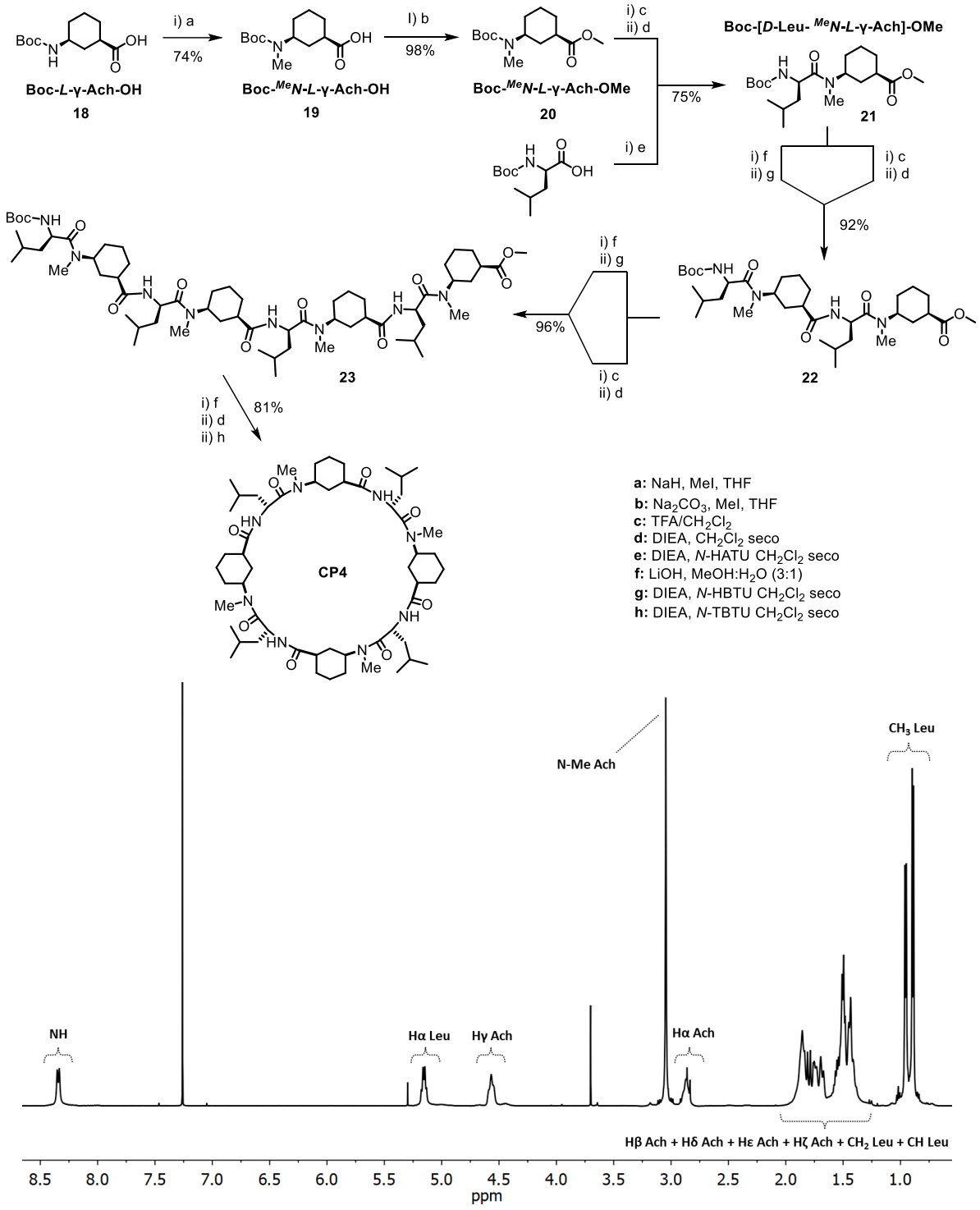


Figura 117. Ruta sintética para la preparación de **CP4** y espectro de ^{1}H RMN en $CDCl_3$ (10 mM aprox).

El siguiente paso para llegar a nuestro objetivo fue preparar la *meso*-tetrakis(3-formilfenil)porfirina (*m*-TFPP) La síntesis de esta molécula fue descrita en 2014 a partir de la

condensación de pirrol y el aldehído monoprotegido con un grupo acetal.[535] La posterior desprotección en medio ácido de este acetal conducía a la *m*-TFPP. Inicialmente, decidimos sintetizar **P2** a través de esta aproximación (Figura 118). Primero se preparó el aldehído protegido con acetal partiendo del 3-bromobenzaldehído. El tratamiento de este con 2,2-dimetil-1,3-propanodiol en medio ácido condujo al 2-(3-bromofenil)-5,5-dimetil-1,3-dioxano (**24**). La reacción se llevó a cabo en tolueno, a reflujo. Posteriormente, el aldehído protegido se trató con *terc*butil litio a -78 °C, formándose el carbanión mediante un intercambio halógeno/metal que se atrapó con DMF seca. De esta forma se obtuvo el compuesto **25** con un 65% de rendimiento. Sin embargo, cuando el compuesto **25** se intentó condensar con pirrol para dar lugar a la porfirina protegida (**26**), no se formó ninguna porfirina. Se intentó llevar a cabo la reacción de condensación variando el ácido utilizado ($BF_3{\cdot}O(Et)_2$ o TFA), el agente oxidante (DDQ o *p*-cloranilo), la concentración (1.0×10^{-2} - 1.0×10^{-3} M) y el tiempo de reacción. Sin embargo, ninguno de estos intentos dio lugar al producto deseado. En algunas ocasiones recuperamos el aldehído de partida y en otras observamos que este se había desprotegido en el transcurso de la reacción.

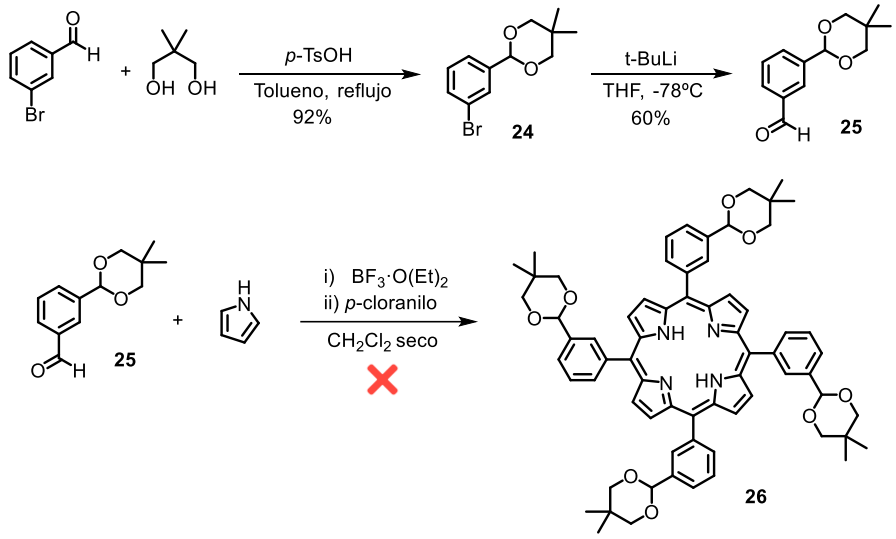


Figura 118. Aproximación a síntesis de la *m*-TFPP a través del empleo del aldehído protegido con un grupo acetal.

Decidimos intentar una aproximación similar, pero realizándola por etapas. Para ello, primero se preparó el dipirrometano **27**. A continuación, se intentó la reacción de condensación entre el dipirrometano **27** y el aldehído protegido **25**, pero tampoco bajo estas condiciones se obtuvo el mencionado producto (Figura 119A). Optamos entonces por cambiar el grupo protector de acetal por un tioacetal, pensando que el primero podría ser demasiado sensible a las condiciones ácidas utilizadas en la formación del anillo porfirínico (Figura 119B). Para ello, el compuesto **25** se trató con 1,3-propanoditiol en medio ácido. La reacción daba lugar a una mezcla del derivado con acetal y tioacetal (**28**), y el compuesto con el grupo acetal hirolizado (**29**). De igual manera, ya que la siguiente etapa es la desprotección del acetal con TFA, se siguió adelante para obtener únicamente el compuesto **29**. Dicho aldehído **29** se sometió a las condiciones de condensación con el pirrol, sin que se observase la formación la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[535] Wang, C.; Ding, H.; Meng, X.; Cui, X.; Yang, Y.; Zhou, T.; Wang, C.; Zeller, M. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11162-11164.

porfirina deseada. En estos intentos, habíamos tenido en cuenta varias precauciones necesarias en cuanto a la síntesis de estos macrociclos.[536] Por un lado, la sequedad del disolvente y del ácido utilizado, llegando incluso a introducir secuestradores de agua como el trietilortoacetato. Por otra parte, las condiciones de dilución de la reacción, que se estiman como óptimas en torno a 10^{-2} M para que haya un balance en la competición entre los procesos de ciclación *versus* polimerización. Específicamente, para la síntesis de porfirinas con aldehídos protegidos con acetales, se conoce que se pueden desproteger parcialmente bajo las condiciones de reacción.

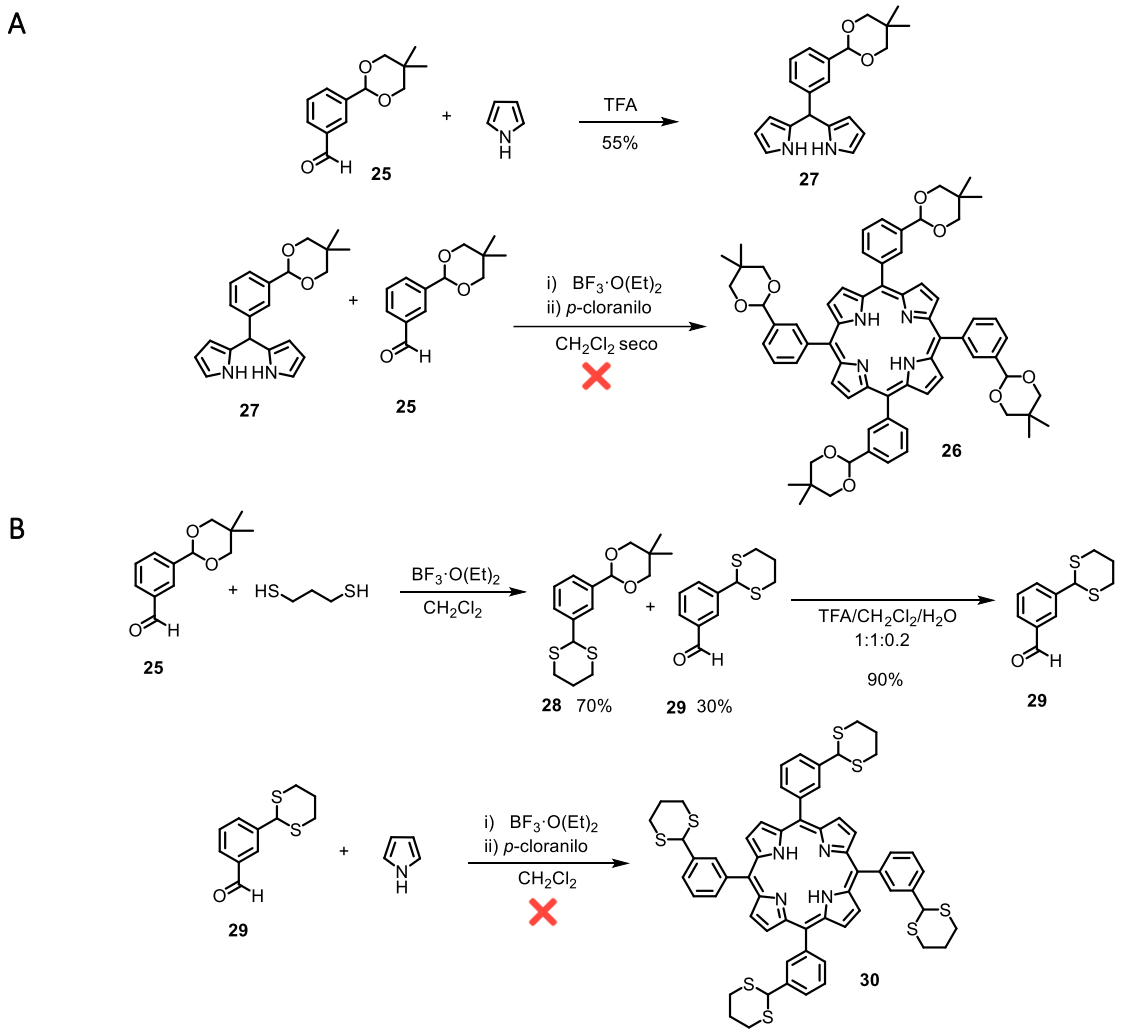


Figura 119. Aproximaciones alternativas a síntesis de la *m*-TFPP a través de aldehídos protegidos.

Decidimos intentar algunas alternativas totalmente diferentes a nuestras aproximaciones previas. Por un lado, a partir del 3-bromobenzaldehído preparamos la porfirina tetrabromada (**31**) con el objetivo de someterla posteriormente a la síntesis de Bouveault (Figura 120),[537] al igual que habíamos hecho previamente en la preparación del compuesto **25**. Al añadir el *n*-

[536] Lindsey, J. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 827-836.
[537] Önal, E.; Ahsen, V.; Pécaut, J.; Luneau, D.; Hirel, C. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 5157-5160.

BuLi, la mezcla de reacción cambió su coloración de morada a verde. Según la bibliografía, esto es un indicio de la abstracción de los protones de los pirroles, que se produce previamente a la formación del organolitio. Sin embargo, pese a haber completado el protocolo de reacción, no observamos la formación del producto deseado, sino que se recuperaba el material de partida.

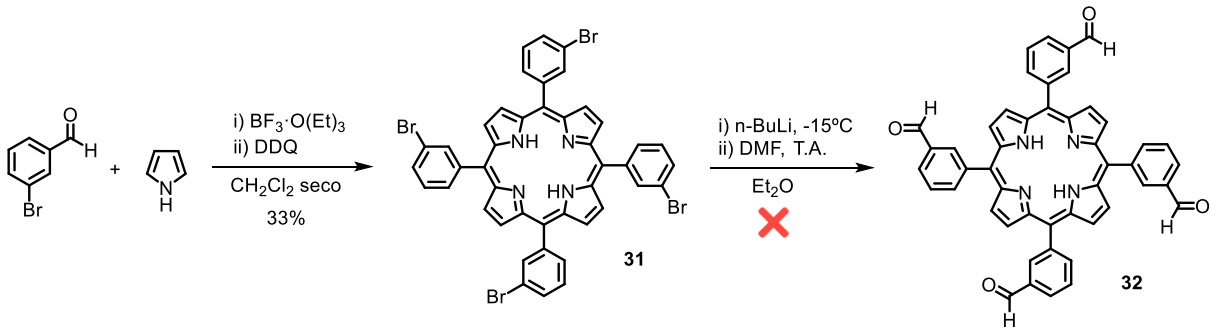


Figura 120. Aproximaciones a la síntesis de la *m*-TFPP a través del derivado tetrabromado.

Por otra parte, ya que se había preparado previamente el aldehído **15** para la síntesis de la porfirina **P1** (Figura 94), decidimos llevar a la cabo la reacción de condensación entre el pirrol y este aldehído. Nuestra idea era someter a la porfirina con cuatro grupos alquino a una reacción de hidroboración para obtener el derivado tetraaldehídico. Pudimos obtener satisfactoriamente la porfirina **32**,[538] y también llevamos a cabo la desililación con éxito para obtener el precursor que necesitábamos (**33**). Desafortunadamente, el tratamiento de este con 9-BBN en TFH no dio lugar al producto deseado, además, no recuperamos el material de partida (Figura 121A). Pensamos que estos dos intentos fallidos podrían deberse a la presencia de cuatro grupos reactivos sobre los que actuar. Para comprobar si este factor era un impedimento en la obtención de los productos deseados, decidimos preparar dos porfirinas distintas, una solo contendría dos bromos y la otra con solo dos acetilenos (Figura 121B). Para ello, llevamos a cabo la reacción de condensación entre el 3-bromobenzaldehído y el dipirrometano **27**, pero no obtuvimos ninguna porfirina como producto. Por otro lado, preparamos el dipirrometano **36** a partir de aldehído **15** y pirrol, para intentar posteriormente la formación de la porfirina entre este y el aldehído **25**. Sorprendentemente, el producto que obtuvimos fue la porfirina **33** donde solo el dipirrometano **36** había participado en la ciclación. En el resultado obtenido de estos dos últimos intentos (Figura 121B) se vuelve a poner de manifiesto la dificultad para incorporar el aldehído protegido con el grupo acetal en la estructura porfirínica.

Recientemente se ha publicado un trabajo donde se aborda la problemática de preparar la *m*-TFPP a partir de aldehídos protegidos.[539] Los autores desarrollan una metodología alternativa donde primero llevan a cabo la condensación de pirrol con 3-formilbenzoato. Posteriormente, hidrolizan el éster con LiOH, seguido de una etapa de reducción a alcohol con $LiAlH_4$. La última etapa es la oxidación a aldehído, para la cual se decantaron por el complejo entre la piridina y el trióxido de azufre como agente oxidante, en la que se conoce como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[538] Yao, D.; Zhang, X.; Mongin, O.; Paul, F.; Paul-Roth, C. O. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 5583-5597.
[539] Mouarrawis, V.; Mathew, S.; Meeus, E. J.; de Bruin, B.; Reek, J. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2022**, *26*, 427-433.

oxidación de Parikh-Doering.[540] Sin embargo, el transcurso de nuestra investigación, que temporalmente fue previa a esta nueva alternativa, nos llevó a una ruta diferente.

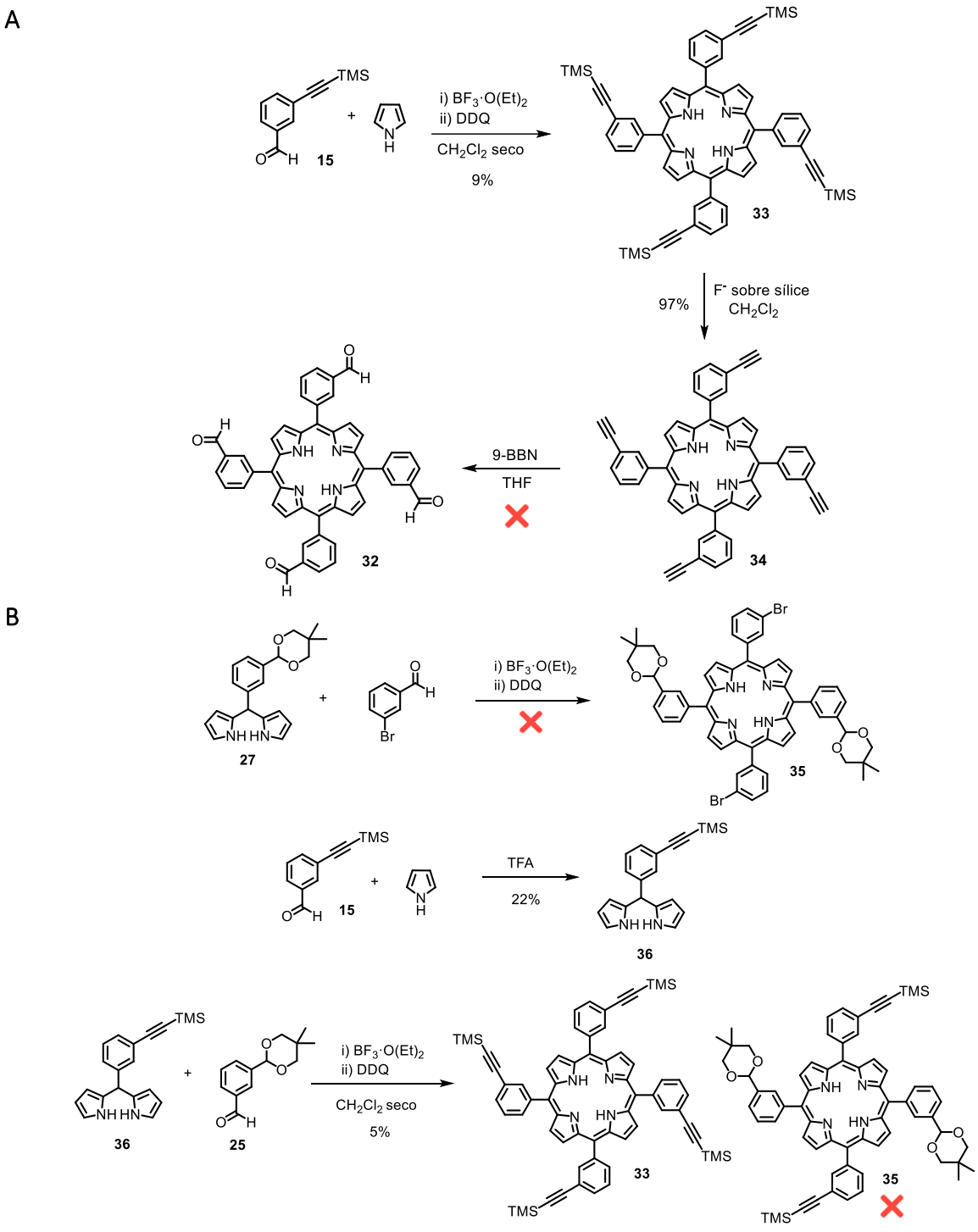


Figura 121. Aproximaciones a la síntesis de la *m*-TFPP a través de derivados bromados o acetilénicos.

[540] Parikh, J. R.; Doering, W. von E. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89,5505-5507.

Finalmente, la última alternativa por la que optamos y que nos permitió obtener el producto deseado fue preparar la *meso*-tetrakis(3-cianofenil)porfirina (*m*-TCPP) para someterla posteriormente a una etapa de reducción de los grupos nitrilo (Figura 122). Empleando las condiciones de Alder y Longo, la condensación entre el 3-formilbenzonitrilo y el pirrol se llevó a cabo en ácido propanoico a reflujo y dio lugar al producto esperado **36** en muy bajo rendimiento (3%).[541] Posteriormente se procedió a metalar la porfirina con Zn^{II}, usando $Zn(OAc)_2{\cdot}H_2O$. La última etapa de esta síntesis fue la reducción con DIBAL-H, que ya se había usado anteriormente en este tipo de transformaciones con porfirinas como sustrato.[542] Sobre este último paso, encontramos dos consideraciones fundamentales para la obtención de **P2**. La primera de ellas es la necesidad de que la porfirina esta metalada previamente al tratamiento con DIBAL-H. En el caso contrario no pudimos recuperar el producto de la fase acuosa. La segunda consideración es el lavado del crudo de reacción con la sal de Rochelle para retirar las sales de aluminio, lo que facilita considerablemente el proceso de elaboración.[543]

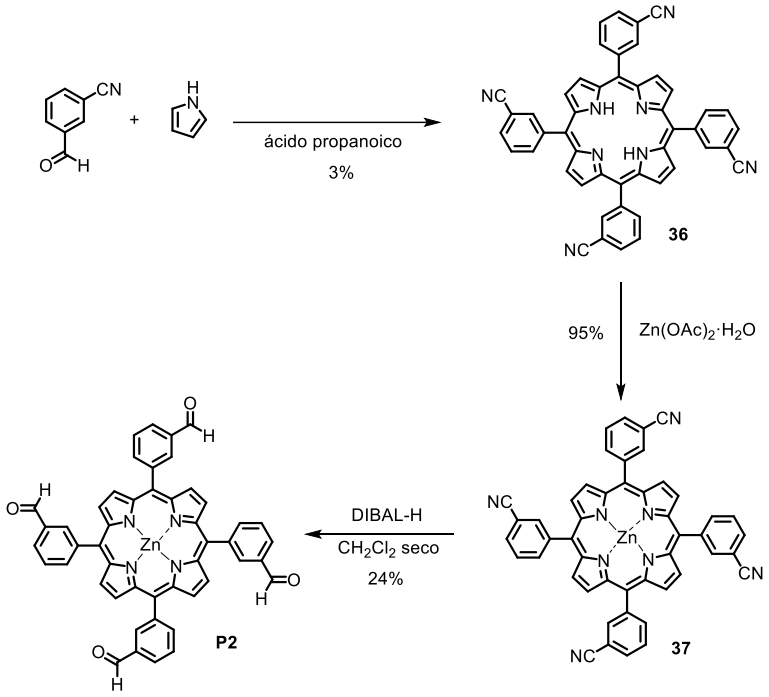


Figura 122. Esquema sintético para la preparación de *m*-TFPP (**P2**) a partir de la *m*-TCPP (**36**).

6.1.2.2 Formación del aducto P2⊂(D3-4)$_2$

Tras obtener **P2**, llevamos a cabo la formación de **P2⊂(D3-4)$_2$**, y monitorizamos el proceso a través de ^{1}H RMN. En primer lugar, se obtuvo **CP3** (Figura 116) mediante el tratamiento con TFA de su precursor, que contiene una hidrazina protegida con Boc. Una vez desprotegido y eliminado el TFA, se disolvió **CP3** en una mezcla 10% MeOH-d_3/CD_2Cl_2. El metanol se empleó como co-disolvente para poder solubilizar por completo **CP3**, cuyo espectro de ^{1}H RMN mostraba señales anchas (Figura 123), aunque sin rastro de la señal característica de la

[541] Wu, Y.; Liu, J. C.; Guo, W. B.; Li, R. Z.; Jin, N. Z. *Polyhedron* **2016**, *117*, 155-160.
[542] Kameyama, K.; Satake, A.; Kobuke, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7617-7620.
[543] Dreiding, A. S.; Hartman, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 939-943.

hidrazina protegida (el protón Boc-N**H** aparece sobre 9.6 ppm). Se procedió entonces con la formación de la especie heterodimérica **D3-4**, mediante la adición de pequeñas alícuotas de una disolución de **CP4** sobre **CP3**. Inmediatamente se aprecian cambios en el espectro de ^{1}H RMN indicativos de la formación del heterodímero. Por una parte, el aumento del número de señales en la zona de los protones amídicos (8.2-8.7 ppm), pero ninguna de ellas puede atribuirse a **CP4/D4** en su estado homodimérico. También aparecen nuevas señales en el espectro, a 4.40 y 2.77 ppm, que aparentemente pertenecen a los $H\gamma_{Ach}$ y $H\alpha_{Ach}$ de **CP4**. La anchura de los picos en comparación al espectro de **CP4** en solitario también indica que este péptido no se encuentra ya como homodímero.

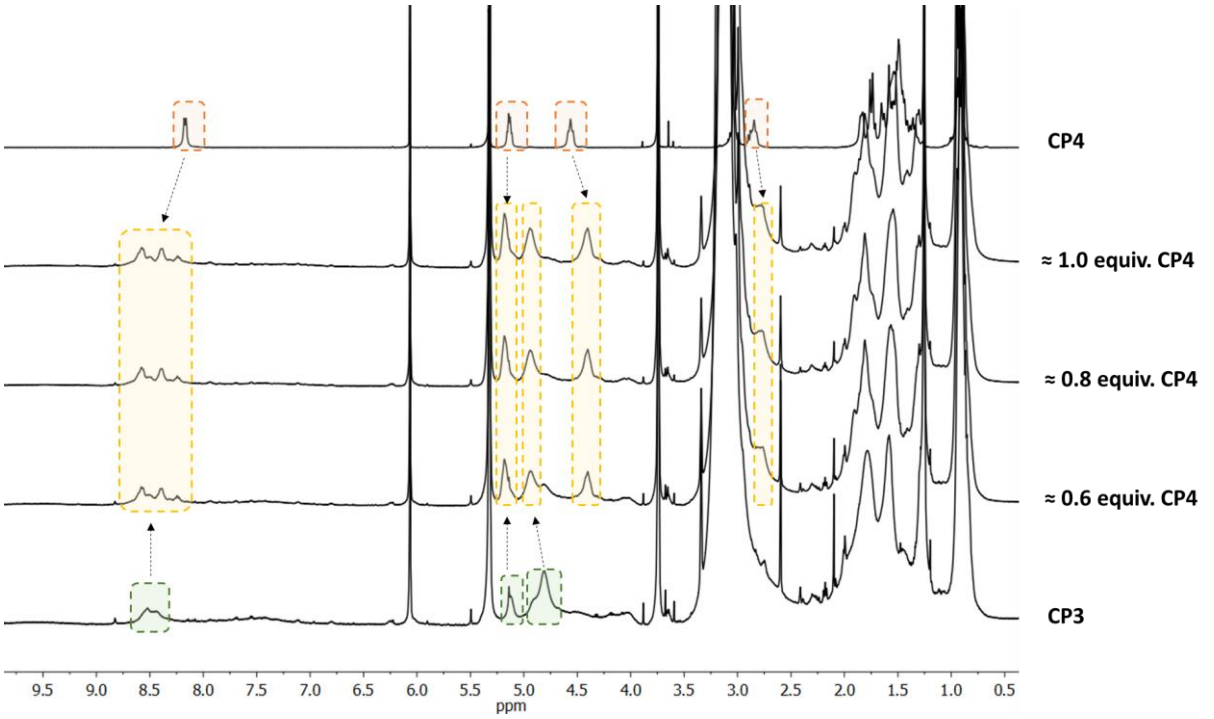


Figura 123. Seguimiento de la adición de **CP4** (30 µL, 90 mM en CD_2Cl_2) sobre **CP3** (3 mM aprox, 10% MeOH-d_3/CD_2Cl_2) que provoca la formación de la especie **D3-4**. Las señales más destacadas de **CP3** se muestran sombreadas en verde, así como en naranja para **CP4** y en amarillo para **D3-4**. Las señales a 6.06 y 3.74 ppm pertenecen al estándar utilizado, 1,3,5-trimetoxibenceno.

Por otra parte, la señal de **CP3** que aparece a 4.81 ppm previamente a la adición de **CP4** (que pertenece a los $H\gamma_{Acp}$ y los CH_2 de la acetilhidrazida), se desplaza a campo bajo, quedando solapada con aquella que resuena a 4.90 ppm ($H\alpha_{Leu}$). La necesidad de formar la especie **D3-4** antes de la condensación con **P2** se debe a que, una vez formado el heterodímero, la polimerización estará más impedida porque competirá con la disociación de **D3-4**.

Una vez confirmada la formación del heterodímero, procedimos con la adición de **P2** sobre la muestra (Figura 124), registrándose su espectro de ^{1}H RMN inmediatamente después de la adición de **P2**. En ese momento, se apreciaban claramente todas las señales **P2** (en morado), incluida la señal del aldehído (10.29 ppm) ya que la condensación con **D3-4** estaba aún lejos de completarse. Aun así, es posible vislumbrar la aparición de un nuevo grupo de señales (en fucsia) que pertenecen a la porfirina formando parte del producto de condensación **P2⊂(D3-4)$_2$**, cuya intensidad aumenta con el paso de las horas. Contrariamente, las señales de **P2** van

desapareciendo de manera progresiva. La anchura de los picos de esta nueva especie, no nos permitió realizar una asignación rigurosa de todas las señales. Pese a ello, los cambios observados en el espectro de ^{1}H RMN junto con la detección por MALDI de la masa del aducto **CP3-P2-CP3** [2878.431 m/z ([M+Na]$^{+}$)], nos permiten afirmar que la condensación se produjo con la estequiometría adecuada.

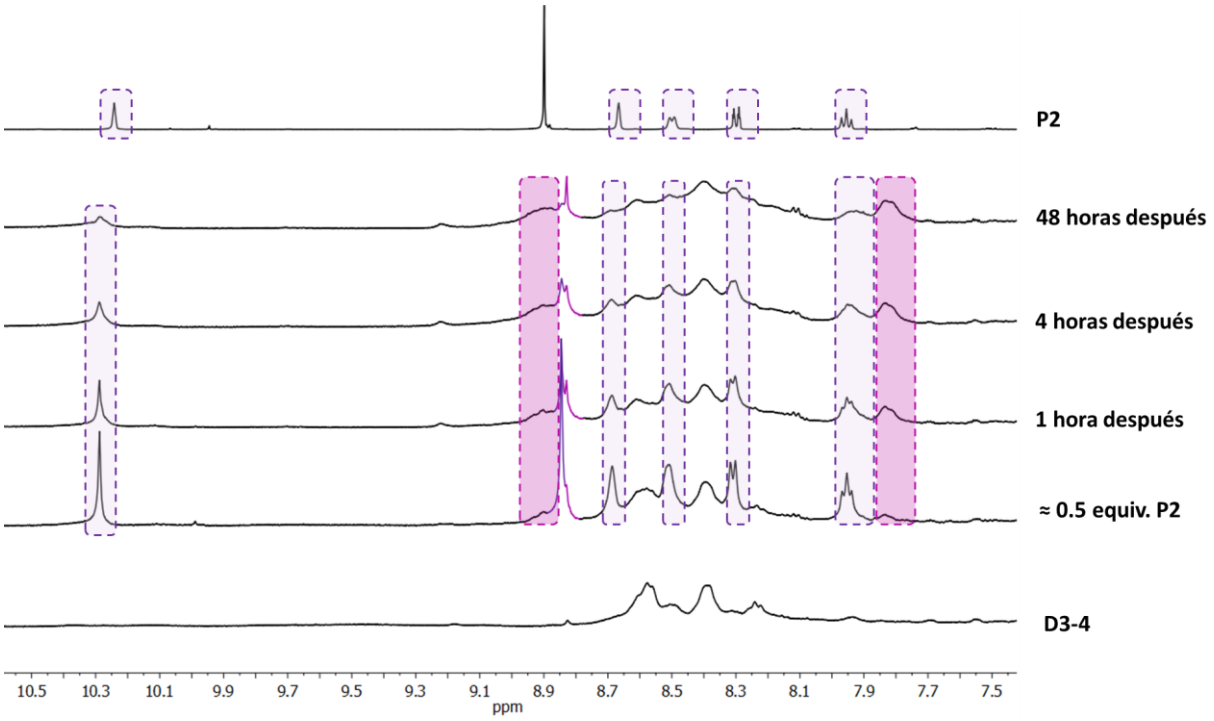


Figura 124. Seguimiento de la formación de **P2⊂(D3-4)$_2$** tras la adición de **P2** (30 µL, 45 mM en CD_2Cl_2) sobre **D3-4** (1.5 mM aprox. en 10% MeOH-d_3/CD_2Cl_2). Las señales de **P2** aparecen sombreadas en morado claro, mientras que aquellas con la sombra en fucsia pertenecen a las señales de la porfirina tras la condensación, formando parte de **P2⊂(D3-4)$_2$**.

Por motivos de límite de tiempo para la finalización de esta tesis doctoral, no se pudieron realizar más avances en relación con este proyecto. Sin embargo, se encuentra en nuestros planes futuros está estudiar la actividad de **P2⊂(D3-4)$_2$** como catalizador. Para ello, también pensamos en intercambiar el centro metálico de **P2** por Mn^{II}, Fe^{II} o Ru^{II}, ya que estos muestran una mayor actividad catalítica.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.2 HETEROCICLOS EN LOS BRAZOS MOLECULARES DE UN α,γ-CICLOHEXAPÉPTIDO: SÍNTESIS Y ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE SU CAPACIDAD DE COORDINACIÓN Y ACTIVIDAD ESTERASA.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.2 Heterociclos en los brazos moleculares de un α,γ-ciclohexapéptido: síntesis y estudios preliminares sobre su capacidad de coordinación y actividad esterasa.

6.2.1 Antecedentes y primera aproximación

En trabajos previos de este grupo de investigación, se demostró que los α,γ-ciclohexapéptidos que incorporan brazos moleculares portadores de *orto*- y *meta*- piridinas terminales eran capaces de coordinarse con algunos metales de la serie de transición, encapsular diamonios alquílicos y actuar como transportadores de pares iónicos M^+/A^- o de H^+/Cl^- (Figura 125).[501,544] Todo ello se debe a la presencia de los tres anillos de piridina, que tienden a converger en un mismo punto, en el plano superior al esqueleto peptídico, dirigiendo así el proceso de coordinación/encapsulación. También se demostró que la formación del dímero jugaba un papel fundamental en la actividad descrita. Las especies heterodiméricas, donde una de las subunidades no portaba grupos coordinantes, mostraron peores propiedades transportadoras.

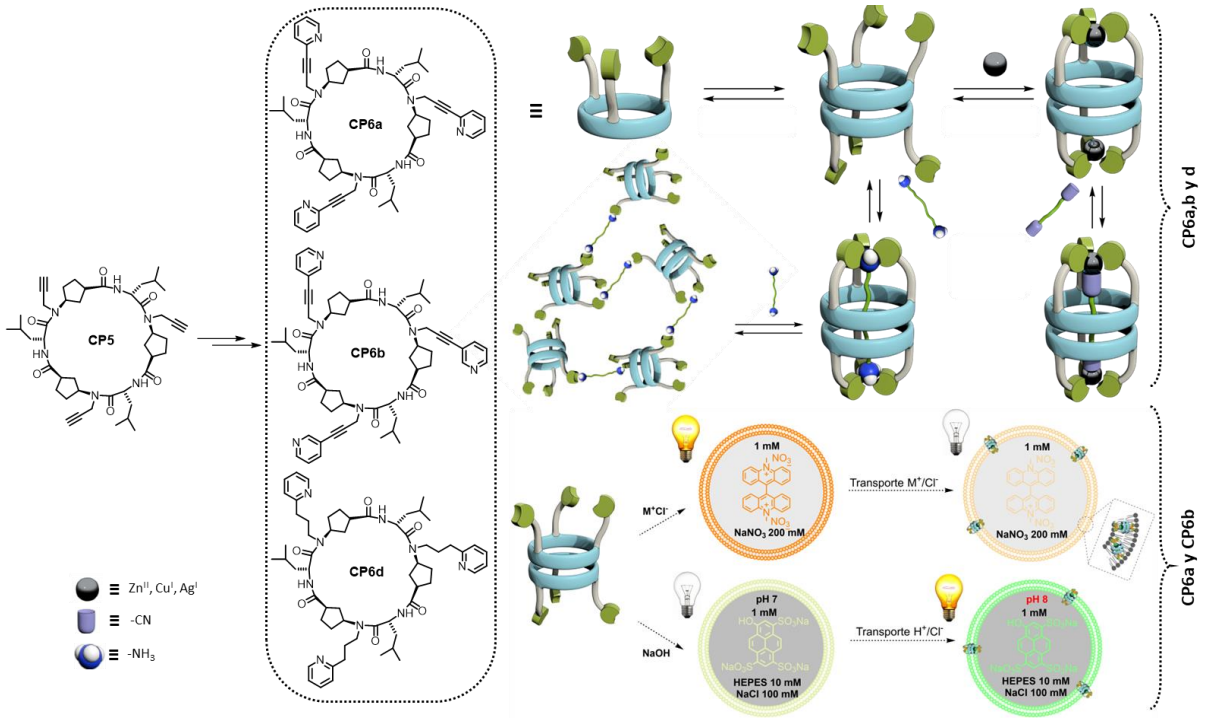


Figura 125. Representación gráfica de los estudios relacionados con los *tris*-piridilciclohexapéptidos desarrollados previamente en el grupo de investigación.

Tras estos resultados, nos planteamos seguir profundizando en las propiedades de este tipo de componente supramolecular y evaluar sus propiedades como catalizadores en la hidrólisis de ésteres de pequeño tamaño. Esto es, queríamos comprobar si presentaban

[544] H.L. Ozores Teira, *Diseño y síntesis de cápsulas moleculales y sistemas mesógenos basados en ciclopéptidos* (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (2018).

actividad esterasa. Como se ha detallado en la sección de la introducción dedicada a metaloenzimas (sección 5.4), la anhidrasa carbónica presente en seres humanos (α-CA) presenta en su sitio activo tres histidinas, que se coordinan con Zn^{II} para formar un complejo capaz de promover la interconversión entre CO_3^{2-} y HCO_3^-. Una molécula de agua ocupa la cuarta posición de coordinación y está involucrada directamente en el ciclo catalítico (Figura 49). Pensamos que el complejo resultante de la coordinación de los *tris*-piridil-CPs con Zn^{II} podría emular este centro activo, y, por tanto, la actividad de la anhidrasa carbónica. Por otra parte, ya que ha de formarse un complejo tetraédrico entre los heteroanillos, el ion Zn^{II} y una molécula de agua, creemos que un CP con *meta*-piridinas terminales sería la mejor opción para que este complejo activo se forme de manera eficiente.

6.2.2 Estudios de hidrólisis con CP6b y CP6c

Nos decantamos por **CP6b** para nuestros primeros ensayos, que estaba disponible en el grupo, ya que había sido preparado por los autores de los trabajos previos. Normalmente, se recurre al ensayo de hidrólisis del *p*ara-nitrofenilacetato (*p*-NPA) para comprobar si una especie sintética puede imitar la actividad de la anhidrasa carbónica.[328] Sin embargo, este ensayo se lleva a cabo en medio acuoso, en el cual **CP6b** es poco soluble. Esto hizo que desarrollásemos un ensayo alternativo para estudiar su actividad esterasa (Figura 126). Pensamos en investigar este proceso de manera confinada, dentro de vesículas lipídicas. Esperábamos que la hidrofobicidad de los ácidos grasos de los fosfolípidos favoreciese la solubilidad del péptido, dado que ya se había demostrado que **CP6b** era capaz de atravesar estas membranas. Para aumentar la sensibilidad del proceso, escogimos como sustrato el acetato del HPTS (8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato trisódico o piranina), que se preparó por tratamiento de este con anhídrido acético a reflujo en presencia de acetato sódico (Figura 126A). El HPTS es un conocido fluoróforo que se usa ampliamente en estudios de transporte a través de membranas lipídicas, y su emisión depende del pH. Si el complejo entre **CP6b** y Zn^{II} fuese capaz de promover la hidrólisis de AcPTS, deberíamos apreciar un notable aumento en la emisión de la muestra por la formación del producto de hidrólisis, el HPTS. Registramos su espectro de absorbancia a diferentes pHs para orientarnos sobre la longitud de onda de excitación apropiada (Figura 126A). Dado que su espectro tiene un punto isosbéstico a 415 nm, lo escogimos como λ_{ex} para que fuese constante en todos los experimentos. Recogeríamos la emisión a 510 nm, que es el máximo para el HPTS. De este modo, se prepararon vesículas que contenían AcPTS (5 mM), y empleando un medio intravesicular compuesto por HEPES (10 mM) y NaCl (100 mM), a pH 7.5. Para el medio extravesicular, escogimos un pH de 8.5, moderadamente básico, ya que en ensayos previos no se observaba hidrólisis cuando el pH externo era también 7.5. De este modo, el medio extravesicular seleccionado fue por tricina (10 mM) y NaCl (145 mM), a pH 8.5. El ensayo consistía en evaluar el incremento en la emisión de las vesículas tras la adición de una alícuota que contiene péptido y zinc. Este incremento se puede relacionar con la hidrólisis dentro de las vesículas. Realizamos medidas control donde solo se adicionaba **CP6b** (desde una disolución stock en DMSO), o $ZnCl_2$ (desde una disolución stock en H_2O) y pudimos comprobar que el péptido y la fuente de zinc, por separado, no provocaban la hidrólisis del AcPTS, ya que no aumentaba la emisión. Cuando se adicionó una alícuota que contenía **CP6b** y $ZnCl_2$, con 10 veces más Zn^{II} que péptido, para asegurar la completa complejación, no observamos indicios de hidrólisis. Tampoco cuando se aumentó hasta 1:40 la proporción **CP6b**:$ZnCl_2$. Esta falta de reactividad se podía deber a la falta de complementariedad geométrica para formar el complejo, y por ello decidimos probar con **CP6c**, pero desafortunadamente no obtuvimos mejores resultados.

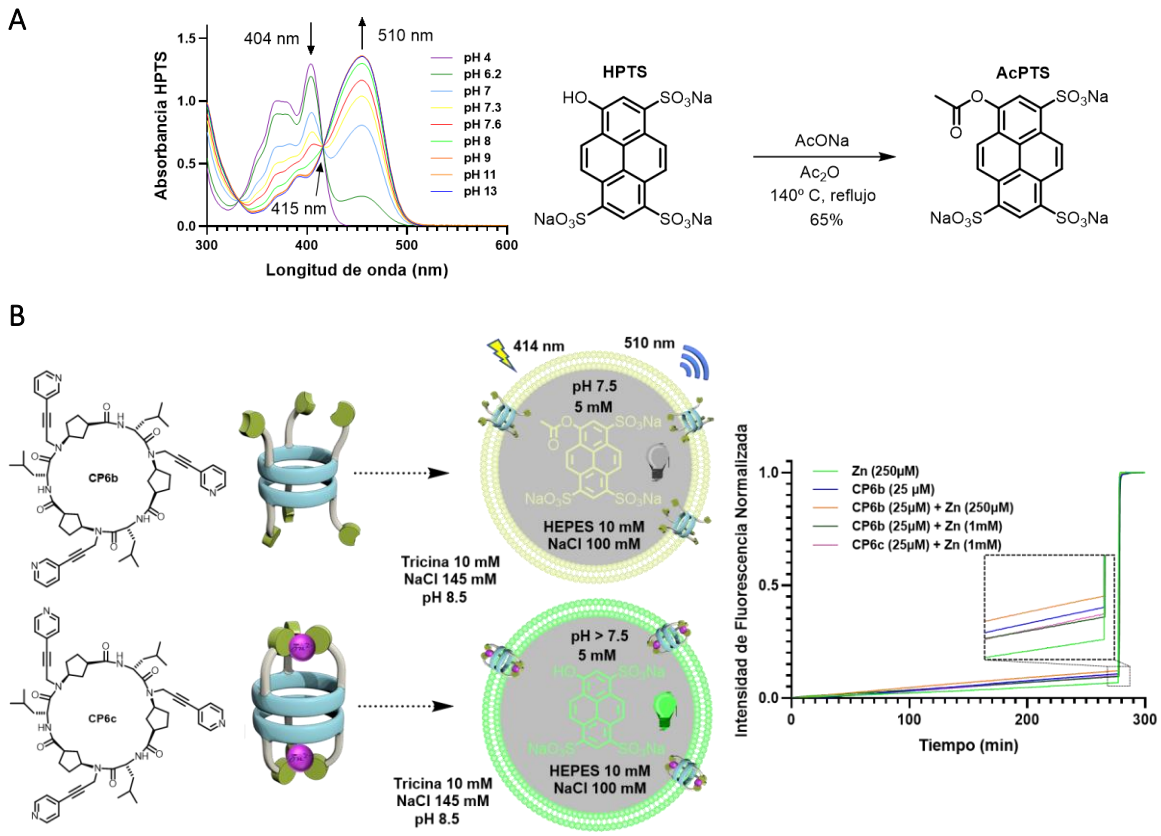


Figura 126. Estudios de hidrólisis con **CP6b** y **CP6c** en vesículas.

Los resultados obtenidos nos hicieron pensar que quizás, la rigidez de los brazos moleculares que incluyen un espaciador propargílico, pudiese ser un impedimento para la formación del complejo o la modulación en la orientación de las piridinas terminales. Por este motivo, decidimos introducir cambios estructurales en el diseño.

6.2.3 Nuevo diseño

En el cambio de rumbo del diseño, consideramos que los *tris*-piridil-CPs que presentan una cadena alquílica espaciador entre el CP (como **CP6a**) y la piridina serían mejores candidatos que los derivados propargílicos (como **CP6b** y **CP6c**), dado que los grupos alquinílicos actúan como atractores de carga retirando riqueza electrónica al anillo de piridina. Además, la flexibilidad de los primeros favorecerá en mayor medida la formación del complejo activo, así como el acercamiento del sustrato, teniendo en cuenta que este último evento puede darse tanto por la parte externa como interna del CP. Por otra parte, creíamos conveniente seguir apostando por un CP con *meta*-pidirinas, ya que aventurábamos que la formación del complejo activo sería más eficiente. Para comprobarlo, decidimos llevar a cabo la optimización de geometría de los *orto*-, *meta*- y *para*- derivados (Figura 127). Para ello, recurrimos a cálculos DFT (detalles en la sección de metodología). Tal como habíamos previsto en nuestro diseño, **CP6d** forma un complejo ''*endo*'' debido a la posición de los átomos de nitrógeno. Además, el espacio restante en la cavidad de **D6d** no es suficiente para acomodar una molécula de sustrato. Por tanto, si el acercamiento de la molécula de sustrato debe producirse por la misma cara en la que está coordinada esa molécula de agua, al igual que sucede en el caso de la CA, ese proceso estaría bastante impedido. Para **CP6e** y **CP6f**, las optimizaciones de geometría dieron como resultado los complejos ''*exo*'', con ángulos promedio N-Zn-O de 107.2° y 109.5°, respectivamente. Sin

embargo, los anillos de piridina de **CP6e** parecen quedar mejor orientados para la coordinación que los de **CP6f**. Para **CP6e**, el ángulo C_{6py}-N-Zn (siendo CP_{6py} el carbono del anillo de piridina que está a 180° del nitrógeno) es 152° mientras que para **CP6f**, el ángulo C_{1py}-N-Zn (siendo CP_{1py} el carbono del anillo de piridina que está a 180° del nitrógeno) es 143°. Esto es, los anillos de piridina de **CP6f** están más alejados de la perfecta alineación con el ion. Aunque estos resultados no son tajantes, ya que la cadena propílica es flexible, hicieron que nos decantásemos por la preparación de **CP6e** para nuestros estudios.

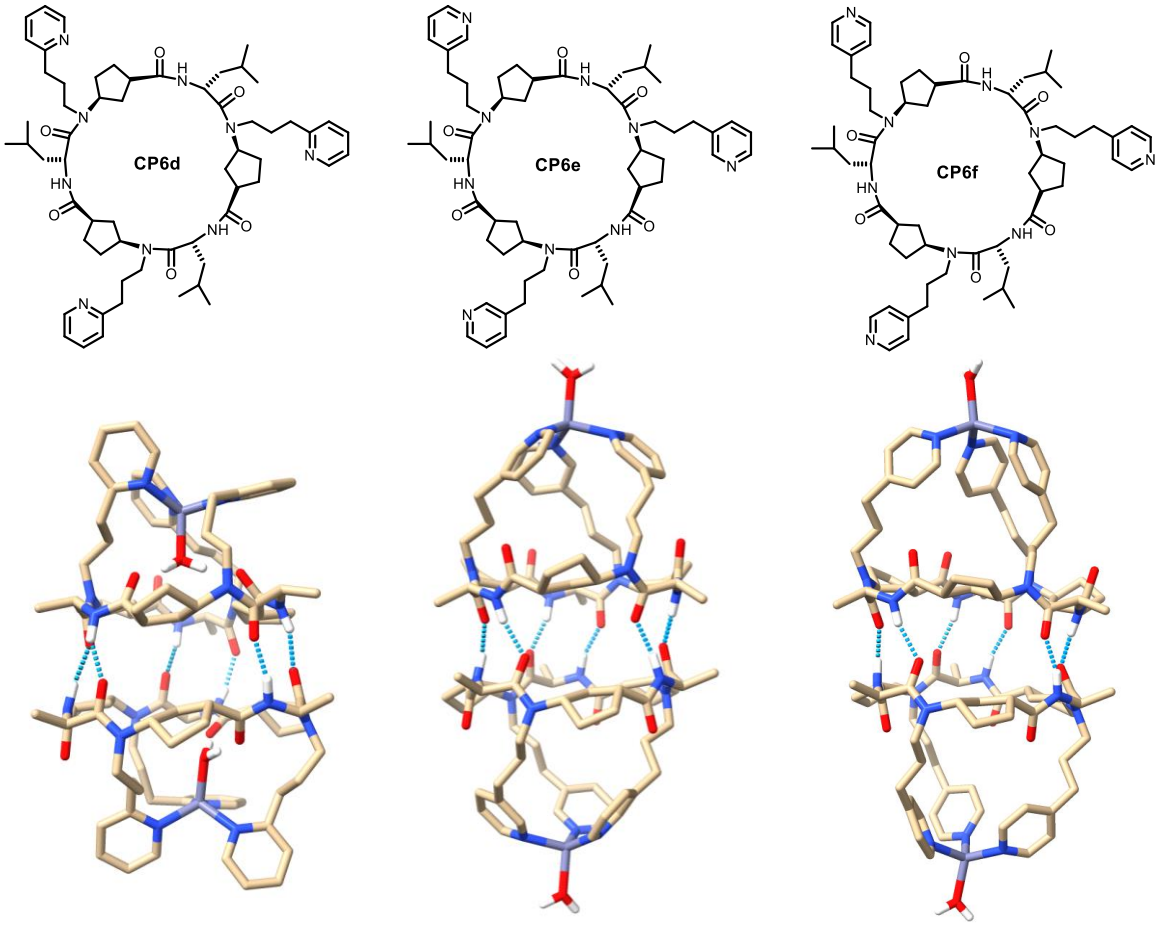


Figura 127. Estructuras de mínima energía obtenidas para los hipotéticos complejos CP·(Zn·H_2O) en el caso de **CP6d**, **CP6e** y **CP6f**.

Por otra parte, decidimos afrontar también la síntesis de **CP7b**, un péptido análogo a **CP6a** o **CP6b**, pero con anillos de imidazol en lugar de piridina en los extremos de sus brazos moleculares. Con este diseño, buscamos acercarnos todo lo posible al bolsillo natural de la anhidrasa carbónica. En nuestra idea original, partiendo de **CP5**,[545] podríamos obtener tanto **CP6e** como **CP7b** (Figura 128), realizando los correspondientes acoplamientos de Sonogashira y posterior hidrogenación catalítica. En los trabajos previos había sido posible obtener **CP6d** por hidrogenación de **CP6b**, por ello pensamos en proceder de manera análoga para obtener

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[545] Pizzi, A.; Ozores, H. L.; Calvelo, M.; García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Demitri, N.; Terraneo, G.; Bracco, S.; Comotti, A.; Sozzani, P.; Bezuidenhout, C. X.; Metrangolo, P.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14472-14476

CP6e a partir de **CP6a**. La preparación de **CP7b**, sin embargo, se presentaba como un reto más complejo, ya que los acoplamientos de Sonogashira con imidazoles suele transcurrir con bajos rendimientos y requieren de heterociclos protegidos. Deberíamos encontrar un derivado del 4-iodoimidazol que incorporase un grupo protector adecuado para poder realizar el acoplamiento de Sonogashira sobre **CP5** y eliminarlo posteriormente. Este último paso de desprotección es importante ya que, aunque en el mecanismo catalítico de la CA, el grupo NH del imidazol no está involucrado activamente, la alteración electrónica y estérica del anillo sí que puede tener repercusiones negativas en su actividad. En los apartados siguientes se detallará cómo se sintetizaron finalmente estos CPs.

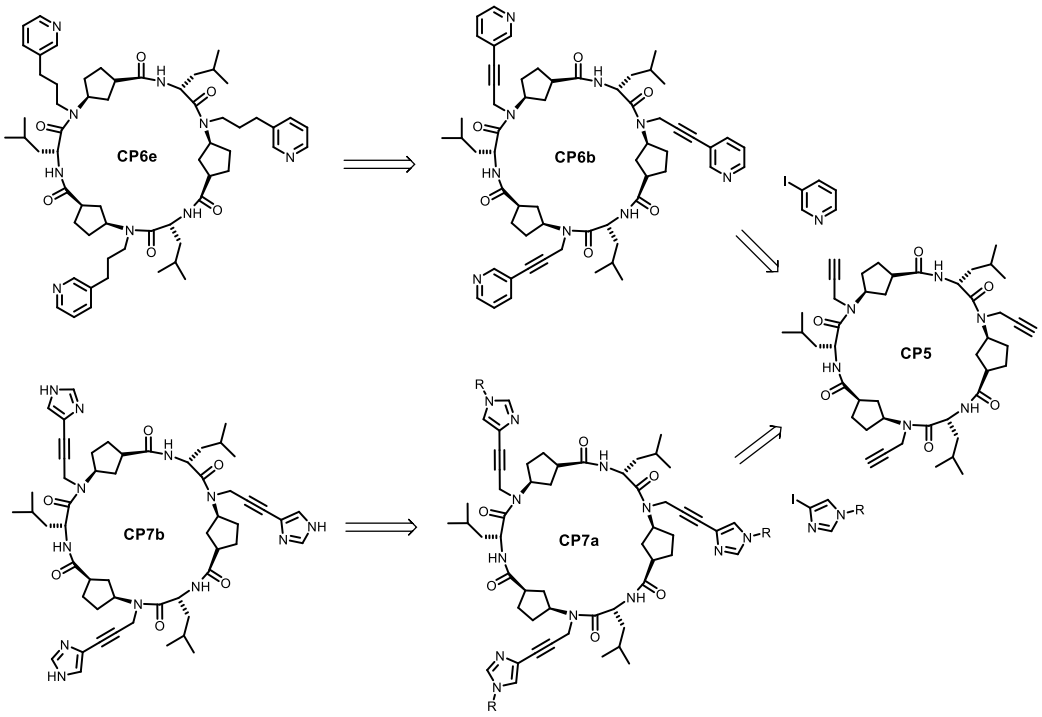


Figura 128. Estrategia retrosintética original para la preparación de **CP6e** y **CP7b.**

6.2.4 Síntesis de CP6e

Según la estrategia que planteamos (Figura 128), la obtención de **CP6e** pasa por la síntesis previa de su precursor **CP5**. Este α,γ-ciclohexapéptido de simetría terciaria está compuesto por un único dipéptido que se repite tres veces en su secuencia (Figura 129). Por tanto, la propuesta sintética se basaba en una síntesis convergente en la que el dipéptido **40** es el componente básico de construcción. A partir de él se construiría el tetrámero (acoplamiento entre dos dipéptidos) y el hexámero. Los dos primeros pasos, hasta la obtención de **Ns-*N*-*L*-γ-Acp-OMe** (**5**) son equivalentes a la ruta sintética de **CP1** (Figura 88). Necesitábamos funcionalizar este aminoácido con una cadena propargílica sobre la amina y por ello recurrimos al grupo protector nosilo. Como se ha comentado en la primera parte de los resultados de esta tesis, es una alternativa que aporta buenos rendimientos para las reacciones con electrófilos voluminosos y además minimiza las probabilidades de epimerización sobre el Cα. Tras la alquilación y posterior eliminación del nosilo, se lleva a cabo el acoplamiento peptídico con la **Boc-*D*-Leu-OH** para obtener el dipéptido **Boc-[*D*-Leu-*propargil*N-*L*-γ-Acp]-OMe** (**40**) con un rendimiento del 81%. En el siguiente paso se tomaron dos fracciones separadas de **40** y se desprotegieron por sus extremos amino y carboxilo, respectivamente. Los péptidos resultantes se acoplaron, usando

N-HBTU como agente activante para dar lugar al tetrapéptido **41**, también con excelentes rendimientos. Posteriormente, el tetrapéptido **41** se desprotegió por su extremo amino y se acopló con el dipéptido (**40**), previamente desprotegido por su extremo carboxilo, obteniéndose el hexapéptido **42**. La desprotección de **42** por ambos extremos y posterior tratamiento con *N*-TBTU en presencia de DIEA y a alta dilución permitió obtener **CP5** con un rendimiento global para estas tres últimas etapas del 45%.

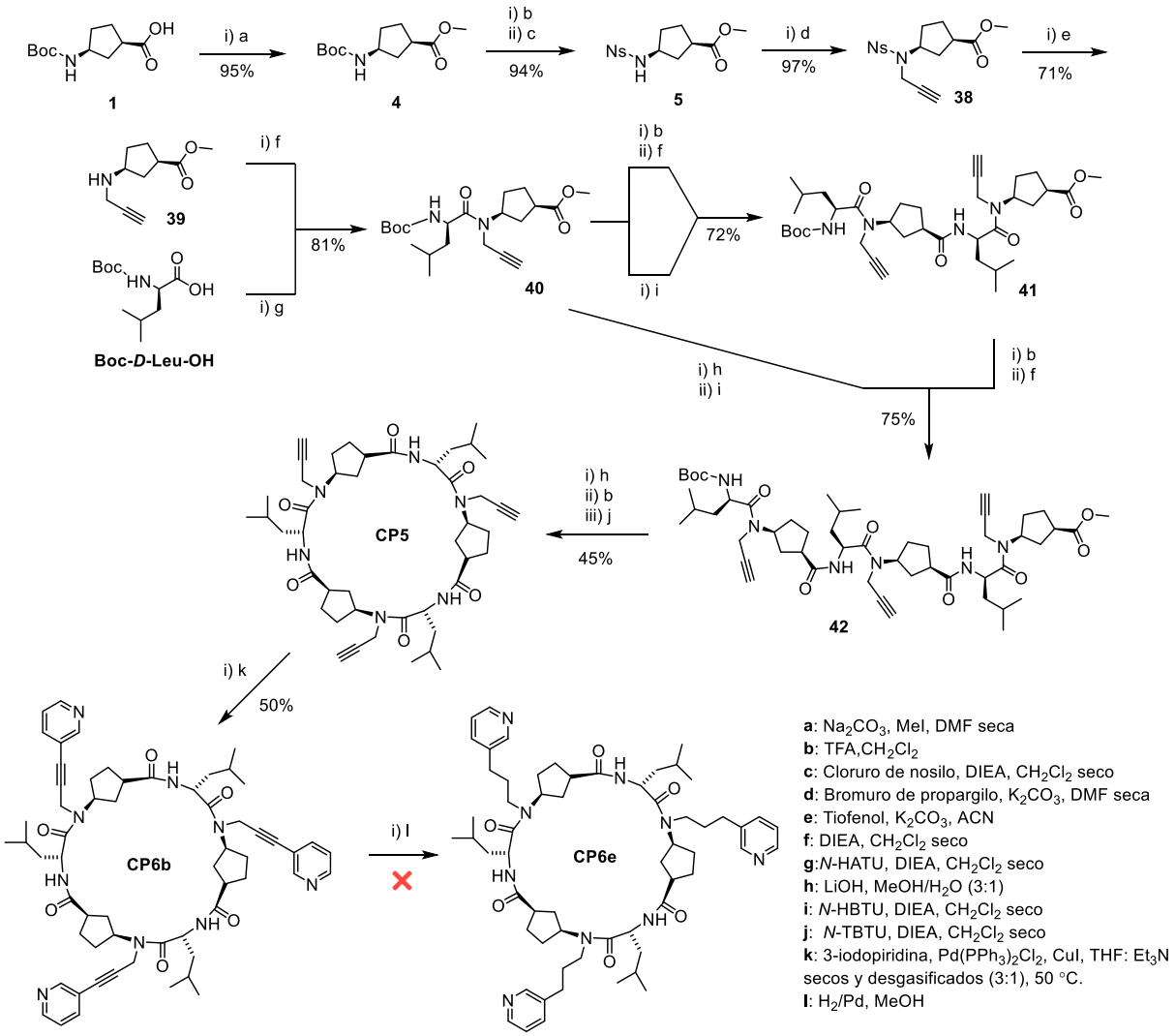


Figura 129. Ruta sintética inicial para la obtención de **CP6e.**

La incorporación de los anillos *meta*-sustituidos de piridina sobre **CP5** se llevó a cabo satisfactoriamente mediante el acoplamiento de Sonogashira con la 3-iodopiridina, para dar lugar a **CP6b**.[501,545] Esta reacción transcurre con un 50% de rendimiento. Sin embargo, el posterior tratamiento con paladio sobre carbono, bajo atmósfera de H_2 (presión de un globo), no dio lugar a **CP6e**. Esta conversión también se estudió a una presión de hasta 10 atmósferas, pero, al igual que en intentos previos, no se obtuvo **CP6e** y tampoco se pudo recuperar **CP6b**. Consideramos que **CP6b** se coordina fuertemente al paladio que usamos en las condiciones de reducción impidiendo la hidrogenación.

Ante estas dificultades, decidimos cambiar la estrategia sintética para que la reducción no se llevase a cabo en la última etapa de la síntesis (Figura 130). En esta nueva aproximación el

anillo de piridina se incorporaría sobre el aminoácido protegido **38**, dando como resultado el producto **43** de manera eficiente. Posteriormente, se llevó a cabo la desprotección del grupo nosilo y el posterior acoplamiento con la Boc-*D*-Leu-OH para obtener el dipéptido **45**. Sin embargo, el rendimiento obtenido en este último paso era demasiado bajo (28%). Por ello, decidimos cambiar ligeramente la estrategia y realizar el acoplamiento y posterior hidrogenación sobre el dipéptido propargilado **40**. El acoplamiento bajo las típicas condiciones de Sonogashira transcurre con un excelente rendimiento, obteniéndose el producto **45**, cuya posterior hidrogenación también transcurre con un buen rendimiento, dando lugar a **46**.

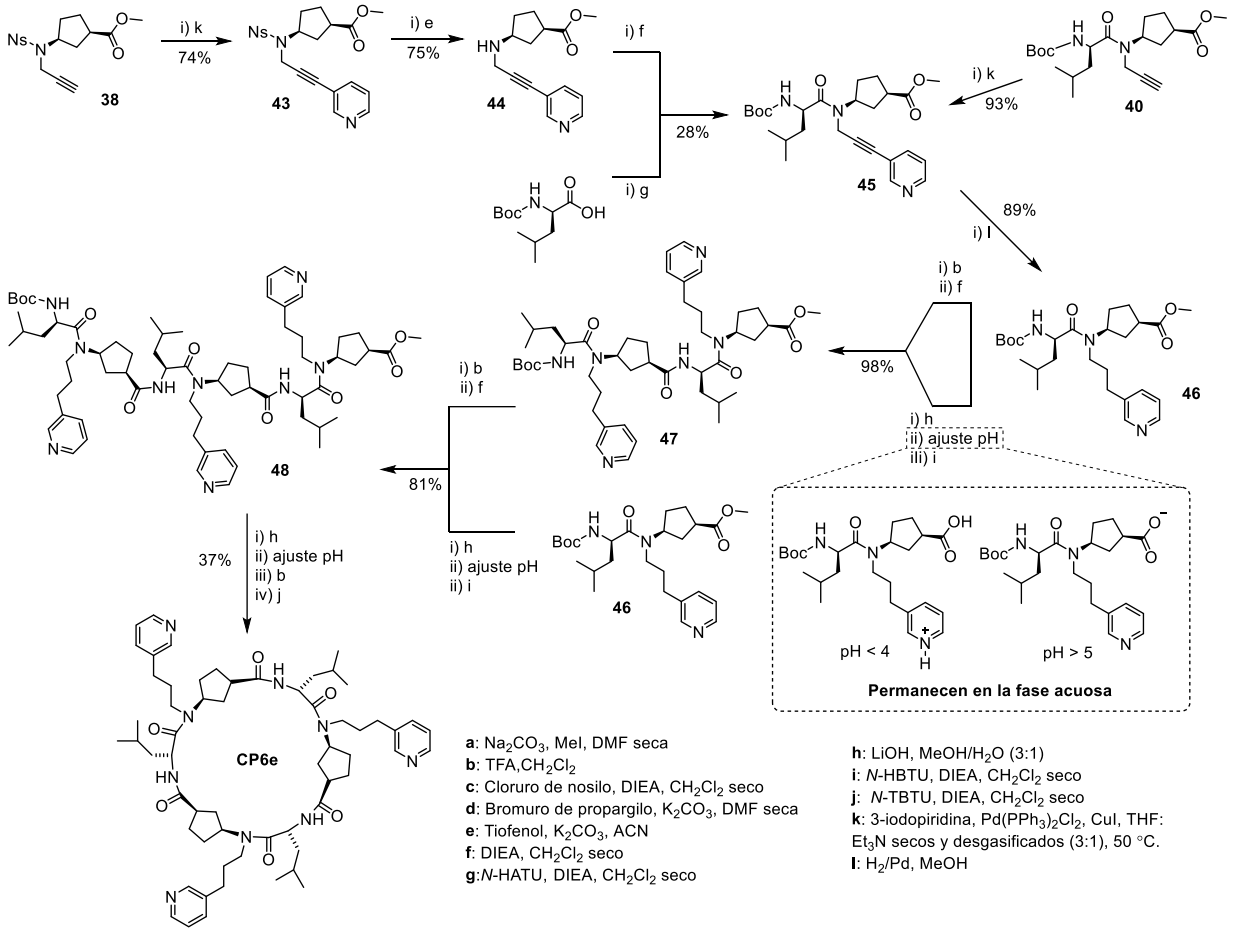


Figura 130. Ruta sintética alternativa para la obtención de **CP6e**.

A partir del dipéptido hidrogenado (**46**), se procedió de manera similar en comparación a la síntesis de **CP5** (Figura 130). La secuencia de desprotecciones y acoplamientos sucesivos nos permitieron obtener los tetra- y hexapéptidos lineales (**47** y **48** respectivamente), también con excelentes rendimientos. Cabe resaltar que fue necesario introducir una etapa importante de ajuste de pH después de las desprotecciones de los extremos *C*-terminal de los péptidos lineales para evitar una caída drástica en los rendimientos obtenidos. La desprotección del extremo *C*-terminal se suele realizar con LiOH en una mezcla MeOH:H_2O. Una vez terminada la reacción, se elimina el MeOH a presión reducida. La dispersión acuosa del péptido *C*-desprotegido se acidifica hasta pH 3, asegurando así que el ácido está protonado, lo que permite recuperar el péptido en la fase orgánica. Sin embargo, en el caso de la ruta sintética para la obtención de **CP6e**, la presencia de un anillo de piridina perturba el pH al cual el péptido es completamente soluble en la fase orgánica. Tras la desprotección del éster **46**, se comprobó que a pH menor

que 4 o mayor que 5, el dipéptido desprotegido permanecía, mayoritariamente, en la fase acuosa. Esto se debe a que, por debajo de pH 4, se forma el catión piridinio, mientras que por encima de pH 5, el ácido está desprotonado. Ambas situaciones favorecen la solubilidad del péptido en agua. Fue necesario realizar un ajuste cuidadoso del pH hasta llegar al punto isoeléctrico, que no es el mismo para el dipéptido **46** que para el tetrapéptido **47** o el hexapéptido **48** *C*-desprotegidos. Afortunadamente, es posible visualizar los cambios en la apariencia de las fases acuosa y orgánica relacionados con la presencia del compuesto deseado en ellas. Finalmente, el hexapéptido **48** se transformó en **CP6e** con un 37% de rendimiento.

La sencillez en el número de señales del espectro ^{1}H RMN de **CP6e** (Figura 131) confirman su simetría, ya que solo se aprecian las señales del dipéptido básico, en el que el doblete a 8.33 ppm corresponde a los NH de las amidas involucradas en enlaces de hidrógeno y por tanto se corresponden con el dímero **D6e**. Además, el espectro de FITR muestra la banda de tensión del enlace N-H a 3288 cm^{-1}, lo que se relaciona con su involucración en enlaces de hidrógeno fuertes. Las bandas a 1621 y 1532 cm^{-1} también se correlacionan con las amidas I y II de una estructura tipo lámina β antiparalela.

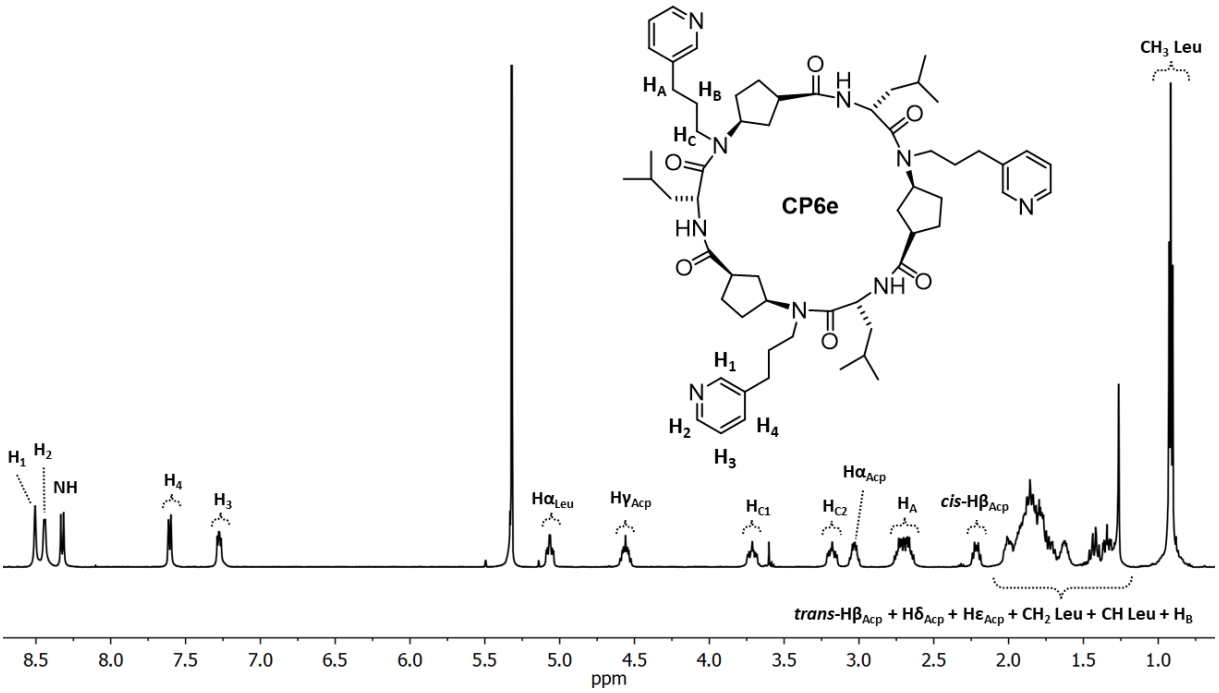


Figura 131. Asignación de señales en el espectro de ^{1}H RMN de **CP6e** (5 mM en CD_2Cl_2).

6.2.5 Síntesis de CP7b

Como se ha comentado previamente, cuando abordamos la idea de preparar un CP que contuviese tres anillos de imidazol en su estructura, decidimos hacerlo utilizando **CP5** como precursor (Figura 128). Principalmente por dos motivos, la síntesis de **CP5** estaba muy optimizada y además este péptido daba buenos resultados cuando se sometía a los acoplamientos de Sonogashira con piridinas. El principal desafío en la síntesis de **CP7b** era encontrar un grupo protector para el 4-iodo-1*H*-imidazol que nos permitiese llevar a cabo el acoplamiento satisfactoriamente, y que luego pudiera ser retirado fácilmente. Se conoce que las reacciones *cross-coupling* sobre el anillo de imidazol están notablemente influidas por las

propiedades electrónicas del mismo.[546] Sin embargo, no hay una tendencia claramente establecida sobre qué grupos protectores favorecen el acoplamiento en caso de la reacción de Sonogashira, sino que los resultados varían enormemente dependiendo de los sustratos.[547] En un estudio de Sandtorv y Bjørsvik, se obtuvieron muy buenos rendimientos para el acoplamiento entre una librería de alquinos de pequeño tamaño y el 4-iodo-1-tosilimidazol.[548] Sin embargo, la desprotección de este grupo requiere condiciones severas como el tratamiento con Li o Na en amoniaco, reactivos de transferencia de un electrón como Na-Hg, agentes reductores como L-Selectride o Red-Al, fotólisis, etc. [549] Otras metodologías involucran el uso del reactivo de Gilman $PhMe_2SiLi$ en condiciones fuertemente básicas, a altas temperaturas.[550] También se ha empleado TBAF en THF a reflujo,[551] Mg-MeoH,[552] ácido triglicólico/LiOH[553] o superóxidos en microondas.[554] La ausencia de una metodología en condiciones suaves nos disuadió de recurrir a este grupo protector inicialmente.

Comenzamos estudiando el 4-iodo-1*H*-imidazol y su derivado *N*-metilado frente a la reacción de Sonogashira con **CP5**, pero ninguno de estos intentos no dio lugar al producto deseado (Figura 132, arriba). A continuación, nos decantamos por incorporar un grupo protector con carácter electroatractor similar al tosilo, como el nosilo. Por ello preparamos el 4-iodo-1-nosilimidazol (**49**) por tratamiento del 4-iodo-1*H*-imidazol con cloruro de nosilo en THF:Et_3N. Dado el costo sintético que supone la preparación de **CP5**, decidimos estudiar estos acoplamientos sobre un modelo más sencillo como el dipéptido propargilado **53**, similar a **40** (Figura 130), pero con un γ-Ach en lugar de γ-Acp. El motivo de esta selección obedece puramente a un motivo logístico, ya que en el momento de optimización de esta síntesis disponíamos del derivado de Ach, y dada la similitud en cuanto a reactividad entre ambos, continuamos adelante con este modelo. Por ello, el modelo fue el dipéptido **53** que debería prepararse a partir del aminoácido **Ns-*propargil*N-*L*-Ach-OMe** (**52**). Escogimos el dipéptido **53** y no el aminoácido **52** porque, en el caso de que el acoplamiento diese lugar al producto deseado, no podríamos desproteger selectivamente el nosilo sobre el grupo amino del Ach sin afectar también al de imidazol. El acoplamiento entre **53** y **49** no dio lugar al producto de reacción, y tampoco se pudo recuperar el dipéptido de partida (Figura 132, abajo). Optamos entonces evaluar un grupo protector electrodador como el trimetilsililetoximetilo (SEM) que ya se había utilizado exitosamente en acoplamientos de Sonogashira y otras reacciones *cross-coupling* con el 4-iodo-1-SEM-imidazol (**50**) con éxito.[546] Sin embargo, en esta ocasión tampoco fue posible apreciar la formación del producto de acoplamiento (Figura 132, abajo).

[546] Schnürch, M.; Flasik, R.; Khan, A. F.; Spina, M.; Mihovilovic, M. D.; Stanetty, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 33283-3307.
[547] a) Das, A. *Synth. Commun.* **2017**, *47*, 2254–2267. b) Cliff, M. D.; Pyne, S. G. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13703-13712. b) Koubachi, J.; El Kazzouli, S.; Bousmina, M.; Guillaumet, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 5119-5138. c) Lindel, T.; Hochgürtel, M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2806-2809. d) Zhao, Z.; Peng, Y.; Dalley, N. K.; Cannon, J. F.; Peterson, M. A. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3621-3624.
[548] Sandtorv, A. H.; Bjørsvik, H. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 4658-4666.
[549] Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, USA, **2006**.
[550] Garg, N. K.; Sarpong, R.; Stoltz, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13179-13184.
[551] Witulski, B.; Alayrac, C. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3281-3284.
[552] Nyasse, B.; Grehn, L.; Ragnarsson, U. *Chem. Commun.* **1997**, 1017-1018.
[553] Haskins, C. M.; Knight, D. W. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 509-601.
[554] Raghuvanshi, R. S.; Yadav, V. P.; Singh, V. K. *Curr. Microw. Chem.* **2017**, *4*, 128-130.

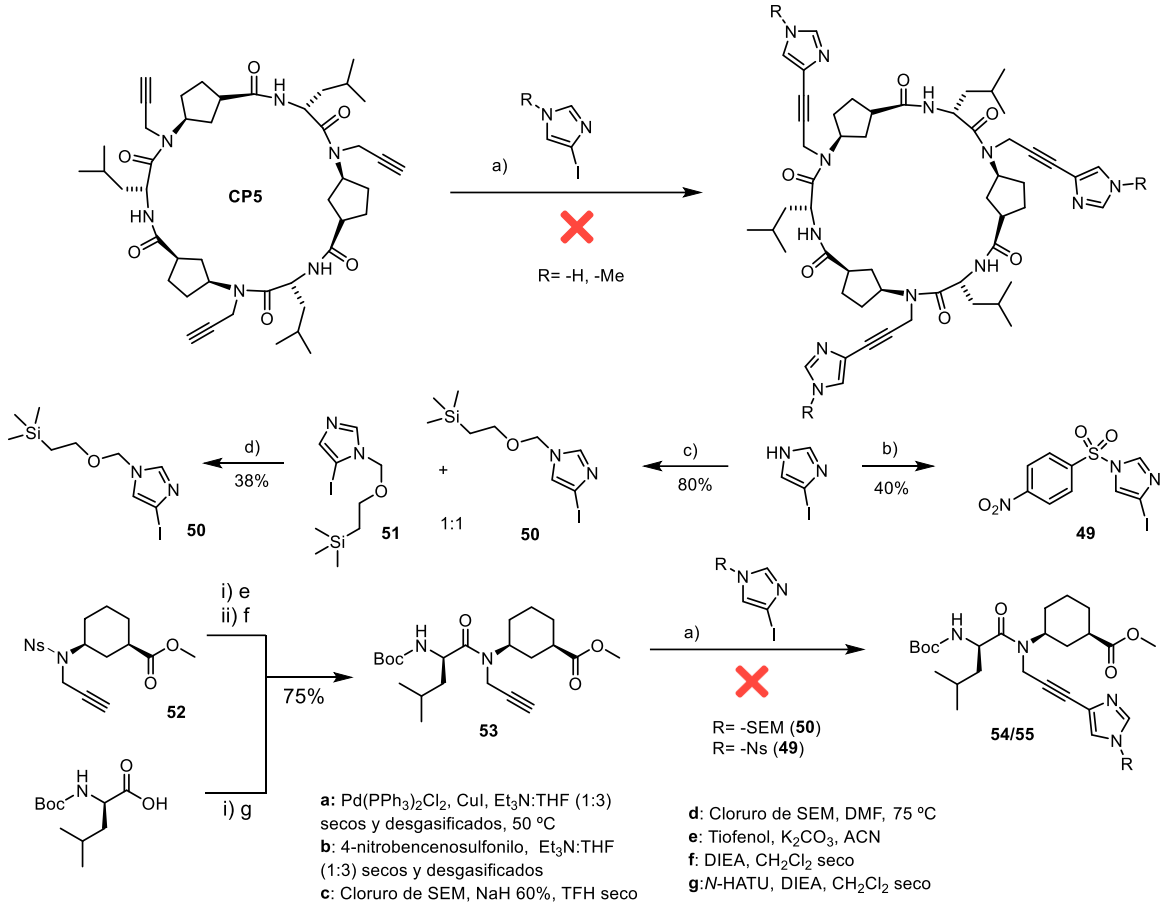


Figura 132. Ensayos en el acoplamiento de Sonogashira utilizando como fuente de halogenuro el 4-iodo-1*H*-imidazol y sus derivados 1-metil, 1-nosil y 1-SEM-imidazoles.

Tras estos intentos, decidimos retomar el acoplamiento de **52** con el 4-iodo-1-tosil-imidazol, que para nuestra satisfacción condujo al producto deseado **57** con un 57% de rendimiento (Figura 133). Este resultado nos animó a buscar unas condiciones para eliminar el grupo tosilo de manera satisfactoria. Comenzamos por el tratamiento con Na/naftaleno en TFH a -78 °C, que se ha empleado para eliminar satisfactoriamente el grupo tosilo de otros heterociclos.[555] Esta reacción transcurre a través de un mecanismo de transferencia de un electrón del naftalenuro de sodio al sustrato, formándose una especie anión radical, que transfiere un segundo electrón al sustrato.[556] Desafortunadamente, cuando la especie **57** se sometió a estas condiciones de reacción, no se observó la formación del producto desprotegido **58**. Decidimos intentar llevar a cabo esta reacción con el aminoácido **57** acoplado a la Boc-*D*-Leu-OH, para comprobar que no era el grupo nosilo sobre la amina el que dificultaba el curso de la reacción. Para ello se procedió a deproteger el grupo nosilo mediante el tratamiento con tiofenol. Sorprendentemente, observamos que el producto formado era aquel donde tanto nosilo como tosilo habían sido desprotegidos dando lugar a la especie **59** con un 50% de

[555] a) Reddy, B. V. S.; Chaya, D. N.; Yadav, J. S.; Grée, R. *Synthesis* **2012**, 297-303. b) Marti, C.; Carreira, E. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2209-2219. c) Seath, C. P.; Fyfe, J. W. B.; Molloy, J. J.; Watson, A. J. B. *Synthesis* **2017**, *49*, 891-898.

[556] a) Letsinger, R. L.; Finnan, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 7197-7198. b) Lewandowska, E.; Neschadimenko, V.; Wnuk, S. F.; Robins, M. J. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6295-6302.

rendimiento. Esto significaba que el tiofenol actuaba como nucleófilo sobre el anillo aromático de ambas sulfonamidas, tanto sobre el anillo más pobre en electrones del nosilo, como sobre el más rico en electrones del tosilo.

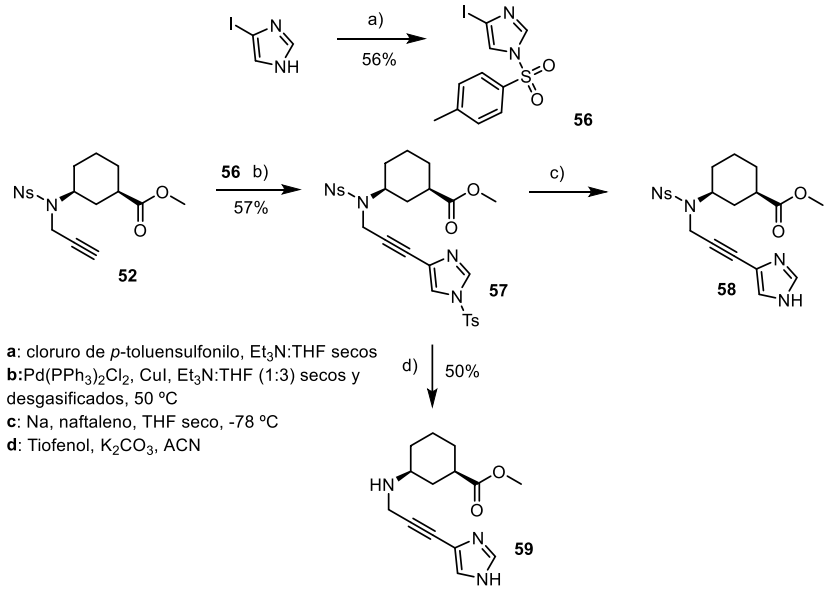


Figura 133. Acoplamiento de Sonogashira utilizando como fuente de halogenuro el 4-iodo-1-tosil-imidazol.

Posteriormente, iniciamos un pequeño estudio recurriendo a otros tiofenoles con sustituyentes dadores de electrones, ya que son mejores candidatos para esta desprotección por ser mejores nucleófilos (Figura 134A). Para no incurrir en interferencias en el rendimiento por la necesidad de desproteger dos grupos (nosilo y tosilo), llevamos a cabo esta evaluación sobre el dipéptido **60**. Esta especie se obtuvo a través del acoplamiento de Sonogashira entre **53** y el 4-iodo-1-tosil-imidazol, dando lugar a **60** en un 80% de rendimiento. Posteriormente, comenzamos a estudiar la etapa de desprotección con este modelo. Usando el tiofenol, no logramos mejores resultados de los que ya habíamos observado previamente, tampoco con el 2-aminotiofenol ni con el 2-mercaptobencilalcohol. Sin embargo, el tratamiento con 4-metoxitiofenol dio lugar al producto deseado con un 80% de rendimiento.

Disponíamos, por tanto, ya de una metodología que permite llevar a cabo las reacciones de acoplamiento y posterior desprotección con rendimientos sintéticamente útiles, por lo que abordamos la síntesis del CP. A continuación, procedimos a implementar estar condiciones modelo sobre nuestro objetivo principal (Figura 134B). El acoplamiento de Sonogashira entre **CP5** y el 4-iodo-1-tosil-imidazol, dio como resultado **CP7a** con un 44% de rendimiento tras realizar unas pequeñas optimizaciones en la temperatura, disolvente y número de equivalentes de halogenuro. La posterior desprotección con 4-metoxitiofenol condujo al péptido objetivo **CP7b** con un 50% de rendimiento. **CP7b** no es soluble en los disolventes orgánicos típicamente utilizados para la purificación en columna o por HPLC en fase normal (CH_2Cl_2, $CHCl_3$, acetato de etilo, hexano…). Dado que la desprotección de **CP7a** se produce de manera completa, y no queda en el crudo de reacción ningún subproducto derivado de este, escogimos la cromatografía de exclusión de tamaños con Sefadex LH-20, que nos permitió separar **CP7b** de los subproductos aromáticos de pequeño tamaño derivados de la eliminación del tosilo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

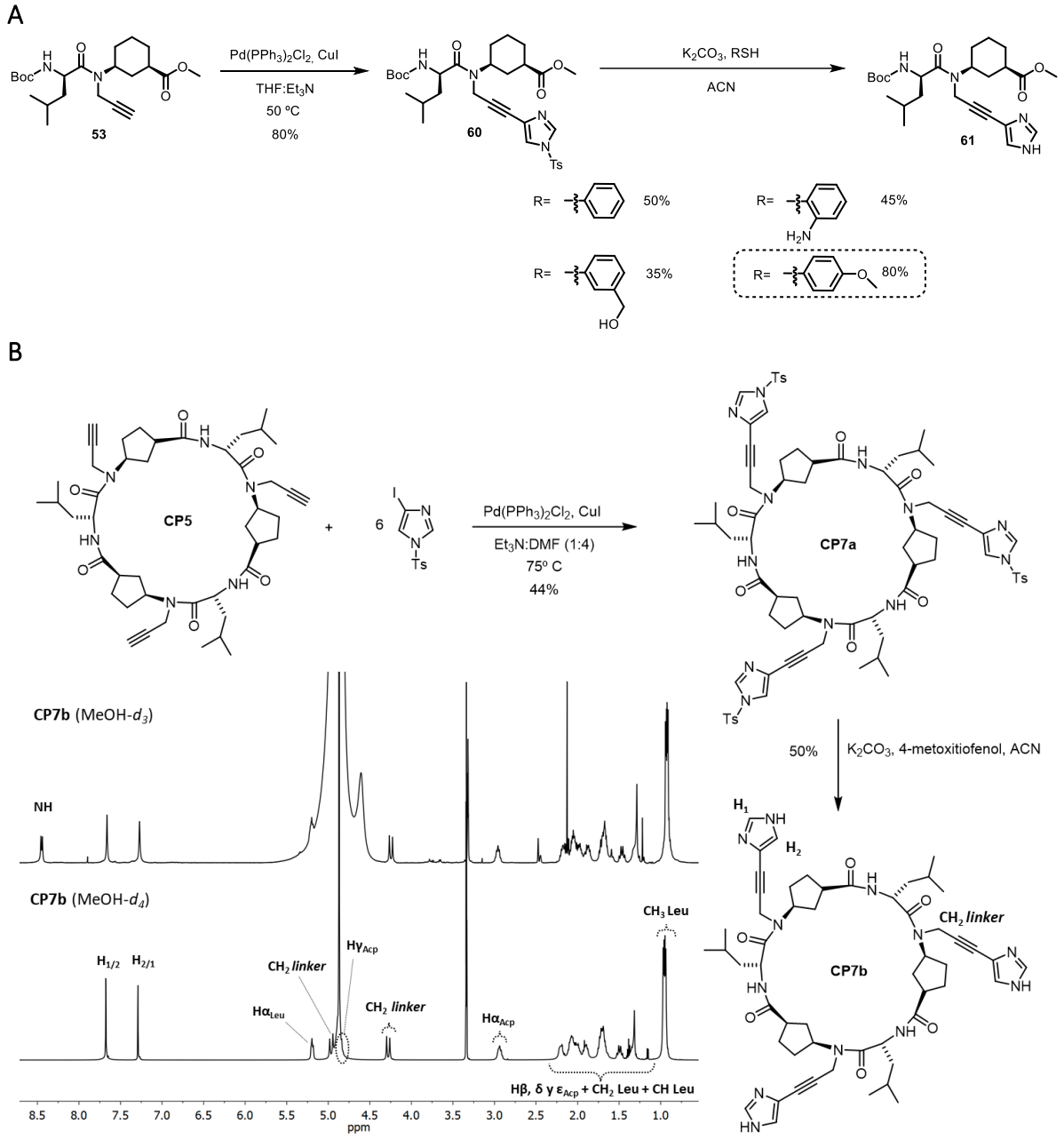


Figura 134. A) Optimización de la desprotección de tosilo con tiofenoles; B) Síntesis de **CP7b** a partir de **CP5** y espectro de ^{1}H RMN con la correspondiente asignación de las señales más relevantes.

Sobre la capacidad de **CP7b** para autoensamblarse, a la luz del desplazamiento químico del NH (8.5 ppm), no se puede asegurar que se forme la especie **D7b**, ya que el espectro se realizó en metanol, que compite por los enlaces de hidrógeno. De todas formas, el fuerte desplazamiento químico de la señal del protón de la amida sugiere que podría tratarse de la especie dimérica. En la tercera parte de los resultados de esta tesis, se muestra el caso de **CP12**, que no es capaz de formar homodímeros, pero su espectro de ^{1}H RMN en DMSO-d_6 muestra la señal para el NH a 7.7 ppm (Figura 184). Esto se debe a que las moléculas del disolvente se encuentran formando enlaces de hidrógeno con los NH amídicos del CP. Sin embargo, para el caso de **CP7b**, en su espectro de FTIR sí podemos observar la banda para la tensión N-H a 3291 cm^{-1}, típicamente asociada con enlaces de hidrógeno, así como las bandas para las amidas I y II a 1627 y 1538 cm^{-1}, respectivamente, indicativas de la estructura hoja β antiparalela.

6.2.6 Actividad esterasa de CP7b

La actividad de la anhidrasa carbónica se basa en un mecanismo general de catálisis básica.[557] Es por ello que típicamente se utiliza el ensayo de hidrólisis del *p*-nitrofenilacetato (*p*-NPA) para evaluar la actividad de una molécula o estructura que pretende imitar a esta enzima.[558] Normalmente se suele seguir la hidrólisis del *p*-NPA por el incremento de la banda a 400 nm en el espectro de UV-Vis de la muestra, que le da el color amarillo al *p*-NP.[328] Sin embargo, este experimento se lleva a cabo en medio acuoso, en el cual **CP7b** no es soluble. Por ello decidimos modificar el tipo de ensayo para adecuarlo a nuestros estudios (Figura 135A). Se preparó un tubo de RMN con **CP7b** en una mezcla MeOD-d_4:D_2O en proporción 3:1. Además, la parte acuosa consistía en una disolución reguladora de PBS deuterado, que se preparó disolviendo la cantidad necesaria de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 en D_2O, a pH 7.4.[324a] Tras registrar el espectro de ^{1}H RMN de **CP7b** en estas condiciones, se adicionó 1 equivalente de $ZnCl_2$ para promover la formación del complejo **CP7b·ZnCl$_2$**. Inmediatamente, se observó la desaparición de la mayoría de las señales del péptido, y las que no desaparecieron se mostraban anchas (2-0.5 ppm). Posteriormente se adicionaron 6 equivalentes de *p*-NPA, el cual es moderadamente soluble en MeOH e insoluble en H_2O, por lo que la concentración final de sustrato se escogió teniendo en cuenta esta limitación. El espectro de ^{1}H RMN de la muestra se volvió a registrar inmediatamente tras la adición de *p*-NPA, observándose principalmente las señales de este (en gris), aunque también se aprecia una pequeña proporción del producto de hidrólisis, el *p*-NP (en amarillo). Con el paso de las horas, las señales atribuidas al *p*-NP van aumentando su intensidad, en detrimento de aquellas pertenecientes al *p*-NPA. Paralelamente, se hizo un experimento control con otra muestra que solo contenía *p*-NPA y $ZnCl_2$ (Figura 135B) en las mismas condiciones descritas anteriormente. Con el paso del tiempo, el *p*-NPA de la muestra control, que no contenía **CP7b**, no se hidrolizó.

Por tanto, se puede concluir que el péptido *tris*-imidazólico **CP7b** facilita la hidrólisis del *p*-NPA, y que, por tanto, imita moderadamente el papel de anhidrasa carbónica, en cuando a su actividad esterasa. Este estudio nos aporta un prometedor dato preliminar, que seguiremos estudiando próximamente. Nos planteamos optimizar las condiciones para poder evaluar la actividad de **CP7b** de la manera más eficiente posible. Una posibilidad que barajamos actualmente es diseñar un experimento combinado en el que el sustrato de la hidrólisis se encuentre encapsulado en liposomas.[559] Esperamos que el carácter anfifílico de **CP7b**, permita su permeación a través de la membrana lipídica de manera efectiva, y así poder estudiar la hidrólisis del sustrato encapsulado, junto con sus posibles propiedades transportadoras de iones. Hasta la fecha no ha sido posible realizar estas indagaciones, debido al límite de tiempo en el desarrollo de este trabajo. Por otra parte, también nos planteamos evaluar la capacidad de **CP7b** para transportar HCO_3^-, por similitud estructural con la prodigiosina (Figura 63), que es capaz de transportar este anión a través de la membrana lipídica mediante la interacción simultánea del anión con los tres protones de los pirroles.[602a] En la tercera parte de los

[557] a) Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 22339-2314. b) Silverman, D. N.; Lindskog, S. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 30-36.

[558] a) Pocker, Y.; Stone, J. T. *Biochemistry* **1967**, *6*, 668-678. b) Xie, D.; Zhou, Y.; Xu, D.; Guo, H. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2093-2095. c) Martin, D. P.; Cohen, S. M. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5259-5261.

[559] Zhao, Y.; Gao, S.; Song, D.; Ye, Z.; Xu, R.; Luo, Y.; Xu, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 551-559.

resultados de esta tesis se discute sobre las diferentes metodologías disponibles para el estudio del transporte de HCO_3^-, y aparecen además ilustradas en la Figura 173.

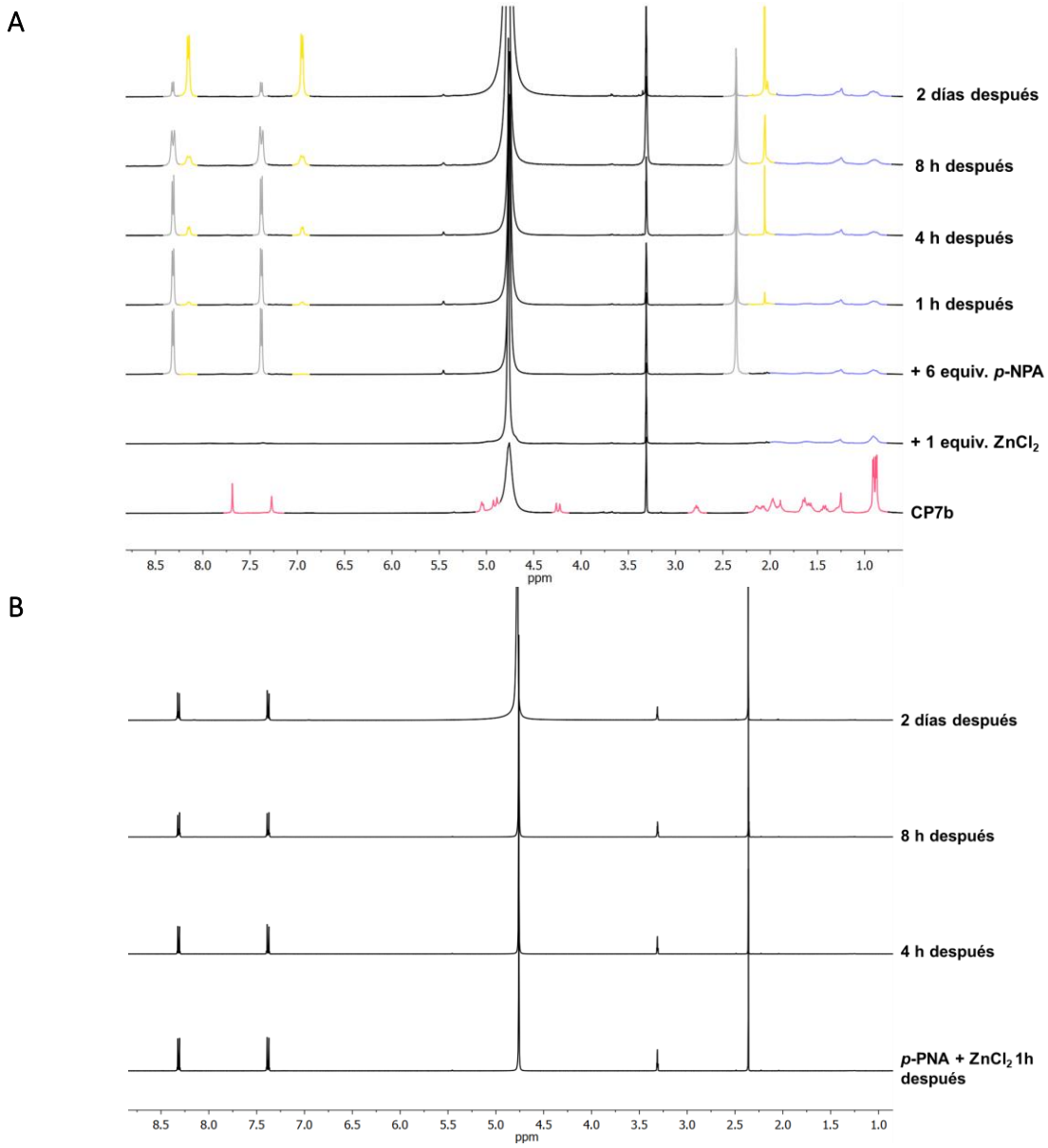


Figura 135. Seguimiento de la hidrólisis del *p*-NPA (30 mM en MeOH-d_4: D_2O (3:1)) mediante cambios en su espectro de ^{1}H RMN A) en presencia de **CP7b** (5 mM) y $ZnCl_2$ (5 mM) y B) en presencia de $ZnCl_2$ (5 mM), pero ausencia de **CP7b**.

6.2.7 Estudios de coordinación con CP6e

En cuanto a **CP6e**, dada la flexibilidad del conector entre el esqueleto peptídico y el anillo de piridina, decidimos comenzar por evaluar su capacidad para participar en la formación de complejos de simetría octaédrica. Nos inspiramos en los trabajos de Nitscke, ilustrados en la introducción de esta tesis (sección 3.5), donde emplea metales de coordinación octaédrica para ocupar los vértices de cajas de coordinación de diferentes geometrías (Figura 20Figura 21). Nuestra idea es promover la formación de una serie de complejos donde el metal se coordine simultáneamente a las tres piridinas de **CP6e** y a una molécula de bipiridina, que por su tamaño

se coordinará preferentemente por la cara externa del dímero, al no ser capaz de adentrarse en la cavidad de **CP6e**. Por último, un diácido lineal y de pequeño tamaño podría ocupar la cavidad peptídica al completar la esfera de coordinación del metal.

Comenzamos por estudiar la respuesta de **CP6e** frente a la adición de Co^{II} y Cu^{II}. En muestras separadas, se llevó a cabo la adición de un equivalente del cloruro correspondiente sobre una disolución de **CP6e** y, posteriormente, un equivalente de 2,2'-bipiridina se adicionó también a cada muestra, siguieron los cambios en el espectro ^{1}H RMN de las mismas. La adición de $CoCl_2$ sobre **CP6e** (Figura 136A) produjo la desaparición de las señales del anillo de bipiridina, y también de aquellas correspondientes a la cadena propílica que actúa de conector. Esto sugiere la coordinación de los heterociclos con un metal paramagnético como el Co(II).[560] Los protones $H\alpha_{Leu}$ y $H\gamma_{Acp}$ sufren desplazamiento a campo alto, de 5.06 a 4.27 ppm, y de 4.55 a 3.92 ppm, respectivamente. Los protones amídicos también se desplazaron a campo alto (de 8.83 a 7.86 ppm). La posterior adición de un equivalente de bipiridina provocó que los protones $H\alpha_{Leu}$ y $H\gamma_{Acp}$ se desplazasen nuevamente a campo bajo, así como los NHs (8.07 ppm). En la zona aromática no apareció ninguna nueva señal que se pudiera asignar a la bipiridina adicionada. Sin embargo, un conjunto de señales anchas aparece entre 2.9-3.4 ppm, y también a 2.6 y 6.5 ppm. En el espectro de TOCSY RMN de la muestra, este grupo de señales no muestra correlación con ninguna otra ni entre sí. Estas señales podrían pertenecer a la molécula de bipiridina formando parte de un complejo junto con **CP6e** y Co^{II}. Simultáneamente se llevó a cabo un experimento de control donde se adicionó $CoCl_2$ sobre un tubo que solo contenía bipiridina, lo que provocó la desaparición de todas las señales aromáticas. Atendiendo a cambios de coloración (Figura 136B), mientras que el tubo donde se llevó a cabo el experimento con **CP6e** presentaba un color azul intenso y sin precipitado, aquel que solo contenía $CoCl_2$ y la bipiridina quedó completamente transparente, con un precipitado ligeramente azul en el fondo. Por su parte, la disolución *stock* de $CoCl_2$ era de color morado.

En el caso de $CuCl_2$, la presencia de esta sal también hizo desaparecer las señales de los anillos de piridina de **CP6e** (Figura 136C), así como los protones H_C y H_A de la cadena propílica (ver asignaciones de **CP6e** en la Figura 131). Las señales de los NH, $H\alpha_{Leu}$, $H\gamma_{Acp}$ y $H\alpha_{Acp}$ se desplazan a campo bajo, justo al contrario de lo que se observaba con $CoCl_2$. Cuando se añadió un equivalente de bipiridina sobre esta muestra, los NH se desplazaron esta vez a campo alto. A su vez, aparecieron dos nuevas señales en la zona aromática, una bastante definida 7.73 ppm y otra más ancha a 10.41 ppm. En el espectro TOCSY, ninguna de estas señales mostró correlación con otra. Además, las señales para los $H\alpha_{Leu}$, $H\gamma_{Acp}$ y $H\alpha_{Acp}$ recuperaban su desplazamiento químico original (antes de la adición de $CuCl_2$), así como H_C y H_A que aparecen de nuevo en el espectro. En cuanto a los cambios de color observados (Figura 136D), la muestra que contiene **CP6e** tenía un color azul claro y un precipitado color turquesa en el fondo. La muestra que solo contiene $CuCl_2$ y bipiridina queda turbia, y se forma un precipitado de un color azul más claro y abundante que en aquella que contiene además **CP6e**.

[560] a) Pradhan, R. N.; Chakraborty, S.; Bharti, P.; Kumar, J.; Ghosh, A.; Singh, A. K. *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 8899-8910. b) Epperson, J. D.; Ming, L. J.; Woosley, B. D.; Baker, G. R.; Newkome, G. R. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 4498-4502. c) Tsitovich, P. B.; Cox, J. M.; Benedict, J. B.; Morrow, J. R. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 700-716.

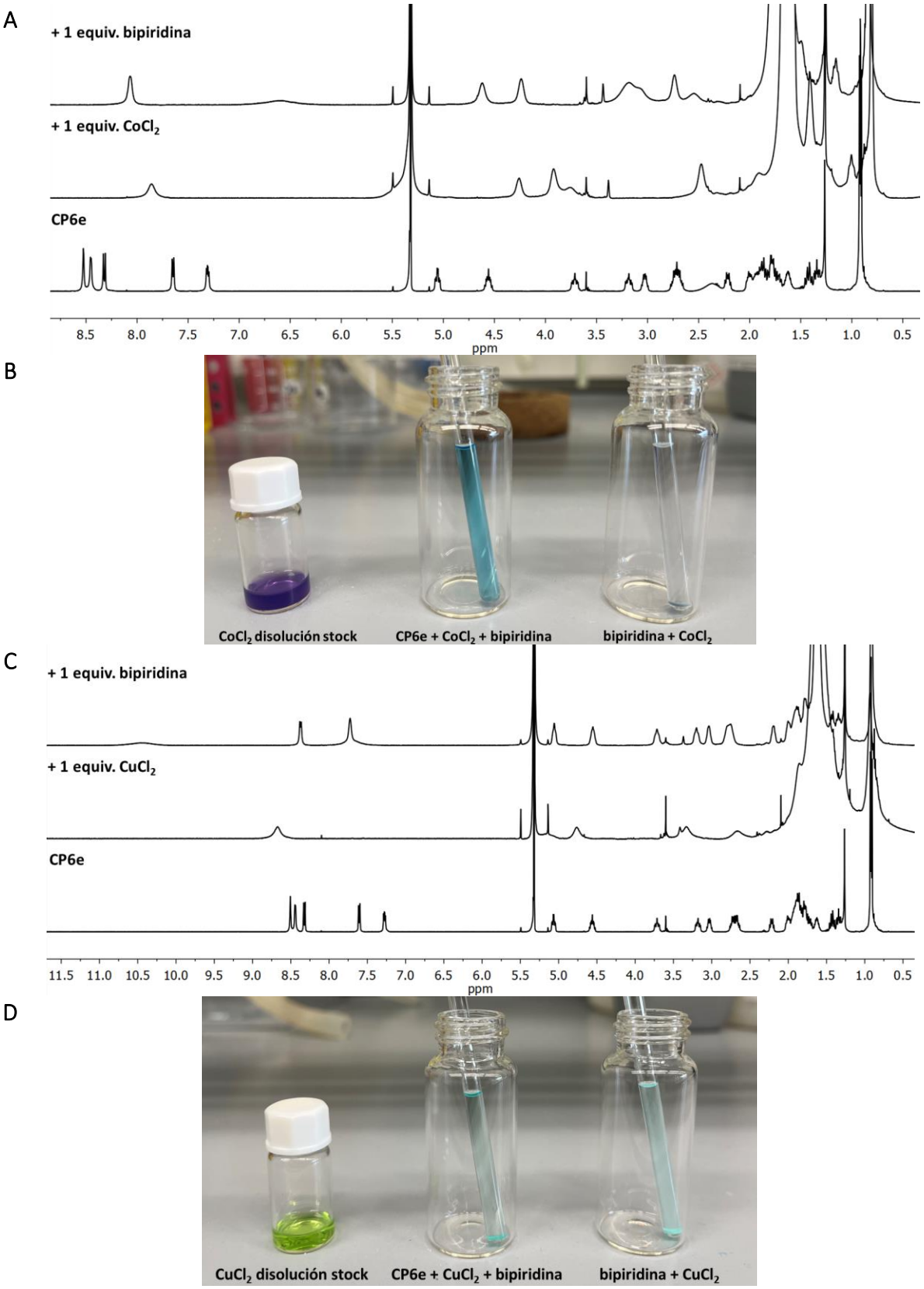


Figura 136. Cambios observados en el espectro de ^{1}H RMN de **CP6e** (5 mM, CD_2Cl_2) tras la adición de $CoCl_2$ (A) y $CuCl_2$ (C) y la consecutiva adición de bipiridina. B) y D) representan los cambios en la coloración de las muestras para ambos casos. Las disoluciones stock de $CoCl_2$ y $CuCl_2$ se prepararon en MeOH-d_3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tanto en presencia de Co^{II} como Cu^{II}, parece que **CP6e/D6e** se compleja con estos iones mtálicos a través de sus piridinas. Además, las diferencias observadas en el espectro tras la adición de la bipiridina, junto con la diferencia en apariencia de las disoluciones sin y con **CP6e/D6e**, nos hace pensar que la molécula de bipiridina también participa en la formación de estos complejos. Es por ello que, al día siguiente de la realización de este experimento, se adicionó sobre ambas muestras un equivalente de ácido acetilenodicarboxílico (ADC). Esta molécula, lineal, pequeña y bidentada, podría acomodarse en el interior de **D6e** para coordinarse a ambos centros metálicos (en caso de que hubiese un centro metálico por cada **CP6e**) de manera simultánea, completando así la esfera de coordinación octaédrica del metal.

La adición de 1 equivalente de ADC sobre la muestra que contenía **CP6e**, $CoCl_2$ y bipiridina, provocó un desplazamiento a campo bajo de la señal perteneciente a los protones NH, de 8.08 a 8.27 ppm (Figura 137A). La señal ancha que aparecía a 6.05 ppm, se desplaza hasta 7.02 ppm. Además, aparece una señal estrecha a 3.39 ppm. Por otra parte, las señales a 2.76 ppm (*cis*-Hβ Acp) y 2.61 ppm (sin asignar) se desplazan ligeramente a campo bajo, solapándose una con la otra. El análisis por espectrometría de masas ESI de esta muestra nos permitió detectar la masa exacta correspondiente al complejo **[D6e·CoCl]⁺** (2153.2579 m/z), **[CP6e·CoCl]⁺** (1123.5802 m/z), **[CP6e·CoCl·ADC]⁺** (1237.5762 m/z) y también la de **[ADC⊂D6e·CoCl·bipiridina]⁺** (2422.3164 m/z).

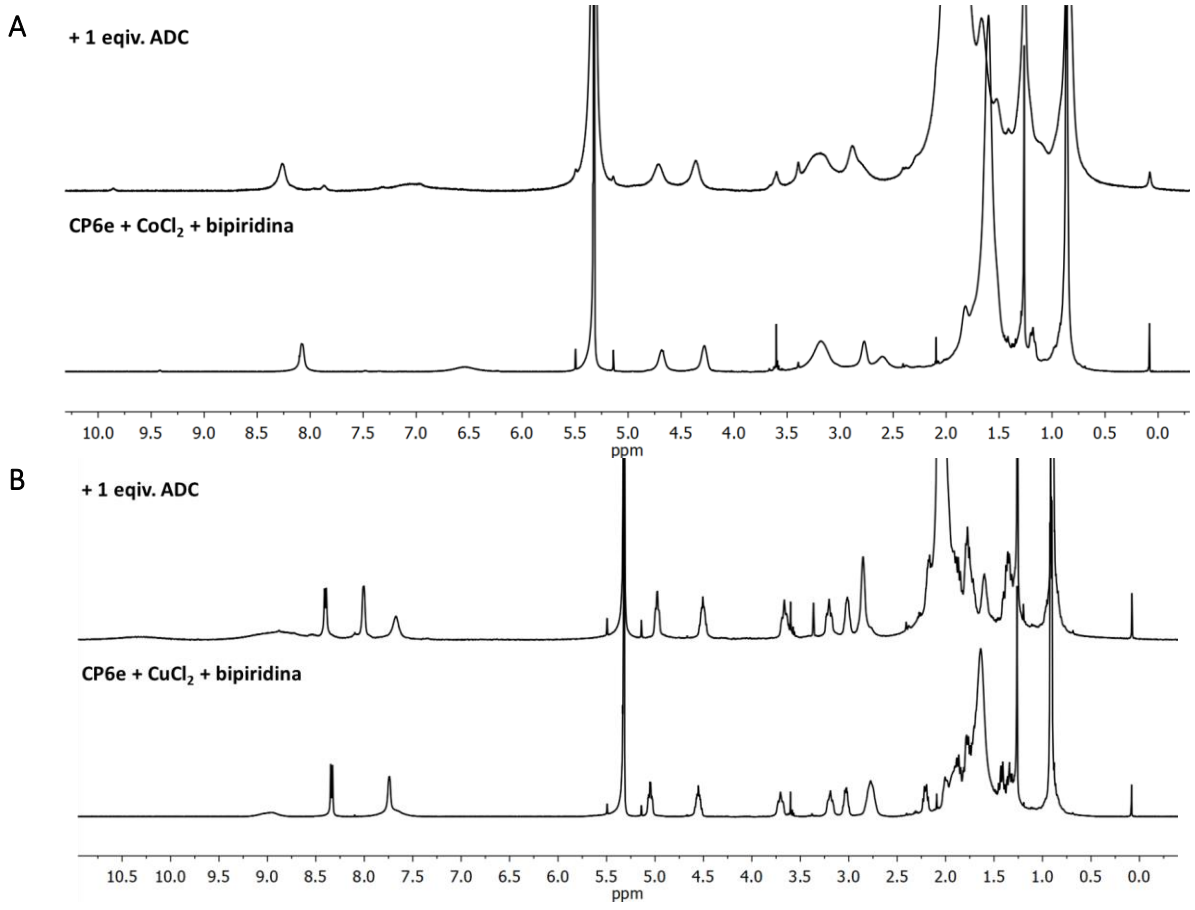


Figura 137. Adición de ácido acetilenodicarboxílico (ADC) sobre A) la muestra que contiene **CP6e**, $CoCl_2$ y bipiridina y B) la muestra que contiene **CP6e**, $CuCl_2$ y bipiridina.

Por otra parte, la adición de 1 equivalente de ADC sobre la muestra que contenía **CP6e**, $CuCl_2$ y bipiridina también provocó cambios notables en el espectro de ^1H RMN (Figura 137B). Antes de la adición, en torno a 7.7 ppm aparecían dos señales superpuestas, un singlete estrecho que queda sobre otra señal más ancha. Tras la adición de ADC, este singlete se desapantalla hasta 8.0 ppm, mientras que la otra señal no cambia su desplazamiento químico, aunque aparece más definida. La señal que aparecía a 2.78 ppm, de los H_A, se desplazó ligeramente a campo bajo, además de aparecer más afilada. El análisis por espectrometría de masas ESI de esta muestra nos permitió detectar la masa exacta correspondiente a las especies **[D6e·CuCl]⁺** (2157.2521 m/z), **[D6e·CuCl·bipi]⁺** (2313.3187 m/z), **[CP6e·CuCl]⁺** (1127.5736 m/z) y **[ADC·CP6e·CuCl]⁺** (1241.5732 m/z). Todos estos resultados sugieren la formación de una nueva especie en la que los iones metálicos Co^{II} y Cu^{II} forman un complejo con **D6e**. Las posteriores adiciones provocan cambios estructurales que sugieren que también se coordinan con la bipiridina y/o el diácido (Figura 138). Sin embargo, nuevos estudios y más concluyentes se deben realizar para demostrar la formación de este tipo de especies.

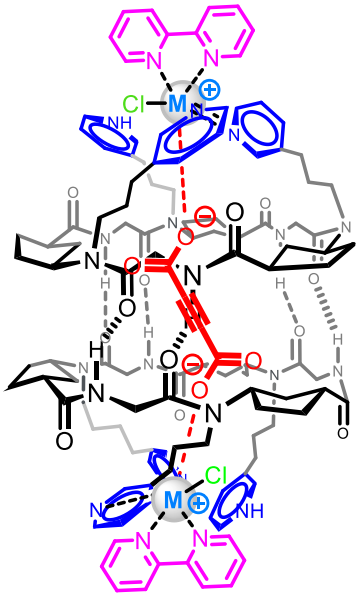


Figura 138. Propuesta de la estructura formada tras la adición de $CoCl_2$ o $CuCl_2$ sobre **CP6e**, con la consecutiva adición de bipiridina y ADC.

También se llevaron a cabo experimentos similares con $FeCl_2{\cdot}4H_2O$ y con $MnCl_2{\cdot}4H_2O$. La adición de 1 equivalente de $FeCl_2{\cdot}4H_2O$ sobre la disolución de **D6e** también provocó la desaparición de las señales de la piridina y un ensanchamiento generalizado del resto de señales (Figura 139A). Sin embargo, el desplazamiento químico del protón amídico no se vio alterado, aunque sí se apantallaron ligeramente las señales de $H\alpha_{Leu}$ y $H\gamma_{Acp}$, al igual que sucedía con la adición de $CoCl_2$. En el espectro también se observa la aparición de una nueva señal ancha a 10.9 ppm y de otras a 5.6 y 3.5 ppm. Cuando posteriormente se adicionó 1 equivalente de la bipiridina, la señal de los NHs permaneció inalterada, pero se solapa con otra señal más ancha, que podría ser la que aparecía previamente a 10.9 ppm. Las señales del resto del espectro parecen haber vuelto a su desplazamiento químico original, exceptuando la que resuena a 3.42 ppm, que no aparecía en el espectro de **CP6e**. Horas más tarde a la realización de este experimento, se volvió a registrar el espectro de ^1H MRN, ya que pretendíamos medir el TOCSY RMN de la muestra. Para nuestra sorpresa, el espectro registrado era muy similar al de **CP6e** previa adición de $FeCl_2{\cdot}4H_2O$. Se pudieron ver de nuevo las señales pertenecientes al

anillo de piridina de **CP6e** y al resto de su esqueleto, prácticamente inalterado con respecto al espectro original del péptido, a excepción de la anchura de las señales. El espectro de TOCSY confirmó esta similitud. En cuanto a los cambios de color percibidos en la muestra, la adición de $FeCl_2{\cdot}4H_2O$ sobre **CP6e** hizo que la disolución de **CP6e** cambiase de incolora a ligeramente amarilla. La posterior adición de bipiridina sobre esa disolución provocó un cambio de color al rojo intenso. Un par de horas más tarde, un sólido rojo se había depositado en el fondo del tubo, mientras y el color de la disolución se volvía mucho más tenue (Figura 139B). Por otro lado, en la muestra control de $FeCl_2{\cdot}4H_2O$ con bipiridina también se formó un precipitado rojo, aunque la disolución tenía un color más intenso que aquella que contiene **CP6e**. Cuando se adicionó ADC sobre la muestra, la señal ancha a 8.6 ppm, que encubre a H_1 y H_2 del anillo de piridina, parece desdoblarse. Al mismo tiempo, la señal de los protones NH se desapantalla ligeramente (de 8.33 a 8.38 ppm), aunque el cambio es mucho más notable para las señales que aparecen a 7.67 (H_4) y 7.37 (H_3) ppm, que se desplazan a 8.03 y 7.76 ppm, respectivamente. Un comportamiento similar sufren los protones H_A de la cadena propílica, cuya señal se mueve de 2.73 a 2.88 ppm. Contrariamente, las señales de los $H\alpha_{Leu}$ y $H\gamma_{Acp}$ sufren un ligero desplazamiento a campo alto. En este caso, el análisis de la muestra por ESI nos permitió detectar la masa correspondiente a las especies **[CP6e]⁺** (1030.6901 m/z) y **[D6e]⁺** (2061.3652 m/z), pero no pudimos confirmar la presencia de ningún complejo entre el péptido y el metal.

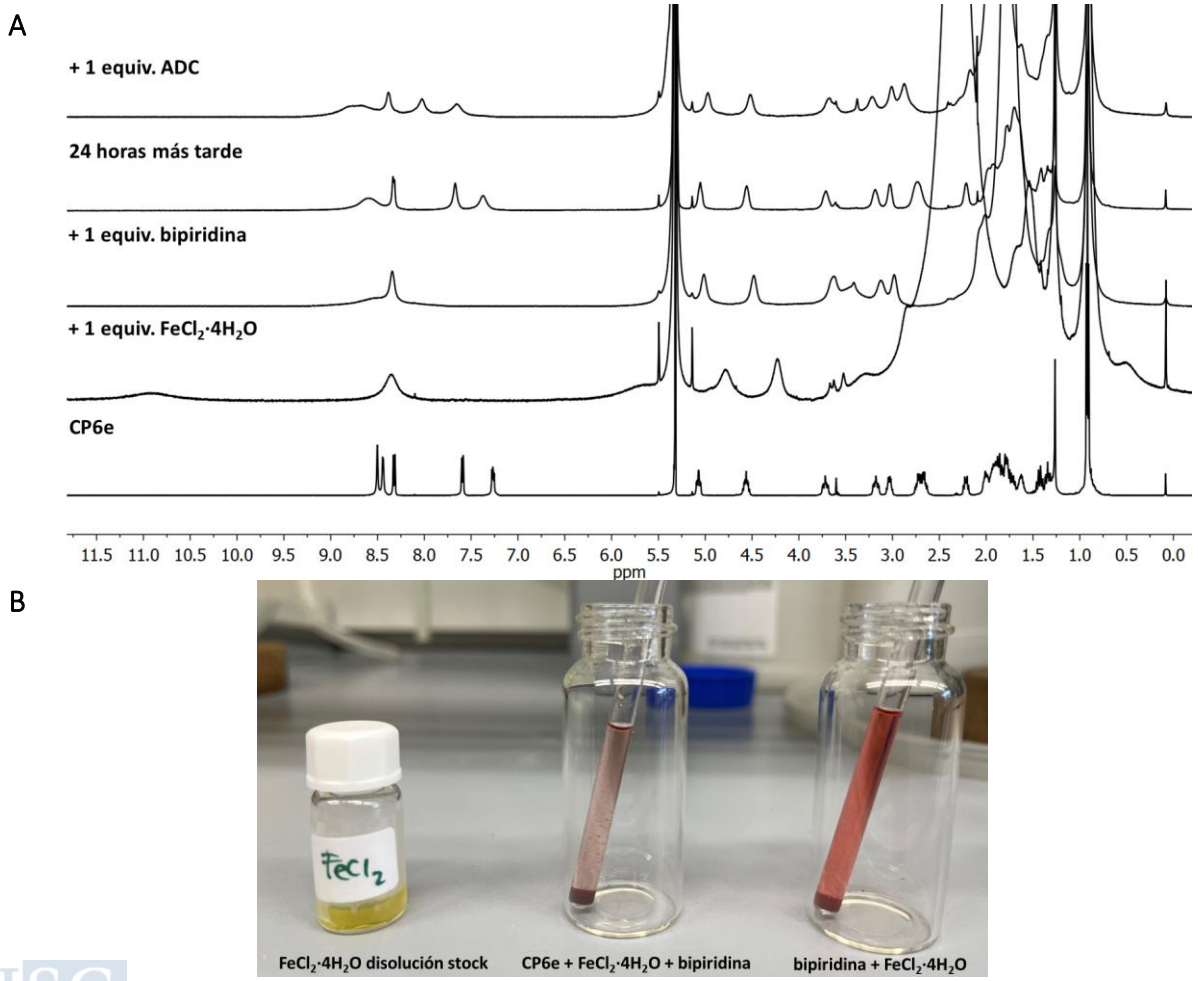


Figura 139. A) Cambios observados en el espectro de ^{1}H RMN de **CP6e** (5 mM, CD_2Cl_2) tras la adición de $FeCl_2{\cdot}4H_2O$, y la posterior adición de bipiridina y ácido acetilenodicarboxílico. B) Cambios en la coloración de las muestras con y sin **CP6e**. La disolución stock de $FeCl_2{\cdot}4H_2O$ se preparó en MeOH-d_3.

Por último, se repitió este experimento, pero empleando $MnCl_2{\cdot}4H_2O$. La adición de $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ sobre **CP6e** hizo desaparecer todas las señales de su espectro de ^{1}H RMN, a excepción del CH_3 de la leucina, que se vislumbra ligeramente (Figura 140A). La adición de un equivalente de 2,2'-bipiridina, provocaba la reaparición de las señales de la muestra, aunque todas ensanchadas con respecto a la referencia. La señal de los NH aparece ligeramente desplazada a campo bajo, pasando de 8.32 a 8.38 ppm, así como la correspondiente al H_3 del anillo de piridina, que se desplaza de 7.27 a 7. 35 ppm. Además, una nueva señal aparece a 5.46 ppm, solapada con la señal del disolvente. El espectro TOCSY de la muestra confirmó la similitud en los desplazamientos químicos de las señales con respecto a la referencia de **CP6e** en ausencia de sal. El día posterior a la realización de este experimento, se llevó a cabo la adición de ADC. En el espectro de ^{1}H RMN de la muestra antes de la adición, aparece una señal pequeña y ancha a 7.82 ppm. Cuando se añadió el diácido, aumentó en ensanchamiento de todas las señales, e incluso algunas de las situadas en la zona aromática se desapantallaron. Más allá de ese ensanchamiento, el resto de las señales no se ven alteradas, aunque en la zona donde aparecen los $H\alpha_{Leu}$ (≈ 5.06 ppm) parece haber ahora dos señales, o una desdoblada.

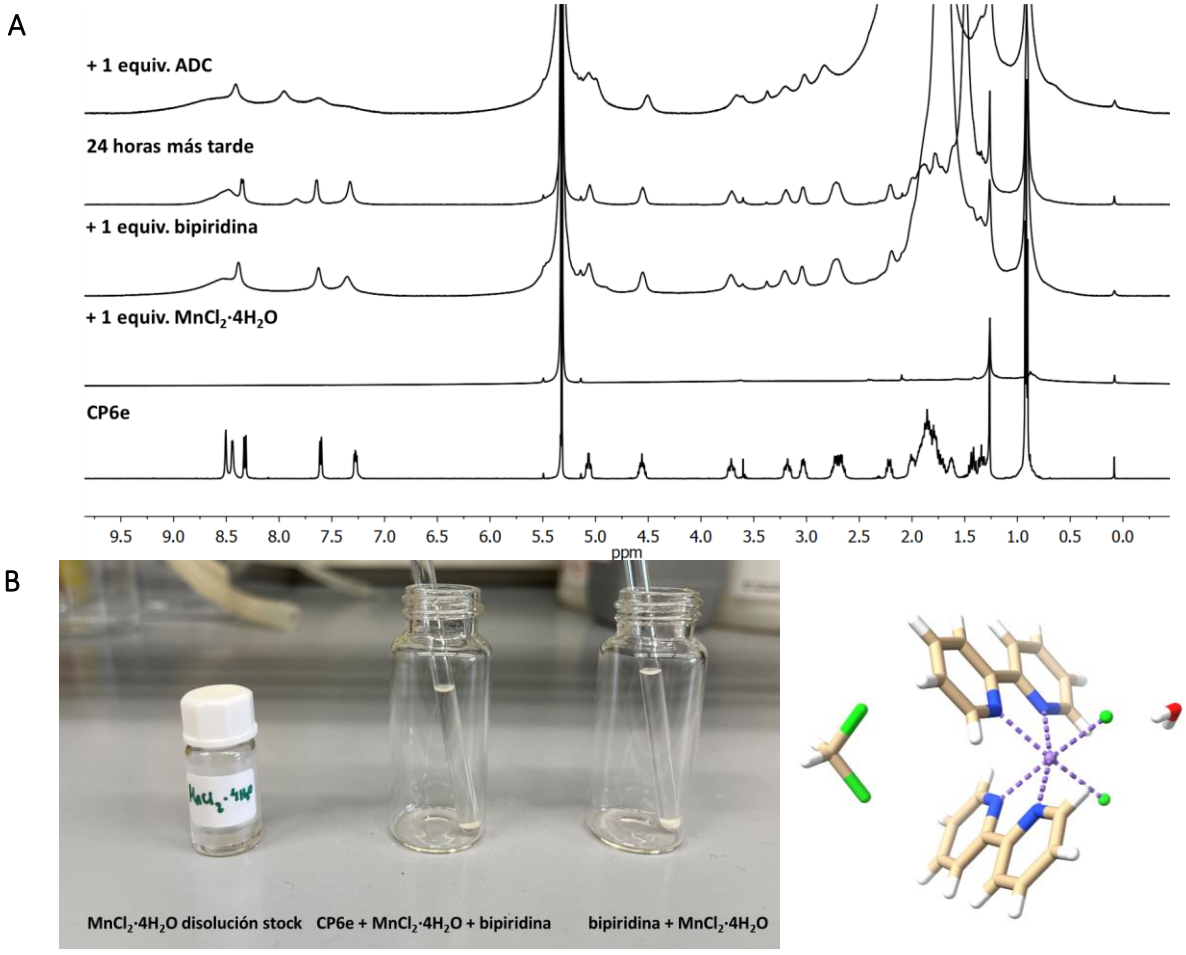


Figura 140. A) Cambios observados en el espectro de ^{1}H MRN de **CP6e** (5 mM, CD_2Cl_2) tras la adición de $MnCl_2{\cdot}4H_2O$, y la consecutiva adición de bipiridina y ácido acetilenodicarboxílico. B) A la izquierda: Cambios en la coloración de las muestras con y sin **CP6e**. A la derecha: estructura cristalina del complejo *cis*-$Mn(bipi)_2Cl_2$, que cristalizó en la muestra que contenía **CP6e**. La disolución stock de $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ se preparó en MeOH-d_3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Al igual que observamos con Fe^{II}, el análisis de la muestra por ESI solo nos permitió detectar la masa correspondiente a las especies **[CP6e]$^+$** (1030.6901 m/z) y **[D6e]$^+$** (2061.3652

m/z). En este caso, la adición de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ sobre **CP6e** no perturbó el color de la muestra, pero sí se formó un precipitado blanco tras la adición de la bipiridina (Figura 140B, izquierda). Días más tarde, observamos la aparición de un cristal de color amarillo en el interior del tubo, cuya difracción de rayos X, determinó que pertenecían al complejo *cis*-$Mn(bipi)_2Cl_2$ (Figura 140B, derecha). En la muestra control que no contenía **CP6e**, también se formó un precipitado blanco, aunque no cristalizó.

Después de realizar nuestros experimentos, y comparando con lo observado en los experimentos control, hicimos una pequeña búsqueda sobre las características de los complejos entre Co^{II}, Cu^{II}, Fe^{II} o Mn^{II} con bipiridina que están descritos en bibliografía (Tabla 5).

COMPLEJO	COLOR	SOLUBILIDAD
$[Co(bipi)_3Cl_2]$	Amarillo amarronado[561]	Soluble en H_2O y CH_3CN[562]
$[Co(bipi)_2Cl_2]$	Rojo[563]	Soluble en H_2O
$[Co(bipi)Cl_2]$	Azul claro[563]	Soluble en H_2O
$[Cu(bipi)_2Cl]Cl \cdot 5H_2O$	Azul pálido[564]	Soluble en H_2O
$[Cu(bipi)_3]Cl_2$	Azul turquesa[565]	Soluble en H_2O y CH_3CN. Insoluble en EtOH.
$[Cu(bipi)]Cl_2$	Verde claro[565]	Soluble en H_2O y CH_3CN. Insoluble en EtOH
$[Fe(bipi)_3X_2]$ (X=Cl, Br)	Rojo intenso[566]	Soluble en H_2O. Poco soluble en DMSO, DMF y CH_3CN. Insoluble en CH_2Cl_2[567]
cis-$[Mn(bipi)_2Cl_2]$	Amarillo[568]	Soluble en H_2O, MeOH y EtOH. Insoluble en $CHCl_3$.
$[Mn(bipi)_3]^{2+}$	Amarillo[569]	Soluble en DMSO, DMF, MeOH, MeCN, Acetona. Ligeramente soluble en CH_2Cl_2.

Tabla 5. Recopilación de algunos complejos descritos en bibliografía entre Co^{II}, Cu^{II}, Fe^{II} o Mn^{II} con bipiridina.

[561] a) Zhong, H.; Hong, Z.; Yang, C.; Li, L.; Xu, Y.; Wang, X.; Wang, R. *ChemSusChem* **2019**, *12*, 4493-4499. b) Sapp, S. A.; Elliott, C. M.; Contado, C.; Caramori, S.; Bignozzi, C. *J. Am. Chem. Soc* .**2002**, *124*, 11215-11222.
[562] Teodor, A. H.; Ooi, E. J.; Medina, J.; Alarcon, M.; Vaughn, M. D.; Bruce, B. D.; Bergkamp, J. J. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 10434-10450.
[563] Lee, R. H.; Griswold, E.; Kleinberg, J. *Inorg. Chem.* **1964**, *3*, 1278-1283.
[564] Sýs, M.; Mukherjee, A.; Jashari, G.; Adam, V.; Ashrafi, A. M.; Novák, M.; Richtera, L. *Materials* **2021**, *14*, 113.
[565] Louis, B.; Detoni, C.; Carvalho, N. M. F.; Duarte, C. D.; Antunes, O. A. C. *Appl. Catal. A Gen.* **2009**, *360*, 218-225
[566] a) Kober, E. M.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 3967-3977. b) Collomb, M. N.; Deronzier, A.; Gorgy, K.; Leprêtre, J. C. *New J. Chem.* **2000**, *24*, 455-461. c) Xie, Z.; Wei, L.; Zhong, S. *Front. Mater. Sci.* **2020**, *14*, 442-449.
[567] Cozzi, P. G., Gualandi, A., Mengozzi, L. & Manoni, E. *Iron(2+), tris(2,2'- bipyridine-N,N')-, Dibromide, (OC-6-11)*. In Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, Wiley Online Library, **2016**.
[568] McCann, S.; McCann, M.; Casey, M. T.; Jackman, M.; Devereux, M.; McKee, V. *Inorg. Chim Acta* **1998**, *279*, 24-29.
[569] a) Fernández, G.; Corbella, M.; Alfonso, M.; Stoeckli-Evans, H.; Castro, I. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 6684-6698. b) Kani, I.; Atlier, Ö.; Güven, K. *J. Chem. Sci.* **2016**, *128*, 523-536.

En todos los experimentos control donde se adicionaron las sales de Co^{II}, Cu^{II}, Fe^{II} o Mn^{II} sobre una muestra que solo contenía la bipiridina (en la misma concentración que en el experimento con **CP6e**), se formaba un precipitado. En estos experimentos, las señales del espectro de ^{1}H RMN de la bipiridina, también se vieron afectadas (Figura 141). En la mayoría de los casos, estas señales no se corresponden con lo que se observó cuando **CP6e** estaba presente (Figura 136A y Figura 136C, Figura 139A y Figura 140A).

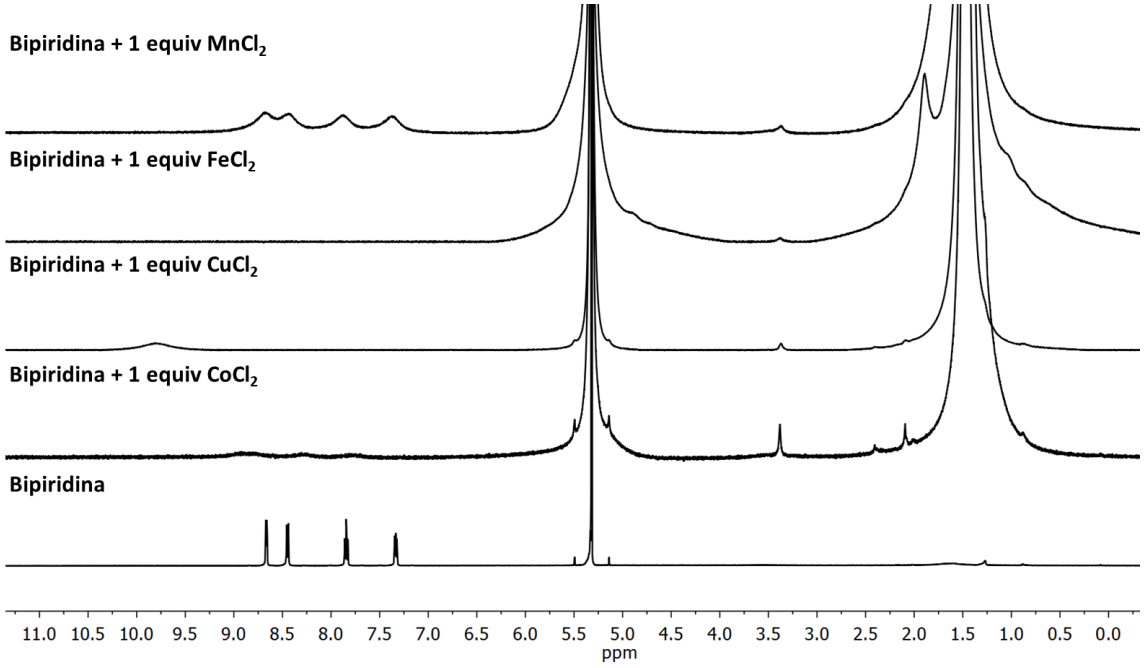


Figura 141. Cambios en el espectro de ^{1}H RMN de la bipiridina (5 mM, CD_2Cl_2) tras la adición de $CoCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_2$ o $MnCl_2$.

En el caso de la muestra donde $FeCl_2$ se añadió sobre **CP6e**, la disolución tomó inicialmente una coloración amarilla, color observado para complejos entre Fe^{II} o Fe^{II} y piridina.[570] Sin embargo, la formación del precipitado rojo intenso tras la adición de bipiridina indica la formación del característico complejo $[Fe(bipi)_3Cl_2]$, insoluble en CH_2Cl_2. Por tanto, la bipiridina debe "secuestrar" al Fe^{II} del medio que tal vez estuviese coordinado previamente a **CP6e**. Algo similar ocurre en el caso de la muestra que contenía **CP6e**, $MnCl_2$ y bipiridina, en la que cristalizó el complejo *cis*-$Mn(bipi)_2Cl_2$ (Figura 140B). Sin embargo, los resultados observados con Co^{II} y Cu^{II} indican que, en las muestras que contienen **CP6e** no se forman los mismos complejos que en presencia únicamente de bipiridina. Esta conclusión deriva de tres observaciones. La primera es la diferencia en el espectro de ^{1}H RMN de las muestras que contienen $CoCl_2$ o $CuCl_2$ frente a las que contienen $FeCl_2$ o $MnCl_2$. La ausencia de las señales de las piridinas de **CP6e** en el primer grupo (Co^{II} y Cu^{II}) indica que esos anillos están formando parte de un complejo metálico, dadas sus propiedades paramagnéticas. El segundo punto importante es la diferencia en la apariencia de las disoluciones con respecto a las referencias. Mientras que la disolución de **CP6e** con $CoCl_2$ y bipiridina tiene un color azul intenso y no muestra precipitado, aquella que no contiene **CP6e** aparece incolora y se forma un precipitado azul claro, que podría ser

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[570] Baudisch, O.; Hartung, W. H.; Milligan, W. O. *Inorg. Synth.* **1939**, *1*, 184-185.

[Co(bipi)Cl_2] (Tabla 5). Según la bibliografía, el color azul se observa en complejos entre Co^{II} y piridina.[571] Algo similar ocurre en el caso de $CuCl_2$, aunque en este caso sí se forma precipitado en la muestra que contiene **CP6e**. Tras la adición de la sal de Cu^{II}, la disolución se tornó azul tenue, ya observado en otros trabajos para complejos entre Cu^{II} y piridina.[572] Sin embargo, el sobrenadante tiene color azul, mientras que en la muestra control, tras depositarse el sólido en suspensión (que podría ser [Cu(bipi)$_3$]Cl_2) el sobrenadante quedó incoloro. En tercer lugar, en las muestras que contenían $CoCl_2$ o $CuCl_2$ se pudo detectar la masa correspondiente a especies complejadas derivadas de **CP6e**. Por supuesto, más allá de esta cotejación bibliográfica, es necesario realizar análisis masas para averiguar qué especies son las que han precipitado en los experimentos realizados, algo que aún no ha sido posible llevar a cabo.

Finalmente, los espectros FTIR de los sobrenadantes de estos experimentos con **CP6e**, no mostraban diferencias significativas (Figura 142).

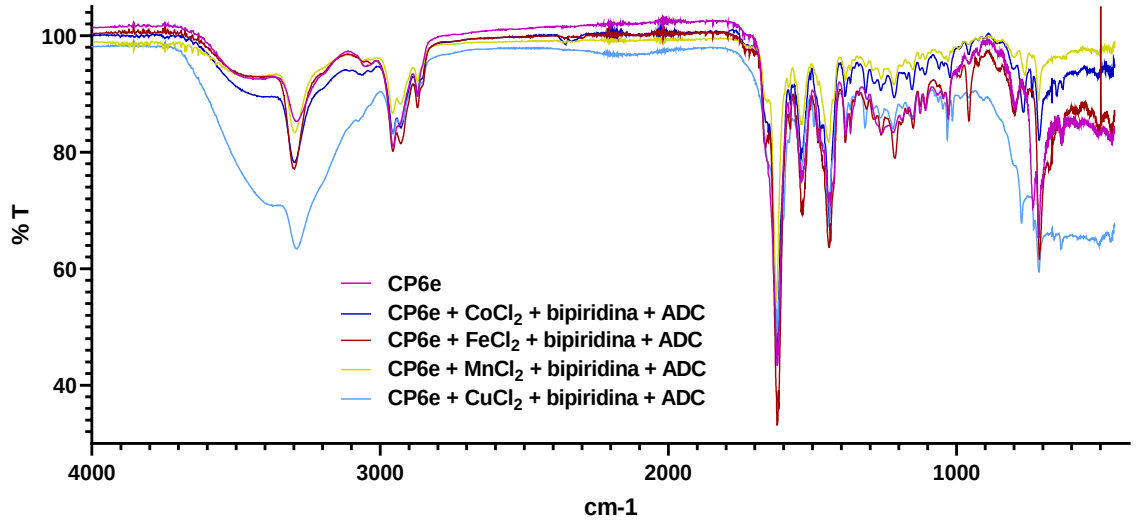


Figura 142. Espectro FTIR de las muestras derivadas de los experimentos entre **CP6e**, las sales metálicas ($CoCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_2$ y $MnCl_2$), la bipiridina y el ácido acetilenodicarboxílico (ADC).

Actualmente, no se han podido realizar más avances en relación con este proyecto, aunque en experimentos futuros, nos planteamos profundizar más en la coordinación entre **CP6** y estos metales. Por otra parte, se estudiará próximamente la posible actividad esterasa de **CP6e** y, si es viable, se intentará determinar cuál de los dos péptidos diseñados, **CP6e** o **CP7b**, presenta mayor actividad, siendo la naturaleza de sus heterociclos el factor que pudiera marcar la diferencia entre ellos.

[571] a) Soldatov, D. V.; Lipkowski, J. *J. Struct. Chem.* **1995**, *36*, 823-829. b) Zhu, D.; Janssen, F. F. B. J.; Budzelaar, P. H. M. *Organometallics* **2010**, *29*, 1897-1908.
[572] Noro, S. I.; Fukuhara, K.; Sugimoto, K.; Hijikata, Y.; Kubo, K.; Nakamura, T. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 11100-11110.

6.3 CÁPSULAS SUPRAMOLECULARES PARA EL RECONOCIMIENTO DE ANIONES.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.3 Cápsulas supramoleculares para el reconocimiento de aniones

6.3.1 Precedentes y diseño

Como se ha comentado en la sección de la introducción dedicada al transporte de aniones, existe un creciente interés en el desarrollo de receptores de aniones sintéticos.[338] Este interés está relacionado con la problemática que representan las canalopatías,[335] que derivan del mal funcionamiento de las proteínas naturales formadoras de canales de iones. En el transcurso de las investigaciones ligadas a este tema, se ha ido desenmascarando el modo de acción de los canales naturales y a su vez, crece el conocimiento disponible para poder desarrollar análogos sintéticos cada vez mejores. En la introducción y objetivos se ha comentado el reciente trabajo del grupo en relación al transporte de iones.[501] En esta línea, se ha descrito un α,γ-ciclohexapéptido funcionalizado con tres brazos moleculares con piridinas capaz de transportar pares iónicos a través de membranas lipídicas. Aunque la capacidad transportadora de los CPs se ha venido estudiando desde mucho antes,[463a,573] la incorporación de estos brazos aporta selectividad y modifica el mecanismo transportador del CP, ya que pasa de apilarse para formar un canal transmembranal, a actuar como ionófono que se difunde entre ambos lados de las bicapas lipídicas.

En la introducción, también se han detallado las numerosas aportaciones en el área del reconocimiento de aniones que evidencian que la manera en que un receptor envuelve al anión es fundamental para determinar su afinidad por el mismo. Además, normalmente, esto se traduce en selectividad y buena actividad transportadora, aunque no en todos los casos es así. El esqueleto ciclopeptídico resulta un buen candidato para ceñirse a estos requisitos, por su estructura preorganizada, su diámetro modulable o por la posibilidad de decorar su parte externa para favorecer las interacciones con las membranas lipídicas. El encerrado tridimensional se plantea como una modificación que puede traer ventajas significativas para el fin que nos proponemos. Por este motivo se decidió explorar la respuesta frente a la presencia de iones de un CP dotado con una tapa molecular. En base a los precedentes sobre receptores de aniones, planteamos el uso de una tapa *tris*-triazólica por su contrastada capacidad para estabilizar especies cargadas, tal como se han cubierto brevemente en la introducción (Sección 6, Figura 55). Por ello pensamos en recurrir nuevamente a la química *click* azida/alquino para tal fin. Esto nos permitiría tener tres triazoles apuntado hacia la cavidad, aportando un grado de preorganización muy elevado (Figura 143)

La elección de la tris(2-azidoetil)amina (que denominaremos pre-tapa **A**) y el 1,3,5-tris(azidometil)-2,4,6-trietilbenceno (denominado pre-tapa **B**) como precursores de las mencionadas tapas moleculares se hizo valorando varios factores. El primero de ellos es la viabilidad sintética para incorporar estas tapas al péptido, ya que es posible partir de los precursores tris(2-aminoetil)amina (TREN) y 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno para preparar exitosamente los derivados **A** y **B**.[574] El acoplamiento con el *c*-[(*D*-Leu-*L*-^{propargil}*N*-Acp)$_3$], **CP5**, nos permitiría obtener **CP8** y **CP9** (Figura 143). Además, la simetría terciaria de

[573] Rodriguez-Vazquez, N.; Ozores, H.; Guerra, A.; Gonzalez-Freire, E.; Fuertes, A.; Panciera, M.; Priegue, J.; Outeiral, J.; Montenegro, J.; Garcia-Fandino, R.; Amorín, M.; Granja, J. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *14*, 2647-2661.
[574] a) Mettry, M.; Moehlig, M. P.; Gill, A. D.; Hooley, R. J. *Supramol. Chem.* **2017**, *29*, 120-128. b) Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. *Org Lett* **2007**, *9*, 3797-3800.

estos precursores encaja con la del péptido. En el caso de **A**, pensamos que su flexibilidad sería un punto a favor para amoldar el espacio disponible a aniones de distintito tamaño, y el carácter básico del nitrógeno central también se podría emplear para modificar su afinidad con el pH. Por su parte, **B** dejaría un hueco más reducido, aportando mayor selectividad para el reconocimiento de halogenuros de pequeño tamaño. Además, el anillo aromático podría actuar cooperando en la estabilización por interacciones anión-π.[361,364]

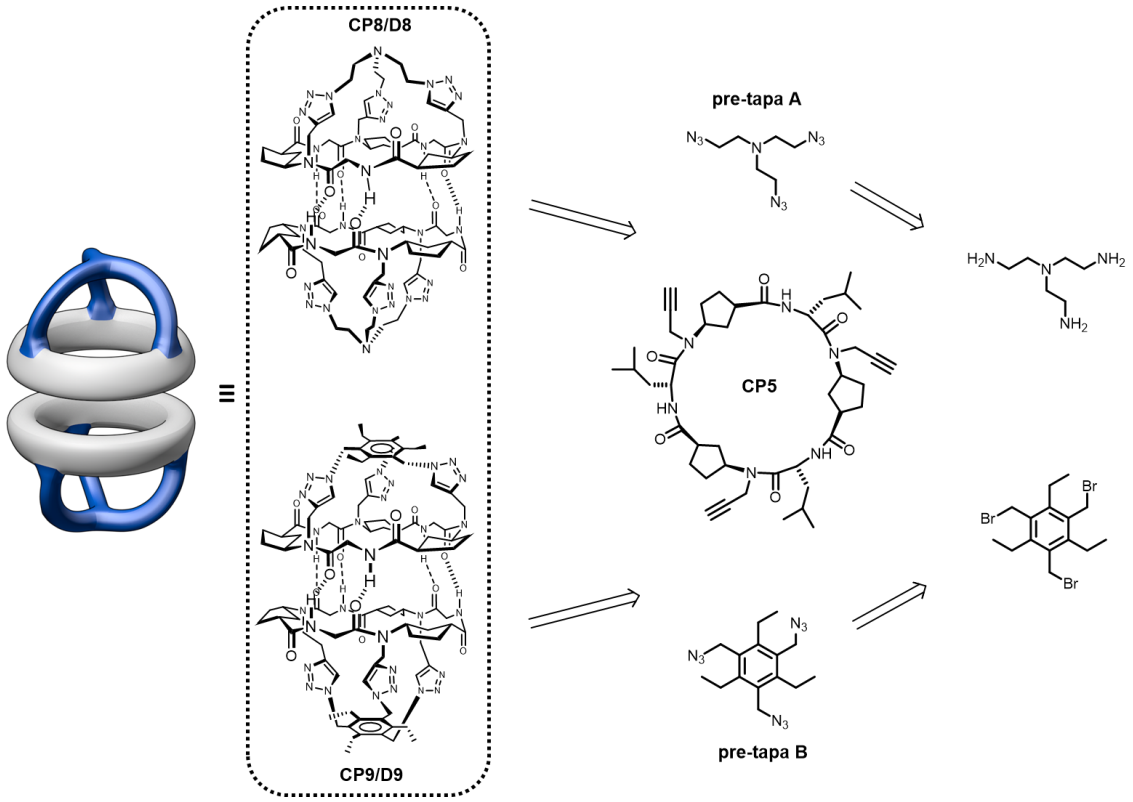


Figura 143. Estrategia sintética para la obtención de **CP8** y **CP9**.

6.3.2 Síntesis

En el planteamiento original del proyecto, sería **CP5** el que usaríamos para incorporar dos tapas distintas. La síntesis de este CP ya ha sido descrita en apartado previo (Figura 129).[545] En cuanto a la dos tapas utilizadas, partimos de los reactivos comerciales tris(2-aminoetil)amina (TREN) y 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno. En el caso del 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno, el tratamiento con azida sódica en DMSO dio lugar, con un rendimiento moderado del 52 %, a la pre-tapa **B** a través de un mecanismo de sustitución nucleófila.[574a] Para la TREN, se empleó el hidrocloruro de imidazol-1-sulfonilazida como reactivo de transferencia diazo. Este reactivo fue propuesto por Goddard-Borger y Sitick en 2007 como una buena alternativa al TfN_3, por ser menos explosivo y mucho más estable.[574b] En las condiciones de reacción, se emplea una fuente de Cu^{II}, que actúa como catalizador estabilizando las especies intermedias.[575] Los estudios mecanísticos con ^{15}N (Figura 144, en rojo) revelan que son los dos

[575] a) Alper, P. B.; Hung, S. C.; Wong, C. H. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6029-2032. b) Nyffeler, P. T.; Liang, C. H.; Koeller, K. M.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc*. **2002**, *124*, 10773-10778.

nitrógenos terminales del agente azidante los que se transfieren a la amina. Esto se debe a que el ataque nucleófilo del nitrógeno de amina se produce sobre el nitrógeno terminal del reactivo de transferencia.[576]

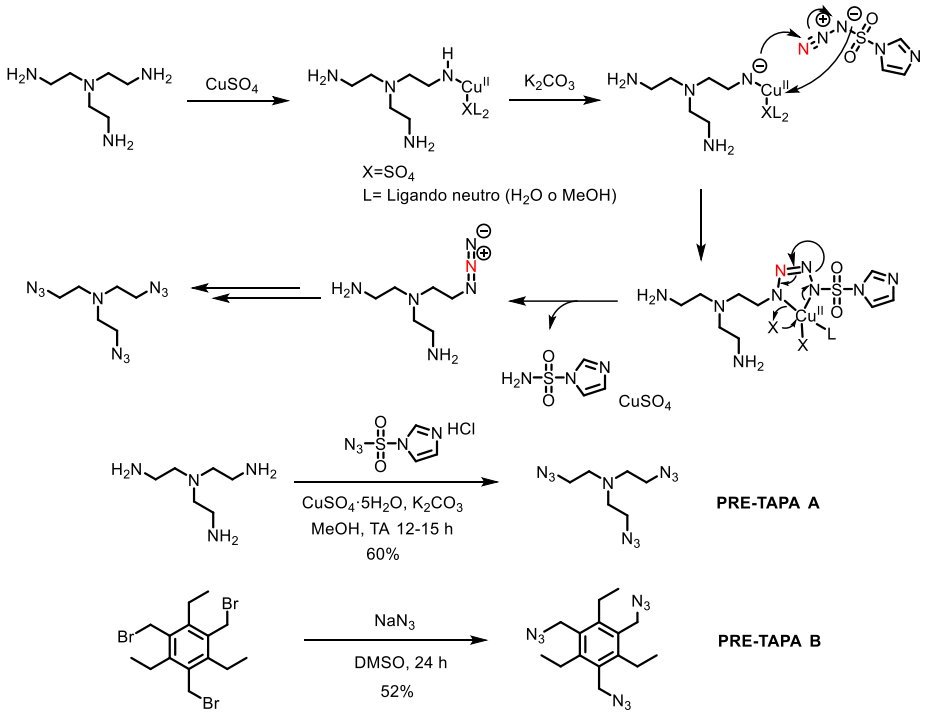


Figura 144. Mecanismo de transferencia diazo, catalizado por Cu^{II}, usando el hidrocloruro de imidazol-1-sulfonilazida como reactivo de transferencia. Rendimiento en la preparación de las pre-tapas A y B.

Tras la obtención de los precursores de las tapas moleculares, se procedió al acoplamiento *click* con **CP5**. Primero se recurrió a las condiciones previamente utilizadas en el grupo (obtención de **CP2**, primera parte de la sección resultados), empleando el catalizador $[Cu(MeCN)_4PF_6]$ en presencia de TBTA como ligando estabilizador, DIEA como base, y CH_2Cl_2 como disolvente.[517] El producto de acoplamiento del **CP5** con la pre-tapa **A** condujo a **CP8**, que se obtuvo en un 15% de rendimiento. En el caso de la reaccción con la pre-tapa **B** para obtener el **CP9**, el rendimiento fue únicamente del 10%. En este último caso se observaba la formación de un material laminoso insoluble tanto en disolventes polares como apolares que atribuimos a la posible formación de una especie polimérica. Dados los requerimientos de tiempo para la preparación del **CP5**, y que el objetivo de este proyecto no abarcaba solo la síntesis de las cápsulas, sino el estudio de las mismas como receptores de aniones, nos pareció que no resultaba viable continuar adelante con tan bajos rendimientos. Por ello se decidió abordar la optimización de esta reacción, para la cual existe una gran variedad de condiciones en la bibliografía.[577] Las condiciones acuosas o mezclas con diversos alcoholes, donde se suele emplear $CuSO_4$ y ascorbato sódico como precursores del catalizador,[578] no son una buena alternativa en nuestro caso, debido a los problemas de solubilidad del CP. La combinación de

[576] a) Pandiakumar, A. K.; Sarma, S. P.; Samuelson, A. G. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2917-2920. b) Stevens, M. Y.; Sawant, R. T.; Odell, L. R. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4826-2831.
[577] Hein, J. E.; Fokin, V. V. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39, 1302-1315.*
[578] Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879-9883.

CuBr y DBU en tolueno, a reflujo, se ha usado con muy buenos resultados para cicloadiciones alquino-azida intramoleculares,[579] especialmente en ciclaciones peptídicas.[580] Esta es una opción *ligand-free* que transcurre a través del mecanismo general del acoplamiento *click* (Figura 145), donde L son moléculas de disolvente o de la base utilizada, pero que no requiere del uso de un ligando estabilizador adicional.

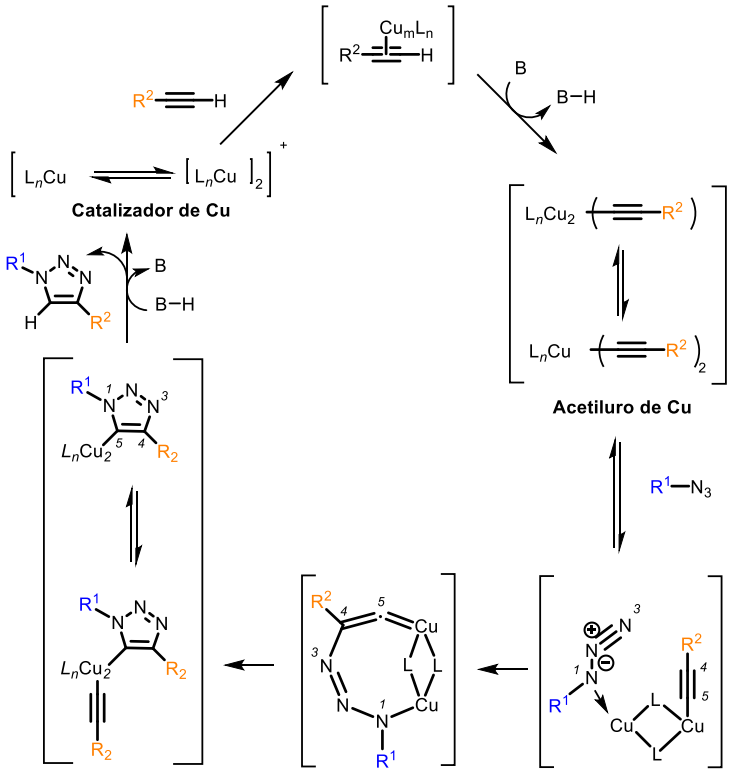


Figura 145. Mecanismo general para el acoplamiento alquino-azida catalizado por Cu^{I}.[581]

Aunque en nuestro caso, inicialmente, no se trata de una reacción intramolecular *per se*, tras el primer acoplamiento alquino-azida, los otros dos restantes sí son intramoleculares. Además, el uso de DBU, una base más fuerte que la DIEA que veníamos utilizando, se ha relacionado con una aceleración de la etapa de formación del acetiluro de Cu, ya que favorece la desprotonación del alquino π-complejado (Figura 145). En algunas ocasiones, estas condiciones han dado mejores rendimientos que aquellas donde se usan ligandos triazólicos. Se postula que también actúa estabilizando al Cu^{I}, previniendo su oxidación, uno de los mayores obstáculos a sortear en esta reaccción.[580b] Por otra parte, esta nueva estrategia presenta una ventaja logística en cuanto al manejo de los reactivos, especialmente al usar CuBr en lugar de $[Cu(MeCN)_4PF_6]$, cuya manipulación en caja seca y el uso riguroso de una atmosfera inerte dificulta el protocolo.

[579] Chavez-Acevedo, L.; Miranda, L. D. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 44408-4412.

[580] a) Bock, V. D.; Perciaccante, R.; Jansen, T. P.; Hiemstra, H.; Van Maarseveen, J. H. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 919-922. b) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *1*, 51-68 c) Liu, Y.; Zhang, L.; Wan, J.; Li, Y.; Xu, Y.; Pan, Y. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10728-10734.

[581] a) Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2210-115. b) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.

El resultado de implementar estas condiciones alternativas en la síntesis de **CP8** y **CP9** fue muy satisfactorio, ya que pudimos obtener ambos productos con unos rendimientos de 48% y 54%, respectivamente. Sorprendentemente el rendimiento de **CP9** fue ligeramente mayor que el de **CP8**, justo al contrario de lo que habíamos observado con las condiciones previas. Quizás, la cadena más corta de la pre-tapa **B** (un solo carbono) que contiene el grupo azida, favorece ligeramente un estado de transición más preorganizado tras el primer acoplamiento. Dado que los materiales de partida presentan tres grupos reactivos, es importante trabajar en condiciones de alta dilución (10^{-3} M) para evitar que un mismo péptido pueda acoplarse con más de una tapa. Para ambos péptidos se determinó que los lavados con cloruro amónico eran fundamentales para eliminar los restos de cobre, que presumiblemente, también se mantenía coordinado a los nuevos triazoles formados reduciendo los rendimientos. El espectro de ^{1}H NMR de ambos CPs confirmó, dada su simplicidad, la formación de los correspondientes dímeros **D8** y **D9** con una simetría *C3* (Figura 146), cuyos protones amídicos resonaban a 7.29-8.02 ppm, respectivamente. El dímero **D9**, presenta señales más anchas y peor resueltas, sugiriendo una dinámica de interconversión conformacional más lenta que la de **D8**. Posteriores estudios más detallados de 2D RMN, MS y FTIR confirmaban las estructuras diméricas.

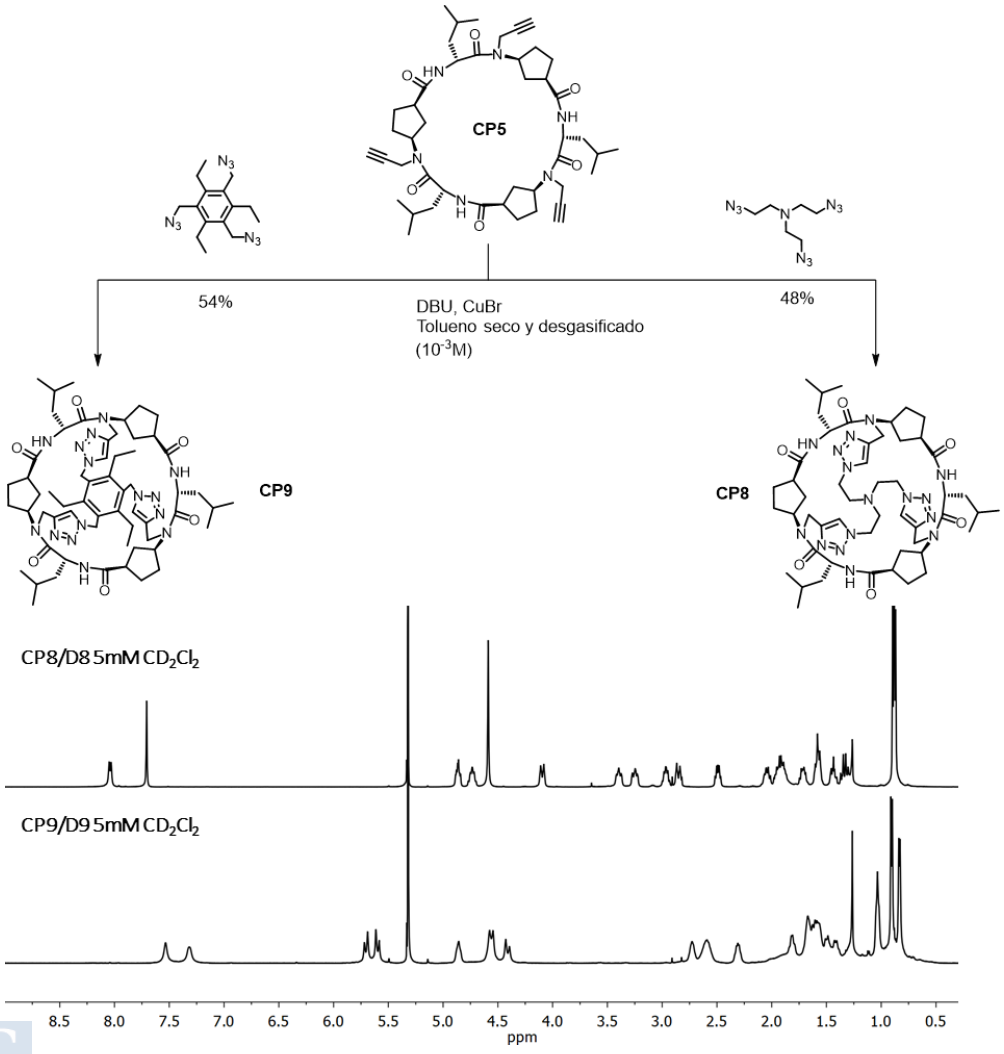


Figura 146. Preparación de **D8** y **D9** y sus correspondientes espectros de ^{1}H NMR. La simetría *C3* de ambos se ve reflejada en sus espectros de ^{1}H NMR.

En las siguientes secciones se detallarán, por separado, las características estructurales más relevantes de cada especie, así como los estudios llevados a cabo, principalmente en relación con el reconocimiento y transporte de aniones.

6.3.3 Estudios con CP8

Tras la obtención de **CP8**, como ya se ha indicado, varios análisis confirman la formación de **D8** en disolventes no polares. Por un lado, su NH tiene un desplazamiento químico de 8.02 ppm, lo que se relaciona con su participación en los enlaces de hidrógeno que forman el dímero **CP8**-**CP8**. El especto de IR muestra la banda de tensión para el enlace N-H a 3324 cm^{-1}, que como ya se ha mencionado en anteriores discusiones, también es indicativo de la formación de enlaces de hidrógeno. Además, las bandas de tensión de las dos amidas (1622 y 1532 cm^{-1}) concuerdan con el apilamiento tipo lámina β antiparalela. Por su parte, el análisis de masas exactas confirma la presencia del dímero (2045.2485 [**D8**+Na]$^+$). Finalmente, fuimos capaces de obtener unos cristales apropiados para la resolución por difracción de rayos X de la estructura de **D8**, empleando una disolución del CP en 10% CD_3CN/CD_2Cl_2. Cabe resaltar que el uso de $CDCl_3$, a pesar de ser un disolvente muy común para el estudio de moléculas orgánicas debido a sus buenas propiedades solvatantes, se evitó ya que provocaba la precipitación del péptido. Esto lo atribuimos a las trazas de HCl que contiene, que deben protonar el nitrógeno de la amina terciaria de la tapa. La resolución de la estructura cristalina confirma la formación de **D8** (Figura 147). El dímero se sostiene mediante seis enlaces de hidrógeno, con una longitud promedio de 2.10 Å. Además, una molécula de acetonitrilo ha quedado atrapada en la cavidad. Su átomo de nitrógeno se encaja en el hueco entre los tres triazoles de uno de los monómeros, quedando todos ellos apuntando a la cavidad del CP. La distancia promedio entre el CH de los triazoles y el nitrógeno del acetonitrilo es de 2.74 Å. Si atendemos a la otra subunidad del CP, uno de los anillos de triazol está girado dejando su protón orientado hacia el exterior, mientras que el resto del anillo rellena parcialmente el espacio que queda sin ocupar de la cápsula. El metilo del acetonitrilo queda ocupando de la región hidrofóbica que generan los C_β de de los γ-Acp.

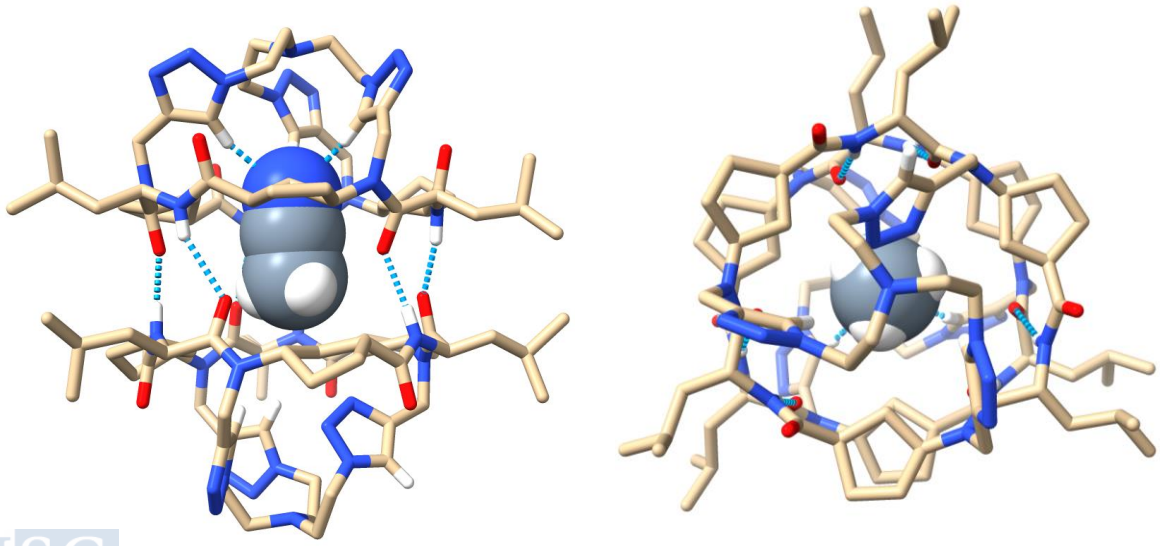


Figura 147. Vistas frontal y superior de la estructura cristalina de **D8**. La molécula de acetonitrilo encapsulada en su interior está representada en modelo CPK.

La asignación de las señales del espectro de ^{1}H RMN, junto con el estudio 2D RMN, nos permitieron confirmar la flexibilidad en la estructura (Figura 148). Por una parte, los protones del metileno que actúa como conectores entre el CP y el anillo de triazol aparecen como un singlete y no como dos dobletes, algo característico de otras estructuras más rígidas como el análogo **CP9** (sobre el que profundizaremos en la sección 3.4). Por otra parte, el protón del triazol da una señal de nOe con los protones etilénicos de la tapa, los protones del *linker* metileno, los protones Hβ del anillo de cinco miembros, y los protones $H\alpha_{Leu}$. Atribuimos estas observaciones a la naturaleza flexible de **D8**, donde cada brazo triazólico puede girar rápidamente, según la escala de tiempos de RMN.

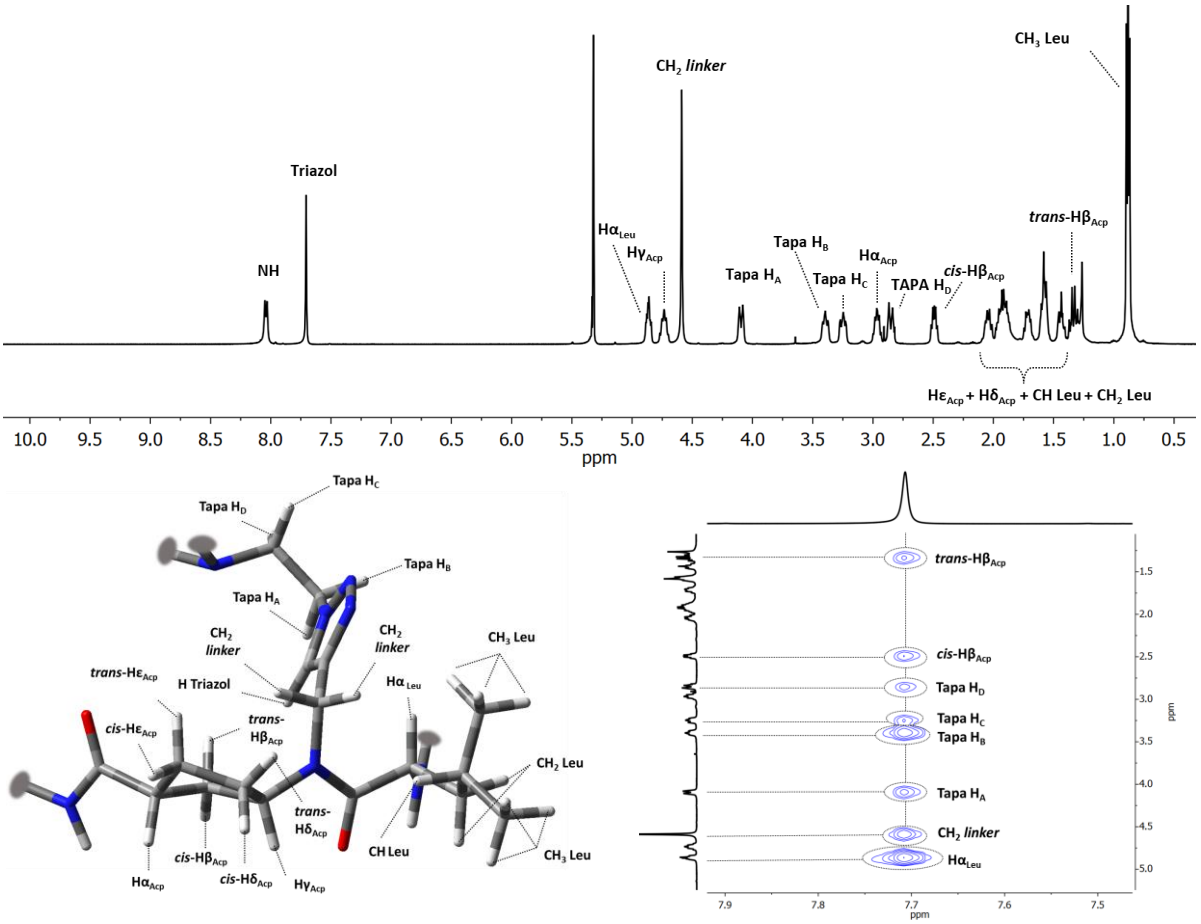


Figura 148. Asignación de señales para el ^{1}H RMN de **D8** y representación de las señales de nOe entrecruzado entre el protón del triazol (7.71 ppm) con las señales de los demás protones de dicho compuesto.

6.3.3.1 Encapsulación de bisnitrilos de cadena corta en la cavidad de D8.

La presencia de una molécula de ACN dentro de la cavidad de **D8** y su relativa flexibilidad, nos hizo reflexionar sobre su capacidad para encapsular bisnitrilos de cadena corta en el que cada uno de los grupos ciano fuese reconocido por el motivo *tris*-triazólico. En un trabajo previo del grupo ya se habían estudiado derivados de **CP5**, pero que incorporaban *orto*-piridinas al final de las tres cadenas alquílicas (saturadas o con los alquinos), previamente coordinados a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

iones metálicos (Zn^{II}, Cu^{I}, Ag^{I}) en la encapsulación de bisnitrilos.[582] En ese trabajo, la fuerza impulsora de la encapsulación debía ser la coordinación de los nitrilos con el ion metálico. En nuestra propuesta pretendíamos que fuese la formación de enlaces de hidrógeno con los tres triazoles de cada monómero. El protón de estos triazoles, de carácter ácido, podría estabilizar los bisnitrilos mediante hasta seis interacciones CH···N, similares a las anteriormente observadas en el rayos-X de **D8**. En ambos casos, las interacciones van der Waals con la cavidad y el llenado de esta deberían de favorecer la encapsulación. Decidimos, por tanto, evaluar el reconocimiento molecular de malononitrilo (MN) y succinonitrilo (SN). Para evitar una posible competencia, en estos experimentos no se utilizó ACN. En ambos casos se observa, después de la adición de diferentes equivalentes de cada bisnitrilo, la aparición de señales que sugieren su encapsulación. Entre ambos sustratos se observan ciertas diferencias que sugieren una marcada selectividad, ya que, cuando se añadía casi un equivalente (0.92) de MN no se observaba ningún cambio en el espectro de **CP8**, mientras que solo con añadir medio equivalente (0.53) de SN fue suficiente para apreciar la aparición de nuevas señales a 7.79 y 7.57 ppm, como un doblete y un singlete, respectivamente (Figura 149). De todas formas, esta seguía siendo la especie minoritaria, lo que sugiere una baja afinidad.

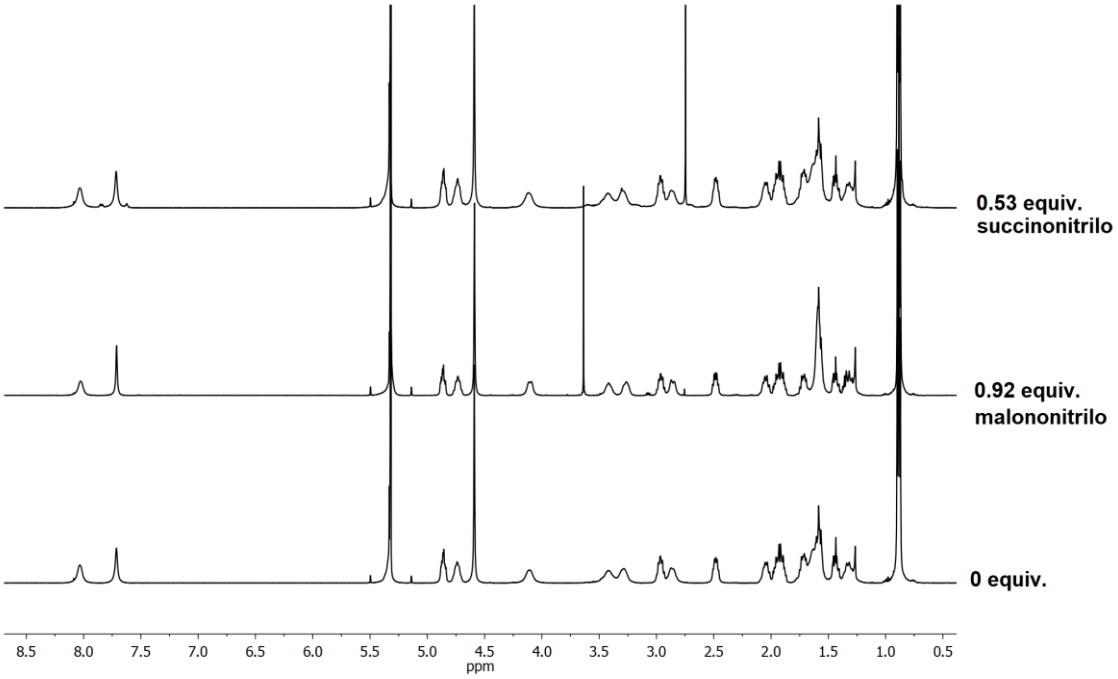


Figura 149. Comparativa del espectro ^{1}H RMN de **CP8** (CD_2Cl_2, TMSS como estándar) tras la adición de 0.53 equivalentes de succinonitrilo frente a 0.92 equivalentes de malononitrilo. El singlete a 2.75 ppm corresponde al succinonitrilo adicionado, mientras que aquel a 3.64 ppm pertenece al malononitrilo.

Analizando ambos casos de manera separada, en el estudio con malononitrilo fue necesaria la adición de 30 equivalentes para observar cambios notables, que no se acentuaron cuando se siguió añadiendo MN hasta 60 equivalentes (Figura 150A). El protón del triazol se desapantalla ligeramente, de 7.71 a 7.77 ppm (Figura 150B), lo que encaja con una posible

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[582] A. Fuertes García, *Nuevas estrategias para el transporte de iones y la encapsulación selectiva de ligandos en α,γ-ciclopéptidos* (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, **2019**.

interacción CH···N débil. Por su parte, las señales pertenecientes a los protones de la tapa se vuelven anchas. El protón H_A, correspondiente a uno de los protones metilénicos contiguos al triazol, se desapantalla notablemente, de 3.41 a 3.56 ppm (Figura 150C), lo que concuerda con la orientación del grupo CN hacia los extremos de la cavidad.

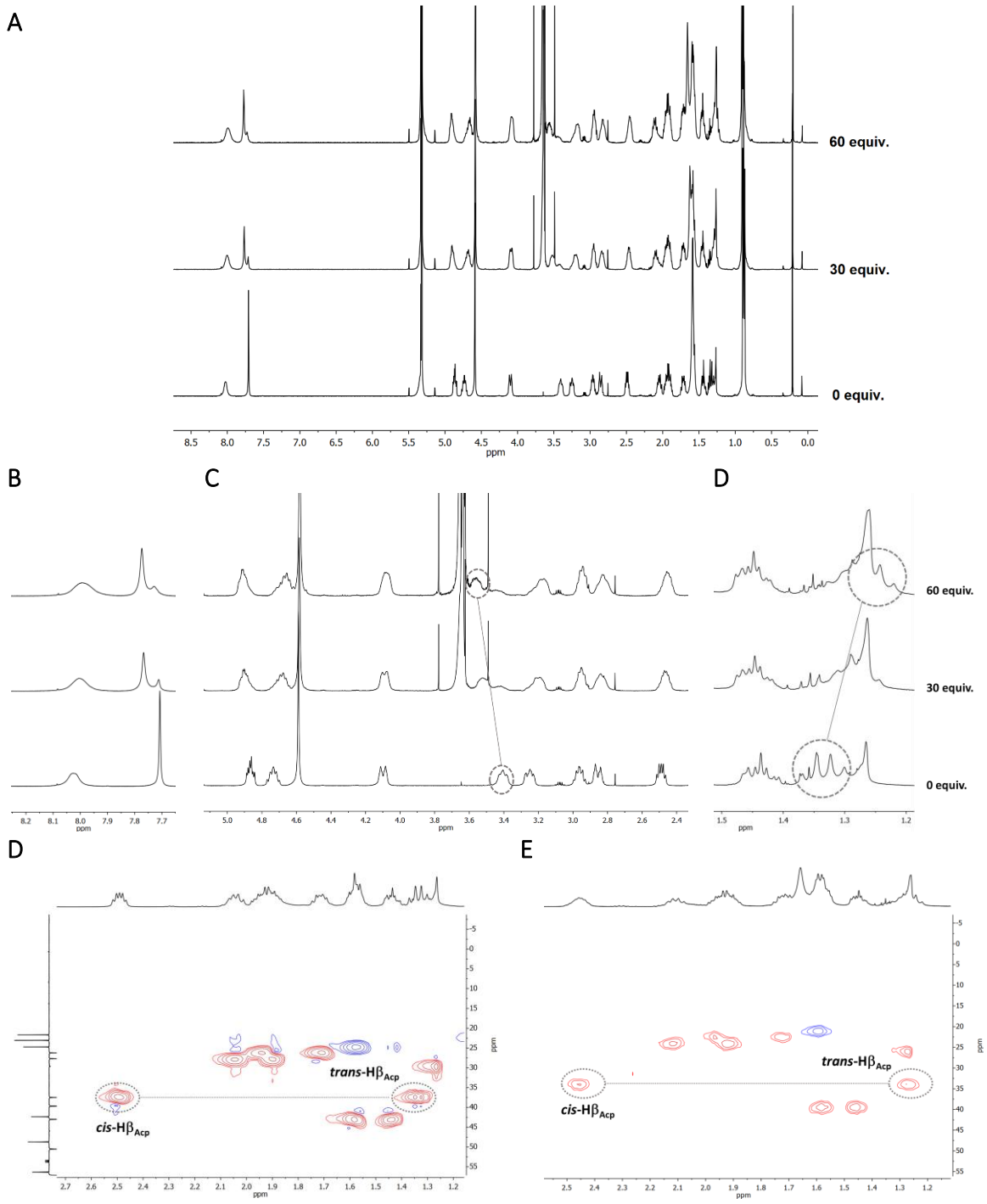


Figura 150. Espectro de RMN correspondientes a las adiciones de malononitrilo sobre una disolución de **CP8** (4.7 mM en CD_2Cl_2, contiene TMSS como estándar). Los cambios más relevantes ilustrados en las figuras B-F se corresponden con la adición de 60 equivalentes. Ampliación de los espectros HSQC de (E) **D8** y (F) **MN⊂D8** en los que se remarcan las señales correspondientes a los $H\beta_{Acp}$.

Como última observación, el hidrógeno del carbono beta del Acp ($H\beta_{Acp}$) en *trans* con respecto a los sustituyentes (amino y carboxilo), originalmente localizado a 1.34 ppm, se apantalla hasta 1.26 ppm (Figura 150D), lo que pudimos confirmar mediante HSQC, comparando los espectros de **D8** y **MN⊂D8** (Figura 150E y F, respectivamente). Teniendo en cuenta que estos protones estarían rodeando el metileno del MN, las interacciones van der Waals serían las responsables de este cambio. Estos datos encajan con la presencia de una molécula de malononitrilo dentro de la cavidad de **D8**, aunque se necesita un largo exceso de este ligando para promover su encapsulación.

En el caso del succinonitrilo, se observa la desaparición progresiva de las señales correspondientes a **D8**, mientras otro conjunto de señales, presumiblemente perteneciente a la especie **SN⊂D8**, aparece (Figura 151A). Los cambios más notables son los relativos a los protones amídicos y triazólicos. El primero sufre apantallamiento, de 8.03 a 7.85 ppm. Pensamos que esto puede ser debido a la mayor longitud del huésped, que provoca un distanciamiento de los grupos C=O y NH, debilitando así los enlaces de hidrógeno.

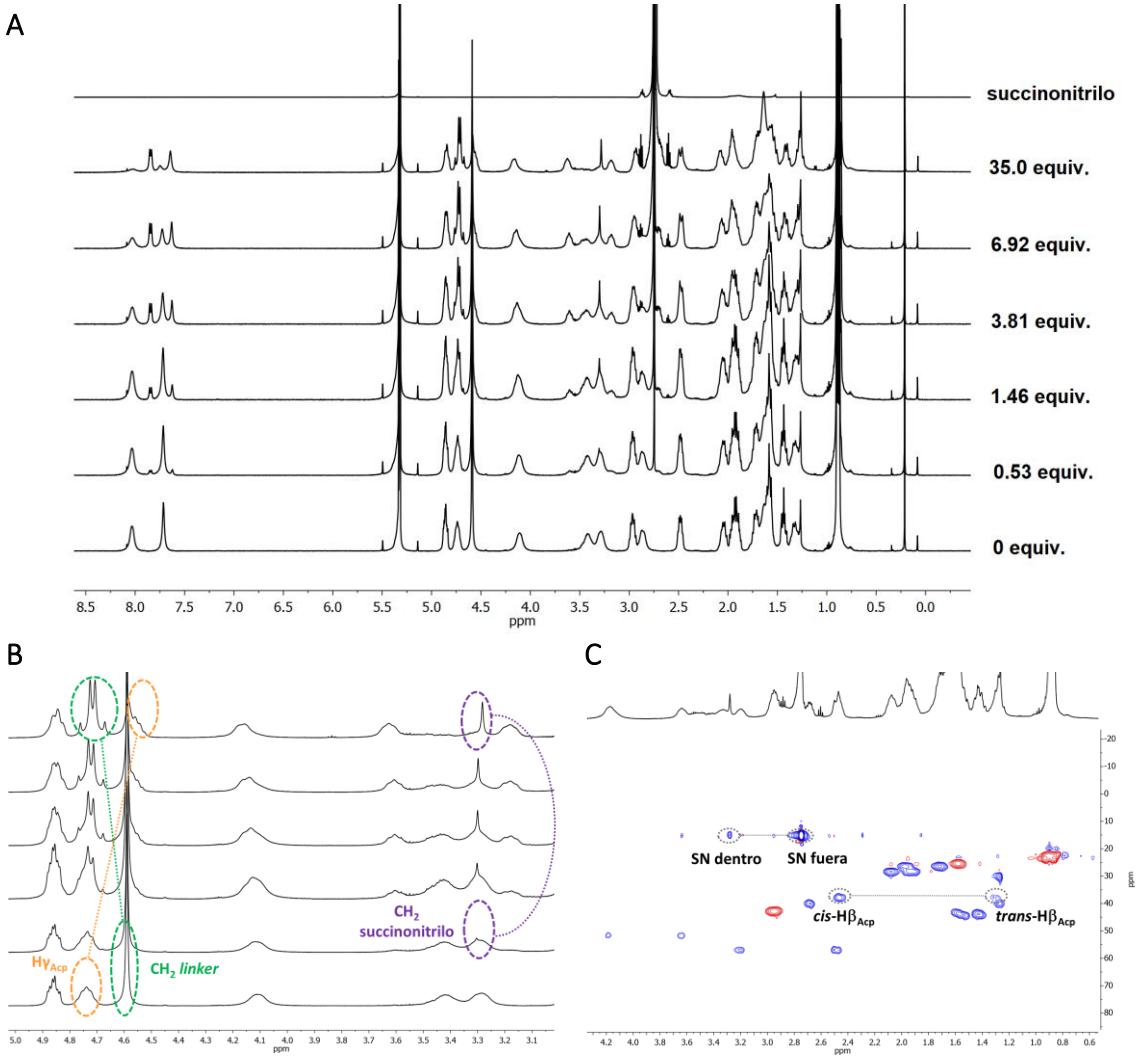


Figura 151. A) Espectros de ^{1}H RMN correspondientes a las adiciones de succinonitrilo sobre una disolución de **CP8** (6.4 mM en CD_2Cl_2, contiene TMSS como estándar); B) ampliación de dichos espectros para enfatizar los cambios más relevantes observados tras la adición de 35 equivalentes; C) experimentos HSQC tras la adición de 35 equivalentes.

El protón del triazol también se apantalla ligeramente, desde 7.72 hasta 7.62 ppm. Esto se traduce en que, probablemente, el triazol tenga que girarse ligeramente para dejar hueco al huésped, y la alineación con el grupo C≡N no es óptima para una fuerte interacción CH···N. Sin embargo, otros cambios observados parecen indicar que, en efecto, hay una molécula de succinonitrilo en la cavidad de **D8**. La señal correspondiente al metileno que actúa de *linker* se desdobla en un sistema AB (Figura 151B, en verde), que sugiere una pérdida en la libertad conformacional del brazo triazólico, transformando los protones en diastereotópicos. Además, se desapantalla ligeramente, de 4.59 a 4.71 ppm. Los protones $H\gamma_{Acp}$ se apantallan (Figura 151B, en naranja), lo que pudiera estar correlacionado con el menor empaquetamiento de la lámina β del dímero. De nuevo se observa el apantallamiento de los *trans*-$H\beta_{Acp}$ (Figura 151C), al igual que en la encapsulación de MN. Esto podría deberse a la presencia de los dos metilenos de SN en la cavidad. Además de estos cambios significativos, se advirtió la aparición de un singlete a 3.30 ppm que no pertenece a ninguno de los protones de **D8** y cuya intensidad aumenta con las sucesivas adiciones de SN (Figura 151B, en morado). Este singlete no deriva de ninguna impureza del succinonitrilo que se estaba utilizando en la valoración. En el espectro de HSQC se aprecia que este singlete tiene una señal de cruce con el carbono del SN en su ^{13}C RMN (Figura 151C). Por tanto, los singletes a 3.30 y 2.75 ppm pertenecen ambos a la molécula de succinonitrilo, pero en sus estados encapsulado y libre, respectivamente.

Para ambos huéspedes, malononitrilo y succinonitrilo, se hicieron optimizaciones de geometría usando cálculos DTF, el objetivo era visualizar cómo se adaptarían ambas moléculas en la cavidad de **D8**. La estructura optimizada de **MN⊂D8** muestra a todos los triazoles apuntando al interior de la cavidad (Figura 152A y B), con una distancia promedio $d_{H\text{-}N}$ de 2.65 Å, menor que la observada en la estructura cristalina de **ACN⊂D8**. Esto es coherente con el desapantallamiento que sufren los protones triazólicos tras la adición de MN. Además, el metileno del MN queda justo en la zona intermedia entre los dos CPs, muy próximos a los $H\beta_{Acp}$, lo que también encaja con los cambios observados experimentalmente para *trans*-$H\beta_{Acp}$. Por otro lado, la estructura optimizada para **SN⊂D8** (Figura 152C y D) también muestra a los nitrilos rodeados por los protones triazólicos, con una distancia promedio $d_{H\text{-}N}$ de 2.36 Å, que no se ajusta a la observado experimentalmente, pues la señal del protón del triazol se apantalla ligeramente.

Hay que resaltar que en estos cálculos no hemos tenido en cuenta las moléculas de disolvente que rodean la estructura, y es posible que, a fin de dejar espacio al SN encapsulado, los triazoles roten ligeramente hacia afuera y queden estabilizados por otras interacciones CH···N con las moléculas de SN que hay en el medio. Además, la señal que vemos para el protón triazólico podría ser un promedio entre las diferentes orientaciones del anillo. Analizando las distancias del enlace de hidrógeno, en el caso de **MN⊂D8** es de 1.85 Å, mientras que para **SN⊂D8** se observa un incremento de su longitud hasta 1.98 Å. Esta observación es congruente con la mayor longitud del huésped (SN), por lo que es necesario incrementar el espacio de la cavidad para acomodarlo. Consecuentemente, se debe aumentar ligeramente la distancia entre los dos CPs, algo que queda reflejado en el desplazamiento a campo alto de la señal del protón amídico. Por otra parte, los dos carbonos centrales de la molécula de succinonitrilo rellenan mejor la cavidad de **D8**, en torno al bolsillo hidrofóbico creado por los Hβ

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Acp. Esto nos lleva a concluir que las interacciones hidrofóbicas que se establecen con SN podrían ser las responsables de la mayor afinidad que observamos, a pesar de que la encapsulación de este huésped debilite las interacciones **CP8**-**CP8**.

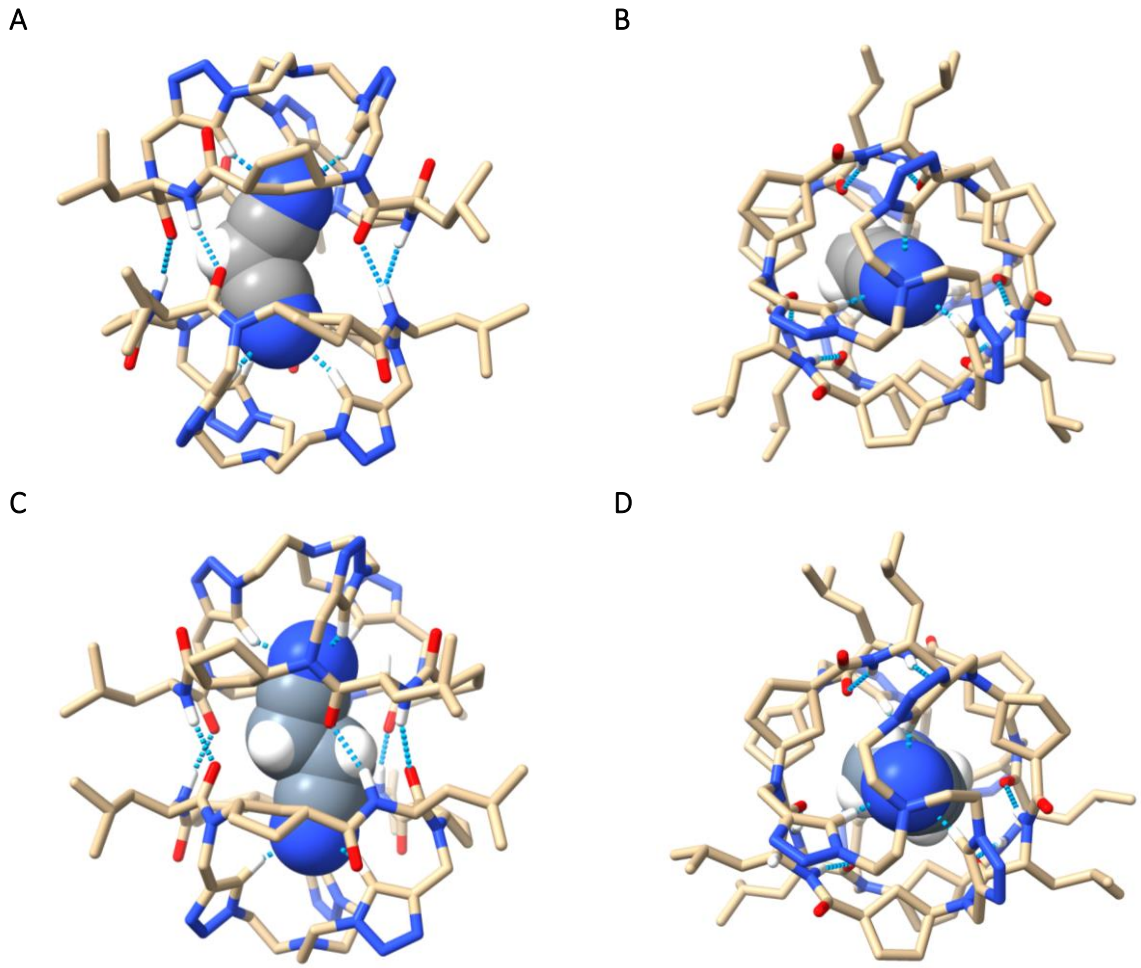


Figura 152. Representación de las geometrías de mínima energía obtenidas empleando B3LYP/6-31G(d,p) para las especies **MN⊂D8** (A y B) y **SN⊂D8** (C y D).

Los estudios con ambos bisnitrilos muestran que la tapa de *tris*-triazol puede actuar como dadores de enlaces de hidrogeno y favorecer la encapsulación de moléculas aceptoras. Sin embargo, no creíamos que la capacidad de **D8** para albergar bisnitrilos de mayor tamaño fuese mejor que la que ya habíamos estudiado para MN y SN, ya que no puede extender su cavidad en mayor medida. Esto nos disuadió de continuar por esta vía. Decidimos, por tanto, centrarnos en el estudio de su capacidad para reconocer aniones.

6.3.3.2 Estudio del reconocimiento de aniones por parte de CP8.

Con el objetivo de evaluar la respuesta de **D8** frente a la presencia de aniones, decidimos comenzar por los haluros solubles en medios orgánicos, utilizando TBAF, TBACl y TBABr para seguir, mediante valoraciones por ^{1}H RMN, los cambios que se pudieran presentar en el espectro del CP. La simplicidad del espectro de **D8**, que se debe a su simetría *C3*, hace que esta sea una buena opción para evaluar su comportamiento. Además, tanto los protones amídicos como los del triazol aparecen claramente diferenciados a campo bajo. Satisfactoriamente, la adición de cantidades crecientes de Cl^- o F^- evidenciaba la interacción entre el receptor y cada uno de los aniones, provocando la desaparición progresiva de todas las señales de **D8** y la simultánea aparición de otro grupo de señales (Figura 153) que sugieren la formación de un complejo entre **D8** y el haluro. El análisis de MS de la muestra con Cl^- arrojaba evidencias sobre

la formación de este complejo (ver Figura 204, sección experimental, página 386), debido a la observación de los picos de masa 540.49132 y 1045.59739, que hemos atribuido a [(**CP8** + 2Cl)/2]$^-$ y [**CP8** + Cl]$^-$, respectivamente. En los primeros experimentos de valoración que realizamos, decidimos usar TMSS como estándar interno, ya que no entorpece la apreciación de cambios en el espectro del CP y nos permitiría cuantificar el proceso. Sin embargo, la adición de fluoruro originaba una descomposición del TMSS, por lo que decidimos utilizar dioxano como estándar.

En estos primeros experimentos advertimos varios cambios fundamentales. El primero de ellos es la diferencia de afinidad para los tres haluros. Mientras que 3.13 equivalentes de F^- fueron suficientes para promover la desaparición completa de las señales de **D8** (Figura 153A), se necesitaron cerca de 25 equivalentes en el caso de Cl^- (Figura 153B). Contrariamente, la adición de 4.5 equivalentes de Br^- no produjo ningún cambio. Esto nos hizo pensar que **D8** presentaba selectividad de tamaño, y que Br^- era demasiado grande para poderse acomodar en su cavidad, siendo F^- el más adecuado para este fin. Por otro lado, el nuevo grupo de señales que aparece en el espectro de ^{1}H RMN era muy similar para ambos aniones, F^- y Cl^-, habiendo una sola señal que se diferenciaba notablemente, la del protón amídico, aunque en ambos casos esta señal se desapantalla. Resuena a 8.00 ppm en el espectro de **D8** y la complejación con F^- se desplaza hasta 10.0 ppm, pero solo hasta 8.62 ppm tras la adición de Cl^-. Este comportamiento nos lleva a plantear que, cualquiera que sea el cambio conformacional que sufre **D8** tras la adición de estos aniones, es similar para ambos y, posiblemente, lleva a la implicación directa de los protones amídicos en el reconocimiento del haluro. Un tercer aspecto llamativo es el comportamiento del protón triazólico. Esperábamos una tendencia al desplazamiento a campo bajo debido a su potencial interacción con los aniones, sin embargo, observamos justo lo contrario. Para la especie **D8**, la señal de este protón resuena a 7.66 ppm, mientras que tras la interacción con el fluoruro se desplaza hasta 7.38 ppm. En los estudios realizados con el cloruro la señal está algo más apantallada, a 7.29 ppm. En ambos casos, no cambia su desplazamiento durante la valoración. Concluimos que este protón no participa activamente en el proceso de reconocimiento. Por último, nos llama la atención el cambio que sufren los protones $H\alpha_{Leu}$ y $H\gamma_{Acp}$ tras la adición de TBAF o TBACl. Mientras que los primeros se apantallan tras la formación del complejo (de 4.81 a 4.15 ppm), lo cual es típico en la formación de α-hélices,[583] los $H\gamma_{Acp}$ se desapantallan (de 4.73 a 4.90 ppm).

[583] a) Jiménez, M. A.; Nieto, J. L.; Herranz, J.; Rico, M.; Santoro, J. *FEBS Lett.* **1987**, *221*, 320-324. b) Sharman, G. J.; Griffiths-Jones, S. R.; Jourdan, M.; Searle, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12318-12324. c) Avbelj, F.; Kocjan, D.; Baldwin, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, *101*, 17394-17397.

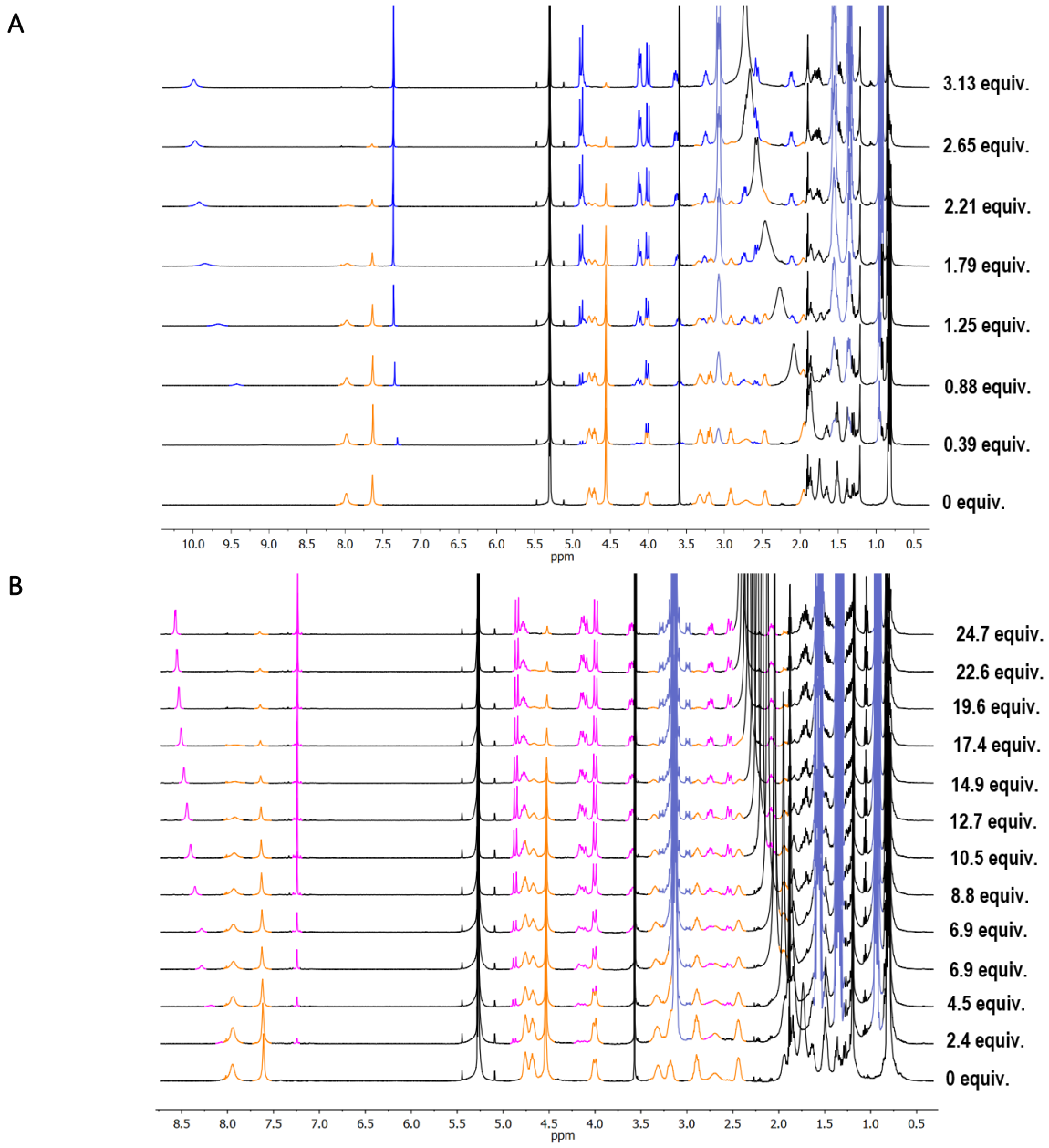


Figura 153. Conjunto de espectros correspondientes al seguimiento por ^{1}H RMN de la valoración de **CP8** con A) TBAF ([**CP8**]= 7.3 mM) y B) TBACl ([**CP8**]= 5.5 mM), en 10% CD_3CN/CD_2Cl_2. Aparecen en naranja las señales más remarcables de **D8**, en azul las del complejo con fluoruro y, en fucsia, las correspondientes al complejo con cloruro. Las señales en azul claro pertenecen al ion TBA^+. En ambos casos se ha usado dioxano (2.5 mM), singlete a 3.6 ppm, como estándar interno.

Tras obtener los complejos con fluoruro y cloruro, estudiamos los espectros 1D y 2D RMN de ambas especies, para poder asignar las nuevas señales de **D8** complejado. Observamos que sus correlaciones son prácticamente idénticas, lo que nos reafirma en la idea de que la reorganización estructural que sufre **D8** en presencia de estos aniones es muy parecida. Además de los cambios mencionados previamente en relación con el protón amídico y del triazol, que son los más evidentes, hay algunos otros que también llaman la atención cuando se estudia en detalle el complejo y que nos informan sobre el cambio conformacional que ha tenido lugar (Figura 154).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

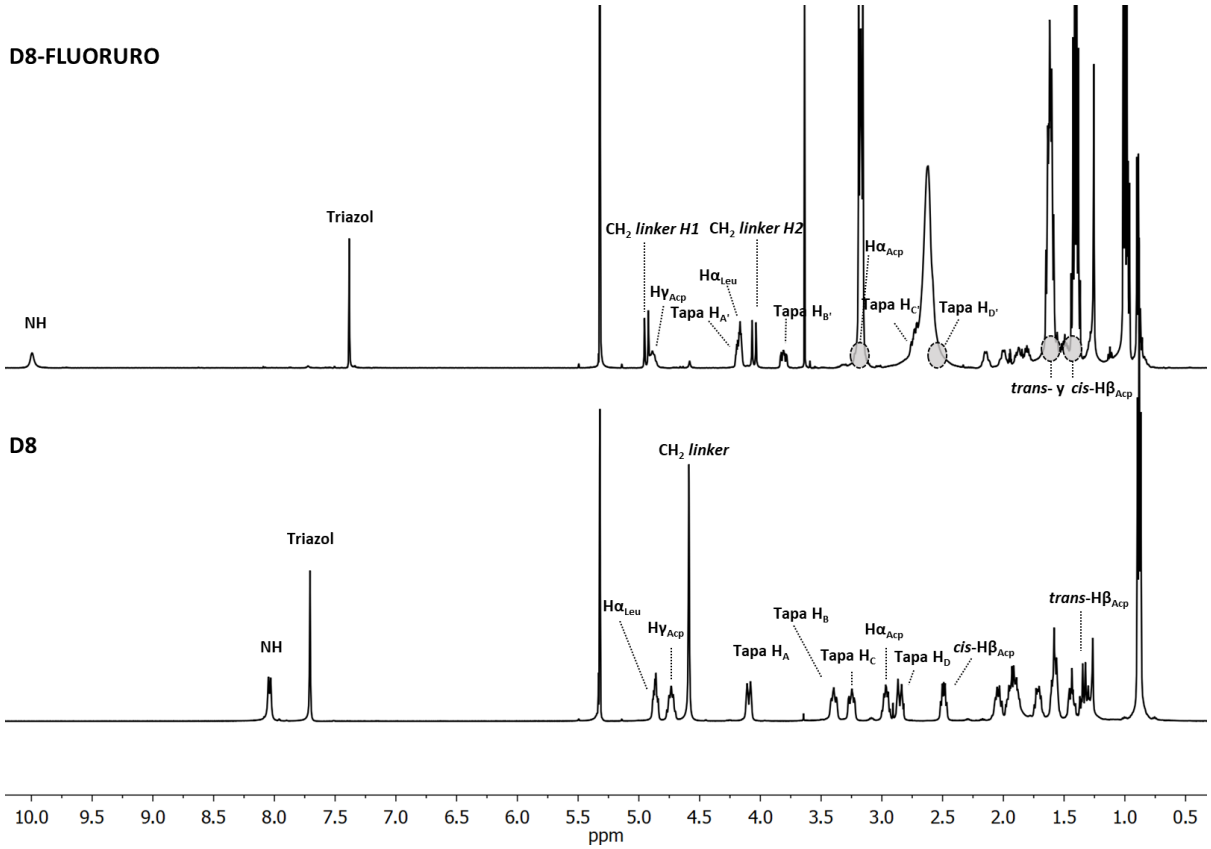


Figura 154. Comparación de los espectros de ^{1}H RMN de **CP8** antes y después de la adición de fluoruro (TBAF).

El *linker* metilénico entre el CP y la tapa, que aparecía como singlete a 4.59 ppm en el espectro de **D8**, se desdobla en dos dobletes, que aparecen a 4.90 y 4.04 ppm, evidencia de la disminución en la libertad conformacional de este conector. El protón $H\alpha_{Leu}$, inicialmente a 4.81 ppm, se apantalla marcadamente hasta 4.15 ppm en el caso de fluoruro, y hasta 4.19 ppm tras la adición de cloruro. El protón $H\gamma_{Acp}$, sin embargo, sufre un cambio en sentido contrario, a campo bajo, pasando de 4.73 a 4.90 ppm para el fluoruro, y a 4.83 ppm para el cloruro. En cuanto a los protones de los dos metilenos de la tapa, marcados como A-D, en ambos casos (especie libre y complejada) H_A y H_B son protones geminales, al igual que H_C y H_D. Para **D8** estas cuatro señales aparecen entre 4.09-2.85 ppm, siendo H_A el que aparece más desapantallado de los cuatro. Para la especie complejada, se advierte una mayor diferencia en el entorno químico de $H_{A'-B'}$ [4.19 ($H_{A'}$) y 3.81 ($H_{B'}$) ppm] con respecto al par $H_{C'-D'}$ [2.74 ($H_{C'}$) y 2.61 ($H_{D'}$), ya que resuenan en grupos dos a dos bastante distanciados en el espectro. Por último, se aprecia un cambio considerable en los protones $H\beta_{Acp}$. Los protones *cis*- y *trans*- (con respecto a los sustituyentes) presentaban desplazamientos químicos notablemente dispares ($\Delta\delta$= 1.15 ppm) para la especie libre **D8**, siendo el *cis*-$H\beta_{Acp}$ el más desapantallado. Tras la complejación, ambos aparecen a campo alto y en entornos químicos similares ($\Delta\delta$= 0.18 ppm), siendo el *trans*-$H\beta_{Acp}$ el más desapantallado en esta ocasión. Por otra parte, la comparación de los picos de nOe de las especies libre y complejada reafirma que ha tenido lugar una dramática reorganización del esqueleto peptídico tras la complejación, según los cambios observados en el entorno de los protones triazólico, CH_2 *linker*, $H\gamma_{Acp}$, y NH (Figura 155).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

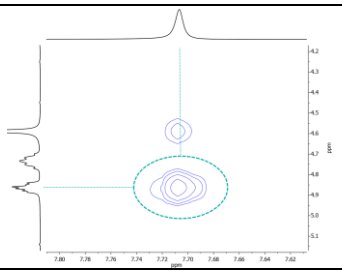
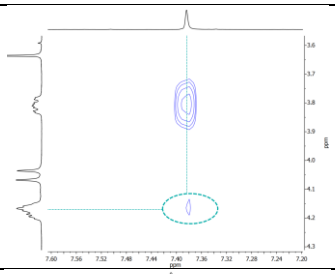
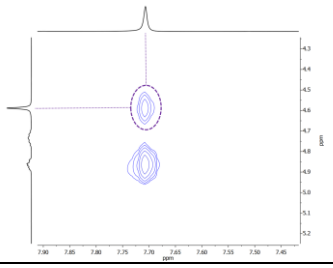
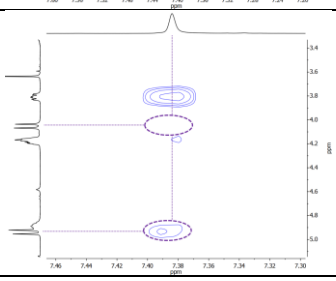
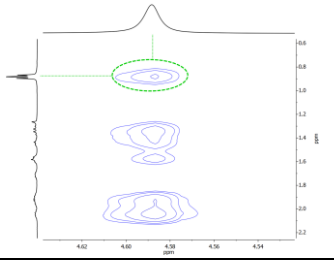
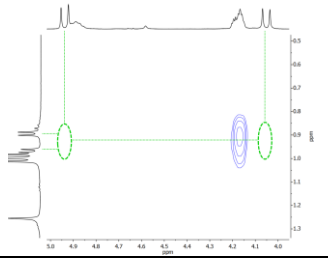
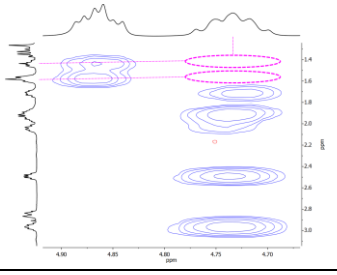
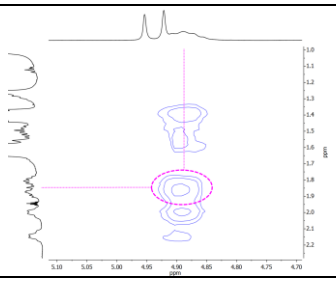
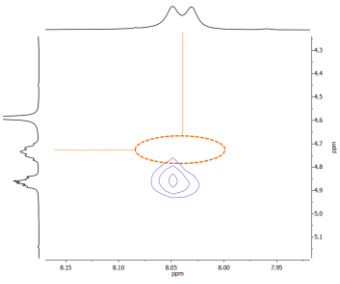
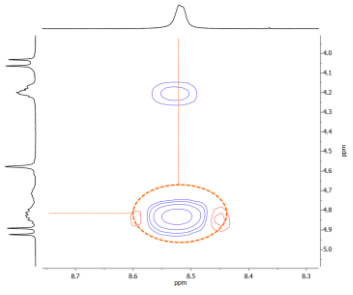
	ANTES DE LA COMPLEJACIÓN (**CP8**)	DESPUÉS DE LA COMPLEJACIÓN F^-/Cl^-
PROTÓN TRIAZOL		
$H\alpha_{Leu}$		
CH_2 *Linker*		
CH_2 *Linker*		
CH_3 Leu		
$H\gamma_{Acp}$		
CH_2 Leu		
NH		
$H\gamma_{Acp}$		

Figura 155. Cambios más relevantes en los picos de cruce de nOe antes y después de la complejación de **CP8** con F^-/Cl^-.

Analizaremos punto por punto estos cambios, comenzando con aquellos que se aprecian claramente para el protón triazólico (Figura 155A). En el espectro de ROESY previo a la complejación, este protón presenta nOe fuerte con los protones $H\alpha_{Leu}$ y también con el singlete perteneciente al *linker* metilénico (indicados en azul y morado, respectivamente). Como

comentábamos previamente, estos nOes junto con otros (Figura 148), nos informan de la flexibilidad de la tapa *tris*-triazólica de **D8**. Cuando se forma el complejo con F^- o Cl^-, el pico de cruce con $H\alpha_{Leu}$ prácticamente desaparece. Por su parte, cuando el singlete del *linker* CH_2 se desdobla en dos dobletes, solo uno de ellos, el que aparece a campo más alto, tiene pico de cruce con el protón triazólico de la especie complejada. Atendiendo a ese CH_2, nos sorprendió observar que el nOe que lo correlaciona con los metilos de la leucina en **D8**, desaparece completamente cuando se forma el complejo (Figura 155B), sin que ninguno de los dobletes que pertenecen ahora a ese metileno mostrasen pico de cruce con las nuevas señales de los metilos de la leucina. En cuanto al protón $H\gamma_{Acp}$, el cambio más notable es la aparición de un nuevo pico de cruce con el CH_2 de la leucina, que no estaba presente para la especie libre **D8** (Figura 155C). Por último, también aparece una nueva e inesperada correlación para el NH con el $H\gamma_{Acp}$ (Figura 155D), que tampoco se observaba para la especie no complejada **D8**. La información que arrojan estas comparaciones nos lleva a determinar que, una explicación posible para que se observen esos nOe es que se haya producido un plegamiento del esqueleto peptídico. Nos empezamos a plantear entonces si la especie que reconoce a los aniones es **D8** o **CP8**. Se debe principalmente a que encontrábamos poco probable que el protón NH pudiese, simultáneamente, orientarse apropiadamente para mantener la interacción NH···O, de la que depende la dimerización, y a la vez situarse cerca en el espacio del protón $H\gamma_{Acp}$, como muestra la señal de nOe (Figura 155D).

Al analizar el comportamiento de **D8** tras la adición de TBAF o TBACl (Figura 153), mencionamos que el desplazamiento a campo bajo del NH era uno de los cambios más evidentes. Cuando reparamos en el posible plegamiento de **D8** en la formación del complejo, decidimos evaluar el papel del agua en el proceso. El objetivo era determinar si estos cambios observados para el protón de la amida pudiesen estar relacionados con la presencia de agua de hidratación en las sales comerciales utilizadas y, si esto, a su vez, fuese el desencadenante del plegamiento del péptido, o por el contrario la presencia de agua compitiese en el reconocimiento de los aniones. Para ello, decidimos añadir tamices moleculares de 4 Å activados sobre la disolución del complejo entre **D8** y cloruro. Dejamos actuar durante toda la noche, esperando que los tamices pudiesen retirar eficientemente el agua de la muestra. Pasado este tiempo, registramos el espectro de protón nuevamente, y comprobamos asombrados que el equilibrio se había revertido, casi completamente, en favor de la recuperación de **D8** libre. Sobre esa misma muestra, se adicionaron instantáneamente 10 µL de agua y se volvió a registrar el espectro. Las señales de **D8** habían desaparecido por completo, solo se apreciaba el mismo grupo de señales que habíamos asignado previamente al complejo con cloruro. Todo parecía indicar que el proceso de complejación era dependiente del agua.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

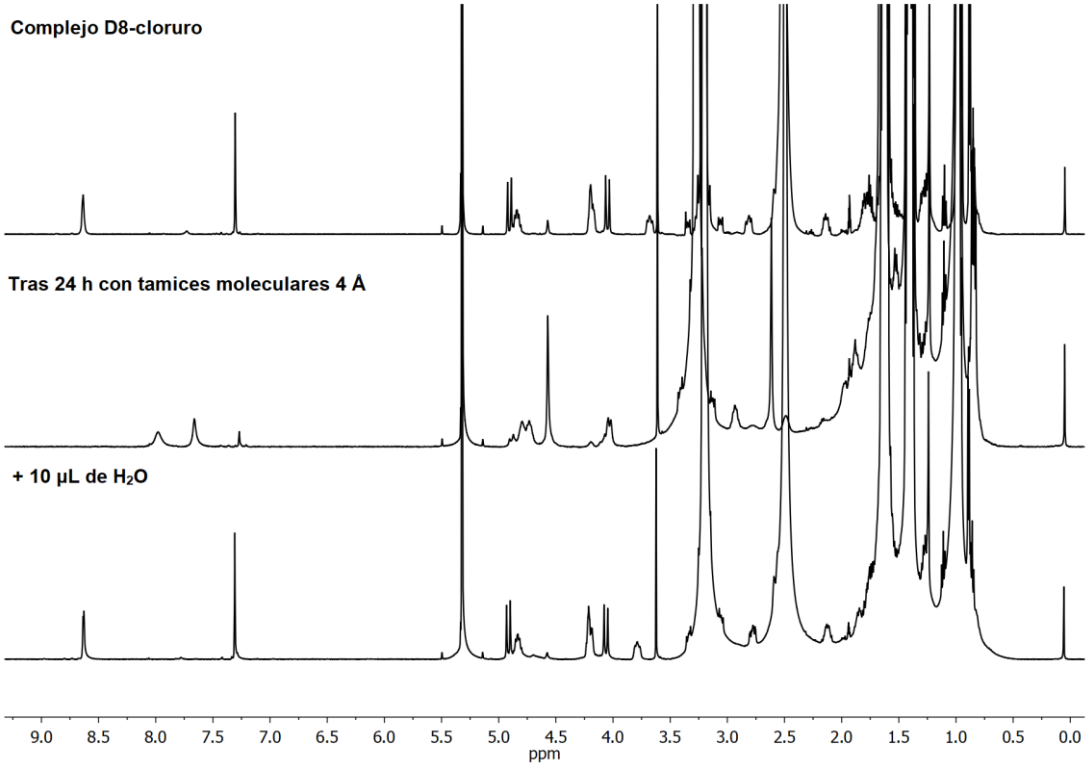


Figura 156. Efecto del agua en el reconocimiento de cloruro. Espectros de ^{1}H RMN (arriba) del complejo **CP8** (5.5 mM) tras la adición de 25 equiv. cloruro (TBACl), (centro) tras la posterior adición de tamices moleculares (4Å) y (inferior) tras la adición de H_2O (10 µL).

Después de confirmar el papel fundamental del agua en el proceso de reconocimiento de cloruro y, previsiblemente, del resto de aniones, comprobamos si la sola adición de agua sobre **D8** provocaba ya un cambio sustancial en el espectro. No fue así, ya que el espectro permanecía prácticamente inalterado. Lo que se observó fue la definición de algunas señales y el ligero desplazamiento a campo bajo del protón del triazol (de 7.65 a 7.73 ppm), probablemente debido a la interacción con las moléculas de agua. Sin embargo, los enlaces de hidrógeno no parecen debilitarse ya que el protón NH no se desplaza. En ningún caso se aprecian cambios comparables a aquellos observados en la presencia de aniones. Por tanto, la presencia de agua, pese a ser fundamental para el proceso de reconocimiento, no actúa en solitario para promover el cambio que sufre **D8**.

Al mismo tiempo, descubrir el papel activo del agua nos llevó a plantearnos si aquella falta de respuesta que habíamos observado con TBABr pudiera deberse a una carencia de agua más que a una cuestión de tamaño, ya que esta sal es menos higroscópica que TBACl y mucho menos que TBAF.[584] Repetimos, por tanto, el mismo experimento, pero esta vez adicionando una pequeña cantidad de agua mili-Q previamente a la adición de sal. La adición de 4.5 equivalentes de TBABr, que en ausencia de agua no había promovido ningún cambio (Figura 157A), hizo aparecer un segundo grupo de señales con un patrón muy similar al registrado para las adiciones de fluoruro y cloruro. Posteriores adiciones de TBABr, hasta 28.1 equivalentes, hicieron desaparecer por completo las señales de **D8** (Figura 157B). Confirmamos, por tanto,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[584] Klemperer, W. G. *Inorg. Synth.* **1990**, 27, 74-85.

que el receptor sí era capaz de acoger Br^-, pero que necesitaba más agua que la disponible en la disolución preparada a partir de la sal comercial. En el nuevo complejo formado, la señal del NH se desplaza hasta 8.37 ppm, menos que en los complejos con cloruro y fluoruro (8.62 y 10.0 ppm, respectivamente). Esta tendencia nos lleva de nuevo a pensar que el protón NH estaba directamente implicado en la interacción con el anión.

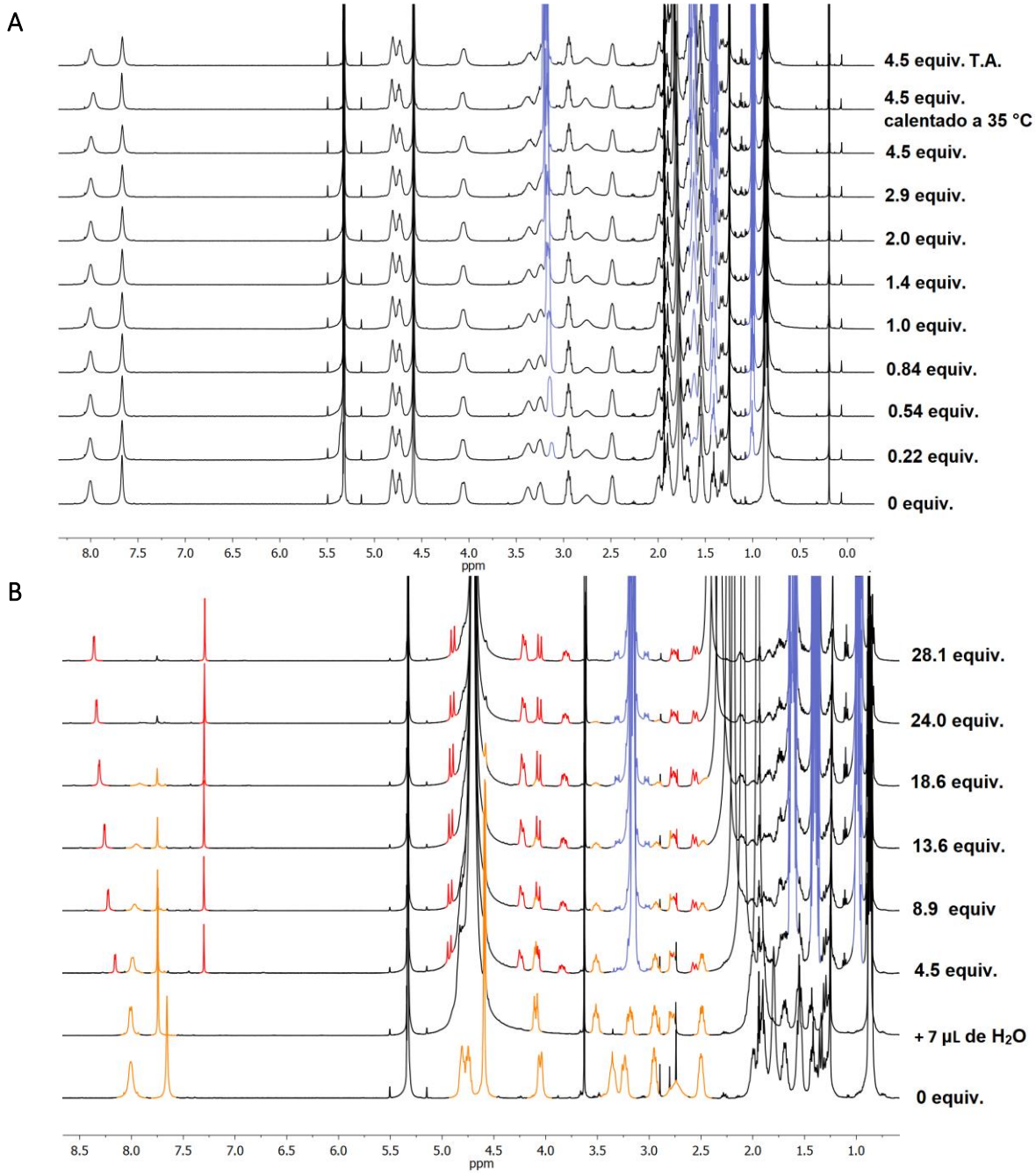


Figura 157. Conjunto de espectros obtenidos en el seguimiento por ^{1}H RMN de la valoración de **CP8** con TBABr. A) Adición de TBABr sobre **CP8** (4.8 mM, 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, TMSS como estándar) en ausencia de agua adicional. B) Adición de TBABr sobre **CP8** (5.6 mM, 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, dioxano como estándar) posteriormente a la adición de 7µL de H_2O. Las señales correspondientes a **D8** se muestran en naranja, mientras que en rojo aparecen aquellas asignadas al complejo formado con bromuro. En azul claro, se muestran las señales de TBA^+.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La confirmación definitiva del papel que juega el agua en este proceso llegó gracias a la resolución de las estructuras cristalinas para los complejos con cloruro y fluoruro. En ambos casos en la celdilla unidad hay dos subunidades de **CP8** que no interaccionan entre sí, si no que encierran entre ambas un agregado formado por tres aniones y varias moléculas de agua. La especie **D8** se disocia para permitir que los protones amida (NH) puedan establecer enlaces de hidrógeno con los aniones y las moléculas de agua de este clúster. Tal y como habíamos aventurado tras el análisis de los datos de RMN, **CP8** se deforma en el proceso de complejación, perdiendo su forma circular (Figura 147) para adoptar una forma de pirámide trigonal. El vértice superior de esta pirámide es la amina terciaria de la tapa. Las aristas, son los tres brazos triazólicos, donde el anillo queda ligeramente ladeado orientando el protón hacia fuera de la cavidad molecular. Esto explica por qué no se produjo ningún cambio en el desplazamiento químico de estos protones (al seguir la adición por RMN) que indicase la interacción con los aniones estudiados. Finalmente, la base triangular de esta pirámide es el esqueleto peptídico, donde los residuos de leucina se sitúan en sus vértices. Las cadenas laterales de las leucinas se disponen hacia fuera, creando un armazón hidrofóbico que protege al clúster encapsulado del medio externo. En esta conformación, todos los grupos carbonilo, tanto de los residuos *D*-α-Leu como *L*-γ-Acp, quedan orientados hacia la cara externa del CP. De esta manera se reducen las repulsiones entre los aniones y los pares solitarios de los oxígenos carbonílicos. A su vez, todos los NH quedan orientados hacia la cara contraria, la cara interna, donde interaccionan, mediante enlaces de hidrógeno, con los aniones o las moléculas de agua del clúster. Aunque ambas estructuras son muy similares, de ahí que observásemos grupos de señales análogos por RMN tras la adición de TBACl y TBAF, los complejos de fluoruro y cloruro presentan algunas características distintivas.

En el complejo con cloruro, denominado como **$(3Cl^{-}\cdot 5H_2O)\subset$D8**, tres aniones y tres moléculas de agua se disponen ocupando seis posiciones químicamente equivalentes e intercambiables, formando un hexágono entre las dos subunidades de **CP8** (Figura 158A y B). Además, otras dos moléculas de agua se disponen en los planos superior e inferior de dicho hexágono, en una posición equidistante a todos sus vértices. Los tres NH de una de las subunidades forman enlaces de hidrógeno solo con las tres moléculas de agua de ese hexágono. Por su parte, los otros tres NHs disponibles, que son aportados por la segunda subunidad de **CP8**, interaccionan con los tres aniones cloruro. Esta distribución deja a cada anión cloruro estabilizado mediante tres enlaces de hidrógeno, dos con las moléculas de agua adyacentes ($d_{O\cdots Cl}$= 3.07 Å) y uno con el NH ($d_{H\cdots Cl}$= 2.35 Å). Además, las dos moléculas de agua situadas en posiciones apicales también pueden participar a través de enlaces de hidrógeno con los aniones cloruro o con las moléculas de agua que forman parte del complejo ecuatorial hexagonal ($d_{O\cdots Cl/O}$= 3.60 Å). En cuanto a la disposición relativa de ambas subunidades de **CP8**, la vista superior del complejo **$(3Cl^{-}\cdot 5H_2O)\subset$D8** (Figura 158B) nos muestra que, prácticamente, coinciden uno sobre otro dejando una estructura que recuerda a una bipirámide trigonal. Ambas unidades distan entre sí en torno a 7.22 Å, dejando un hueco que se encuentra ocupado por el clúster.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

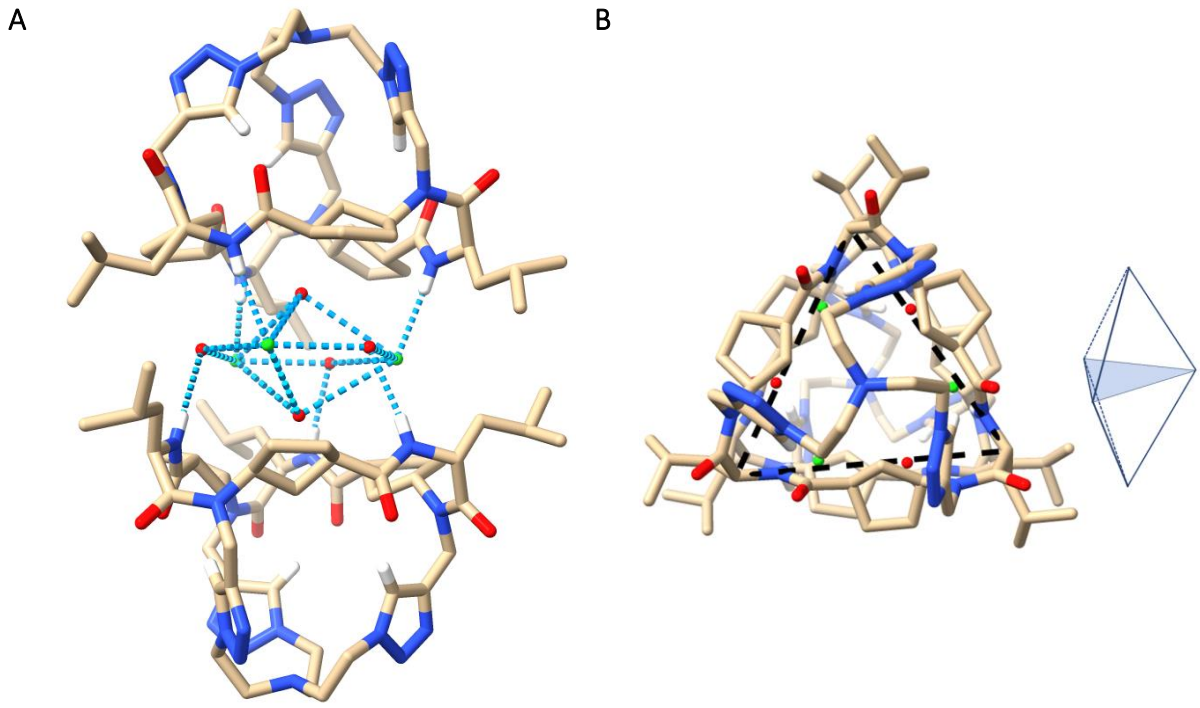


Figura 158. Visión frontal (A) y superior (B) de la estructura cristalinas del complejo **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8**.

En cuanto al complejo con fluoruro, la resolución de la estructura cristalina muestra dos unidades del complejo **(3F⁻·8H₂O)⊂D8** co-cristalizadas (Figura 159). En esta estructura, lo primero que llama la atención es que la celdilla unidad tiene dos unidades diméricas de **CP8** separadas por un eje de inversión de simetría. En el interior de la cápsula hay un clúster formado por ocho moléculas de agua y tres aniones, confirmando la mayor tendencia del fluoruro a la hidratación. Debido a la similitud electrónica de fluoruro y oxígeno, no es posible diferenciarlos, aunque sí se puede afirmar que hay tres iones fluoruro formando parte del clúster, en base al número de contraiones TBA^+ que co-cristalizaron junto con el complejo. Además, la ocupación del fluoruro en las dos unidades de **(3F⁻·8H₂O)⊂D8** que co-cristalizaron no es exactamente la misma (véase Figura 205, sección experimental, página 386), aunque ambos complejos presentan una distribución análoga. En uno de estos complejos, todos los aniones fluoruro se encuentran formando enlaces de hidrógeno con los protones amídicos de una misma subunidad de **CP8** (Figura 159A, izquierda). Sin embargo, probabilísticamente, en el otro complejo **(3F⁻·8H₂O)⊂D8**, dos aniones interaccionan con una de las subunidades mientras que, el tercero, lo hace con la otra (Figura 159A, derecha) En ambos casos, cada fluoruro se encuentra formando cuatro enlaces de hidrógeno, completando así su esfera de hidratación.[384d] Por tanto, cada uno de los aniones establece un enlace de hidrógeno con el protón de la amida del CP, y además está rodeado por tres moléculas de agua ($d_{H\cdots F}$= 1.83 Å y $d_{O\cdots F}$= 2.70 Å) (véase las distancias en detalle en la Figura 206, sección experimental, página 387). En cuanto a las moléculas de agua restantes, existen dos tipos diferentes, las que se sitúan en las posiciones axiales y las tres dispuestas en la zona ecuatorial del conglomerado. Las aguas axiales ocupan la zona más profunda de la cavidad y establecen enlaces de hidrógeno con las posiciones ocupadas por fluoruro/agua. Las tres moléculas de agua ecuatoriales, forman una especie de cinturón en la que cada una de ellas solo establece dos enlaces de hidrógeno. Se localizan precisamente en aquellos huecos interpeptídicos que no están protegidos por el armazón hidrofóbico de las leucinas (ver moléculas de agua axiales y ecuatoriales en detalle en

la Figura 207, sección experimental, página 388). Precisamente para el complejo **(3F$^-$·8H$_2$O)⊂D8** esta protección está reforzada, ya que las dos subunidades de **CP8** se encuentran rotadas 60° una con respecto de la otra (Figura 159B). Esto provoca una mayor cobertura lateral por parte de las cadenas isobutílicas de las leucinas. La distancia interpeptídica es de 7.64-8.00 Å en este caso, lo que parece estar relacionado con el mayor tamaño del clúster.

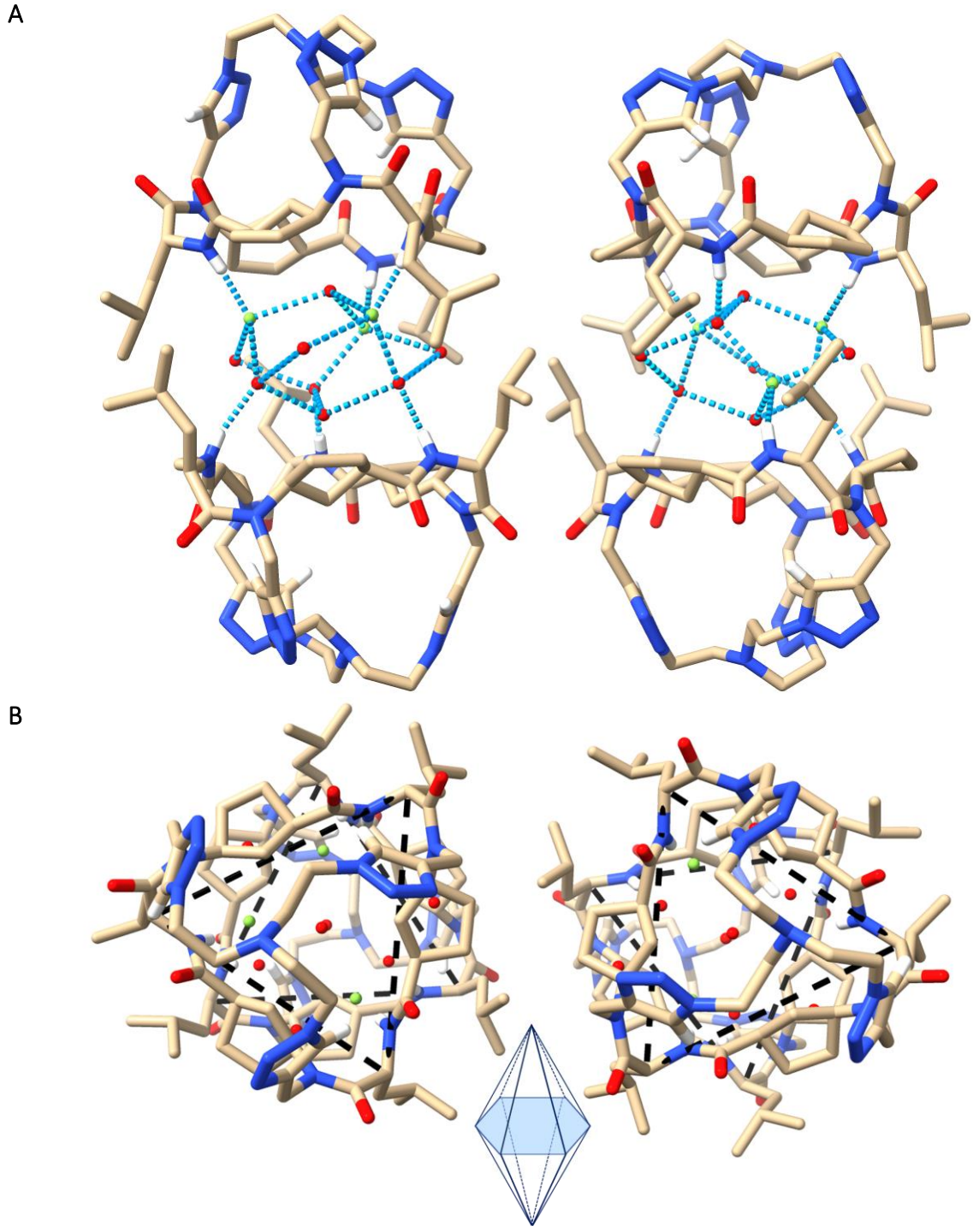


Figura 159. Visión frontal (A) y superior (B) de la estructura cristalinas del complejo **(3F$^-$·8H$_2$O)⊂D8**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Otra diferencia que llama la atención en comparación con la estructura cristalina de **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8** es la disposición de los brazos triazólicos. Aunque para **(3F⁻·8H₂O)⊂D8** los anillos también se orientan lateralmente, con el protón apuntando hacia fuera de la cavidad, los dos metilenos que los conectan con el nitrógeno de la amina terciaria se disponen de manera diferente para cada brazo. El par electrónico de este nitrógeno apunta hacia un lateral de la cavidad, en lugar de hacia el centro, tal como ocurre en **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8**. Posiblemente esta deformación podría deberse al empaquetamiento.

Tras la obtención de las estructuras cristalinas, decidimos examinarlas minuciosamente para comprobar si los cambios estructurales que habíamos observado en disolución, mediante estudios por RMN (Figura 155), tienen correlación con lo que se muestra en estado sólido (Figura 160).

A la vista de los resultados, existe una concordancia entre la información que revelan las estructuras cristalinas y lo que previamente se había percibido en disolución. Con respecto al protón triazólico, la estructura cristalina de **D8** muestra que dista 2.95 Å del protón $H\alpha_{Leu}$, con el cual presenta un nOe fuerte. Para la especie **(3F⁻·8H₂O)⊂D8**, la distancia entre esos mismos protones es de 4.13 Å [4.29 Å en el caso de **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8**] que explica la debilidad del nOe observado entre ellos (Figura 155A y Figura 160A).

Para el caso del metileno que actúa como *linker*, uno de sus protones se encuentra a 2.45 Å de uno de los CH_3 de la leucina en **D8**, lo cual es coherente con el nOe que se observa entre ambos. Tras la complejación, esa distancia pasa a ser 6.52 Å para **(3F⁻·8H₂O)⊂D8** [4.57 Å para **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8**], lo que explicaría la falta de nOe entre ellos (Figura 155B y Figura 160B).

Si nos detenemos ahora en el $H\gamma_{Acp}$, hay 4.47 Å entre este protón y el CH_2 de la leucina en la estructura cristalina de **D8**, lo que se puede correlacionar con la ausencia de nOe. El plegamiento del esqueleto peptídico promovido por la complejación deja a estos protones muy próximos en el espacio, concretamente a 2.21 Å [2.19 Å para **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8**], observándose un claro nOe que los correlaciona (Figura 155C y Figura 160C).

Finalmente, el NH queda alejado de los $H\gamma_{Acp}$ cuando **D8** se encuentra en la conformación plana que le permite dimerizar, concretamente $H\gamma_{Acp}$ dista 4.63 y 4.81 Å con los NHs más cercanos, explicando esto la ausencia de nOe. Sin embargo, solo 2.21 Å separan a estos protones en el complejo **(3F⁻·8H₂O)⊂D8** [2.47 Å en el caso de **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8**]. Esto encaja con el fuerte nOe que aparece entre ambos (Figura 155D y Figura 160D). Queda ahora esclarecida la presencia de este pico de cruce, dado que, como ya se advirtió, no era compatible su proximidad espacial con la dimerización.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

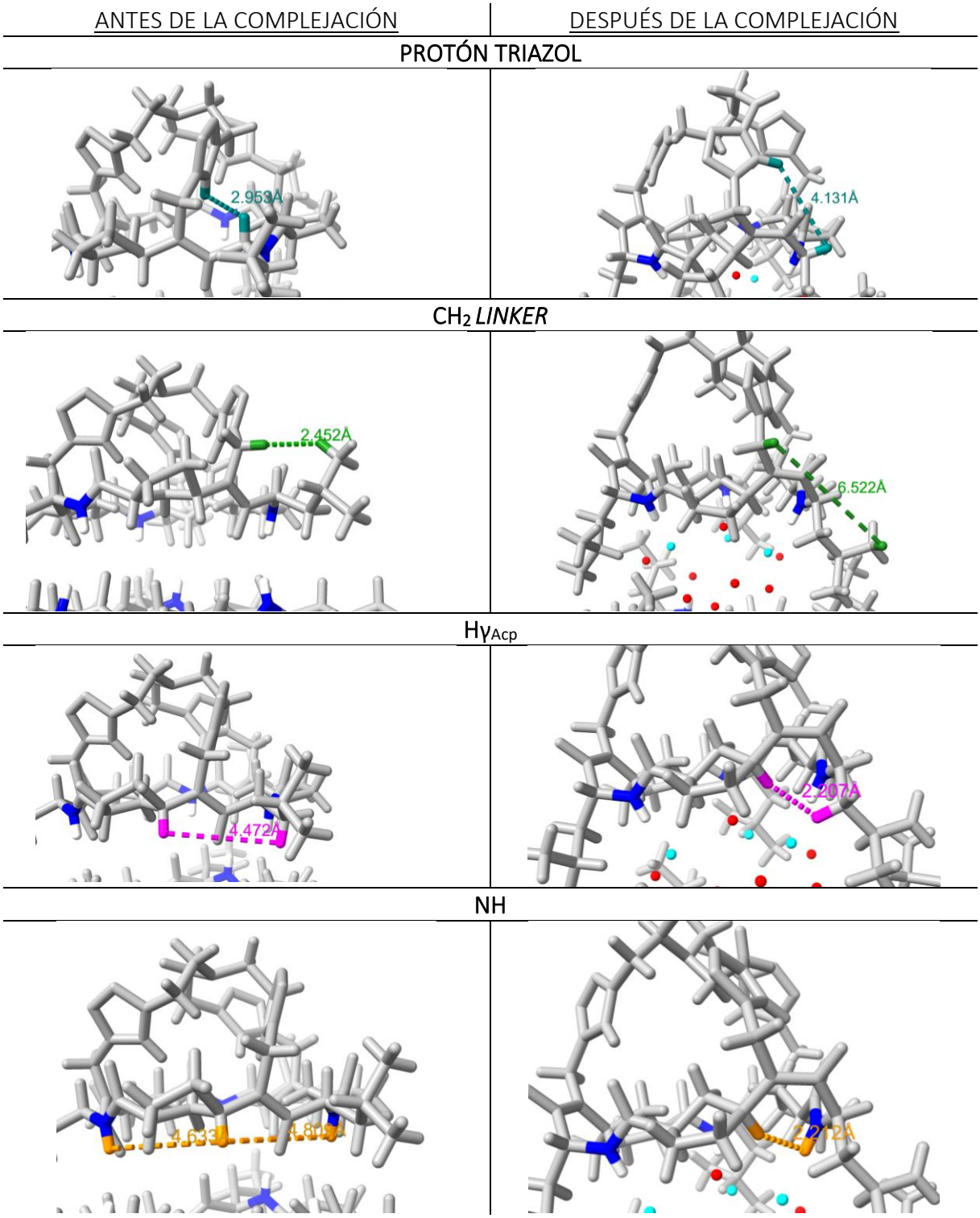


Figura 160. Figuras derivadas de las estructuras cristalinas en la que se denotan los cambios más destacados entre **D8** y **(3F⁻·8H₂O)⊂D8** como consecuencia de la reorganización del esqueleto peptídico. Aunque se resaltan únicamente las distancias medidas para el complejo **(3F⁻·8H₂O)⊂D8**, no hay diferencias significativas con el de **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8**.

El análisis pormenorizado de las estructuras cristalinas de **D8** y **(3A⁻·nH₂O)⊂D8** nos ayudó a comprender una diferencia llamativa en el espectro de ^{1}H RMN de ambas especies que no habíamos podido dilucidar previamente a qué se debía. Se trata del cambio en el desplazamiento químico que sufren los protones $H\alpha_{Leu}$ (apantallamiento) y $H\gamma_{Acp}$

(desapantallamiento). En la estructura de **D8**, $H\alpha_{Leu}$ está influido por la densidad electrónica del anillo de triazol que se encuentra frente a él, y también por el oxígeno carbonílico del residuo de Acp, con el que está alineado. Sin embargo, la reorganización que tiene lugar en la complejación, deja a $H\alpha_{Leu}$ apuntando hacia fuera del esqueleto peptídico, imposibilitando las interacciones que antes se daban. Por su parte, $H\gamma_{Acp}$ queda expuesto a la densidad electrónica del anión cuando se forma el complejo **$(3A^{-}\cdot nH_2O)\subset$D8** (≈ 2.7 Å) y ahí podría radicar el desplazamiento químico que observamos.

Una vez que comprobamoss que, realmente, lo que ocurría tras la adición de TBAF, TBACl o TBABr era la disociación de **D8** y posterior plegamiento del esqueleto peptídico para acomodar el clúster de aniones hidratados, pensamos en evaluar cuáles eran los factores que influían en ese plegamiento. Ya sabíamos que el agua era fundamental y, por supuesto, los aniones. Sin embargo, no conocíamos hastá qué punto influía el esqueleto peptídico y la tapa en este proceso. Por ello, empezamos comprobando si el CP sin la tapa *tris*-triazólica (**CP5**) o su dímero (**D5**) podía comportarse de la misma manera que **CP8** (Figura 161). Este péptido, **CP5/D5**, es el precursor que utilizamos para incorporar la tapa molecular, y está bloquedo por su cara γ mediante la *N*-alquilación con tres grupos propargilo (Figura 146). Pensamos en someterlo a la presencia de fluoruro, pues fue el anión que mostró mayor afinidad por **D8.** La adición de hasta 8.5 equivalentes (casi tres veces más de lo que usamos para **D8**) no promovió ningún cambio en el espectro de ^{1}H RMN de **D5**. Esto confirma que la tapa *tris*-triazólica, pese a no participar activamente en la complejación con el clúster, es un componente estructural fundamental, que facilita el plegamiento de **CP8**.

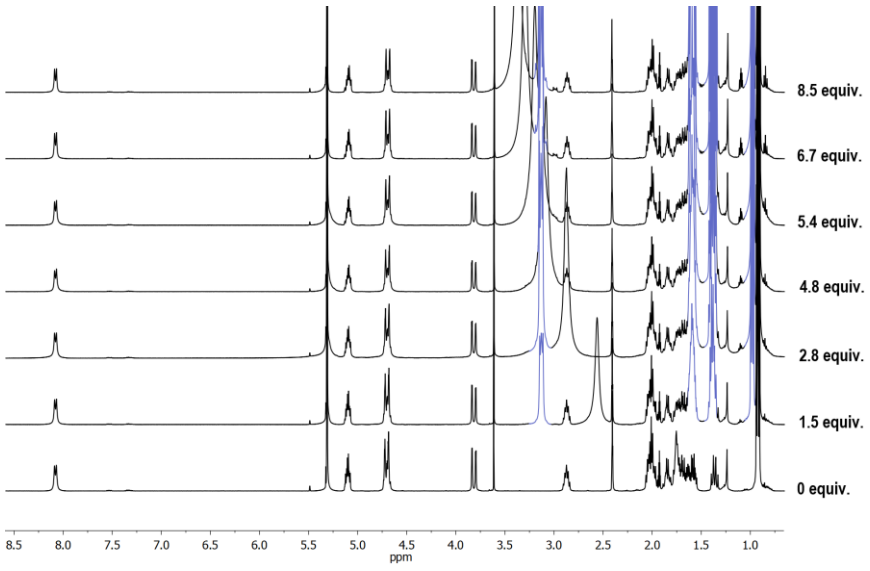


Figura 161. Conjunto de espectros obtenidos en el seguimiento por ^{1}H RMN de la adición de TBAF sobre **CP5** (5.6 mM en 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, se usó dioxano como estándar). Las señales en azul claro pertenecen al contraión TBA^+.

Posteriormente, decidimos estudiar si una especie heterodimérica podría dar cabida a estos aniones hidratados y, por tanto, determinar la importancia de la forma dimérica en su estabilización. Como ya se comentó en la sección de la introducción dedicada a los ciclopéptidos, concretamente cuando hablábamos de α,γ-CPs, es conocida la tendencia que tienen estos péptidos a formar heterodímeros entre CPs constituidos por residuos de Acp con otros de igual quiralidad pero constituidos por residuos de Ach, frente a sus correspondientes

homodímeros.[489a] Para llevar a cabo este estudio preparamos el *c*-[(*D*-Leu-*L*-^{propargil}*N*-Ach)$_3$], que llamaremos **CP10**. Vimos oportuno preparar también el derivado que incorpora la tapa tris(2-azidoetil)amina, **CP11**, ya que así podríamos comparar entre un heterodímero donde solo uno de los monómeros tiene tapa, y otro donde ambos la tienen (Figura 161A). Por otra parte, podríamos estudiar de manera independiente la capacidad para reconocer aniones de **D11**. La síntesis completa se encuentra detallada en la sección de información suplementaria y es análoga a la descrita para **CP5** y **CP8**. En este caso, **CP10** se obtuvo con un 80% de rendimiento, y **CP11**, con un 50%.

Con ambos péptidos pudimos observar la formación de los correspondientes heterodímeros cuando se adicionaba **D10** o **D11** sobre **D8** en experimentos separados (Figura 161B y C). Se observa la desaparición de las señales de la cápsula **D8** (naranja) en favor de la formación de un nuevo grupo de señales que no pertenecen a **D10** ni a **D11**, si no a las especies **D8-10** (Figura 161B, en rojo vino) o **D8-11** (Figura 161C, en verde azulado). Una vez formadas estas nuevas especies, se adicionó TBAF. Inmediatamente, se observa que las señales de la especie heterodimérica, en ambos experimentos, desaparecen de manera simultánea a la aparición de un grupo de señales ya conocido, que pertenece al complejo **(3F$^-$·nH$_2$O)⊂D8** (azul). Observamos, por otra parte, cómo emergen las señales de los homodímeros **D10** o **D11**, debido a que ya no están formando parte del heterodímero porque **CP8** está ahora ocupado formando el complejo **(3F$^-$·nH$_2$O)⊂D8**. Este resultado significa que ninguno de los heterodímeros fue capaz de plegarse correctamente para acomodar al clúster aniónico, ni siquiera aquel donde ambas subunidades incorporan la tapa *tris*-triazólica (**D8-11**).

Las especies **D8-10** y **D8-11** se caracterizaron por RMN y espectrometría de masas, cuyos iones 1840.1846 (**[D8-10]$^+$**) y 2086.2933 (**[D8-11]$^+$**) se corresponden con los correspondientes dímeros. Para **D8-10** es más sencillo apreciar su formación a través de los cambios del espectro de ^{1}H RMN (aparición de las señales color rojo vino) que en el caso de **D8-11**, ya que las señales son más anchas (color verde azulado). Sin embargo, al observar en detalle, se puede apreciar que aparecen señales nuevas que no corresponden ni a **D8** ni a **D11**. Por ejemplo, la señal ancha que aparece a 4.95 ppm (Figura 161C, cuarto espectro empezando por abajo) pertenece al nuevo Hα_{Leu} de la subunidad **CP8** del heterodímero **D8-11**. Por otro lado, la que aparece a 4.22 ppm corresponde a uno de los protones de los metilenos de la tapa *tris*-triazólica de la subunidad **CP11**. Las asignaciones completas para ambos heterodímeros se encuentran en la sección experimental (página 381), así como sus datos espectrales (páginas 533-540).

Comparando la adición de TBAF sobre ambas especies heterodiméricas, y también sobre **D8**, hay una importante diferencia que llama la atención. Para el caso de **D8**, la adición de 3.13 equivalentes de TBAF fue suficiente para promover la completa desaparición de las señales de la especie libre. Sin embargo, para **D8-10** se necesitaron 6.8 equivalentes, y 13.8 en el caso de **D8-11**. Aunque son posibles otras explicaciones, estos resultados pueden ser interpretados teniendo en cuenta que la formación del complejo **(3F$^-$·nH$_2$O)⊂D8** requiere la disociación del dímero. Por tanto, parece razonable que cuanto más fuertes sean las láminas β, más difícil sería este proceso. Dado que los heterodímeros son más estables que los homodímeros, se requiere un exceso de TBAF para forzar la disociación. Cualitativamente, estos datos nos informarían que la especie más estable es la cápsula heterodimérica **D8-11**. Como información adicional, en relación con **D8-10**, también se comprobó qué ocurría tras la adición de TBACl sobre este, mostrando el mismo comportamiento que con la adición de TBAF. La presencia del anión promovió la disociación de **D8-10** y se formó el complejo **(3Cl$^-$·nH$_2$O)⊂D8**. En este caso, tras la

adición de 45 equivalentes de TBACl, aún se observan las señales de **D8-10**, lo que contrasta con los 25 equivalentes que se tenían que añadir sobre **D8** (ver Figura 153B y Figura 208 de la sección de experimental, página 389).

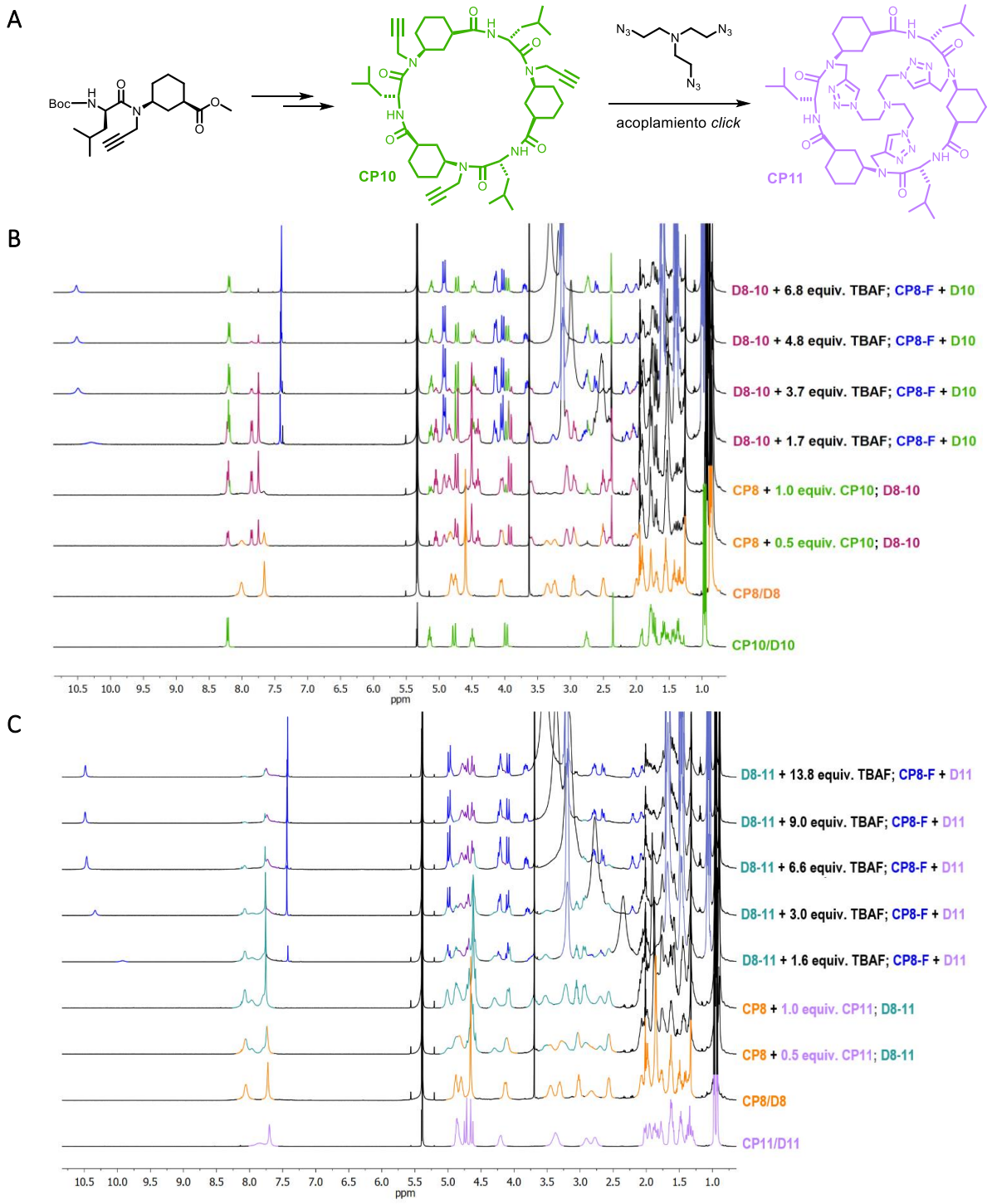


Figura 161. A) Estructura de los péptidos **CP10** y **CP11**. Estudios de ^{1}H RMN correspondientes a la formación de: B) El heterodímero **D8-10** (rojo vino) mediante adición de **CP10** (verde) sobre una disolución de **CP8** (naranja) (6.9 mM); C) El heterodímero **D8-11** (verde azulado) mediante adición de **CP11** (lila) sobre una disolución de **CP8** (8 mM). Se usó 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 como disolvente y dioxano como estándar. En ambos casos, la adición de TBAF resulta en la disociación de los heterodímeros y formación del complejo **$(3F^{-}\cdot nH_2O)\subset$D8** (azul).

Afortunadamente, también pudimos obtener las estructuras cristalinas de los dímeros **D10** y **D11**. En el caso de **D10**, este dímero co-cristalizó con **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8** en la mezcla que resultaba tras finalizar el experimento anteriormente comentado de las adiciones de TBACl sobre **D8-10** (Figura 208, sección experimental, página 389). Esto confirma, por tanto, que en presencia de Cl^-, las especies que quedan en disolución son **D10** y **(3Cl⁻·nH₂O)⊂D8**. Una molécula de dioxano, que es el estándar que usamos en los experimentos de adición por RMN, ocupaba la cavidad de **D10** (Figura 162A y B). La presencia de esta molécula no impidió la dimerización, pues se aprecia claramente que hay seis enlaces de hidrógeno ($d_{NH\cdots O}$= 2.08 Å) que conectan ambos monómeros en una estructura tipo lámina β antiparalela.

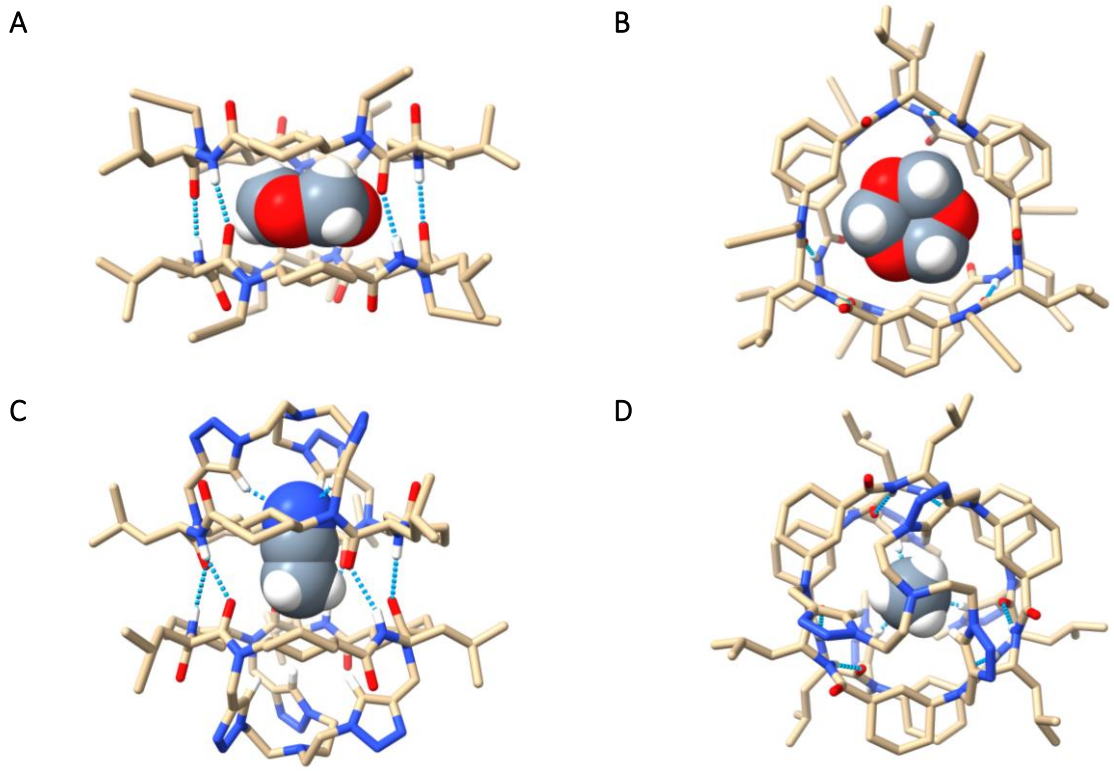


Figura 162. Estructuras cristalinas de **D10** (A y B) y **D11** (C y D) obtenidas por difracción de Rayos X de cristales obtenidos por evaporación lenta de disoluciones de ambas especies en 10% CD_3CN/CD_2Cl_2.

En la estructura cristalina de **D11** también se halló una molécula de acetonitrilo encapsulada, al igual que en el caso de **D8**. La longitud de todos los enlaces de hidrógeno es 2.24 Å, ligeramente más largos que el promedio de **D8**, 2.10 Å. La distancia entre los protones triazólicos y el nitrógeno del CH_3CN atrapado es de 2.66 Å, frente a los 2.74 Å observados en el caso de **D8**.

Si comparamos ambas estructuras cristalinas, **D10** y **D11**, el aumento de la longitud del enlace de hidrógeno (Δd= 0.16 Å) para **D11**, nos indica que la introducción de la tapa molecular afecta a la dimerización, y en este caso parece debilitarla. Un detalle que nos hace prever que esto pudiera estar ocurriendo, es el comportamiento de los protones amida de **D10** y **D11** en los experimentos de heterodimerización y posterior adición de TBAF. Tras la disociación de **D8-10**, las señales emergentes de homodímero **D10** (Figura 161B, en verde) son prácticamente idénticas a su espectro de referencia (el primer espectro empezando por abajo). La señal de los NHs sale como un doblete bien definido al mismo desplazamiento que en la referencia. Sin

embargo, para el caso de **D8-11** (Figura 161C) cuando se adiciona TBAF y se recupera **D11** (en morado), sus señales se ven más anchas que en el espectro de referencia (en lila, primer espectro empezando por abajo). Es difícil distinguir la señal del NH debido a su anchura. Esto nos hizo reparar en que quizás, el agua presente en la muestra, que proviene del agua de hidratación del TBAF que se añade, pudiera interferir en la dimerización de **CP11**, algo que no parecía que ocurriese con **CP10**. Estas apreciaciones, sin embargo, no son suficientes como para enunciar que **D11** es un dímero más débil que **D10**. La determinación de las constantes de asociación para cada proceso de dimerización sería lo apropiado, aunque, de momento no se ha llevado a cabo.

La obtención de las estructuras cristalinas mencionadas nos permitió obtener modelos computacionales de los heterodímeros **D8-10** y **D8-11** mediante la optimización de geometría empleando cálculos DFT (Figura 163). Para poder hacer comparaciones con **D8**, utilizamos la estructura cristalina de este para optimizarla siguiendo el mismo método, pero eliminando la molécula de acetonitrilo de su cavidad, e hicimos lo mismo con **D11**. Encontramos que las longitudes de enlace de hidrógeno de estas cuatro estructuras optimizadas siguen la siguiente tendencia: $d_{\mathbf{D11}calc}$= 1.98 Å, $d_{\mathbf{D8\text{-}11}calc}$= 1.93 Å, $d_{\mathbf{D8}calc}$= 1.94 Å, y $d_{\mathbf{D8\text{-}10}calc}$= 1.89. Å. Se observa, por tanto, una menor distancia para las especies heterodiméricas. Curiosamente, la conformación de mínima energía para las especies heterodiméricas es aquella donde uno de los anillos triazólicos del **CP8** se encuentra girado dejando su protón orientado hacia el exterior de la cavidad, tal y como ocurría en la estructura cristalina de **D8**. En la sección 3.3.3 de este capítulo se discute más en detalle sobre estas estructuras y su estabilidad con respecto a **D8**.

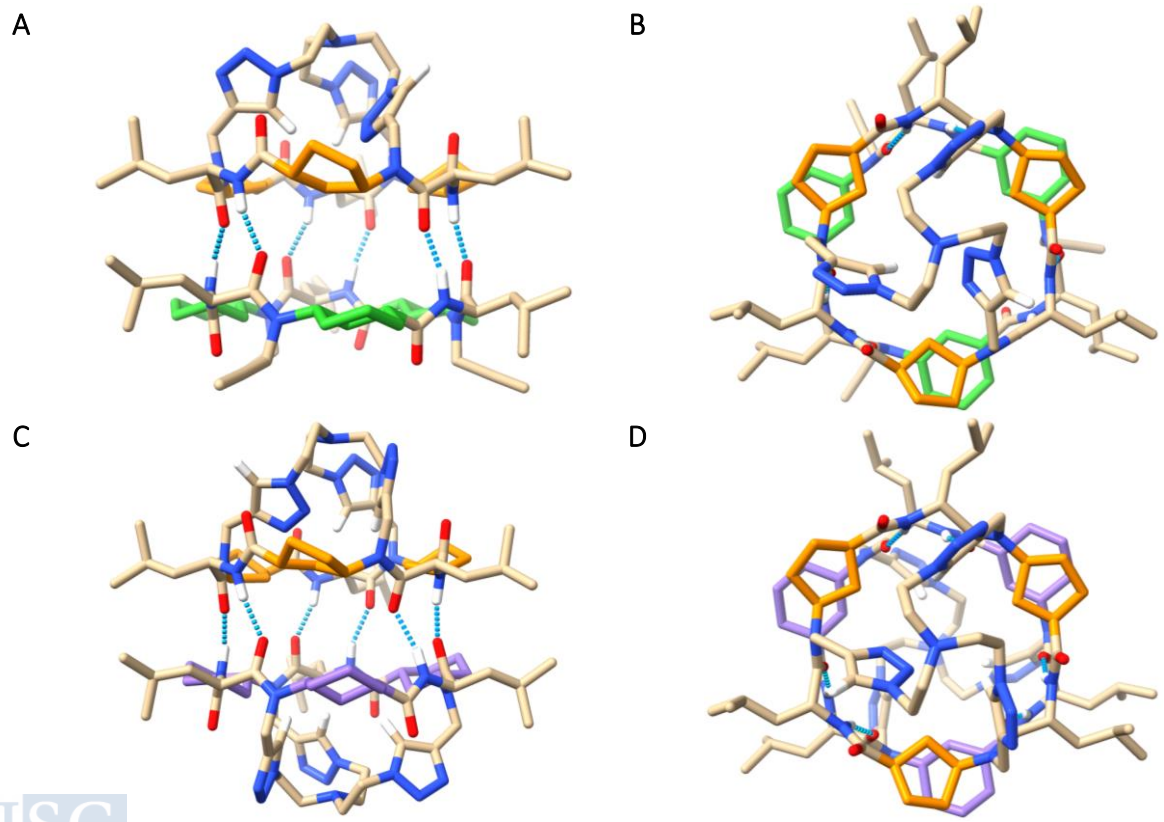


Figura 163. Geometría de mínima energía para las especies **D8-10** (A y B) y **D8-11** (C y D) obtenidas usando B3LYP/ 6-31G (d, p) como método de cálculo.

Tras estos experimentos, todo parece indicar que **D11** está imposibilitado para el reconocimiento de aniones, ya que no observamos la formación paralela de ninguna otra especie que pudiésemos atribuir a un complejo entre **D11** y el anión. Para constatar esto, se procedió a las adiciones de TBAF y TBACl sobre **D11**, de manera individual y en ausencia de **D8**. Comprobamos que este péptido no respondía a la presencia de ninguno de los aniones, ya que no daba lugar a ningún cambio significativo tras la adición de 8.0 equivalentes de TBAF o 30.6 equivalentes de TBACl (ver Figura 209, sección experimental, página 390). Lo único que apreciamos fue un ensanchamiento de todas las señales de **D11**, que atribuimos a un posible debilitamiento de las interacciones **CP11**-**CP11** debido a la cantidad de agua presente en la muestra. Esto significaría que este tipo de α,γ-ciclohexapéptidos que incorporan la tapa *tris*-(triazoletil)amina, solo pueden acomodar los hidratos de los aniones en su seno mediante la deformación del esqueleto peptídico. Dicha deformación está severamente comprometida en **D11** dada la rigidez de los anillos de seis miembros que incluye el γ-Ach.

Una vez concluidos estos experimentos con **D10** y **D11**, tomándolos en conjunto con experimentos anteriores, podemos determinar que hemos aclarado los factores estructurales fundamentales para que se produzca el reconocimiento de los diferentes aniones. Por un lado, la presencia de agua, como queda demostrado en los experimentos de secado de las muestras, o con la adición de agua en la valoración con TBABr, que permite también su encapsulación. Además, las estructuras cristalinas obtenidas permiten visualizar los clústeres hidratados de **(3F$^-$·8H$_2$O)⊂D8** y **(3Cl$^-$·5H$_2$O)⊂D8**. Por otro lado, la introducción de una tapa molecular que facilita el plegamiento del esqueleto peptídico y que adopte la forma de pirámide trigonal. En tercer lugar, la flexibilidad de la cadena peptídica para que se pueda dar tal deformación y se adapte a la forma del clúster hidratado, algo que sí puede hacer **D8**, que está constituido por γ-Acp, pero no **D11**, cuya secuencia basada en γ-Ach lo dificulta. Por último, la presencia de los aniones Cl$^-$, F$^-$ y Br$^-$ promueven la formación de complejos **(3A$^-$·nH$_2$O)⊂D8**. Estos cuatro factores deben darse simultáneamente para que se formen los complejos mencionados.

Dados estos resultados preliminares con aniones esféricos, decidimos extenderlo a otros aniones de diferentes formas y propiedades, tal como: I$^-$, NO$_3^-$, N$_3^-$, AcO$^-$, Br$_3^-$ y PF$_6^-$. Para todos ellos usamos sus sales de tetrabutilamonio. Con los aniones yoduro y nitrato fue necesaria la adición de una pequeña cantidad de agua para promover la formación de los correspondientes complejos, que por similitud con los anteriores denominamos como **(3I$^-$·nH$_2$O)⊂D8** y **(3NO$_3^-$·nH$_2$O)⊂D8** (Figura 164). En ambos casos se necesitaba la adición de un mayor número de equivalentes que en las adiciones de F$^-$, Cl$^-$ o Br$^-$, siendo necesarios 86 equivalentes de TBAI y 60 equivalentes de TBANO$_3$ para que se observase una mezcla en una proporción 1:2.5 en favor de dichos complejos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

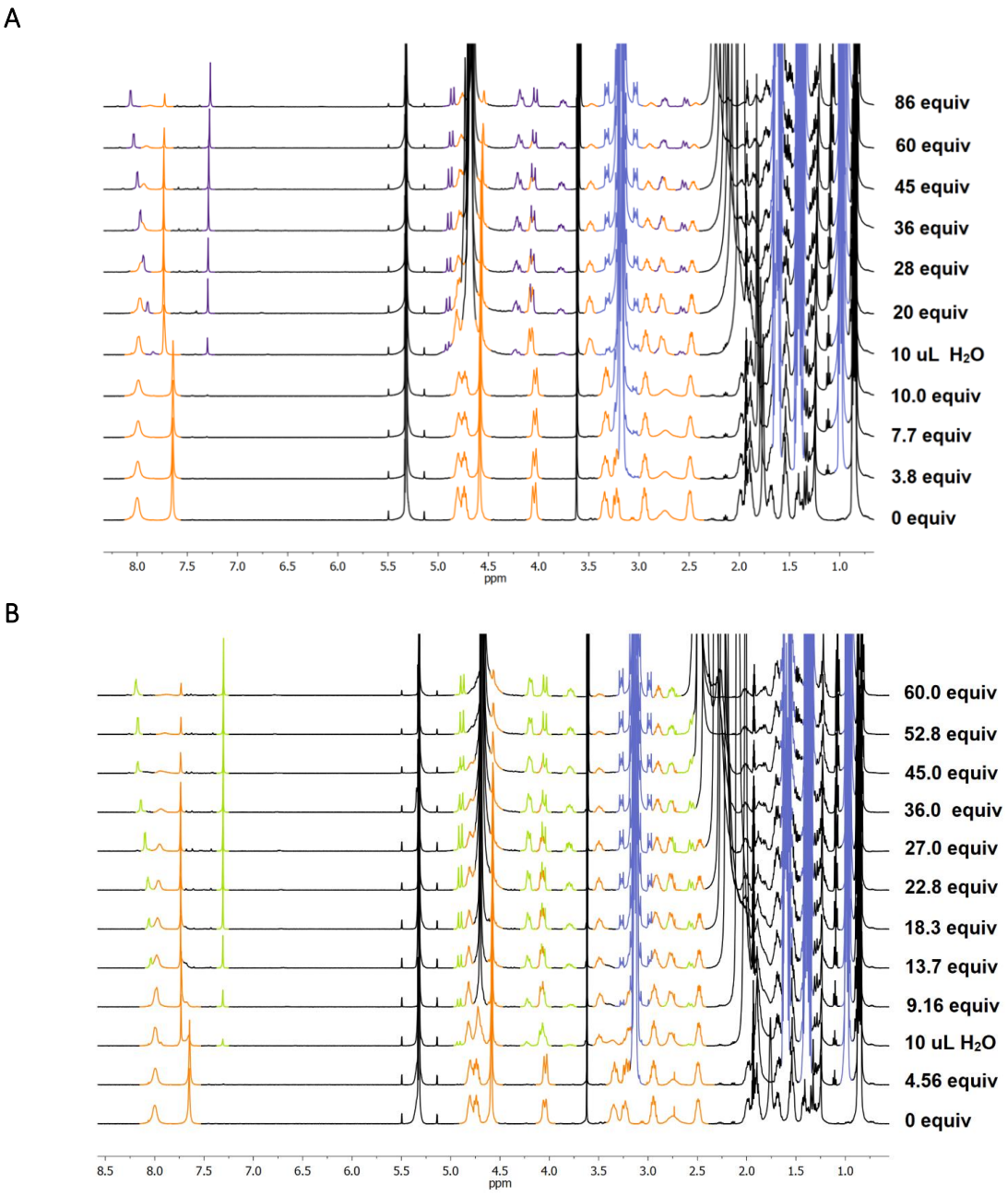


Figura 164. Conjunto de espectros de ^{1}H RMN correspondientes al seguimiento de la formación de los complejos **(3I$^-$·nH$_2$O)⊂D8** (A) y **(3NO$_3^-$·nH$_2$O)⊂D8** (B) mediante la adición de TBAI (A) o TBANO$_3$ (B) sobre una disolución de **CP8** (7 mM, 10% CD$_3$CN/CD$_2$Cl$_2$, se usó dioxano como estándar). En naranja se muestran las señales más relevantes de **D8**, que van desapareciendo paulatinamente. Aparecen en morado las señales pertenecientes al complejo **(3I$^-$·nH$_2$O)⊂D8**, y en verde lima las de **(3NO$_3^-$·nH$_2$O)⊂D8**. Se muestran en azul claro las señales de TBA$^+$.

Para los estudios realizados con los aniones N_3^- y AcO^- (Figura 165) no fue necesaria la adición de cantidades extra de agua para que se observase la aparición de un nuevo grupo de señales, que atribuimos a **(3N$_3^-$·nH$_2$O)⊂D8** (en gris) y **(3AcO$^-$·nH$_2$O)⊂D8** (en azul verdoso). En ambos casos, tal como se había observado anteriormente, estas señales emergen en detrimento de las de **D8** (en naranja). En el caso de la adición de TBAN$_3$ (Figura 165A), tras 35.0 equivalentes se forma una mezcla, en una proporción 1:2, en favor de la formación de **(3N$_3^-$·nH$_2$O)⊂D8**, mientras que con 66 equivalentes de acetato prácticamente desaparecían por completo las señales correspondientes a **D8** (Figura 165B).

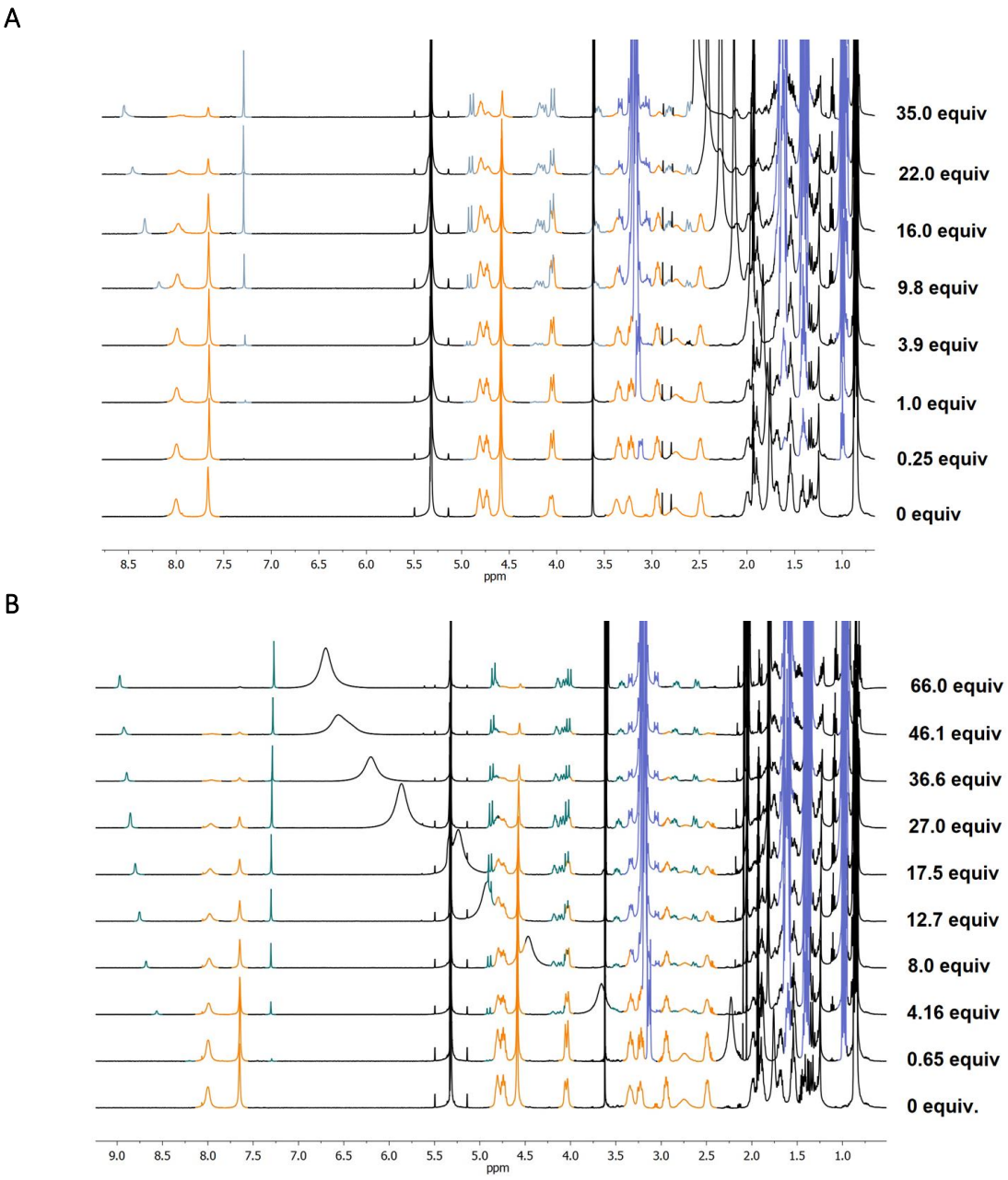


Figura 165. Conjunto de espectros de ^{1}H RMN correspondientes al seguimiento de la formación de A) El complejo **(3N$_3^-$·nH$_2$O)⊂D8** mediante la adición de TBAN$_3$ sobre una disolución de **CP8** (6.9 mM); B) El complejo **(3AcO$^-$·nH$_2$O)⊂D8** mediante la adición de TBAAc sobre una disolución de **CP8** (5.4 mM). Las señales de **(3N$_3^-$·nH$_2$O)⊂D8** se muestran en gris, las de **(3AcO$^-$·nH$_2$O)⊂D8** en verde azulado y en naranja las de **D8**. En azul claro, las señales de TBA$^+$. En ambos casos se usó 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 como disolvente, y dioxano como estándar.

En contraste con el resultado obtenido con los aniones mencionados previamente, la adición de diferentes equivalentes de TBABr$_3$ o TBAPF$_6$ sobre una disolución de **D8** no daba lugar a la aparición de señales que se pudiesen atribuir a la formación de los complejos correspondientes (Figura 166), ni siquiera tras la adición de 10 µL de agua. Posiblemente estos aniones son demasiado largos (Br$_3^-$) o voluminosos (PF$_6^-$) para acomodarse entre las dos subunidades de **CP8** con un número variable de moléculas de agua.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

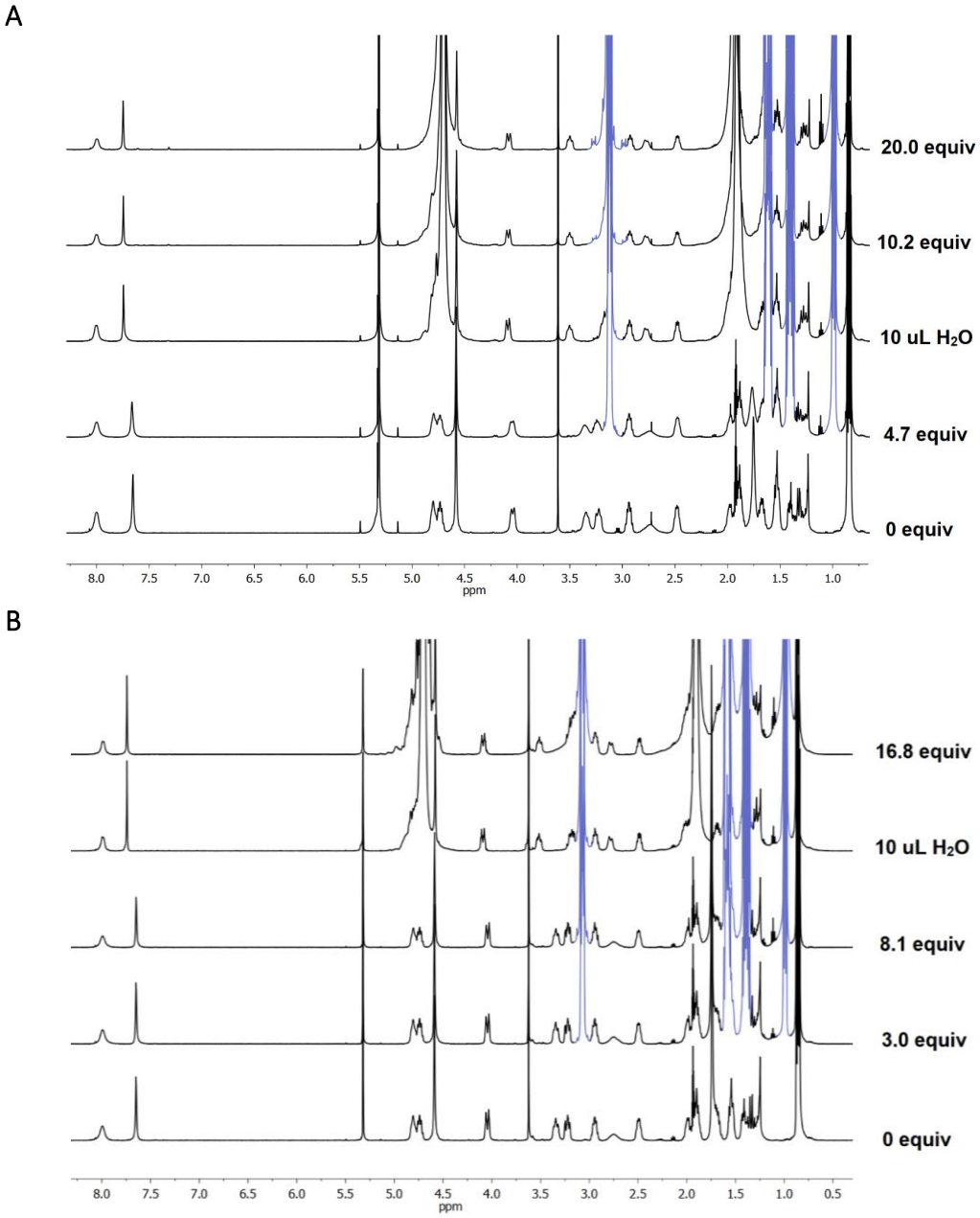


Figura 166. Conjunto de espectros de ^{1}H RMN correspondientes al seguimiento de la adición de A) $TBABr_3$ sobre **CP8** (7.3 mM); B) $TBAPF_6$ sobre **CP8** (5.5 mM). En ambos casos se usó 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 como disolvente, y dioxano como estándar. Se muestran en azul claro las señales correspondientes al contraión TBA^+.

Todos los aniones que provocaban cambios en el espectro de ^{1}H RMN de **D8** se comportaban de manera similar a los ya estudiados (F^-, Cl^-, Br^-), surgiendo un grupo de señales muy similar y característico en todos los casos (Figura 167). La comparación de las estructuras cristalinas de **$(3F^-{\cdot}8H_2O)\subset$D8** y **$(3Cl^-{\cdot}5H_2O)\subset$D8** ya mostraban que el plegamiento de **D8** en ambos casos era muy parecido, habiendo algunas pequeñas diferencias en términos de distancias, además de la disposición relativa de ambas subunidades de **CP8**. En base a los resultados observados con estos otros aniones, pensamos que este patrón de comportamiento es extensible a todos los aniones que han promovido la aparición de ese grupo de señales tan característico en el espectro de ^{1}H RMN. Esto es, para todos los casos, sostenemos que se forman complejos similares, con tres aniones atrapados entre las dos subunidades de **CP8** y asistido por un numero variable de moléculas de agua, formando el clúster $3A^-{\cdot}nH_2O$. El CP

adopta una conformación con un eje de simetría *C3*, formando un "sándwich" con el clúster. Suponemos que el tamaño de este hidrato y sus aniones determina las pequeñas diferencias que se advierten en el espectro de ^{1}H RMN (Figura 167, arriba), ya que el esqueleto peptídico se reacomoda con el fin de aislar al $3A^{-}\cdot nH_2O$ del medio apolar externo.

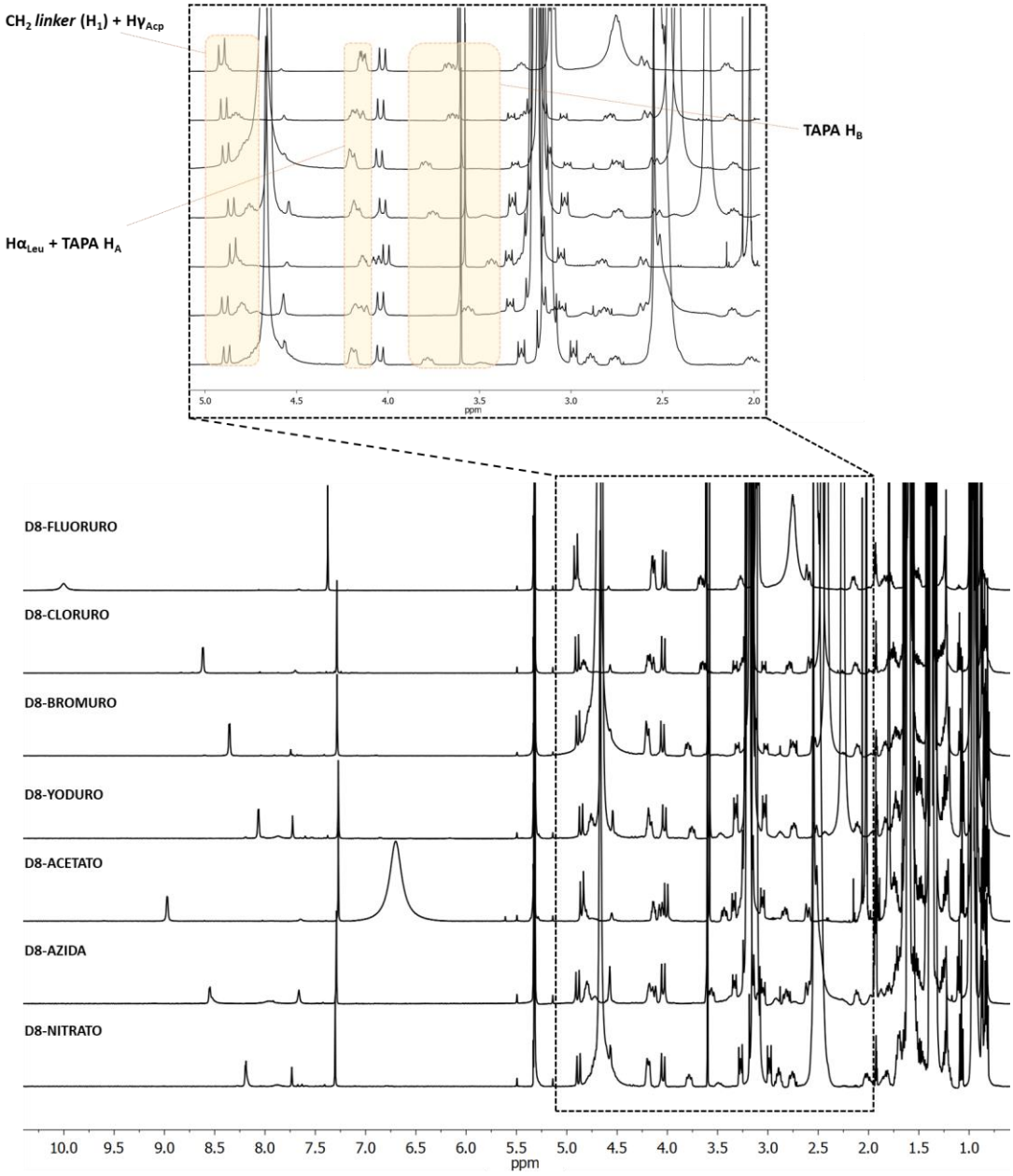


Figura 167. Comparación del espectro ^{1}H RMN registrado tras la adición de cantidades variables de los distintos aniones estudiados sobre disoluciones de **CP8** (5-7 mM) en 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 y empleando dioxano como estándar interno.

Esta similitud estructural entre los complejos queda patente al comprobar que, también sus espectros 2D RMN muestran una clara coincidencia. Al superponer los espectros de ROESY de las muestras que contienen los complejos **$(3Cl^{-}\cdot nH_2O)\subset D8$** y **$(3AcO^{-}\cdot nH_2O)\subset D8$**, los picos de cruce de ambas especies son análogos (Figura 168). Esto evidencia que, estructuralmente, estas dos especies deben ser muy parecidas. Análogamente, lo mismo ocurre con el resto de complejos, ya que muestran el mismo tipo de patrón estructural. En las Figuras 210-212 de la

sección experimental (páginas 391-393) se pueden apreciar las superposiciones de los espectros ROESY RMN de **D8** con los de D8-cloruro y D8-fluoruro, por separado, así como los de ambos complejos de manera conjunta.

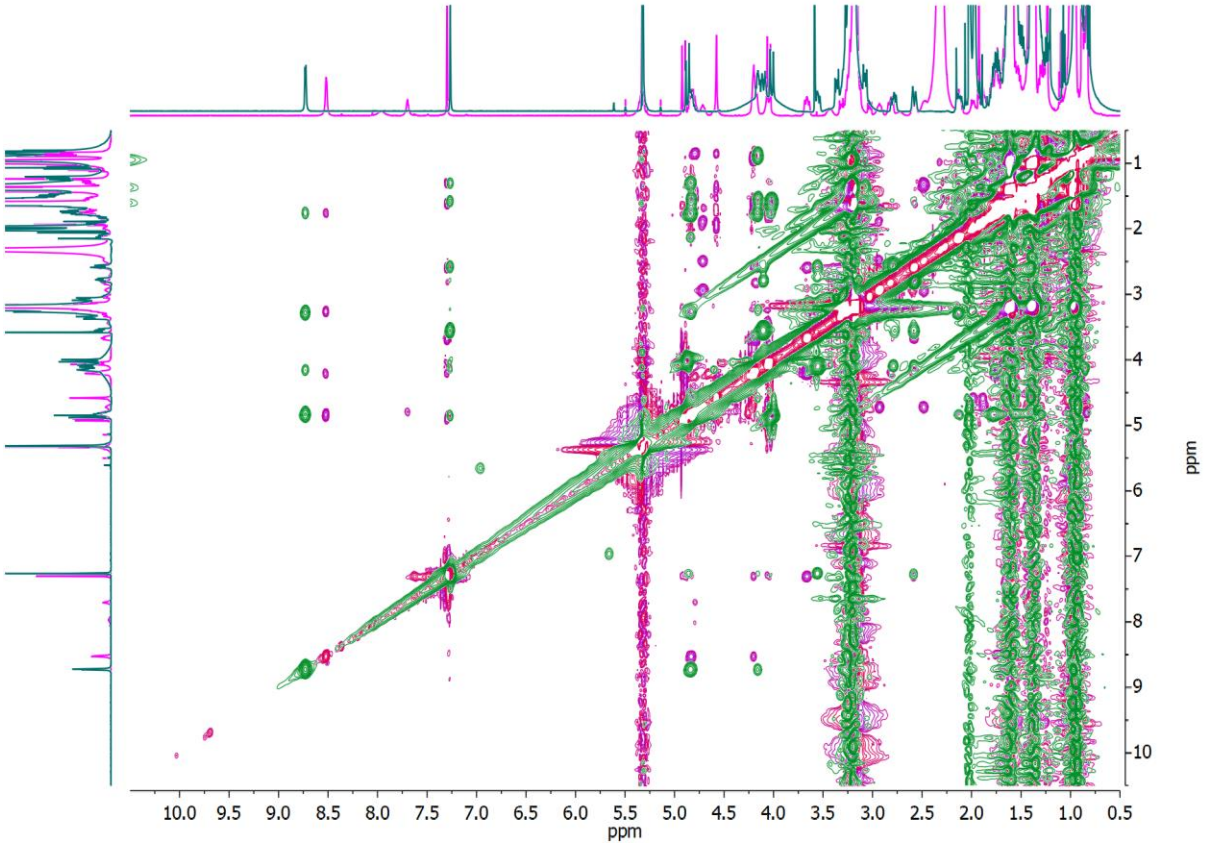


Figura 168. Superposición de los espectros ROESY de las especies **(3Cl$^-$·nH$_2$O)⊂D8** (en fucsia) y **(3AcO$^-$·nH$_2$O)⊂D8** (en verde). Nótese que en el caso de la muestra que contiene el complejo de cloruro, aún quedan algunas señales de la especie **D8** debido a que el equilibrio no ha sido completamente desplazado. Por este motivo, algunos picos de cruce en fucsia no encuentran su análogo en verde.

Para ahondar en el conocimiento de estos complejos, decidimos repetir el experimento del secado, pero ahora con la muestra que contiene **(3AcO$^-$·nH$_2$O)⊂D8**, que no había requerido la adición de agua en el experimento de RMN con **D8**. Para ello se emplearon los tamices moleculares de 4 Å, al igual que se había hecho previamente con **(3Cl$^-$·nH$_2$O)⊂D8**. Se observó que, pasado un tiempo, volvían a reaparecer las señales de **D8** (Figura 169). En este caso era necesario un tiempo de espera de 48 h, mientras que el secado de **(3Cl$^-$·nH$_2$O)⊂D8** tenía lugar tras 24 h de espera. Esto podría informar sobre lo fuertemente atrapado que está el clúster hidratado 3AcO·nH$_2$O. Dado que la entalpía de hidratación del anión acetato (-375 kJ/mol) es algo menor que la del cloruro (-355 kJ/mol),[585] hay una menor tendencia a desprenderse de esas moléculas de agua para el acetato. Por ello, sería razonable pensar que el clúster 3AcO·nH$_2$O está más fuertemente complejado con las dos subunidades de **CP8** que 3Cl·nH$_2$O. Tras la adición de una pequeña cantidad de agua, las señales asignadas a **(3AcO$^-$·nH$_2$O)⊂D8** reaparecen nuevamente (Figura 169). Estos experimentos ponen en evidencia el papel

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[585] Van Der Sluys, W. G. *J. Chem. Educ.* **2001**, *78*, 111-115.

fundamental del agua en la formación de este complejo y, por tanto, creemos que esto se puede extrapolar a todos los demás complejos **(3A⁻·nH₂O)⊂D8** estudiados.

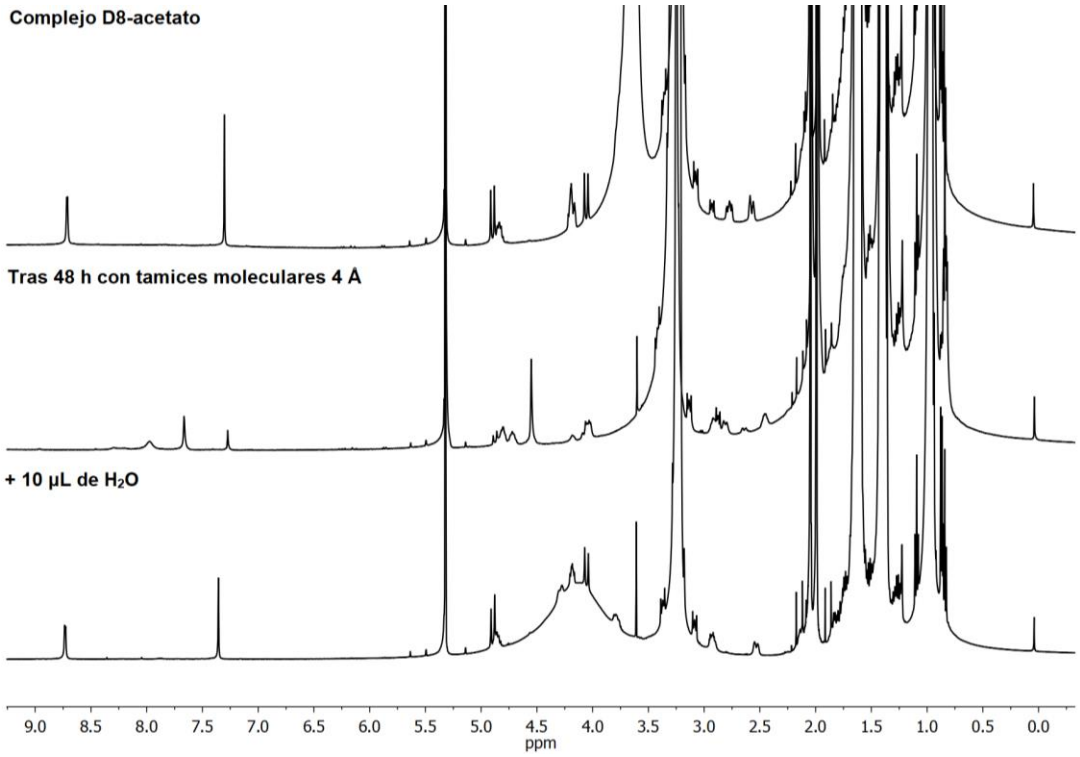


Figura 169. Efecto de la retirada de agua y su posterior adición en el espectro de ^{1}H RMN del complejo **(3AcO⁻·nH₂O)⊂D8** (D8-acetato).

Si comparamos los datos que tenemos sobre los complejos estudiados, podemos establecer una tendencia en cuanto al número de equivalentes adicionados (teniendo en cuenta también la fracción molar) que nos dará una idea cualitativa de la afinidad de **D8** por cada anión. Por otro lado, podemos valorar también el desplazamiento de la señal NH con cada uno de ellos, lo que se puede correlacionar con la fortaleza de los enlaces de hidrógeno que se establecen. Por desgracia no resulta preciso determinar los valores de las constantes de asociación (K_a) ya que se desconoce el número de moléculas de agua que forman parte de cada clúster $3A^{-}\cdot nH_2O$, aunque sí podemos conjeturar que este número de moléculas estará relacionado con el tamaño de los aniones y con su energía de hidratación. Para indagar un poco más sobre estos complejos, decidimos llevar a cabo optimizaciones de geometría mediante cálculos DFT para obtener las posibles estructuras de las especies **(3Br⁻·nH₂O)⊂D8** y **(3I⁻·nH₂O)⊂D8**, de las cuales no teníamos datos cristalográficos. Pretendíamos también comprobar si las distancias N-H···A⁻ encontradas en esos modelos computacionales pudieran ser coherentes con el desplazamiento químico observado experimentalmente para los NHs. Ya que la tendencia a la hidratación de yoduro y bromuro es más similar a la de cloruro que a la de fluoruro, decidimos partir de la estructura cristalina de **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8**, ya que no pensamos que las estructuras de **(3Br⁻·nH₂O)⊂D8** o **(3I⁻·nH₂O)⊂D8** pudiesen acomodar más de cinco moléculas de agua, dado el tamaño de estos aniones. Con esta hipótesis realizamos optimizaciones de la geometría de los complejos **(3F⁻·8H₂O)⊂D8**, **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8**, **(3Br⁻·5H₂O)⊂D8** y **(3I⁻·5H₂O)⊂D8** con el fin de poder comparar las distancias de enlace de hidrógeno en la serie de los haluros. Partimos entonces de las estructuras cristalinas de **(3F⁻·8H₂O)⊂D8** y **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8**, con ocho moléculas de agua para el complejo de fluoruro y cinco para el resto

de haluros. De estas optimizaciones se obtuvieron unas distancias NH···A^- de: $d_{D8\text{-}F}$= 1.67, $d_{D8\text{-}Cl}$= 2.29, $d_{D8\text{-}Br}$= 2.41 y $d_{D8\text{-}I}$= 2.63 Å (las estructuras optimizadas para cada uno de estos complejos se ilustran en las Figuras 213 y 214 de la sección experimental, páginas 394-395). Estos valores de distancias de enlace de hidrógeno ($d_{O\cdots H}$) son coherentes con lo observado experimentalmente sobre el desplazamiento del protón NH con cada uno de los haluros (Figura 170). El anión fluoruro, el más pequeño y que presenta la distancia NH···A^- más corta, además con mucha diferencia, es el que promueve mayor desplazamiento del protón NH. Cloruro y bromuro presentan distancias NH···A^- más semejantes (Δd= 0.13 Å), siendo más corta la de cloruro. El desplazamiento de la señal del NH en ambos casos también es próximo (Δδ= 0.27 ppm), siendo mayor el de cloruro. Por último, el anión bromuro es el que presenta, según los cálculos, la distancia NH···A^- más larga y es a la vez el anión que menos desplaza la señal del protón de la amida. Por supuesto, las diferencias encontradas experimentalmente para el desplazamiento químico del NH en la serie de los haluros pueden estar influidas por varios factores como el radio de los aniones, su electronegatividad o su polarizabilidad.

Anión	Equiv.	Relación ($3A^-$ ·nH_2O) ⊂D8/D8	δ NH (ppm)	$\Delta H_{triazol}$ (ppm)	p*Ka*
F^-	3.13	1	10	7.38	3.2
Cl^-	24.7	0.90	8.62	7.29	-8.0
Br^-	28.1	0.92	8.35	7.28	-9.0
I^-	86	0.71	8.07	7.27	-10.0
N_3^-	35	0.67	8.55	7.29	4.75
AcO^-	66	0.88	8.97	7.27	4.7
NO_3^-	60	0.77	8.19	7.30	-1.4

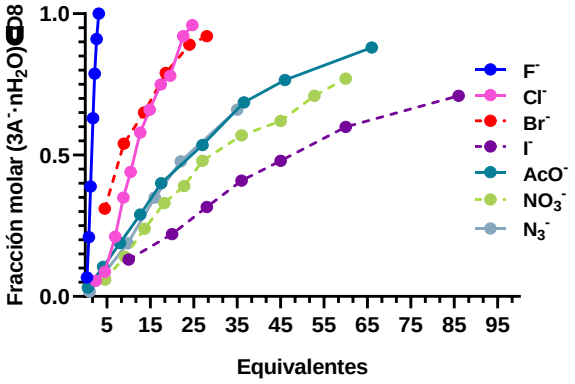


Figura 170. Izquierda: tabla comparativa de diversos parámetros experimentales encontrados a raíz de la adición de los aniones sobre **D8** mediante seguimiento por ^{1}H RMN; a la derecha: representación gráfica de la fracción molar de **$(3A^-\cdot nH_2O)\subset D8$** frente al número de equivalentes adicionados en cada caso. Se han usado líneas punteadas para aquellos aniones que necesitaron la adición de agua extra.

Respecto al resto de aniones, llama la atención que AcO^- es el segundo anión (después de fluoruro) que mayor desplazamiento químico del NH promueve, lo que pudiera deberse a su basicidad. Si comparamos, para todos los aniones, la progresión que sigue la fracción molar **$(3A^-\cdot nH_2O)\subset D8$ /D8** con el número de equivalentes adicionados (Figura 170 derecha), podemos tener una visión global de la afinidad en términos cualitativos. Claramente, el anión fluoruro es el que da mejores resultados, lo que se relaciona con ser el más pequeño, electronegativo y el que tiene una esfera de hidratación más fuerte. Los aniones cloruro y bromuro tienen un comportamiento similar, aunque la necesidad de añadir agua para el bromuro podría estar modificando los efectos de la valoración. Lo mismo sucede con acetato y azida, que desplazan de manera similar el equilibro. Por último, nitrato y ioduro son los que más débilmente interactúan, siendo este último el que presenta el comportamiento más desfavorable de toda la serie, un ion con una débil esfera de hidratación y gran polarizabilidad.

El último factor que decidimos evaluar en el proceso de reconocimiento fue el papel del contraión, tetrabutilamonio en este caso. Para tal fin, recurrimos a la conocida capacidad de los éteres corona para complejar cationes alcalinos, con objetivo de solubilizar AcONa.

Repetimos la adición de AcO^- sobre **D8**, pero esta vez, en lugar de utilizar una disolución de TBAAc en la mezcla de 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 para realizar las adiciones, utilizamos una disolución de AcONa y el 15-corona-5 en CD_3CN. El 15-corona-5 se utilizó en un ligero exceso con respecto a la cantidad de AcONa, para asegurar la solubilización de la sal. En los experimentos de adición de la disolución de AcONa/15-corona-5 sobre **D8** se observaba la aparición de un precipitado, por lo que se asume que no todo el acetato que se añade está disponible para la complejación. Aun así, tras varias adiciones, se pudo apreciar cómo aparecían las señales de **(3AcO⁻·nH₂O)⊂D8** (Figura 171A, en azul verdoso). Debido a la precipitación, no se pudo añadir suficiente acetato para desplazar el equilibrio por completo y poder hacer una comparación cuantitativa con el experimento previamente realizado con TBAAc. Sin embargo, el objetivo de este experimento era demostrar si el contraión jugaba algún papel fundamental. A la luz de los resultados, se puede concluir que, al margen de su influencia en la solubilidad, el contraión no es determinante en la complejación.

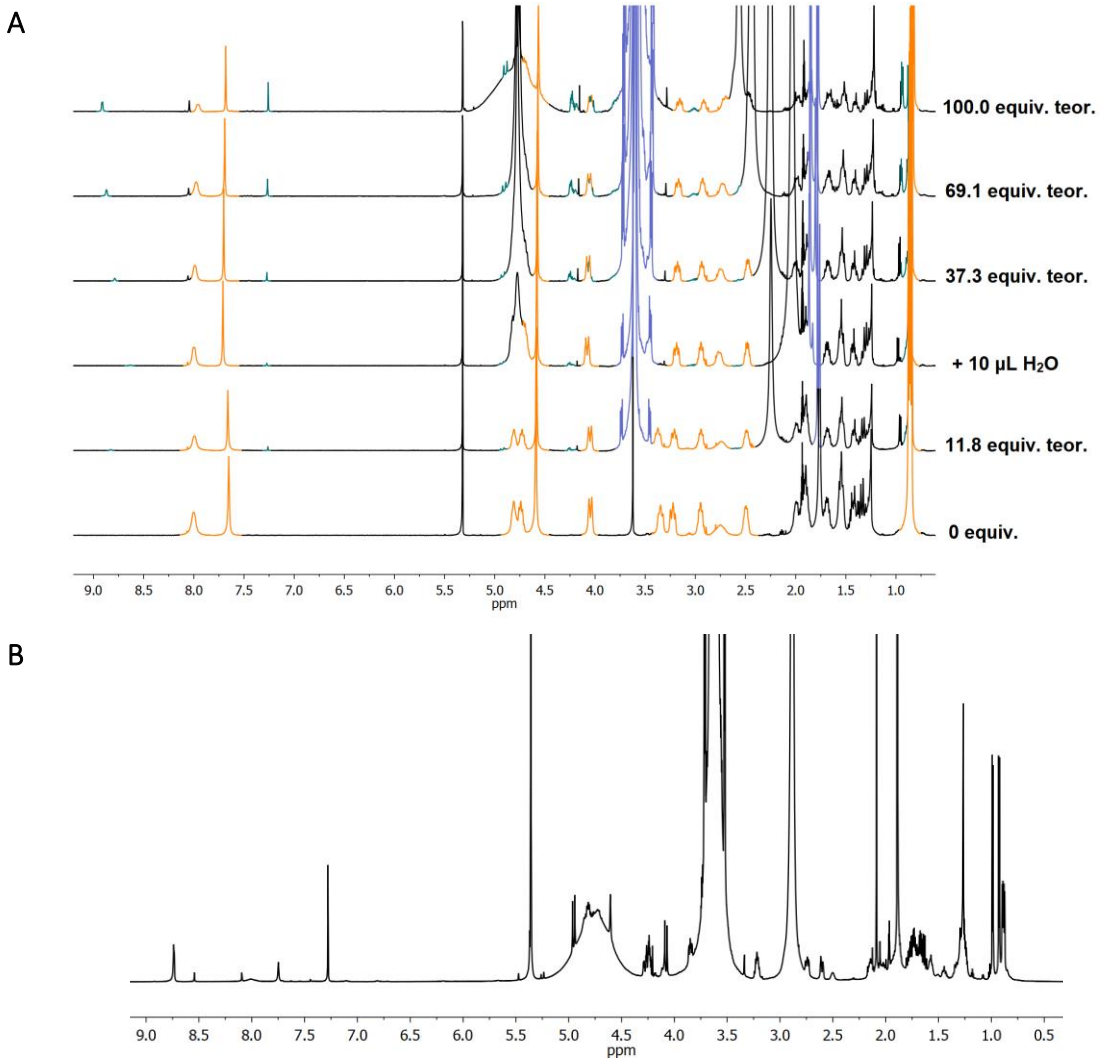


Figura 171. A) Conjunto de espectros correspondientes al estudio mediante ^1H RMN de la adición de la disolución AcONa/15-corona-5 sobre **CP8** (5.6 mM, 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, se usó dioxano como estándar). Las señales de **CP8** se muestran en naranja, y en verde azulado las correspondientes a **(3AcO⁻·nH₂O)⊂D8**. En azul claro aparecen las señales del 15-corona-5 y el acetato. Debido a la precipitación, se indica solo el valor teórico de AcO^- adicionado, que no equivale al disponible para la complejación; B) Espectro ^1H RMN de la muestra resultante tras el experimento descrito en A, registrado dos semanas después.

Tras un par semanas de la realización de este experimento, quisimos obtener su espectro bidimensional de ROESY para poder hacer algunas comparaciones con los datos que teníamos tras la adición de TBAAc. Sorprendentemente, cuando registramos el espectro de protón de la muestra resultante tras el experimento con AcONa/15-corona-5, observamos que la especie más abundante en esa muestra era el **(3AcO⁻·nH₂O)⊂D8** (Figura 171B). El equilibrio se había desplazado de una proporción 1.4:1 a 3:1 **(3AcO⁻·nH₂O)⊂D8 /D8**. Este cambio puede deberse a un proceso de solubilización lenta del acetato, aunque en la muestra aún quedaba algo de precipitado. Comparando entonces los dos espectros de ROESY (Figura 172), se pudo constatar que se trata de la misma especie.

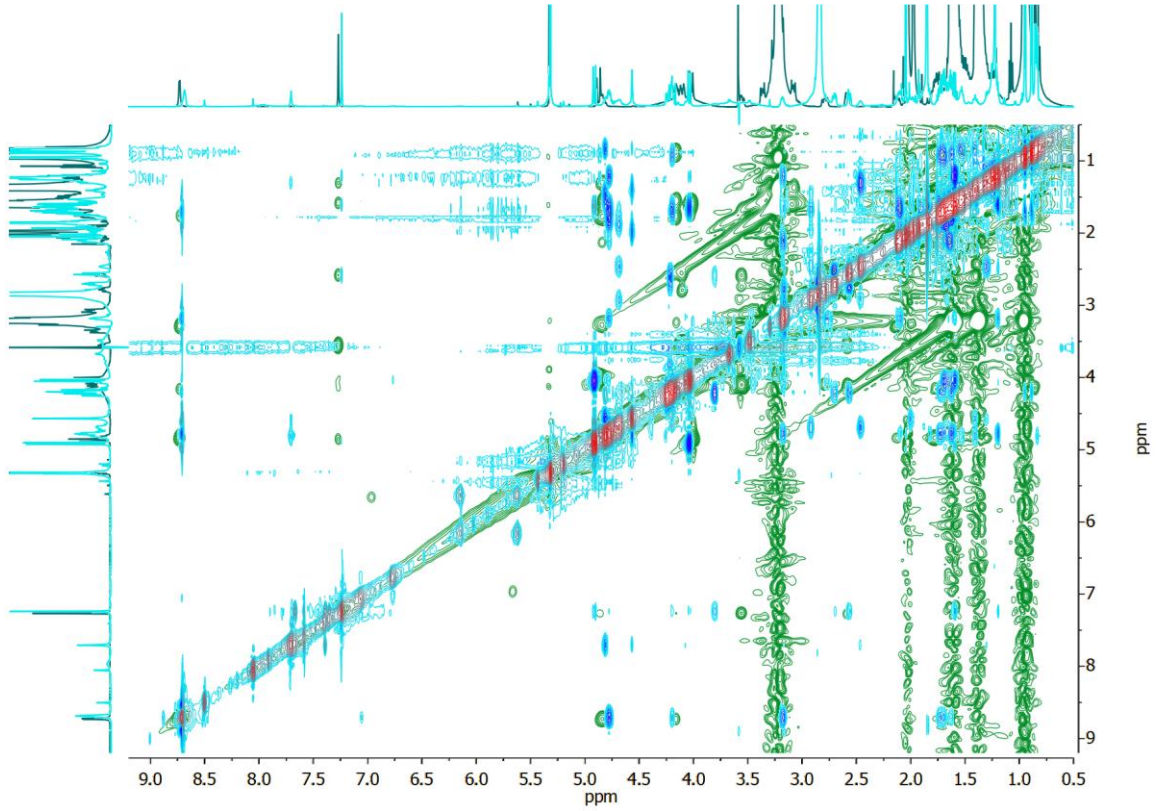


Figura 172. Superposición de los espectros de ROESY de la especie obtenida mediante adición de TBAAc (verde) o AcONa/15-corona-5 (azul celeste) sobre **D8**. Nótese que, en el último caso, aún queda una pequeña proporción de **D8** y sus picos de cruce también aparecen en azul. Además, el espectro se ha registrado con supresión de la señal del 15-corona-5 (3.6 ppm) que afecta a algunas señales vecinas.

Tras haber profundizado en los factores que intervienen en el proceso de formación de los complejos **(3A⁻·nH₂O)⊂D8**, nos planteamos extender nuestros estudios a la capacidad de estas especies para transportar diferentes aniones. Como se ha ejemplificado en la introducción, uno de los factores que favorece la actividad de un transportador es su capacidad para acoger al anión en su seno y decorarlo con un manto lipófilo que permite extraerlo del medio acuoso, a la vez que solubilizarlo en el entorno hidrofóbico de las membranas. El armazón hidrofóbico de **D8** ejerce esa función cuando se reorganiza para encerrar a los clústers en su interior y crear una coraza que lo separa del medio externo. Un segundo aspecto relevante es la cinética del atrapado y posterior liberación (K_{on}/K_{off}) del anión. Por tanto, nos pareció interesante estudiar cómo serían las tendencias en el transporte de los aniones estudiados y cuál sería la repercusión del medio acuoso en la formación de los complejos **(3A⁻·nH₂O)⊂D8**.

6.3.3.3 CP8 como transportador de aniones a través de membranas lipídicas.

Cuando se pretende estudiar una molécula como posible transportador, el protocolo habitual consiste en monitorizar el transporte a través de vesículas lipídicas de dimensiones controladas (LUV-*large unilamellar vesicles*), cuya bicapa emula a las membranas biológicas. Para ello, comúnmente se recurre a fosfolípidos que abundan en las membranas naturales, como el POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina). En ocasiones se utiliza colesterol en proporciones variables con el fin de aportar rigidez a la membrana y/o estudiar ese efecto en la actividad del transportador.[586,411a] Otra opción recurrente es incluir lípidos aniónicos, intentando emular las membranas de células cancerosas.[587] Mediante perturbaciones intencionadas del gradiente osmótico, se observa si la molécula estudiada es capaz de transportar iones a un lado o a otro de la membrana, con el fin de equilibrar ese gradiente. La actividad del transportador de iones puede recogerse a través de medidas directas o indirectas.[588] Las primeras son aquellas en que se detecta un cambio en las propiedades químicas de la muestra que es consecuencia directa del transporte de un ion. En el caso de las mediadas indirectas, se recurre a ellas especialmente cuando se conoce que el transporte no es de tipo uniporte, sino simporte M^+/X^- o antiporte M^-/X^-. Se registra el cambio de una propiedad directamente relacionada con M, y se asume que lleva asociado el transporte consiguiente de X, ya que ambos se producen de manera simultánea.

En la sección de la introducción dedicada a transporte, se ha discutido ampliamente sobre la relevancia de diversos aniones, especialmente a nivel biológico, y el creciente interés en el desarrollo de transportadores sintéticos que puedan imitar a los naturales y ayudar a comprender mejor los procesos de transporte. Los aniones más estudiados en este terreno son Cl^-, NO_3^-, HCO_3^-, aunque también se encuentra en aumento el interés por F^-, $H_2PO_4^-$ y SO_4^{2-}, pese a suponer un reto debido a su mayor penalización por deshidratación. A continuación, haremos un breve repaso a través de las técnicas más comúnmente utilizadas para estudiar el transporte de estos aniones, que se ilustran todas ellas en la Figura 173.

Cuando hablamos específicamente de estudiar el transporte de cloruro, uno de los métodos más extendidos consiste en detectar directamente el flujo de cloruro a través del ensayo de lucigenina.[589] El nitrato de bis-*N*-metilacridinio, comúnmente conocido como lucigenina, es un fluoróforo sensible a la presencia de haluros (excepto fluoruro). En este ensayo, se preparan vesículas cargadas con el fluoróforo en disolución acuosa de $NaNO_3$. La entrada de haluros al medio intravesicular desplaza al contraión nitrato de la lucigenina, y esto se traduce en la extinción de la emisión. Por otro lado, a través del uso de un electrodo selectivo

[586] a) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2002**, *1564*, 429-434. b) Soto-Arriaza, M. A.; Olivares-Ortega, C.; Quina, F. H.; Aguilar, L. F.; Sotomayor, C. P. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2013**, *1828*, 2763-2769.

[587] a) Martinho, N.; Marquês, J. M. T.; Todoriko, I.; Prieto, M.; de Almeida, R. F. M.; Silva, L. C. *Mol. Pharm.* **2023**, *20*, 918-928. b) Starosta, R.; Santos, T. C.; Dinis de Sousa, A. F.; Santos, M. S.; Corvo, M. L.; Tomaz, A. I.; de Almeida, R. F. M. *Front. Mol. Biosci.* **2023**, *9*, 1059116.

[588] Matile, S.; Sakai, N.; Hennig, A. Transport Experiments in Membranes. In *Techniques*; *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*; Steed, J. W., Gale, P. A., Eds.; John Wiley & Sons Ltd, Chichester UK, **2012**; Vol.2, pp 473–500.

[589] a) McNally, B. A.; Koulov, A. V.; Smith, B. D.; Joos, J. B.; Davis, A. P. *Chem. Commun.* **2005**, 1087-1089. b) Lisbjerg, M.; Valkenier, H.; Jessen, B. M.; Al-Kerdi, H.; Davis, A. P.; Pittelkow, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4948-4951.

de cloruro (ISE), también se puede seguir de manera directa el flujo de cloruro, por ejemplo, a través del intercambio Cl^-/NO_3^-.[590] En este ensayo, se cargan las vesículas con una concentración conocida de NaCl. Cuando se suspenden en un medio que no contiene Cl^-, sino NO_3^- en la misma concentración, se produce (si el transportador es capaz de promoverlo) la salida de cloruro al medio extravesicular, acompañada de la entrada de nitrato. El ISE detectará este aumento de la concentración de cloruro en el medio externo. Debido a que el anión nitrato es más lipofílico que cloruro, se suele suponer que este transporte está limitado por el cloruro,[591] aunque se aconseja tener precaución con estas asunciones, ya que existen precedentes en los que el transporte de nitrato es la etapa limitante.[592] Esto último también se aplica al ensayo con lucigenina, ya que también se valora el transporte Cl^-/NO_3^-. Cuando se conoce que una molécula es capaz de transportar Cl^- (aunque también es aplicable a otros aniones), se puede estudiar si se da el transporte H^+/Cl^- (o Cl^-/OH^-). Para ello se recurre al 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato sódico (conocido como HPTS o piranina) cuya emisión es sensible al pH.[593] En vesículas cargadas con este fluoróforo en disolución acuosa de NaCl, una acidificación del pH se verá traducida en la reducción de la emisión. Lo contrario ocurre cuando el pH intravesicular aumenta. Esta es una manera indirecta de estudiar el transporte de cloruro, ya que los cambios observables en la muestra son producidos por el transporte de H^+ u OH^-. Empleando un transportador de protones, como FCCP,[594] se puede determinar si la etapa limitante del transporte en el intercambio de H^+.

Con respecto al transporte de F^-, existen actualmente dos técnicas para estudiar directamente el transporte de este anión. La más comúnmente utilizada es el electrodo selectivo de fluoruro, a través del cual se detecta la salida de este anión del interior de las vesículas, mediada por un trasportador.[595] La otra es el empleo de un complejo de europio desarrollado por Butler en 2015.[596] Este complejo tiene dos brazos de quinolina que absorben alrededor de 330 nm y actúan como antenas, transfiriendo energía de manera eficiente al ion Eu(III) central, que emite luz roja en el rango 570-720 nm. En disolución acuosa, una molécula de agua ocupa el sitio de coordinación vacante de Eu(III), lo que produce una reducción significativa de la emisión. La presencia de fluoruro desplaza a esta molécula de agua, quedando el anión coordinado a Eu(III).[597] Es posible seguir este proceso a través del cambio en su espectro de emisión, especialmente de la banda a 596 nm. En el grupo de Butler han estudiado ampliamente este tipo de complejos de lantánidos.[598] Realizando modificaciones

[590] Jowett, L. A.; Gale, P. A. *Supramol. Chem.* **2019**, *31*, 297-312.
[591] a) Sisson, A. L.; Clare, J. P.; Taylor, L. H.; Charmant, J. P. H.; Davis, A. P. *Chem. Commun.* **2003**, *17*, 2246-2247. b) Valkenier, H.; Davis, A. P. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2898-2909.
[592] Yang, Y.; Wu, X.; Busschaert, N.; Furuta, H.; Gale, P. A. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 9230-9233.
[593]a) Gilchrist, A. M.; Wang, P.; Carreira-Barral, I.; Alonso-Carrillo, D.; Wu, X.; Quesada, R.; Gale, P. A. *Supramol. Chem.* **2021**, *33*, 325-344. b)
[594] a) Benz, R.; McLaughlin, S. *Biophys. J.* **1983**, *41*, 381-398. b) Monteiro, J. P.; Martins, A. F.; Lúcio, M.; Reis, S.; Geraldes, C. F. G. C.; Oliveira, P. J.; Jurado, A. S. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2011**, *43*, 287-298.
[595] Clarke, H. J.; Howe, E. N. W.; Wu, X.; Sommer, F.; Yano, M.; Light, M. E.; Kubik, S.; Gale, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 16515-16522.
[596] Butler, S. J. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10879-10882.
[597] Cataldo, A.; Chvojka, M.; Park, G.; Šindelář, V.; Gabbaï, F. P.; Butler, S. J.; Valkenier, H. *Chem. Commun.* **2023**, *59*, 4185-4188.
[598] Bodman, S. E.; Butler, S. J. *Chem. Sci* **2021**, *12*, 271-2734.

estructurales en los mismos, se han desarrollado derivados para detectar selectivamente otros aniones, como veremos más adelante.

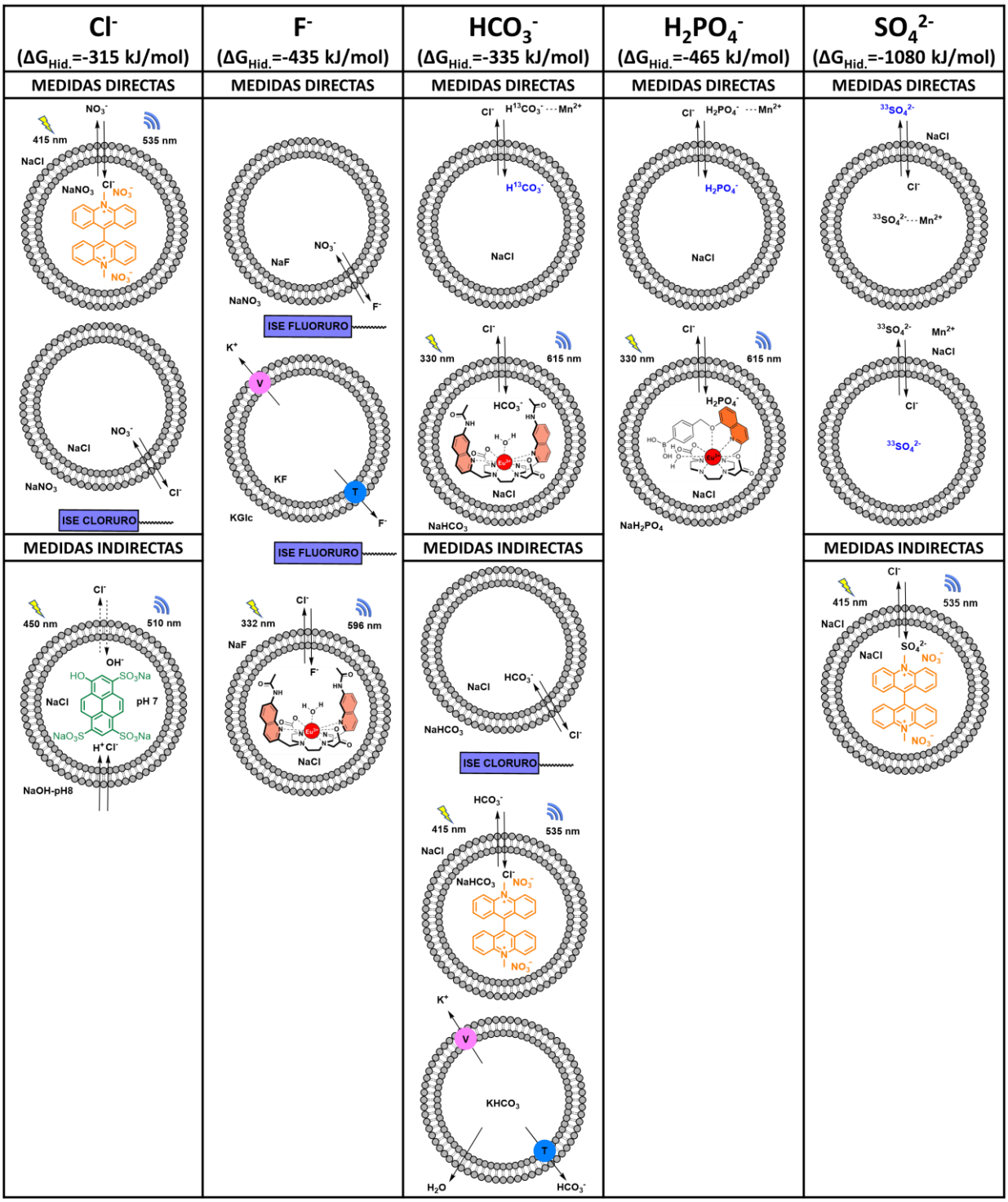


Figura 173. Métodos de detección directa e indirecta de diversos aniones en estudios de transporte a través de LUV.

Cuando se pretende estudiar el transporte de HCO_3^-, se puede recurrir a los ensayos previamente mencionados de lucigenina[599] y electrodo selectivo de cloruro.[600] Esas dos técnicas se emplean para el estudio de un posible transporte Cl^-/HCO_3^-, sustituyendo NO_3^- por HCO_3^- en ambos experimentos. De este modo, midiendo el transporte de cloruro se detecta de manera indirecta el transporte de HCO_3^-. Otro tipo de medida indirecta es el ensayo de variación osmótica. La salida de HCO_3^- de las vesículas, promovida por el anionóforo que se está estudiando, va acompañada por la salida de un catión por parte de un cationófono, generalmente K^+, por lo que se usa valinomicina. Se produce entonces la salida de agua, con el fin de equilibrar el gradiente osmótico. Esto tiene como consecuencia una disminución del tamaño de las vesículas, que se puede detectar por DLS.[601] El transporte de bicarbonato también se puede estudiar de manera directa mediante dos tipos de experimentos. Uno de ellos consiste en seguir el transporte de $H^{13}CO_3^-$ por ^{13}C RMN.[602] La suspensión de vesículas cargadas con NaCl se sitúa en el tubo de RMN. Cuando se adiciona $H^{13}CO_3^-$ a la muestra, inmediatamente aparece un pico en el espectro de ^{13}C RMN debido al $H^{13}CO_3^-$ extravesicular. Posteriormente, se adiciona Mn^{2+} en una concentración mucho menor que la de $H^{13}CO_3^-$ (aproximadamente 100 veces menor). El catión paramagnético Mn^{2+} interacciona con $H^{13}CO_3^-$ provocando un ensanchamiento de la señal de ^{13}C RMN. Es en este momento cuando se adiciona el transportador y, si es capaz de promover el transporte $H^{13}CO_3^-/Cl^-$, se observará como la señal de ^{13}C RMN vuelve a mostrarse como un pico perfectamente definido. Esto se debe a que el $H^{13}CO_3^-$ transportado al interior de las vesículas no puede interaccionar con Mn^{2+} porque este último es impermeable a la membrana. Otra técnica recientemente desarrollada para la detección directa de HCO_3^-, consiste en el uso de un complejo catiónico de europio, desarrollado por Butler para la detección de fluoruro. Cuando el HCO_3^- se coordina de manera reversible al complejo $[Eu.L^1]^+$, aumenta la emisión de Eu(III), especialmente a 615 nm.[603] Este complejo es insensible a Cl^- y NO_3^-.

Por último, $H_2PO_4^-$ y SO_4^{2-} son posiblemente los aniones menos estudiados en ensayos de transporte, debido a su alta hidrofilia y el elevado coste energético de su deshidratación. Para ambos es posible seguir el transporte de manera directa mediante ^{13}P RMN y ^{33}S RMN.[604,605] El trasfondo de estos ensayos es el mismo que el comentado previamente para HCO_3^-. Se usa un catión paramagnético que enmascara la señal de ^{13}P o ^{33}S cuando interacciona con los aniones. Cuando, por acción del transportador, los aniones cruzan la membrana, al no estar expuestos

[599] a) Harrell, W. A.; Bergmeyer, M. L.; Zavalij, P. Y.; Davis, J. T. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3950-3952. b) Hussain, S.; Brotherhood, P. R.; Judd, L. W.; Davis, A. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1614-1617. c) Ref 411.

[600] a) Hernando, E.; Soto-Cerrato, V.; Cortés-Arroyo, S.; Pérez-Tomás, R.; Quesada, R. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 1771-11778. b) Olivari, M.; Montis, R.; Berry, S. N.; Karagiannidis, L. E.; Coles, S. J.; Horton, P. N.; Mapp, L. K.; Gale, P. A.; Caltagirone, C. *Dalton Trans.* **2016**, *45,* 11892-11897.

[601] Jowett, L. A.; Howe, E. N. W.; Wu, X.; Busschaert, N.; Gale, P. A. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 10475-10487.

[602] a) Davis, J. T.; Gale, P. A.; Okunola, O. A.; Prados, P.; Iglesias-Sánchez, J. C.; Torroba, T.; Quesada, R. *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 138-144. b) Busschaert, N.; Gale, P. A.; Haynes, C. J. E.; Light, M. E.; Moore, S. J.; Tong, C. C.; Davis, J. T.; Harrell, W. A. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6252-6254.

[603] Martínez-Crespo, L.; Hewitt, S. H.; De Simone, N. A.; Šindelář, V.; Davis, A. P.; Butler, S.; Valkenier, H. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 7367-7375.

[604] Cataldo, A.; Norvaisa, K.; Halgreen, L.; Bodman, S. E.; Bartik, K.; Butler, S. J.; Valkenier, H. *J. Am. Chem. Soc*. **2023**, *145*, 16310-16314.

[605] Busschaert, N.; Karagiannidis, L. E.; Wenzel, M.; Haynes, C. J. E.; Wells, N. J.; Young, P. G.; Makuc, D.; Plavec, J.; Jolliffe, K. A.; Gale, P. A. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1118-1127.

a la presencia de este catión paramagnético, dan lugar a la aparición de señales definidas en los espectros de ^{13}P RMN y ^{33}S RMN. El transporte de SO_4^{2-} también se puede seguir de manera indirecta en el ensayo de lucigenina.[606] En este caso, se mantiene la misma concentración de cloruro a ambos lados de la membrana. El detonante del transporte es un pulso de Na_2SO_4. Si la entrada de SO_4^{2-} al interior de las vesículas va acompañada de la salida de cloruro, se producirá una disminución en la emisión de la lucigenina. Para $H_2PO_4^{2-}$, recientemente se ha empleado un complejo de europio preparado también en el grupo de Butler[607] para la detección directa de este anión.[604] Las diferencias estructurales de este complejo con respecto al usado en la detección de fluoruro o bicarbonato hacen que sea selectivo para la detección de fosfato.

Tras haber estudiado en profundidad los factores que influyen en el proceso de reconocimiento de aniones de nuestro receptor, decidimos evaluar si **CP8/D8** sería capaz de facilitar el transporte de aniones a través de membranas lipídicas. Teníamos evidencias sólidas de su capacidad para acomodar haluros, así que decidimos empezar por el anión cloruro. El transporte de cloruro tiene una enorme trascendencia a nivel biológico, como se ha detallado en la introducción cuando hablamos de la familia de los canales trasportadores de cloruro (ClC)[400-404] o del regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis cística (CFTR) (Figura 62).[405-407] Además, en nuestro caso, el anión cloruro era uno de los que mejor reconocía el receptor que estudiamos, **D8**. Utilizando los ensayos de lucigenina y HPTS previamente comentados, además de variaciones de estos, elaboramos una secuencia de experimentos de transporte con el fin de determinar si **D8** era capaz de facilitar el transporte de cloruro y, en caso de que así fuese, dilucidar el mecanismo de este transporte. En la Figura 174 se ilustra de manera general los experimentos realizados. La secuencia está planteada en un orden determinado, de manera que, a medida que avanzamos en los experimentos, se va completando la información con respecto a la capacidad de **D8** como transportador. De este modo, primero, el ensayo de lucigenina nos permitiría saber si **D8** transporta cloruro (Figura 174, cuadrante 1). Posteriormente, modificaciones de este ensayo nos darían información sobre si ese transporte, en caso de producirse, va acompañado del transporte de un catión alcalino (Figura 174, cuadrante 2), así como sobre si **D8** pudiese transportar otros haluros (Figura 174, cuadrante 3). Los ensayos con HPTS nos darían información acerca de la capacidad de **D8** para modificar el pH intravesicular, lo que se traduce en el co-transporte de H^+ o el intercambio de OH^- (Figura 174, cuadrante 4). Además, variaciones de este experimento también nos permitirían estudiar la etapa limitante del transporte (Figura 174, cuadrante 5), así como la posibilidad de estudiar las velocidades relativas del transporte de otros aniones con respecto a la referencia de cloruro (Figura 174, cuadrante 6). Para los experimentos con lucigenina y HPTS se realizaron medidas de DLS para comprobar la homogeneidad en el tamaño, estabilidad y número de partículas de diferentes dispersiones de vesículas preparadas en el transcurso de la investigación (ver Figura 215, sección experimental, página 396).

USC DE COMPOSTELA

[606] Busschaert, N.; Wenzel, M.; Light, M. E.; Iglesias-Hernández, P.; Pérez-Tomás, R.; Gale, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 141336-14148.

[607] Bodman, S. E.; Breen, C.; Plasser, F.; Butler, S. *J. Org. Chem. Front.* **2022**, *9*, 5494-5504.

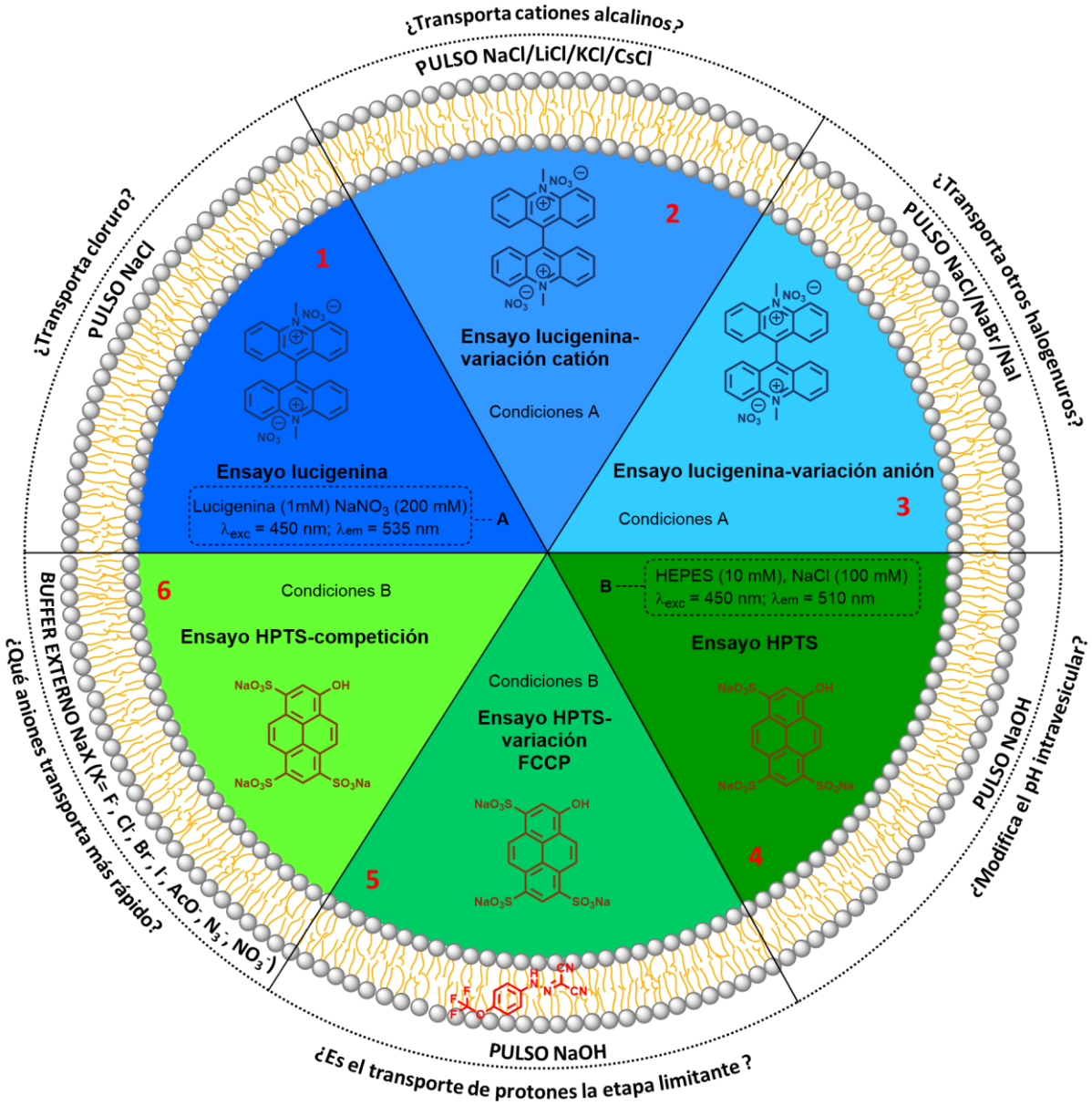


Figura 174. Secuencia de experimentos llevados a cabo para el estudio de la actividad de **D8** como transportador.

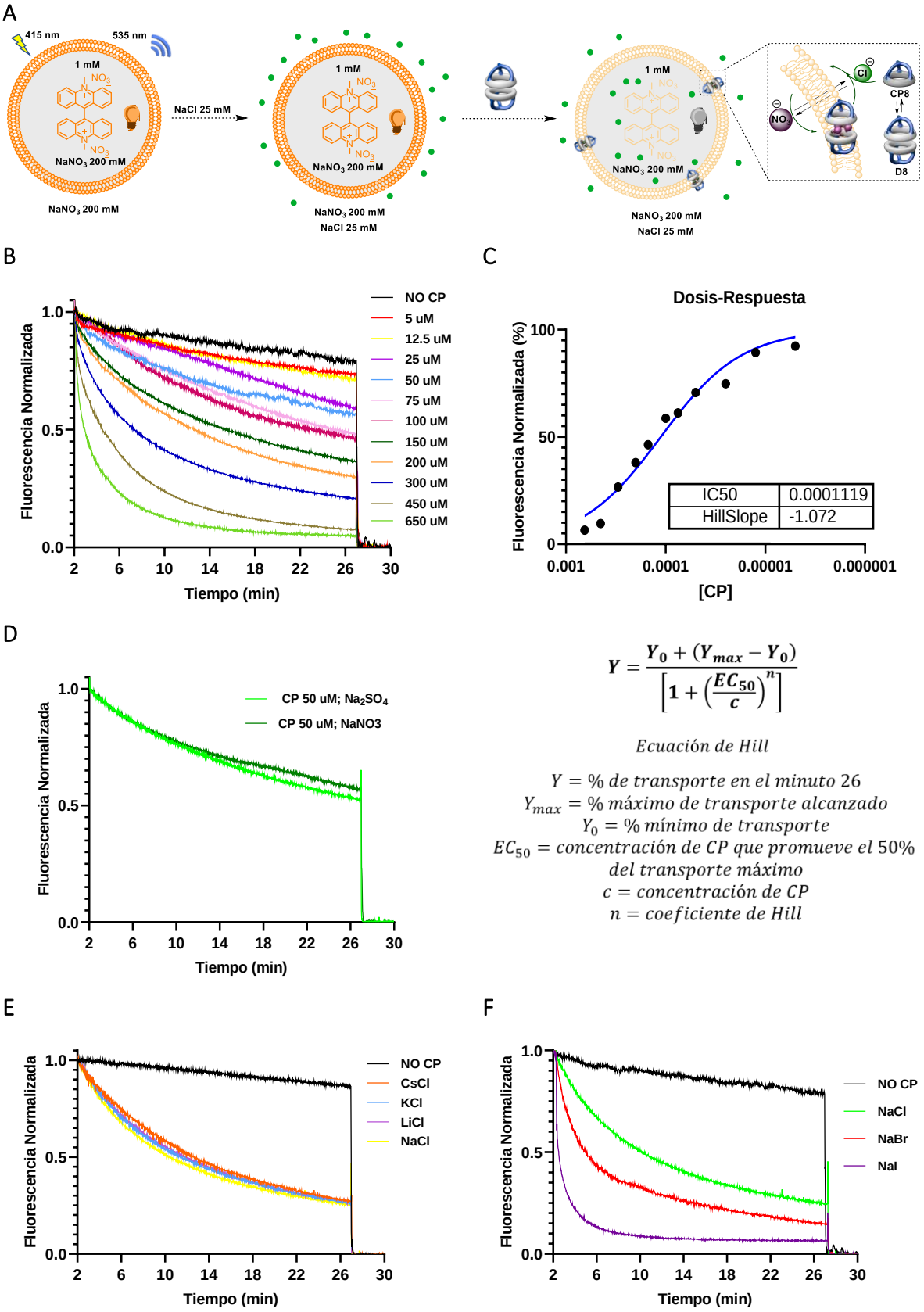
Empezamos, por tanto, por determinar si **D8** trasportaba cloruro recurriendo para ello al ensayo de lucigenina (Figura 175). El procedimiento experimental sobre la preparación de las vesículas, la toma y tratamiento de datos se encuentra detallado en la sección de metodología. El experimento empieza recogiendo la emisión de la muestra que solo contiene la suspensión de vesículas que tienen encapsulada la lucigenina (**Lucigenina⊂LUV**). Tras un minuto, se añade NaCl, para crear el gradiente osmótico entre el medio intra- y extravesicular. Pasado otro minuto de equilibrado, se añade el trasportador y se recoge si su presencia tiene consecuencia en la emisión. Para nuestra satisfacción, se comprobó que la adición de **D8** provocaba, efectivamente, el apagado progresivo de la emisión de la lucigenina (Figura 175B). Este transporte, comparado con otros publicados en los últimos años[501] era muy lento, por lo que decimos registrar la emisión durante 25 minutos (el transportador se añade en el minuto 2) tras su adición. Pasado este tiempo se añadía Tritón (10% v/v) para provocar la disgregación de las vesículas y obtener un máximo de emisión que pudiésemos utilizar para la normalización de los datos. Pasados tres minutos de la adición de Tritón, se da por finalizado el experimento, que

dura en su totalidad 30 minutos. El ajuste de estos valores normalizados a la ecuación de Hill nos permite obtener la actividad de **D8** como transportador de cloruro a través de su EC_{50}, que es 112 µM (Figura 175C). Aunque, a la luz de este experimento, queda claro que **D8** transporta cloruro, desconocíamos si se trataba de transporte Cl^-/NO_3^- o Cl^-/Na^+. Para dilucidar ente ambos, hicimos algunas variaciones en el experimento con lucigenina y volvimos a comprobar el transporte.

Por un lado, preparamos las vesículas utilizando como medio intra y extravesicular una disolución de lucigenina en Na_2SO_4 aq. (200 mM). Comparamos el trasporte observado utilizando la misma concentración de **CP8** en los dos ensayos (medio Na_2SO_4 *vs* medio $NaNO_3$). En este tipo de experimento, lo esperable es observar que en las medidas donde tenemos Na_2SO_4 en el interior de las vesículas, se vea una disminución clara en la actividad del transportador, ya que la energía de hidratación de SO_4^{2-} hace que sea mucho más difícil de transportar. De ese modo, el transporte Cl^-/SO_4^{2-} será mucho menos eficiente o no tendrá lugar. Sin embargo, lo que observamos en nuestro caso es que el transporte permanece prácticamente inalterado cuando cambiamos $NaNO_3$ por Na_2SO_4 (Figura 175D). Esto quiere decir que, o bien **CP8** es capaz de promover tanto el intercambio Cl^-/NO_3^- como Cl^-/SO_4^{2-}, o bien ninguno de los dos, y se trata entonces del simporte Cl^-/Na^+. Para determinarlo, tomamos el experimento de lucigenina (con $NaNO_3$ en el medio) y realizamos varias medidas con una concentración de **CP8** fija, pero variamos la sal de cloruro que se usa para promover el gradiente. Por tanto, utilizamos LiCl, NaCl, KCl y CsCl para determinar si se trataba de un transporte Cl^-/M^+, ya que un aumento o disminución en el tamaño del catión, tendría repercusión en la actividad de **CP8**. Esto no fue lo que observamos, ya que la actividad se mostró inalterada en todos los casos (Figura 175E), haciendo que descartásemos el simporte Cl^-/M^+. Esto nos lleva a concluir que el primer estudio con lucigenina sugería un transporte basado en el intercambio Cl^-/NO_3^- (Figura 175A y B), que implicaría, en contra de lo que habitualmente se supone, que **CP8** también era capaz de transportar iones SO_4^{2-}.

Procedimos entonces a estudiar el efecto que tendría cambiar la adición de NaCl por NaBr o NaI, ya que sabemos que **CP8** también es capaz de acomodar estos haluros. El ensayo de lucigenina no nos permite hacer comparaciones con NaF, ya que este fluoróforo es insensible a la presencia de fluoruro. Manteniendo una concentración fija de **CP8** (75 µM), tomamos medidas cambiando la sal de sodio utilizada. El resultado muestra un aumento en la actividad de transporte que sigue la tendencia $I^- > Br^- > Cl^-$ (Figura 175F). Esta tendencia es justo la contraria que habíamos observado en los estudios de RMN a través de los cuales seguíamos la formación de los complejos **$(3A^-\cdot nH_2O)\subset$D8**. Esto podría estar causado por la dificultad de **D8** para liberar en el medio intravesicular aquellos aniones por los que muestra más afinidad, o por su mayor lipofilia. Según los datos de cristalografía, el proceso de complejación en medios orgánicos lleva a un plegamiento de **CP8** que protege fuertemente al clúster del medio externo. Debido a esto, en medio acuoso, la apertura del complejo para la liberación del anión podría estar más dificultada. Desafortunadamente, no es posible comprobar experimentalmente si la especie que se forma en la membrana lipídica es **$(3A^-\cdot nH_2O)\subset$D8**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



$$Y = \frac{Y_0 + (Y_{max} - Y_0)}{\left[1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^n\right]}$$

Ecuación de Hill

$Y = \%$ *de transporte en el minuto 26*
$Y_{max} = \%$ *máximo de transporte alcanzado*
$Y_0 = \%$ *mínimo de transporte*
$EC_{50} =$ *concentración de CP que promueve el* 50% *del transporte máximo*
$c =$ *concentración de CP*
$n =$ *coeficiente de Hill*

Figura 175. A) Esquema representativo del ensayo de lucigenina⊂LUV; B) Resultado del ensayo de lucigenina con CP8; C) Ajuste de la actividad de CP8 a la ecuación de Hill; D) Comparativa entre el ensayo con $NaNO_3$ y con Na_2SO_4; E) Resultados obtenidos tras la variación de la sal de cloruro; F) Resultados obtenidos tras la variación de la sal de sodio. Para estos experimentos λexc= 415 nm y λem= 535 nm.

Para determinar la implicación de los complejos estudiados en disolución tipo **(3A$^-$·nH$_2$O)⊂D8** en este transporte, decidimos estudiar la capacidad transportadora de **CP11**, que como ya habíamos demostrado no era capaz de reconocer aniones y formar los complejos **(3A$^-$·nH$_2$O)⊂D11**. El estudio de **D11** frente al ensayo de lucigenina, reveló una reducida capacidad transportadora de esta cápsula (Figura 176). Además, se observa la precipitación de la muestra al llegar a una concentración 200 µM, lo que sugiere una cierta dificultad de **CP11** para incorporarse a las membranas. Dada la similitud estructural entre **D8** y **D11**, la inactividad de **D11** como transportador sugiere que, posiblemente, el transporte pueda estar mediado por la especie **(3A$^-$·nH$_2$O)⊂D8** cuando estudiamos **D8**.

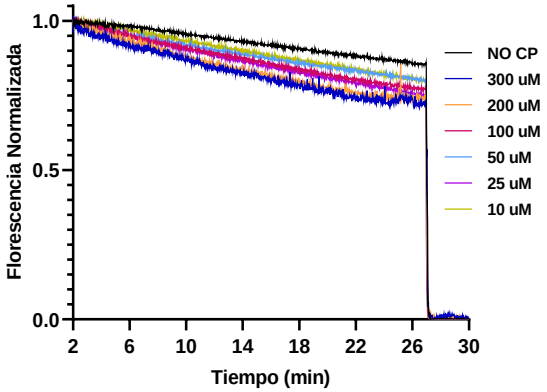


Figura 176. Variación en la emisión de la lucigenina con el tiempo para la determinación del transporte de cloruro mediado por **CP11**.

A continuación, decidimos estudiar si el transporte de cloruro iba asociado a un cambio de pH del medio, que podría implicar un mecanismo simportador Cl^-/H^+ o antiportador Cl^-/OH^-. Para ello, recurrimos al ensayo con HPTS (Figura 177A),[593] ya que es un fluoróforo sensible al pH, como se ha comentado previamente. La información sobre la preparación de las vesículas para este ensayo, así como sobre la toma y análisis de datos, se encuentra recogida en el apartado de metodología. En estos experimentos, comenzamos recogiendo la emisión de la muestra que solo contiene la dispersión de vesículas, en las que se encuentra encapsulado el fluoróforo (**HPTS⊂LUV**). Un minuto después, se añade el pulso de NaOH, creando un gradiente de pH entre el medio intra- y extravesicular (pH 7 y 8, respectivamente). Tras un minuto de equilibrado, se adiciona **CP8** y se observa qué efecto tiene sobre la emisión del HPTS. Claramente se pudo observar que promueve la basificación del medio intravesicular, ya que la emisión del HPTS aumentaba con el tiempo (Figura 177B). Un aspecto llamativo es que este transporte es mucho más eficiente que el anteriormente determinado para el cloruro, ya que el EC_{50} obtenido era de 3 µM (Figura 177C).

Todo parece indicar que la etapa limitante es el movimiento de los iones Cl^-. Para confirmarlo, hicimos una comprobación indirecta, añadiendo un transportador de protones que afectaría al transporte si la migración de H^+ fuese la etapa más lenta (Figura 177D).[593] Para ello, utilizamos el carbonilcianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), que es conocido por ser un eficiente transportador de protones.[594] Si utilizando este transportador en las medidas, junto con **CP8**, viéramos un aumento en la actividad registrada, significaría que la etapa limitante es el transporte de H^+, ya que estaría siendo aliviada por la acción del FCCP. Sin embargo, la actividad no se vio afectada por la presencia de FCCP, tal como ya esperábamos (Figura 177D). Esta observación experimental puede tener dos posibles causas, que el

transporte que tiene lugar sea Cl^-/H^+, siendo el transporte de cloruro la etapa limitante, o que la basificación que vemos en el ensayo de HPTS sea debida al intercambio Cl^-/OH^-. Si este último fuera el caso, al no estar implicados los protones en el transporte, la adición de FCCP no tendría ningún efecto. Actualmente no existe ningún ensayo para poder diferenciar entre el simporte Cl^-/H^+ y en antiporte Cl^-/OH^-, de manera que se debe concluir que ambos podrían darse.

Finalmente, decidimos hacer uso de la versatilidad del ensayo de HPTS y la capacidad de **CP8** para inducir cambios en el pH del medio asociado al transporte de iones para estudiar la velocidad relativa (selectividad) con la que **CP8** transporta los distintos aniones (Figura 177E). Decidimos investigar aquellos con los que previamente, en estudios de RMN, habíamos observado la formación de complejos **$(3A^-\cdot nH_2O)\subset D8$**. En este nuevo ensayo no se emplea un gradiente de pH para impulsar el transporte, si no diferentes sales entre los medios intra- y extravesiculares. De este modo, se preparan el mismo tipo de **HPTS⊂LUV** que habíamos utilizado para el ensayo previo, en una disolución acuosa de HEPES (10 mM) y NaCl (100 mM) a pH 7. Sin embargo, en el momento de realizar las medidas, estas vesículas se suspenden en una disolución acuosa de HEPES (10 mM) y NaX (100 mM) a pH 7, siendo NaX las sales de sodio de los diferentes aniones que pretendemos estudiar (NaF, NaCl, NaBr, NaI, NaAcO, $NaNO_3$ y NaN_3) (Figura 177E). De esta manera, en el medio intravesicular siempre hay cloruro, mientras que se variaba el anión en el medio extravesicular. En este experimento, lo que desencadena la respuesta observable es la diferencia de velocidad con que **CP8** transporta Cl^- fuera de las vesículas frente a la velocidad con que transporta X^- al interior de estas. Por tanto, hay tres escenarios posibles, que el anión situado fuera de las vesículas sea transportado más rápidamente, más lentamente, o a la misma velocidad que Cl^- (Figura 177E). Cuando los aniones se transportan a diferentes velocidades llevan asociado un cambio del pH del medio, por lo que cada una de estas alternativas dan lugar a una respuesta diferente en la emisión del HPTS (Figura 177F). De esta manera, tal y como cabría esperar, cuando a ambos lados de la membrana hay NaCl no se observa ninguna respuesta tras la adición de **CP8**. La emisión se mantiene constante porque no se induce ningún gradiente de velocidad. Sin embargo, si el anión que hay en el exterior es trasportado más rápidamente que cloruro, de manera que el intercambio X^-/H^+ (o X^-/OH^-) es más rápido que Cl^-/H^+ (o Cl^-/OH^-), se producirá una acidificación del medio intravesicular, que se aprecia a través de la disminución en la emisión del HPTS. Esto es lo que se observaba cuando empleábamos NaBr o NaI en el medio externo (Figura 177E), ya que, como previamente habíamos observado en el ensayo con lucigenina, **D8** transporta Br^- y I^- de manera más rápida que Cl^-. Esto nos confirma la tendencia en el transporte $I^- > Br^- > Cl^-$. Cuando se utilizó $NaNO_3$ en el medio extravesicular, se observó prácticamente la misma respuesta que con NaCl, la emisión apenas se ve afectada. Esto indica que la velocidad de transporte de Cl^- es similar a la de NO_3^-. Por último, NaF, NaAcO y NaN_3 inducen un aumento en la emisión del HPTS debido a la basificación del medio interno. Esto, a su vez, tiene su origen en que la velocidad de transporte de los aniones fluoruro, acetato y azida es menor que la de cloruro. De este modo, se aprecia la siguiente tendencia global para la velocidad relativa con que **CP8** transporta estos aniones: $I^- > Br^- > Cl^- \approx NO_3^- > F^- > AcO^- > N_3^-$. Todo parece indicar que son varios factores los que influyen en estos resultados, y no es posible analizarlos desde un único punto de vista. Por un lado, está la capacidad de **D8** para acomodarlos en su interior y liberarlos posteriormente. Por otro lado, desconocemos el efecto global que tiene el medio acuoso en que realizamos las medidas. Aunque tenemos evidencias de que el agua es necesaria para la formación de los complejos **$(3A^-\cdot nH_2O)\subset D8$**, no sabemos hasta qué punto un medio puramente acuoso pudiera entorpecer la deshidratación parcial de los aniones que se debe producir para la formación de dichos complejos.

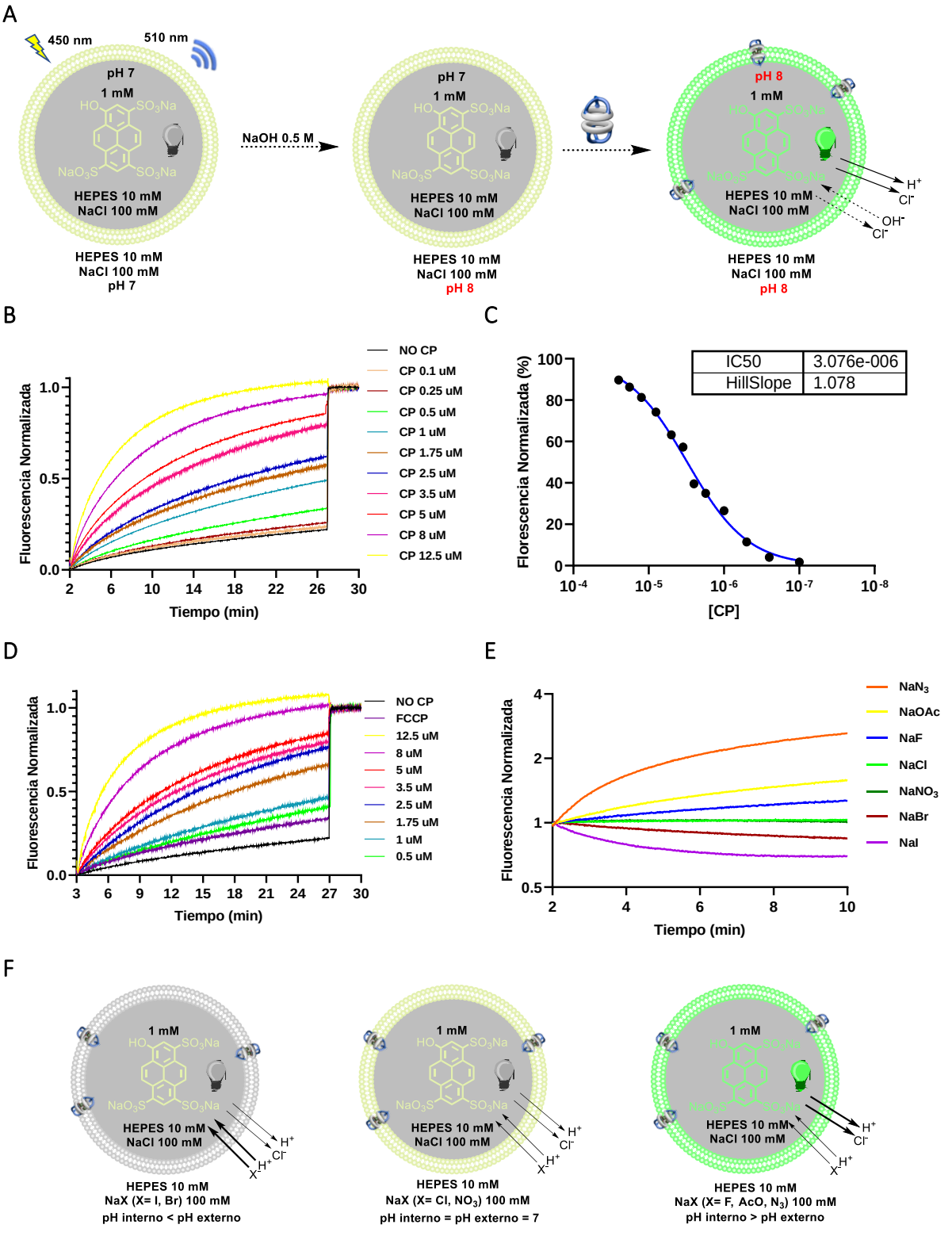


Figura 177. A) Esquema representativo del ensayo de HPTS⊂LUV; B) Resultado del ensayo con **CP8**; C) Ajuste de la actividad de **CP8** a la ecuación de Hill; D) Resultado del ensayo con la adición de FCCP; E) Resultados obtenidos tras la variación de la sal de sodio del medio externo; F) Esquema representativo de los resultados obtenidos en E. Para estos experimentos λexc= 450 nm y λem= 510 nm.

De los estudios de transporte realizados con **CP8** podríamos concluir que, a la luz del ensayo con lucigenina, **CP8** es capaz de facilitar el antiporte X^-/NO_3^-, siendo X = Cl^-, Br^- y I^-.

Además, este ensayo también muestra que la eficiencia en esta serie es $I^- > Br^- > Cl^-$. En cuanto al ensayo con HPTS, ha mostrado que **CP8** es capaz de promover la basificación intravesicular, lo que sugiere una actividad del tipo simportador Cl^-/H^+ o antiportador Cl^-/OH^-. Aunque no es posible diferenciar entre estas dos posibilidades, nos decantamos por el mecanismo tipo simportador que se podría explicar por la protonación de la amina terciaria de la tapa *tris*-triazólica. También hemos podido determinar que el transporte de cloruro es la etapa limitante y que **CP8** es mucho mejor transportador del par Cl^-/H^+ (o Cl^-/OH^-) que de Cl^-/NO_3^-, siendo EC_{50} para el primer caso 40 veces más eficiente que para el segundo. Esto se debe a que en el transporte Cl^-/NO_3^- no hay etapa que agilice el proceso, ya que la velocidad de transporte de Cl^- es muy similar a la de NO_3^-. Esto último queda demostrado a la luz de los resultados obtenidos cuando variamos la sal en el medio externo del ensayo con HPTS y dejamos que la diferencia de velocidades de transporte empuje los cambios en la emisión. Gracias a estos experimentos pudimos determinar la siguiente tendencia en la selectividad: $I^- > Br^- > Cl^- \approx NO_3^- > F^- > AcO^- > N_3^-$.

6.3.4 Estudios con CP9

Tras haber estudiado cómo afecta la presencia de tapa molecular, el esqueleto peptídico y el agua a la formación de las especies **$(3A^-\cdot nH_2O)\subset$D8**, estábamos convencidos de que el estudio de **CP9** arrojaría luz sobre el efecto que tiene la incorporación de una tapa más rígida como es el 1,3,5-tris(azidometil)-2,4,6-trietilbenceno (pre-tapa **B**). Pretendíamos determinar si con **CP9** también era capaz de reconocer diferentes aniones gracias al mecanismo basado en una reorganización drástica del esqueleto peptídico y la disociación de los dos componentes del dímero para albergar en su interior otro tipo de anión hidratado.

Comenzamos estudiando con detalle la estructura de **CP9**. Sabemos que este péptido forma dímeros, tanto por el desplazamiento de la señal de su protón amídico a 7.32 ppm, por las bandas típicas en su espectro de IR [(3313 (NH), 1624 (amida I) y 1526 cm^{-1} (amida II)] y por la detección del pico correspondiente a **D9** por espectrometría de masas (2250.3841 m/z, $[D9+Na]^+$). El análisis de los espectros 1D y 2D RMN parece indicar que **D9** presenta un marcado aumento en la rigidez en comparación con **D8** (Figura 178). Uno de estos indicativos lo encontramos en la multiplicidad de los protones correspondientes al metileno que actúa de *linker* entre el esqueleto peptídico y la tapa. En el espectro ^{1}H RMN de **D9** estos protones aparecen como un sistema AB y no como un singlete, como ocurría en **D8**. Esto sugiere una menor libertad conformacional de los brazos triazólicos de **D9**. En el espectro de ROESY de **D9** se observa que para el protón triazólico solo se da un pico de cruce, con el protón $H\alpha_{Leu}$, que además es muy débil (Figura 178). Este dato contrasta sorprendentemente con aquellos nOes que se apreciaban para el mismo protón de la especie **D8**, para los que era posible visualizar hasta ocho picos de cruce, con los protones del anillo de Acp, la tapa molecular, el *linker* metilénico y la leucina (Figura 148). La restricción en el movimiento que introduce la tapa **B** viene determinada, tanto por el anillo aromático hexasustituido como por la presencia de un único metileno que hace de conector con el triazol, y no dos de ellos, como es el caso de la tapa **A**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

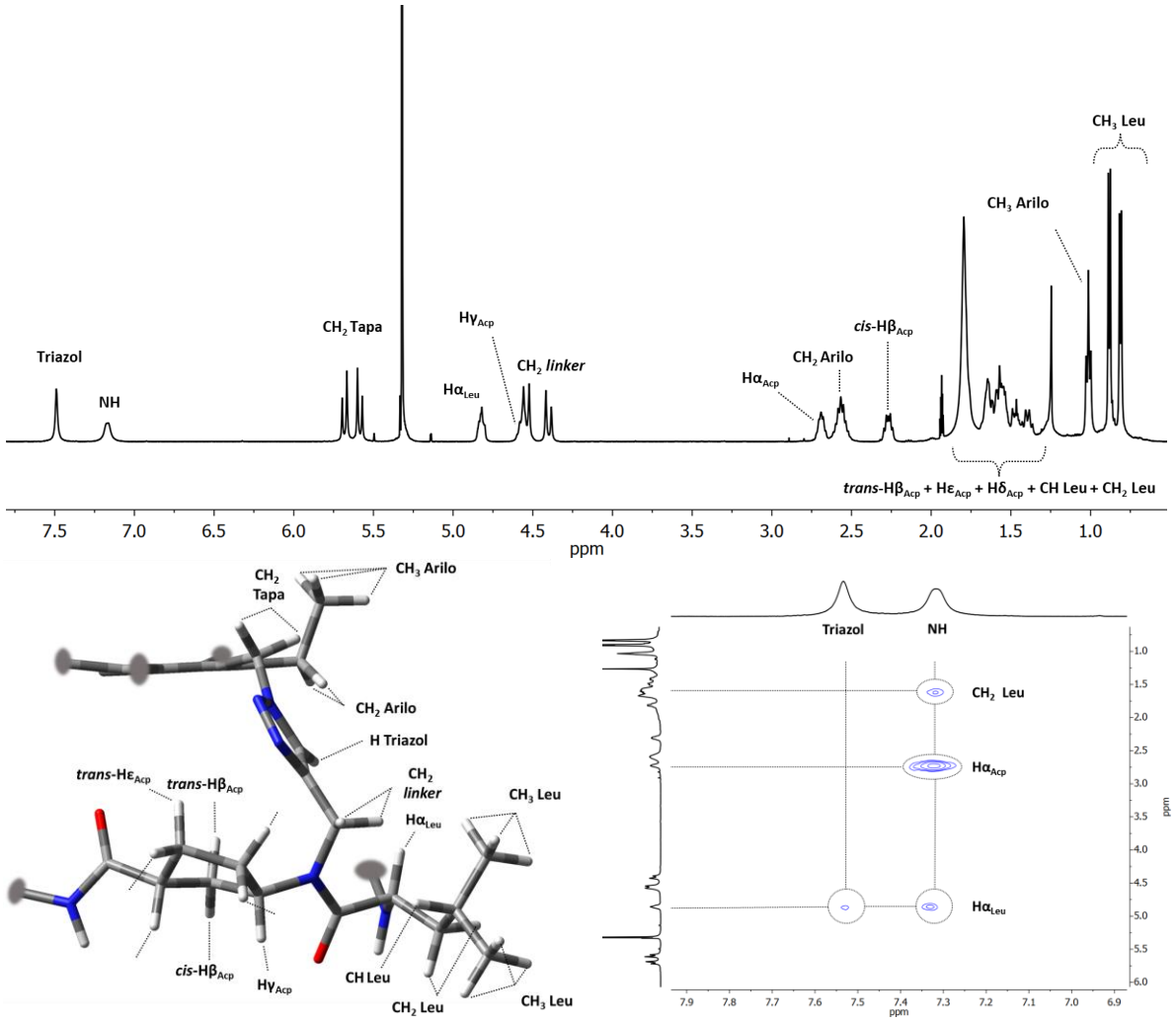


Figura 178. Asignación de señales para el ^{1}H RMN de **CP9** (5 mM en 10% CD_3CN/CD_2Cl_2) y ampliación del espectro de ROESY en el que se pueden apreciar los nOes de los protones triazólico y amídico.

Otra característica que pudimos advertir sobre **D9** es el menor desplazamiento químico de la señal del NH (7.17 ppm) frente a los 8.00 ppm para **D8** (ambos a la misma concentración, 5 mM). Esto podría interpretarse como el resultado de interacciones más débiles entre las subunidades de **D9**. Pensamos que, quizás, los grupos NH y C=O no estarían orientados de la manera más idónea para la dimerización, debilitando los enlaces de hidrógeno. Sin embargo, esta apreciación no es suficiente como para poder afirmar que **D9** es un dímero más débil que **D8**, ya que contrasta con otra observación experimental. Según los espectros de IR de ambos dímeros, la banda de tensión del enlace N-H para **D8** sale a 3316 cm^{-1}, mientras que para **D9**, a 3305 cm^{-1}, lo que significaría que los enlaces de hidrógeno de **D9** son ligeramente más fuertes que los de **D8**.

Para indagar sobre esta cuestión decidimos llevar a cabo una optimización de la geometría de **D9** usando como coordenadas de partida los datos cristalográficos de **D8**. Además, usamos también B3LYP como funcional y 6-31G(d,p) como base, al igual que habíamos hecho para estudios previos con **D8**. Para poder hacer comparaciones, optimizamos también la estructura de **D8** sin la molécula de acetonitrilo en su interior. De los resultados obtenidos pudimos hacer varias apreciaciones. Por un lado, la distancia promedio del enlace de hidrógeno ($d_{O\cdots H}$) para **D9** es 2.01 Å, mientras que para **D8** es ligeramente más corta, 1.93 Å. Por otro lado, los grupos

carbonilo de las α-Leu de **D9** están ligeramente orientados hacia el interior. Concretamente, mientras que el ángulo C=O···H es, en promedio, de 135.8° para **D8**, se encuentra un valor de 125.7° para **D9**. Esto se traduce en que los oxígenos carbonílicos de **D9** estarían mejor alineados para la formación del enlace de hidrógeno (siendo el ángulo óptimo de 120° si asumimos hibridación sp^2 del oxígeno carbonílico). Por otra parte, todos los triazoles de **D9** se encuentran girados, formando enlaces de hidrógeno con los oxígenos carbonílicos de los γ-Acp ($d_{O\cdots H}$= 2.34 Å), de manera que componen una especie de "pared aromática" en torno a la cavidad que queda entre el CP y la tapa. Esto resalta con respecto a la estructura de **D8**, en la que todos los protones triazólicos apuntan a la cavidad.

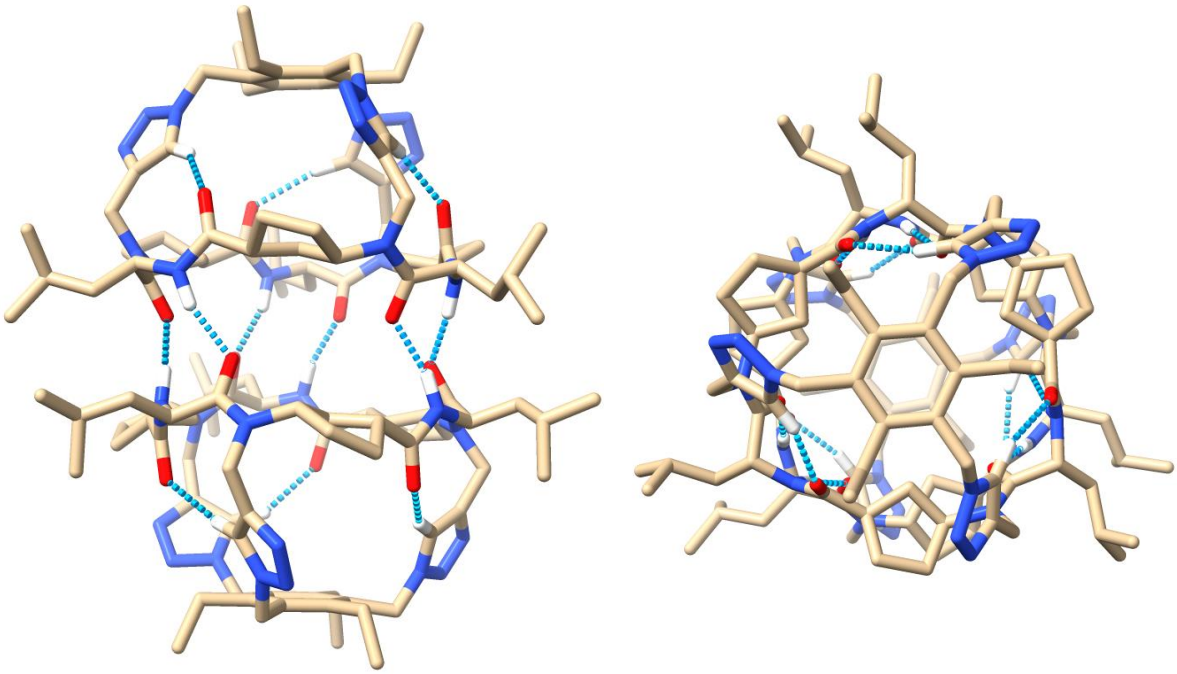


Figura 179. Vistas frontal (izquierda) y superior (derecha) de la estructura de mínima energía encontrada para la especie **D9**, empleando B3LYP/6-31G(d,p).

A continuación, abordamos la capacidad para reconocer aniones de **D9**. Para ello, realizamos adiciones de TBAF sobre una disolución de **D9**, siguiendo el proceso por ^{1}H RMN, cuyos datos más relevantes se muestran en la Figura 180. Estos experimentos de adición se realizaron dos veces, cambiando el estándar interno entre ambos. En el primero de ellos se usó el TMSS (Figura 180A), que se descompone con las sucesivas adiciones del TBAF, por lo que se repitió posteriormente empleando dioxano (Figura 180B). Aunque de forma general los resultados obtenidos sugieren la formación de la misma especie, se aprecian ciertas diferencias entre ellos. En ambos experimentos se observa que, con la progresiva adición de TBAF, las señales de **D9** (en morado) van desapareciendo para dar paso a un nuevo grupo de señales que pertenece, en principio, a la especie complejada (en verde). Sin embargo, el comportamiento del dímero **D9** parece depender del estándar utilizado. Para los espectros recogidos en presencia del TMSS, la señal del NH del dímero **D9** se desplaza ligeramente a campo alto (de 7.18 ppm a 7.09 ppm), sugiriendo que a medida que se reduce la concentración su concentración, aumenta la proporción del monómero **CP9**, en un proceso de interconversión rápida en la escala de RMN, por lo que la señal se apantalla. En este caso, la señal del protón amídico de la nueva especie formada resuena a 8.82 ppm.

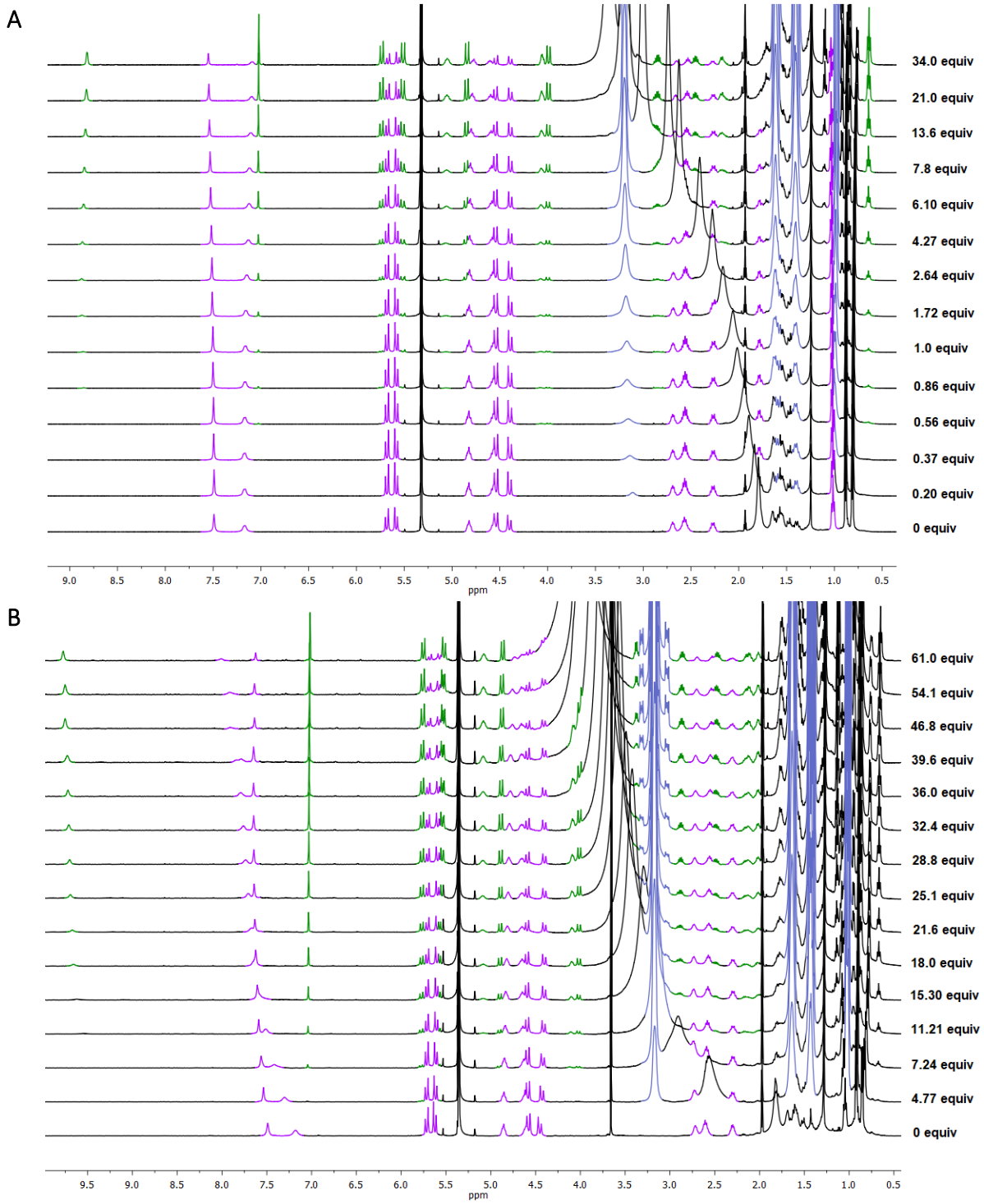


Figura 180. Conjunto de espectros obtenidos tras el seguimiento por ^{1}H RMN de la adición de A) TBAF sobre **CP9** (3.5 mM, 10% CD_3CN/CD_2Cl_2) usando TMSS como estándar; B) TBAF sobre **CP9** (4.3 mM, 10% CD_3CN/CD_2Cl_2) usando dioxano como estándar. Para ambos experimentos, las señales de **CP9** aparecen en morado y las de la especie complejada, en verde. En azul claro se resaltan las señales del contraión TBA^+.

Sin embargo, para los espectros registrados en presencia de dioxano ocurre lo contrario, la señal del NH de **D9** se desapantalla (de 7.18 a 8.05 ppm), un comportamiento que se podría atribuir a que se incrementa su estabilidad. En este caso, la señal del protón amídico de la especie complejada resuena a 9.77 ppm. Cuando se compara la evolución en la formación de la especie complejada en ambos experimentos (Figura 181), es posible apreciar que la

presencia de dioxano en el medio entorpece la formación de dicho complejo. Observamos que para el mismo (o aproximado) número de equivalentes de TBAF, la fracción molar de la especie complejada es menor en este caso. Por tanto, de alguna manera, la diferencia en el comportamiento de **D9** debe estar relacionado con la presencia de dioxano. Como se vio en la estructura cristalina de **D10** (Figura 162A y B), la molécula de dioxano era capaz de intercalarse en la parte interna de la lámina β de **D10**. Pensamos que tal vez el dioxano también se intercale en **D9**, modificando su estabilidad y a medida que desaparece el dímero del medio, más moléculas están disponibles para intercalar el dioxano, modificando su desplazamiento químico, en un proceso rápido según la escala de tiempos de estos experimentos. Además de las diferencias observadas atendiendo a la presencia o ausencia de dioxano, hay un detalle que nos permite intuir que el atrapamiento de fluoruro por parte de **D9** lleva consigo un aumento en la rigidez de la estructura. Los protones metilénicos que conectan el triazol con la tapa aparecen como una señal única para **D9** (2.57 ppm), sin embargo, cuando se forma el complejo con fluoruro, estos protones pasan a ser diastereotópicos, y aparecen como dos señales bien diferenciadas en el espectro de ^{1}H RMN (dos dq a 2.85 y 2.45 ppm).

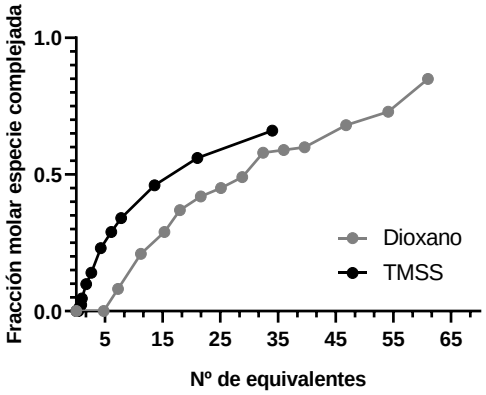


Figura 181. Gráfica representativa de la evolución en la fracción molar del complejo formado entre **D9** y fluoruro tras la adición de TBAF en los experimentos donde se empleó TMSS como estándar interno (negro) o dioxano (gris). Para la valoración con TMSS, solo se pudo usar la referencia para calcular la concentración de **D9** al inicio del experimento, previamente a la adición de TBAF. Se calcularon las concentraciones de las especies libres y complejada durante la valoración bajo la premisa de que el sumatorio de la concentración de ambas debía ser igual a la concentración inicial de **D9** (se tuvo en cuenta la dilución).

Tras encontrar que **D9** era capaz de interaccionar con fluoruro, en tanto que parecía estar formándose un complejo con este anión, se abordó posteriormente la interacción con el anión cloruro. Sin embargo, la adición de hasta 22 equivalentes de TBACl solo promovió un ligero desplazamiento del protón triazólico (de 7.47 a 7.55 ppm) en el espectro de ^{1}H RMN de **D9** (Figura 182), pero no la aparición de señales que pudiesen sugerir la formación de un complejo, ni siquiera tras la adición de una pequeña alícuota de agua (10 µL). Sin embargo, el agua sí provoca un desplazamiento a campo bajo de los protones triazólico (7.72 ppm) y amídico (de 7.18 a 7.29 ppm), además de la aparición de este último como un doblete bien definido. Este comportamiento es similar al observado tras la adición de agua sobre **D8** (Figura 157), aunque algo más acusado. Cabe destacar que también estudiamos el comportamiento con el anión $TBANO_3$, pensando que, quizás, este anión de simetría terciaria y plano pudiese acomodarse entre las dos subunidades de **CP9**, estabilizado por los protones amídicos. Sin embargo, tras la adición de 5 equivalentes, tampoco se observó ningún cambio en el espectro de ^{1}H RMN de **CP9** (Figura 216, sección experimental, página 397). Esto parece indicar que la respuesta de **D9** está mucho más limitada por el tamaño y a electronegatividad del anión que en el caso de **D8**,

siendo capaz de albergar solamente al anión más pequeño de los estudiados, el anión fluoruro. Aunque no ha sido posible hacerlo aún, nos planteamos estudiar la capacidad de **D9** para promover el transporte de fluoruro a través de las membranas lipídicas, ya que existen técnicas para la medición directa de este proceso, que aparecen ilustradas en la Figura 173.

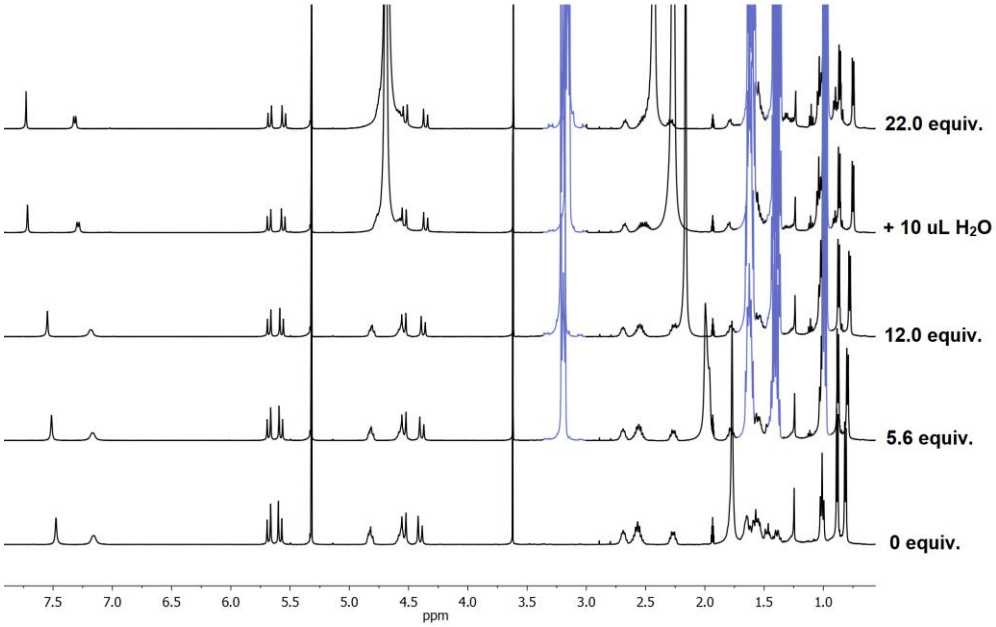


Figura 182. Conjunto de espectros obtenidos tras el seguimiento por ^{1}H RMN de la adición de TBACl sobre **CP9** (6.3 mM en 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, se usó dioxano como estándar). Las señales del contraión TBA^+ aparecen en azul.

Analizando el comportamiento de **D9** con fluoruro, varios aspectos nos hacen considerar que probablemente se está produciendo una situación similar a la que tenía lugar en el caso de **D8**. El primero de ellos es el desplazamiento del NH desde 7.17 hasta 8.87 ppm. Por otra parte, está la respuesta del protón triazólico, que se apantalla desde 7.49 a 7.02 ppm. Esto deja claro que este anillo vuelve a no participar activamente en la interacción con el anión. Por último, las señales de los protones $H\alpha_{Leu}$ y $H\gamma_{Acp}$ también se comportan de forma similar a la que vimos en la formación de los complejos **(3A$^-$·nH$_2$O)⊂D8**. El primero, el $H\alpha_{Leu}$ se apantalla (de 4.82 a 4.06 ppm), mientras que el segundo, $H\gamma_{Acp}$, se desapantalla (de 4.57 a 5.05 ppm). Todos estos cambios son análogos a los ya observamos con **D8** tras la adición de diversos aniones, y determinamos que estaban relacionados con la reorganización del esqueleto peptídico que se producía con objetivo de acomodar el clúster $3A{\cdot}nH_2O$. Además, en el espectro ROESY que se realizó de la muestra tras la adición de TBAF, en la que coexistían las especies libre y complejada, se aprecia un pico de cruce entre el protón amídico de la especie complejada con el protón $H\gamma_{Acp}$, que no se observa entre los protones análogos de **D9**. Como habíamos comentado previamente en la discusión relativa a **D8**, donde también se observó el mismo pico de cruce en el complejo con cloruro, es difícil que se de esta correlación en una especie dimérica, debido a la distancia entre esos protones. Sin embargo, la estructura cristalina de **(3F$^-$·8H$_2$O)⊂D8** y **(3Cl$^-$·5H$_2$O)⊂D8** arrojó que existía una notable proximidad entre ambos tras la reorganización del esqueleto peptídico, por ello proponemos un modelo similar para **D9.**

Claramente, la afinidad de **D9** por el anión fluoruro es mucho menor que la que presenta **D8**, a la luz del número de equivalentes adicionados en cada caso. Mientras que alrededor de 3 equivalentes fueron suficientes para desplazar completamente el equilibrio en favor de la

especie **(3F⁻·nH₂O)⊂D8**, fue necesario añadir más de 34 equivalentes sobre **D9** para obtener una relación molar **(3F⁻·nH₂O)⊂D9/D9** 2:1. Además, la señal del NH resuena a campo más bajo en el complejo con **D8** (10.0 ppm) que en aquel con **D9** (9.0 ppm). Para investigar sobre cómo se acomodaría el clúster **3F·nH₂O** entre los dos monómeros de **CP9**, decidimos emplear los datos que poseíamos sobre las estructuras cristalográficas de **(3Cl⁻·5H₂O)⊂D8** y **(3F⁻·8H₂O)⊂D8**. Partiendo de estos datos, reemplazamos la tapa molecular por la que corresponde para **D9**, y llevamos a cabo la optimización de la geometría de los modelos **(3F⁻·5H₂O)⊂D9** y **(3F⁻·8H₂O)⊂D9** (Figura 183) con objetivo de evaluar varios factores.

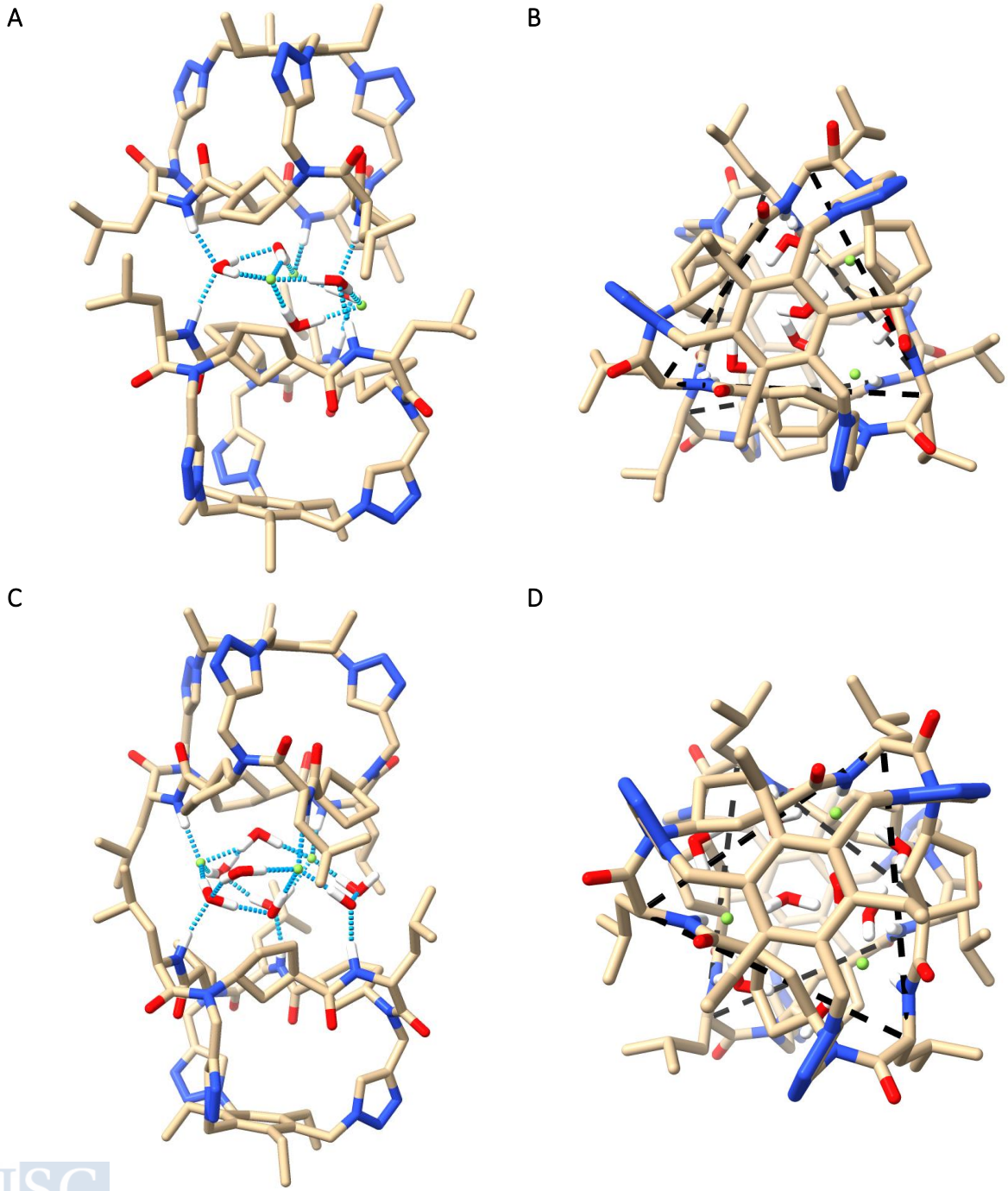


Figura 183. Geometrías de mínima energía obtenidas para los complejos **(3F⁻·5H₂O)⊂D9** (A y B) y **(3F⁻·8H₂O)⊂D9** (C y D) empleando B3LYP/6-31G(d,p), además de GD3BJ como simulador de la dispersión.

Por un lado, queríamos comprobar si era posible obtener un mínimo de energía para ambas estructuras, tendiendo en cuenta la distorsión del esqueleto peptídico y la rigidez de la tapa **B**. Por otro lado, desconocemos el número de moléculas de agua que forman parte del complejo **(3F⁻·nH₂O)⊂D9**, pero podemos evaluar, computacionalmente, cuál de los dos tipos de clúster encontrados para **D8** (con cinco u ocho moléculas de agua) se mantiene mejor en la cavidad de **D9**. Afortunadamente, ambas estructuras convergieron en un mínimo con este nivel de cálculo [B3LYP/6-31G(d,p)]. Para el complejo **(3F⁻·5H₂O)⊂D9** (Figura 183A y B), observamos que la geometría del clúster de la estructura cristalina con **D8** (Figura 158) no se mantiene. Para **D8**, tres aniones cloruro y tres moléculas de agua se distribuían en los vértices de un hexágono, y además, dos moléculas de agua se situaban en los planos superior e inferior de este hexágono, en posiciones equidistantes a todos los vértices. Todos los aniones establecían enlaces de hidrógeno con el mismo monómero de **CP8**, y ambas subunidades peptídicas aparecían prácticamente superpuestas. En el caso de la estructura obtenida computacionalmente con **D9**, los componentes del clúster se han reorganizado, de manera que hay dos moléculas de agua que establecen enlaces de hidrógeno, simultáneamente, con los NHs de las dos subunidades de **CP9** ($d_{O\cdots H}$≈ 1.82 Å), ocupando cuatro de los seis NHs disponibles. Sobre los otros dos restantes, uno interacciona con un anión fluoruro ($d_{O\cdots F}$≈ 1.64 Å) y el otro, con otra molécula de agua ($d_{O\cdots H}$= 1.82 Å). De este modo, de los tres aniones fluoruro presentes en el clúster, dos de ellos están estabilizados por tres enlaces de hidrógeno. De estos dos, uno está rodeado por tres moléculas de agua, y el otro por dos moléculas de agua y un NH. Estos dos aniones no completan, por tanto, su esfera de coordinación. El tercer anión fluoruro forma cuatro enlaces de hidrógeno, todos ellos con moléculas de agua. Por otra parte, las subunidades de **CP9** se encuentran giradas una con respecto a la otra aproximadamente 15°.

En cuanto a la estructura de **(3F⁻·8H₂O)⊂D9** (Figura 183C y D), volvemos a encontrar que el cambio de tapa no impide la convergencia de la optimización, adoptando esa estructura piramidal que ya comentamos previamente. Se aprecia que los tres aniones fluoruro se encuentran estabilizados, cada uno de ellos, por cuatro enlaces de hidrógeno, con tres moléculas de agua y un protón amídico. Además, los tres NH amídicos que interaccionan con los aniones pertenecen a una misma subunidad de **CP9**. En este caso, la geometría obtenida para **(3F⁻·8H₂O)⊂D9** recuerda bastante a la encontrada en la estructura cristalina de **(3F⁻·8H₂O)⊂D8** (Figura 159). La distancia promedio entre los protones amídicos y los fluoruros es de 1.726 Å, mientras que para el resto de los protones amídicos, que interaccionan con moléculas de agua, encontramos que $d_{O\cdots H}$ es 1.774 Å. Por otra parte, la distancia entre los aniones fluoruro y los protones de las moléculas de agua que les rodean es de 1.641 Å. Para medir la distancia interpeptídica se tomó la distancia entre los carbonos caboníllicos de los residuos de leucina de ambos monómeros, que tiene un valor promedio de 8.531 Å. Otra característica que también se mantiene con respecto al complejo con **D8** es la posición relativa entre los monómeros ciclopeptídicos, que se encuentran girados aproximadamente 60° uno con respecto del otro (Figura 183D). Para poder comparar esta estructura con la que se obtuvo para el complejo entre el anión fluoruro y **D8**, empleamos la estructura optimizada, para cuya obtención habíamos partido de los datos cristalográficos de **(3F⁻·8H₂O)⊂D8** (Figura 213A, sección experimental, página 394). Encontramos que $d_{NH\cdots F}$= 1.671 Å, mientras que $d_{O\cdots H}$ es 1.770 Å y $d_{F\cdots H}$= 1.633 Å. A su vez, la distancia interpeptídica es 8.071 Å. Estos datos sugieren que el complejo formado con el péptido **D8** es más compacto que aquel que se obtiene con **D9**, lo que iría en consonancia con la menor afinidad experimental que presenta **D9** por fluoruro. Como hemos comentado, esta diferencia la marca la tapa molecular que ambos incorporan,

que otorga una mayor libertad conformacional a **D8** que a **D9**. Cabe resaltar que la mayor distancia observada entre los protones amídicos de **CP9** y los fluoruros también se correlaciona con el menor desplazamiento químico encontrado para esos protones (9.00 ppm), con respecto a los protones de **D8** cuando se forma el complejo con este anión (10.00 ppm).

Entre ambos modelos, **$(3F^{-}\cdot 5H_2O)\subset$D9** y **$(3F^{-}\cdot 8H_2O)\subset$D9**, pensamos que aquel que podría acercarse más al complejo que realmente se forma entre **D9** y fluoruro es aquel donde ocho moléculas de agua participan en el clúster, principalmente porque se consigue completar la esfera de coordinación de todos los aniones. Además, esa esfera de coordinación es bastante más homogénea entre los aniones que en el caso de **$(3F^{-}\cdot 5H_2O)\subset$D9**, lo que aporta simetría, una característica que, según los estudios de RMN, también es propia del complejo entre **D9** y fluoruro.

De nuestros estudios con los diferentes CPs preparados hasta el momento habíamos identificado que tanto el anillo de seis miembros del residuo de Ach, como la tapa de 1,3,5-*tris*(azidometil)-2,4,6-trietilbenceno introducían rigidez en el esqueleto peptídico. Quisimos comprobar qué efecto tenía la convergencia de ambos factores en una misma estructura, y para ello preparamos **CP12** (Figura 184). Se procedió de manera análoga a la síntesis de **CP9**, pero utilizando **CP10** para acoplar sobre él la tapa aromática **B**. Logramos un rendimiento del 36%, frente al 54% obtenido para **CP9**. Para nuestra sorpresa, **CP12** no formaba homodímeros en disolución, algo que enseguida advertimos al observar que la señal de su NH resonaba a 6.38 ppm en CD_2Cl_2 (Figura 184). Por otra parte, cuando registramos el espectro ^{1}H RMN de **CP12** en DMSO-d_6, el protón NH apareció a 7.76 ppm, indicativo de que las moléculas de disolvente establecen enlaces de hidrógeno con estos protones. Lo mismo ocurrió cuando el espectro se registró en MeOH-d_3. En ocasiones, para estudiar la estabilidad de los dímeros entre CPs se recurre a aumentar la proporción de un disolvente competitivo en la mezcla y seguir el desplazamiento a campo alto de los protones amídicos, como consecuencia del desensamblaje del dímero.[485a,500] El comportamiento del NH de **CP12** en presencia de DMSO o MeOH es relevante porque advierte sobre un posible "enmascaramiento" de la formación de monómeros en experimentos con otros ciclopéptidos.

Un análisis detallado del espectro muestra que los protones $H\alpha_{Ach}$ (2.21 ppm) aparecen notablemente apantallados, si los comparamos con aquellos de **CP9** (2.69 ppm, en este caso es $H\alpha_{Acp}$) o **CP10** (2.74 ppm). El proceso de dimerización de los CPs lleva a que queden próximos en el espacio los Hα del γ-Aa de uno de los CPs con los oxígenos carbonílicos de las leucinas del otro CP. De este modo, este protón se ve desapantallado por los pares de electrones libres de este oxígeno en la especie dimérica. Cuando no hay dimerización, esta influencia no tiene lugar. Este desplazamiento a campo alto también afecta a los $H\beta_{Ach}$ que resuenan a 1.56 y 0.84 ppm (*cis*- y *trans*-$H\beta_{Ach}$ respectivamente) en el espectro ^{1}H RMN de **CP12**, mientras que aparecen a 2.30 y 1.42 (*cis*-/*trans*-) ppm para **CP9**, y a 1.84 y 1.36 ppm para **CP10**. Por último, llama la atención el desplazamiento químico del protón triazólico, a 7.93 ppm, el más desapantallado de todas las especies preparadas (7.71 ppm para **D8**, 7.49 ppm para **D9** y 7.64 ppm para **D11**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

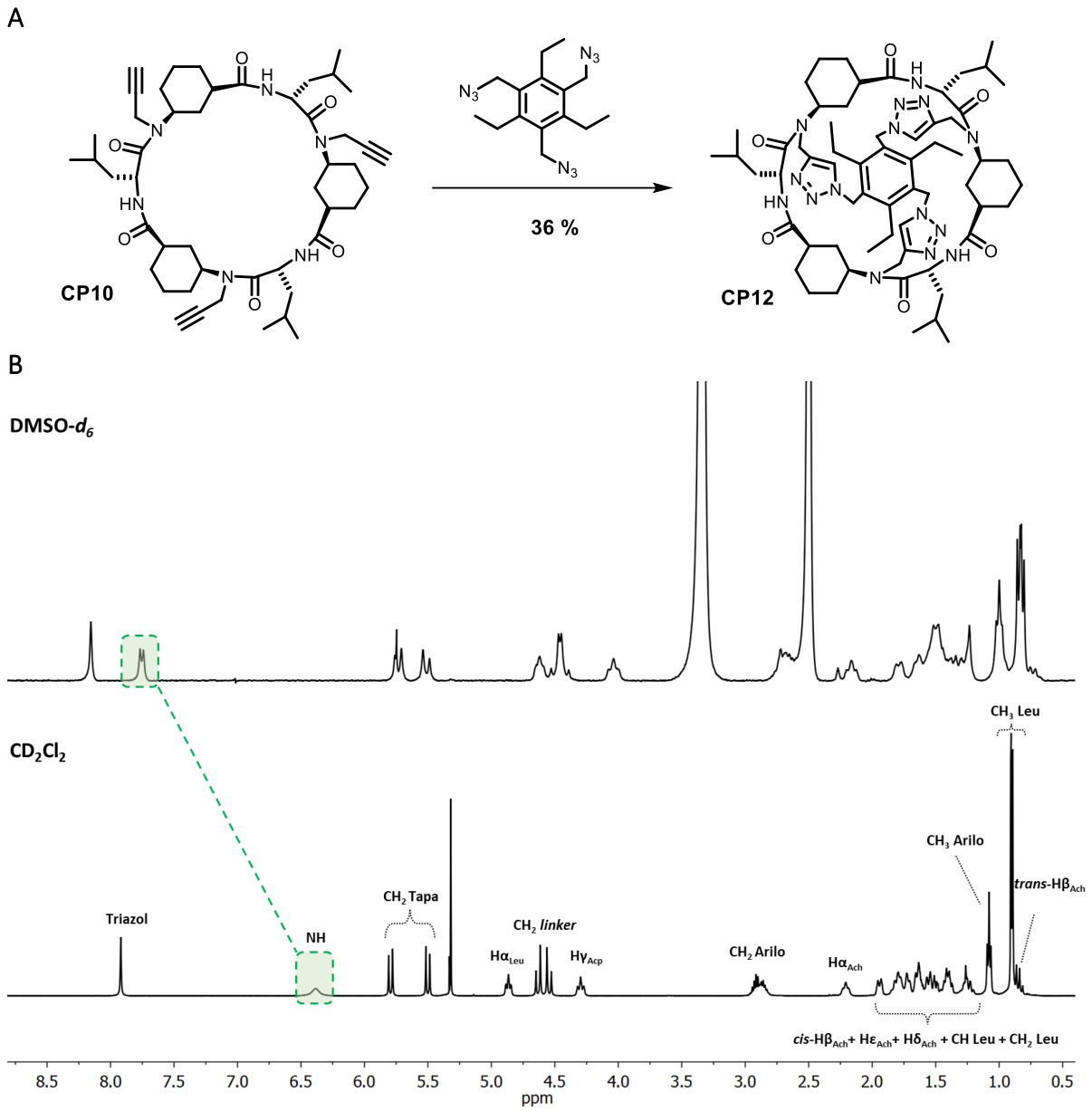


Figura 184. A) Síntesis de **CP12** mediante acoplamiento *click* entre **CP10** y la pre-tapa **B**; B) Asignación de señales del espectro de ^{1}H RMN de **CP12** y comparación entre el desplazamiento del protón amídico empleando CD_2Cl_2 o DMSO-d_6 como disolvente; C) Comparación de los espectros FTIR de **CP12**, **D11**, **D9** y **D8**.

Rápidamente reparamos en que la incapacidad de **CP12** para formar homodímeros nos brindaba la oportunidad de realizar varios experimentos que nos ayudaran a entender mejor los sistemas que estábamos estudiando. Empezamos por tratar de determinar los radios hidrodinámicos de las especies **D9**, **(3A$^-$·nH$_2$O)⊂D9** y **CP12** mediante experimentos de difusión.

Los experimentos de difusión permiten conocer el tamaño aproximado de las moléculas en disolución mediante la determinación del coeficiente de autodifusión (Dt). Este parámetro representa el resultado de los movimientos aleatorios dependientes de la temperatura que cada molécula exhibe en disolución y que se ve reflejado en los tiempos de relajación de los protones excitados de una determinada especie. Por tanto, su valor es dependiente del disolvente, concretamente, de su viscosidad (η). El coeficiente de difusión de una molécula se relaciona de manera inversa con su radio hidrodinámico (r_h) a través de la ecuación del Einstein-

Stokes. En nuestros estudios, llevamos a cabo experimentos de DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*) para determinar el radio hidrodinámico de las mencionadas especies. Son experimentos de resonancia magnética nuclear en los que se somete a la muestra a un gradiente pulsado de campos magnéticos, de tal manera que se vaya produciendo un decaimiento de la intensidad de las señales a lo largo del experimento. La velocidad de este decaimiento depende directamente del tamaño de cada especie, de manera que aquellas de bajo peso molecular, que tienen radios hidrodinámicos pequeños, difunden más rápido en disolución, por lo que su decaimiento será más marcado que en el caso de las moléculas de mayor tamaño. De esta manera, podremos distinguir entre varias especies presentes en una misma mezcla porque cada una de ellas presentará un coeficiente de difusión distinto. Al mismo tiempo, todas las señales pertenecientes a una misma molécula poseen el mismo valor de difusión. Cuando se pretende determinar el radio hidrodinámico de una molécula, los parámetros de adquisición de los espectros (en cuanto a intensidad de los pulsos y tiempo de espera entre cada uno de ellos) serán ajustados dependiendo del tamaño molecular de la especie de interés. Este ajuste se lleva a cabo con el fin de obtener una buena curva de decaimiento, esto es, la molécula de interés no difundirá ni excesivamente rápido ni excesivamente despacio. En estos experimentos se suele introducir en la disolución una molécula de radio hidrodinámico conocido, que actuará como referencia. De esta manera, aplicando la relación $D_M/D_{Ref}=r_{href}/r_{hM}$ (siendo M la molécula de interés y ref la de referencia), podremos conocer el radio hidrodinámico de la especie que se estudia.

El tetrametilsilano (TMS) y el tetrakis(trimetilsilil)silano (TMSS) son moléculas ampliamente utilizadas como referencia para estos experimentos. Sin embargo, debido a que el TBAF produce su descomposición, fue descartada en nuestro caso. Tampoco consideramos conveniente usar dioxano, el estándar que habíamos elegido para determinar la concentración de todas las especies en equilibrio en la formación de los complejos $(3A^-\cdot nH_2O)\subset D9$, ya que hemos comprobado que puede intercalarse entre los CPs, y esto repercutiría en su valor de difusión. Finalmente, nos decantamos por el 1,3,5-trimetoxibenceno (TMB), dado que sus señales características se diferencian claramente de las de los péptidos a estudiar. Determinamos experimentalmente su radio hidrodinámico para usarlo posteriormente como referencia (Figura 185). Esta molécula presenta dos señales en su espectro de ^{1}H RMN (a y b). Utilizamos el promedio del coeficiente de difusión de ambas para determinar el radio hidrodinámico del TMB, obteniendo un valor de 3.35 Å.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

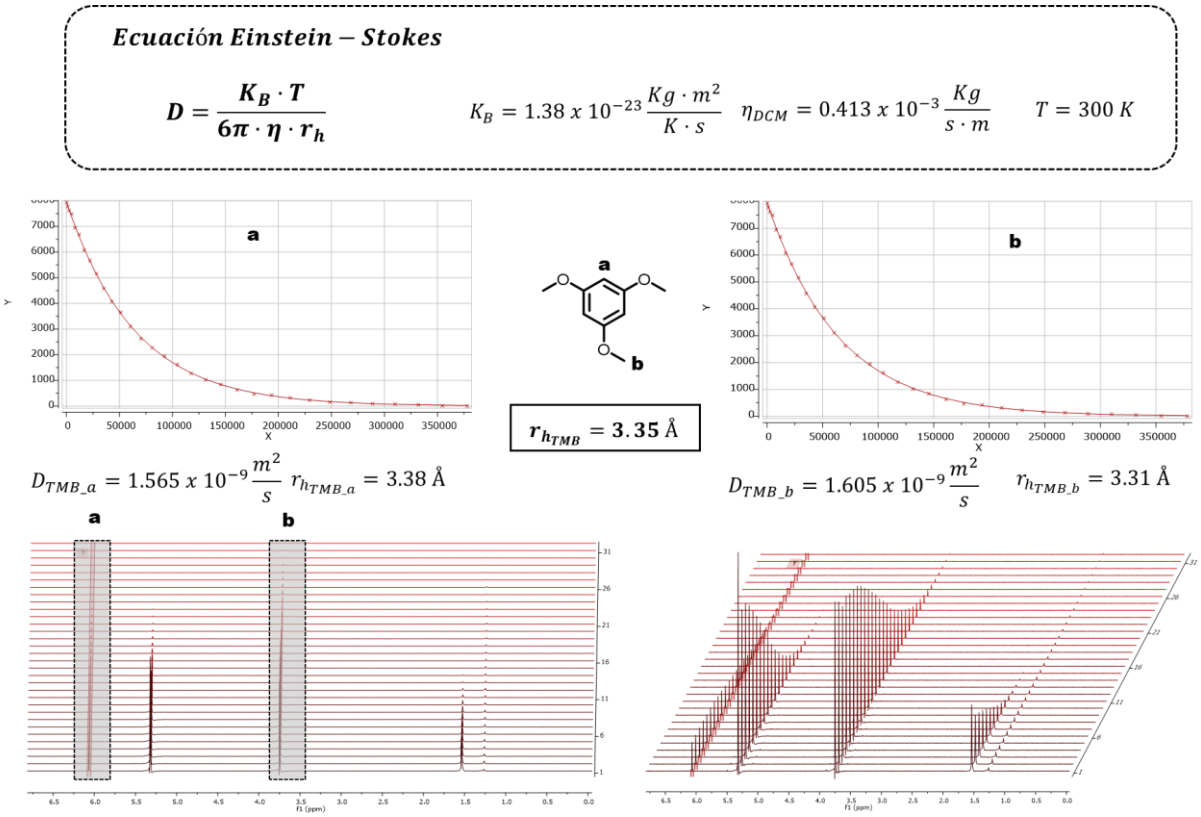


Figura 185. Determinación del radio hidrodinámico del TMB mediante DOSY.

Posteriormente, en experimentos separados, determinamos el valor de r_h para **D9**, **(3F⁻·nH₂O)⊂D9** y **CP12**, conteniendo todas las muestras TMB como estándar (Figura 186). Para homogeneizar las determinaciones, decidimos tomar como referencia para el cálculo del valor de difusión las mismas señales para las tres especies. Se trata de las señales del CH_2 *linker*, el CH_2 bencílico de la tapa y el CH_3 del arilo (Figura 186, marcadas como a, b y c).

Los experimentos de DOSY arrojaron unos valores de los r_h bastante similares para **D9** (11.69 Å) y **(3F⁻·nH₂O)⊂D9** (11.04 Å) (Figura 186A y B). Sin embargo, el r_h de **CP12** es 8.30 Å (Figura 186C). Es evidente que, si bien hay una pequeña diferencia entre el r_h de **D9** y **(3F⁻·nH₂O)⊂D9**, que pudiera ser el resultado de la compactación estructural asociada a la complejación, ambos valores distan notablemente de aquel encontrado para el monómero **CP12**. Por tanto, descartamos la posibilidad de que la complejación del anión fluoruro tuviese lugar únicamente a través de la especie monomérica **CP9** para formar [**(3F⁻·nH₂O)⊂CP9**], reforzando la hipótesis de que se trata de una especie dimérica **(3F⁻·nH₂O)⊂D9** similar a la propuesta en el modelo computacional (Figura 183) y a lo observado con los complejos formados a partir de **D8**.

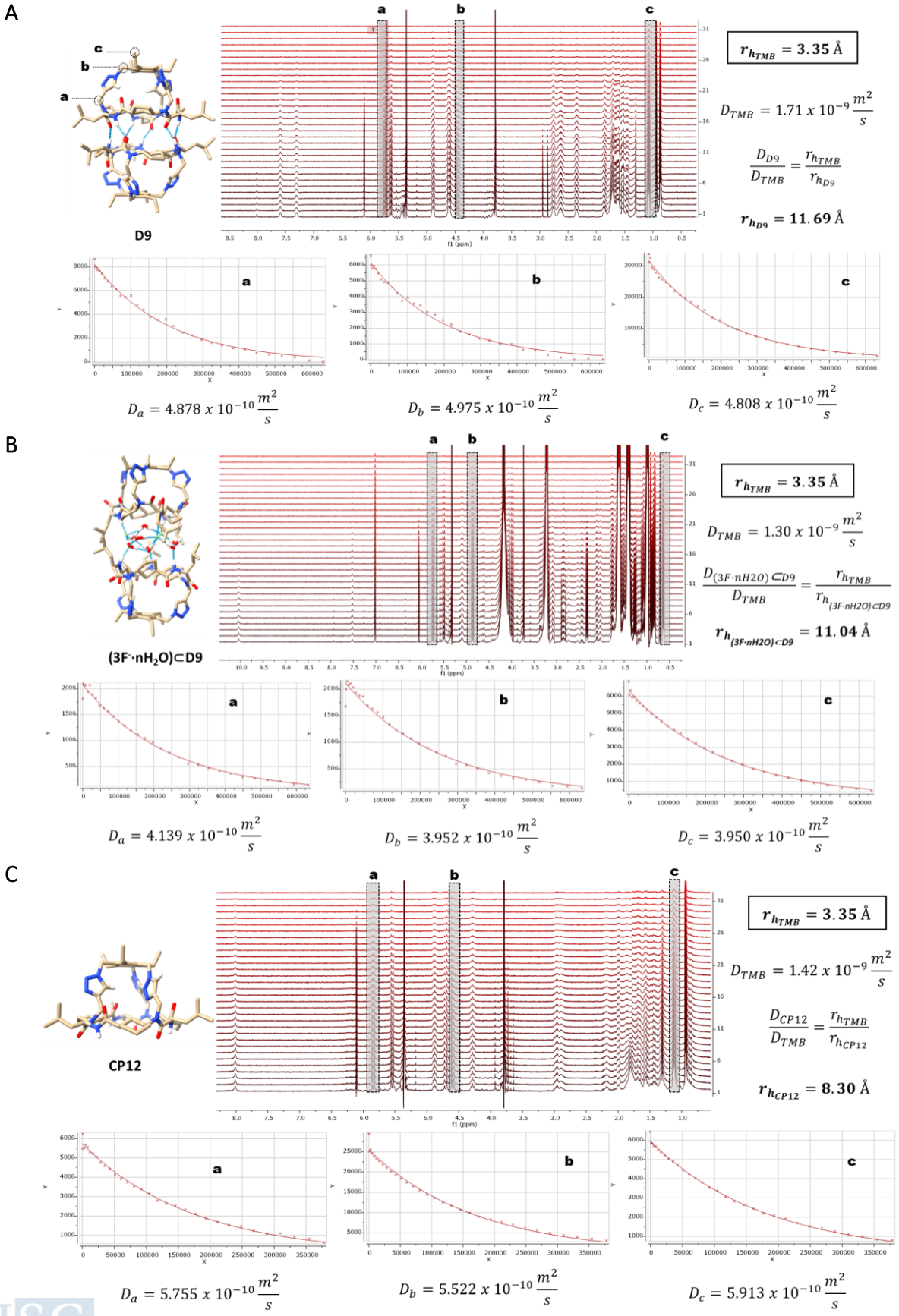


Figura 186. Determinación del radio hidrodinámico de **D9** (A), **$(3F^{-}{\cdot}nH_2O){\subset}D9$** (B) y **CP12** (C).

Tanto en el caso de **D8** como en **D9**, a la complejación entre estos y los clústeres $3A^{-}\cdot nH_2O$, les precede una etapa de disociación de las especies diméricas. Entendemos, por tanto, que cuanto más fuertes sean las interacciones CP-CP, mayor será el coste energético de esta etapa sobre el proceso global. Nos preguntamos entonces si un CP que no forma dímeros, como es **CP12**, y que además posee tres triazoles en su estructura, podría interaccionar con aniones de algún modo. Según lo observado para **D11**, no esperamos que **CP12** sea capaz de formar el mismo tipo de complejos que **D8** o **D9**, ya que hemos comprobado que los anillos de seis miembros que forman parte de su esqueleto peptídico son un impedimento para ello. Aun así, nos planteamos que quizás su forma monomérica fuese una ventaja para permitir que un anión de pequeño tamaño se pueda acomodar en la cavidad entre sus tres triazoles.

Empezamos por evaluar el anión fluoruro por ser el de menor tamaño. La adición de hasta 16 equivalentes de TBAF sobre una disolución de **CP12** no promovió ningún cambio similar a los descritos anteriormente en su espectro ^{1}H RMN que se pudiera asociar con un proceso de reconocimiento (Figura 187). Se produce un pequeño desplazamiento del protón NH a campo bajo, de 6.23 a 6.56 ppm. También se desplaza muy ligeramente el protón del triazol, de 7.94 a 7.98 ppm. Estos desplazamientos podrían deberse a presencia de agua en el TBAF adicionado.

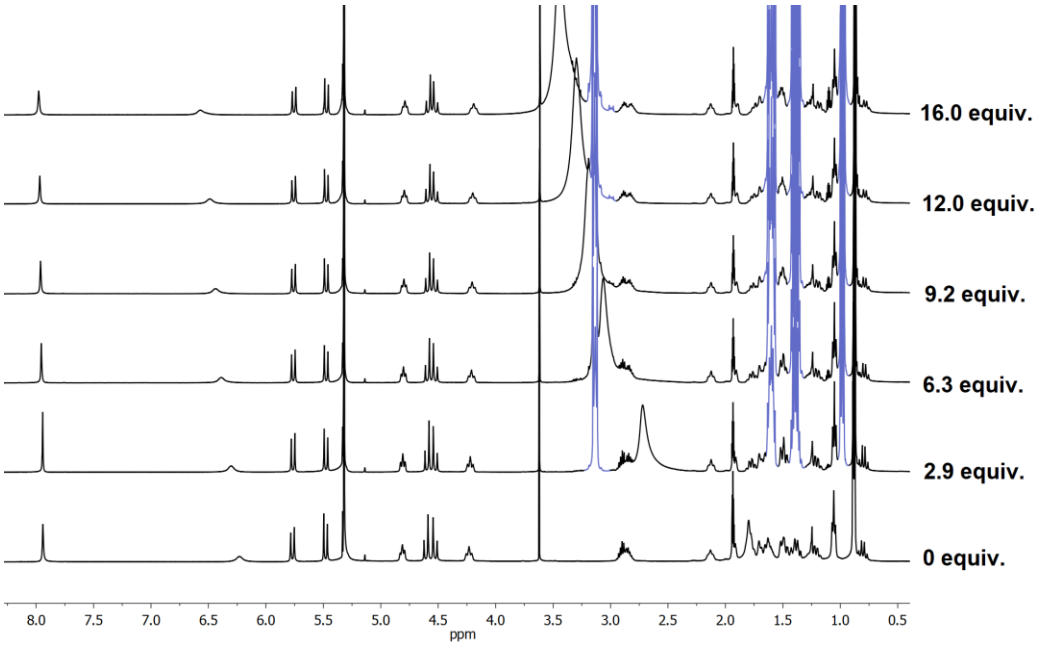


Figura 187. Conjunto de espectros registrados como resultado del seguimiento por ^{1}H RMN de la adición de TBAF sobre **CP12** (6.6 mM en 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, se usó dioxano como estándar interno). Las señales que se muestran en azul pertenecen al contraión TBA^+.

Tras no encontrar resultados con fluoruro, pensamos que podría deberse a que el coste energético de la deshidratación del anión es demasiado alto en este caso. Por ello decidimos comprobar cuál era la respuesta de **CP12** con el anión N_3^-, que, al ser lineal, podría ser un buen candidato para ocupar el bolsillo *tris*-triazólico. Sin embargo, tras la adición de hasta 57 equivalentes de $TBAN_3$, el espectro de ^{1}H RMN de **CP12** solo mostraba un pequeño cambio en el desplazamiento químico de la señal de la amida a campo más bajo (6.23-6.26 ppm). Por tanto, descartamos la capacidad para reconocer aniones de este CP y confirmamos la necesidad de adaptarse a otras conformaciones que permitan converger seis dadores de enlace de

hidrogeno que puedan interaccionar con los hidratos de los aniones, formando un complejo hidrofóbico estable.

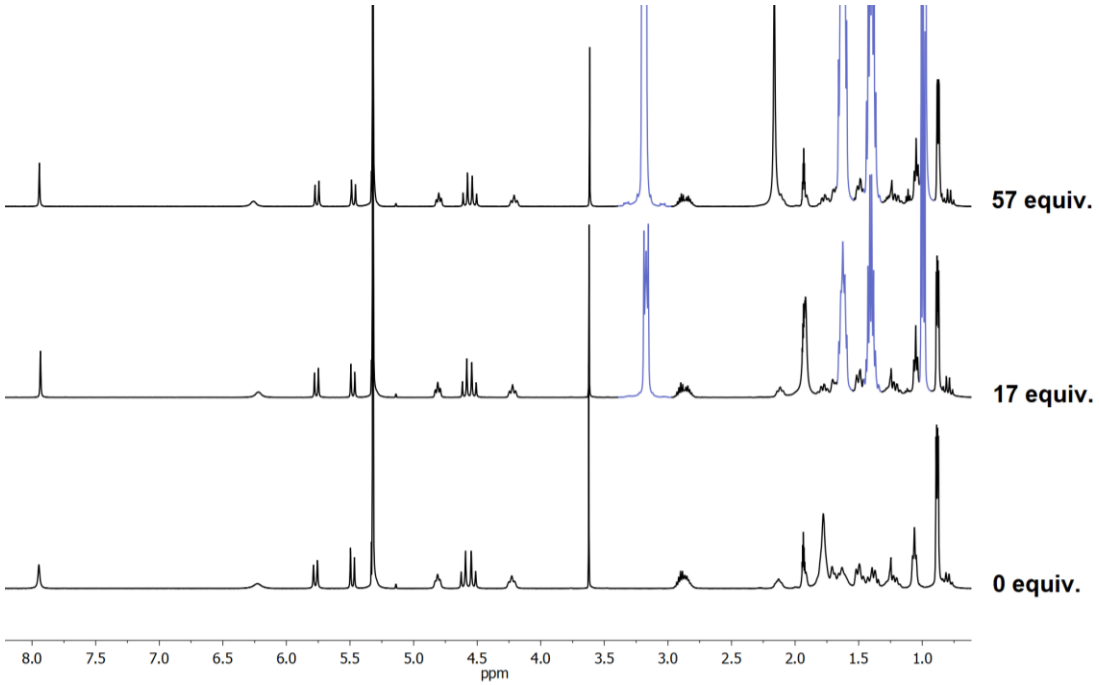


Figura 188. Conjunto de espectros registrados como resultado del seguimiento por ^{1}H RMN de la adición de $TBAN_3$ sobre **CP12** (5.26 mM en 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, se usó dioxano como estándar interno). Las señales que se muestran en azul pertenecen al contraión TBA^+.

Los estudios con **CP12**, no es capaz de interaccionar con los aniones y tampoco puede formar homodímeros. Decidimos profundizar en este segundo aspecto y nos planteamos si la conformación que adoptaba este último CP era responsable de impedir su dimerización o si otros péptidos más flexibles podrían adaptar su conformación para para establecer enlaces de hidrogeno con **CP12**, formando los correspondientes heterodímeros. Por tanto, decidimos abordar el estudio de heterodimerización combinándolo con otros CPs más flexibles. En base a este razonamiento, decidimos emplear **CP9**, **CP10**, **CP5** y **CP12** para investigar sobre la posible formación de los heterodímeros **D9-10** y **D5-12** (Figura 189).

Por un lado, tras la adición sucesiva de **D10** sobre **D9** (Figura 189A), pudimos observar, como es usual en estos experimentos, cómo desaparecieron las señales de los homodímeros para dar paso a las de la especie heterodimérica **D9-10** (en azul claro). Por ejemplo, desaparece la señal a 7.17 ppm, que corresponde al NH de **D9**. A su vez, aparece una señal ancha a 8.17, que corresponde al NH de la subunidad **CP9** de **D9-10**. Esto último se comprobó mediante experimentos 2D RMN, al igual que el doblete que aparece a 7.45 ppm, que pertenece al NH de la subunidad **CP10** en **D9-10**. El protón del triazol, que lo aporta **CP9**, aparece a 7.41 ppm (7.47 en **D9**). Otros cambios que indican la formación del heterodímero son la aparición de las señales a 4.99 ppm ($H\alpha_{Leu}$ **CP10** en **D9-10**), 3.87 (CH_2 propargilo **CP10** en **D9-10**) o 3.00 ($H\alpha_{Acp}$ **CP10** en **D9-10**) ppm. La asignación completa de las señales correspondientes a la especie **D9-10**, así como los experimentos 2D RMN realizados para llevar a cabo dichas asignaciones, se encuentran en la sección experimental. También, en las Figuras 217 y 218 de la sección experimental (páginas 398 y 399), se pueden consultar las ampliaciones de los espectros de ^{1}H RMN recogidos en ambos procesos de valoración, tanto de **D9** con **D10** como de **CP12** con **D5**.

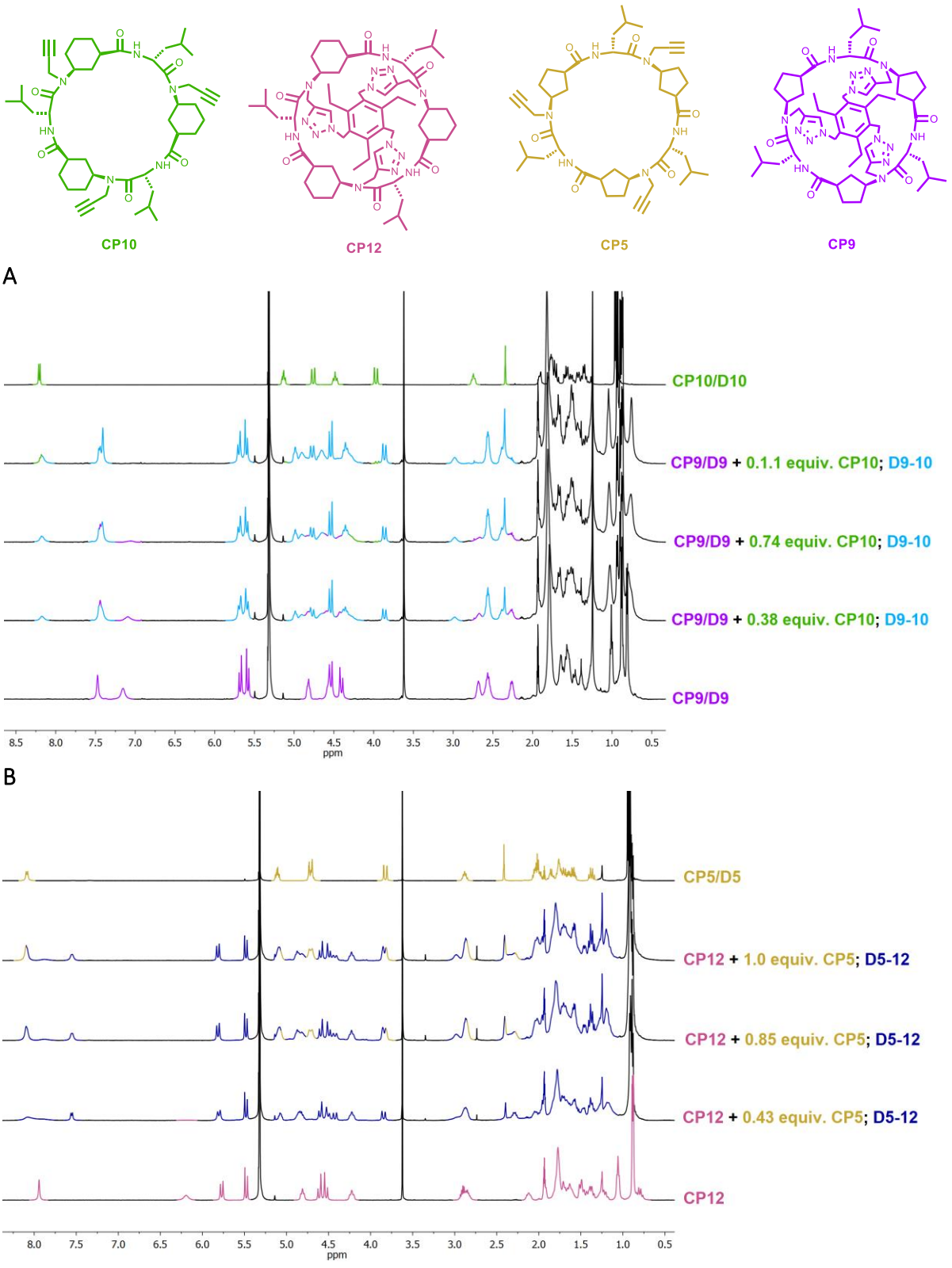


Figura 189. Conjunto de espectros registrados como resultado del seguimiento por ^{1}H MRN de la formación de **D9-10** (azul claro) y **D5-12** (azul oscuro). A) Adición de **CP10** (55 mM) sobre **CP9** (4.6 mM en 10% CD_3CN/CD_2Cl_2); B) Adición de **CP5** (55 mM) sobre **CP12** (4.3 mM en 10% CD_3CN/CD_2Cl_2). En ambos experimentos se utilizó dioxano (singlete a 3.6 ppm) como estándar interno.

Para nuestra sorpresa, el experimento de adición de **D5** sobre **CP12** también reveló la formación de la especie heterodimérica (Figura 189B). Se aprecia claramente como la señal del

NH de **CP12**, inicialmente a 6.19 ppm, va desapareciendo con la adición de **CP5**, indicativo de que esos NH están ahora involucrados en enlaces de hidrógeno con **CP5**, formando la especie **D5-12** (en azul oscuro). Concretamente, el análisis 2D RMN de **D5-12** nos permitió identificar a los protones de la amida de la subunidad **CP12** del heterodímero como la señal ancha que resuena a 7.90 ppm. La señal que aparece a 8.09 pertenece al protón triazólico, aportado por la subunidad **CP12**, mientras que aparecen como un singlete muy definido a 7.95 ppm en la especie monomérica. Por otra parte, mientras que el NH de **D5** aparece a 8.09 ppm, se desplaza a campo alto al formar **D5-12**, ya que resuena a 7.55 ppm. Algunos otros cambios fácilmente apreciables también permiten diferenciar la especie heterodimérica. Por ejemplo, el doblete que aparece a 4.43 ppm pertenece a uno de los protones del CH_2 propargílico de la subunidad **CP5** de **D5-12**, que resonaba a 4.71 ppm en **D5**. La señal ancha y pequeña que aparece a 2.97 ppm, pertenece al CH_2 bencílico de la tapa de **CP12** en el heterodímero, y las nuevas señales que aparecen solapadas entre 2.37 y 2.23 ppm corresponden a los nuevos $H\alpha_{Ach}$ y $H\beta_{Acp}$, (para ver los espectros 2D RMN consultar anexo, páginas 555-562). Además del seguimiento por ^1H RMN de la formación de estas especies, el estudio de los nuevos picos de nOe que aparecen, nos permite asegurar que se trata de heterodímeros (Figura 190).

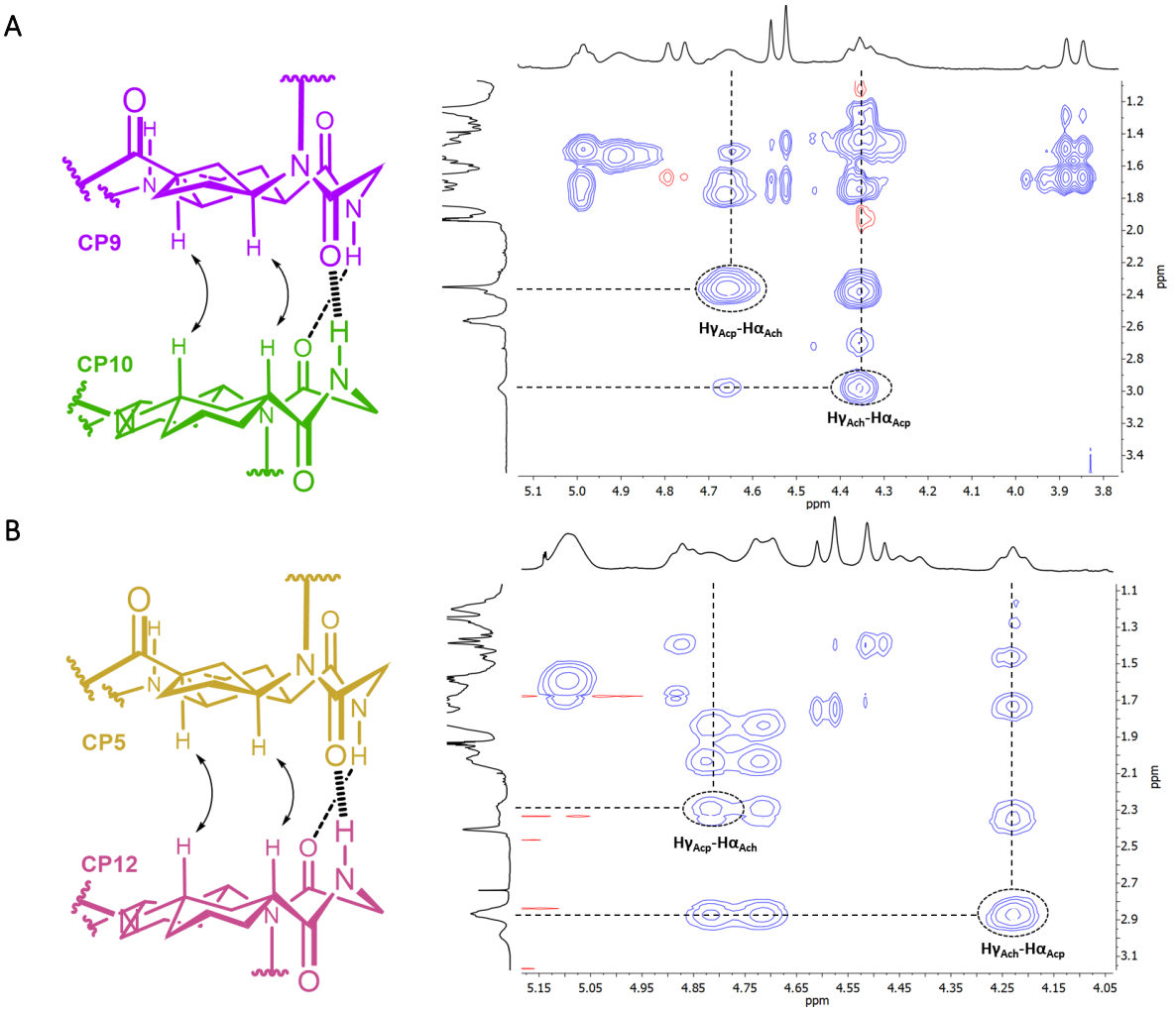


Figura 190. Ampliaciones de los espectros de NOESY en la que se resaltan los picos de cruce más relevantes de los heterodímeros **D9-10** (A) y **D5-12** (B).

Concretamente, se puede apreciar que aparecen dos picos de cruce muy distintivos entre los $H\gamma_{Ach}$ y $H\alpha_{Acp}$ así como entre $H\gamma_{Acp}$ y $H\alpha_{Ach}$. Cuando se trata de homodímeros, el pico de cruce $H\gamma_{Acp}$- $H\alpha_{Acp}$ no representa un indicio de dimerización, ya que puede darse tanto entre los protones del anillo de Acp de un monómero, como entre dos monómeros distintos que forman un dímero. Sin embargo, en el caso que nos ocupa, la aparición de estos picos de cruce entre diferentes tipos de anillos (cinco y seis miembros) sí es evidencia de la formación de dímeros, ya que solo pueden deberse a la cercanía en el espacio de ambos CPs. Por otra parte, pudimos confirmar la formación de **D9-10** y **D5-12** por espectrometría de masas exactas (1943.2570 [**D9-10**]$^+$ y 1943.2552 [**D5-12**]$^+$).

Afortunadamente, para la especie **D5-12** obtuvimos, un cristal cuya resolución por difracción de rayos X nos permitió visualizar la formación del heterodímero (Figura 191). En ella se muestra a los dos CPs unidos por seis enlaces de hidrógeno de longitud promedio 2.07 Å. Una molécula de diclorometano se encuentra ocupando la cavidad entre ambos. Lo más llamativo de esta estructura es el grado de distorsión de la típica conformación plana de los CPs. Los estudios experimentales previos sugieren que es **CP12** el que introduce ese factor de deformación, y **CP5** se adapta, deformándose también, para poder formar el heterodímero. Esto queda refutado a la luz de la estructura cristalina, donde vemos que para **CP12**, la presencia de la tapa molecular genera una distorsión en la orientación de los grupos carbonilo involucrados en la dimerización. Para el ángulo C=O···H, si asumimos una hibridación sp^2 para el oxígeno carbonílico, el alineamiento entre estos tres átomos que daría lugar al enlace de hidrógeno más favorable es de 120°. Sin embargo, para el ángulo N-H···O asumimos que cuanto mayor sea este, más fuerte será el enlace de hidrógeno.[488] En un estudio computacional realizado en este grupo de investigación, se observó que para los α,γ-ciclohexapéptidos que dimerizan a través de sus caras α, el ángulo C=O···H ronda los 144°, y el N-H···O, los 167°.[487] En el caso de **D5-10** encontramos que los seis ángulos C=O···H distan bastante entre sí, al igual que los seis N-H···O. Como apreciamos en la estructura cristalina, esto se debe a que los tres brazos moleculares se disponen de manera muy diferente. Por un lado, uno de los triazoles queda totalmente girado hacia el exterior. El segundo triazol se encuentra ladeado en dirección al residuo de Ach. Por último, el tercer brazo molecular se dispone de manera que el CH_2 que actúa de *linker* invade la cavidad del CP, dirigiéndose el triazol directamente al interior. Consecuentemente, encontramos una gran variación en los ángulos previamente comentados, siendo el ángulo C=O···H más cerrado de 132.3°, y el más abierto de 169.9°. Lo mismo sucede para el ángulo N-H···O, que va desde 147.3° a 174.9°. Para tener una visión comparativa, se han resaltado algunos datos de las estructuras cristalinas de **D8**, **D10**, **D11** y **D5-12** en la Tabla 6. Se puede apreciar que los valores de los ángulos N-H···O y C=O···H de **D5-12** son los que presentan mayor desviación estándar, a pesar de que, en promedio, no se diferencian demasiado de los valores normalmente encontrados para estas estructuras, mencionados previamente. Sin embargo, **CP5** es capaz de adaptarse correctamente a estas desviaciones, algo que suponemos está influido por la ausencia de tapa molecular. Se establecen, por tanto, seis enlaces de hidrógeno de manera eficiente, encontrando que, para la distancia O··H, los valores son bastante homogéneos (Tabla 6).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

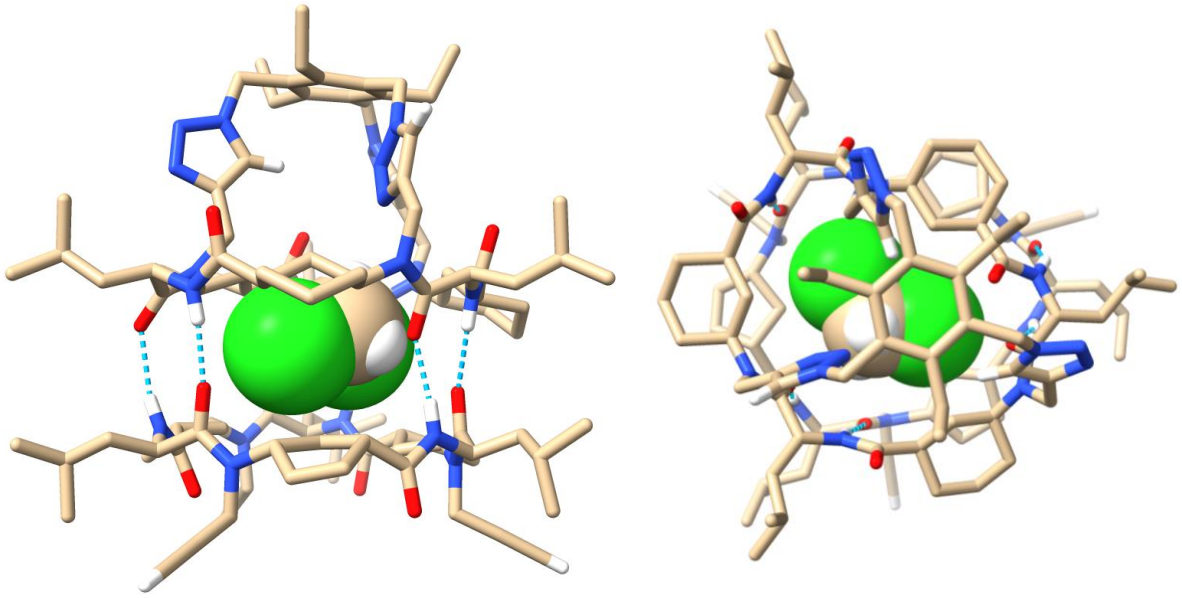


Figura 191. Vistas frontal (izquierda) y superior (derecha) de la estructura cristalina de **D5-12**.

	O···N	O···H	N-H···O	C=O···H
D8	2.959 (0.126)	2.103 (0.141)	165.5 (6.2)	139.9 (8.2)
D10	2.704 (0.292)	2.083 (0.013)	172.2 (3.1)	151.1 (0.63)
D11	3.096 (0.000)	2.243 (0.000)	163.3 (0.0)	135.9 (0.0)
D5-12	2.919 (0.069)	2.072 (0.079)	163. 9 (9.6)	148.8 (13.0)

Tabla 6. Recopilación de algunos parámetros relevantes en cuanto a la geometría de **D8**, **D10**, **D11** y **D5-12**. Todos ellos son valores promedio, y entre paréntesis se especifica la desviación estándar (σ). Los datos de distancia están expresados en Å y los ángulos en grados.

De este modo, el hecho de que sea posible la formación del heterodímero **D5-12** refuerza nuestras observaciones previas en relación con las consecuencias que tiene la incorporación de la tapa molecular en los CPs. Con el objetivo de seguir indagando en esta cuestión desde un punto de vista cuantitativo, decidimos llevar a cabo un pequeño estudio computacional para calcular las energías de interacción y dimerización de las especies que hemos estudiado experimentalmente en este trabajo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.3.5 Estudios computacionales sobre homo- y heterodimerización de los CPs estudiados.

Siguiendo los pasos de un trabajo previo realizado en el grupo de investigación de Juan Granja,[487] se calcularon, mediante métodos DFT, las energías de interacción y dimerización de todos los homodímeros y heterodímeros estudiados en este capítulo. Por un lado, se optimizaron todas las estructuras monoméricas y diméricas desde **CP5** hasta **CP12** usando B3LYP como funcional y 6-31 G (d,p) como conjunto de bases. La elección de B3LYP se hizo en base a que habíamos observado que reproducía fielmente la geometría de aquellos dímeros de los que tenemos estructuras cristalinas. Una vez obtenidas las conformaciones de mínima energía, se evaluó la energía de interacción de los dímeros como la diferencia entre la energía electrónica del dímero y la suma de las energías electrónicas de los monómeros separados, con las mismas geometrías que tienen en el dímero (es decir, geometrías congeladas). Las energías de los monómeros se corrigieron para el error de superposición del conjunto de bases (BSSE), utilizando la aproximación *counterpoise*.[608] Para todos los cálculos SP (*single point*) se utilizó la base 6-31 G+ (d,p) con el objetivo de obtener valores de energía más precisos.

Las energías de dimerización se calcularon como las energías de los dímeros menos las energías de los monómeros separados y relajados (optimizados). La diferencia entre la energía de dimerización y la energía de interacción es la energía de deformación de los monómeros. Por tanto, mientras que la energía de interacción nos aporta información sobre la fortaleza de las interacciones favorables y desfavorables que participan en la formación del dímero, la energía de dimerización tiene en cuenta, además, el coste energético derivado de la deformación conformacional que adopta el monómero para formar esos dímeros.

Las optimizaciones de geometría de las especies monoméricas (Figura 192) mostraron una marcada tendencia a la deformación de los CPs que contienen el residuo de Acp en su estructura, y no tanto en aquellos que contienen Ach, tal y como ya habíamos propuesto inicialmente. La conformación más estable para **CP5** perturba la planaridad del esqueleto peptídico, que deja a uno de los brazos propargílicos apuntando al interior de la cavidad. Sin embargo, para su análogo ciclohexílico, **CP10**, encontramos que la conformación más estable es aquel en la que todas las cadenas de propargilo están apuntando hacia fuera. Además, los grupos isobutilo de los residuos de leucina quedan totalmente extendidos contribuyendo a la planaridad de **CP10**. Del mismo modo, la incorporación de la tapa **A** contribuye a una estructura más contraída en el caso de **CP8** que en el de **CP11**, aunque para ambas se encontró que el mínimo de energía deja a uno de los triazoles con su protón apuntando hacia afuera de la cavidad. Con la tapa **B**, vemos como **CP9** adopta una conformación mucho más desorganizada que **CP12**, ya que cada uno de sus brazos triazólicos se dispone de manera distinta. La rigidez de los residuos de Ach de **CP10** favorece una conformación más simétrica y predispuesta para la dimerización, como vemos posteriormente con las estructuras optimizadas de homodímeros (Figura 193) y heterodímeros (Figura 194).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[608] Gray, M.; Bowling, P. E.; Herbert, J. M. *J. Chem. Theory Comput.* **2022**, *18*, 6742-6756.

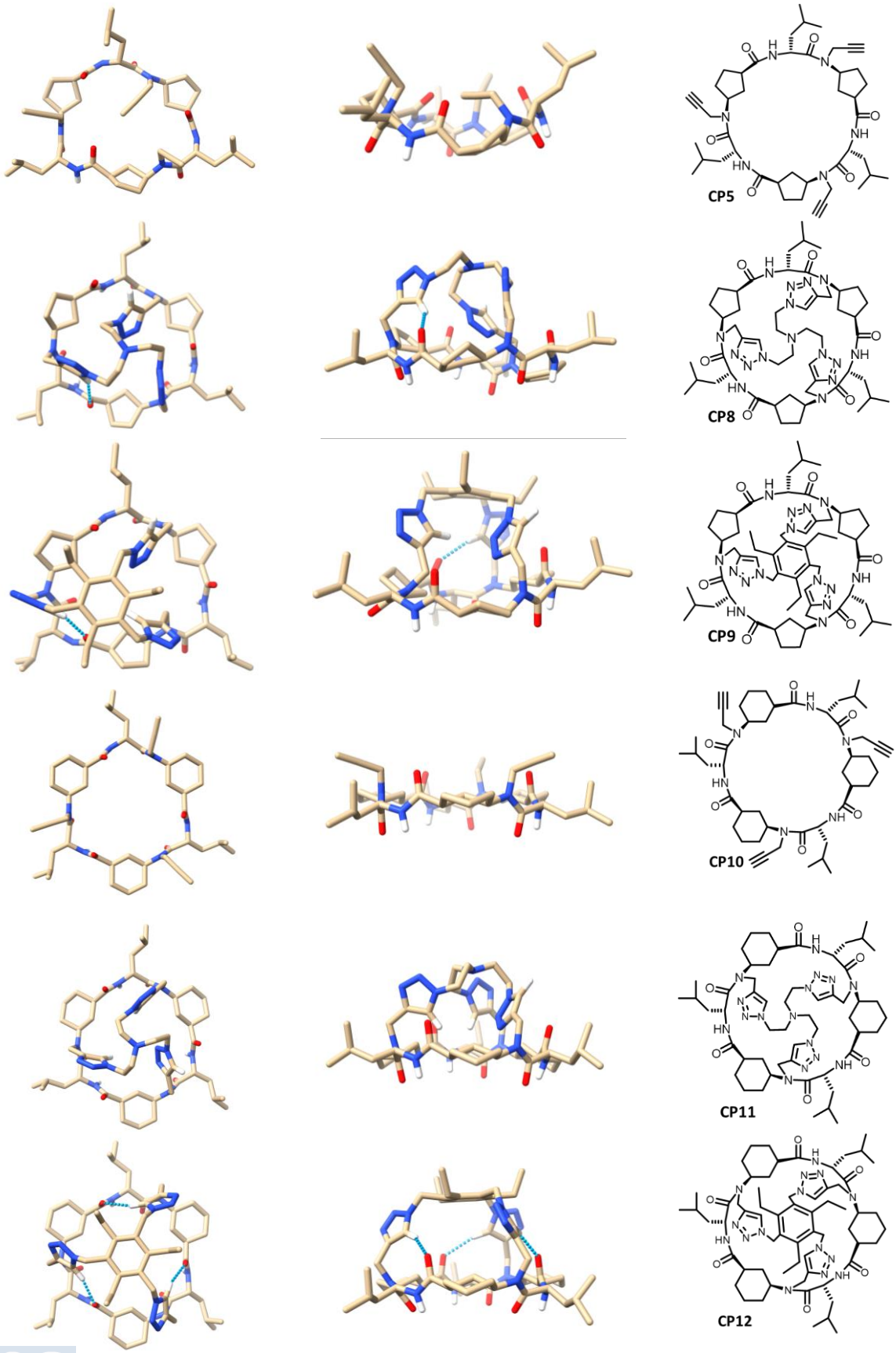
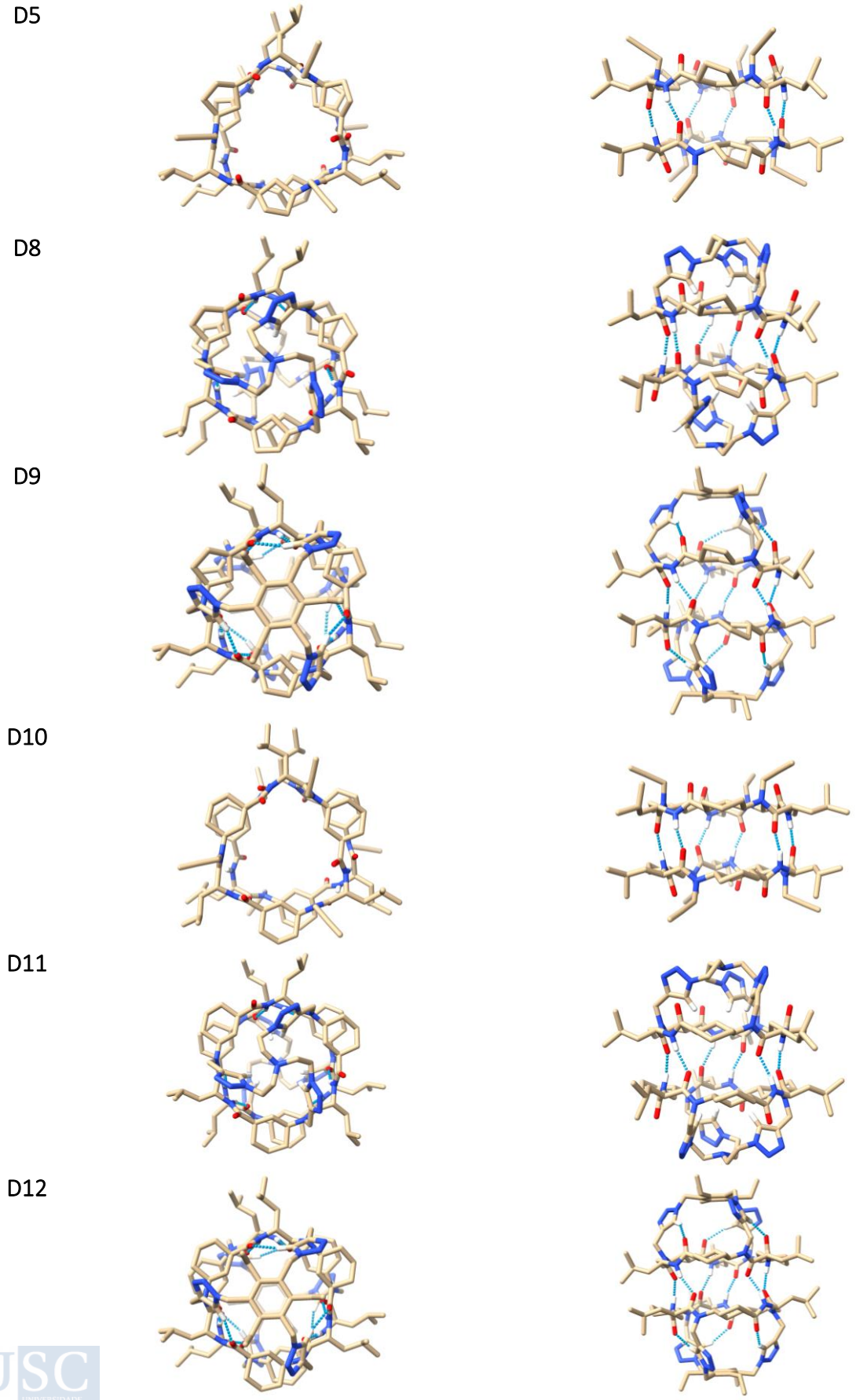


Figura 192. Conformaciones de mínima energía para los monómeros **CP5** a **CP12**, empleando B3LYP/6-31G(d,p).



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 193. Conformaciones de mínima energía para los homodímeros **D5** a **D12** empleando B3LYP/6-31G(d,p).

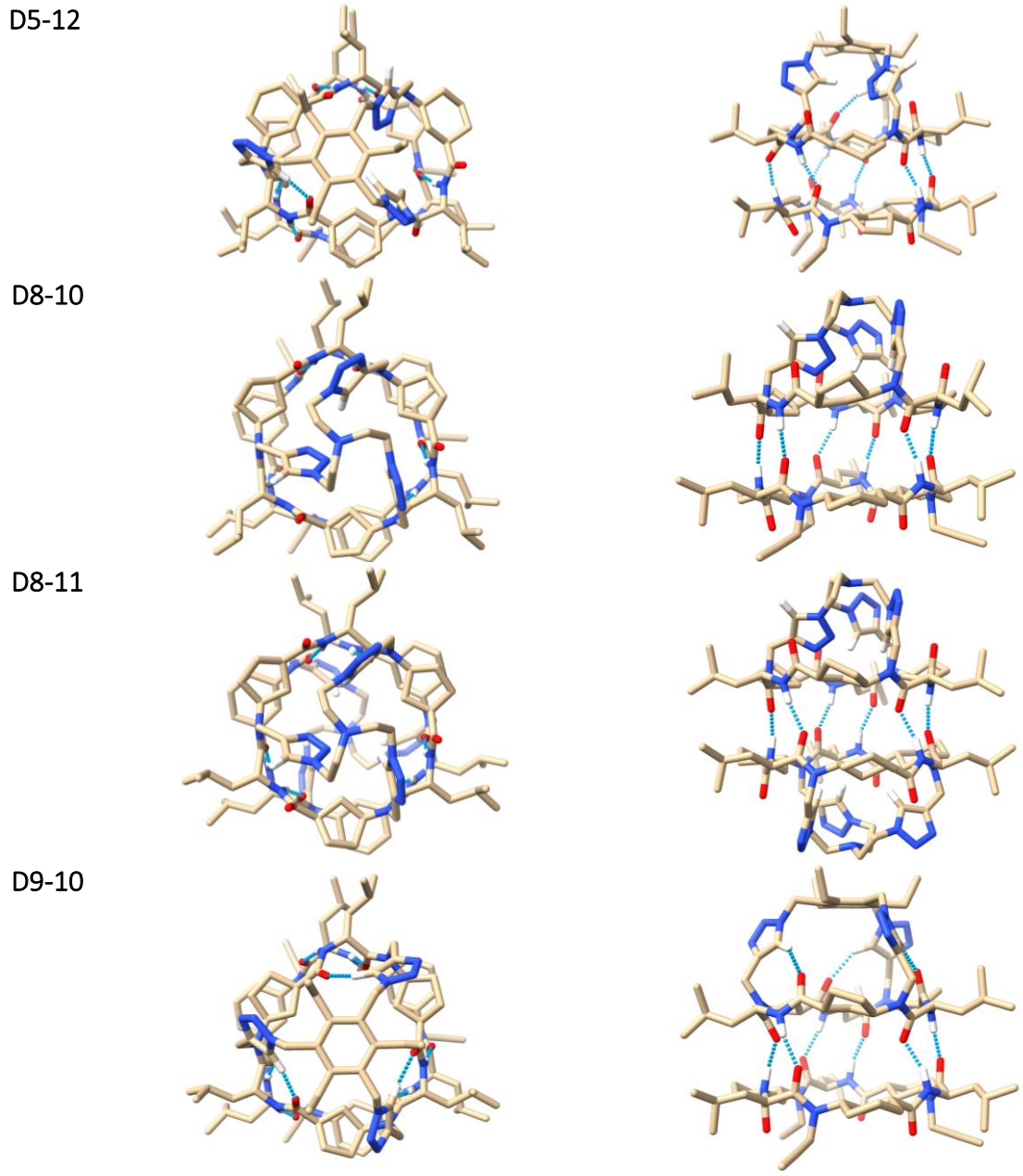


Figura 194. Conformaciones de mínima energía para los heterodímeros **D5-12**, **D8-10**, **D8-11** y **D9-10** empleando B3LYP/6-31G(d,p).

Al observar la geometría de los dímeros optimizados, se aprecia que los monómeros derivados de Acp son los que más se alejan de la conformación que adopta en las estructuras diméricas. En la Tabla 7 se recogen una variedad de parámetros que nos servirán para poder hacer comparaciones entre las estructuras estudiadas. Cabe volver a resaltar que, experimentalmente, hemos identificado que las especies heterodímericas **D8-10** y **D8-11** son más estables que los homodímeros **D8**, **D10** y **D11**. Lo mismo sucede con **D9-10** y **D5-12**, se forman preferentemente a los homodímeros **D5**, **D9** y **D10**. Por otra parte, experimentalmente, la manera inequívoca en que se pueden comparar las estabilidades de los dímeros es a través de sus valores de K_a, de los cuales no disponemos aún. El desplazamiento químico de la señal del NH pude ser, en algunos casos, un valor indicativo de dicha estabilidad, aunque no definitivo. Un mayor desplazamiento químico de esta señal se asocia con un enlace de hidrógeno más fuerte y, por tanto, distancias de enlace más cortas. Este dato de distancia solo

es posible obtenerlo a través de estructuras cristalinas, al igual que los valores en los ángulos C=O···H y N-H···O, sobre los cuales partimos de la consideración de que el valor más favorable para el primero es de 120°, y que el segundo de 180°. Trasladando estas consideraciones a los recursos computacionales que se han empleado en este estudio, podremos comparar los valores obtenidos para la distancia O···H y los ángulos C=O···H y N-H···O entre los homodímeros y heterodímeros optimizados, así como con los valores que nos proporcionan las estructuras cristalinas (Tabla 6). Por otro lado, en cuanto a las energías de dimerización e interacción obtenidas, cabe resaltar que estos valores solo se relacionan con la contribución entálpica de la energía libre del proceso de dimerización. Por tanto, en este estudio no se abarcan las contribuciones entrópicas, que probablemente, también jueguen un papel importante en el proceso. Por ejemplo, la entropía de mezclado puede favorecer la formación de las especies heterodiméricas.

	$E_{dimerización}$	$E_{interacción}$	E_{dimer}-E_{inter}	$d_{O\cdots H}$	C=O···H	N-H···O	δ_{NH}	ν_{N-H}
D5	-51.80	-69.75 (5.1)	17.9	1.87	140.1	161.6	8.09	3001
D8	-46.83	-60.31 (5.6)	13.5	1.94	135.4	162.2	8.00	3316
D9	-43.76	-56.35 (5.4)	12.6	2.01	125.7	161.9	7.13	3305
D10	-62.44	-72.14 (5.0)	9.7	1.84	138.7	165.8	8.20	3295
D11	-50.11	-59.00 (5.2)	8.9	1.98	138.3	161.6	7.74	3321
D12	-52.36	-58.58 (5.6)	6.3	2.03	126.5	161.5	6.23	3331
D5-12	-50.28	-68.39 (5.6)	18.1	1.89	131.9	164.5	7.90 (**CP12**)/7.55 (**CP5**)	-
D8-10	-57.04	-63.85 (4.9)	6.8	1.89	142.3	163.3	8.21 (**CP8**)/7.64 (**CP10**)	-
D8-11	-50.81	-60.32 (5.2)	9.5	1.93	141.2	160.9	8.02 (**CP8**)/7.91 (**CP11**)	-
D9-10	-51.51	-64.67 (5.2)	13.2	1.92	133.5	163.7	8.17 (**CP9**)/7.45 (**CP10**)	-

Tabla 7. Energías de dimerización e interacción, y longitud del enlace de hidrógeno encontrados para las estructuras homo- y heterodiméricas, empleando B3LYP como funcional y 6-31G (d,p) como conjunto de bases. Se incluye también el valor experimental del desplazamiento químico de la señal NH para las especies en disolución (concentración aproximada 5 mM en CD_2Cl_2). Entre paréntesis aparece el valor de la corrección BSSE. Los valores de energía de dimerización e interacción, así como la diferencia entre ambas, se da en Kcal/mol. Los valores de las distancias están expresados en angstroms, los ángulos en grados, los desplazamientos químicos en ppm y las frecuencias en cm^{-1}.

Comenzaremos comentando las diferencias observadas en cuanto a la distancia del enlace de hidrógeno ($d_{O\cdots H}$). Por un lado, se aprecia que el valor $d_{O\cdots H}$ encontrado para **D5** (1.87 Å), es muy ligeramente superior al de su análogo **D10** (1.84 Å), siendo este último notablemente más corto que el determinado a partir de su estructura cristalina (2.08 Å). Para sus derivados que incorporan la tapa **A**, **D8** y **D11**, las distancias son ligeramente mayores, 1.94 y 1.98 Å, respectivamente. En este caso, volvemos a apreciar que los valores que muestran los cálculos son menores que los encontrados experimentalmente, de 2.10 Å para **D8** y 2.24 Å para **D11**. En este punto, hay que tener en cuenta que en las cavidades de las estructuras cristalinas **D8**, **D10** y **D11** se encontraron moléculas de disolvente que han sido omitidas en estos cálculos, con el fin de poder hacer comparaciones. La ausencia de estas moléculas podría ser un motivo por el cual se obtienen valores de $d_{O\cdots H}$ más cortos que los experimentales. Sin embargo, tanto los valores calculados como los experimentales coinciden en que la distancia del enlace de hidrógeno de **D11** es mayor que la de **D8**, y que ambas son más largas que la de **D10**. Por otro lado, para los homodímeros que incorporan la tapa **B**, **D9** y **D12**, se obtuvieron valores de distancia mayores que para los que incorporan la tapa **A**. En concreto, 2.01 Å para **D9** y 2.03 Å

para **D12**. Curiosamente, reparamos en que existe una correlación entre las distancias de los enlaces de hidrógeno obtenidas en estos cálculos y el desplazamiento químico de la señal NH en el espectro de ^{1}H RMN de dichas especies, así como en la frecuencia de vibración de los enlaces N-H (a excepción de **CP9**) (Tabla 7). Las distancias O···H más cortas, encontradas computacionalmente, parecen tener correlación con un mayor desplazamiento químico de la señal del NH, así como con una menor frecuencia para la tensión del enlace N-H, encontrados experimentalmente. En cuanto a las especies heterodiméricas, encontramos que las distancias $d_{O\cdots H}$ no siempre son menores que la de los homodímeros. Por ejemplo, para los dímeros **D8-10** y **D9-10**, el valor promedio de $d_{O\cdots H}$ (1.89 y 1.92 Å, respectivamente) es menor que el de los homodímeros de Acp (**D8** y **D9**), pero más largo que el de Ach, **D10** (1.84 Å). Además, para **D5-12**, el valor calculado de $d_{O\cdots H}$ (1.89 Å) es bastante más corto que el encontrado experimentalmente (2.07 Å). Si comparamos los valores de **D8-10** y **D8-11**, observamos que aquel cuyos dos monómeros incorporan tapa (**D8-11**) presenta una distancia $d_{O\cdots H}$ ligeramente mayor que aquel donde uno de los monómeros no porta tapa molecular (1.93 Å frente a 1.89 Å). En relación con los heterodímeros, reparamos en que, experimentalmente, el desplazamiento químico del NH de la subunidad de Acp es mayor que el de la subunidad de Ach, para las especies **D8-10**, **D8-11** y **D9-10** (Tabla 7). Además, en otros trabajos desarrollados en el grupo donde también se estudia la formación de heterodímeros entre α,γ-ciclohexapéptidos de Acp con aquellos de Ach, se observa la misma tendencia,[609,610] aunque estos no se han abordado en este estudio. Sin embargo, sucede lo contrario en el caso de **D5-12** (Tabla 7). Decidimos, por tanto, evaluar la diferencia entre las distancias $d_{OAcp\cdots HAch}$ y $d_{OAch\cdots HAcp}$ para estas estructuras (Tabla 8). Sin embargo, excepto para **D8-11**, encontramos la tendencia contraria a lo que muestran los valores experimentales de desplazamiento químico (si asociamos que las distancias más cortas se verían reflejadas en un desplazamiento químico a campo más bajo). Por ejemplo, para **D5-12** la distancia promedio $d_{OAcp\cdots HAch}$ es mayor que la $d_{OAch\cdots HAcp}$, lo que indicaría que los enlaces que se establecen entre los NHs de **CP5** y los oxígenos carbonílicos de **CP12** son más cortos que en caso contrario (NH de **CP12** con oxígeno carbonílico de **CP5**). Solamente para **D8-11** obtuvimos unos valores que van en consonancia con los desplazamientos químicos mencionados, ya que $d_{OAcp\cdots HAch}$ es ligeramente mayor que $d_{OAch\cdots HAcp}$ (1.95 y 1.91 Å, respectivamente).

	$d_{OAcp\cdots HAch}$	$d_{OAch\cdots HAcp}$	$C_{Acp}{=}O\cdots H_{Ach}$	$C_{Ach}{=}O\cdots H_{Acp}$	$N_{Acp}{-}H\cdots O_{Ach}$	$N_{Ach}{-}H\cdots O_{Acp}$
D5-12	1.93	1.84	134.9	128.9	161.6	167.4
D8-10	1.84	1.95	146.4	138.8	159.5	167.0
D8-11	1.95	1.91	139.7	142.8	163.6	161.7
D9-10	1.91	1.94	128.7	138.3	165.4	162.1

Tabla 8. Recopilación de los parámetros más relevantes en las geometrías de mínima energía obtenidas para las especies heterodiméricas empleando B3LYP/ 6-31G (d,p). Los valores de distancia están expresados en angstroms y los ángulos en grados.

[609] A. Fuertes García, *Nuevas estrategias para el transporte de iones y la encapsulación selectiva de ligandos en α,γ-ciclopéptidos* (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (**2019**). Páginas 199-201, formación de las especies **D5a-8** y **D5a-9**.

[610] Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-571. Página 24 de la SI, formación de la especie **11$_{7a-9}$**.

Por otro lado, analizaremos los valores obtenidos para los ángulos C=O···H y N-H···O. Comenzando por N-H···O, se observa que el ángulo N-H···O no varía de forma significativa entre todos los dímeros estudiados, oscilando entre 161° y 165°. Sí cabe resaltar que para aquellas estructuras de las que disponemos de datos cristalográficos, el ángulo calculado es más cerrado que el experimental, encontrando la mayor diferencia para **D10** (calculado 165.8° y experimental 172.2°). Para el ángulo C=O···H, encontramos, sin embargo, una mayor disparidad en los valores. Se vuelve a apreciar una cierta tendencia en relación con la incorporación de las tapas moleculares. Mientras que **CP5**, que no tiene tapa, presenta un ángulo promedio de 140.1°, **CP8** (tapa **A**) presenta un ángulo algo más cerrado (135.4°), lo que se acentúa con **CP9** (tapa **B**), para el que encontramos un valor de 125.7°. Sin embargo, no encontramos una diferencia tan acentuada entre los CPs de Ach, ya que el ángulo C=O···H de **D10** y **D11** es prácticamente el mismo (138.7° y 138.3°, respectivamente), aunque sí se advierte una diferencia con el valor para **D12**, cuyo ángulo es de 126.5°. Al comparar con las estructuras cristalinas, volvemos a ver que el valor calculado para **D10** es el que más se desvía del experimental (151.1°) y, de nuevo, hacia un valor menor. En el caso de los heterodímeros, de la observación experimental en cuanto a la mayor estabilidad en comparación con los homodímeros, podríamos suponer que los primeros presentan una distancia de enlace de hidrógeno más corta y/o una mejor alineación C=O···H (entendiendo que el valor más favorable sería 120°). Sin embargo, los valores obtenidos no siguen una tendencia clara en cuanto a la variación del ángulo C=O···H en comparación con los homodímeros (Tabla 7). Por ejemplo, el promedio de los ángulos C=O···H calculado para **CP5-12** (131.9°), es menor que el de **D5** (140.5°), pero mayor que el de **D12** (126.5°). Al mismo tiempo, este valor calculado es marcadamente menor que el valor experimental (148.7°). Sin embargo, para **D8-11**, el ángulo encontrado (141.2°) es mayor que el de **D8** (135.4°) y que el de **D11** (138.3°). Lo mismo ocurre con **D8-10**, para el que se encuentra un valor de 142.3°, mayor que el de **D8** (135.4°) y que el de **D10** (138.7°). Mientras tanto, para **D9-10**, el ángulo C=O···H (133.5°) es mayor que el de **D9** (125.7°) pero menor que el de **D10** (138.7°). Por tanto, no se observa una tendencia hacia la mejor alineación C=O···H en las especies heterodiméricas. Decidimos examinar de manera separada los valores C_{Acp}=O···H_{Ach} frente a C_{Ach}=O···H_{Acp} (Tabla 8). Los datos parecen sugerir que las subunidades de Acp son las que más deformación sufren, ya que los valores C_{Acp}=O···H_{Ach} se desvían más que aquellos de los correspondientes homodímeros que los C_{Ach}=O···H_{Acp}. Esto es, los grupos carbonilo de los CPs de Acp cambian más su orientación que aquellos de los CPs de Ach. Esto encajaría con la mayor flexibilidad de los monómeros de Acp, como se vio en las optimizaciones de geometría (Figura 192).

Por último, analizaremos los resultados obtenidos para las energías de interacción y dimerización. Recordemos que las energías de interacción nos aportan información en cuanto a la fortaleza de las interacciones que mantienen los dímeros, mientras que la energía de dimerización tiene en cuenta la deformación de los monómeros, por lo que los valores de esta última son mayores. Si comparamos los tres CPs de Acp, **D5**, **D8** y **D9**, vemos que los valores más favorables se obtienen para el péptido sin tapa, **D5**. Le sigue **D8**, con la tapa más flexible. Por último, **D9**, que incorpora la tapa más rígida, es el que presenta un valor más alto de energía de interacción y dimerización, pese a ser el que sufre menor coste de deformación tiene (E_{dimer}-E_{inter}). Se debe, como vemos, a que el valor calculado para su energía de interacción es el más desfavorable de todas las estructuras estudiadas. Haciendo la misma comparación entre los CPs de Ach, (**D10**, **D11** y **D12**), vemos de nuevo la misma tendencia, en tanto que el CP sin tapa **D10**, es el que presenta una mayor estabilidad. De nuevo, le sigue el péptido con la tapa flexible,

CP11. Curiosamente, **D12**, no solo no presenta los valores más desfavorables encontrados (como cabría esperar por los resultados experimentales), sino que muestra una energía de dimerización más favorable que **D11** y que **D9**, el péptido con tapa análoga, pero con el esqueleto de Acp. Si comparamos **D5** frente a **D10**, ambos sin tapa, los valores obtenidos son mejores para el péptido de Ach, **D10**. El mismo patrón se repite entre **D8** y **D11**, y entre **D9** y **D12.** En parte, esto se debe a que para los péptidos de Ach, la energía empleada en la reorganización de los monómeros es menor. Como comentábamos al principio de esta discusión, parece que la mayor rigidez de su esqueleto les otorga mayor grado de preorganización. Analizando los parámetros relativos a las energías obtenidos para los heterodímeros, volvemos a encontrar, al igual que cuando analizamos las distancias y los ángulos, que los valores obtenidos no siempre son más favorables que los de ambos homodímeros por separado, especialmente al comparar con los homodímeros de Ach (Figura 195).

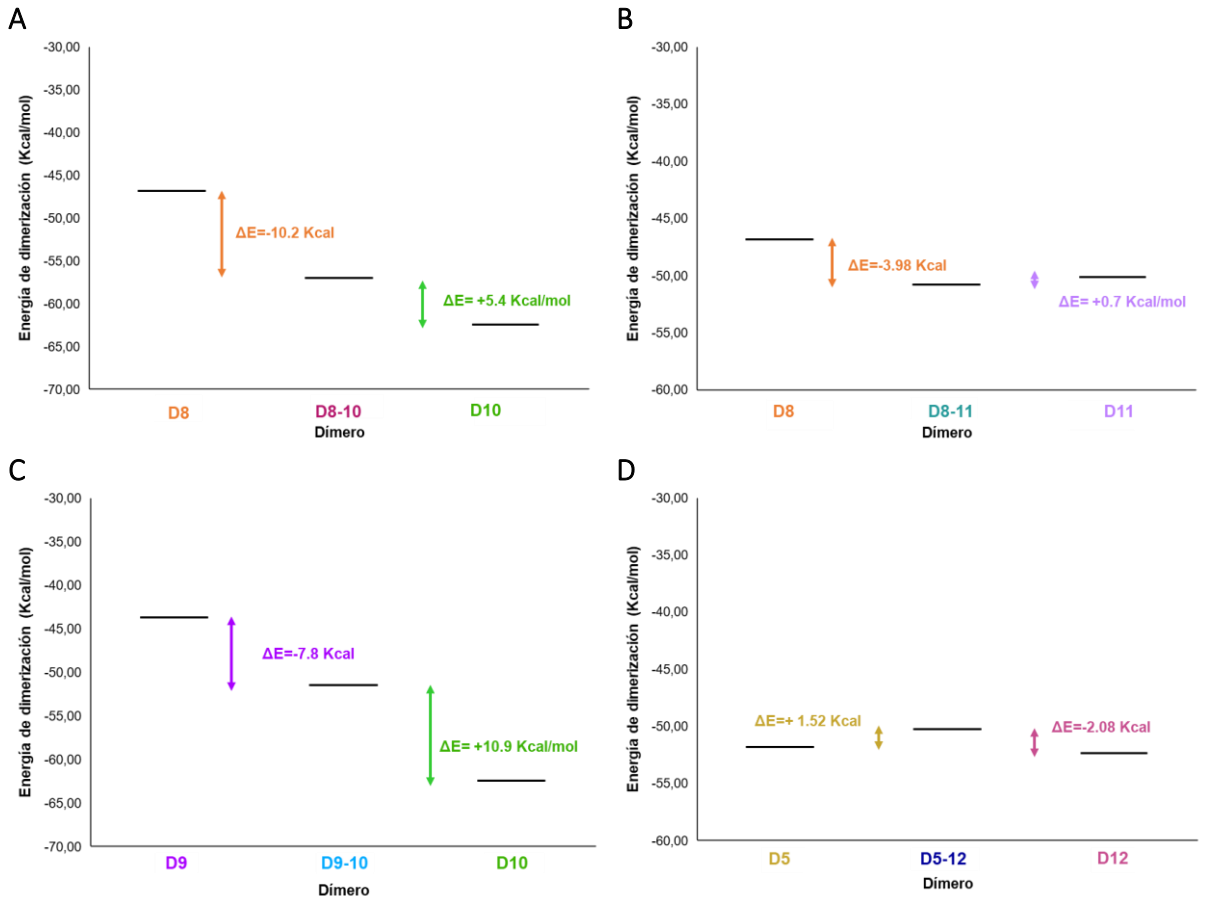


Figura 195. Gráficos ilustrativos de las variaciones de la energía de dimerización entre los heterodímeros y los homodímeros correspondientes.

Esto lo vemos en las energías de dimerización de **D8-10**, **D8-11** y **D9-10**. Son más favorables que las de los homodímeros de Acp (**D8** y **D9**), pero quedan prácticamente igual o más desfavorables que los de Ach (**D10** y **D11**). Mención especial merece el caso de **D5-12**, para el que obtenemos valores de $E_{interacción}$ y $E_{dimerización}$ más desfavorables que para ambos homodímeros (con excepción de la $E_{interacción}$ que sí es menor que la de **D12**). Sin embargo, para este dímero se encontró el mayor coste de deformación (18.2 Kcal/mol), ya que, sobre todo

CP12 adopta una conformación que se desvía bastante de la geometría de mínima energía obtenida para su forma monomérica (Figura 192). En la Figura 195 se ilustran gráficamente estas variaciones en la energía de dimerización. Cabe mencionar que, aunque a disociación del homodímero de Ach pueda ser más costosa en términos energéticos, la mayor estabilidad del heterodímero con respecto a homodímero de Acp, puede compensar este coste. Además, cuando ambos CPs se encuentran en la disolución, la concentración del heterodímero es, estadísticamente, el doble que la cada uno de los homodimeros por separado, lo que también favorece la formación de la especie heterodimérica.

Los resultados obtenidos no son del todo claros en cuanto a los fundamentos de la mayor estabilidad de los heterodímeros, así como en relación con **D12**, especie que no se forma en disolución, pero para la cual, los cálculos realizados no predicen una geometría o energía de dimerización más desfavorable que para el resto de dímeros estudiados. Es por ello por lo que decidimos cambiar el funcional B3LYP por M05-2X, ya que este último podría reproducir más fielmente las interacciones no covalentes,[611] que juegan un papel fundamental en las moléculas que estudiamos. Por tanto, repetimos todas las optimizaciones de geometría, esta vez con M05-2X como funcional y 6-31G(d,p) como conjunto de bases. Posteriormente, los cálculos de energía se llevaron a cabo empleando M05-2X/6-31G+(d,p). Los resultados de las optimizaciones de geometría arrojaron estructuras muy similares a las que previamente habíamos obtenido con B3LYP. Las geometrías que se obtuvieron mediante estas optimizaciones se encuentran representados en las Figuras 219-221 de la sección experimental (páginas 400-402). En las Tablas 9 y 10 se recogen los valores obtenidos para las energías de interacción y dimerización, así como aquellos relativos a las distancias y los ángulos de interés. Aunque, en términos de valores absolutos, se aprecian diferencias con respecto a los resultados obtenidos con B3LYP, en rasgos generales, con M05-2X se observan las mismas tendencias.

Comenzando de nuevo por la distancia de enlace de hidrógeno, lo primero que llama la atención es que, en general, los valores son ligeramente mayores a los obtenidos con B3LYP. Sin embargo, se aprecia de nuevo esa tendencia al aumento de las distancias con la introducción de las tapas moleculares. Además, en esta ocasión no hay prácticamente diferencia entre la distancia O···H encontrada para los CPs de Acp con la de los de Ach, algo que sí se apreciaba en los cálculos previamente realizados. Por ejemplo, se observa el mismo valor para **D9** y **D12**, algo que nos indica, como se detallará más adelante, que con M05-2X tampoco apreciamos resultados significativamente desviados para **D12**. Por otra parte, nuevamente, los heterodímeros presentan valores de distancia O···H más corta que los homodímeros de Acp, pero igual o mayor que los de Ach, excepto **D8-11**. En esta ocasión, el análisis diferenciado de las distancias $O_{Acp}\cdots H_{Ach}$ y $O_{Ach}\cdots H_{Acp}$ de las especies heterodiméricas (Tabla 10) muestra resultados diferentes a los valores obtenidos con B3LYP (Tabla 8). Mientras que para **D8-11** y **D9-10** las diferencias son mínimas, para **D5-12** se muestra una distancia $O_{Acp}\cdots H_{Ach}$ más corta que $O_{Ach}\cdots H_{Acp}$, lo opuesto a lo que se observó con B3LYP. La misma tendencia se obtuvo para **D8-10**, aunque este y **D5-12** presentan patrones contrarios en cuanto al desplazamiento químico de los NH.

[611] a) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 1009-1018. b) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3*, 289-300. c) Hohenstein, E. G.; Chill, S. T.; Sherrill, C. D. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 1996-2000. d) Wong, B. M. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 51-56.

	$E_{dimerización}$	$E_{interacción}$	E_{dimer}-E_{inter}	$d_{O\cdots H}$	C=O···H	N-H···O
D5	-45.73	-55.09 (4.8)	9.36	1.94	140.5	160.5
D8	-33.04	-45.28 (5.3)	12.24	2.01	138.8	162.0
D9	-28.23	-40.41 (5.0)	12.18	2.08	128.3	162.7
D10	-44.37	-53.81 (4.5)	9.4	1.94	143.6	165.3
D11	-35.32	-42.65 (4.8)	7.33	2.06	144.8	161.2
D12	-34.74	-41.79 (5.4)	7.06	2.08	129.7	162.1
D5-12	-38.10	-51.59 (5.2)	13.49	1.96	136.6	163.8
D8-10	-42.42	-48.26 (4.6)	5.84	1.98	144.8	163.2
D8-11	-35.68	-44.61 (4.9)	8.93	1.99	145.6	162.3
D9-10	-35.43	-47.98 (4.9)	12.55	2.02	134.5	162.6

Tabla 9. Energías de dimerización e interacción, y longitud del enlace de hidrógeno encontrados para las estructuras homo- y heterodiméricas empleando M05-2X como funcional y 6-31G (d,p) como conjunto de bases. Aparece entre paréntesis el valor de la corrección BSSE. Los valores de energía de dimerización e interacción, así como la diferencia entre ambas, se da en Kcal/mol. Los valores de las distancias están expresados en angstroms y los ángulos en grados.

	$d_{OAcp\cdots HAch}$	$d_{OAch\cdots HAcp}$	C_{Acp}=O···H_{Ach}	C_{Ach}=O···H_{Acp}	N_{Acp}-H···O_{Ach}	N_{Ach}-H···O_{Acp}
D5-12	1.92	2.01	141.7	131.4	160.8	166.7
D8-10	1.91	2.04	149.6	140.2	159.9	167.2
D8-11	2.01	1.98	144.3	146.8	163.6	162.0
D9-10	2.02	2.01	130.0	139.0	163.4	161.9

Tabla 10. Recopilación de distancias relevantes en las geometrías de mínima energía obtenidas para las especies heterodiméricas empleando M05-2X/ 6-31G(d,p). Los valores de distancia están expresados en angstroms y los ángulos en grados.

Evaluando ahora los ángulos, en el caso de N-H···O, nos volvemos a encontrar con que varía muy ligeramente entre unas especies y otras, y a su vez, también presenta valores similares a los obtenidos con B3LYP. Por su parte, el ángulo C=O···H se hace más cerrado con la introducción de las tapas moleculares, lo que ya resaltamos en los cálculos previos. Se observa que, en general, los valores obtenidos para este ángulo son mayores que con B3LYP, lo que es coherente con el alargamiento de las distancias O···H. Esta variación es bastante homogénea, en el sentido en que todos los ángulos C=O···H se ven aumentados en 2-4°, excepto el valor para **D5**, que se mantiene prácticamente inalterado. Cuando analizamos de manera diferenciada los ángulos C_{Acp}=O···H_{Ach} y C_{Ach}=O···H_{Acp}, se observa la tendencia análoga a la que ya se discutió para B3LYP.

Por último, las energías de interacción están en el rango de -40 a -55 Kcal/mol, por lo que son notablemente menos favorables que las que se obtuvieron con B3LYP (-56 a -72 Kcal/mol). Sin embargo, tanto E_{inter} como E_{dimer} siguen la misma tendencia observada con B3LYP, valores más favorables para CPs sin tapa, y más desfavorables a medida que aumenta la rigidez de esta. De nuevo, los valores obtenidos para **D12** son más favorables que los de **D9**, algo que, como hemos comentado, es contradictorio a lo encontrado experimentalmente. Una diferencia remarcable con respecto a los resultados obtenidos con B3LYP, es el valor de estas energías para **D5-12**, y que en esta ocasión, tanto su energía de interacción (-51.59 Kcal/mol) como su energía de dimerización (-38.10 Kcal/mol), son más favorables que las de **D12** (-34.74 y -41.79

Kcal/mol, respectivamente). Para el resto de los heterodímeros, de nuevo observamos unos valores de E_{inter} y E_{dimer} más favorables que los homodímeros de Acp, pero no que aquellos de Ach.

En conclusión, los cálculos realizados con ambos métodos coinciden en presentar mayores distancias de enlace de hidrógeno para los CPs con tapa. Además, los CPs de Ach presentan distancias O···H ligeramente mayores. Si observamos las geometrías de estos CPs, vemos que la introducción de las tapas hace que los grupos carbonilo se orienten hacia el interior de la cavidad peptídica, lo que se aprecia en la disminución del ángulo C=O···H. Experimentalmente, vemos indicios de esta tendencia cuando comparamos las estructuras cristalinas de **D10**, **D8** y **D11** (Tabla 6). De la comparación entre **D10** y **D11** vemos cómo aumenta la distancia O···H (de 2.08 a 2.24 Å), y también como se reduce el ángulo C=O···H (de 151.1 a 135.9°). De la comparación entre **D8** y **D11** vemos cómo dos péptidos que comparten tapa se diferencian en la longitud del enlace de hidrógeno (2.10 y 2.24 Å) debido, presumiblemente, a la naturaleza de su esqueleto peptídico. Además, la tendencia que siguen las distancias calculadas O···H para los homodímeros es coherente con el desplazamiento químico observado para los NHs. A su vez, las energías de interacción y dimerización siguen la misma tendencia, siendo más favorables para los CPs sin tapa, y encontrando sus valores más desfavorables para los CPs con la tapa rígida B, a excepción de **D12**, para el cuál ninguno de los dos métodos empleados predice un mayor impedimento para la formación de dímeros. Además, analizando los valores de E_{inter} y E_{dimer} para los heterodímeros, vemos de nuevo una tendencia en relación con la presencia o ausencia de tapa. Entre **D8-10** y **D9-10**, los valores más favorables son para el heterodímero con el CP que tiene la tapa molecular flexible (**CP8**). A su vez, entre **D8-10** y **D8-11**, la especie que presenta peores valores es aquella donde ambos CPs tienen tapa (**D8-11**). Por otro lado, con ambos métodos, se observa que los monómeros de Ach tienen menos tendencia a la distorsión y, por tanto, están más preorganizados para la dimerización, lo que da lugar a valores de energía de interacción y energías de dimerización más favorables que con sus análogos de Acp. En cuanto a las especies heterodiméricas, presentan distancias O···H más cortas que los homodímeros de Acp (excepto **D5-12**), pero no que aquellos de Ach. Desafortunadamente, el análisis pormenorizado de distancias y ángulos en los heterodímeros no arrojó luz sobre los factores que pudieran explicar el mayor desplazamiento químico de los NHs de los CPs de Acp, observado experimentalmente.

Contrariamente a lo observado en trabajos computacionales realizados en el grupo,[487] para las energías de interacción y dimerización, se obtuvieron valores más favorables con B3LYP que con M05-2X. Esto se debe a la inclusión del factor de corrección GD3BJ (o corrección de Grimme) en los cálculos con B3LYP, que rectifica la energía de dispersión y que también lleva implícita la función de amortiguación de Becke-Johnson.[524] Esta aproximación se ha empleado previamente para optimizaciones de geometría y cálculos termodinámicos en otros sistemas supramoleculares,[612] donde los enlaces de hidrógeno también son esenciales en la formación de los ensamblados, dando muy buenos resultados.

[612] a) Rahman, F. U.; Wang, R.; Zhang, H. Bin; Brea, O.; Himo, F.; Rebek, J.; Yu, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e2022055. b) Guan, H. W.; Zhu, Y. J.; Peters, J.; Brea, O.; Himo, F.; Rebek, J.; Yu, Y. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 8147-8150. c) Daver, H.; Rebek, J.; Himo, F. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 10861-10870.

Los resultados obtenidos de este estudio computacional nos animan a seguir indagando en la estabilidad relativa de las especies heterodiméricas de este tipo de CPs. Por ello, nos planteamos llevar a cabo una secuencia de estudios experimentales de competición, así como un estudio más exhaustivo de los parámetros termodinámicos asociados a los procesos de homo- y heterodimerización, para poder distinguir entre las contribuciones entrópicas y entálpicas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. Conclusions

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

The research work that have been done during this Ph.D has allow us to deeply study the receptors created from the incorporation of molecular caps or arms into the scaffold on α,γ-cyclic peptides. We have been able to demonstrate that both, peptide, and cap have a large impact on the behavior of the receptor. Regarding the cyclic peptide, its diameter and rigidity restrict the ability to incorporate certain kind of guests. On the other hand, the chemical nature and flexibility of the molecular caps or arm has demonstrated to be fundamental in the role of the supramolecular assembly, from receptors to potentially nanoreactors or nanoenzymes.

First, we focused on the incorporation of porphyrin macrocycles into the peptide scaffold with a final catalytic purpose while different porphyrin role. By one side, we attached **P1** to **CP1/D1** making use of the click chemistry reaction between the azide group, incorporated in the peptide, and the alkyne functionalized zinc metalloporphyrin. As a result, we obtained **CP2/D2**, that we could characterize by mass spectrometry and FTIR. Unfortunately, the complexity of the ^{1}H NMR spectra, due to the presence of a mixture of rotosiomers, did not allow us to make use of the NMR technique to study **D2** and its behavior as receptor in detail. However, we move on and prepared 11 bipyridine ligands with different length, thickness, flexibility and terminal pyridine ends. With these ligands we wanted to study the capability of **D2** of encapsulate them though Zn-N coordination. This process would be dependent on the ligand characteristics. Apart from this, we also prepared a serie of ligands which included a bipyridine core with the objective of coordinate metal complexes though that position once they were encapsulated inside **D2**. Following the shift on the UV-vis Soret band of the metalloporphyrin included in **D2**, from 421 nm for the free receptor to 431 nm for the complexed one, we could confirm the interaction between all the ligands prepared with **D2**. In order to investigate about the nature of that interaction, we run the same kind of experiments with the model porphyrin **P1**. From to that comparison, we could confirm that the ligands were being encapsulated inside **D2**, cause the amount of ligand necessary to shift the Soret band in the same magnitude was 3-15 times smaller (depending on the ligand) in the case of **D2** than in the case of **P1**. However, we observed that **D2** does not present an accentuated preference for any particular ligand, but accommodate all of them with moderate affinities (10^{4}-10^{6} M), something that could be related with it flexibility. Moreover, it is quite relevant that not all titration data could be adjusted to a 1:1 model, then, some ligands had to be adjusted to a 1:2 model. Additionally, there is not size relation between both hosts groups. We interpretated that as an indication of a complex combination of mechanism operating together, giving all of them the same observable result, the shift of the Soret band from 421 nm to 431 nm. The possible reason that we propose to that finding is that, in some not determined way, certain ligands force the receptor **D2** to adopt an uncomfortable conformation that facilitate the coordination of a second ligand molecule though the outer porphyrin face. Computational geometry optimization did not completely clarify the experimental findings, but we obtained complexation energies that were partially in agreement with the experimental data. We are currently trying to translate the results with the bipyridine core ligands to the nanoreactor ability of the receptor.

By other side, with a different approach, we worked on the synthesis of **P2**, the zinc metalated *meso*-tetrakis(3-formylphenil)porphyrin, planning to use its four formyl groups to bind two units of **CP3** (Acp-based α,γ-cyclooctapeptide) to both porphyrin faces though hydrazone bond. After an intense synthetic effort, we achieve the desired porphyrin from the reduction of the cyano derivative. Moreover, we prepared **CP4/D4**, an Ach-based α,γ-cyclooctapeptide, to be the component of the system that would prevent it to converge into

the formation of nanotubes. This prevention regards on the known tendency that has the Acp-based α,γ-cyclic peptides to self-assemble, preferentially, with the Ach-based ones, and *vice versa*. Then, we followed the formation of the desired adduct by ^{1}H NMR. First, we added **CP4** over the **CP3** solution, addressing the formation **D3-4**, that could be observed because of the changes in the spectra. After that, we added **P2** and monitored the disappearance of its signals due to the condensation between the formyl groups of that specie and the hydrazine ones from the subunit **CP3** of **D3-4**, which leaded, in principle, to the formation of the adduct **P2⊂(D3-4)$_2$**. Moreover, we detected, by MALDI mass spectrometry, the peak corresponding to **CP3-P2-CP3**.

Secondly, we focused on the synthesis of two α,γ-cyclohexapeptide scaffolds to be studied as carbonic anhydrase (CA) mimics, **CP6e** and **CP7b**. Since the active site of this natural enzyme possess three histidines residues coordinated, though its imidazole rings, to a Zn^{2+} ion, we specially selected the arms of our synthetic peptides as suitable for that kind of coordination too. By one side, we prepared **CP6e** that contain three pyridine-ended propyl chains. The pyridine moiety was finally introduced in the dipeptidic precursor, after which, the reduction and following peptidic couplings allowed us to obtain **CP6e**. After that, we evaluated the coordination capabilities of **CP6e** with some paramagnetic ions such as Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+} and Mn^{2+}. Following the changes in the peptide scaffold by ^{1}H NMR, we observed that upon the additions of the metallic chloride salts, the most of **CP6e** signals disappeared and the peptide solutions changed notably its color, which can be attributed to the coordination of the ions to the peptide pyridines. However, after the addition of bipyridine, that was supposed to be incorporated to the already formed complex **CP6e·M^{2+}**, we realized that ^{1}H NMR signals from the samples with Mn^{2+} and Fe^{2+} turned back to the original **CP6e** spectra. This would mean that in those cases, the complex between the peptide and the metal has been disrupted. This hypothesis is supported also by the color changes of the metal and by the crystallization of the *cis*-Mn(bipi)$_2$Cl$_2$ complex on the Mn^{2+} containing sample. On the contrast, a different situation was observed with Co^{2+} and Cu^{2+}. The ^{1}H MRN changes suggest that the metal still coordinated to the peptide pyridines even with the addition of bipyridine. Moreover, this changes in the spectra does not fit with the ones that suffered a sample containing just bipyridine after the additions of the corresponding salt, neither the color compared with the peptide containing sample. Finally, an equivalent of acetylene dicarboxylic acid was added to the samples, wondering if that ligand could fill the six-coordination position of the metal through its encapsulation inside **D6e** cavity, since the bipyridine moiety should be coordinated outside due to its size. Analyzing the samples by mass spectrometry, we detected the peaks corresponding to several complexes between **CP6e** and the Co^{2+} or Cu^{2+} that incorporated the bipyridine and the diacid. These preliminary results encourage us to use this peptide as a synthetic catalyst, although its esterase activity has not been studied yet. Regarding the other peptide, **CP7b**, it incorporates three alkyne chains with terminal imidazoles. We finally introduced the imidazole moieties using tosyl as a protecting group for the Sonogashira reaction, after discovering by serendipity that this group can be easily removed by thiophenols. We run a hydrolysis experiment with **CP7b** and *p*-NPA as substrate, followed also by ^{1}H NRM. Before the addition of the substrate, we preform the complex **CP7b·Zn^{2+}**, this time in a mixture of methanol and aqueous media, since the water play an important role in the hydrolysis mechanism of the natural CA. We asses that the sample containing the peptide **CP7b** was able to slowly facilitate the hydrolysis of the substrate, thanks to the raising of the signals corresponding to *p*-NP. On the contrary, the *p*-NPA contained in a sample with the same conditions, but in absence of

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

peptide, did not suffer hydrolysis. In next steps we will continue exploring and exploiting both peptides, **CP6e** and **CP7b** as catalyst.

Thirdly, we developed a surprising anion recognition system based on the rearrangement of *tris*-triazolyl α,γ-cyclohexapeptides in order to accommodate water-anion clusters in between two peptide monomers. We prepared four capped derivates by coupling two different peptides, **CP5** and **CP10** with two different caps, **A** and **B**. From these four compounds, we were able to obtain crystalline structures from **D8** and **D11**, both with the *tris*(triazolylethyl)amine cap, confirming them as dimeric structures. We studied the anion recognition capabilities of all the peptides by following the changes on their ^{1}H MNR spectra upon the addition of the corresponding tetrabutylammonium salts. By one side, **D8** is able to recognize, as far as we know, F^-, Cl^-, Br^-, I^-, NO_3^-, N_3^- and AcO^-, presenting the highest affinity for fluoride. Then, regarding the halides, the affinity tendency follows qualitatively $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$, being necessary to add an extra amount of water for the two biggest, something that could be related with their smaller hygroscopicity. We could demonstrate that, in presence of the anions and enough amount of water, **D8** suffer disassembly and simultaneously reorganize its scaffold to surround the aforementioned anion-water clusters, as show the crystalline structures of the complexes with chloride and fluoride. These **(3A$^-$·nH$_2$O)⊂D8** complexes incorporate three anions and a variable number of water molecules, that depend on the size and the hydrophilicity character of the anion. Each anion is then stabilized by the hydrogen bonds that stablish with the peptide amidic protons and the surrounding water molecules. As we expected from the ^{1}H NMR studies, the triazole protons does not participate in the recognition process. However, the molecular cap was proven to be essential for that process to take place, cause the addition of TBAF to the uncapped peptide **CP5**, the **CP8** precursor, did not provoke the formation of any complex. Moreover, it was revealed that the counterion TBA^+ does not contribute to the process, apart from facilitate the solubility. In addition, we studied the transport capabilities of **D8**, finding that it can promote Cl^-/NO_3^- and Cl^-/H^+ (or Cl^-/OH^-) exchange across lipid membranes, where the chloride transport is the limiting rate. In this case, the halides transport rate is $I^- > Br^- > Cl^-$, that could be associated with the anion lipophilicity or with the difficulty that the receptor offers to release the anions for which it presents more affinity. By the other side, **CP9/D9**, that incorporate the more rigid aryl pre-cap B, is selective for the smallest anion, fluoride. The behavior of **CP9** towards TBAF addition is similar to the one presented by **CP8**, unless the affinity of the former is markedly lower, something that was attributed to more restricted structure of **CP9** compared to **CP8**. Due to those similarities that we found, we decided to propose a computational model for the complex **(3F$^-$·nH$_2$O)⊂D9**, based on the crystalline structure of **(3F$^-$·8H$_2$O)⊂D8**. The DOSY NMR experiments confirm that the hydrodynamic radius of the complex between **CP9** and fluoride does not correspond to a monomeric structure, discarding then the possibility of having **(3F$^-$·nH$_2$O)⊂CP9** and confirming a bigger complex type, presumably, **(3F$^-$·nH$_2$O)⊂D9**. On the other hand, the Ach-based peptide **CP11** is not able to recognize the tested anions, which we attributed to the impossibility of its rigid peptidic scaffold to reorganize in the same way that **CP8** or **CP9**. Moreover, **CP12**, also composed by Ach aminoacids but that incorporates the rigid cap B is unable to form homodimers, something that we interpretated as a conformational restriction being introduced by the cap, that seems to affect it different way to the Acp and Ach-based CPs. However, **CP12** was able to form the heterodimeric specie **D5-12** structure with **CP5**. This finding encouraged us to develop a short computational study that showed general agreement with the experimental results.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8. Bibliografía

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la presente tesis doctoral, toda la bibliografía se ha insertado a pie de página con el objetivo de facilitar la lectura del manuscrito.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9. Methodology

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9.1 Symbiosis between cyclopeptides and porphyrins in supramolecular receptors with catalytic potential.

General procedure for Sonogashira reaction: Aryl-halide (1 equiv.), aryl-alkyne (1.25 equiv.) and CuI (0.1 equiv.) were loaded on a sealed tube. Three argon efflux-vacuum of 10 minutes each were done. In the cases when the alkyne was in liquid state, it was added after those cycles. Separately, a mixture of freshly distilled THF (or DMF) and Et_3N (3:1) was degasified by argon bubbling during 10-40 minutes (depending on the total solvents volume). After incorporating the $Pd(PPh_3)Cl_2$ (0.1 equiv.) into the sealed tube, the mixture of solvent was added, and the tube was sealed. The reaction mixture was stirred under Ar at 50-70 ºC overnight. After removing the solvents, the crude mixture was redissolved in CH_2Cl_2 and washed with NH_4Cl aq. in order to remove copper in the solution. The aqueous phase turned then blue. In the cases when copper could not be removed with NH_4Cl aq., KCN aq. (12 mg/mL) was used. In these cases, both phases stirred during 2-4 hours. Both phases were separated and the organic one was dried with $MgSO_4$.

General procedure for Suzuki reaction: Aryl-halide (1 equiv.), aryl-boronic acid (1.25 equiv.) and anhydrous K_3PO_4 (3 equiv.) were loaded on a sealed tube and dissolved in dry and degassed DMF (0.1 to 0.05 M). Then, $Pd(PPh_3)_4$ (0.05 equiv.) was added and the mixture was stirred overnight at 100 ºC. The $Pd(PPh_3)_4$ was prepared *in situ*. For that, Pd(OAc) (0.05 equiv.) was dissolved in dry CH_2Cl_2, and after that, PPh_3 (0.2 equiv) was added. The mixture turned into an intense yellow color, indicative of $Pd(PPh_3)_4$ formation. After that time, the mixture was partitioned between water and AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried with $MgSO_4$.

General procedure for dipyrromethanes synthesis: The aldehyde (1 equiv.) and freshly distilled pyrrole (40 equiv.) were placed in a previously purged round bottom flask, and they were degasified for 15 min. Subsequently, TFA (0.1 equiv.) was added. Then, the colorless reaction mixture turned brown. After 1h stirring in the dark, the crude was diluted with toluene, washed with saturated $NaHCO_3$ aq. and dried with anhydrous $MgSO_4$. The product was purified by flash chromatography in SiO_2. When it was necessary, a second purification was carried out by crystallization from cyclohexane.

General procedure for TPP synthesis: In a two neck round bottom flask, the dipyrromethane (1.1 equiv.) and the aldehyde (1.0 equiv.) were dissolved in freshly distilled CH_2Cl_2 (0.01-0.05 M). The solution was degasified by argon bubbling during 45 minutes. After that, the acid catalyst (TFA or $BF_3{\cdot}O(Et)_2$, 3.3 mM) was added and the reaction was stirred during 1h and a half. After that, the oxidant (*p*-chloranil or DDQ, 1-2 equiv.) was added and again, the mixture was still stirred during another 1h and a half. The crude solution was filtered over an alumina pad in order to remove the black subproducts derivate from the pyrrole secondary reactions. The solvent was then removed under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography.

General procedure for UV-Vis titrations with D2: In order to prepare the samples for the titrations, we used a ≈ 5 mM concentration capsule stock solution in deacidified $CHCl_3$ that remains in the freezer. To perform the capsule-ligand titrations, we choose D2 = 250 nM. Notice that the porphyrin concentration is the double of that, cause each D2 molecule contains two porphyrins. Then, we took the appropriated volume of the stock solution (5 mM) necessary to

prepare 50 mL (in a volumetric flask) 250 mM R solution in deacidified $CHCl_3$. With that 250 mM solution of R, all the titration samples are subsequently prepared, each of them with a final volume of 1 mL. The experimental R concentration was measured directly by recording the absorbance intensity at 421 nm of the prepared solution. The previously obtained ε value was used for this purpose. That experimental concentration value was used finally to recalculate the exactly equivalents of Ln that each sample contains.

Regarding the ligand, 4 stock solutions were prepared. Depending on the ligand, it was calculated the mass is needed to weigh to prepare the most concentrated mother solution (of the 4 aforementioned). In 2 mL volumetric flask, that Ln amount was dissolved using as solvent the previously prepared capsule solution. This would be the most concentrated solution of ligand where there would be 5000 equivalents of Ln in 2 mL (2500 eq/mL).

From this solution, another one is prepared where there would be 1000 equivalents in 2 mL (500 eq/mL). From this, a third of 100 equivalents in 2 mL (50 eq/mL). Finally, a fourth solution of 8 equivalents in 2 mL (4 eq/mL). For some ligands that show less affinity, the most concentrated stock solution contains 10000 or 20000 equivalents, the protocol is the same, except that it is from this most concentrated solution that the 5000 equivalents (in 2 mL) solution is prepared. Once the stock ligand solutions are available, each of the samples to be measured is prepared in vials. This samples contain a "X" volume of the proper previously prepared ligand solution and a variable "Y" volume of the 250 nM capsule solution prepared at the beginning, until complete the final volume of 1 mL (Table 11). We prepared samples in the range 0.2-100 equivalents of L (being L a different ligand for each titration).

Sample	Stock solution 5000 equiv. of Ln	Stock solution 1000 equiv. of Ln	Stock solution 100 equiv. of Ln	Stock solution 8 equiv. of Ln
100 equiv.	400 uL	-	-	-
700 equiv.	280 uL	-	-	-
500 equiv.	200 uL	-	-	-
300 equiv.	120 uL	-	-	-
200 equiv.	-	400 uL	-	-
100 equiv.	-	200 uL	-	-
50 equiv.	-	100 uL	-	-
30 equiv.	-	60 uL	-	-
20 equiv.	-	-	400 uL	-
10 equiv.	-	-	200 uL	-
5 equiv.	-	-	100 uL	-
3 equiv.	-	-	60 uL	-
2 equiv.	-	-	-	500 uL
1 equiv.	-	-	-	250 uL
0.8 equiv.	-	-	-	200 uL
0.6 equiv.	-	-	-	150 uL
0.4 equiv.	-	-	-	100 uL
0.2 equiv.	-	-	-	50 uL

Table 11. Samples preparations for the UV-vis titration of **D2** with Ln. Each sample volume was completed up to 1 mL with the **D2** ≈ 250 uM solution.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

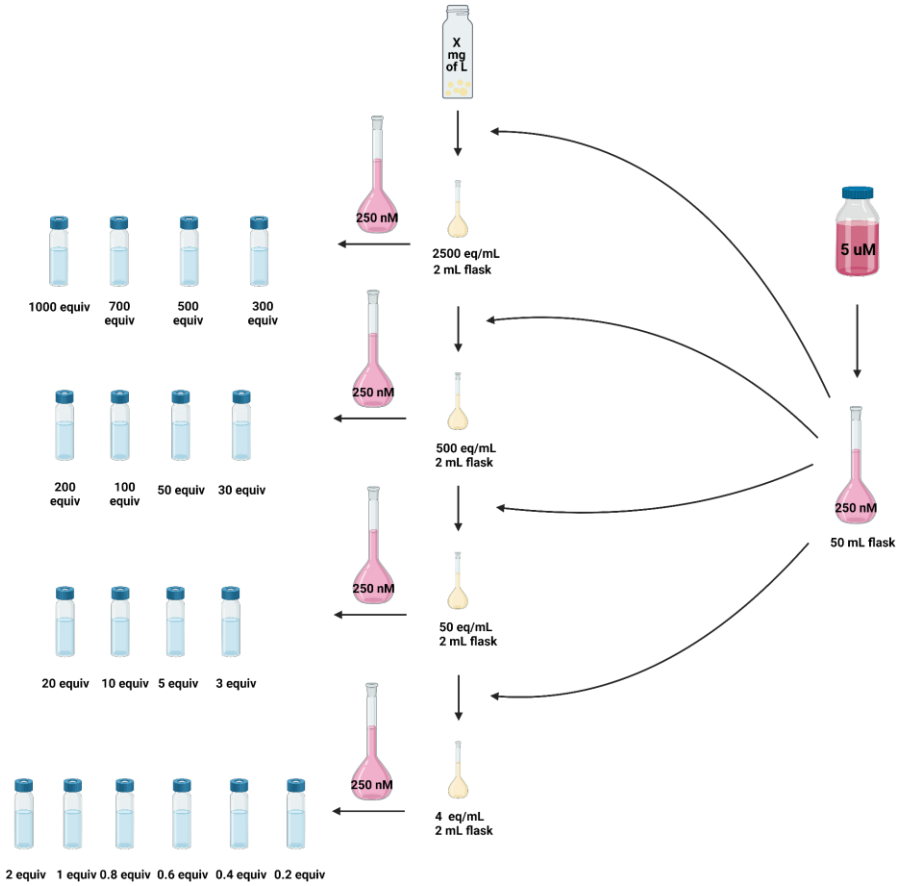


Figure 196. Representative scheme of the sample preparation for the UV-Vis titrations experiments.

General procedure for UV-Vis titrations with P1: The procedure was similar to the previously detailed for D2. However, extra Ln stock solutions were prepared more concentrated (> 5000 equiv.) due to the less affinity of **P1** for the different ligand. For this experiments [P1]≈ 500 nM.

DFT calculations: Computational studies were perform using the sources from Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA). All calculations were performed with the Gaussian 16 rev. Calculations were performed in vacuum. We carried out DFT geometry optimizations using B3LYP as functional with the low basis set 3-21G, in the cases when no ligand is inside **D2**. Moreover, 6-31G(d,p) was used as basis set for the SP calculations. For the calculations regarding the complexes **Ln⊂D2'**, the geometries of all complexes were optimized using the B3LYP hybrid functional together with the standard 3-21G(d) basis set for C, H, N, and O, and the LANL2DZ basis set for Zn. We also included GD3BJ as empirical dispersion.

Acp and Ach precursors enantiopurity determination: For the synthesis of the α,γ-CPs, two different γ-amino acids were used. By one side, the five-member ring containing aminoacid, Boc-*L*-γ-Acp-OH. Its precursor is the racemic mixture Boc-γ-Ace-OH. By other side, the Boc-*L*-γ-Ach-OH, whose precursor is the Boc-γ-Ach-OH. After applying the resolution protocol, with the quiral amine (R)-1-phenylethanamine (Figura 87), the enantiomeric excess of the substrates was checked by SCF HPLC using an isocratic method (95% supercritical CO_2 and 5% methanol) that allowed us to distinguish between both, *D* and *L*, enantiomers (Figure 197 and Figure 198).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

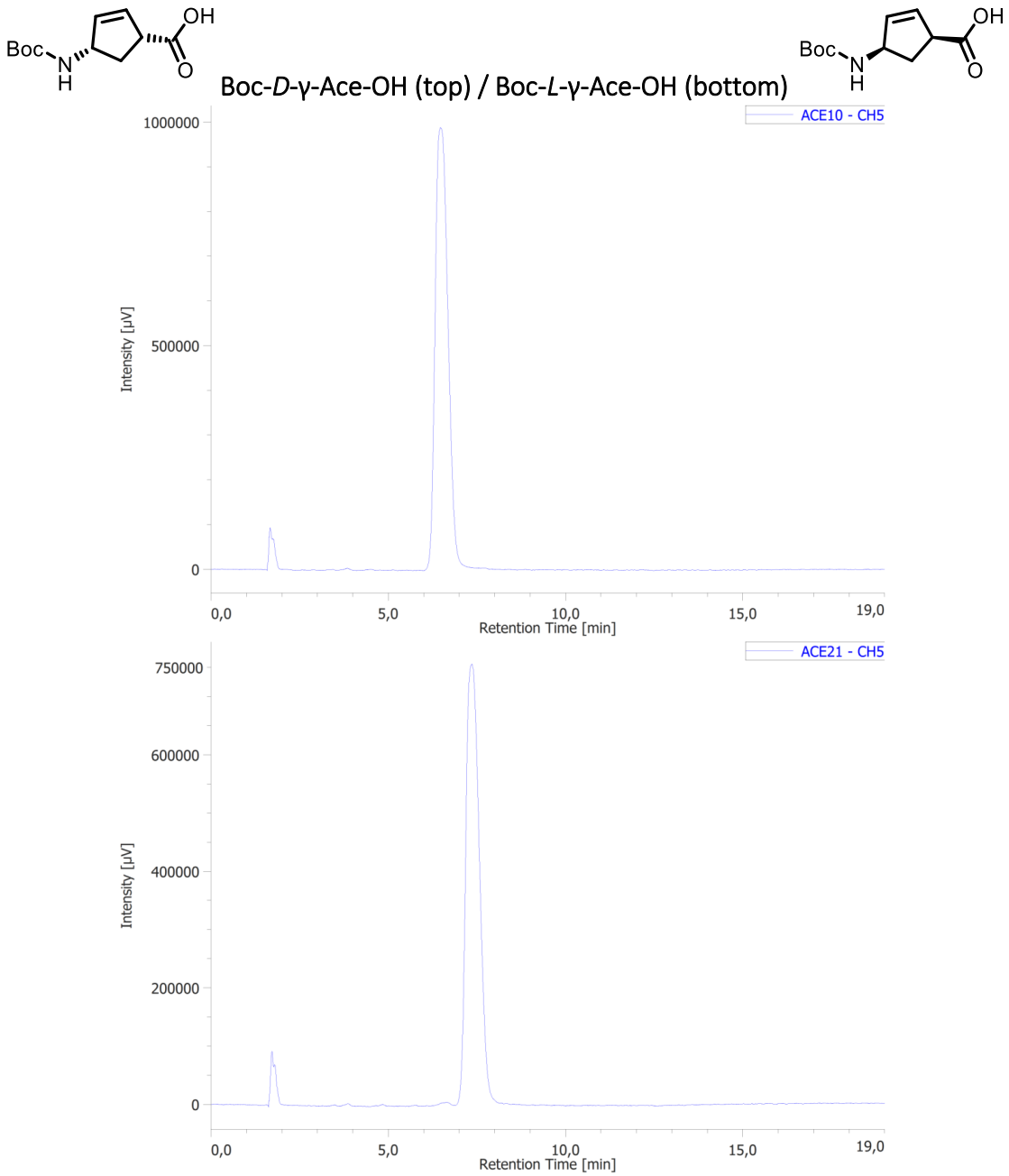


Figure 197. Chromatograms resulting from chiral SFC HPLC analysis of enantioenriched fractions of Boc-γ-Ace-OH. Top: enantiopure Boc-*D*-γ-Ace-OH sample (99% e.e.) Bottom: enantiopure Boc-*L*-γ-Ace-OH sample (99% e.e.).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

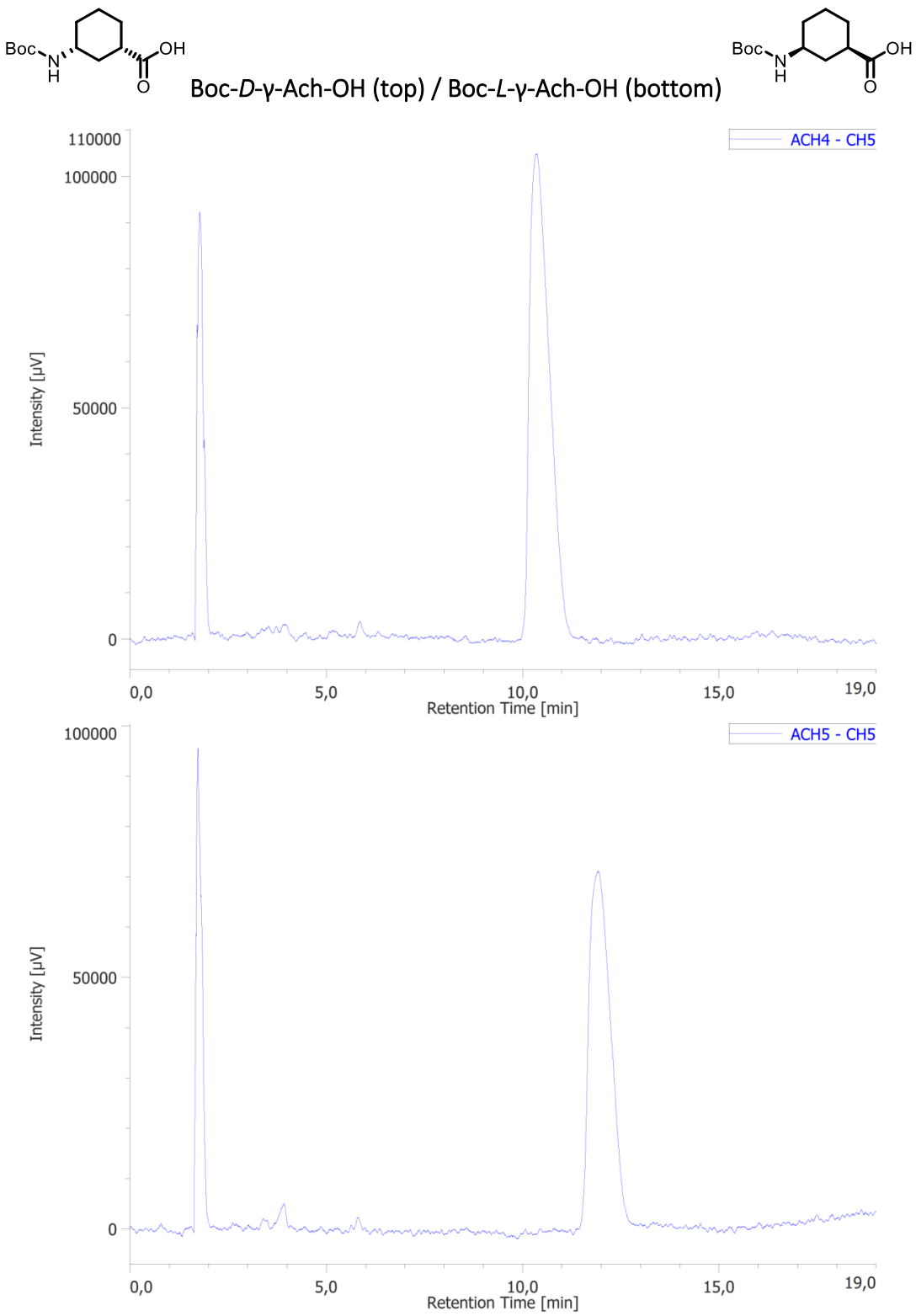


Figure 198. Chromatograms resulting from chiral SFC HPLC analysis of enantioenriched fractions of Boc-γ-Ach-OH. Top: enantiopure Boc-*D*-γ-Ach-OH sample (99% e.e.) Bottom: enantiopure Boc-*L*-γ-Ach-OH sample (99% e.e.).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9.2 Heterocycles in the molecular arms of an α,γ-cyclohexapeptide: synthesis and preliminary studies on its coordination and esterase activity.

AcPTS hydrolysis experiment inside POPC vesicles: The general protocol followed to prepare the vesicles in described in detail in the following methodology section (page 331). For this AcPTS hydrolysis experiment, the intravesicular buffer was: 10 mM HEPES, 10 mM NaCl, 5 mM AcPTS, adjusted to pH 7.5 with NaOH aq. In order to purify the vesicles suspension by Sefadex, we employed the same buffer conditions but without AcPTS. The extravesicular buffer that we used for recording the measurements was: 10 mM tricine, 145 mM NaCl, adjusted to pH 8.5. We prepared the sample in the fluoresce cuvete containing: 1950 µL of external buffer + 50 µL of vesicles suspension + 25 µL CP solution (in DMSO) + 25 µL $ZnCl_2$ solution (H_2O). In the cases when we premixed CP and Zn (in DMSO), we added 25 µL of that solution and 25 µL of water. The excited the sample at 415 nm and recorded the emission at 510 nm. At the minute 277, we added triton (10% v/v in H_2O) to promote the vesicles lysis. The measurement end after 5 hours of recording. We choose that long-time measurement in order to assess that the absence of changes was not due to a slow peptide internalization rate.

***p*-NPA hydrolysis experiment followed by ^{1}H NMR:** In order to carry out the ^{1}H NMR-monitored hydrolysis experiment, several procedures were followed. Firstly, the deuterated PBS buffer was prepared by dissolving 1.4 mg of NaH_2PO_4 and 4.4 mg of Na_2HPO_4 in 4 mL of D_2O. The pH of that solution was 7.4, so it did not need to be adjusted. Separately, 11.6 mg of **CP7b** were dissolved in MeOH-d_4 (1 mL), obtaining a 11.8 mM stock solution of the peptide. By other hand, 14.2 mg of $ZnCl_2$ were dissolved in 463 µL of MeOD-d_4, obtaining a 0.225 M stock solution. Lastly, 181 mg of *p*-NPA were dissolved in MeOD-d_4 (1 Ml) obtaining a 1M stock solution. Then, in an NMR tube, 191 µL of peptide stock solution, 146 µL of MeOD-d_4 and 112 µL of PBS deuterated buffer, were placed. The ^{1}H NMR of the started material was recorded. Then, 10 µL of the $ZnCl_2$ stock solution were added, and the ^{1}H NMR was recorded again. Finally, 15 µL of the *p*-NPA stock solution were added. The hydrolysis of the *p*-NPA was followed by recording the ^{1}H NMR through the time, and also observing the color changes. Moreover, a control experiment was done simultaneously by recording the ^{1}H NMR of another tube containing the same amount of $ZnCl_2$ and *p*-NPA stock solutions but not the peptide.

CP6e complexation studies followed by ^{1}H RMN: In order to study the possible formation of the complexes between **CP6e** and several MCl_2 salts (M= Co^{II}, Cu^{II}, Fe^{II} and Mn^{II}), several procedures were followed. Firstly, the NMR tube was filled with a 5 Mm solution of **CP6e** in CD_2Cl_2 (2.6 mg in 450 µL). Secondly, a MCl_2 stock solution was prepared by dissolving X mg in 0.5 mL of MeOH-d_3 (225 mM). Thirdly, a bipyridine stock solution was prepared by dissolving 11.25 mg in 0.5 mL of CD_2Cl_2 (150 mM). Fourthly, an acetylenedicarboxylic acid stock solution was prepared by dissolving 14.3 mg in 0.5 mM of MeOH-d_3 (250 mM). The ^{1}H NMR of the peptide was recorded firstly. The signals appeared defined and sharp. Then, 10 µL of the MCl_2 stock solution were added into the tube, and the spectra was recorded again. After that, 15 µL of the bipyridine stock solution were added, and the spectra was recorded again. A control experiment was done by checking the response of adding MCl_2 into a tube that just contained bipyridine. The day before, the addition of 10 µL of the acetylenedicarboxylic acid stock solution was done. From that samples, an aliquot was taken in order to perform mass spectrometry analysis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DFT calculations: Computational studies were perform using the sources from Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA). All calculations were performed with the Gaussian 16 rev. Calculations were performed in vacuum. We carried out DFT geometry optimizations of the complexes **CP·(Zn·H_2O)** by using the B3LYP hybrid functional together with the standard 6-31G(d,p) *basis set* for C, H, N, and O, and the LANL2DZ basis set for Zn. We also included GD3BJ as empirical dispersion.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9.3 Supramolecular capsules for anion recognition

General ^{1}H NMR titrations protocol: Stock solutions of CD_3CN in CD_2Cl_2 (10% v/v) containing as internal standard either dioxane (2.50 mM) or TMSS (0.15 mM) were prepared. These solutions were used to prepare all the samples needed in the titration experiments, in order to keep the concentration of the internal standard constant through the experiments. The signals from both standards, dioxane (s, 3.6 ppm in CD_2Cl_2) or TMSS (s, 0.18 ppm in CD_2Cl_2), were used as reference to estimate the concentration of all the components along the titration experiments. Generally, 450 µL of the solution containing the corresponding peptide peptide (**CP5, CP8**, **CP9**, **CP10**, **CP11** or **CP12**, ca. 5mM) was placed in the NMR tube. After recording the ^{1}H NMR spectra of the starting sample, successive additions of the corresponding titrant were made via micropipette and the corresponding spectrum was taken.

Titrations with TBA$^+$ salts: To carry out the experiments with the tetrabutylammonium (TBA) salts in a more reproducible manner, different stock solutions were prepared to carry all the additions. Commercial tetrabutylammonium salts (F^-, Cl^-, Br^-, I^-, NO_3^-, N_3^-, AcO^-, Br_3^- and PF_6^-) were used to prepare them. These stock solutions were prepared to adjust each of the additions to 10 µL, containing 0.2 equivalents (for the most dilute titrations), 0.5, 1.0, 3, 5 and even 10 equivalents for those experiments with the anions with lower affinity. During these titrations, samples were diluted around 12-15% that were corrected during the normalization process, using the internal standard (Dioxane or TMSS), to calculate the concentration of all the species through the titration (free dimer, complex and TBA$^+$ salts).

Titrations with previous heterodimer formation: For the experiments of heterodimers formation, only one stock solution of the titrated peptides (**CP10, CP11 or CP5**) was prepared employing the mixture of solvents that already contains the internal standard. This stock solution was more concentrated (60-90 mM), so that the heterodimeric species could be formed after only two additions of 10-20 µL each.

Titration with malononitrile and succinonitrile: The experiments with malononitrile (MN) and succinonitrile (SN) were carried out following a procedure similar to the anion additions. Several stock solutions of both nitriles were prepared, and upon analysis of the behavior of **D8** with the more diluted ones, we assessed the suitable stock solutions of nitriles to use. For both experiments TMSS was used as internal standard. CD_3CN was not used in these experiments to avoid competition with the titrated nitriles.

Titration of D8 with NaOAc/15-crown-5 ether: The experiment with NaOAc and the 15-crown-5-ether was performed in a slightly different way. The stock solution of the salt was prepared by dissolving the crown ether (550 µL, 1.1 equivalents with respect NaOAc) in of CD_3CN (440 µL). The CD_3CN was chosen as the best solvent (and non-competitive) to solubilize the mixture of crown ether and NaOAc. Subsequently, NaOAc (206 mg) was added, and the mixture stirred until a clear, colorless solution was obtained. Different additions of this solution were made on the NMR tube containing the CD_2Cl_2 solution of **D8** (≈5mM). Approximately, 10 µL of this solution contains 10 equivalents of acetate. However, some precipitation was observed during the additions, suggesting that not all the acetate was soluble in the final sample mixture reducing the amount of available acetate.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

General procedure for vesicles preparation: Vesicles were prepared, under argon, in a round bottom flask by slow evaporation of a solution of EYPC in $CHCl_3$ (25 mg/mL, 1 mL) to from a thin and homogeneous film on the flask surface. The film was dried overnight under high vacuum and then carefully hydrated with the intravesicular aqueous media. The resulting mixture was placed for 1 hour in the rotavapor at 180 r.p.m. and at atmospheric pressure. Every 15 minutes, the rotavapor rotation angle was changed (60°, 50°, 45° and 35°) in order to get and homogeneous dispersion. After that, the milky sample was subjected to 10 freeze-thaw cycles (N_2 (l) → 40 °C water), and the resulting suspension was extruded (25 times) across polycarbonate membrane (200 nm pore size). Finally, the suspension was passed through a size exclusion column (Sephadex G-25) previously equilibrated with the isosmotic extravesicular medium. The resulting vesicle suspension was taken up in a total volume of 5 mL, giving an approximate lipid concentration 6.6 mM. Size and particles number consistency between different vesicles batches were checked using DLS technique.

General procedure for transport measurement: In a plastic cuvette containing a 4 mm diameter stirring bar, the previously prepared vesicle suspensions (50 µL) were dispersed in the extravesicular media (1950 µL). The cuvette was placed with moderate stirring in the fluorometer equipped with a module that allows the successive additions of titrant during the measurement under moderate stirring. Data (fluorescence signal at 535 nm for lucigenin essays and 510 for HPTS) were collected for thirty minutes every second. One minute after the experiment started, aqueous solutions of NaCl (25 µL, 2 M, lucigenin assay) or NaOH (25 µL, 0.5 M, HPTS assay) were added. After an additional minute (minute 2 of the measurement), a solution of the CP at different concentrations (25 µL, in iPrOH for the lucigenin assay or in DMSO for the HPTS) were added. Finally, after 27 minutes an aqueous solution of Triton (50 µL, 10% v/v) was added to provoke the liposomes lyses. After three more minutes of stabilization, the resulting signal was used for the data normalization.

Lucigenin assay specifications: The liposomes were prepared following the procedure described in the methods section, at the amin manuscript. The intravesicular media contains lucigenin (1 mM) in an aqueous solution of $NaNO_3$ (200 mM). The vesicles were suspended in an aqueous solution of $NaNO_3$ (200 mM) that was used as extravesicular media. Regarding the measurement protocol, the vesicle suspension (50 µL) was added into a plastic cuvette containing of $NaNO_3$ (1.950 mL, 200 mM). After 60 s, NaCl is added (25 µL, 2 M) and then elapsed 60 more seconds until transporter aliquots (**CP8** or **CP11**) under study (*i*-PrOH solutions) was added and the change in lucigenin fluorescence was measured (λexc = 450 nm y λem = 535 nm). After 27 min, Triton-X 100 was added (50 µL, 10% solution in water) to lyse all the vesicles and normalize the fluorescence trace. Experiment ended after 30 min.

Lucigenin assay-cation variation: The preparation of vesicles for this assay is the same that for the normal lucigenin assay. The intra- and extravesicular media keep also constant. In this assay, we kept constant the CP concentration (75 µM) between measurements. The variations depend on the chloride salt added. Lucigenin quenching was measured through the addition of chloride salts (LiCl, NaCl, KCl and CsCl) in separated experiments. For each chloride salt, the measurements were repeated at least three times. All the concentrations of the stock solutions of the chloride salts (2 M) used these experiments were identical.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lucigenin assay-anion variation: The preparation of vesicle for this assay was similar to the previously described lucigenin assay. The intra- and extravesicular media was keep also

constant. In this assay, CP concentration (75 µM) was kept constant along measurements. The main difference was on the additions of sodium salts. Lucigenin quenching was measured through the addition of the salts (NaCl, NaBr and NaI) in separated experiments. All the measurements were repeated at least three times. All the concentrations of the stock solutions of the chloride salts (2 M) used these experiments were identical.

Lucigenin assay-sulfate variation: In this case, the protocol for the preparation of vesicle was similar to the previously described lucigenin assay but substituting the nitrate for sulfate in both extra- and intravesicular media (200 mM $NaSO_4$). The peptide concentration (50 µM) was kept constant along measurements. The rest of parameters were kept constant with respect to the procedure described above. The measurements were recorded three times, and the average was taken as result and it was compared to experiments carried out with the same peptide concentration but using $NaNO_3$.

Lucigenin assay-data treatment. The data was normalized using the following equation:

$$F_n = \frac{F_t - F_\infty}{F_0 - F_\infty} \quad (\mathbf{1})$$

Where F_n is the normalized fluorescence, F_t is the fluorescence at certain time, F_∞ is the fluorescence intensity after the total lysis of the liposomes (i.e., 30 min) and F_0 is the fluorescence value by the time of the addition of the compound under study (i.e., 127 s).

The resulting data was adjusted to the Hill equation:

$$Y = \frac{Y_0 + (Y_{max} - Y_0)}{\left[1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^n\right]} \quad (\mathbf{2})$$

Where Y is the transport % at 26 min of the experiment (Y_{26}), Y_0 is the minimum transport, promoted by the smallest peptide concentration, EC_{50} correspond to the concentration which promote the 50% of the maximum activity (Y_{max}). The Hill coefficient (n) is related with the stoichiometry or the cooperativity of the transport. Finally, c is the concentration of the transported for each Y_{26}.

HPTS assay specifications: For the preparation of vesicle for this assay, the general procedure described before was followed. The intravesicular buffer contains HPTS (1 mM) in an aqueous solution of HEPES (10 mM, pH 7.0) containing NaCl (100 mM). The same buffer solution conditions, i.e., HEPES (10 mM, pH 7), NaCl (100 mM), was used as extravesicular media, but adjusted to pH 7 with aqueous solutions of HCl or NaOH. Measurement protocol: 50 µL of the vesicle suspension were dispersed into a cuvette containing HEPES (1980 µL, 10 mM, pH 7.0), NaCl (100 mM). After 60 s, NaOH (25 µL, 0.5 M) was added and then elapsed 60 more seconds until transporter aliquots (DMSO solutions) were added and the change in HPTS fluorescence (basification) was measured (λ_{exc} = 450 nm and λ_{em} = 510 nm). After 27 min, Triton-X 100 was added (50 µL, 10% solution in water) to lyse all the vesicles and normalize the fluorescence traces. Experiment ended after 30 minutes.

HPTS in the presence of FCCP: The preparation of the vesicles for this assay was similar to the previously described HPTS assay. However, before the NaOH and CP additions, the FCCP

(25 µL, 132 µM in DMSO, 1 % mol with respect to the lipid concentration) proton transporter was added one minute after experiment started, then NaOH (25 µL, 0.5 M) was added after two minutes and later CP in DMSO after three minutes. Finally, Triton X-100 (50 µL, 10% solution in water) was added after 27 min. FCCP is an efficient proton transporter, therefore its presence allows to evaluate if proton transport is rate-limiting step. If the transporter activity clearly increases with the addition of FCCP it would mean that the transport mechanism is limited by the H^+ migration and, therefore, this is the rate-limiting step.

HPTS assay-competition variation: The preparation of the samples for this assay was the same that the previously described HPTS assay. The HEPES buffer (10 mM, 100 mM NaCl, pH 7.0) was used to elute the vesicles on the size exclusion chromatography. This vesicle suspension (50 µL) was dispersed on the extravesicular media (1950 µL, 10 mM HEPES at pH 7.0) containing different sodium salts (100 mM). In this case, no NaOH pulse was required. In this experiment, addition of a DMSO solution of CP (25 µL) was carried out after 2 min and the measurements were performed for at least 10 min. The signal input is generated by transport rates of Cl^- compared with the tested anion. Those anions that are transported more efficiently than chloride give rise to acidification of the intravesicular medium, that is, a decrease in the emission of HPTS. On the contrary, the anions that are transported with rates slower than chloride, give rise to the basification of the intravesicular medium and, therefore, an increase in emission is observed.

HPTS assay-data treatment: The data was normalized using the following equation:

$$F_n = \frac{F_t - F_0}{F_\infty - F_0} \quad (\mathbf{3})$$

Where F_n is the normalized fluorescence, F_t is the fluorescence at certain time, F_∞ is the fluorescence intensity after the total lysis of the liposomes (i.e., 30 min) and F_0 is the fluorescence value by the time of the addition of the compound under study (i.e., 127 s). In the experiments with FCCP, F_0 is the fluorescence value at 187 s, as the peptide was added 1 minute later than in other experiments.

The obtained data were adjusted to the Hill equation:

$$Y = \frac{Y_0 + (Y_{max} - Y_0)}{\left[1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^n\right]} \quad (\mathbf{2})$$

Where Y is the percentage of transport calculated after 26 min of experiment (Y_{26}), Y_0 is the transport promoted by the lowest concentration of peptide, EC_{50} corresponds to the calculated concentration that promotes 50% of the maximum activity (Y_{max}). The Hill coefficient (n) is related with the stoichiometry or the cooperativity of the transport. Finally, c is the concentration of the transported for each Y_{26}.

DLS measurements: For each vesicle batch prepared, some control measurements were performed before the transport experiments to check the homogeneity between batches. The size, polydispersity index and particle concentration were measured using the same volumes

than in the fluorescence assay. Four samples were checked for each essay. Regarding the lucigenin experiments, the first sample, containing only the vesicles dispersed in the extravesicular media (blue line), the second sample, which corresponds to the mixture after the addition of the aqueous solution of NaCl (green line), the third measurement was carried out after the incorporation of CP (pink line), and finally, the fourth sample was done after the addition of Triton X-100 (red line). The four samples were stirred for 25 minutes, which after resting for additional 5 min were recorded. For the HPTS assay in HEPES buffer (10 mM, NaCl 100 mM, pH 7), the analyzed mixtures correspond to the initial conditions (blue line), and after successive additions of NaOH (green line), cyclic peptide (pink line) and Triton (red line). Notice that the samples measurement indicates monodispersity, in view of the sharp slope of the correlation curves, which was maintained in all samples except after the addition of the surfactant, Triton X-100, when the vesicles undergo lysis. After lysis, the faster decay of the correlation coefficient is a signal of the smaller particle size. Also, the slope, less sharp, indicates higher polydispersity. We measured the particle concentration, which also indicated homogeneity between batches and confirmed the stability of the vesicles until the lysis.

DFT geometry optimizations: Computational studies were perform using the sources from Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA). All calculations were performed with the Gaussian 16 rev. The geometries used in the calculations were based on the crystal structures derived from this study. Calculations were performed in vacuum. We carried out DFT geometry optimizations using B3LYP with the moderate-size basis set 6-31G(d, p). The SP calculations were performed with B3LYP/6-31G+(d, p). We also included GD3BJ as empirical dispersion in all calculations. For the optimization of the specie $(3I^{-}{\cdot}5H2O)\subset D8$ B3LYP functional and DGTZVP basis set were used, since 6-31G(d,p) is uncompatible with the iodide atom. In the calculations with MO5-2X as fuctional, we used M05-2X/6-31G(d, p)// M05-2X/6-31G+(d, p) and did not included the GD3BJ cause this correction cannot be applied to M05-2X.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9.4 General Materials

All reagents and solvents were purchased from Iris Biotech, Fischer Scientific, Alfa Aesar, Sigma-Aldrich, TCI, Avanti Polar Lipids, GL Biochem. They were used without further purification unless otherwise stated. CH_2Cl_2 was distilled from CaH_2, immediately prior to their use. All solvents are HPLC or synthesis grade.

Analytical thin-layer chromatography was performed on E. Merck silica gel 60 F254 plates. In case of not been UV active (254/365 nm), the compounds were visualized by dipping the plates in appropriate revealing solutions, such as: ninhydrin (2% in EtOH), Ce/Mo (200 mg $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ + 9.6 g $(NH_4)_2MoO_4$ + 11.2 mL H_2SO_4 + 200 mL H_2O) or phosphomolybdic acid (3 g $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$ in 100 mL EtOH), followed by heating. Silica-gel flash chromatography was performed using E. Merck silica gel (type 60SDS, 230-400 mesh). Mixtures for chromatography are reported as v/v ratios of the solvents noted for each compound. HPLC purification was carried out on a JASCO LC-4000 using a semipreparative Phenomenex Luna 5µ Silica 100 Å column or on an Agilent preparative HPLC 1260 Infinity II with a Waters SunFire preparative 5µ Silica, 19 x 150 mm column. Boc-*L*-Ace-OH and Boc-*L*-Ach-OH enantiopurity was checked on an Agilent Super Fluid Chromatography (SFC) HPLC with a Lux® 5µ i-cellulose-5, 250 x 4.6 mm column. Size exclusion chromatography was carried out using Sephadex® G-25 as stationary phase in the cases when the mobile phase was H_2O, and LH-20 in the cases when the mobile phase was MeOH.

^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on AVIII 500 MHz, NEO 750 MHZ or Varian Mercury 300 MHz spectrometers. Chemical shifts (δ): are reported in parts per million (ppm), relative to the deuterated solvent in which the spectrum was recorded. 1H NMR splitting patterns are designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t) or quartet (q). All first-order splitting patterns were assigned based on the appearance of the multiplet. Non-easily interpreted signals are designated as multiplet (m) or broad (br). Carbon resonances were assigned using either Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) spectra obtained with phase angles of 135° or by Heteronuclear Single Quantum Coherence experiments (HSQC).The signals of the ^1H NMR spectra of the peptides were identified from the corresponding double-quantum-filled 2D: COSY, TOCSY and NOESY and/or ROESY spectra acquired at a concentration between 2 and 100 mM and at room temperature unless otherwise specified (mixing times for NOESY and/or ROESY are 350 ms). DOSY NMR experiments were performed at 298 K and without spinning the sample.

Electrospray (ESI) mass spectra were recorded on a Bruker BIOTOF II mass spectrometer and are reported as mass-per-charge ratio *m/z*. Accurate mass determination (HRMS) using ESI-MS were performed on a Sciex QSTAR Pulsar spectrometer. MALDI-TOF experiments were done using α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) or 2-[(2E)-3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile (DCTB) as matrix on a Bruker Autoflex apparatus.

FT-IR measurements were made on a JASCO FT/IR-400 spectrophotometer placing the sample on a CaF_2 pellet or on a Perkin Elmer Spectrum Two ATR-FTIR, directly depositing the sample as a thin film over its diamond plate (neat).

UV/vis measurements were collected on a Cary 100 Bio, using a Hellma analytics cuvette (10 x 4 mm, cm path) at 24 °C.

Fluorescence assays were performed on a FluoroMax-2 spectrofluorometer (Jobin-Yvon Spex) equipped with a stirrer and a temperature controller (all experiments were carried out at 25 °C).

Optical rotation ($[\alpha]_D^T$) measurements were carried out on a Jasco DIP-370 digital polarimeter. Sodium D line wavelength was utilized, and the solvent used was HPLC grade methanol in all cases.

DLS control vesicles measures were done in a MALVERN ZetaSizer ULTRA using plastic fluorescence cuvette (12.5 x 12.5 x 45 mm, 2.5 mL capacity).

LUV extrusion procedure was carried out utilizing a Mini-Extruder set purchased from Avanti Lipids, as well as filter supports and polycarbonate membranes of the choosen diameter (200 nm).

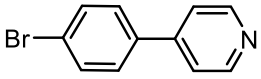
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10. Experimental Section

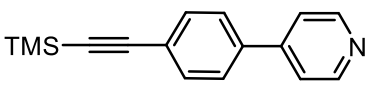
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10.1 Symbiosis between cyclopeptides and porphyrins in supramolecular receptors with catalytic potential.

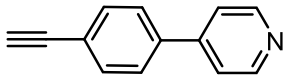
10.1.1 Synthesis and characterization



4-(4-bromophenyl)pyridine. 1-bromo-4-iodobenzene (500 mg, 1.76), 4-pyridyl-boronic acid (181 mg, 1.47 mmol) and K_3PO_4 (936 mg, 4.41 mmol) were placed into a sealed tube. Three argon flow- vacuum cycles of 10 minutes each were done. After that $Pd(PPh_3)_4$ (85 mg, 0.05 mmol) and dry DFM (15 mL) were added. The $Pd(PPh_3)_4$ was prepared *in situ*, as it is described in the Suzuki cross-coupling protocol, detailed in the methods section. The mixture stirred at 100 °C overnight. After removing the DMF under reduced pressure, the mixture was redissolved in CH_2Cl_2 (50 mL) and washed with H_2O (3x30 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure The product was obtained as a light-yellow solid [340 mg, 99%]. **^{1}H NMR** ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 8.64 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 202 (100), $[M+H]^+$.[613, 614]



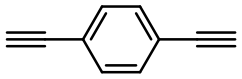
4-(4-((trimethylsilyl)ethynyl)phenyl)pyridine (L1). 4-(4-bromophenyl)pyridine (150 mg, 0.64 mmol), and CuI (12 mg, 0.06 mmol) were placed into a sealed tube. Three argon flow-vacuum cycles of 10 minutes each were done. Separately, dry TFH (4 mL) and freshly distilled Et_3N (2 mL) were degasified through argon bubbling during 10 minutes. The ethynyltrimethylsilane (0.3 mL, 1.92 mmol) and $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (44 mg, 0.06 mmol) was added into the tube. Then, the degasified solvent was added too. The mixture was allowed to react overnight. After that, the solvent was removed under reduced pressure and the solid was redissolved in CH_2Cl_2 and washed with NH_4Cl aq. (3x30 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The product was obtained as a white powder [144 mg, 90%]. **^{1}H NMR** ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 8.71 (br, 2H), 7.58 (s, 4H), 7.56 – 7.43 (m, 2H), 0.27 (s, 9H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 252 (100), $[M+H]^+$.[502]



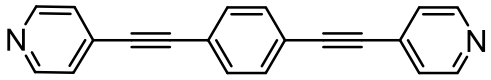
4-(4-ethynylphenyl)pyridine. L1 (200 mg, 0.8 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2/MeOH (1:1, 8 mL) and treated with KOH aq. (1M, 0.64 mL). After 3 hours, the solvent was removed under reduced pressure. The solid was redissolved in CH_2Cl_2 (20 mL) and washed with H_2O (3x20 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was obtained as a white-yellow solid [134 mg, 96%]. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 180 (100), $[M+H]^+$.[502]

[613] Wang, Y.; Frattarelli, D. L.; Facchetti, A.; Cariati, E.; Tordin, E.; Ugo, R.; Zuccaccia, C.; Macchioni, A.; Wegener, S. L.; Stern, C. L.; Ratner, M. A.; Marks, T. J. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 8005-8015.

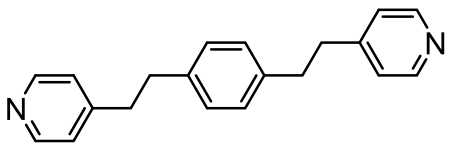
[614] Vermeulen, N. A.; Karagiaridi, O.; Sarjeant, A. A.; Stern, C. L.; Hupp, J. T.; Farha, O. K.; Stoddart, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14916-14919.



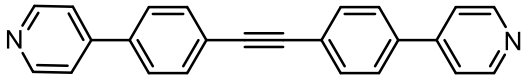
1,4-diethynylbenzene. A solution of the commercially available 1,4-bis((trimethylsilyl)ethynyl)benzene (300 mg, 1.1 mmol) in MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, 5 mL) was treated with KOH aq. (1 M, 0.9 mL) and the mixture stirred during 4 hours. After that, the solvent was removed under reduced pressure and the solid was redissolved in CH_2Cl_2 and washed with H_2O (3x10 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was obtained as a white powder [98 mg, 70%].[615]



1,4-bis(pyridin-4-ylethynyl)benzene (L5). 1,4-diethynylbenzene (98 mg, 0.78 mmol), 4-iodopyridine (396 mg, 1.94 mmol), CuI (15 mg, 0.078 mmol) were places into a sealed tube. Three argon flow- vacuum cycles of 10 minutes each were done. Separately, dry TFH (6 mL) and freshly distilled Et_3N (3 mL) were degasified through argon bubbling during 10 minutes. The $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (54 mg, 0.078 mmol) was added into the tube. Then, the degasified solvent was added too. The mixture was allowed to react overnight. After that, the solvent was removed under reduced pressure and the solid was redissolved in CH_2Cl_2 and washed with NH_4Cl aq. (3x30 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude was purified through chromatography column with SiO_2 (0-5% MeOH/CH_2Cl_2) to obtain the pure product as a light-yellow powder [161 mg, 74%]. **^{1}H NMR** ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 8.62 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H), 7.56 (s, 4H), 7.39 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 281 (100), $[M+H]^+$.[616]



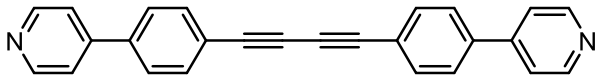
1,4-bis(pyridin-4-ylethynyl)benzene (L4). A solution of **L5** (70 mg, 0.25 mmol) in EtOH was treated with Pd/C (10% weight, 27 mg, 0.025 mmol). The mixture stirred under H_2 atmosphere overnight. The solution was filtered over celite and the mother liquors was concentrated under reduced pressure. The crude was purified through chromatography column with SiO_2 (0-5% MeOH/CH_2Cl_2) to obtain the pure product as a white-yellow powder [68 mg, 95%]. **^{1}H NMR** ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 8.46 (d, *J* = 6.4 Hz, 4H), 7.07 (d, *J* = 6.1 Hz, 4H), 7.04 (s, 4H), 2.90 (s, 8H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 289 (100), $[M+H]^+$.[617,618]



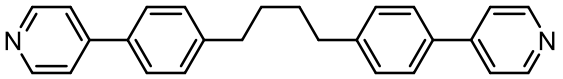
1,2-bis(4-(pyridin-4-yl)phenyl)ethyne (L6). 4-(4-bromophenyl)pyridine (55 mg, 0.25 mmol), 4-(4-ethynylphenyl)pyridine (35 mg, 0.19 mmol) and CuI (4 mg, 0.02 mmol) were placed into a

[615] Lowe, G.; Droz, A. S.; Vilaivan, T.; Weaver, G. W.; Park, J. J.; Pratt, J. M.; Tweedale, L.; Kelland, L. R. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3167-3174.
[616] Nguyen, P.; Yuan, Z.; Agocs, L.; Lesley, G.; Marder, T. B. *Inor. Chim Acta* **1994**, *220*, 289-296.
[617] Yam, V. W. W.; Lau, V. C. Y.; Wu, L. X. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 1461-1468.
[618] Massaro, A.; Mordini, A.; Mingardi, A.; Klein, J.; Andreotti, D. *European J. Org. Chem.* **2011**, *2*, 271-279.

sealed tube. Three argon flow- vacuum cycles of 10 minutes each were done. Separately, dry TFH (3 mL) and freshly distilled Et_3N (1 mL) were degasified through argon bubbling during 10 minutes. The $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (14 mg, 0.02 mmol) was added into the tube. Then, the degasified solvent was added too. The mixture was allowed to react overnight. After that, the solvent was removed under reduced pressure and the solid was redissolved in CH_2Cl_2 and washed with NH_4Cl aq. (3x30 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude was purified first through chromatography column with SiO_2 (0-5% MeOH/CH_2Cl_2), and after that, through HPLC (0-7% MeOH/ CH_2Cl_2) to obtain the pure product as a light-yellow powder [48 mg, 76%].[619] **^{1}H NMR** ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 8.67 (d, *J* = 5.3 Hz, 4H), 7.70-7.62 (m, 8H), 7.52 (m, 4H) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 333 (100), $[M+H]^+$.



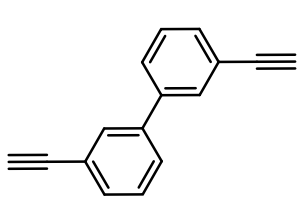
1,4-bis(4-(pyridin-4-yl)phenyl)buta-1,3-diyne (L8). A solution of 4-(4-ethynylphenyl)pyridine (121 mg, 0.68 mmol) in CH_2Cl_2 (23 mL) was treated with CuCl (913 mg, 6.8 mmol) and TMEDA (1 mL, 6.8 mmol). The addition of TMEDA turned the reaction color from light brown to blue/green. After 5 minutes, the reaction color changed to light blue. The reaction mixture stirred overnight. After that, the crude was washed with H_2O (3x30 mL) and the organic was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude was purified first through chromatography column with SiO_2 (0-5% MeOH/CH_2Cl_2), and after that, through HPLC (0-7% MeOH/ CH_2Cl_2) to obtain the pure product as a light-yellow powder [176 mg, 78%].[502] **^{1}H NMR** ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 8.69 (d, *J* = 5.7 Hz, 4H), 7.66 (AB, *J* = 8.8 Hz, 4H), 7.63 (AB, *J* = 8.8 Hz, 4H), 7.50 (m, 1H, d, *J* = 5.7 Hz, 4H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 357 (100), $[M+H]^+$.



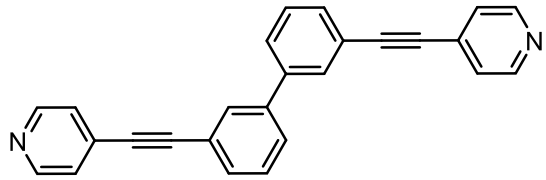
1,4-bis(4-(pyridin-4-yl)phenyl)butane (L7). A solution of **L8** (30 mg, 0.084 mmol) in EtOH (3 mL) was treated with Pd/C (10% weight, 8.9 mg, 0.0084 mmol). The mixture stirred under H_2 atmosphere overnight. The solution was filtered over celite and the mother liquors was concentrated under reduced pressure. The crude was purified through chromatography column with SiO_2 (0-5% MeOH/CH_2Cl_2) to obtain the pure product as a yellow powder [24 mg, 80%]. ($CDCl_3$, 300 MH) δ: 8.64 (br, 4H), 7.57 (d, *J* = 7.4 Hz, 4H), 7.49 (d, *J* = 5.5 Hz, 4H), 7.29 (d, *J* = 7.4 Hz, 4H), 2.72 (m, 4H), 1.73 ppm (m, 4H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 365 (100), $[M+H]^+$.[502]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

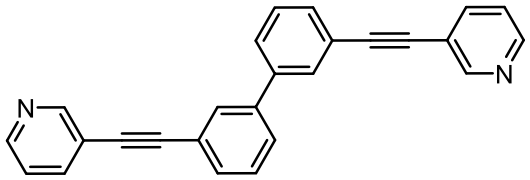
[619] Lovett, J. E.; Hoffmann, M.; Cnossen, A.; Shutter, A. T. J.; Hogben, H. J.; Warren, J. E.; Pascu, S. I.; Kay, C. W. M.; Timmel, C. R.; Anderson, H. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13852-13859.



3,3'-diethynyl-1,1'-biphenyl. [1,1'-biphenyl]-3,3'-dicarbaldehyde (100 mg, 0.48 mmol), was dissolved in MeOH (15 mL). Then, K_2CO_3 (265 mg, 1.98 mmol) and dimethyl (1-diazo-2-oxopropyl)phosphonate (172 µL, 1.15 mmol) were added. After 3h, the solvent was removed under reduced pressure. The crude was redissolved in dichloromethane and washed with brine (3x20 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The solid was purified by flash chromatography (0-15% CH_2Cl_2/Hexane) giving the pure product as a yellow solid [87 mg, 90%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.71 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.56 (dd, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 2H), 7.49 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 2H), 7.40 (td, *J* = 7.0, 6.3, 2.7 Hz, 2H), 3.11 (s, 2H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 202 (100), $[M+H]^+$.[507b]

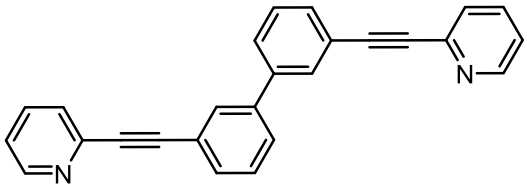


3,3'-bis(pyridin-4-ylethynyl)-1,1'-biphenyl (**L9**). 3,3'-diethynyl-1,1'-biphenyl (50 mg, 0.25 mmol), CuI (4.7 mg, 0.025 mmol), PPh_3 (32 mg, 0.123 mmol) and 4-iodopiridine (126 mg, 0.62 mmol) were placed into a dry and previously purged sealed tube equipped with a stirring bar. Several high vacuum-argon cycles of about ten minutes duration each one (5-6 cycles). Simultaneously, in a dry and purged round bottom flask, fresh distillated Et_3N (2 mL) and dry DMF (4 mL) were placed and degasified during 15 minutes. When the sealed tube cycles were done, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (17 mg, 0.024 mmol) were added, followed by the addition of the previously degasified mixture of solvents. Then, the tube was sealed and the mixture was allowed to react overnight at 60 °C. After cooling down, the solvents were removed under reduced pressure. Then, the crude was redissolved in dichloromethane and washed with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (3x30 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The solid was purified first by flash chromatography (0-10% MeOH/CH_2Cl_2) and after by preparative chromatography to give the desired product as a pale-yellow powder [58 mg, 58%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.66 (s, 4H), 7.83 (t, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.66 (ddd, *J* = 7.8, 1.9, 1.2 Hz, 2H), 7.60 (dt, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 2H), 7.51 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 5.3 Hz, 4H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 357 (100), $[M+H]^+$.[507b]

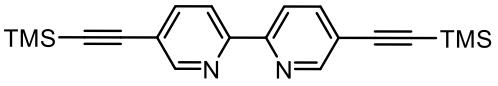


3,3'-bis(pyridin-3-ylethynyl)-1,1'-biphenyl (L10). 3,3'-diethynyl-1,1'-biphenyl (57 mg, 0.28 mmol), CuI (5.3 mg, 0.028 mmol), PPh_3 (32 mg, 0.123 mmol) and 3-iodopiridine (130 mg, 0.63 mmol) were placed into a dry and previously purged sealed tube equipped with a stirring bar. Several high vacuum-argon cycles of about ten minutes duration each one (5-6 cycles). Simultaneously, in a dry and purged round bottom flask, fresh distillated Et_3N (2 mL) and dry DMF (4 mL) were placed and degasified for 15 minutes. When the sealed tube cycles were done, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (17 mg, 0.038 mmol) were added, followed by the addition of the previously degasified mixture of solvents. Then, the tube was sealed, and the mixture was allowed to react overnight at 60 °C. After cooling down, the solvents were removed under reduced pressure. Then, the crude was redissolved in

dichloromethane and washed with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (3x30 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The solid was purified first by flash chromatography (0-10% MeOH/CH_2Cl_2) and after, by HPLC (0-10% MeOH/CH_2Cl_2) to give the desired product as a pale-yellow powder [28 mg, 28%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.80 (broad s, 2H), 8.57 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.56 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.38 – 7.30 (m, 2H).**MS (ESI)** [m/z (%)]: 357 (100), $[M+H]^+$.[507c]

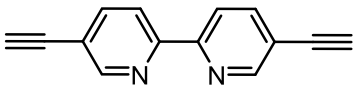


3,3'-bis(pyridin-2-ylethynyl)-1,1'-biphenyl (L11). 3,3'-diethynyl-1,1'-biphenyl (100 mg, 0.49 mmol), CuI (6 mg, 0.049 mmol), PPh_3 (64 mg, 0.247 mmol) and 2-iodopiridine (233 mg, 1.14 mmol) were placed into a dry and previously purged sealed tube equipped with a stirring bar. Several high vacuum-argon cycles of about ten minutes duration each one (5-6 cycles). Simultaneously, in a dry and purged round bottom flask, fresh distillated Et_3N (4.2 mL) and dry DMF (8.2 mL) were placed and degasified during 15 minutes. When the sealed tube cycles were done, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (34 mg, 0.049 mmol) were added, followed by the addition of the previously degasified mixture of solvents. Then, the tube was sealed and the mixture was allowed to react overnight at 60 °C. After cooling down, the solvents were removed under reduced pressure. Then, the crude was redissolved in dichloromethane and washed with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (3x30 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The solid was purified first by flash chromatography (0-10% MeOH/CH_2Cl_2) to give the desired product as a pale-yellow powder [133 mg, 60%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.64 (ddd, *J* = 4.9, 1.8, 0.9 Hz, 2H), 7.87 (td, *J* = 1.8, 0.6 Hz, 2H), 7.71 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 2H), 7.63 – 7.61 (m, 2H), 7.60 (dd, *J* = 1.8, 0.8 Hz, 2H), 7.57 (dt, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 2H), 7.50 – 7.42 (m, 2H), 7.29 – 7.23 (m, 2H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 357 (100), $[M+H]^+$.

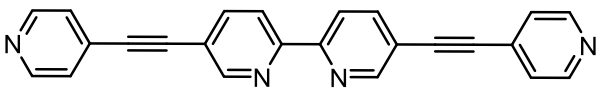


5,5'-bis((trimethylsilyl)ethynyl)-2,2'-bipyridine. 5,5'-dibromo-2,2'-bipyridine (100 mg, 0.318 mmol) and CuI (10 mg, 0.053 mmol) were placed into a dry and previously purged sealed tube equipped with a stirring bar. Several high vacuum-argon cycles of about ten minutes duration each one (5-6 cycles). Simultaneously, in a dry and purged round bottom flask, fresh distillated Et_3N (2.5 mL) and dry THF (6.6 mL) were placed and degasified during 15 minutes. When the sealed tube cycles were done, ethynyltrimethylsilane (140 µL, 0.96 mmol) and $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (22 mg, 0.031 mmol) were added, followed by the addition of the previously degasified mixture of solvents. Then, the tube was sealed and the mixture was allowed to react overnight at 60 °C. After cooling down, the solvents were removed under reduced pressure. Then, the crude was redissolved in dichloromethane and allowed to stir during 3h with a saturated aqueous solution of NH_4Cl. The aqueous phase turned in blue, sign of the copper removal. The two phases were separated in a funnel and the organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The solid was purified by flash chromatography (50-85% CH_2Cl_2/Hexane) to give the desired product as a white powder

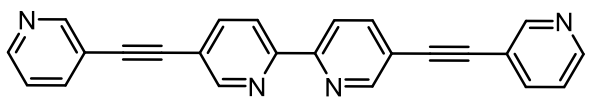
[96 mg, 86%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.72 (s, 2H), 8.37 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.86 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 2H), 0.28 (s, 18H).**MS (ESI)** [m/z (%)]: 349 (100), $[M+H]^+$.[620]



5,5'-diethynyl-2,2'-bipyridine. 5,5'-bis((trimethylsilyl)ethynyl)-2,2'-bipyridine (65 mg, 0.19 mmol) was dissolved in TFH (2 mL). When the solution was homogeneous, MeOH was added (2 mL). Then, K_2CO_3 was added (33 mg, 0.24 mmol) and the reaction was stirred overnight. After that, the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude was redissolved in dichloromethane and washed with a saturated aqueous solution of NaCl. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The product was obtained as a pale brown powder [38 mg, 99%] that was used in the following step without further purification. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.76 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 2H), 8.38 (dd, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 2H), 7.89 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 2H), 3.31 (s, 2H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 205 (100), $[M+H]^+$.[508]



5,5'-bis(pyridin-4-ylethynyl)-2,2'-bipyridine (L12). 5,5'-diethynyl-2,2'-bipyridine (50 mg, 0.25 mmol), CuI (3 mg, 0.025 mmol), PPh_3 (32 mg, 0.125 mmol) and 4-iodopiridine (115 mg, 0.56 mmol) were placed into a dry and previously purged sealed tube equipped with a stirring bar. Several high vacuum-argon cycles of about ten minutes duration each one (5-6 cycles). Simultaneously, in a dry and purged round bottom flask, fresh distillated Et_3N (2 mL) and dry DMF (4 mL) were placed and degasified during 15 minutes. When the sealed tube cycles were done, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (17 mg, 0.025 mmol) were added, followed by the addition of the previously degasified mixture of solvents. Then, the tube was sealed and the mixture was allowed to react overnight at 60 °C. After cooling down, the solvents were removed under reduced pressure. Then, the crude was redissolved in dichloromethane and allowed to stir overnight with an aqueous solution of KCN (12 mg/mL). After that, the two phases were separated in a funnel and the organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The solid was purified by flash chromatography (0-10% MeOH/CH_2Cl_2) to give the desired product as a pale-yellow powder [35 mg, 40%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.84 (dd, *J* = 2.1, 0.9 Hz, 2H), 8.68 – 8.64 (m, 4H), 8.49 (dd, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 2H), 7.98 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 2H), 7.50 – 7.38 (m, 4H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 359 (100), $[M+H]^+$.[508]

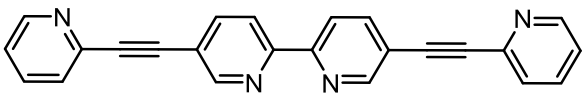


5,5'-bis(pyridin-3-ylethynyl)-2,2'-bipyridine (L13). 5,5'-diethynyl-2,2'-bipyridine (80 mg, 0.392 mmol), CuI (8 mg, 0.0392 mmol), PPh_3 (51.4 mg, 0.196 mmol) and 3-iodopiridine (176 mg, 0.862 mmol) were placed into a dry and previously purged sealed tube equipped with a stirring bar. Several high vacuum-argon cycles of about ten minutes duration each one (5-6 cycles). Simultaneously, in a dry and purged round

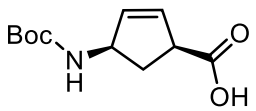
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[620] Grosshenny, V.; Romero, F. M.; Ziessel, R. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1491-1500.

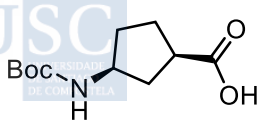
bottom flask, fresh distillated Et_3N (3.3 mL) and dry THF (6.5 mL) were placed and degasified during 15 minutes. When the sealed tube cycles were done, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (30 mg, 0.0392 mmol) were added, followed by the addition of the previously degasified mixture of solvents. Then, the tube was sealed and the mixture was allowed to react during 4h at 60 °C. After cooling down, the solvents were removed under reduced pressure. Then, the crude was redissolved in dichloromethane and allowed to stir overnight with an aqueous solution of KCN (12 mg/mL). After that, the two phases were separated in a funnel and the organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The solid was purified first by flash chromatography (0-10% $MeOH/CH_2Cl_2$) to give the desired product as a pale-yellow powder [70 mg, 50%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.88 – 8.72 (m, 4H, Ha + Hd), 8.66 – 8.54 (m, 2H, Hg), 8.48 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Hc), 7.97 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 2H, Hb), 7.87 (dt, *J* = 7.9, 1.8 Hz, 2H, He), 7.34 (dd, *J* = 7.9, 4.8 Hz, 2H, Hf). **^{13}C-NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 154.62, 152.35, 151.93, 149.14, 139.67, 138.84, 123.36, 120.91, 120.02, 90.44, 89.78. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 359 (100), $[M+H]^+$.



5,5'-bis(pyridin-2-ylethynyl)-2,2'-bipyridine (L14). 5,5'-diethynyl-2,2'-bipyridine (80 mg, 0.392 mmol), CuI (8 mg, 0.039 mmol), PPh_3 (51.4 mg, 0.196 mmol) and 3-iodopiridine (176 mg, 0.862 mmol) were placed into a dry and previously purged sealed tube equipped with a stirring bar. Several high vacuum-argon cycles of about ten minutes duration each one (5-6 cycles). Simultaneously, in a dry and purged round bottom flask, fresh distillated Et_3N (3.3 mL) and dry DMF (6.5 mL) were placed and degasified during 15 minutes. When the sealed tube cycles were done, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (30 mg, 0.0392 mmol) were added, followed by the addition of the previously degasified mixture of solvents. Then, the tube was sealed and the mixture was allowed to react overnight at 60 °C. After cooling down, the solvents were removed under reduced pressure. Then, the crude was redissolved in dichloromethane and allowed to stir overnight with an aqueous solution of KCN (12 mg/mL). After that, the two phases were separated in a funnel and the organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The solid was purified by flash chromatography (0-10% $MeOH/CH_2Cl_2$) to give the desired product as a pale-yellow powder [100 mg, 71%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.92 – 8.87 (m, 2H, Ha), 8.66 (ddd, *J* = 4.8, 1.9, 1.0 Hz, 2H, Hg), 8.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Hc), 8.02 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 2H, Hb), 7.74 (td, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 2H, He), 7.59 (dt, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 2H, Hd), 7.30 (ddd, *J* = 7.7, 4.9, 1.2 Hz, 2H, Hf). **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 154.77, 152.28, 150.25, 142.82, 140.07, 136.65, 127.57, 123.47, 120.93, 119.77, 92.73, 86.44. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 359 (100), $[M+H]^+$.

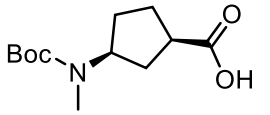


Boc-*L*-γ-Ace-OH. This γ-amino acid was obtained following the route developed in our research group using Vince's Lactam as commercial source.[489a]

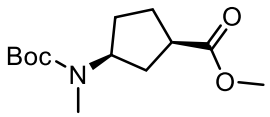


Boc-*L*-γ-Acp-OH (1). A solution of **Boc-*L*-γ-Ace-OH** (2.8 g, 12 mmol) in EtOH (60 mL) was treated with Pd/C (10% mol, 1.2 mmol, 1.3 g) and stirred overnight under hydrogen atmosphere (ballon pressure). After

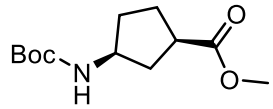
that, the mixture was filtered over celite and the mother liquors were concentrated under reduced pressure, affording the compound **1** as a white solid, that was used in the following step without further purification [2.77 g, 98%]. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 230 (100), $[M+H]^+$.[489a]



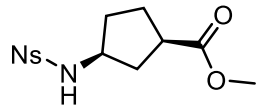
Boc-^{Me}*N*-*L*-γ-Acp-OH (2). An ice-water bath-cooled solution of Boc-*L*-γ-Acp-OH (**1**) (1.53 g, 5.72 mmol) in dry THF (28 mL) was treated with NaH (60%, 0.687 g, 17 .2 mmol) and the mixture was stirred for 30 min. After that, MeI (1.1 mL, 17.18 mmol) was added dropwise. After stirring for 24 h, the mixture was cooled down and H_2O (10 mL) was added, and the THF was evaporated under vacuo. The aqueous solution was washed with Et_2O (3x10 mL), and then, the pH was adjusted to 3 with HCl aq. (5%). The product was extracted with CH_2Cl_2 (4x10 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The product **2** was obtained as a yellow solid [1.1 g, 70%] and used in the following step without further purification. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 244 (100), $[M+H]^+$.[489a]



Boc-^{Me}*N*-*L*-γ-Acp-OMe (3). A solution of compound **2** (2.1 g, 8.65 mmol) in dry DMF (32 mL) was treated with Na_2CO_3 (1.83 g, 17.31 mmol) and the MeI was added dropwise (2.15 mL, 34.61 mmol). The resulting solution stirred for 3h under an argon atmosphere. After that time, AcOEt (30 mL) and H_2O (30 mL) were added. The organic layer was washed with H_2O (2x25 mL) $NaHCO_3$ (sat, 3x30 mL), and NaCl (sat, 3x30). Then, it was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated to afford the compound **3** as a transparent oil [1.64 g, 74%]. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 258 (100), $[M+H]^+$.[500]

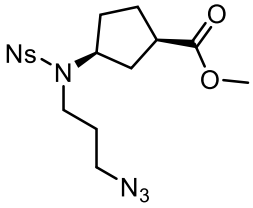


Boc-*N*-*L*-γ-Acp-OMe (4). The compound **1** (2.7 g, 11.8 mmol) was dissolved in dry DMF (50 mL) and treated with Na_2CO_3 (2.5 g, 23.5 mmol). Subsequently, MeI (3 mL, 47.2) was added dropwise. The resulting solution stirred for 3 h under an argon atmosphere. After that time, AcOEt (30 mL) and H_2O (30 mL) were added. The organic layer was washed with H_2O (2x25 mL) $NaHCO_3$ (sat, 3x30 mL), and NaCl (sat, 3x30). Then, it was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated to afford the compound **4** as a pale-yellow oil [2.8 g, 98%], that was used in the following step without further purification. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 244 (100), $[M+H]^+$.[500]

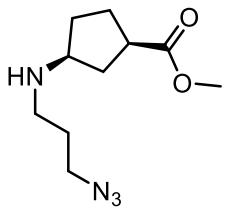


Ns-*N*-*L*-γ-Acp-OMe (5). A solution of compound **4** (2.8 g, 11.5 mmol) in CH_2Cl_2 (46 mL) was treated with TFA (12 mL). After stirring for 15 minutes, the solution was concentrated in a rotary evaporator and then under high vacuum for 4 h. The resulting solid was redissolved in dry CH_2Cl_2 (38 mL) and DIEA (7.7 mL, 46.3 mmol) was added, followed by 2-nitrobenzenesulfonyl chloride (2.76 g, 12.7 mmol). The mixture stirred for 24 h under an argon atmosphere. Then, it was washed with HCl aq. (5%, 2x50 mL) and $NaHCO_3$ (sat., 2x50 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated in vacuo. After purification by column chromatography (15-50% AcOEt/Hexane),

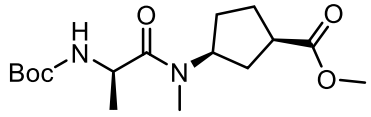
the compound **5** was obtained as a yellow solid. [3.58 g, 94%]. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 329 (100), $[M+H]^+$.[500]



Ns-*propilazide*N-*L*-γ-Acp-OMe (6). A solution of the compound **5** (0.374 g, 1.06 mmol) in dry DMF (5.3 mL) was treated with K_2CO_3 (1.18 g, 8.62 mmol) and 3 -azidopropyl-1-p-toluenesulfonate (1.85 g, 7.24 mmol). The mixture stirred for 24 hours under argon. Then, the DMF was evaporated under high vacuum, using toluene in order obtain an azeotropic mixture that facilitates the DMF removal. The resulting residue was redissolved in CH_2Cl_2, washed with H_2O (3x30 mL) and aqueous NaCl solution (sat. 3x30 mL), and then dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography (10-50% AcOEt/Hexane) to afford the desired pure product **6**. [0.401g, 94%]. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 412 (100), $[M+H]^+$.[500]

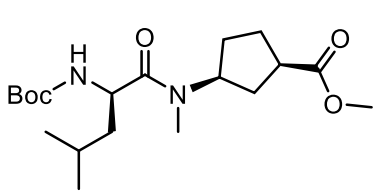


***propylazide*N-*L*-γ-Acp-OMe (7).** A solution of compound **6** (0.460, g, 1.12 mmol) in ACN (8.7 mL) was treated with K_2CO_3 (0.770 g, 5.56 mmol) and PhSH (0.46 mL, 4.48 mmol). The mixture stirred for 3 h. After that, H_2O (20 mL) was added and the ACN was evaporated under high vacuum. Then, CH_2Cl_2 was added to the obtained suspension, and it was washed with H_2O (2x25 mL) and NaCl aq. (sat., 2x25 mL). After drying the resulting solution with anhydrous $MgSO_4$, filtering and concentrating, the purification of the residue was carried out by column chromatography (0-10% MeOH/CH_2Cl_2) to obtain the product **7** as a white solid. [0.217g, 92%]. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 227 (100), $[M+H]^+$.[500]

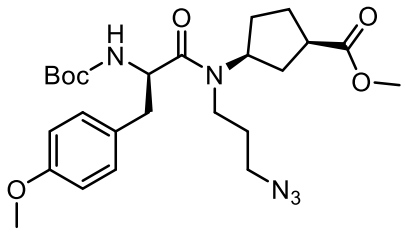


Boc-*D*-Ala-*Me*N-*L*-γ-Acp-OMe. (8). Compound **3** (1.0 g, 3.89 mmol) was dissolved in a 1:1 mixture of CH_2Cl_2 and TFA (24 mL). The solution stirred for 15 min and then it was concentrated on the rotary evaporator, diluted in CH_2Cl_2 and concentrated again (3x), with additional drying under high vacuum for 3 h. The resulting residue was redissolved in dry CH_2Cl_2 (40 mL) and treated with DIEA (6.32 mL, 37.9 mmol), Boc-*D*-Ala-OH (0.809 mg, 4.48 mmol) and *N*-HATU (2.1 g, 5.45 mmol). The resulting solution was stirred for 2 h under Ar atmosphere and then washed with aqueous solutions of HCl (5%, 2x30 mL) and $NaHCO_3$ (sat., 2x30 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (20-40% AcOEt/hexane) to give the desired dipeptide **8** as a white foam [1.137 g, 90%] **^{1}H NMR** ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 5.61 (dd, *J* = 16.0, 8.1 Hz, 1H, NH), 4.97 (p, *J* = 8.9 Hz, 1H, $H\gamma_{Acp}$), 4.63 (dq, *J* = 28.8, 7.1 Hz, 1H, $H\alpha_{Ala}$), 4.30 (q, *J* = 8.7 Hz, 1H, $H\alpha_{Acp}$), 3.70 (s, 3H, OMe), 2.91 (2s, 3H, N-CH_3 Acp), 2.23 – 1.55 (m, 6H, Acp), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.30 (dd, *J* = 7.1, 3.0 Hz, 3H, CH_3 Ala). **^{13}C NMR** ($CDCl_3$, 75 MHz) δ: 176.4 and 175.8 (C), 173.3 and 172.6 (C), 155.1 (C), 79.5 (C), 57.4 (CH), 54.2 (CH2), 51.99 and 51.98 (CH), 46.9 and 46.4 (CH3), 41.4 and 41.4 (CH), 32.3 and 31.2 (CH3), 28.4 (CH3), 28.2 and 27.7 (CH2), 27.5 and 27.2 (CH2) 20.0 and 18.9 (CH3). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{16}H_{28}N_2O_5$ 328.2056, found: 328.2066.

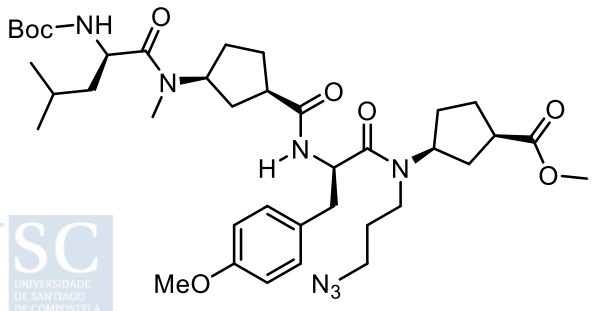
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Boc-*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Acp-OMe (9). The compound **3** (1.58 g, 6.15 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (43 mL) and treated with TFA (19 mL). The solution stirred for 15 min and then the TFA was removed under pressure. The residue obtained was dissolved in dry CH_2Cl_2 (61.5 mL) and treated with DIEA (6.32 mL, 37.9 mmol), Boc-*D*-Leu-OH (1.655 6.64 mmol) and *N*-HATU (2.8 g, 7.38 mmol). The resulting solution stirred for 3 h at room temperature under argon atmosphere. After that time, it was washed with HCl aq. (5%, 3x40 mL) and $NaHCO_3$ aq. (sat., 3x30 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered, and concentrated. Finally, purification was carried out by column chromatography on silica gel (20-40% AcOEt/Hexane), obtaining the compound **9** as a white foam. [0.794g, 75%]. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 371 (100), $[M+H]^+$.[500]



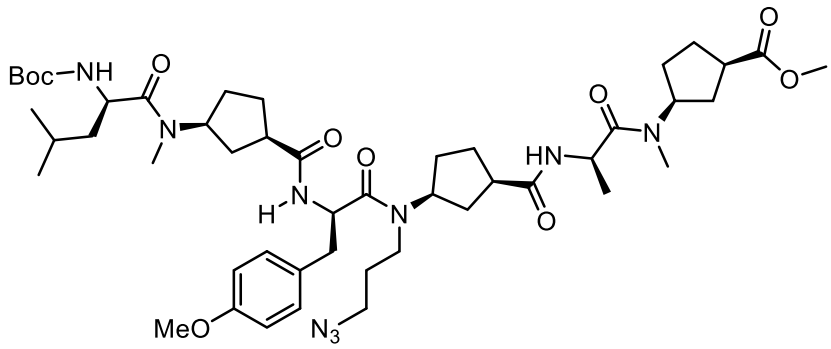
Boc-*D*-Tyrosine(OMe)-^{propylazide}*N*-*L*-γ-Acp-OMe. (10) A solution of **7** (0.217 g, 0.95 mmol) in dry CH_2Cl_2 (9.5 mL) was treated with DIEA (0.32 mL, 1.9 mmol). In another round bottom flask, Boc-*D*-Tyrosine(OMe)-OH (0.308 g, 1.05 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (10.5 mL) and then successively treated with *N*-HATU (0.543 g, 1.43 mmol) and DIEA (0.24 mL, 2.47 mmol). Then both solutions were combined and stirred during 4 h under Ar atmosphere. After this time, the mixture was washed with saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (3x20 mL) and aqueous HCl (5%, 3x20 mL). The resulting organic phase was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (15-20% AcOEt/hexane) to afford mentioned product **10** as a transparent oil [0.403 g, 84%] **^{1}H NMR** ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 7.13 – 6.96 (m, 2H, Tyr), 6.85 – 6.72 (m, 2H, Tyr), 5.43 and 5.22 (m, 1H, NH), 4.81 (q, *J* = 7.8 Hz, 0.5 H, $H\alpha_{Tyr}$), 4.61 (q, *J* = 8.4 Hz, 0.5 H, $H\alpha_{Tyr}$), 3.90 (m, 1H, $H\gamma_{Acp}$), 3.76 (s, 3H, OMe(Tyr)), 3.66 (s, 3H, OMe), 3.36 and 3.04 (m and tt, *J* = 10.1, 5.1 Hz, 2H, N-**CH_2**-Tyr), 3.26 (m, 2H, N-**CH_2**-CH_2-CH_2-N_3), 2.90 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, N-CH_2-**CH_2**-CH_2-N_3), 2.76 and 2.55 (m and q, *J* = 8.0 Hz, 1H, $H\alpha_{Acp}$), 2.04 (m, 1H, Acp), 1.94 -1.47 (m, 8H, 2H N-CH_2-CH_2-**CH_2**-N_3 and 6H Acp), 1.40 (s, 9H, Boc), 1.23 (m, 1H, Acp). **^{13}C NMR** ($CDCl_3$, 76 MHz) δ :176.2 and 175.9 (C), 172.6 and 171.8 (C), 158.8 (C), 155.1 (C), 130.6 (CH), 128.5 (C), 113.9 (CH), 79.8 (C), 58.2 (CH), 55.4 (CH), 52.6 and 52.1 (CH3), 52.0 and 51.6 (CH3), 49.6 and 48.9 (CH2), 41.2, and 40.9 (CH), 40.8 and 39.8 (CH2), 39.6 and 39.6 (CH2), 32.7 and 32.3 (CH2), 28.8 and 27.9 (CH2), 28.4 (CH3), 26.9 and 26.6 (CH2). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{25}H_{37}N_5O_6$: 503.2762, found 503.2.



Boc-*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Acp-*D*-Tyrosine (OMe)-^{propylazide}*N*-*L*-γ-Acp-OMe (11) Previously obtained dipeptide **9** (0.290 g, 0.81 mmol) was dissolved in a MeOH/H2O mixture (3:1, 12 mL) and then LiOH (0.098 g, 4.12 mmol) was added. After stirring for 3 h, MeOH was evaporated under reduced pressure and the aqueous phase was acidified with aqueous HCl (5%) to pH 2. Then, it was extracted with CH_2Cl_2 (4x15 mL), dried over anhydrous. $MgSO_4$,

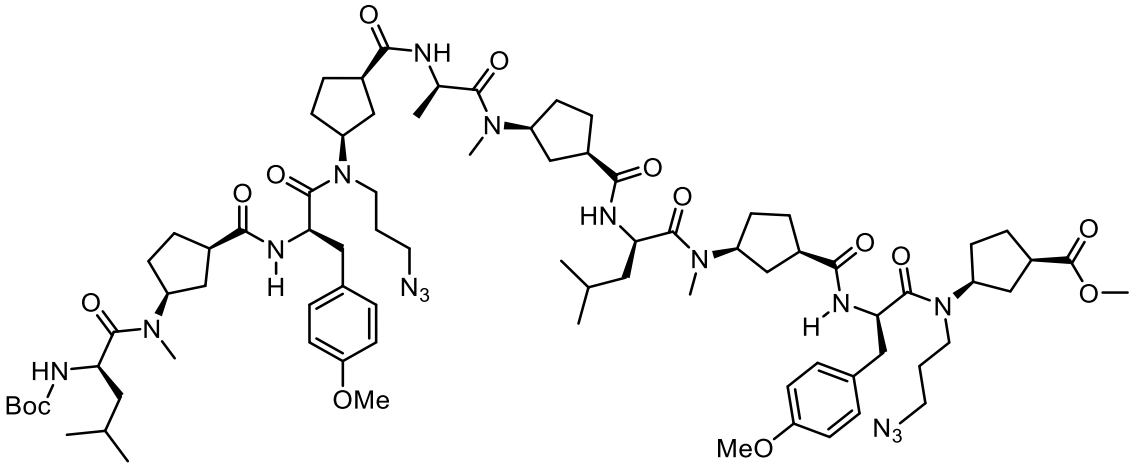
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

filtered and concentrated to yield a white foam. Separately, the dipeptide **10** (0.282 g, 0.56 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (2.8 mL) and treated with TFA (2.8 mL). After stirring for 15 min the mixture was concentrated in the rotary evaporator, diluted in CH_2Cl_2 and concentrated for 3 times and finally dried under high vacuum for 3 h. After this time, the residue was dissolved in dry CH_2Cl_2 (2.8 mL) and DIEA (0.38 mL, 2.45 mmol) was added. Subsequently, the *C*-deprotected aminoacid was dissolved again in dry CH_2Cl_2 (2.8 mL) and subsequently treated with DIEA (0.26 mL, 1.6 mmol), and *N*-HBTU (0.455 g, 1.2 mmol). Finally, both deprotected dipeptides were combined and stirred for 3 h under Ar atmosphere. The resulting solution was washed saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (3x20 mL) and aqueous HCl (5%, 3x20 mL). Then the organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered, and evaporated under vacuum. The resulting foam was purified by flash chromatography (15-70% AcOEt/hexane) to yield the desired product as a white foam [0.325 g, 78%] **^{1}H NMR** ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 7.08 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H, Tyr), 6.80 (ddd, *J* = 8.5, 3.4, 1.5 Hz, 2H, Tyr), 6.59 – 6.30 (m, 2H, NH), 3.76 (s, 1.5 H, OMe (Tyr)), 3.66 (s, 1.5 H, OMe), 3.39 and 3.06 (2m, 2H), 3.33-3.23 (m, 2H, N-**CH_2**-CH_2-CH_2-N_3), 2.99-2.69 (m, 7H, 2H N-CH_2-**CH_2**-CH_2-N_3, 3H N-CH_3, 2H Acp), 2.60 (m, 2H, Acp), 2.11-1.16 (m, 26H), 0.97 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH_3 Leu), 0.90 (dd, *J* = 6.7, 5.0 Hz, 3H, CH_3 Leu). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{38}H_{59}N_7O_8$: 741.4432, found: 741.4431.



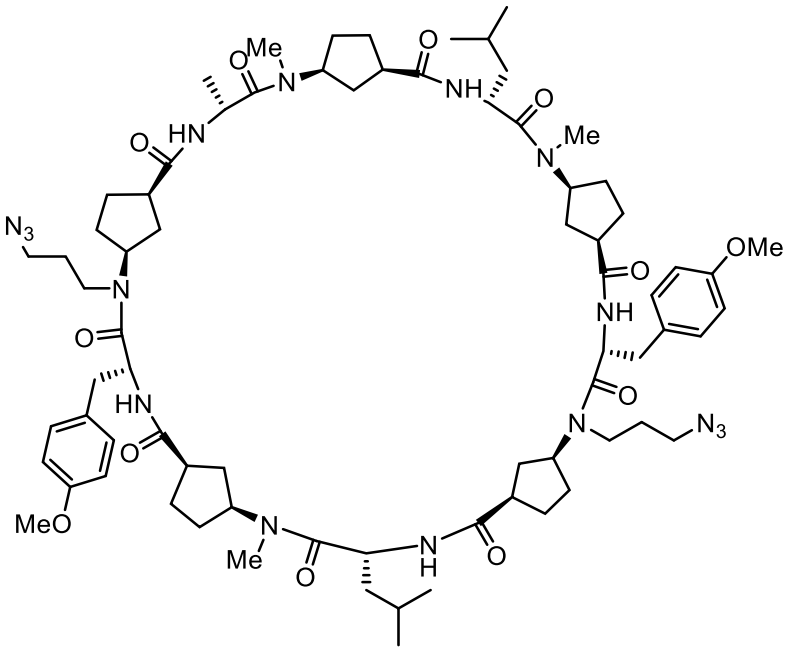
Boc-*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Acp-*D*-Tyrosine (OMe)-^{propylazide}*N*-*L*-γ-Acp-*D*-Ala-^{Me}*N*-*L*-γ-Acp-OMe. (12) Previously obtained tetrapeptide **11** (0.162 g, 0.219 mmol) was dissolved in a MeOH/H_2O mixture (3:1, 7.5 mL) and then LiOH (0.026 g, 1.09 mmol) was added. After stirring for 3 h, MeOH was evaporated under reduced pressure and the aqueous phase was acidified with aqueous HCl (5%) to pH 2. Then, it was extracted with CH_2Cl_2 (4x15 mL), dried over anhydrous. $MgSO_4$, filtered and concentrated to yield a white foam. By other side, **8** (0.072 g, 0.22 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (2.2 mL) and treated with TFA (2.2 mL). After stirring for 15 min the mixture was concentrated in the rotary evaporator, diluted in CH_2Cl_2 and concentrated for 3 times and finally dried under high vacuum for 3 h. After this time, the residue was dissolved in dry CH_2Cl_2 (4.4 mL) and DIEA (0.5 mL, 3.22 mmol) was added. Subsequently, the first portion residue was dissolved again in dry CH_2Cl_2 (5.5 mL) and subsequently treated with DIEA (0.447 mL, 2.6 mmol), and *N*-HATU (0.293 g, 0.77 mmol). Finally, both deprotected dipeptides were combined and stirred for 3 h under Ar atmosphere. The resulting solution was washed saturated aqueous solutions of $NaHCO_3$ (3x20 mL) and HCl (5%, 3x20 mL). Then the organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered, and evaporated under vacuum. The resulting solid was purified by flash chromatography (0-5% MeOH/CH_2Cl_2) to yield the desired product **12** as a white foam [0.167 g, 81%] **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{48}H_{75}N_9O_{10}$: 937.5611, found: 937.5523.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



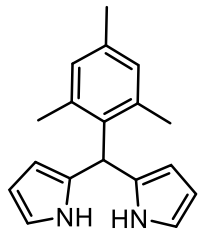
Boc-[*D*-Leu-^{Me}*N*-L-γ-Acp-*D*-Tyr-^{propylazide}*N*-*L*-γ-Acp-*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Acp-*D*-Tyr-^{propylazide}*N*-*L*-γ-Acp-*D*-Ala-^{Me}*N*-*L*-γ-Acp]-OMe. (13). Previously obtained tretrapeptide **11** (0.162g, 0.22 mmol) was dissolved in a MeOH/H_2O mixture (3:1, 7.5 mL) and then LiOH (0.026 g, 1.09 mmol) was added. After stirring for 4 h, MeOH was evaporated under reduced pressure and the aqueous phase was acidified with aqueous HCl (5%) to pH 2. Then, it was extracted with CH_2Cl_2 (4x15 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered, and concentrated to yield a white foam. By other side, hexapeptide **12** (0.168 g, 0.18 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (1.8 mL) and treated with TFA (1.8 mL). After stirring for 15 min the mixture was concentrated in the rotary evaporator, diluted in CH_2Cl_2 and concentrated for 3 times and finally dried under high vacuum for 3 h. After this time, the residue was dissolved in dry CH_2Cl_2 (4.4 mL) and DIEA (0.5 mL,3.22 mmol) was added. Subsequently, the *C*-deprotected aminoacid was dissolved again in dry CH_2Cl_2 (4.4 mL) and subsequently treated with DIEA (0.1 mL, 0.5 mmol), and *N*-HBTU (0.125 g, 0.33 mmol). Finally, both deprotected dipeptides were combined and stirred for 4 h under Ar atmosphere. The resulting solution was washed saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (3x20 mL) and aqueous HCl (5%, 3x20 mL). Then the organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The resulting foam was purified by flash chromatography (0-5% CH_2Cl_2/MeOH) to yield the desired product **13** as a white foam [0.216 g, 77%] **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{80}H_{122}N_{16}O_{15}$: 1046.9302, found: 1046.9374.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

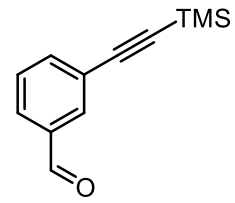


c-[*D*-Leu-^{Me}*N*-L-γ-Acp-*D*-Tyr-^{propylazide}*N*-*L*-γ-Acp-*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Acp-*D*-Tyr-^{propylazide}*N*-*L*-γ-Acp-*D*-Ala-^{Me}*N*-*L*-γ-Acp] (CP1). Linear decapeptide **13** (0.216 g, 0.12 mmol) was dissolved in a MeOH (7 mL). When the solution was homogeneous, H_2O was added drop by drop (2 mL). Then LiOH (0.026 g, 1.09 mmol) was added. After stirring for 12 h, MeOH was evaporated under vacuum and the aqueous mixture was acidified with aqueous HCl (5%) to pH 2. Then, the aqueous solution was extracted with CH_2Cl_2 (4x15 mL). The combined organic extracts were dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum to yield the *C*-deprotected decapeptide as a white foam. The resulting foam dissolved in CH_2Cl_2 (3.5 mL) and treated with TFA (3.5 mL). After stirring for 30 minutes, mixture was concentrated in the rotary evaporator, diluted in CH_2Cl_2 and concentrated (3 times) and dried under high vacuum for 3 h. Finally, the *C*- and *N*-deprotected decapeptide was dissolved in CH_2Cl_2 (43 mL) and DIEA (0.04 mL, 0.25 mmol) and *N*-TBTU (0.068 g, 0.21 mmol) were added. The mixture was stirred under Ar atmosphere during 72 h. Then, the solution was washed saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (3x20 mL) and aqueous HCl (5%, 3x20 mL). Then the organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The solid was purified first by flash chromatography (0-15% MeOH/CH_2Cl_2) and second by HPLC (silica gel, 0-10% MeOH/CH_2Cl_2 over 30 min, Rt 17 min) to yield the desired cyclic decapeptide **CP1** [194 mg, 47%]. **^{1}H NMR** ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 8.78 – 8.33 (m, 5H, NH), 7.16 – 7.06 (m, 4H, Tyr), 6.87 – 6.76 (m, 4H, Tyr), 5.33 – 5.00 (m, 5H, 2H Hα_{Leu} + 2H Hα_{Tyr} + 1H Hα_{Ala}), 5.01 – 4.84 (m, 3H, Hγ ^{Me}*N*-Acp), 4.83-4.67 (m, 2H, Hγ ^{propylazide}*N*-Acp), 3.80 – 3.78 (m, 3H, OMe Tyr), 3.77 (m, 3H, OMe Tyr), 3.31 (dq, *J* = 15.3, 9.8, 8.0 Hz, 4H, N-**CH_2**-CH_2-CH_2-N_3), 3.21 – 3.11 (m, 5H, Hα_{Acp}), 3.07-2.95 (m, 11H, 9H N-CH_3 + 2H CH_2-Tyr), 2.94 – 2.85 (m, 6H, 2H CH_2-Tyr + 4H N-CH_2-CH_2-**CH_2**-N_3), 2.06-1.83 (m, 14H, 12H ^{Me}*N*-Acp + 2H N-CH_2-**$CH_{2(1)}$**-CH_2-N_3), 1.82-1.57 (m, 16H, 6H ^{Me}*N*-Acp + 8H ^{propylazide}*N*-Acp + 2H CH_2 Leu), 1.57-1.35 (m, 5H, 2H N-CH_2-**$CH_{2(1)}$**-CH_2-N_3 + 2H CH_2 Leu + 1H CH Leu), 1.35-1.05 (8H, 3H CH_3 Ala + 4H ^{propylazide}*N*-Acp + 1H CH Leu), 1.05-0.83 (m, 12H, CH_3 Leu). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{74}H_{110}N_{16}O_{12}$: 1415.8562, found: 1415.8551. **FTIR (neat)**: ν = 3302 (amide A), 2098 (azide), 1623, 1614 (amide I), 1532;1542 (amide II) cm^{-1}.

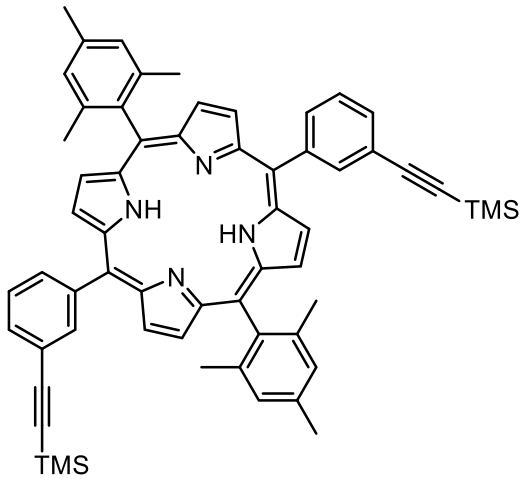
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



2,2'-(mesitylmethylene)bis(1H-pyrrole) (14). Freshly distilled pyrrole (56 mL, 800 mmol), and mesitaldehyde (2.96 mL, 20 mmol) were placed in a previously purged round bottom flask, and they were degasified for 15 min. Subsequently, TFA (154 µL, 2 mmol) was added, then, the colorless reaction mixture turned brown. After 1h stirring in the dark, the crude was diluted with toluene (150 mL), washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ solution (3×100 ml) and dried with anhydrous $MgSO_4$. A first purification was carried out by crystallization from cyclohexane, after which, a brown/green powder was obtained. After several washes with cool cyclohexane and hexane, a light grey solid was obtained [1.2 g, 23%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.94 (broad s, 2H), 6.87 (s, 2H), 6.67 (t, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.18 (q, *J* = 2.8 Hz, 2H), 6.01 (tt, *J* = 2.7, 1.2 Hz, 2H), 5.93 (s, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.07 (s, 6H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 202 (100), $[M+H]^+$.[511]



3-((trimethylsilyl)ethynyl)benzaldehyde (15). 3-Bromobenzaldehyde (3 mL, 25.6 mmol), ethynyltrimethylsilane (5.6 mL, 40.4 mmol), $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (0.208 g, 0.29 mmol), and CuI (0.096 g, 0.51 mmol) were dissolved in a 1:3 dry mixture of THF (69 mL) and Et_3N (23 mL). The mixture was allowed to react overnight at 50 °C. The solvent was removed under reduced pressure. Then the black and dense crude was redissolved in CH_2Cl_2 and washed with a saturated NH_4Cl aqueous solution (3x50 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum, obtaining a brown liquid that was purified by column chromatography using 2-10% AcOEt:Hexane as eluent, obtaining an amber liquid as the pure product [2.9 g, 56%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.99 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.83 (d, J = 7.71 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 7.71 Hz, 1H), 7.48 (t, J = 7.70, 1H), 0.26 (s, 9H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 203 (100), $[M+H]^+$.[621]

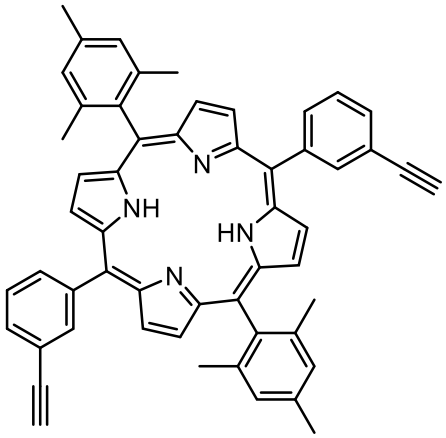


5,15-dimesityl-10,20-bis(3-((trimethylsilyl)ethynyl)phenyl)porphyrin (16). In a two neck round bottom flask, the compounds **14** (800 mg, 3 mmol) and **15** (637 µL, 3 mmol) were dissolved in fresh distilled CH_2Cl_2 (350 mL). The solution was degasified by argon bubbling for 45 minutes. After that, $BF_3{\cdot}O(Et)_2$ (150 µL, 3.3 mM) was added, and the reaction was stirred during 1h and a half. Then, DDQ (681 mg, 3 mmol) was added and again, the mixture was still stirred during another 1h and a half. The crude solution was filtered over an alumina pad in order to remove the black subproducts derivated from the pyrrole secondary reactions. The solvent was then removed under reduced pressure. The product was

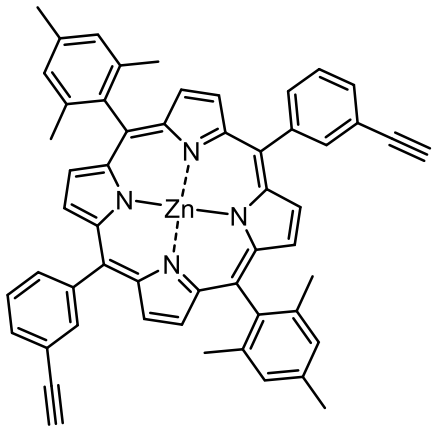
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[621] Frixa, C.; Mahon, M. F.; Thompson, A. S.; Threadgill, M. D. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 306-317.

purified by flash chromatography (0-50% CH_2Cl_2/Hexane) obtaining a purple powder [615 mg, 47%]. Even though the NMR signals match with the reported bibliography, we realized later that we had a mixture of five porphyrins that we were able to separate two steps forward and recalculate the yield as a 24% for the desired porphyrin .**^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.75 (d, *J* = 5.0 Hz, 4H), 8.69 (d, *J* = 4.8 Hz, 4H), 8.33 (s, 2H), 8.14 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.76 – 7.63 (m, 2H), 7.28 (s, 4H), 2.63 (s, 6H), 1.83 (s, 12H), 0.26 (s, 18H) ppm.[622]



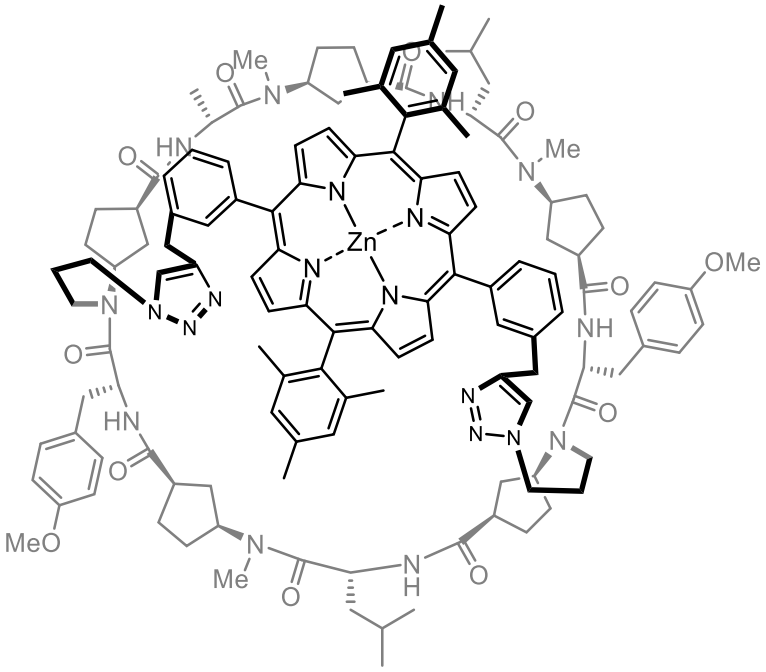
5,15-bis(3-ethynylphenyl)-10,20-dimesitylporphyrin (17). The porphyrins mixture obtained in the previous step (615 mg, 0.69 mmol) was dissolved in freshly distilled CH_2Cl_2 (76 mL) and then, tetrabutylammonium fluoride over silica gel (1.5 mmol F^-/g) was added (1.37 mg, 1.38 mmol). After 2 hours, the mixture was filtered in order to remove the silica gel. The solvent was evaporated under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography (0-50% CH_2Cl_2/Hexane) obtaining a purple powder [501 mg, 97%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.10 – 8.66 (m, 8H), 8.47 (p, *J* = 1.7 Hz, 2H), 8.40 – 8.21 (m, 2H), 7.98 (ddt, *J* = 7.7, 2.8, 1.4 Hz, 2H), 7.75 (td, *J* = 7.7, 1.9 Hz,2H), 7.37 (s, 4H), 3.18 (s, 2H), 2.71 (s, 6H), 1.96 (s, 12H).[511]



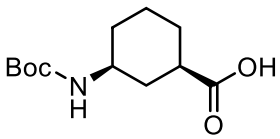
5,15-Bis(3-ethynylphenyl)-10,20-dimesitylporphinatozinc(II) (P1). The porphyrins mixture obtained in the previous step (100 mg, 0.13 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (13.8 mL) and MeOH (4.6 mL) (3:1 v/v). Then, $Zn(OAc)_2{\cdot}2H_2O$ (27.5 mg, 0.13 mmol) was added and the mixture stirred overnight. The solvents were removed under reduced pressure and the desired porphyrin was separated from the rest four secondary porphyrins by flash chromatography (0-50% CH_2Cl_2/Hexane) obtaining a purple powder as the pure product [58 mg, 55%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.85 (d, *J* = 4.5 Hz, 4H), 8.78 (d, *J* = 4.6 Hz, 4H), 8.37 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 8.22 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.70 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.29 (s, 4H), 3.15 (s, 2H), 2.64 (s, 6H), 1.82 (s, 12H). **MS (MALDI-TOF)** 808.2 ($[M]^+$).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

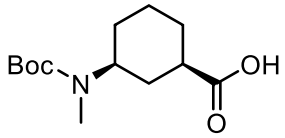
[622] Ravikanth, M.; Strachan, J. P.; Li, F.; Lindsey, J. S. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7721-7734.



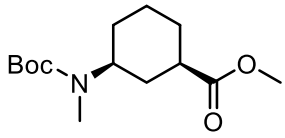
CP2. CP1 (50 mg, 0.035 mmol) and **P1** (31 mg, 0.039 mmol) were dissolved in freshly distilled and degassed (Ar flow, 20 min) CH_2Cl_2 (35 mL) and then solutions of DIEA (800 µL from a 0.15 mM solution, 0.11 mmol), TBTA (780 µL from a 3 mM solution, $1.77x10^{-3}$ mmol) and $[Cu(MeCN)_4PF_6]$ (600 µL, 14 mM, $7x10^{-3}$ mmol) in freshly distilled and degassed CH_2Cl_2 were added. The resulting mixture was stirred overnight under Ar atmosphere. The resulting solution was concentrated under reduced pressure. The crude was redissolved in CH_2Cl_2 and washed with NH_4Cl (3x7 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and evaporated under vacuum. The solid was purified by flash chromatography (0-10% MeOH/CH_2Cl_2) to give the desired product, **CP2**, as a purple powder [33 mg, 43 %]. **FTIR (neat)**: v = 3310 (amide A), 1672, 1625 (amide I), 1512 cm^{-1} (amide II). **MS (MALDI-TOF)** 2225.1 ($[CP2]^+$), 4450.3 ($[D2]^+$).



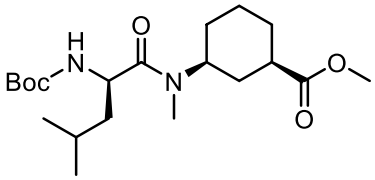
Boc-*L*-γ-Ach-OH (18). The racemic mixture of the *cis*-3-(Boc-amino)cyclohexanecarboxylic acid (14 g, 57 mmol), was dissolved in $CHCl_3$ (142 mL) and hexane (48 mL) in a 3:1 proportion. Then, the quiral amine (*R*)-1-phenyl-ethylamine (3 mL, 28 mmol) was added and the crystals of the diastereomeric salt between the amine and the acid was allowed to be formed during several days. After that, the mixture was filtered under vacuum and the solid was washed with $CHCl_3$ (5x30 mL). Then, the solid was suspended in CH_2Cl_2 (150 mL) and HCl aq. 5% (150 mL) was added, that allowed the recovering of the *cis*-3-(Boc-amino)cyclohexanecarboxylic acid *L*-enriched in the organic layer. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated, in order to give the **Boc-*L*-γ-Ach-OH** as a white solid. To get an e.e. > 98% this process was repeated at least 3 times, reducing the proportion of hexane in each new crystallization and increasing the amount of chiral amine used up to equivalent. The enantiomeric excess was determined by Supercritical Fluid Chromatography using and also, by measuring the optical rotation, until reaching a $[\alpha]_D^{20} \approx -50$.[484]



Boc-^{Me}*N*-*L*-γ-Ach-OH (19). A solution of **18** (5.0 g, 20.6 mmol) in dry THF (180 mL) was cooled in a water bath. Subsequently NaH (60%, 4.12 g, 102 .51 mmol) was carefully added and allowing the mixture to react for 30 minutes. Subsequently, MeI (14.56 g, 102.51 mmol) was added dropwise, after which the reaction mixture was left at room temperature for 24 h. After that, H_2O (30 mL) was added and the THF was evaporated under pressure. The aqueous solution was washed with Et_2O (3x40 mL), and then, the pH was adjusted to 3 with HCl aq. (5%). The product was extracted with CH_2Cl_2 (4x40 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The product **19** was obtained as a yellow solid [3.9 g, 74%] and used in the following step without further purification. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 258 (100), $[M+H]^+$.[484]



Boc-^{Me}*N*-*L*-γ-Ach-OMe (20). A solution of **19** (3.8g, 14.8 mmol) was dissolved in dry DMF (55 mL). Then, Na_2CO_3 (3.1 g, 29.6 mmol) and MeI (3.68 mL, 59.1 mmol) were added. The resulting mixture stirred during 6 hours under argon atmosphere. Then, AcOEt (50 mL) and H_2O (50 mL) were added. The organic layer was washed with H_2O (3x30 mL), $NaHCO_3$ aq. (3x30 mL) and NaCl aq. (3x30 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The product **20** was obtained as a yellow/orange oil [3.9 g, 97%]. **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 4.04 (br, 1H, $H\gamma_{Ach}$), 3.66 (s, 3H, N-Me), 2.72 (s, 3H, OMe), 2.43 (m, 1H, $H\alpha_{Ach}$), 1.92 (m, 3H, Ach), 1.62-1.16 (m, 12H, 4H Ach + 9H Boc) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 271 (100), $[M+H]^+$.[623]

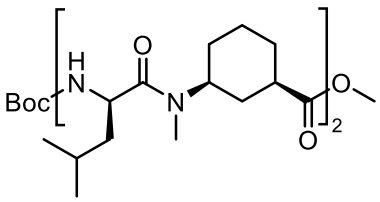


Boc-*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Ach-OMe (21): A solution of **20** (1.0 g, 3.69 mmol) in a mixture of TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 20 mL) was stirred at r.t. for 15 min and then the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dried under high vacuum for 3 h. A solution of the resulting TFA salt in dry CH_2Cl_2 (20 mL) was treated successively with DIEA (1.89 mL, 11.07 mmol), Boc-*D*-Leu-OH (0.92 g, 3.69 mmol) and, finally, *N*-HATU (2.1 g, 5.54 mmol). The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. The crude was washed with aqueous solutions of HCl (5%, 3x30 mL) and saturated $NaHCO_3$ aqueous solution (3x30 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude of reaction was purified by flash chromatography (0-5% MeOH/CH_2Cl_2) in order to obtain the pure product **21** as a white foam [1.056 g, 75%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.27 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH Leu), 4.61 (ddt, *J* = 13.5, 9.6, 4.8 Hz, 1H, $H\alpha_{Leu}$), 4.44 (tt, *J* = 11.9, 3.8 Hz, 1H, $H\gamma_{Ach}$), 3.69 and 3.65 (2s, 3H, OMe), 2.91 and 2.81 (2s, 3H, N-Me), 2.52 – 2.39 (m, 1H, $H\alpha_{Ach}$), 2.02 – 1.20 (m, 11H, 8H Ach + 3H Leu), 1.42 (s, 9H, Boc), 0.99 (dd, *J* = 6.5, 4.2 Hz, 3H, CH_3 Leu), 0.91 (dd, *J* = 6.7, 1.9 Hz, 3H, CH_3 Leu). **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.6 and 175.3 (C), 173.2 and 172.8 (C), 156.0 and 155.9 (C), 79.8 (C), 55.4 and 52.2 (CH), 52.1 (CH), 49.6 and 49.1 (CH3), 44.0 and 43.3 (CH2), 43.1 and 42.8 (CH), 33.2 and 32.0 (CH2), 30.4 and 29.3 (CH2), 29.6 and 29.9 (CH3), 28.8

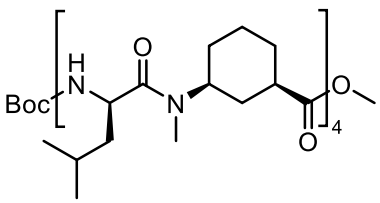
USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

[623] Liu, L. Z.; Ma, T.; Zhou, J.; Long Hu, Z.; Jun Zhang, X.; Zhen Zhang, H.; Zeng, M.; Liu, J.; Li, L.; Jiang, Y.; Zou, Z.; Wang, F.; Zhang, L.; Xu, J.; Wang, J.; Xiao, F.; Fang, X.; Zou, H.; Efanov, A. M.; Thomas, M. K.; Lin, H. V.; Chen, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 126857.

(CH3), 28.6 and 28.5 (CH2), 25.1 (CH), 24.8 and 24.8 (CH2), 23.9 and 23.8 (CH3), 22.4 and 22.2 (CH3). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 329.2 ([M-CO_2Me]$^+$, 100), 407.3 ([MNa]$^+$, 89), 285.2 ([MH-Boc]$^+$, 68). **HRMS (ESI) calculated** for $C_{20}H_{37}N_2O_5$ 385.2697, **found** 385.2090.

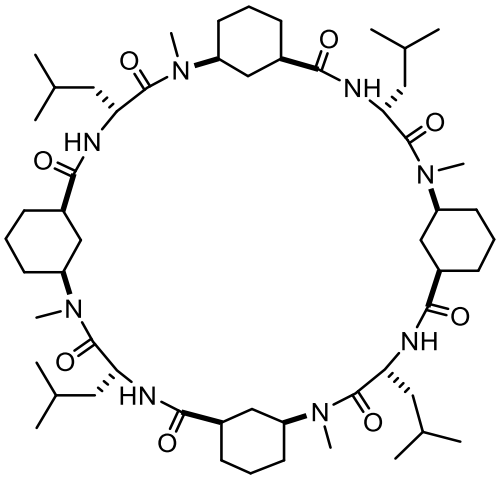


Boc-[(*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Ach)$_2$]-OMe (22). A solution of **21** (528 mg, 1.37 mmol) in a MeOH/H_2O mixture (3:1, 28 mL) was treated with LiOH (164 mg, 6.86 mmol) and stirred at rt for 3 h. Then, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting aqueous layer was acidified with an aqueous solution of HCl (10%) to pH 3 and extracted with CH_2Cl_2 (4 x 20 mL). The combined organic layers were dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated to obtain the *C*-deprotected dipeptide as a white foam which was used in the next step without further purification. Separately, a different solution of **21** (528 mg, 1.37 mmol) in a mixture of TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 7 mL) was stirred at rt for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure and dried in high vacuum for 3 h. The resulting *N*-deprotected dipeptide was dissolved in CH_2Cl_2 (7 mL) and DIEA (0.95 mL, 5.46 mmol), **Boc-*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Ach-OH** and *N*-HBTU (800 mg, 2.1 mmol) were added. The solution was stirred overnight at r.t. and then washed with aqueous solutions of HCl (5%, 3x10 mL) and $NaHCO_3$ (sat., 3x10 mL), dried with anydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude of reaction was purified by flash chromatography (0-5% MeOH/CH_2Cl_2) providing the desired product as a white foam. [802 mg, 92%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.32 (ddd, *J* = 28.7, 20.0, 8.8 Hz, 1H, NH Leu 1), 5.63 and 5.29 (d, *J* = 5.9 Hz and ddd, *J* = 14.6, 10.2, 7.5 Hz, 1H, NH Leu 2), 5.02 – 4.89 (m, 1H, Hα_{Leu1}), 4.60 (qd, *J* = 10.1, 8.3, 3.9 Hz, 1H, Hα_{Leu2}), 4.41-4.32 (m, 2H, Hγ_{Ach}), 3.72 – 3.63 (m, 3H, OMe), 2.94 – 2.75 (m, 6H, NMe), 2.50 – 2.38 (m, 2H), 2.51-2.20 (m, 2H, Hα_{Ach}), 2.00-1.22 (31H, 6H Leu + 16H Ach + 9H Boc (1.42 ppm)), 0.99 (dd, *J* = 8.0, 6.1 Hz, 6H, CH_3 Leu 1), 0.91 (dd, *J* = 6.8, 2.8 Hz, 6H, CH_3 Leu 2)). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 637.5 ([MH]$^+$, 40), 537.4 ([MH-Boc]$^+$, 27). **HRMS (ESI) calculated** for $C_{34}H_{51}N_4O_7$ 637.4535, **found** 637.4546



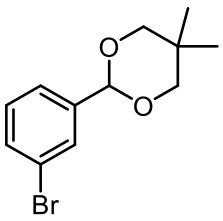
Boc-[(*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Ach)$_4$]-OMe (23). A solution of **22** (489 mg, 0.76 mmol) in a MeOH/H_2O mixture (3:1, 8 mL) was treated with LiOH (92 mg, 3.8 mmol) and stirred at rt for 4 h. Then, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting aqueous layer was acidified with an aqueous solution of HCl (10%) to pH 3 and extracted with CH_2Cl_2 (4 x 20 mL). The combined organic layers were dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated to obtain the *C*-deprotected tetrapeptide as a white foam which was used in the next step without further purification. Separately, a different solution of **22** (489 mg, 0.76 mmol) in a mixture of TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 4 mL) was stirred at rt for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure and dried in high vacuum for 3 h. The resulting TFA salt was dissolved in CH_2Cl_2 (4 mL) and DIEA (1.4 mL, 8.05 mmol), **Boc-[(*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-γ-Ach)$_2$]-OH** and *N*-HBTU (432 mg, 1.14 mmol) were added. The solution was stirred overnight at r.t. and then washed with aqueous solutions of HCl (5%, 3x10 mL) and $NaHCO_3$ (sat., 3x10 mL), dried with anydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude of reaction was purified by flash chromatography (0-10% MeOH/CH_2Cl_2) providing the desired product as a white foam. [759 mg, 96%]. **^{1}H NMR** (500

MHz, $CDCl_3$) δ: 6.53 – 6.26 (m, 3H, 3 NH), 5.30 (m, 1H, NH), 5.00 – 4.87 (m, 4H, $H\alpha_{Leu}$), 4.61 (m, 1H, $H\gamma_{Ach}$), 4.53 – 4.35 (m, 3H, 3 $H\gamma_{Ach}$), 3.89 – 3.62 (m, 3H, OMe), 3.02 – 2.69 (m, 12H, 4 NMe), 2.46 (ddt, *J* = 22.7, 10.7, 3.4 Hz, 1H, $H\gamma_{Ach}$), 2.28 (m, 3H, 3 $H\alpha_{Ach}$), 2.04 – 1.24 (18H, 24H Ach + 12H Leu + 9H Boc (1.42 ppm)), 1.00 (qd, *J* = 6.6, 6.1, 3.0 Hz, 12H, CH_3 Leu), 0.92 (qd, *J* = 7.2, 6.7, 4.6 Hz, 12H, CH_3 Leu). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 1041 ($[MH]^+$, 40), 551 ($[(M+2)/2]^+$, 100). **HRMS (ESI) calculated** for $C_{62}H_{108}N_8O_{11}$: 1040.8134, **found**: 1040.8123.

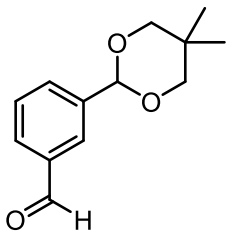


***c*-[(*D*-Leu-^{Me}N-*L*-γ-Acp)$_4$] (CP4).** A solution of linear octapeptide **23** (600 mg, 0.53 mmol) in a mixture MeOH/H_2O (3:1, 11 mL) was treated with LiOH (73 mg, 3.15 mmol). After stirring for 3 h at r.t., the MeOH was removed on the rotary evaporator and the resulting solution was acidified with an aqueous solution of HCl (5%) to pH 2. This solution was extracted with CH_2Cl_2 (4x30 mL) and the combined organic extracts were dried, filtered and concentrated in vacuo. The resulting foam was dissolved in a mixture of CH_2Cl_2/TFA (10 mL) and stirred for 30 min. The solvents were removed under reduced pressure. Then, there were done tree cycles that consisted of redissolving in CH_2Cl_2 and removing the solvent under reduced pressure, in order to eliminate the TFA as much as it is possible. It was further dryed under high vacuum for 3 h. This residue was redissolved in dry CH_2Cl_2 (50 mL) and DIEA (2 mL, 11.5 mmol) and *N*-TBTU (510 mg, 1.59 mmol) were added. This mixture was stirred overnight. After that, the solution was washed with aqueous solutions of HCl (5%, 3x40 mL) and $NaHCO_3$ (3x40 mL). The organic phase was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (0-15% MeOH/CH_2Cl_2) to give **CP4** as a white solid [430 mg; 81%]. **^{1}H RMN.** ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 8.34 (d, *J*= 9.1Hz, 4H, NH), 5.15 (q, *J*= 7.5 Hz, 4H, $H\alpha_{Leu}$), 4.57 (t, *J*= 11.3 Hz, 4H, $H\gamma_{Ach}$), 3.05 (s, 12H, N-Me), 2.86 (m, 4H, $H\alpha_{Ach}$), 1.86 (m, 4H, *trans*-$H\varepsilon_{Ach}$), 1.83 (m, 4H, *trans*- $H\beta/\zeta_{Ach}$), 1.80 (m, 4H, trans, $H\beta/\zeta_{Ach}$), 1.76 (m, 4H, *cis*-$H\zeta_{Ach}$), 1.69 (m, 4H, *cis*-$H\beta_{Ach}$), 1.56 (m, 4H, CH Leu), 1.50 (m, 12H, 8H CH_2 Leu + 4H, *cis*-$H\delta_{Ach}$), 1.45 (m, 4H, *cis*-$H\varepsilon_{Ach}$), 1.44 (m, 8H, *trans*-$H\delta_{Ach}$), 0.92 (dd, *J*= 31.6, *J*= 6.3, 24H, CH_3 Leu). **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.4 (C), 172.5 (C), 51.5 (CH), 46.8 (CH), 43.8 (CH2), 43.4 (CH), 30.9 (CH2), 30.4 (CH3), 29.6 (CH2), 29.0 (CH2), 24.9 (CH2), 23.4 (CH), 22.5 (CH3). **FT-IR** (293 K, CH_2Cl_2) 3297 (amide A), 1674, 1619 (amide I), 1528 (amide II) cm-1. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 1009.74 ($[MH]^+$, 100). **HRMS (ESI) calculated** for $C_{56}H_{96}N_8O_8$ 1009.7424, **found** 1009.7435.

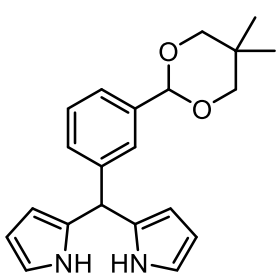
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



2-(3-bromophenyl)-5,5-dimethyl-1,3-dioxane (24). In a 100 mL two-neck round bottom flask, 3-bromobenzaldehíde (4 mL, 34.2 mmol), 2,2-dimethylpropane-1,3-diol (4.27 mg, 41.0 mmol) were dissolved in toluene (55 mL). Then, *p*-toluenesulfonic acid was added (6.6 mg, 0.034 mmol). The mixture was refluxed overnight using a Dean-Stark apparatus for water elimination. After cooling down the reaction mixture, it was diluted with Et_2O (100 mL) and washed with $NaHCO_3$ (3 x 100 mL), H_2O (3 x 100 mL) and brine (3 x 100 mL). The organic phase was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The product was obtained as a pale-yellow oil [8.79 mg, 95%]. **^{1}H RMN.** ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 7.66 (s, 1H), 7.48-7.37 (m, 2H), 7.20 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.74 (d, *J* = 11.3 Hz, 2H), 3.60 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H), 1.25 (s, 3H), 0.77 (s, 3H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 271 ([MH]$^+$, 100).[624]



3-(5,5-dimethyl-1,3-dioxan-2-yl)benzaldehyde (25). In a previously purged 500 mL two-neck round bottom flask, compound **24** (8.9 g, 32.8 mmol) was dissolved in fry THF (300 mL). Then, *p*-toluenesulfonic acid was added (6.6 mg, 0.034 mmol). The flask was cooled down until -78 °C with dry ice/acetone bath and then, t-BuLi (43.7 mL, 65.6 mmol) was added carefully. The mixture stirred at -78 °C for 2 hours, and after that, I was allowed to slowly warm up until 0 °C and immediately cooled again until -78 °C. Then, dry DMF was added (5 mL, 65.6) and the mixture stirred for 30 minutes more. Then the flask was allowed to reach 0 °C, and after that, room temperature. The solution was neutralized with HCl aq. The crude mixture was dissolved in Et_2O and washed with HCl aq. 10% (4 x 30 mL) and H_2O (4 x 30 mL). The organic phase was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The product was obtained as colorless oil [4.9 g, 67%]. **^{1}H RMN.** ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 10.04 (s, 1H), 8.04 (1, 1H), 7.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.55 (7, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.79 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 3.69 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 1.30 (s, 3H), 0.82 (s, 3H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 27 ([MH]$^+$, 100).[625,502]

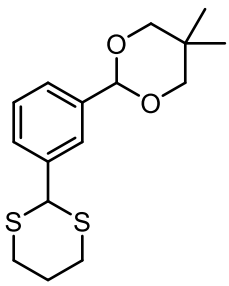


5-(3-(5,5-dimethyl-1,3-dioxan-2-yl)phenyl)dipirrometane (27). Freshly distilled pyrrole (5 mL, 72.6 mmol), and compound **25** (400 mg, 1.82 mmol) were placed in a previously purged round bottom flask, and were degasified for 15 min. Subsequently, TFA (10 µL, 0.182 mmol) was added, then, the colorless reaction mixture turned brown. After 1h stirring in the dark, the crude was diluted with toluene (150 mL), washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ solution (3 x 50 ml) and dried with anhydrous $MgSO_4$. The crude product was purified by column chromatography to obtain **27** as a light green foam [220 mg g, 36%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.94 (broad s, 2H), 7.47 (d, 1H), 7.37 (t, 2H), 7.18 (d, 1H), 6.61 (s, 2H), 6.15 (q, 2H), 5.90 (dt, 2H), 3.75 (d, 2H), 3.63 (d, 2H), 1.31 (s, 3H), 0.81 (s, 3H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 337 (100).

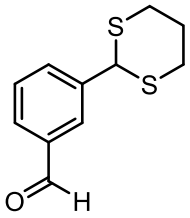
USC

[624] AbuSalim, D. I.; Merfeld, M. L.; Lash, T. D. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10360-10368.

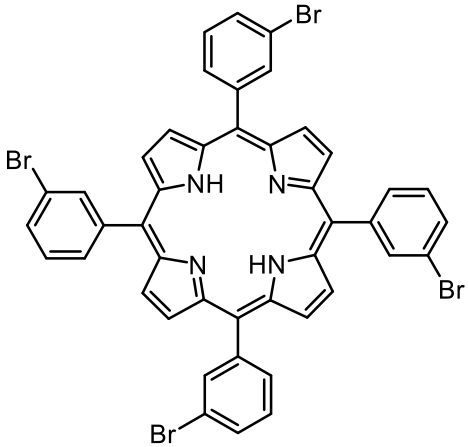
[625] Urbani, M.; Iehl, J.; Osinska, I.; Louis, R.; Holler, M.; Nierengarten, J. F. *European. J. Org. Chem.* **2009**, 3715-3725.



2-(3-(1,3-dithian-2-yl)phenyl)-5,5-dimethyl-1,3-dioxane (28). Compound **25** (400 mg, 1.82 mmol) and 1,3-propanedithiol (0.2 mL, 2 mmol) were dissolved in dry CH_2Cl_2 (20 mL). Then, $BF_3{\cdot}O(Et)_2$ was added (68 µL, 0.55 mmol). The mixture was allowed to react overnight. After that, the organic layer was washed with NaCl (3 x 30 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude was purified by chromatography column, but the acetal deprotected product **29**, that was also obtained, could not be separated from the mixture. From the total amount of product, there was a 70% of **28** and 30% of **29** (410 mg in total). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 310 ([**28**+H]$^+$, 100), 225 ([**29**+H]$^+$, 40).



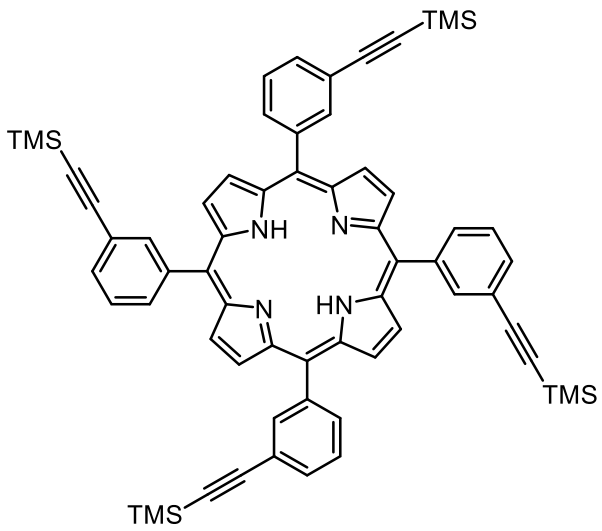
3-(1,3-dithian-2-yl)benzaldehyde (29). The mixture **28/29** (410 mg, 0.93 mmol of 28) weas dissolved in CH_2Cl_2 (5.76 mL), TFA (5.76 mL) and H_2O (1.28 mL). The mixture stirred during 2 hours. After that, the total reaction volume was transferred into an Erlenmeyer and the TFA was carefully neutralized with $NaHCO_3$ aq. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The product was purified by column chromatography to obtain a colorless oil [361 mg, 90%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 10.01 (s, 1H), 7.83(d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* =7.7 Hz, 1H), 7.51 (t, *J* = 7.0, 1H), 5.23 (s, 1H), 3.25 – 2.82 (m, 4H), 2.25-2.13 (m, 1H), 2.05-1.84 (m, 1H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 225 (100), [**29**+H]$^+$.



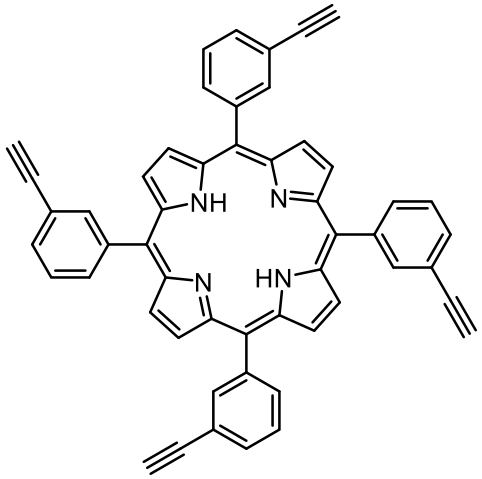
5,10,15,20-tetrakis(3-bromophenyl)porphyrin (31). In a two neck round bottom flask, pyrrole (19.4 µL, 0.28 mmol) and 3-bromobenzaldehyde (33 µL, 0.28 mmol) were dissolved in fresh distilled CH_2Cl_2 (5 mL). The solution was degasified by argon bubbling during 45 minutes. After that, $BF_3{\cdot}O(Et)_2$ (2.5 µL, 3.3 mM) was added, and the reaction was stirred during 1h and a half. After that, DDQ (63.6 mg, 0.28 mmol) was added and again, the mixture was still stirred during another 1h and a half. The crude solution was filtered over an alumina pad to remove the black subproducts derived from the pyrrole secondary reactions. The solvent was then removed under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography (0-50% CH_2Cl_2/Hexane) obtaining a purple powder [21.7 mg, 33%] .**^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.86 (s, 8H, Hβ), 8.38 (s, 4H Ha), 8.15 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H, Hb), 7.95 (d, *J* = 7.7 Hz, 4H, Hd), 7.64 (t, *J* = 7.9 Hz, 4H) ppm.[626]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[626] Hunter, C. A.; Misuraca, M. C.; Turega, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 582-594.



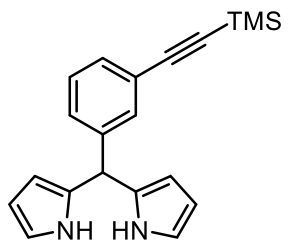
5,10,15,20-tetrakis(3-((trimethylsilyl)ethynyl)phenyl)porphyrin (33). In a two neck round bottom flask, pyrrole (34 µL, 0.5) and 3-((trimethylsilyl)ethynyl)benzaldehyde (**15**) (100 mg, 0.5 mmol) were dissolved in fresh distilled CH_2Cl_2 (50 mL). The solution was degasified by argon bubbling during 45 minutes. After that, $BF_3{\cdot}O(Et)_2$ (21.3 µL, 3.3 mM) was added, and the reaction was stirred during 1h and a half. After that, DDQ (113 mg, 0.5 mmol) was added and again, the mixture was still stirred during another 1h and a half. The crude solution was filtered over an alumina pad in order to remove the black subproducts derivate from the pyrrole secondary reactions. The solvent was then removed under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography (0-50% CH_2Cl_2/Hexane) obtaining a purple powder [40 mg, 9%] .**^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.83 (s, 8H, Hβ), 8.33 (s, 4H Ha), 8.15 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H, Hb), 7.90 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H, Hd), 7.69 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H, Hc), 0.27 (s, 18H) ppm.[627]



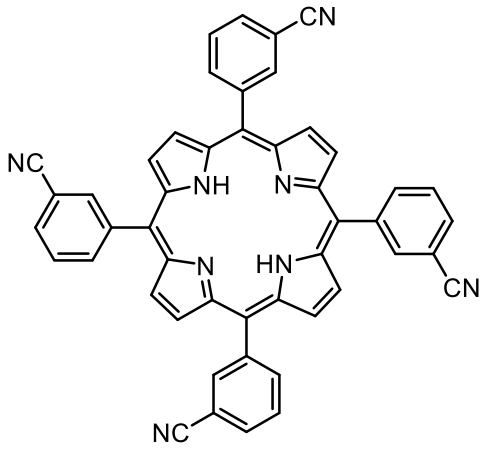
5,10,15,20-tetrakis(3-ethynylphenyl)porphyrin (34). The product **33** (40 mg, 0.04 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (4 mL) and then, tetrabutylammonium fluoride over silica gel (1.5 mmol F^-/g) was added (106 mg, 0.16 mmol). After 2 hours, the mixture was filtered to remove the silica gel. The solvent was evaporated under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography (0-50% CH_2Cl_2/Hexane) obtaining a purple powder [28 mg, 97%] **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.85 (s, 8H), 8.37 (s, 4H), 8.20 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H), 7.93 (d, *J* = 8.2Hz, 2H), 7.73 (t, *J* = 7.7 Hz), 3.17 (s, 4H).[627]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

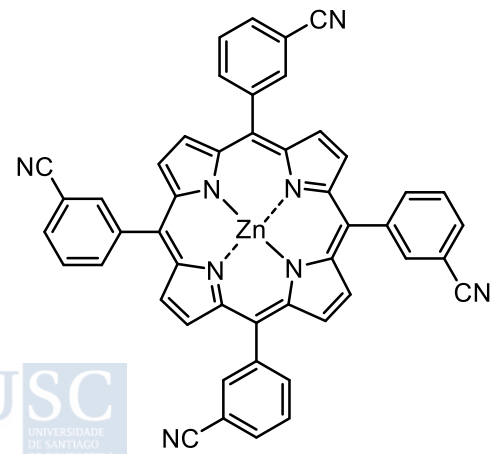
[627] Chida, K.; Yoshii, T.; Ohwada, M.; Hayasaka, Y.; Komeda, J.; Sakamoto, R.; Maruyama, J.; Kamiya, K.; Inoue, M.; Tani, F.; Nishihara, H. *Catal. Today* **2023**, *411-412*, 113830.



5-(3-((trimethylsilyl)ethynyl)phenyl)dipirrometane (35). Freshly distilled pyrrole (2.75 mL, 39.6 mmol), and compound **15** (200 mg, 0.99 mmol) were placed in a previously purged round bottom flask, and were degasified for 15 min. Subsequently, TFA (6 µL, 0.1 mmol) was added, then, the colorless reaction mixture turned brown. After 1h stirring in the dark, the crude was diluted with toluene (15 mL), washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ solution (3 x 30 ml) and dried with anhydrous $MgSO_4$. The crude product was purified by column chromatography to obtain **36** as a light-yellow foam [70 mg g, 22%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.91 (broad s, 2H), 7.40-7.34 (m, 2H), 7.30-7-21 (m, 1H), 7.10-7.12 (m, 1H), 6.70 (m, 2H), 6.15 (q, *J* = 3.0 Hz, 2H), 5.90 (m, 2H), 5.44 (s, 1H), 0.24 (s, 9H). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 319 (100).

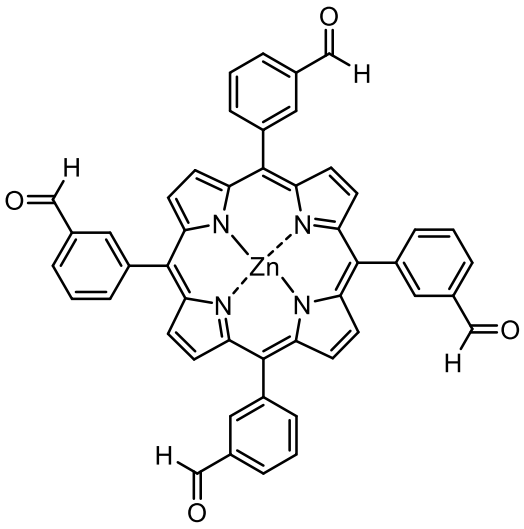


Tetrakis(3-cyanophenyl)porphyrin (36). In a 25 mL round bottom flask, 3-formylbenzonitrile (150 mg, 1.14 mmol) was dissolved in propionic acid (7.6 mL). The solution was warmed up until reflux was observed, and then, pyrrole (80 uL, 1.14 mmol) was added. Immediately after the pyrrole addition, the colorless solution turned into brown. The reaction stirred with reflux during 1h and a half. After cooling down the reaction mixture, the volume was poured into a 250 mL Erlenmeyer. A saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ was added slowly, to neutralize the acid. When the solution stopped bubbling, the two phases were separated using a separatory funnel. The organic phase, clearly purple, was dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered, and concentrated. The solvent was then removed under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography (0-1% MeOH/CH_2Cl_2) obtaining a brilliant purple powder [21 mg, 2.6 %].**^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.88 (s, 8H, Hβ), 8.53 – 8.38 (m, 8H, Ha and Hb Ar), 8.20 – 8.04 (m, 4H, Hc Ar), 7.93 (dt, *J* = 10.4, 5.3 Hz, 1H, Hd Ar) ppm. **MS (MALDI-TOF):** 714.3 ([M]$^+$).[541]

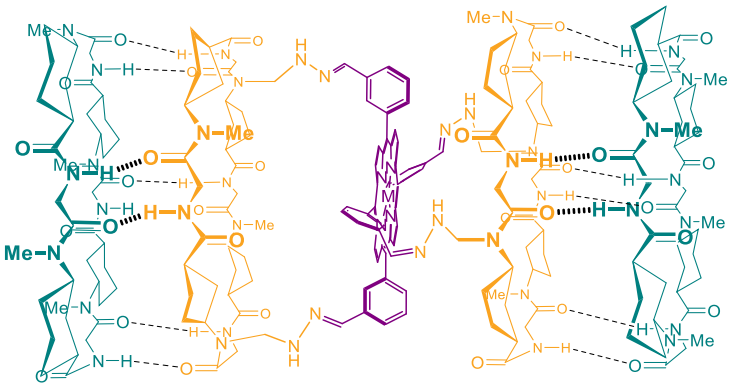


Tetrakis(3-cyanophenyl)porphyrin zinc (II). The compound **37**, obtained in the previous step (42 mg, 0.059 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (4.5 mL) and MeOH (1.5 mL) (3:1 v/v). Then, $Zn(OAc)_2{\cdot}2H_2O$ (13 mg, 0.059 mmol) was added and the mixture stirred during three hours. The solvents were removed under reduced pressure and the desired porphyrin was purified by flash chromatography (0-1% MeOH/CH_2Cl_2) obtaining a purple powder as the pure product [46.5 mg, 95%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.90 (s, 8H, Hβ), 8.52 – 8.49 (m, 4H, Ha Ar), 8.46 (m, 4H, Hb Ar), 8.12 (dt, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 4H, Hc Ar), 7.92 (dddd, *J* = 11.0, 8.2, 5.6, 2.6 Hz, 4H, Hd Ar). **MS (MALDI-TOF):** 776.2 ([M]$^+$).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Tetrakis(3-formylphenyl)porphyrin zinc (II) (P2). The **porphyrin** step (100 mg, 0.13 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (16.0 mL). The solution was degasified by through argon bubbling. Then, DIBAL-H (1M in CH_2Cl_2) was added (3.1 mL, 3.12 mmol) was added and the mixture stirred for three hours. Then, a Rochelle salt saturated aqueous solution was added (20 mL), and the mixture stirred during 15 minutes. Then, the two phases were separated. The organic phase was washed with HCl 1% aqueous solution. The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and concentrated. The solvent was then removed under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography (0-1% MeOH/CH_2Cl_2) obtaining a brilliant purple powder [24 mg, 24%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2). δ: 10.24 (s, 1H, formyl), 8.90 (s, 8H, Hβ), 8.67 (t, *J* = 1.7 Hz, 4H, Ha Ar), 8.50 (dp, *J* = 6.0, 1.4 Hz, 4H, Hb Ar), 8.30 (dt, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 4H, Hc Ar), 7.95 (t, *J* = 7.7 Hz, 4H, Hd Ar). **MS (MALDI-TOF):** 788.2 ($[M]^+$).[535]



Supramolecular adduct P2⊂(D3-4)$_2$. *c*-[(*D*-Leu-*L*-^{Me}*N*-γ-Acp-*D*-Leu-*L*-^{BocNHNHAc}*N*-γ-Acp-)$_2$] (12 mg, 9.44x10^{-3} mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 and TFA (1:1, 2 mL). After 30 minutes, the solvent was evaporated under reduced pressure. There were done tree cycles that consisted on redissolving in CH_2Cl_2 and removing the solvent under reduced pressure, in order to eliminate the TFA as much as it is possible. It was further dryed under high vacuum overnight. Then, the deprotected peptide **CP3** it was redissolved in dry CH_2Cl_2 and stirred with 4 Å molecular sieves during 5h, in order to neutralize the acidity from the remaining TFA thank to the basicity of the molecular sieves.[628] The solution was concentrated and dried under high vacuum, and the deprotected peptide was used in the following heterodimezation and condensation experiment.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[628] Magyar, Á.; Juhász, K.; Hell, Z. *Synthesis*, **2021**, *53*, 279-295.

By one side, a 3 mM solution (CD_2Cl_2 with 10% MeOH-d_3, 4.5 mM trimethoxybenzene) was placed into the NMR tube.

Separately, the solutions of **CP4** and **P2** were prepared. For the case of **CP4**, a 90 mM stock solution was prepared (CD_2Cl_2, 4.5 mM trimethoxybenzene). For the porphyrin, a 45 mM stock solution (CD_2Cl_2, 4.5 mM trimethoxybenzene) was prepared.

After recording the ^{1}H NMR of the deprotected peptide, the ach-based peptide was added, using a micropipette, until no acp-based peptide dimer was observed (30 uL of the 90 mM stock solution), completing the heterodimerization process.

At this point, **P2** was added (30 uL of the 45 mM stock solution). The ^{1}H NMR spectra was recorded immediately, after 1 h, 4 h, 48 h and 72 h.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10.1.2 Figures

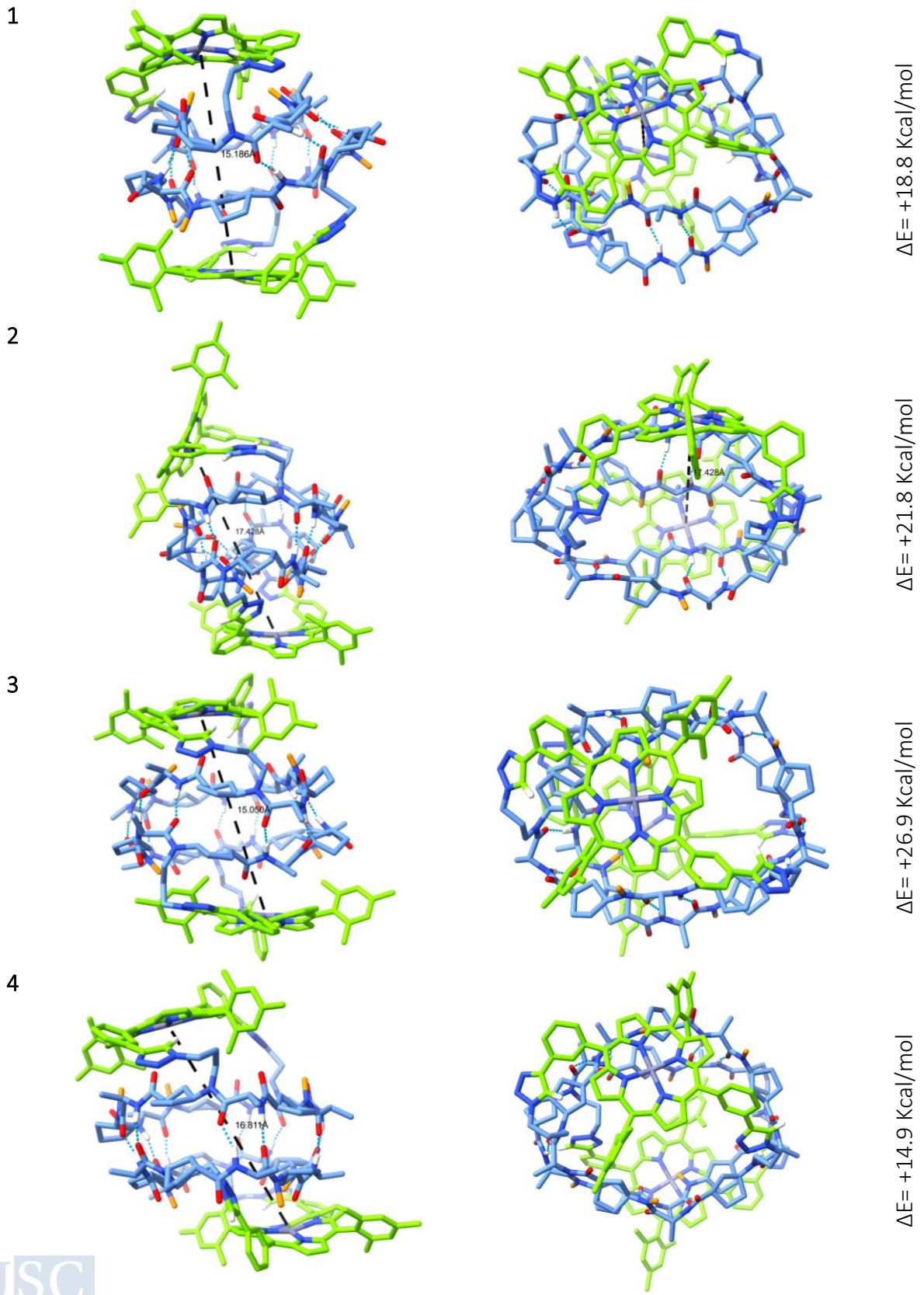


Figure 199. Geometry optimization 1-4 for the rotoisomer **R3** of the specie **D2'**. The level of calculation employed was B3LYP/3-21G// B3LYP/6-31G(d,p), including in both cases the dispersion correction gd3bj.

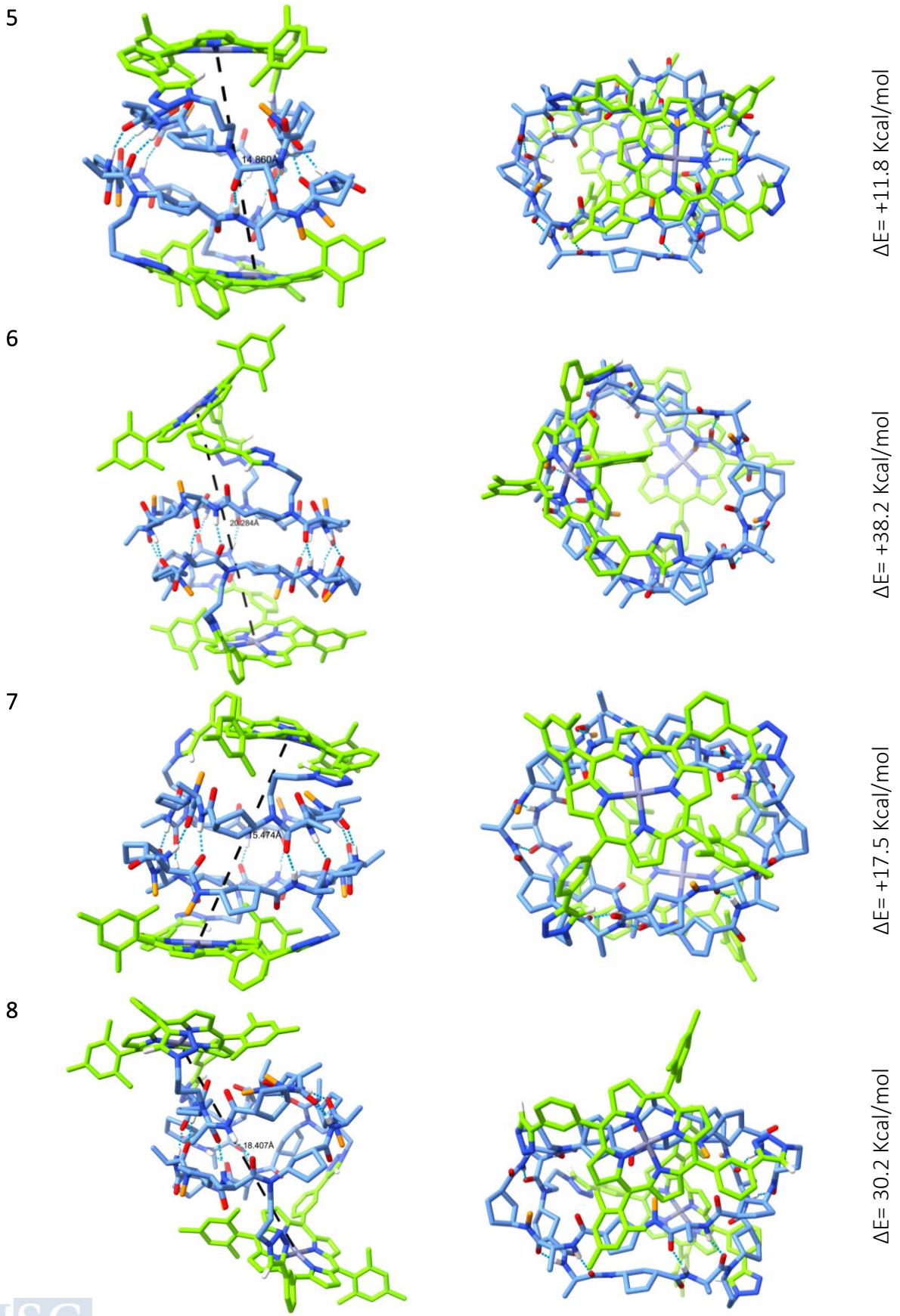
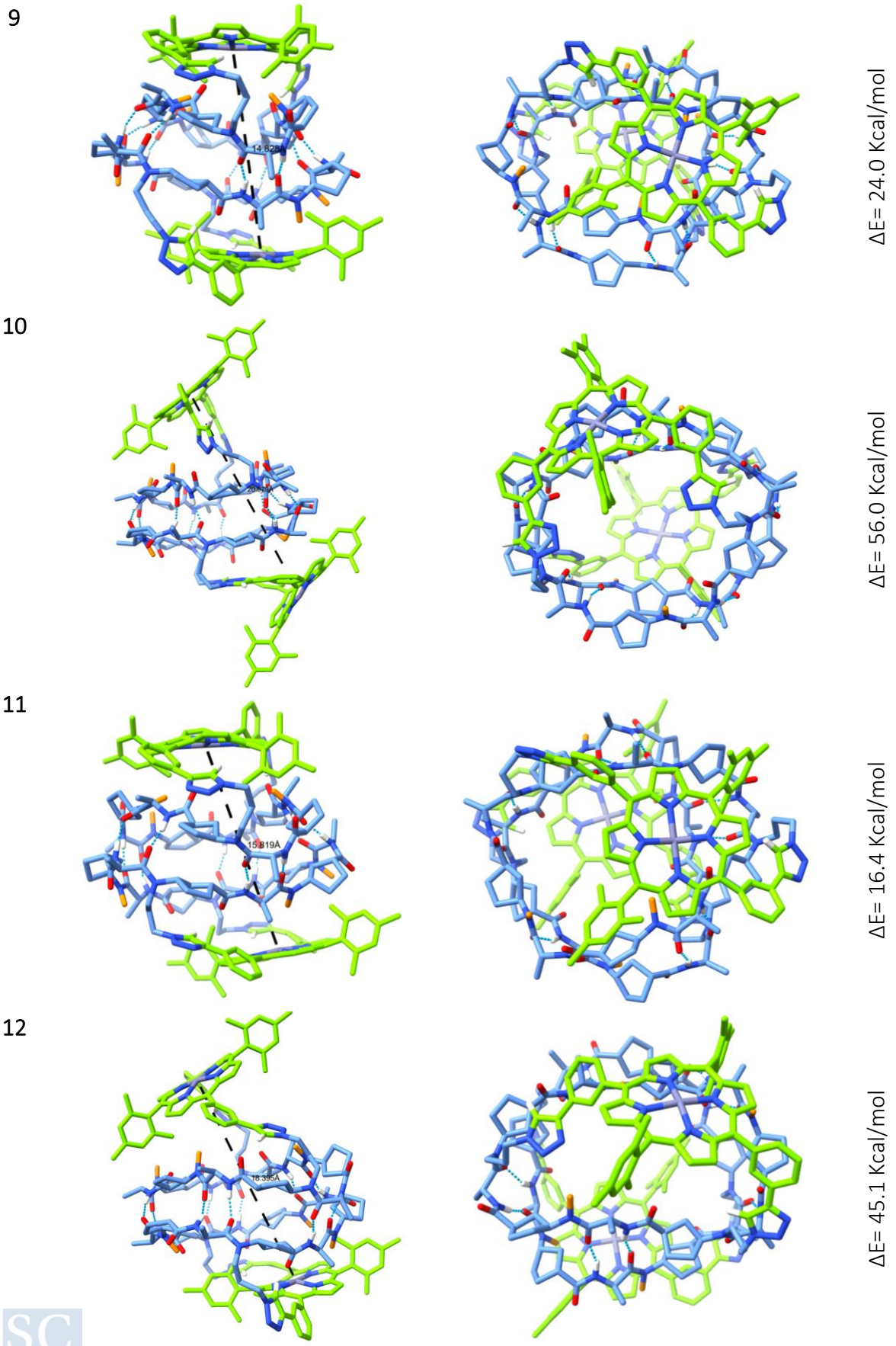


Figure 200. Geometry optimization 5-8 for the rotoisomer **R3** of the specie **D2'**. The level of calculation employed was B3LYP/3-21G// B3LYP/6-31G(d,p), including in both cases the dispersion correction gd3bj.



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Figure 201. Geometry optimization 9-12 for the rotoisomer **R3** of the specie **D2'**. The level of calculation employed was B3LYP/3-21G// B3LYP/6-31G(d,p), including in both cases the dispersion correction gd3bj.

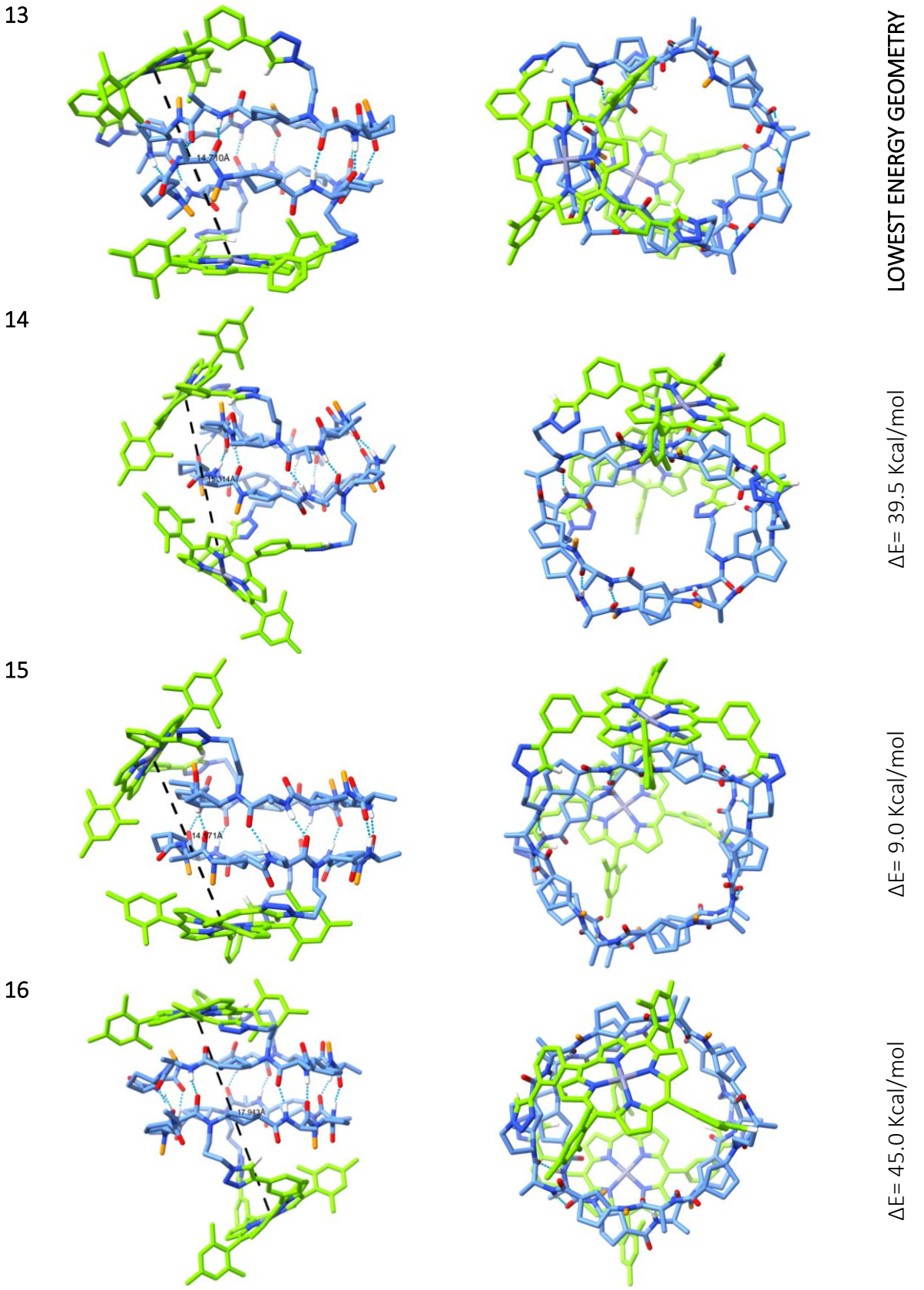


Figure 202. Geometry optimization 13-16 for the rotoisomer **R3** of the specie **D2'**. The level of calculation employed was B3LYP/3-21G// B3LYP/6-31G(d,p), including in both cases the dispersion correction gd3bj.

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

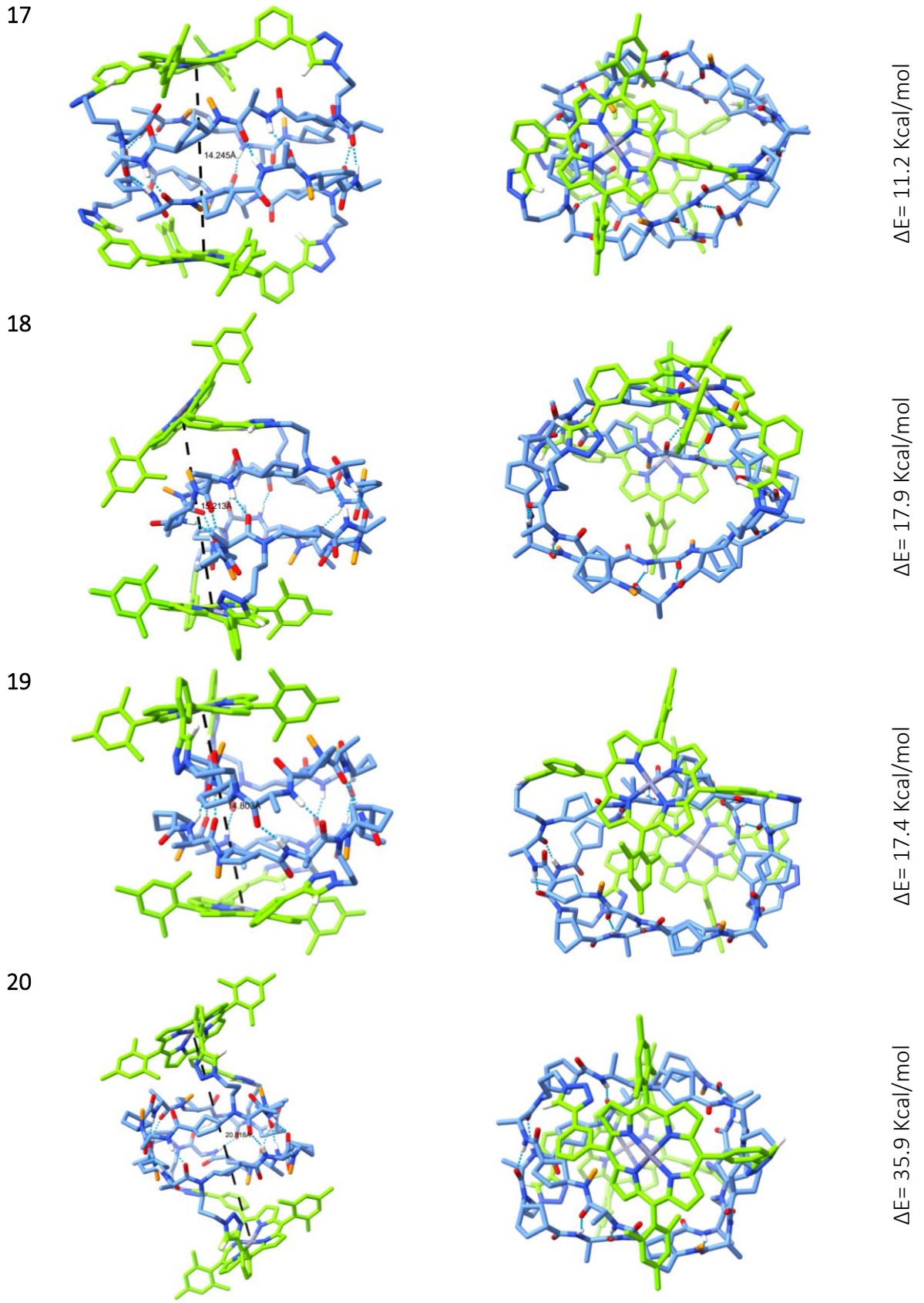
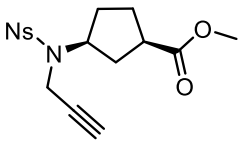


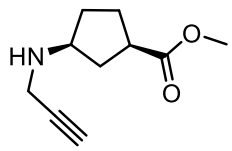
Figure 203. Geometry optimization 17-20 for the rotoisomer **R3** of the specie **D2'**. The level of calculation employed was B3LYP/3-21G// B3LYP/6-31G(d,p), including in both cases the dispersion correction gd3bj.

10.2 Heterocycles in the molecular arms of an α,γ-cyclohexapeptide: synthesis and preliminary studies on its coordination and esterase activity.

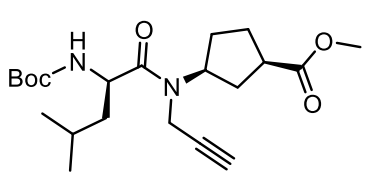
10.2.1 Synthesis and characterization



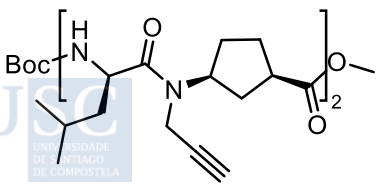
Ns-*propargyl*-*N*-*L*-γ-Acp-OMe (38). The compound **3**, (2.5 g, 7.6 mmol) was dissolved in dry DMF (38 mL) and treated with K_2CO_3 (4.2 g, 30.0 mmol) and propargyl bromide (80%, 2.68 mL, 30.0 mmol). The mixture was stirred overnight under Ar atmosphere and then DMF was mostly removed by consecutives extractions with H_2O (4x30 mL) using CH_2Cl_2 as organic phase. The organic layer was washed with aqueous HCl (5%, 2x50 mL) and saturated aqueous solutions of $NaHCO_3$ (3x50 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered, concentrated. The remaining DMF was removed by consecutives toluene addition followed by rotavapor concentrations. The product was purified by flash chromatography (10-20% AcOEt/hexane) providing the desired product **38** as a light-yellow oil [2.7 g, 97%]. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 367 (100), $[M+H]^+$.[545]



***propargyl*-*N*-*L*-γ-Acp-OMe (39).** A solution of the compound **38** (3.2 g, 8.74 mmol) in MeCN (70 mL) was treated with K_2CO_3 (6.0 g, 43.7 mmol) and PhSH (3.5 mL, 35.0 mmol). The mixture stirred overnight and then acetonitrile was evaporated under vacuum. The resulting residue was dissolved in CH_2Cl_2 and washed with H_2O (2x25 mL) and brine (2x25 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography (0-8% MeOH/CH_2Cl_2) to afford the desired product as colorless oil [1.12 g, 71%]. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 182 (100), $[M+H]^+$.[545]

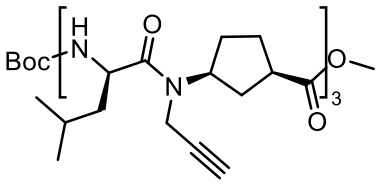


Boc-*D*-Leu-*propargyl*-*N*-*L*-γ-Acp-OMe (40). A solution of compound **39** (1.5 g, 8.3 mmol) in dry CH_2Cl_2 (40 mL) was treated with DIEA (4.3 mL, 24.9 mmol). Separately, the Boc-*D*-Leu-OH (512 mg, 2.1 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (40 mL), and then, DIEA (4.3 mL, 24.9 mmol) and *N*-HATU were added (4.7 g, 12.5 mmol). After stirring under Ar for 4 hours, the resulting solution was washed with HCl 5% (2x40 mL) and sat. aq. $NaHCO_3$ (2x40 mL), dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The crude mixture was purified by flash column chromatography (0-4% MeOH/CH_2Cl_2), to give the compound **40** as light-yellow foam [2.65 g, 81%]. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 395 (100), ($[M+H]^+$).[545]

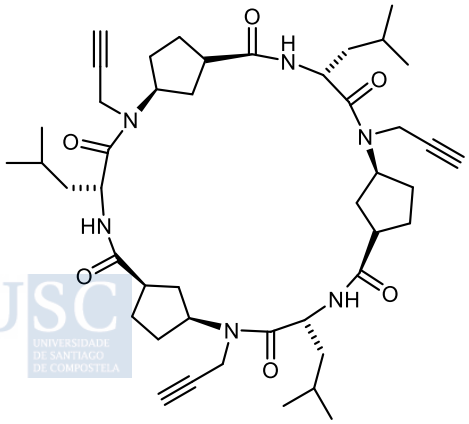


Boc-[(*D*-Leu-*propargyl*-*N*-*L*-γ-Acp)$_2$]-OMe (41). A solution of compound **40** (656 mg, 1.7 mmol) in MeOH/H_2O (Vt = 8.5 mL, 3:1) was treated with LiOH (204 mg, 8.5 mmol) and stirred for 4 h. After this time, MeOH was concentrated under reduced pressure and the resulting solution was acidified until pH 3 (HCl

5% aq.) and extracted with CH_2Cl_2 (4x15 mL). The combined organic layers were dried with anh. $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure to give the *C*- deprotected dipeptide. Parallelly, a different fraction of compound **40** (656 mg, 1.7 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (4 mL) and treated with TFA (4 mL). After stirring for 30 min, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH_2Cl_2 and further evaporated, repeating this process up to three times. The *C*- deprotected dipeptide was dissolved in dry CH_2Cl_2 (9 mL) and subsequently DIEA (1.3 mL, 5.1 mmol) and *N*-HBTU (966 mg, 2.6 mmol) were added. The *N*-deprotected dipeptide was dissolved in dry CH_2Cl_2 (9 mL) and DIEA was added (1.3 mL, 5.1 mmol). Finally, both fractions were mixed and reacted under Ar for 4 h. This solution was washed with HCl 5% (2x15 mL) and sat. aq. $NaHCO_3$ (2x15 mL), dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash column chromatography (25-50% AcOEt/hexane) to give the compound **41** as a foam [804 mg, 72%].**MS (ESI)** [m/z (%)]: 657 (100), $[M+H]^+$.[545]



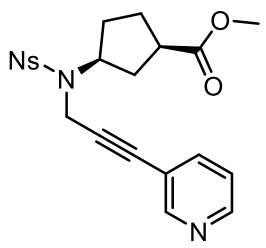
Boc-[*D*-Leu-*^{propargil}N*-*L*-γ-Acp]$_3$-OMe (42). The compound **41** (925 mg, 1.4 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (2.5 mL) and treated with TFA (3.5 mL). After stirring for 30 min, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH_2Cl_2 and further evaporated, repeating this process up to three times. Parallelly, the dipeptide **40** (656 mg, 1.7 mmol) was dissolved in MeOH/H_2O (Vt = 8.5 mL, 3:1) was treated with LiOH (204 mg, 8.5 mmol) and stirred for 4 h. After this time, MeOH was concentrated under reduced pressure and the resulting solution was acidified until pH 3 (HCl 5% aq.) and extracted with CH_2Cl_2 (4x15 mL). The combined organic layers were dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure to give the *C*- deprotected dipeptide. The *C*- deprotected dipeptide was dissolved in dry CH_2Cl_2 (8 mL) and subsequently DIEA (1.3 mL, 5.1 mmol) and *N*-HBTU (966 mg, 2.6 mmol) were added. The *N*-deprotected tetrapeptide dissolved in dry CH_2Cl_2 (8 mL) and DIEA was added (1.3 mL, 5.1 mmol). Finally, both fractions were mixed and reacted under Ar for 4 h. This solution was washed with HCl 5% (2x15 mL) and sat. aq. $NaHCO_3$ (2x15 mL), dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash column chromatography (25-70% AcOEt/hexane) to give the title compound as a white foam. [963 mg, 75%].**MS (ESI)** [m/z (%)]: 919 (100), $[M+H]^+$.[545]



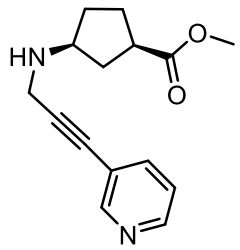
c-[(*D*-Leu-*^{propargyl}N*-*L*-γ-Acp)$_3$] (CP5). The hexapeptide **42** (1.1 g, 1,2 mmol) was dissolved in MeOH (6 mL) and water (2 mL) and then LiOH (143 mg, 6.0 mmol) was added. After stirring for 4h, the organic solvent was evaporated, and the remaining aqueous layer was acidified until pH 3 with HCl. The resulting white precipitate was extracted with CH_2Cl2 (4x5 mL), dried, filtered and concentrated. Free acid was further deprotected by a solution of TFA/CH_2Cl_2 (1:1, Vt = 6 mL), in which the product was stirred for 15 min. After completion of the reaction, TFA was removed under

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH_2Cl_2 and further evaporated, repeating this process up to three time. For the cyclization step, the oil obtained in the previous step was dissolved in dry CH_2Cl_2 (800 mL) and treated with DIEA (1 mL, 3.6 mmol) and *N*-TBTU (1.14 g, 3.6 mmol). The mixture was stirred overnight under Ar and then concentrated to reduce the volume in order to carry out the work up. Then, it was washed with 5% HCl (2x50 mL) and sat. aq. $NaHCO_3$ (2x50 mL). The organic layer was dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude was purified by flash column chromatography CH_2Cl_2-MeOH 0-10% to give the desired product **CP5** as a white powder (421 mg, 45%). **^{1}NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.11 (d, J = 9.5 Hz, 3H, NH), 5.10 (m, 3H, $H\alpha_{Leu}$), 4.80 (AB, J = 20.1 Hz, 3H, propargylic $CH_{2(1)}$), 4.66 (m, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 3.82 (AB, J = 20.1 Hz, 3H, propargylic $CH_{2(2)}$), 2.86 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.27 (s, 3H, C≡C**H**), 2.21-1.28 (m, 27H, Acp + CH_2 Leu + CH Leu), 0.94-0.84 (dd, 18H, CH_3 Leu) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 787 (100), $[M+H]^+$.[545]

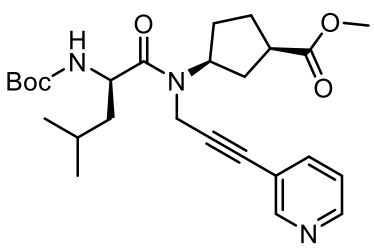


Ns-*m-pyridyl-propargyl*-*N*-*L*-γ-Acp-OMe (43). Compound **38** (200 mg, 0.55 mmol), 3-iodopyridine (123 mg, 0.6 mmol), and CuI (11 mg, 0.055 mmol) were placed inside a sealed tube., after which we proceeded to carry out argon-vacuum cycles (3-4 cycles of 10 minutes each one). On the other hand, in a 100 mL round bottom flask, a mixture of dry THF (5 mL) and freshly distilled Et_3N (2 mL) was deoxygenated by bubbling with argon for 30 minutes. Next, the $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (40 mg, 0.055 mmol) was added into the sealed tube, followed by the solvent mixture. The mixture was allowed to stir at 50 °C overnight. After that period, he proceeded to concentrate the solvents under pressure. Next, the reaction crude was redissolved in 50 mL of CH_2Cl_2 and another 50 mL of an aqueous KCN solution (12mg/mL) were added. The two phases remained stirred for 4h. Subsequently, both phases were separated by extraction. The organic fraction was dried with MgSO4, filtered, and concentrated. Finally, the crude mixture was purified by flash column chromatography (0-5% MeOH/CH_2Cl_2), which afforded the desired compound, **43**, as a yellow oil [179.0 mg, 74%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.54 (m, 1H, py), 8.46 (br, 1H, py), 8.26 (d, *J* = 9.0, 2H, Ns), 8.11 (d, *J* = 9.0, 2H, Ns), 7.55 – 7.45 (m, 1H, py), 7.25 (m, 1H, py), 4.45 (s, 2H, CH_2 propargylic), 4.41 – 4.26 (m, 1H, $H\gamma_{Acp}$), 3.67 (s, 3H, OMe), 2.86 – 2.73 (m, 1H, $H\alpha_{Acp}$), 2.61 (br, 1H, Acp), 2.25 – 1.66 (m, 5H, Acp) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 444 (100), $[M+H]^+$.

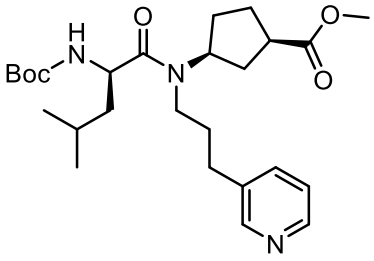


***m-pyridyl-propargyl*-*N*-*L*-γ-Acp-OMe (44).** A solution of the compound **43** (113 g, 0.26 mmol) in MeCN (2 mL) was treated with K_2CO_3 (176 mg, 1.27 mmol) and PhSH (200 µL, 2.1 mmol). The mixture stirred overnight and then acetonitrile was evaporated under vacuum. The resulting residue was dissolved in CH_2Cl_2 and washed with H_2O (2x25 mL) and brine (2x25 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography (0-8% MeOH/CH_2Cl_2) to afford the desired product, **44**, as yellow oil [50 mg, 75%].**MS (ESI)** [m/z (%)]: 259 (100), $[M+H]^+$.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

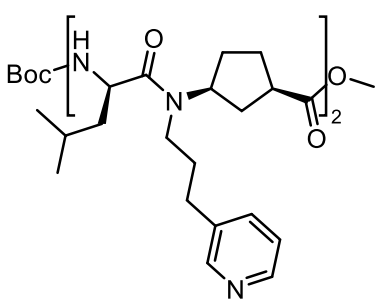


Boc-*D*-Leu-*m-pyridyl-propargyl*N-*L*-γ-Acp-OMe (45). The compound **40** (840 mg, 2.13 mmol), 3-iodopyridine (565 mg, 2.77 mmol), and CuI (40 mg, 0.213 mmol) were placed inside a sealed tube., after which we proceeded to carry out argon-vacuum cycles (3-4 cycles of 10 minutes each one). On the other hand, in a 100 mL round bottom flask, a mixture of dry THF (40 mL) and freshly distilled Et_3N (13 mL) was deoxygenated by bubbling with argon for 30 minutes. Next, the $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (150 mg, 0.213 mmol) was added into the sealed tube, followed by the solvent mixture. The mixture was allowed to stir at 50 °C overnight. After that period, he proceeded to concentrate the solvents under pressure. Next, the reaction crude was redissolved in 50 mL of CH_2Cl_2 and another 50 mL of an aqueous KCN solution (12 mg/mL) were added. The two phases remained stirred for 4h. Subsequently, both phases were separated by extraction. The organic fraction was dried with MgSO4, filtered, and concentrated. Finally, the crude mixture was purified by flash column chromatography (0-5% MeOH/CH_2Cl_2), which afforded the desired compound as a yellow foam. [702.0 mg, 75%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.64 (d, *J* = 14.2 Hz, 1H, H_1 pyridine), 8.54 (dd, *J* = 12.9, 4.9 Hz , 1H, H_2 pyridine), 7.79 (m, 1H, H_4 pyridine), 7.31 (ddd, *J* = 13.0, 7.9, 4.8 Hz, 1H, H_3 pyridine), 5.25 (d, *J* = 9.2 Hz, 0.5H, NH) and 5.13 (d, *J* = 9.2 Hz, 0.5H, NH), 4.89 and 4.42 (m, 1H, $H\gamma_{Acp}$), 4.77 (m, 1H, $H\alpha_{Leu}$), 4.66 (d, *J* = 19.1 Hz, 0.5H, **CH_2**-C≡C), 4.42 (d, *J* = 17.5 Hz, 0.5H, **CH_2**-C≡C), 4.30 (d, *J* = 17.5 Hz, 0.5H, **CH_2**-C≡C), 4.21 (d, *J* = 19.1 Hz, 0.5H, **CH_2**-C≡C), 3.70 (m, 3H, OMe), 2.86 (ddd, *J* = 13.5, 8.5, 5.4 Hz, 1H, $H\alpha_{Acp}$), 2.24-1.84 (m, 6H, Acp), 1.74 (m, 1H, CH Leu), 1.54 (m, 2H, CH_2 Leu), 1.42 (s, 9H, Boc), 0.94 ppm (m, 6H, CH_3 Leu). **^{13}C-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 176.5 and 175.9 (C), 174.0 and 172.6 (C), 155.6 (C), 152.1 (CH), 148.8 and 148.3 (CH), 138.9 (CH), 123.0 (CH), 89.7 and 89.0 (C), 81.0 (C), 79.6 (C), 57.8 and 55.0 (CH), 52.1 and 51.9 (CH), 49.5 and 48.9 (CH), 43.2 and 42.7 (CH2), 41.2 (CH3), 33.6 and 32.8 (CH2), 31.9 and 31.6 (CH2), 29.1 and 28.3 (CH2), 28.1 (CH3), 27.7 and 27.4 (CH2), 24.7 (CH), 23.5 and 23.4 (CH), 22.1 and 21.7 (CH). **HRMS (ESI)** calculated for $C_{26}H_{37}N_3O_5$: 472.2806 found: 472.2807.

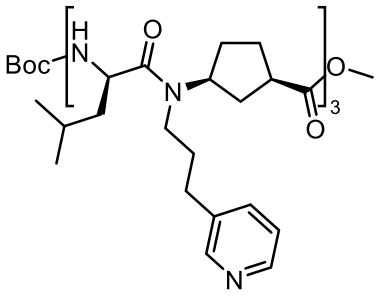


Boc-*D*-Leu-*m-pyridyl-propyl*N-*L*-γ-Acp-OMe (46). A solution of compound **45** (452 mg, 0.957 mmol) in EtOH (20 mL), under argon atmosphere, was treated with Pd/C (10% mol, 102 mg). The reaction stirred overnight under H_2 pressure (balloon). The crude was filtered through a pad of celite and concentrated under reduced pressure. Finally, the crude was purified by flash column chromatography (0-5% MeOH/CH_2Cl_2), which afforded the desired compound as an orange foam. [410.0 mg, 90%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.47 (m, 1H, H_1 pyridine), 8.45 (m, 1H, H_2 pyridine), 7.62 (m, 1H, H_4 pyridine), 7.26 (m, 1H, H_3 pyridine), 5.21 (d, *J* = 9.2 Hz, 0.6H, NH) and 5.11 (d, *J* = 9.2 Hz, 0.4H, NH), 4.67 (m, 0.5H, $H\alpha_{Leu}$) y 4.53 (m, 0.5H, $H\alpha_{Leu}$), 4.61 (m, 0.5H, $H\gamma_{Acp}$) y 4.25 (m, 0.5H, $H\gamma_{Acp}$), 3.70 and 3.67 (s, 3H, OMe), 3.34 (m, 1H, N-**$CH_{2(1)}$**-CH_2-CH_2-py) y 3.19 (m, 1H, N-**$CH_{2(2)}$**-CH_2-CH_2-py), 2.79 (m,1H, $H\alpha_{Acp}$), 2.67 (dt, *J* = 16.1, 7.9 Hz, 2H, N-CH_2-CH_2-**CH_2**-py), 2.10 (m, 2H, $H\beta_{Acp}$), 1.89 (m, 2H, N-CH_2-**CH_2**-CH_2-py), 1.68 (m, 2H, , CH_2 Leu), 1.42 (s, 9H, Boc), 0.93 (m, 6H, CH_3 Leu). **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 176.4 and 176.0 (C), 173.8 and 172.9 (C), 155.6 (C), 149.3 (CH), 149.0 (CH), 147.3 (CH), 146.7 (CH), 136.8 (CH), 123.8 (CH), 79.63 (C), 57.9 (CH), 55.6 (CH), 52.2 (CH), 52.0 (CH), 49.4 (CH), 48.9 (CH), 43.6 (CH_2), 43.4 (CH_2), 41.8 (CH_2), 41.3 (CH), 41.1 (CH), 33.1 (CH_2), 32.7 (CH_2), 32.5 (CH_2), 30.8 (CH_2), 30.5 (CH_2), 30.3 (CH_2), 29.3 (CH_2), 28.5 (CH), 28.3 (CH_2), 27.2 (CH_2), 24.8 (CH),

24.7 (CH), 23.6 (CH), 23.5 (CH), 22.1 (CH), 21.9 (CH). **HRMS (ESI)** calculated for $C_{26}H_{41}N_3O_5$: 476.3119 found: 476.3119.

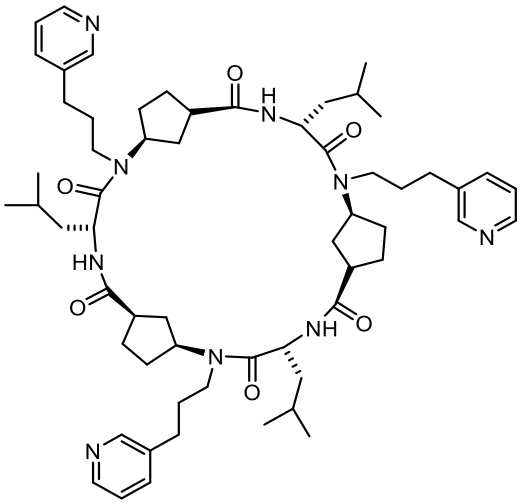


Boc-[*D*-Leu-*m-pyridyl-propyl*N-*L*-γ-Acp]$_2$-OMe (47). The compound **46** (50 mg, 0.11 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (1 mL) and treated with TFA (1 mL). After stirring for 1h, it was concentrated under reduced pressure, after which it was redissolved in CH_2Cl_2 and concentrated again. This process was repeated four times in order to remove most of the TFA. The *N*-deprotected product was obtained as an orange oil which, that was dried under high vacuum for 4h. On the other hand, another equivalent portion of **46** (50 mg, 0.11 mmol) was dissolved in MeOH (2.25 mL) and subsequently 0.75 mL of H_2O was added dropwise. After 5 minutes of stirring, LiOH (14 mg, 0.55 mmol) were added. The mixture stirred during 4h. Subsequently, the MeOH was concentrated under reduced pressure, after which the aqueous suspension was acidified to pH 5 with HCl aq. The *C*-deprotected product was extracted with CH_2Cl_2, dried over $MgSO_4$, and concentrated. The *C*-deprotected product was dissolved in dry CH_2Cl_2 (1 mL), DIEA (160 mL, 0.66 mmol) and *N*-HBTU (70 mg, 0.165 mmol) were added and allowed to stir for 10 minutes, after which all the content to another flask containing *N*-deprotected product dissolved in dry CH_2Cl_2 (1 mL) and DIEA (160 mL, 0.66 mmol) and the mixture was left stirring for 3h. Finally, the crude was purified by flash column chromatography (0-5% MeOH/CH_2Cl_2), which afforded the desired compound as yellow oil [107.0 mg, 98%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.49 (m, 2H, H_1 pyridine), 8.46 (m, 2H, H_2 pyridine), 7.67 (m, 2H, H_4 pyridine), 7.31 (m, 2H, H_3 pyridine), 6.47-6.09 (m, 1H, NH), 5.19 (m, 1H, NH), 5.02 and 4.87 (m, 1H, Hα_{Leu1}), 4.66 and 4.53 (m, 1H, Hα_{Leu2}), 4.60 (m, 1H, Hγ_{Acp1}), 4.24 (m, 1H, Hγ_{Acp2}), 3.69 (m, 6H, OMe), 3.37 (m, 2H, N-**$CH_{2(1)}$**-CH_2-CH_2-py) y 3.22 (m, 2H, N-**$CH_{2(2)}$**-CH_2-CH_2-py), 2.82 y 2.71 (m, 2H, Hα_{Acp}), 2.68 (m, 2H, N-CH_2-CH_2-**CH_2**-py), 2.11 (m, 2H, Hβ_{Acp}), 1.92 (m, 4H, N-CH_2-**CH_2**-CH_2-py), 1.66 (m, 4H, CH_2 Leu),1.42 (s, 9H, Boc), 0.93 (m, 6H, CH_3 Leu). **HRMS (ESI)** calculated for $C_{46}H_{70}N_6O_7$: 819.5379 found: 819.5372.



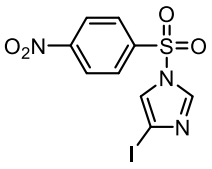
Boc-[*D*-Leu-*m-pyridyl-propyl*N-*L*-γ-Acp]$_3$-OMe (48). The compound **46** (100 mg, 0.12 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (1 mL) and treated with TFA (1 mL). After stirring for 1h, it was concentrated under reduced pressure, after which it was redissolved in CH_2Cl_2 and concentrated again. This process was repeated four times in order to remove most of the TFA. The *N*-deprotected product was obtained as a yellow oil which, that was dried under high vacuum for 4h. On the other hand, the compound **45** (60 mg, 0.12 mmol) was dissolved in MeOH (2.25 mL) and subsequently 0.75 mL of H_2O was added dropwise. After 5 minutes of stirring, LiOH (15 mg, 0.6 mmol) were added. The mixture stirred during 4h. Subsequently, the MeOH was concentrated under reduced pressure, after which the aqueous suspension was acidified to Ph 4 with HCl aq. The *C*-deprotected product was extracted with CH_2Cl_2, dried over $MgSO_4$, and concentrated. The *C*-deprotected product was dissolved in dry CH_2Cl_2 (1 mL), DIEA (160 mL, 0.66 mmol) and *N*-HBTU (70 mg, 0.165 mmol) were added and allowed to stir for 10 minutes, after which all the content to another flask containing *N*-deprotected product dissolved in dry CH_2Cl_2 (1 mL) and DIEA (160

mL, 0.66 mmol) and the mixture was left stirring for 3h. Finally, the crude was purified by flash column chromatography (0-5% MeOH/CH_2Cl_2), which afforded the desired compound as pale-yellow oil [110.0 mg, 81%]. **^{1}H NMR** (500 MHz,$CDCl_3$) δ 8.58 – 8.38 (m, 6H, pyridine), 7.76 – 7.48 (m, 3H, pyridine), 7.22 (dt, *J* = 7.8, 3.7 Hz, 3H, pyridine), 6.81 – 6.22 (m, 2H, NH), 5.24 and 5.11 (m, 1H, NH), 5.06 – 4.47 (m, 3H, $H\alpha_{Leu}$), 4.32 – 4.00 (m, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 3.78 – 3.63 (m, 3H, OMe), 3.38 (ddt, *J* = 17.7, 10.7, 5.8 Hz, 3H, N-**$CH_{2(1)}$**-CH_2-CH_2-py), 3.28 – 3.13 (m, 3H, N-**$CH_{2(2)}$**-CH_2-CH_2-py), 3.05-2.72 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.73-2.55 (m, 9H, N-CH_2-**CH_2**-**CH_2**-py), 2.22-1.15 (36H, 18H Acp + 9H Leu + 9H Boc (1.40 ppm)), 1.00-0.81 (m, 18H, CH_3 Leu). **HRMS (ESI)** calculated for $C_{66}H_{99}N_9O_9$: 1162.7639 found: 1162.7630.

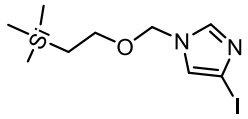


***c*-[*D*-Leu-*$^{m\text{-}pyridyl\text{-}propyl}$N*-*L*-γ-Acp]$_3$ (CP6e)**. To a solution of compound **48** (110 mg, 0.095 mmol) in MeOH (2 mL) and H_2O (0.5 mL) LiOH (12.0 mg, 0.47 mmol) was added and the resulting mixture was stirred for 4 h. Then, the organic solvent was concentrated under reduced pressure and the remaining aqueous solution was acidified until pH 3.5 (HCl 5% aq.), extracted with CH_2Cl_2 (4x10 mL), dried with anhydrous $MgSO_4$ and filtered. After solvent evaporation, the free acid was obtained as a white foam. This foam was further dissolved in CH_2Cl_2 (1 mL) and treated with TFA (1 mL). After stirring for 30 min, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH_2Cl_2 and successively evaporated. This process was repeated three times. This residue was dissolved in dry CH_2Cl_2 (63 mL) and then DIEA (2.5 mL, 14.3 mmol) and *N*-TBTU (91 mg, 0.285 mmol) were added. The reaction stirred overnight. Then, the organic solution was washed with H_2O (2x30 mL). The organic layer was dried with anhydrous. $MgSO_4$, filtered and concentrated by rotary-evaporation. The crude mixture was purified by flash column chromatography (0-15% MeOH/CH_2Cl_2), 0.1% Et_3N was added when the polarity reached 15% MeOH. The desired product was obtained as a white solid. [36.1 mg, 37%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ 8.50 (broad s, 3H, H_1 pyridine), 8.45 (broad s, 3H, H_2 pyridine), 8.33 (d, *J* = 9.5 Hz, 3H, NH), 7.58 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H, H_4 pyridine), 7.26 (m, 3H, H_3 pyridine), 5.07 (td, *J* = 10.0, 4.0 Hz, 3H, $H\alpha_{Leu}$), 4.56 (tt, *J* = 11.2, 6.9 Hz, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 3.71 (ddd, *J* = 15.8, 11.2, 5.1 Hz, 3H, N-**$CH_{2(1)}$**-CH_2-CH_2-py), 3.18 (ddd, *J* = 15.9, 11.1, 5.4 Hz, 3H, N-**$CH_{2(2)}$**-CH_2-CH_2-py), 3.03 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.69 (dddd, *J* = 36.0, 13.9, 11.2, 6.0 Hz, 6H, N-CH_2-CH_2-**CH_2**-py), 2.22 (dt, *J* = 12.4, 7.5 Hz, 3H, *cis*-$H\beta_{Acp}$), 1.99 (m, 3H, *cis*-$H\varepsilon_{Acp}$), 1.92 (m, 6H, N-CH_2-**CH_2**-CH_2-py), 1.83 (m, 6H, CH_2 Leu), 1.80-1.67 (m, 9H, 3H *trans*-$H\varepsilon_{Acp}$ + 3H *trans*-$H\delta_{Acp}$ + *cis*-$H\delta_{Acp}$), 1.63 (m, 3H, CH Leu), 1.43 (td, *J* = 11.8, 9.4 Hz, 3H, *trans*-$H\beta_{Acp}$), 0.92 (t, *J* = 6.6 Hz, 18H, CH_3 Leu). **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_2Cl_2) δ: 176.7 (C), 174.6 (C), 150.3 (CH), 148.1 (CH), 137.1 (CH),

136.2 (C), 124.0 (CH), 56.4 (CH), 47.6 (CH), 46.4 (CH2), 43.6 (CH2), 43.1 (CH), 41.2 (CH2), 36.3 (CH2), 34.1 (CH2), 30.9 (CH2), 29.3 (CH2), 27.5 (CH2), 25.2 (CH), 23.9 (CH3), 22.3 (CH3). **FTIR (CaF2)**: ν = 3288 (amide A), 1621 (amide I), 1532 (amide II) cm^{-1}. **HRMS (ESI)** calculated for $C_{60}H_{87}N_9O_6$: 1030.6852 found: 1030.6855.



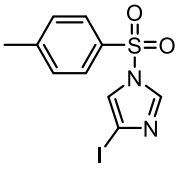
4-iodo-1-nosyl-imidazole (49). 4-iodo-*1H*-imidazole (100 mg, 0.5 mmol) and *p*-nitrobenzenesulfonyl chloride (126 mg, 0.55 mmol) were added into a Schlenk tube, previously purged, under argon atmosphere. Then, 3-4 vacuum-argon flow cycles were done. Separately, in a dry and purged flask, a mixture of dry THF (3 mL) and freshly distilled Et_3N (1 mL) was degasified through argon bubbling for 15 minutes. After that, the solvents mixture was added into the Schlenk tube, and the reaction stirred overnight. Then, the mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The solid was recrystallized from CH_2Cl_2 to get the pure product as a yellow solid. [78.5 mg, 40%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, CD_3CN) δ: 8.40 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, CH Ar), 8.23 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, CH Ar), 8.04 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, CH imidazole), 7.68 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, CH imidazole) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 379 (100), $[M+H]^+$.



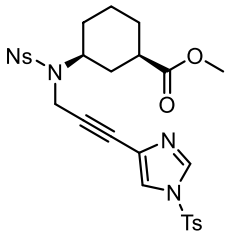
4-iodo-1-SEM-imidazole (50). A solution of 4-iodo-*1H*-imidazole (200 mg, 1.04 mmol) in dry TFH (3 mL) was cooled to 0 °C and NaH (60% mineral oil, 60 mg, 1.5 mmol) was added portionwise. The mixture was allowed to warm up to rt and stirred for 1.5 h, then cooled to 0 °C again and 2-(chloromethoxy)ethyl)trimethylsilane (SEM-Cl) (180 mL, 1.04 mmol) was added dropwise. The mixture was allowed to warm up to rt and stirred overnight. In order to quench the NaH, the mixture was cooled to 0 °C, and small amount of H_2O was added. After that, the solvent was removed under reduced pressure and the crude was redissolved in CH_2Cl_2, and then washed with H_2O (3x15 mL) and NaCl aq. (3x15 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting yellow oil (266 mg) contained a mixture of two regioisomers, the 4-iodo-1-SEM-imidazole and the 5-iodo-1-SEM-imidazole. The mixture was then subjected to an isomerization procedure. It was redissolved DMF (6 mL), and SEM-Cl was added (20 mL, 0.1 mmol). The mixture stirred overnight at 75 °C, with reflux. Then, the DMF was removed under reduced pressure. The oil was redissolved in CH_2Cl_2 and washed with H_2O (7x15 mL). The crude was purified by chromatography column (0-10% CH_2Cl_2/Hexane) in order to obtain the pure product a light-yellow oil [97 mg, 30%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.50 (s, 1H, CH imidazole), 7.13 (s, 1H, CH imidazole), 5.23 (s, 2H, CH_2-N), 3.47 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH_2-O), 0.89 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH_2-TMS), -0.02 (s, 9H, TMS). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 325 (100), $[M+H]^+$.[629,630]

Note: synthetic procedure for compounds **52** and **53** are described in the following section, along with the whole synthesis of **CP10**.

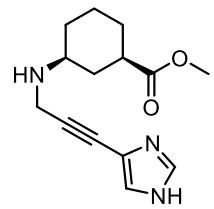
[629] He, Y.; Chen, Y.; Du, H.; Schmid, L. A.; Lovely, C. J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5529-5532.
[630] Harusawa, S.; Araki, L.; Terashima, H.; Kawamura, M.; Takashima, S.; Sakamoto, Y.; Hashimoto, T.; Yamamoto, Y.; Yamatodani, A.; Kurihara, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 832-837.



4-iodo-1-tosyl-imidazole (56). 4-iodo-*1H*-imidazole (200 mg, 1.04 mmol) and *p*-toluensulfonyl chloride (216 mg, 1.14 mmol) were added into a Schlenk tube, previously purged, under argon atmosphere. Then, 3-4 vacuum-argon flow cycles were done. Separately, in a dry and purged flask, a mixture of dry THF (4 mL) and freshly distilled Et_3N (0.15 mL) was degasified through argon bubbling, for 15 minutes. Then, the solvents mixture was added into the Schlenk tube, and the reaction stirred overnight. Then, the mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The solid was recrystallized from CH_2Cl_2 to get the pure product as a white solid. [222.0 mg, 56%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.88 (s, 1H, CH imidazole), 7.83 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, CH Ar), 7.40 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, CH Ar), 7.37 (s, 1H, CH imidazole), 2.46 (s, 2H, CH_3-Ar) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 349 (100), $[M+H]^+$.[631]



Ns-$^{tosyl\text{-}imidazolyl\text{-}propargyl}$*N*-*L*-γ-Ach-Ome (57). 4-iodo-1-tosyl-imidazole (66 mg, 0.19 mmol) and CuI (3.4 mg, 0.019) were placed into a sealed tube into a dry and previously purged sealed tube equipped with a stirring bar. Several high vacuum-argon cycles of about ten minutes duration each one (5-6 cycles). Simultaneously, in a dry and purged round bottom flask, fresh distillated Et_3N (2 mL) and dry TFH (2 mL) were placed and degasified during 5 minutes. When the sealed tube cycles were done, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (13 mg, 0.018 mmol) were added. Because of the viscose consistency of compound **52**, it was added to the sealed tube from a solution in the mixture of dry and degasified solvents prepared before (72 mg, 0.019 mmol, dissolved in 2 mL). After that, the rest of solvent was added. Then, the tube was sealed and the mixture was allowed to react overnight at 50 °C. After cooling down, the solvents were removed under reduced pressure. Then, the crude was redissolved in dichloromethane and washed with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (3x30 Ml). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The solid was purified first by flash chromatography (0-10% MeOH/CH_2Cl_2) and to give the desired product as a yellow oil (60 mg, 53%) **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.24 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar-Ns), 8.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H. Ar-Ns), 7.88 (s, 1H, CH imidazole), 7.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar-Ts), 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar-Ts), 7.26 (s, 1H, CH imidazole), 4.41 (AB system, *J* = 18.9 Hz, 1H, CH_2 propargylic), 4.25 (AB system, *J* = 18.8 Hz, 1H, CH_2 propargylic), 3.80 (m, 1H, $H\gamma_{Ach}$), 3.65 (s, 3H, OMe), 2.46 (s, 3H, CH_3-Ts), 2.37 (m, 1H, $H\alpha_{Ach}$), 2.01-1.30 (m, 8H, Ach). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 601 (100), $[M+H]^+$.

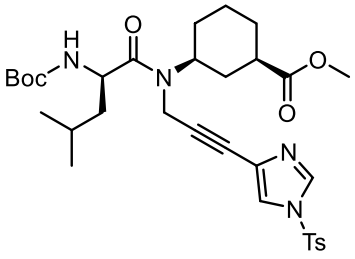


imidazolyl-^{propargyl}*N*-*L*-γ-Ach-Ome (59). A solution of compound **57** (80 mg, 0.13 mmol) in dry acetonitrile (2 mL) was treated with K_2CO_3 (91 mg, 0.66 mmol) and thiophenol (106 mL, 1.04 mmol). The solution stirred during 5 hours. Then, the solvent was removed under reduced pressure and the crude was redissolved in CH_2Cl_2 and washed with NaCl (3x15 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography (firstly: 40-100% AcOEt:Hexane;

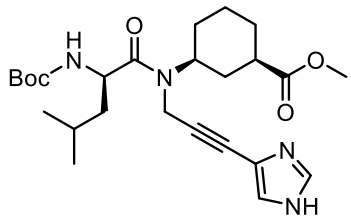
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[631] Cliff, M. D.; Pyne, S. G. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2378-2383.

secondly: 0-50% MeOH:AcOEt) in order to obtain the pure product as a light-yellow oil (15 mg, 50%). **^{1}H NMR** (300 MHz, MeOH-d_4) δ: 7.66 (s, 1H, CH imidazole), 7.27 (s, 1H, CH imidazole), 3.78 (s, 2H, CH_2 propargylic), 3.68 (s, 3H, OMe), 2.92 (m, 1H, $H\gamma_{Ach}$), 2.45 (m, 1H, $H\alpha_{Ach}$), 2.25 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H, Ach), 2.09 – 1.73 (m, 3H, Ach), 1.52 – 1.06 (m, 4H, Ach).**MS (ESI)** [m/z (%)]: 262 (100), $[M+H]^+$.

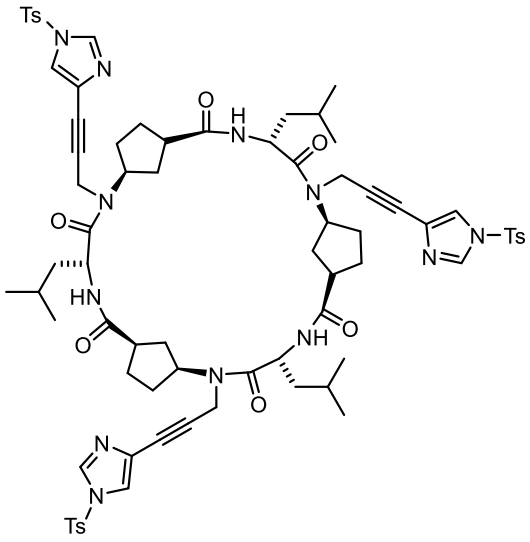


Boc-*D*-Leu-*tosyl-imidazolyl-propargyl*N-*L*-Ach-OMe (60). 4-iodo-1-tosyl-imidazole (40 mg, 0.12 mmol) and CuI (2 mg, $9.2x10^{-3}$ mmol) were placed into a sealed tube into a dry and previously purged sealed tube equipped with a stirring bar. Several high vacuum-argon cycles of about ten minutes duration each one (5-6 cycles). Simultaneously, in a dry and purged round bottom flask, fresh distillated Et_3N (0.8 mL) and dry TFH (2 mL) were placed and degasified during 5 minutes. When the sealed tube cycles were done, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (13 mg, $9.2x10^{-3}$ mmol) were added. Because of the viscose consistency of compound **53**, it was added to the sealed tube from a solution in the previously dried and degasified solvents (40 mg, 0.097 mmol, dissolved in 1 mL). After that, the rest of solvent was added. Then, the tube was sealed, and the mixture was allowed to react overnight at 50 °C. After cooling down, the solvents were removed under reduced pressure. Then, the crude was redissolved in dichloromethane and washed with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (3x10 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The solid was purified first by flash chromatography (0-10% MeOH/CH_2Cl_2) and to give the desired product as a light-yellow oil [49 mg, 80%]. **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.89 (s, 1H, CH imidazole), 7.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, Ar), 7.41 (s, 1H, CH imidazole), 7.36 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, Ar), 5.25 – 4.95 (m, 1H, NH Leu), 4.74 – 3.98 (m, 4H, $H\alpha_{Leu}$ + $H\gamma_{Ach}$ + CH_2 propargylic), 3.77-3.56 (2s, 3H, OMe), 2.44 (s, 3H, CH_3-Ts), 2.16-1.16 (m, 20H, 8H Ach + 9H Boc + 2H CH_2 Leu + 1H CH Leu), 0.93 (m, 6H, CH_3 Leu) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 629 (100), $[M+H]^+$.

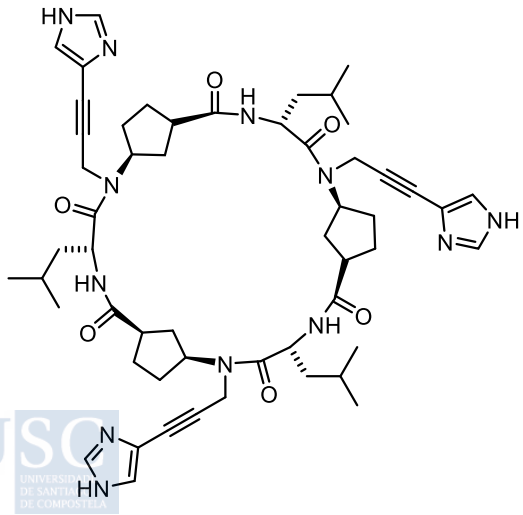


Boc-*D*-Leu-*imidazolyl-propargyl*N-*L*-Ach-OMe (61). A solution of compound **60** (15 mg, 0.024 mmol) in dry acetonitrile (1 mL) was treated with K_2CO_3 (17 mg, 0.12 mmol) and thiophenol (20 mL, 0.19 mmol). The solution stirred during 6 hours. Then, the solvent was removed under reduced pressure and the crude was redissolved in CH_2Cl_2 and washed with NaCl (3x5 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography (0-50% MeOH/CH_2Cl_2) in order to obtain the pure product as a light-yellow oil (6 mg, 50%). This procedure was followed in the same way using as nucleophile the 2-aminothiophenol, the 4-metoxythiophenol and the 2-mercaptobenzylalcohol, that provided the same product in a 45%, 80% and 35% of yield, respectively. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 475 (100), $[M+H]^+$.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



***c*-[(*D*-Leu-$^{tosyl\text{-}imidazolyl\text{-}propargyl}$*N*-*L*-γ-Acp)$_3$] (CP7a).** In a dry a purged sealed tube, **CP5** (25 mg, 0.0317 mmol), compound **56** (66 mg, 0.191 mmol) and CuI (1 mg, $3.17x10^{-3}$ mmol) were introduced. Then, 3-4 vacuum-argon flow cycles were done. Separately, in a dry and purged flask, a mixture of dry DMF (3.2 Ml) and freshly distilled Et_3N (0.7 Ml) was degasified through argon bubbling, during 15 minutes. Then, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (2 mg, $3.17x10^{-3}$ mmol) was added into the sealed tube and immediately latter, the mixture of solvents was added too. The reaction stirrer during 24 h at 75 °C. After that, the solvents were removed under reduced pressure, using toluene to completely remove the DFM. The crude was redissolved in CH_2Cl_2 (20 Ml) and stirred during 3 h with a KCN aqueous solution (12 g/Ml, 20 Ml). After that, the organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. Finally, the crude mixture was purified by flash column chromatography (0-10% MeOH/CH_2Cl_2), which afforded **CP7a** as a light-yellow solid. [20.0 mg, 43%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.17 (d, *J* = 9.6 Hz, 3H, NH), 7.92 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H, CH imidazole), 7.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H, CH Ar), 7.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 3H, CH Ar), 7.32 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, CH imidazole), 5.17 (td, *J* = 9.4, 4.8 Hz, 3H, $H\alpha_{Leu}$), 4.98 (d, *J* = 19.0 Hz, 3H, **$CH_{2(1)}$**-C≡CH), 4.70 (t, *J* = 9.2 Hz, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 3.99 (d, *J* = 19.1 Hz, 3H, **$CH_{2(2)}$**-C≡CH), 2.95 – 2.82 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.18 (dt, *J* = 14.0, 7.2 Hz, 3H, *cis*-$H\beta_{Acp}$), 2.10 – 1.98 (m, 6H, 3H *trans*-$H\varepsilon_{Acp}$ + 3H *trans*-$H\delta_{Acp}$), 1.88 (m, 3H, *cis*-$H\delta_{Acp}$), 1.78 (m, 3H, *cis*-$H\varepsilon_{Acp}$), 1.70 (ddd, *J* = 13.2, 9.3, 4.2 Hz, 3H, **$CH_{2(1)}$** Leu), 1.62 (dq, *J* = 12.0, 6.3 Hz, 3H, CH Leu), 1.55 (ddd, *J* = 13.0, 8.5, 4.7 Hz, 3H, **$CH_{2(2)}$** Leu), 0.85 (dd, *J* = 12.8, 6.4 Hz, 18H). **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.9 (C), 173.9 (C), 146.9 (C), 136.5 (CH), 134.6 (C), 130.6 (CH), 127.5 (CH), 126.4 (C), 121.1 (CH), 88.2 (C), 76.7 (C), 55.1 (CH), 47.7 (CH), 41.9 (CH), 41.7 (CH2), 36.3 (CH2), 33.7 (CH2), 29.7 (CH2), 27.8 (CH2), 24.8 (CH), 23.4 (CH3), 22.1 (CH3), 21.7 (CH3). **FTIR (CaF2)**: ν = 3300 (amide A), 1624 (amide I), 1532 (amide II), 1174 (CH aryl), 1080 (CH aryl) cm^{-1}. **HRMS (ESI) calculated** for $C_{75}H_{90}N_{12}NaO_{12}S_3$ 1469.5856, **found** 1469.5868.



***c*-[(*D*-Leu-$^{imidazolyl\text{-}propargyl}$*N*-*L*-Acp)$_3$] (CP7b).** The imidazole-protected peptide **CP7a** (30 mg, 0.02 mmol) was dissolved in DMF (4 mL). K_2CO_3 (42 mg, 0.302 mmol) and *p*-methoxythiophenol (80 µl, 0.48 mmol) were added. The reaction stirred overnight. After that, the DMF was removed under reduced pressure, using toluene to completely remove it. With the crude solid in a flask, CH_2Cl_2 (in which the product in insoluble) was used to solubilize the excess of *p*-methoxythiophenol and secondary derivates and remove them. The product remains in the flask walls. Finally, the product was purified by size exclusion chromatography, using LH-20 Sefadex® as

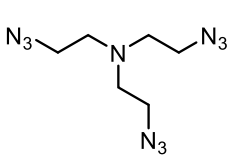
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

stationary phase and HPLC methanol as mobile phase. The pure product was obtained as a white solid. [11.4 mg, 50%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, MeOD-*d4*) δ: 8.44 (d, *J* = 9.1 Hz, 3H, NH), 7.65 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, CH imidazole), 7.26 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, CH imidazole), 5.17 (dd, *J* = 8.5, 4.3 Hz, 3H, $H\alpha_{Leu}$), 4.94 (d, *J* = 19.1 Hz, 3H, **$CH_{2(1)}$**-C≡CH), 4.82 (m, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 4.25 (d, *J* = 19.0 Hz, 3H, **$CH_{2(2)}$**-C≡CH), 2.96 – 2.86 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.16 (m, 3H, *cis*-$H\delta_{Acp}$), 2.05 (m, 6H, 3H *trans*-$H\delta_{Acp}$ + 3H *cis*-$H\beta_{Acp}$), 1.97 (m, 3H, $H\varepsilon_{Acp}$), 1.88 (ddd, *J* = 11.5, 7.9, 5.9 Hz, 3H, $H\varepsilon_{Acp}$), 1.77 – 1.55 (m, 9H, CH Leu + CH_2 Leu), 1.46 (q, *J* = 11.1 Hz, 3H, *trans*-$H\beta_{Acp}$), 0.93 (dd, *J* = 10.8, 5.5 Hz, 18H, CH_3 Leu). **^{13}C NMR** (126 MHz, MeOH-d_4) δ: 177.9 (C), 175.3 (C), 137.2 (CH), 56.4 (CH), 49.4 (CH), 43.3 (CH), 42.3 (CH2), 37.0 (CH2), 35.8 (CH2), 34.2 (CH2), 30.6 (CH2), 28.6 (CH2), 26.0 (CH), 23.7 (CH3), 22.3 (CH3). **FTIR (CaF2)**: ν = 3291 (amide A), 1627 (amide I), 1538 (amide II) cm^{-1}. **HRMS (ESI) calculated** for $C_{54}H_{72}N_{12}NaO_6$ 1007.5590, **found**. 1007.5575.

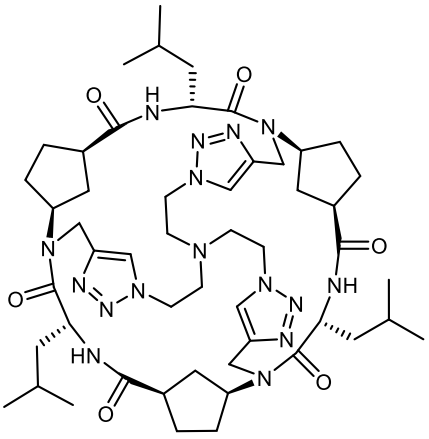
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10.3 Supramolecular capsules for anion recognition

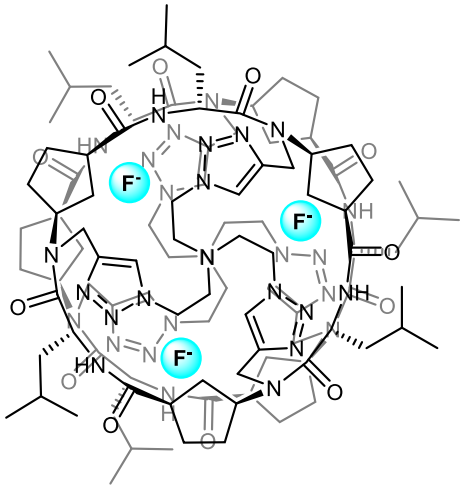
10.3.1 Synthesis and characterization



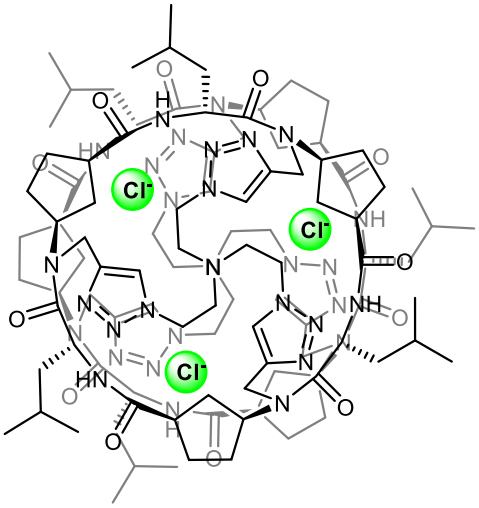
Tris(2-azidoethyl)amine. The tris(2-aminoethyl)amine (300 mg, 2.05 mmol) was dissolved in methanol. Then, K_2CO_3 (2.126 g, 15.4 mmol) and $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (16 mg, 0.06 mmol) were added. Finally, the imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride was added. The blue solution was stirred overnight, after which, the color turned paled green. The conversion was checked by mass spectrometry, where only the mass of the product was found. The methanol was removed under reduced pressure and the product was extracted with ethyl acetate and washed with H_2O (3x15 mL). The organic layer was dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated. The product, a transparent and colorless oil, was used in the following step without further purification [276 mg, 60%] and its spectroscopic properties agree with the previously reported.[574b] **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$). δ (ppm): 3.36 (t, *J* = 6.1 Hz, 3H, N_3-CH_2-**CH_2**-N), 2.80 (t, *J* = 6.2 Hz, N_3-**CH_2**-CH_2-N). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 225 (100), $[M]^+$.



c-[(*D*-Leu-*triazolylamine N-L*-γ-Acp-)$_3$] (D8). Cyclic peptide **CP5** (50 mg, 0.064 mmol), tris(2-azidoethyl)amine (21 mg, 0.095 mmol) and DBU (20 uL, 0.192 mmol), were dissolved in dry toluene (64 mL). Then, the solution was degassed with Ar flow for 40 minutes. After that, the mixture was heated to reflux and then CuBr (1.8 mg, 0.013 mmol) was added. The mixture was stirred at reflux under Ar overnight. After cooling, the mixture was filtered over filter paper, the filtrate was dissolved methanol as solvent and concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in CH_2Cl_2 (30 mL) and treated with an aqueous solution of KCN (10mg/mL) (30 mL). The resulting two phases mixture were vigorous stirred for two hours. The organic layer was dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude was purified by flash column chromatography (0-10% CH_2Cl_2-MeOH) and by normal-phase HPLC (2-10% MeOH/CH_2Cl_2 over 30 min) to give **D2** as a white solid (31 mg, 48%, t_R = 18 min). **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.04 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, NH), 7.71 (s, 1H, H triazole), 4.86 (td, *J* = 9.3 and 4.3 Hz, 3H, $H\alpha_{Leu}$), 4.80 – 4.68 (m, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 4.59 (s, 6H, CH_2 linker), 4.09 (dt, *J* = 14.0 and 4.0 Hz, 3H, $H_{A\ CAP}$), 3.40 (ddd, *J* = 13.5, 9.1, 3.5 Hz, 3H, $H_{B\ CAP}$), 3.25 (ddd, *J* = 15.0, 9.1 and 3.4 Hz, 3H, $H_{C\ CAP}$), 2.96 (dt, *J* = 10.6 and 7.3 Hz, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.85 (dt, *J* = 15.0 and 4.1 Hz, 3H, $H_{D\ CAP}$) , 2.49 (dt, *J* = 12.6 and 6.7 Hz, 3H, *cis*-$H\beta_{Acp}$), 2.10 – 2.00 (m, 3H, *trans*-$H\varepsilon_{Acp}$), 1.95 (m, 3H, *cis*-$H\delta_{Acp}$), 1.90 (m, 3H, *cis*-$H\varepsilon_{Acp}$), 1.76 – 1.66 (m, 3H, *trans*-$H\delta_{Acp}$), 1.62-1.54 (m, 6H, CH Leu + CH_2 Leu), 1.44 (tt, *J* = 10.0 and 4.2 Hz, 3H, CH_2 Leu), 1.34 (q, *J* = 11.6 Hz, 3H, *trans*-$H\beta_{Acp}$), 0.95 – 0.83 (m, 18H, CH_3 Leu) ppm. **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_2Cl_2) δ: 175.3 (C), 174.9 (C), 145.2 (C), 124.4 (CH), 57.8 (CH_2), 57.0 (CH), 51.1 (CH_2), 49.3 (CH), 43.6 (CH_2), 43.0 (CH), 40.3 (CH_2), 38.1 (CH_2), 28.3 (CH_2), 28.6 (CH_2), 25.3 (CH), 23.7 (CH_3), 22.3 (CH_3) ppm **FTIR (CaF2)**: ν = 3316 (amide A), 1623 (amide I) and 1532 cm-1 (amide II). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 1033.6 (100) ($[M+Na]^+$), 2045.2 ($[2M+Na]^+$). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{51}H_{78}N_{16}NaO_6$: 1033.6182; found: 1033.61.89. **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{102}H_{156}N_{32}NaO_{12}$: 2044.2473; found: 2044.2485.

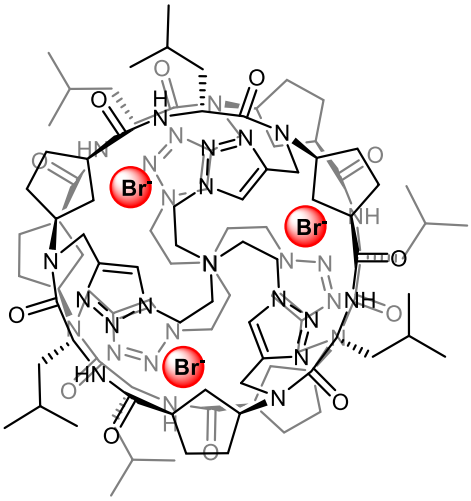


D8-fluoride complex. In an NMR tube was prepared a solution of **D8** in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 (7.3 mM, 450 µL,) containing dioxane (2.5 mM). Consecutives additions of a solution of TBAF in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 containing dioxane (2.5 mM) up to 3.1 equivalents were added. **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 9.99 (s, 3H, NH), 7.38 (s, 3H, H triazole), 4.94 (d, *J* = 16.0 Hz, 3H, CH_2 linker), 4.90 (m, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 4.19 (m, 3H, $H_{A'\ CAP}$), 4.16 (m, 3H, $H\alpha_{Leu}$), 4.05 (d, *J* = 16.0 Hz, 3H, CH_2 linker), 3.81 (ddd, *J* = 14.4, 8.7 and 3.0 Hz, 3H, $H_{B'\ CAP}$), 3.18 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.74 (ddd, *J* = 14.7, 8.8 and 3.3 Hz, 3H, $H_{C'\ CAP}$), 2.61 (dt, *J* = 15.1 and 3.9 Hz, 3H, $H_{D'\ CAP}$), 2.15 (m, 3H, *cis*-$H\varepsilon_{Acp}$), 2.01 (m, 3H, *cis*-$H\delta_{Acp}$), 1.88 (m, 3H, CH_2 Leu), 1.80 (m, 3H, CH Leu), 1.62 (m, 6H, *trans*-$H\delta_{Acp}$ + *trans*-$H\varepsilon_{Acp}$) 1.57 (m, 3H, *trans*-$H\beta_{Acp}$), 1.50 (m, 3H, CH_2 Leu), 1.39 (m, 3H, *cis*-$H\beta_{Acp}$) , 0.97 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH_3 Leu), 0.89 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH_3 Leu) ppm. **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_2Cl_2) δ: 176.8 (C), 173.7 (C), 148.3 (C), 124.4 (CH), 58.0 (CH_2), 55.6 (CH), 53.9 (CH_2), 49.9 (CH), 41.9 (CH_2), 39.8 (CH), 39.1 (CH_2), 32.5 (CH_2), 30.2 (CH_2), 29.0 (CH_2), 25.6 (CH), 23.3 (CH_3), 22.1 (CH_3) ppm. **FTIR (CaF2)**: v = 3244 (amide A), 1632 (amide I), 1577 and 1556 cm-1 (amide II).

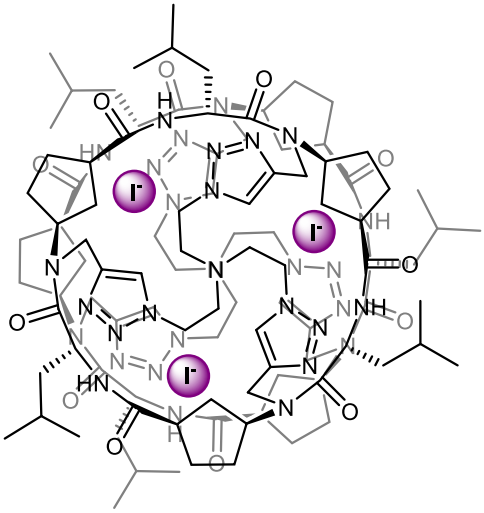


D8-chloride complex. In an NMR tube was prepared a solution of **D8** in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 (5.5 mM, 450 µL) containing dioxane (2.5 mM). Consecutives additions of a solution of TBACl in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 containing dioxane (2.5 mM) up to 24.7 equivalents were added. **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.62 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H, NH), 7.29 (s, 3H, triazole), 4.90 (d, *J* = 16.1 Hz, 3H, CH_2 linker), 4.83 (dq, *J* = 15.8, 8.3 Hz, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 4.20 (m, 3H, $H\alpha_{Leu}$), 4.15 (m, 3H, $H_{A'\ CAP}$), 4.04 (d, *J* = 16.1 Hz, 3H, CH_2 linker), 3.66 (ddd, *J* = 14.3, 8.9, 3.0 Hz, 3H, $H_{B'\ CAP}$), 3.27 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.79 (ddd, *J* = 14.8, 8.9, 3.2 Hz, 3H, $H_{C'\ CAP}$), 2.58 (dt, *J* = 14.9, 4.0 Hz, 3H, $H_{D'\ CAP}$), 2.12 (m, 3H, Acp), 1.80 (m, 3H, Acp), 1.76 (m, 3H, CH Leu), 1.60 (m, 6H, CH_2 Leu), 1.64-1.30 (m, 18H, Acp [1.61 and 1.30, $H\beta_{Acp}$], 0.95 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H, CH_3 Leu), 0.88 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH_3 Leu) ppm. Note: the described multiplicities were taken from the experiment where 24.7 equivalents were added over **D8**, while the 2D NMR spectra were recorded from the sample that contain TMSS as standard and just 14.2 equivalents of TBACl. This was done in order to reduce the noise produced by the signals proceeding from the TBA^+, and then allow to better observe the **D8-chloride** complex crosspeaks, while D8 still present in the sample.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

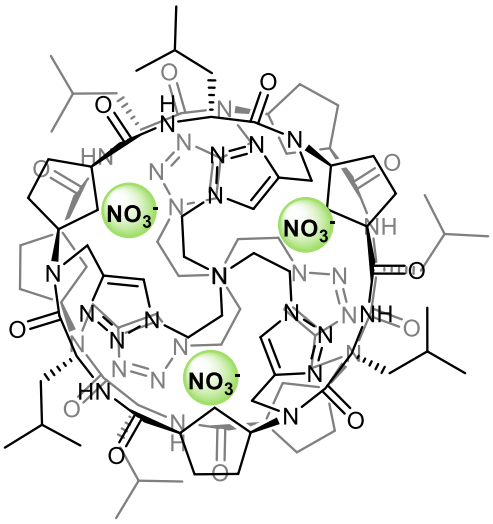


D8-bromide complex. In an NMR tube was prepared a solution of **D8** in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 (5.6 mM, 450 µL) containing dioxane (2.5 mM). Consecutives additions of a solution of TBABr in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 containing dioxane (2.5 mM) up to 28 equivalents were added. ^{1}**H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.35 (d, *J* = 4.4 Hz, 3H, NH), 7.28 (s, 3H, triazole), 4.82-4.60 (6H, 3H CH_2 linker + 3H $H\gamma_{Acp}$), 4.24-4.16 (m, 6H, $H\alpha_{Leu}$ + $H_{A'\ CAP}$), 4.05 (d, *J* = 16.1 Hz, 3H, CH_2 linker), 3.79 (ddd, *J* = 14.4, 8.8, 3.1 Hz, 3H, $H_{B'\ CAP}$), 3.24-3.08 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.75 (ddd, *J* = 19.3, 11.2, 5.4 Hz, 3H, $H_{C'\ CAP}$), 2.55 (dt, *J* = 15.1, 4.1 Hz, 3H, $H_{D'\ CAP}$), 2.10 (m, 3H, Acp), 1.84 (m, 3H, Acp), 1.80-1-19 (m, 27H, 3H CH Leu + 6H CH_2 Leu + 18H, Acp), 0.94 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H, CH_3 Leu), 0.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH_3 Leu) ppm.

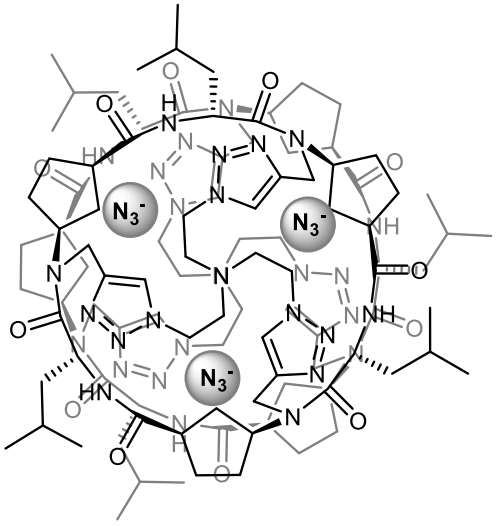


D8-iodide complex. In an NMR tube was prepared a solution of **D8** in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 (7 mM, 450 µL) containing dioxane (2.5 mM). Consecutives additions of a solution of TBABr in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 containing dioxane (2.5 mM) up to 86 equivalents were added. ^{1}**H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.07 (d, *J* = 4.2 Hz, 3H, NH), 7.27 (s, 3H, triazole), 4.86 (d, *J* = 16.1 Hz, CH_2 linker), 4.76 (m, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 4.24-4.13 (m, 6H, $H\alpha_{Leu}$ + $H_{A'\ CAP}$), 4.03 (d, *J* = 16.1 Hz, 3H, CH_2 linker), 3.75 (m, 3H, $H_{B'\ CAP}$), 3.26-3.10 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.74 (ddd, *J* = 14.4, 8.3, 3.2 Hz, 3H, $H_{C'\ CAP}$), 2.53 (dd, *J* = 15.0, 4.4 Hz, 3H, $H_{D'\ CAP}$), 2.11 (m, 3H, Acp), 1.83 (m, 3H, Acp), 1.80-1-19 (m, 27H, 3H CH Leu + 6H CH_2 Leu + 18H, Acp), 0.94 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H, CH_3 Leu), 0.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH_3 Leu) ppm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

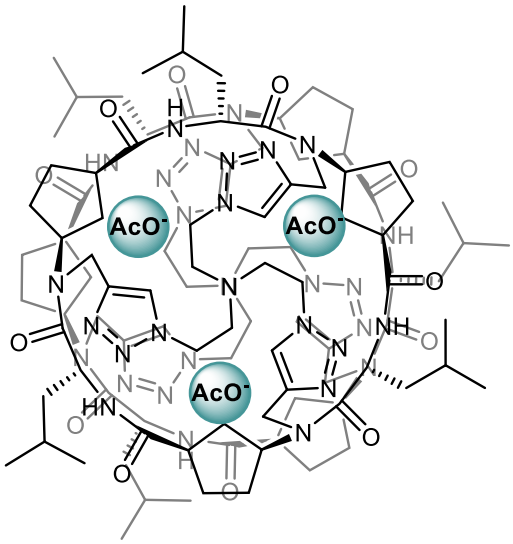


D8-nitrate complex. In an NMR tube was prepared a solution of **D8** in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 (7 mM, 450 µL) containing dioxane (2.5 mM). Consecutives additions of a solution of $TBANO_3$ in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 containing dioxane (2.5 mM) up to 60 equivalents were added. **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.17 (d, *J* = 4.1 Hz, 3H, NH), 7.30 (s, 3H, triazole), 4.89 (d, *J* = 16.1 Hz, CH_2 linker), 4.75 (m, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 4.25-4.15 (m, 6H, $H\alpha_{Leu}$ + $H_{A'\ CAP}$), 4.05 (d, *J* = 16.1 Hz, 3H, CH_2 linker), 3.79 (m, 3H, $H_{B'\ CAP}$), 3.20-3.07 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.76 (ddd, *J* = 14.6, 8.6, 3.6 Hz, 3H, $H_{C'\ CAP}$), 2.56 (m, 3H, $H_{D'\ CAP}$), 2.01 (m, 3H, Acp), 1.83 (m, 3H, Acp), 1.80-1-19 (m, 27H, 3H CH Leu + 6H CH_2 Leu + 18H, Acp), 0.95 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H, CH_3 Leu), 0.87 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H, CH_3 Leu) ppm.

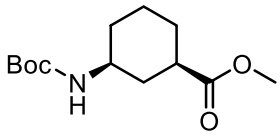


D8-azide complex. In an NMR tube was prepared a solution of **D8** in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 (6.9 mM, 450 µL) containing dioxane (2.5 mM). Consecutives additions of a solution of $TBAN_3$ in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 containing dioxane (2.5 mM) up to 35 equivalents were added. **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.55 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H, NH), 7.29 (s, 3H, triazole), 4.89 (d, *J* = 16.1 Hz, CH_2 linker), 4.79 (m, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 4.18 (m, 3H, $H\alpha_{Leu}$), 4.13 (m, 3H, $H_{A'\ CAP}$), 4.04 (d, *J* = 16.1 Hz, 3H, CH_2 linker), 3.56 (ddd, *J* = 13.7, 8.8, 2.9 Hz, 3H, $H_{B'\ CAP}$), 3.10 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.82 (ddd, *J* = 14.6, 9.0, 3.1 Hz, 3H, $H_{C'\ CAP}$), 2.66 (dt, *J* = 15.9, 4.1 Hz, 3H, $H_{D'\ CAP}$), 2.11 (m, 3H, Acp), 1.80 (m, 3H, Acp), 1.80-1-19 (m, 27H, 3H CH Leu + 6H CH_2 Leu + 18H, Acp), 0.94 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH_3 Leu), 0.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH_3 Leu) ppm.

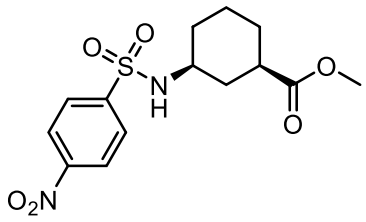
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



D8-acetate complex. In an NMR tube was prepared a solution of **D8** in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 (6.9 mM, 450 µL) containing dioxane (2.5 mM). Consecutives additions of a solution of $TBAN_3$ in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 containing dioxane (2.5 mM) up to 35 equivalents were added. **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.97 (s, 3H, NH), 7.27 (s, 3H, triazole), 4.85 (d, *J* = 16.1 Hz, CH_2 linker), 4.80 (m, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 4.14 (m, 3H, $H\alpha_{Leu}$), 4.07 (m, 3H, $H_{A'\ CAP}$), 4.04 (d, *J* = 16.1 Hz, 3H, CH_2 linker), 3.43 (m, 3H, $H_{B'\ CAP}$), 3.28 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.84 (m, 3H, $H_{C'\ CAP}$), 2.60 (m, 3H, $H_{D'\ CAP}$), 2.10-1.19 (m, 33H, 3H CH Leu + 6H CH_2 Leu + 24H, Acp), 0.91 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH_3 Leu), 0.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH_3 Leu) ppm.

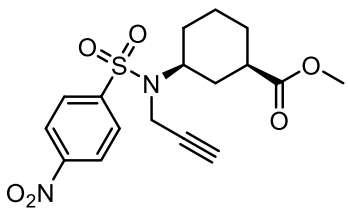


Boc-*L*-γ-Ach-OMe. Amino **Boc-*L*-γ-Ach-OH**, described in a previous group work,[484] (2.3 g, 9.46 mmol) was dissolved in dry DMF (34 mL) and then Na_2CO_3 (2.0 g, 19 mmol) and MeI (2.4 mL, 38 mmol) were added. The resulting solution was stirred overnight under Ar atmosphere. After this time, H_2O (30 mL) and AcOEt (30 mL) were added. The DMF was mostly removed by further extractions with H_2O (4x30 mL). The ethyl acetate layer was washed with saturated aqueous NaHCO3 (dil. sat., 3x50 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO4, filtered, concentrated. The remaining DMF was removed by consecutives toluene addition followed by rotavapor concentrations. The resulting solid was purified by flash chromatography (5-20% AcOEt/hexane) to afford the desired product as a white solid [2.4 g, 98%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.45 (br, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.43 (br, 1H, $H\gamma_{Ach}$), 2.37 (ddt, *J* = 12.0, 7.1 and 3.6 Hz, 1H), 2.22-2.12 (m, 1H), 1.92 (dddt, *J* = 17.9, 12.8, 3.4 and 1.7 Hz, 2H), 1.82 (dq, *J* = 13.3 and 3.4 Hz, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.38 – 1.13 (m, 3H), 1.03 (qd, *J* = 12.3 and 3.7 Hz, 1H) ppm . **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.5 (C), 155.2 (C), 79.3 (C), 51.7 (CH_3), 49.0 (CH), 42.3 (CH), 35.7 (CH2), 32.9 (CH_2), 28.5 (CH_3), 28.3 (CH2), 24.3 (CH_2) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 158 (100) ([M-Boc]$^+$), 280 (11.2) ([M+Na]$^+$). **HRMS (ESI)** Calculated for C13H23NO4: 258.1700, found: 258.1692.

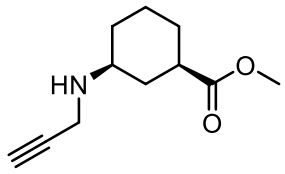


Ns-*L*-γ-Ach-OMe. A solution of **Boc-*L*-γ-Ach-OMe** (2.4 g, 9.3 mmol) in CH_2Cl_2 (24 mL) was treated with TFA (24 mL). After 15 min, the solution was concentrated under vacuum and further dried at high vacuum for 2 h. The resulting solid was dissolved in dry CH_2Cl_2 (35 mL) and DIEA (6.5 mL, 37.8 mmol) was added, followed by *p*-nitrobenzenesulfonyl chloride (3.0 g, 13.9 mmol). The mixture was stirred overnight under Ar atmosphere. The solution was washed with aqueous HCl (5%, 2x50 mL) and saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (2x50 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The resulting residue was purified by flash chromatography (15-50% AcOEt/hexane) to provide the desired product as a yellow solid [2.7 g, 85%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.07 (d, *J* =

8.8 Hz, 2H), 6.68 (br, 0.5 H), 5.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.89 (ddt, *J* = 11.0, 7.3 and 4.1 Hz, 0.5 H), 3.68 and 3.64 (2s, 3H), 3.22 (tdt, *J* = 11.7, 8.0 and 4.0 Hz, 1H, $H\gamma_{Ach}$), 2.53-1.05 (m, 9H) ppm. **^{13}C RMN** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.6 (C), 175.1 (C), 150.1 (C), 147,5 (C), 128.2 (CH), 124.6 (CH), 52.4 (CH_3), 52.0 (CH_3), 48.2 (CH), 42.0 (CH), 41.5 (CH), 35.8 (CH_2), 33.8 (CH_2), 33.5 (CH_2), 31.6 (CH_2), 28.1 (CH_2), 27.9 (CH_2), 23.8 (CH_2), 23.3 (CH_2) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 311 (100) ([M-OMe]$^+$). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{14}H_{18}N_2O_6S$: 343.0958, found: 343. 0966.

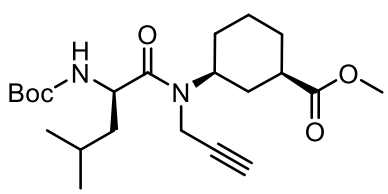


Ns-*^{propargyl}N-L*-γ-Ach-OMe (52). The **Ns-*L*-γ-Ach-OMe** (1.8 g, 5.26 mmol) was dissolved in dry DMF (26 mL) and treated with K_2CO_3 (2.9 g, 21.0 mmol) and propargyl bromide (1.9 mL, 21 mmol). The mixture was stirred overnight under Ar atmosphere and then DMF was mostly removed by consecutives extractions with H_2O (4x30 mL) using CH_2Cl_2 as organic phase. The organic layer was washed with aqueous HCl (5%, 2x50 mL) and saturated aqueous solutions of $NaHCO_3$ (3x50 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered, concentrated. The remaining DMF was removed by consecutives toluene addition followed by rotavapor concentrations. The product was purified by column chromatography (10-20% AcOEt/hexane) providing the desired product as a light-yellow viscous oil [1.9 g, 95%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.34 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.11 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.28 – 4.09 (m, 2H), 3.78 (tt, *J* = 12.1 and 3.8 Hz, 1H, $H\gamma_{Ach}$), 3.65 (s, 3H), 2.39 (tt, *J* = 12.1 and 3.6 Hz, 1H, $H\alpha_{Ach}$), 2.16 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, C≡C**H**), 2.02 – 1.92 (m, 2H), 1.88 (dt, *J* = 13.1 and 3.3 Hz, 1H), 1.80 – 1.64 (m, 2H), 1.54 (qd, *J* = 12.4 and 3.7 Hz, 1H), 1.40 – 1.15 (m, 2H) ppm. **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.8 (C), 150.2 (C), 146.9 (C), 128.7 (CH), 124.3 (CH), 79.2 (C), 73.5 (CH), 57.6 (CH_3), 51.6 (CH), 42.9 (CH), 33.5 (CH_2), 32.7 (CH_2), 30.6 (CH_2), 28.0 (CH_2), 24.8 (CH_2) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 141 (100) ([(M+2Na+H)/3]$^+$). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{17}H_{21}N_2O_6S$: 381.1115, found 381.1124.

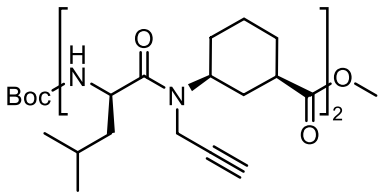


***^{propargyl}N-L*-γ-Ach-OMe.** Nosyl protected amino acid **Ns-*^{propargyl}N-L*-γ-Ach-OMe** (0.867 g, 2.3 mmol) was dissolved in MeCN (20 mL) and treated with K_2CO_3 (1.6 g, 11.4 mmol) and PhSH (2.0 mL, 18.4 mmol). The mixture was stirred overnight and then acetonitrile was evaporated under vacuum. The resulting residue was dissolved in CH_2Cl_2 and washed with H_2O (2x25 mL) and brine (2x25 mL). The organic phase was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography (0-8% MeOH/CH_2Cl_2) to afford the desired product as colorless oil [0.365 g; 80%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.66 (s, 3H), 3.46 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 2.70 (tt, *J* = 11.2 and 3.8 Hz, 1H, $H\gamma_{Ach}$), 2.35 (tt, *J* = 12.1 and 3.4 Hz, 1H, $H\alpha_{Ach}$), 2.19 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, C≡C**H**), 2.14 (dtd, *J* = 10.3 and 3.6, 1.7 Hz, 1H), 1.99 – 1.80 (m, 3H), 1.36 – 1.29 (m, 2H), 1.20 (td, *J* = 12.4 and 11.2 Hz, 1H), 1.09 – 0.98 (m, 1H) ppm **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.8 (C), 82.3 (C), 71.4 (CH), 54.4 (CH), 51.8 (CH_3), 42.2 (CH), 35.3 (CH_2), 35.2 (CH_2), 32.5 (CH_2), 28.7 (CH_2), 24.1 (CH_2) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 196 (100) ([M]$^+$). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{11}H_{17}NO_2$: 196.1332, found 196.1330.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

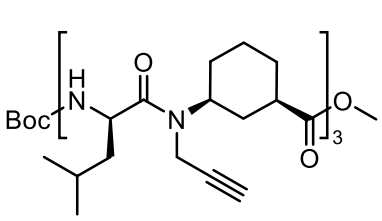


Boc-*D*-Leu-*propargyl*N-*L*-γ-Ach-OMe. Compound ***propargyl*N-*L*-γ-Ach-OMe** (365 mg, 1.9 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (10 mL) and DIEA was added (1 mL, 6.3 mmol). Separately, the Boc-*D*-Leu-OH (512 mg, 2.1 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (10 mL) and DIEA (1 mL, 6.3 mmol) and *N*-HATU was added (1.1 g, 2.85 mmol). After stirring under Ar for 4 hours, the resulting solution was washed with HCl 5% (2x5 mL) and sat. aq. $NaHCO_3$ (2x5 mL), dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The crude mixture was purified by flash column chromatography (0-4% MeOH/CH_2Cl_2), to give the dipeptide as a foam [552 mg, 75%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.26 and 5.06 (d, 1H, NH), 4.65 (m, 1H, $H\alpha_{Leu}$), 4.46 and 3.87 (dd, 2H, N-CH_2), 4.38 and 3.78 (m, 1H, $H\gamma_{Ach}$), 4.07 (td, 1H, C≡CH), 3.70 and 3.66 (s, 3H, OMe), 2.45 (m, 1H, $H\alpha_{Ach}$), 2.28 and 2.14 (2H, t, CH_2 Leu), 2.03-1.28 (m, 8H, Ach), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.00 and 0.94 ppm (dd, 6H, CH_3) ppm **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.3 (C), 174.8 (C), 173.5 (C), 172.3 (C), 155.6 (C), 155.5 (C), 80.4 (C), 80.1 (C), 79.6 (C), 79.5 (C), 72.6 (CH), 70.5 (CH), 55.8 (CH), 52.9 (CH), 51.9 (CH3), 51.7 (CH_3), 49.3 (CH), 48.8 (CH), 43.4 (CH_2), 42.9 (CH), 42.5 (CH), 42.3 (CH_2), 33.2 (CH2), 32.5 (CH_2), 31.9 (CH_2), 30.9 (CH_2), 30.6 (CH_2), 29.7 (CH_2), 28.3 (CH_3), 28.2 (CH_2), 28.0 (CH_2), 24.7 (CH), 24.6 (CH), 24.6 (CH_2), 24.5 (CH_2), 23.5 (CH_3), 23.4 (CH_3), 22.0 (CH_3), 21.7 (CH_3) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 449 (29) ([M+H]$^+$), ([M-tBu]$^+$) 393 (100) **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{22}H_{36}N_2O_5$: 408.2621, found 408.2622.

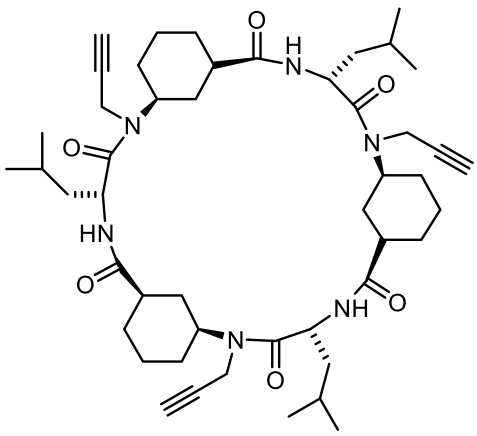


Boc-[*D*-Leu-*propargyl*N-*L*-γ-Ach]$_2$-OMe A solution of **Boc-*D*-Leu-*propargyl*N-*L*-γ-Ach-OMe** (184 mg, 0.45 mmol) in MeOH/H_2O (Vt = 3 mL, 3:1) was treated with LiOH (54 mg, 2.25 mmol) and stirred for 4 h. After this time, MeOH was concentrated under reduced pressure and the resulting solution was acidified until pH 3 (HCl 5% aq.) and extracted with CH_2Cl_2 (4x15 mL). The combined organic layers were dried with anh. $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure to give the *C*- deprotected dipeptide. Parallelly, a different fraction of **Boc-*D*-Leu-*propargyl*N-*L*-γ-Ach-OMe** (184 mg, 0.45 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (3 mL) and treated with TFA (3 mL). After stirring for 30 min, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH_2Cl_2 and further evaporated, repeating this process up to three times. The *C*- deprotected dipeptide was dissolved in dry CH_2Cl_2 (3 mL) and subsequently DIEA (0.30 mL, 1.35 mmol) and *N*-HBTU (255 mg, 0.675 mmol) were added. The TFA salt was dissolved in dry CH_2Cl_2 (3 mL) and DIEA was added (1.5 mL, 6.75 mmol). Finally, both fractions were mixed and reacted under Ar for 4 h. This solution was washed with HCl 5% (2x15 mL) and sat. aq. $NaHCO_3$ (2x15 mL), dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash column chromatography (25-50% AcOEt/hexane) to give the title compound as a foam [297 mg, 95%].**^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.33 and 6.08 (dd, 1H, NH), 5.23 and 5.09 (dd, 1H, NH), 4.97 and 4.65 (m, 2H, $H\alpha_{Leu}$), 4.40 (m, 2H, $H\gamma_{Ach}$), 4.11-3.73 (m, 4H, propargylic CH_2), 3.62-3.73 (m, 3H, OMe), 2.80 (s, 2H, C≡CH), 2.45 (m, 1H, $H\alpha_{Ach}$), 2.33-2.20 (m, 1H, $H\alpha_{Ach}$), 1.43 (s, 9H, Boc), 0.99 and 0.93 ppm (m, 12H, CH_3 Leu) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 685.5 (100) ([M+H] $^+$), 585 (61) ([M-Boc]$^+$), 342.1 (30) ([(M+2) /2]$^+$). **HRMS (ESI)** calculated for $C_{38}H_{61}N_4O_7$ 685.4535, 685.4533.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

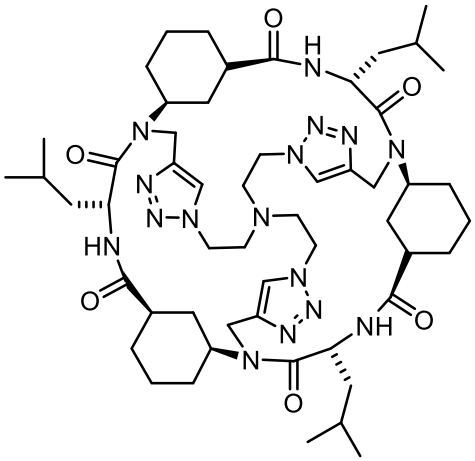


Boc-[*D*-Leu-^{propargyl}*N*-*L*-γ-Ach]$_3$-OMe. The tetrapeptide **Boc-[*D*-Leu-^{propargyll}*N*-*L*-γ-Ach]$_2$-OMe** (297 mg, 0.43 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (7 mL) and treated with TFA (1.3 mL). After stirring for 30 min, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH_2Cl_2 and further evaporated, repeating this process up to three times. Parallelly, the dipeptide **Boc-*D*-Leu-^{propargyl}*N*-*L*-γ-Ach-OMe** (184 mg, 0.45 mmol) was dissolved in MeOH/H2O (Vt = 3 mL, 3:1) was treated with LiOH (54 mg, 2.25 mmol) and stirred for 4 h. After this time, MeOH was concentrated under reduced pressure and the resulting solution was acidified until pH 3 (HCl 5% aq.) and extracted with CH_2Cl_2 (4x15 mL). The combined organic layers were dried with anh. $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure to give the *C*- deprotected dipeptide. The *C*- deprotected dipeptide was dissolved in dry CH_2Cl_2 (3 mL) and subsequently DIEA (0.30 mL, 1.35 mmol) and *N*-HBTU (256 mg, 0.675 mmol) were added. The TFA salt was dissolved in dry CH_2Cl_2 (3 mL) and DIEA was added (1.5 mL, 6.75 mmol). Finally, both fractions were mixed and reacted under Ar for 4 h. This solution was washed with HCl 5% (2x15 mL) and sat. aq. $NaHCO_3$ (2x15 mL), dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash column chromatography (25-70% AcOEt/hexane) to give the title compound as a white foam. [272 mg, 66%]. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ:6.38-6.05, 6.58-5.14, 4.71-4.56 (m, 3H, NH), 4.99 y 4.64 (m, 3H, Hα_{Leu}), 4.42 (m, 3H, Hγ_{Ach}), 4.15-3.72 (m, 6H, propargylic CH_2), 3.62-3.72 (m, 3H, OMe), 2.28 (m, 3H, C≡CH), 2.43, 2.14 (m, 3H, Hα_{Ach}), 2.03-1.50 (m, 33H), 1.43 (s, 9H, Boc), 0.96 ppm (m, 18H, CH_3 Leu) ppm. **MS (ESI)** [m/z (%)]: 881 (100) ([M-Boc]$^+$), 961.6 (31) ([M+H]$^+$). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{54}H_{84}N_6O_9$: 961.6373; found: 961.6371.



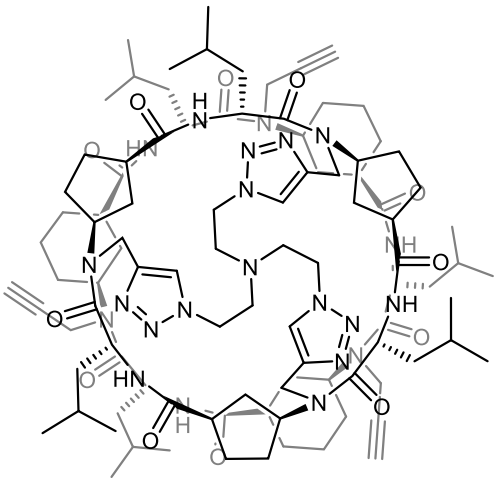
c-[(*D*-Leu-^{propargyl}*N*-*L*-Ach)$_3$] (CP10). The hexapeptide **Boc-[*D*-Leu-^{propargil}*N*-*L*-γ-Ach]$_3$-OMe** (182 mg, 0.19 mmol) was dissolved in MeOH (2 mL) and water (0.5 mL) and then LiOH (23 mg, 0.95 mmol) was added. After stirring for 4h, the organic solvent was evaporated, and the remaining aqueous layer was acidified until pH 3 with HCl. The resulting white precipitate was extracted with CH_2Cl2 (4x5 mL), dried, filtered and concentrated. Free acid was further deprotected by a solution of TFA/CH_2Cl_2 (1:1, Vt = 3.5 mL), in which the product was stirred for 15 min. After completion of the reaction, TFA was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH_2Cl_2 and further evaporated, repeating this process up to three time. For the cyclization step, the oil obtained in the previous step was dissolved in dry CH_2Cl_2 (126 mL) and treated with DIEA (1.5 mL, 6.75 mmol) and *N*-TBTU (183 mg, 0.57 mmol). The mixture was stirred overnight under Ar and then washed with 5% HCl (2x15 mL) and sat. aq. $NaHCO_3$ (2x15 mL). The organic layer was dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude was purified by flash column chromatography CH_2Cl_2-MeOH 0-10% (120 mg, 77%). **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm):8.28 (d, *J* = 9.4 Hz, 3H, NH), 5.17 (td, *J* = 10.0 and 4.0 Hz, 3H, Hα_{Leu}), 4.87 (d, *J* = 19.1 Hz, 3H, propargylic H_1), 4.48 (tt, *J* = 12.6 and 3.9 Hz, 3H, Hγ Ach), 3.96 (d, *J* = 19.2 Hz, 3H, propargylic H_2), 2.75 (ddt, *J* = 11.8, 7.8 and 4.1 Hz, 3H, Hα_{Ach}), 2.25 (s, 3H, C≡CH), 1.91 (m, 3H, Hε_{Ach}), 1.84-1.76 (m, 9H, Ach), 1.74 (m, 6H, CH_2 Leu), 1.58-1.42 (m, 10H, 3H CH Leu, 6H

Ach), 1.36 (m, 6H, Ach), 0.94 (dd, *J* = 14.8 and 6.5 Hz, 18H, CH_3 Leu). **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm): 175.7 (C), 174.2 (C), 81.6 (C), 72.5 (CH), 52.4 (CH), 47.6 (CH), 43.3 (CH), 41.2 (CH_2), 32.8 (CH_2), 32.2 (CH_2), 30.3 (CH_2), 30.0 (CH_2), 25.8 (CH_2), 25.6 (CH), 24.0 (CH_3), 22.2 (CH_3). **FTIR (CaF2)**: ν = 3295 (amide A), 1623 (amide I), 1525 cm-1 (amide II). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 829.5 (100) ($[M+H]^+$), 846.6 (85) ($[M+Na]^+$). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{48}H_{72}N_6O_6$: 829.5586; found: 829.5584.

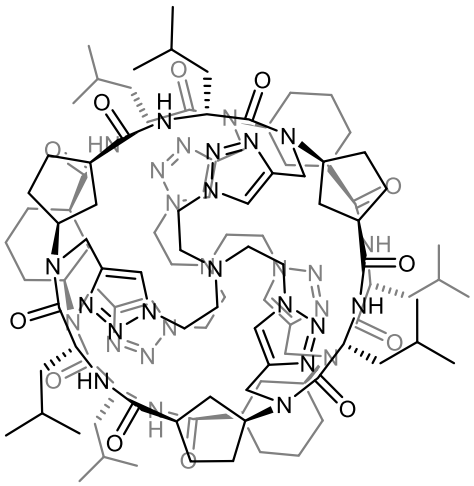


c-[(*D*-Leu-*triazolylamine*-*N*-*L*-Ach)$_3$] (CP11). The cyclic peptide **CP10** (30 mg, 0.036 mmol), the tris(2-azidoethyl)amine (12 mg, 0.054 mmol) and DBU (22 uL, 0.144 mmol), were dissolved in dry toluene (40 mL). Then, the solution was degassed with Ar flow for 40 minutes. After that, mixture was heated until reflux was observed (110˚ C), then, CuBr (1.5 mg, 0.0048 mmol) was added. The mixture was stirred overnight under Ar at 110˚ C. After cooling down, the mixture was filtered over filter paper. The product, that remains in the filter, was recovered using methanol as solvent. The methanol was removed under reduced pressure and the mixture was dissolved in CH_2Cl_2 (30 mL) in a 100 mL round bottom flask. An aqueous solution of KCN (10mg/mL) (30 mL) was added in the flask and the two phases were left to stir for two hours. After recovering the organic layer, it was dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude was purified by flash column chromatography 0-10% CH_2Cl_2-MeOH 0-10%, and after that, by normal-phase HPLC (2-10% MeOH-CH_2Cl_2 over 30 min) to give the product as a white solid (19 mg, 50%, t_R = 15 min). **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 7.79 (br s, 3H, NH), 7.64 (s, 3H, H triazole), 4.79 (m, 6H, $H\alpha_{Leu}$ + $H\gamma_{Ach}$), 4.67 (d, *J* = 17.7 Hz, 3H, CH_2 linker H_1), 4.57 (d, *J* = 17.7 Hz, 3H, CH_2 linker H_2), 4.13 (m, 3H, $H_{A\ CAP}$),3.30 (m, 6H, $H_{B\ CAP}$ + $H_{C\ CAP}$), 2.83 (m, 3H, $H\alpha_{Ach}$), 2.70 (m, 3H, $H_{D\ CAP}$), 1.94 (m, 3H, Ach), 1.83-1.63 (m, 9H, Ach (1.80 ppm *cis*-$H_{\beta Ach}$)), 1.60-1.46 (m, 9H, 3H C**H$_{2(1)}$** Leu + 3H CH Leu + 3H Ach), 1.45-1.33 (m, 6H, 3H C**H$_{2(2)}$** Leu + 3H Ach), 1.33-1.18 (m, 6H, Ach (1.23 ppm *trans*-$H_{\beta Ach}$),), 0.87 (18H, dd, *J* = 21.9, 6.3 Hz, CH_3 Leu) ppm. **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm): 174.8 (C), 174.3 (C), 145.6 (C), 124.1 (CH), 52.7 (CH_2), 48.5 (CH_2), 44.5 (CH), 44.0 (CH_2), 39.4 (CH_2), 34.5 (CH_2), 25. (CH_2), 25.4 (CH), 23.8 (CH_3), 22.2 (CH_3) ppm. **FTIR (CaF_2)**: ν = 3321 (amide A), 1614 (amide I), 1526 cm-1 (amide II). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 1053.7 ($[M]^+$, 100). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{54}H_{84}N_{16}O_6$: 1053.6833; found: 1053.6871.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

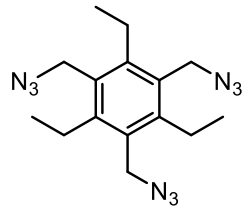


D8-10. 450 µL of **D8** (6.4 mM in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, dioxane (2.5 mM) as internal standard) were placed into al NMR tube. Following the assembly by NMR, **D10** was added (38 µL from a stock solution 59 mM) until no signals from **D8** were observed, due to the formation of the heterodimeric specie D8-10. **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.21 (d, *J* = 9.8 Hz, 3H, NH Acp), 7.64 (d, *J* = 9.2 Hz ,3H, NH Ach), 7.74 (s, 3H, H triazole), 5.04 (td, *J* = 9.8 and 3.9 Hz, 1H, Hα Leu_{Ach}), 4.91 (m, 3H, Hα Leu_{Acp}), 4.83 (m, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 4.72 (dd, *J* = 18.9 and 2.5 Hz, 3H, propargylic Ach H_1), 4.50 (s, 6H, CH_2 linker Acp), 4.40 (td, *J* = 12.3 and 6.1 Hz, 3H, $H\gamma_{Ach}$), 4.04 (d, *J* = 13.9 Hz, 3H, CAP Acp H_A), 3.91 (dd, *J* = 19.1 and 2.5 Hz, 3H, propargylic Ach H_1), 3.60 (m, 3H, CAP Acp H_B), 3.05 (m, 6H, $H\alpha_{Acp}$ + CAP Acp H_C), 2.93 (m, 3H, CAP Acp H_D), 2.50 (td, *J* = 11.6, 9.7 and 5.7 Hz, 3H, $H\alpha_{Ach}$), 2.40 (m, 3H, *cis*-$H\beta_{Acp}$), 2.37 (s, 3H, , C≡CH Ach), 2.10-1.17 (39H, $H\delta_{Acp}$ + $H\varepsilon_{Acp}$ + *trans*-$H_{\beta Acp}$ + $H\delta_{Ach}$ + $H\varepsilon_{Ach}$ + $H\beta_{Ach}$), 0.95-0.80 (36H, CH_3 Leu_{Acp} + CH_3 Leu_{Ach}) ppm. **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_2Cl_2) δ: 175.9 (C), 178.0 (C), 174.6 (C), 174.0 (C), 144.6 (C), 124.8 (CH), 81.2 (C), 72.6 (CH), 67.4 (CH_2), 57.3 (CH_2), 56.3 (CH), 52.8 (CH), 52.2 (CH), 50.6 (CH_2), 49.0 (CH), 47.6 (CH), 44.4 (CH), 43.3 (CH_2), 42.3 (CH), 41.4 (CH_2), 39.6 (CH_2), 36.3 (CH_2), 32.6 (CH_2), 32.4 (CH_2), 30.1 (CH_2), 29.9 (CH_2), 29.5 (CH_2), 27.3 (CH_2), 25.9 (CH), 25.2 (CH), 23.8 (CH_3), 23.2 (CH_3), 22.4 (CH_3), 21.9 (CH_3) ppm. **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{99}H_{151}N_{22}O_{12}$: 1840.1876; found: 1840.1846.

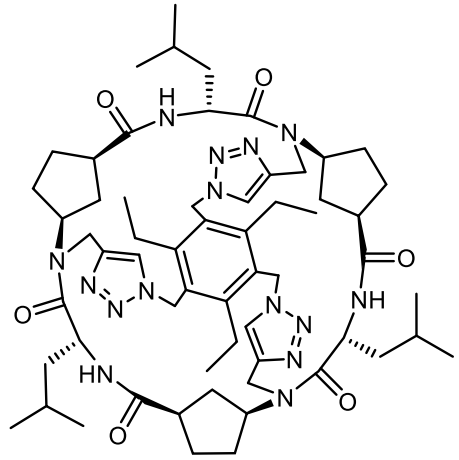


D8-11. 450 µL of **D8** (8 mM in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, dioxane (2.5 mM) as internal standard) were placed into al NMR tube. Following the assembly by NMR, **D11** was added (38 µL from a stock solution 59 mM) until no signals from D8 were observed, due to the formation of the heterodimeric specie **D8-11**. **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.02 (broad s, 3H, NH Acp), 7.91 (broad s, 3H, NH Ach), 7.70 (s, 6H, triazole Acp + triazole Ach), 4.94 (m, 3H, Hα Leu_{Acp}), 4.81 (m, 3H, Hγ Acp), 4.75 (m, 3H, Hα Leu_{Ach}), 4.67-4.47 (m, 15H, 6H CH_2 linker Acp + 6H CH_2 linker Ach + 3H $H\gamma_{Ach}$), 4.23 (m, 3H, CAP Ach H_A), 4.02 (d, *J* = 13.9 Hz, 3H, CAP Acp H_A), 3.64 (m, 3H, CAP Acp H_B), 3.44 (s, 3H, CAP Ach H_B), 3,22-3.08 (m, 6H, CAP Ach H_C + CAP Acp H_C), 2.98 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.86 (d, *J* = 15.1 Hz, 3H, CAP Acp H_D), 2.80 (m, 3H, CAP Ach H_D), 2.63 (m, 3H, $H\alpha_{Ach}$), 2.49 (m, 3H, $H\beta_{Acp}$), 2.14-1.11 (m, 75H, Acp + Ach + Leu), 0.97-0.75 (m, 36H, CH_3 Leu) ppm. **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_2Cl_2) δ: 175.5 (C), 174.4 (C), 145.5 (C), 144.7 (C), 124.3 (CH), 67.4 (CH_2), 56.8 (CH), 50.5 (CH_2), 49.1 (CH), 48.4 (CH), 46.3 (CH_2), 45.0 (CH) , 43.5 (CH_2), 42.2 (CH), 39.9 (CH_2), 39.2 (CH_2), 36.6 (CH_2), 34.3 (CH_2), 30.0 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.0 (CH_2), 26.3 (CH_2), 25.9 (CH_2), 25.3 (CH), 25.2 (CH), 23.6 (CH_3), 23.4 (CH_3), 22.2 (CH_3), 21.8 (CH_3) ppm. **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{105}H_{162}N_{32}NaO_{12}$: 2086.2942; found: 2086.2933.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

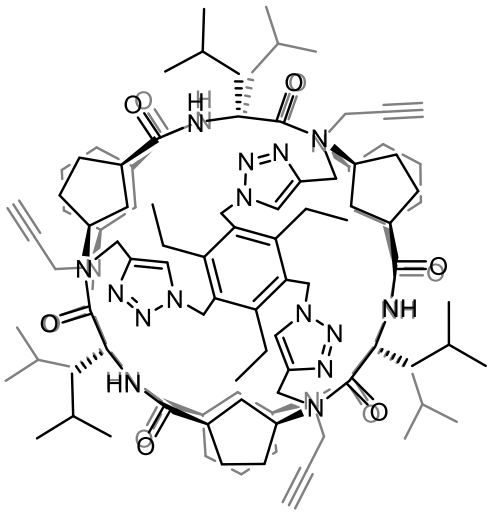


1,3,5-tris(azidomethyl)-2,4,6-triethylbenzene. 1,3,5-tris(bromomethyl)-2,4,6-triethylbenzene (200 mg, 0.45 mmol) was dissolved in DMSO (2 mL. Then, NaN_3 (117 mg, 1.81 mmol) was added. The reaction stirred during 24 hours. After that, H_2O (25 mL) was added and AcOEt was used in order to extract the product. After washing with NaCl saturated aqueous solution (3x20 mL), the organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The product was obtained as white solid that was used in the following step without further purification [0.136 g, 52%].**^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.49 (s, H), 2.85 (q, *J* = 7.6 Hz, 6H), 1.24 (t, *J* = 7.6, Hz, 9H) ppm.[574a]

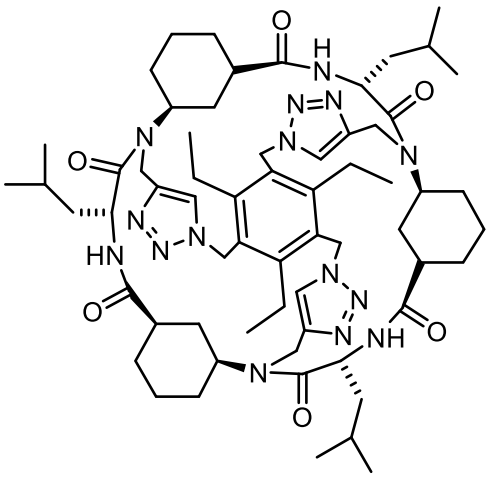


c-[(*D*-Leu-$^{triazolyl(1,3,5\text{-}ethylbenzene)}$*N*-*L*-Acp)$_3$] (CP9). The cyclic peptide **CP5** (50 mg, 0.064 mmol), the 1,3,5-tris(azidomethyl)-2,4,6-triethylbenzene (31 mg, 0.095 mmol) and DBU (28 uL, 0.192 mmol), were dissolved in dry toluene (64 mL). Then, the solution was degassed with Ar flow during 40 minutes. After that, mixture was heated until reflux was observed (110˚ C), then, CuBr (1.8 mg, 0.013 mmol) was added. The mixture was stirred overnight under Ar at reflux. After cooling down, the mixture was filtered over filter paper. The product remains in the filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the crude was redissolved in CH_2Cl_2 (30 mL) in a 100 mL round bottom flask. An aqueous solution of KCN (10 mg/mL) (30 mL) was added in the flask and the two phases were stirred during two hours. After recovering the organic layer, it was dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude was purified by flash column chromatography 0-10% MeOH/CH_2Cl_2, and after that, by normal-phase HPLC (2-10% MeOH/CH_2Cl_2 over 30 min) to give the product as a white solid (38 mg, 54%, t_R = 12 min). **^{1}H NMR** (500 MHz,CD_2Cl_2) δ: 7.53 (s, 3H, H triazole), 7.32 (s, 3H, NH), 5.70 (d AB, *J* = 14.7 Hz, 3H, triazole-**$CH_{2(1)}$**-Ar), 5.60 (d AB, *J* = 14.5 Hz, 3H, triazole-**$CH_{2(2)}$**-Ar), 4.87 (m, 3H, Hα_{Leu}), 4.56 (m, 6H, 3H Hγ_{Acp} + 3H N-**$CH_{2(1)}$**-triazole), 4.41 (d AB, *J* = 17.0 Hz, 3H, N-**$CH_{2(1)}$**-triazole), 2.73 (m, 3H, Hα_{Acp}), 2.59 (m, 6H, Ar-**CH_2**-CH_3), 2.30 (m, 3H, *cis*-Hβ_{Acp}), 1.81 (m, 3H, *cis*-Hδ_{Acp}), 1.67 (m, 6H, *trans*-Hδ_{Acp} + *trans*-Hε_{Acp}), 1.62 (m, 6H, CH_2 Leu), 1.56 (m, 3H, *cis*-Hε_{Acp}), 1.50 (m, 3H, CH Leu), 1.42 (m, 3H, *trans*-Hβ_{Acp}), 1.03 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, Ar-CH_2-**CH_3**), 0.87 (dd, *J* = 35.9, 6.1 Hz, 18H, CH_3 Leu) ppm. **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_2Cl_2) δ: 175.9 (C), 174.9 (C), 147.3 (C), 145.1 (C), 129.9 (C), 122.5 (CH), 57.1 (CH2), 49.4 (CH), 48.8 (CH), 43.2 (CH2), 42.9 (CH2), 40.2 (CH), 36.4 (CH), 30.3 (CH2), 29.3 (CH2), 27.2 (CH), 25.3 (CH2), 23.8 (CH3), 22.2 (CH3), 16.0 (CH3) ppm. **FTIR (CaF2)**: v = 3305 (amide A), 1624 (amide I) and 1526 cm-1 (amide II). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 1136.6 (100) ([M+Na]$^+$), 2251.4 ([2M+Na]$^+$). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{60}H_{87}N_{15}NaO_6$: 1136.6856; found: 1136.6878. **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{120}H_{174}N_{30}NaO_{12}$: 2250.3820; found: 2250.3841.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

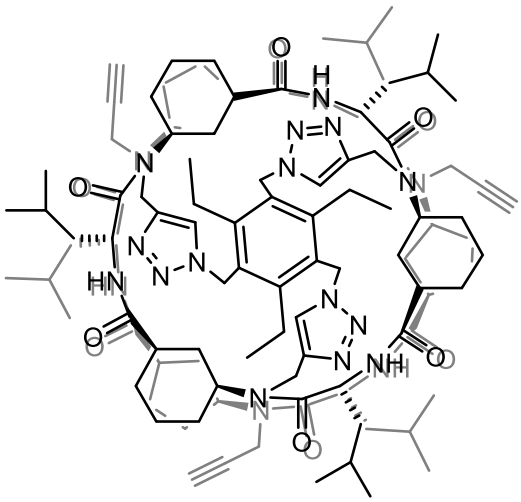


D9-10. 450 µL of D9 (6.6 mM in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, dioxane (2.5 mM) as internal standard) were placed into al NMR tube. Following the assembly by NMR, **D10** was added (38 µL from a stock solution 55 mM) until no signals from D9 were observed, due to the formation of the heterodimeric specie D9-10. **^{1}H NMR** (500 MHz,CD_2Cl_2) δ: 8.17 (broad s, 3H, NH Acp), 7.45 (d, 3H, NH Ach), 7.41 (s, 3H, H triazole), 5.69 (d AB, *J* = 14.8 Hz, 3H, triazole-**$CH_{2(1)}$**-Ar), 5.60 (d, *J* = 14.8 Hz, 3H, triazole-**$CH_{2(2)}$**-Ar), 4.99 (dt, , *J* = 9.8, 3.2 Hz, 3H, Hα Leu_{Ach}), 4.90 (m, 3H, Hα Leu_{Acp}), 4.77 (d, *J* = 19.2 Hz, 3H, N-**$CH_{2(1)}$**-C≡CH), 4.65 (m, 3H, $Hγ_{Acp}$), 4.54 (d, *J* = 17.2 Hz, 6H, N-**CH_2**-triazole), 4.36 (t, *J* = 13.0 Hz, 3H, $Hγ_{Ach}$), 3.86 (d, *J* = 19.1 Hz, 3H, N-**$CH_{2(2)}$**-C≡CH), 2.98 (m, 3H, $Hα_{Acp}$), 2.57 (m, 6H, Ar-**CH_2**-CH_3), 2.39 (t, *J*= 12.2 Hz , 3H, $Hα_{Ach}$), 2.35 (t, *J*= 2.4 Hz, 3H, N-CH_2-C≡**CH**), 1.92-1.20 (m, 66H, 24H Ach + 18H Acp + 9H Leu_{Acp} + 9H Leu_{Ach}), 1.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 9H, Ar-CH_2-**CH_3**), 0.92 (dd, *J* = 20.5, 6.6 Hz, 18H, CH_3 Leu_{Ach}), 0.87 (d, *J* = 6.1 Hz, 18H, CH_3 Leu_{Acp}). **^{13}C-NMR** (126 MHz, CD_2Cl_2) δ 175.0 (C), 174.1 (C), 147.1 (C), 145.1 (C), 122.2 (CH), 81.3 (CH), 72.6 (CH), 67.4 (CH2), 56.7 (CH), 52.8 (CH), 49.2 (CH), 48.5 (CH2), 47.7 (CH), 44.5 (CH), 42.9 (CH2), 41.1 (CH2), 39.6 (CH2), 35.4 (CH2), 32.6 (CH2), 32.3 (CH2), 30.1 (CH2), 28.0(CH2), 25.9 (CH2), 25.3 (CH), 25.1 (CH), 23.8 (CH3), 23.4 (CH2), 23.4(CH3), 21.9 (CH3), 15.8 (CH3) ppm. **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{108}H_{160}N_{21}O_{12}$: 1943.2550; found: 1943.2570.



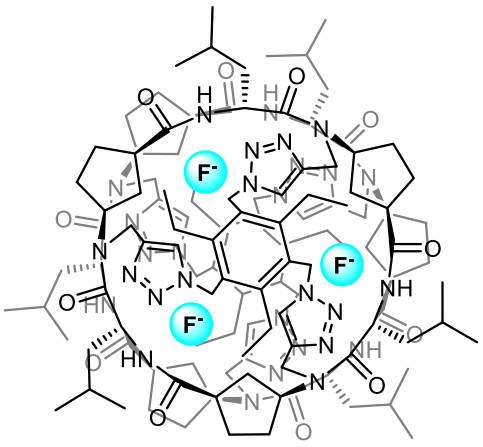
CP12. The cyclic peptide **CP10** (30 mg, 0.036 mmol), the 1,3,5-tris(azidomethyl)-2,4,6-triethylbenzene (18 mg, 0.054 mmol) and DBU (20 uL, 0.108 mmol), were dissolved in dry toluene (36 mL). Then, the solution was degassed with Ar flow during 40 minutes. After that, mixture was heated until reflux was observed (110˚ C), then, CuBr (1.0 mg, 0.004 mmol) was added. The mixture was stirred overnight under Ar at reflux. After cooling down, the mixture was filtered over filter paper. The product remains in the filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the crude was redissolved in CH_2Cl_2 (30 mL) in a 100 mL round bottom flask. An aqueous solution of KCN (10 mg/mL) (30 mL) was added in the flask and the two phases were stirred for two hours. After recovering the organic layer, it was dried with $MgSO_4$, filtered, and concentrated. The crude was purified by flash column chromatography 0-10% MeOH/CH_2Cl_2, and after that, by normal-phase HPLC (2-10% MeOH/CH_2Cl_2 over 30 min) to give the product as a white solid (15.2 mg, 36%, t_R = 10 min). **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 7.92 (s, 3H, H triazole), 6.38 (s, 3H, NH), 5.79 (AB system, *J* = 15.4 Hz, 3H, triazole-**$CH_{2(1)}$**-Ar), 5.50 (AB system, *J* = 15.3 Hz, 3H, triazole-**$CH_{2(2)}$**-Ar), 4.87 (ddd, *J* = 11.6, 9.0, 2.9 Hz, 3H, $Hα_{Leu}$), 4.63 (d AB, *J* = 17.3 Hz, 3H, N-**$CH_{2(1)}$**-triazole), 4.54 (d, *J* = 17.3 Hz, 3H, N-**$CH_{2(2)}$**-triazole), 4.30 (tt, *J* = 12.3, 3.4 Hz, 3H, $Hγ_{Ach}$), 2.91 (dq, *J* = 22.3, 7.4 Hz , 3H, Ar-**$CH_{2(1)}$**-CH_3), 2.86 (dq, *J* = 22.3, 7.4 Hz , 3H, Ar-**$CH_{2(2)}$**-CH_3), 2.21 (t, *J* = 11.7 Hz, 3H, $Hα_{Ach}$), 1.94 (dt, *J* = 13.2, 3.4 Hz, 3H, *trans*-$Hε_{Ach}$), 1.80 (td, *J* = 12.2, 4.0 Hz, 3H, *trans*-$Hδ_{Ach}$),

1.72 (d, *J* = 11.4 Hz , 3H, *cis*-Hδ$_{Ach}$), 1.67-1.59 (m, 6H, 3H CH Leu + 3H *cis*-Hζ$_{Ach}$), 1.56 (d, *J* = 12.9 Hz, 3H, *cis*-Hβ$_{Ach}$), 1.50 (m, 3H, CH$_{2(1)}$ Leu), 1.44-1.35 (m, 6H, 3H CH$_{2(2)}$ Leu + *cis*-Hε$_{Ach}$), 1.25 (m, 3H, *trans*-Hζ$_{Ach}$), 1.08 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, Ar-CH$_2$-**CH$_3$**), 0.90 (dd, *J* = 6.7, 1.7 Hz, 18H, CH$_3$ Leu), 0.84 (q, *J* = 12.1 Hz *trans*-Hβ$_{Ach}$) ppm. **^{13}C NMR** (126 MHz, CD_2Cl_2) δ: 174.8 (C), 172.9 (C), 147.8 (C), 145.9 (C), 130.1 (C), 122.7 (CH), 53.9 (CH), 49.2 (CH2), 48.5 (CH), 46.2 (CH), 43.4 (CH2), 39.2 (CH2), 34.9 (CH2), 30.1 (CH2), 29.8 (CH2), 25.8 (CH2), 25. (CH), 23.7 (CH3), 23.4 (CH2), 21.9 (CH3), 15.5 (CH3). **FTIR (CaF2)**: ν = 3331 (amide A), 1628 (amide I) and 1529 cm-1 (amide II). **MS (ESI)** [m/z (%)]: 1136.6 (100) ([M+Na]$^+$), 2251.4 ([2M+Na]$^+$). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{63}H_{93}N_{15}NaO_6$: 1178.7325; found: 1178.7328.



D12-5. 450 µL of **CP12** (4.28 mM in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, dioxane (2.5 mM) as internal standard) were placed into al NMR tube. Following the assembly by NMR, **D5** was added (35 µL from a stock solution 55 mM) until no signals from **CP12** were observed, due to the formation of the heterodimeric specie **D12-5**. Especially significant is the downfield shift of the CP12 NH proton, initially at 6.19, indicative of monomeric structure **CP12**, that after **CP5** adition, goes up to 7.79 ppm. **^{1}H NMR** (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.10 (broad s, 3H, H$_{triazole}$), 7.90 (broad s, 3H, NH Ach), 7.56 (broad s, 3H, NH Acp), 5.82 (d, *J* = 15.2 Hz, 3H, triazole-**CH$_{2(1)}$**-Ar), 5.49 (d, *J* = 15.2 Hz, 3H, triazole-**CH$_{2(2)}$**-Ar), 5.09 (broad m, 3H, Hα Leu$_{Acp}$), 4.88 (t, *J* = 9.1 Hz, 3H, Hα Leu$_{Ach}$), 4.80 (broad m, 3H, Hγ$_{Acp}$), 4.59 (AB system, *J* = 17.0 Hz, 3H, N-**CH$_{2(1)}$**-triazole), 4.50 (AB system, *J* = 17.0 Hz, 3H, N-**CH$_{2(2)}$**-triazole), 4.43 (d, *J* = 19.1 Hz, 3H, N-**CH$_{2(1)}$**-C≡CH), 4.23 (t, *J* = 11.3 Hz, 3H, Hγ$_{Ach}$), 3.84 (d, *J* = 19.0 Hz, 3H, N-**CH$_{2(1)}$**-C≡CH), 2.98 (broad m, 6H, Ar-**CH$_2$**-CH$_3$), 2.87 (broad m, 3H, Hα$_{Acp}$), 2.41 (s, 3H, N-CH$_2$-C≡**CH**), 2.35 (broad m, 3H, Hα$_{Ach}$), 2.27 (broad m, 3H, Hβ$_{Acp}$), 2.10-1.23 (57H, 15H Acp + 9H Leu$_{Acp}$ + 21H Ach + 9H Leu$_{Ach}$), 1.19 (m, 9H, Ar-CH$_2$-**CH$_3$**), 0.92 (m, 18H, CH$_3$ Leu$_{Acp}$), 0.89 (dd, *J* = 11.3, 6.6 Hz, 18H, CH$_3$ Leu$_{Ach}$), 0.86 (m, 3H, H Ach) ppm. **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{108}H_{160}N_{21}O_{12}$: 1943.2550; found: 1943.2552.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



D9-fluoride. 450 µL of a 3.3 mM solution of **D9** (10% CD_3CN/CD_2Cl_2, TMSS 0.15 mM) were placed into an NMR tube. Consecutives addition on TBAF in solution (10% CD_3CN/CD_2Cl_2, TMSS 0.15 mM) up to 34 equivalents gave as a result the formation of D9-fluoride complex. **^{1}H NMR** (500 MHz,CD_2Cl_2) (green peaks) δ: 8.82 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H, NH), 7.02 (s, 3H, $H_{triazole}$), 5.73 (AB system, *J* = 15.7 Hz, 3H, triazole-**$CH_{2(1)}$**-Ar), 5.51 (AB system, *J* = 15.7 Hz, 3H, triazole-**$CH_{2(2)}$**-Ar), 5.03 (m, 3H, $H\gamma_{Acp}$), 4.84 (AB system, *J* = 16.2 Hz, 3H, N-**$CH_{2(1)}$**-triazole), 4.05 (m, 3H, $H\alpha_{Leu}$), 3.99 (AB system, *J* = 16.2 Hz, 3H, N-**$CH_{2(2)}$**-triazole), 3.18 (m, 3H, $H\alpha_{Acp}$), 2.85 (dq, *J* = 14.7, 7.9, 7.3 Hz, 3H, Ar-**$CH_{2(1)}$**-CH_3), 2.45 (dq, *J* = 15.0, 7.4 Hz, 3H, Ar-**$CH_{2(2)}$**-CH_3), 2.16 (m, 3H, *cis*-$H\beta_{Acp}$), 2.00-1.18 (m, 24H, 15H Acp + 9H Leu), 0.91 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.88 (dd, *J* = 15.6, 6.3 Hz, 18H, CH_3 Leu), 0.64 (t, *J* = 7.4 Hz, 9H, Ar-CH_2-**CH_3**) ppm.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10.3.2 Figures

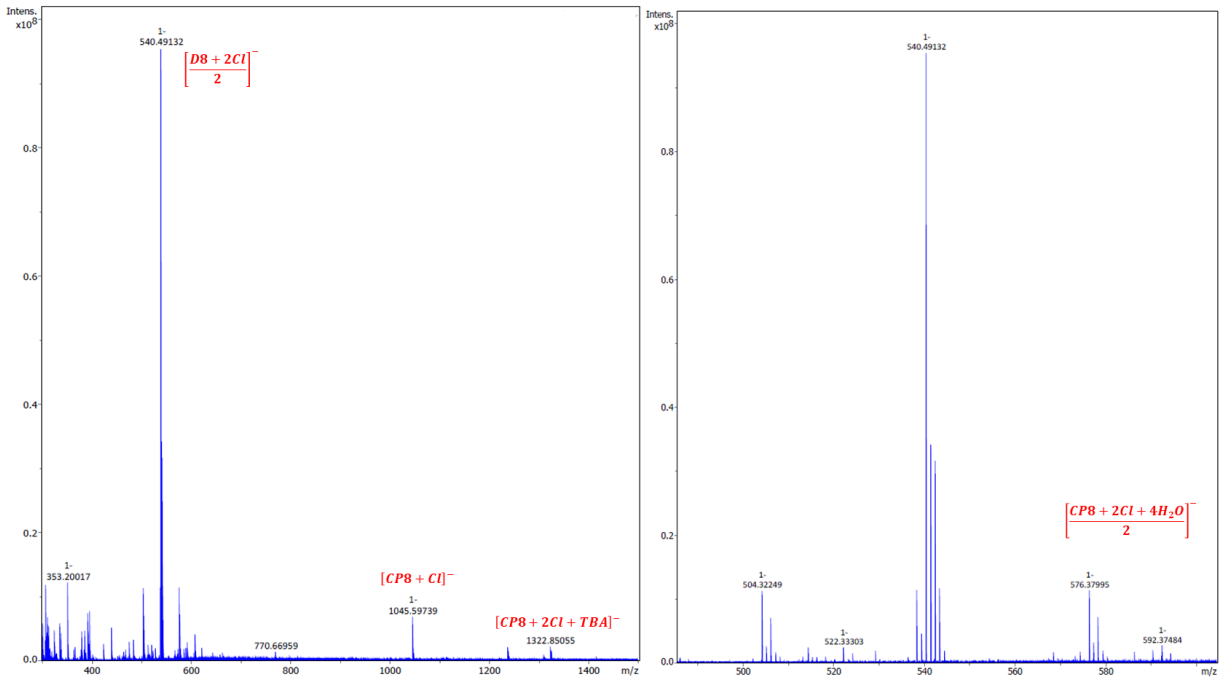


Figure 204. Negative ESI-TOF mass spectra of **D8-chloride** complex.

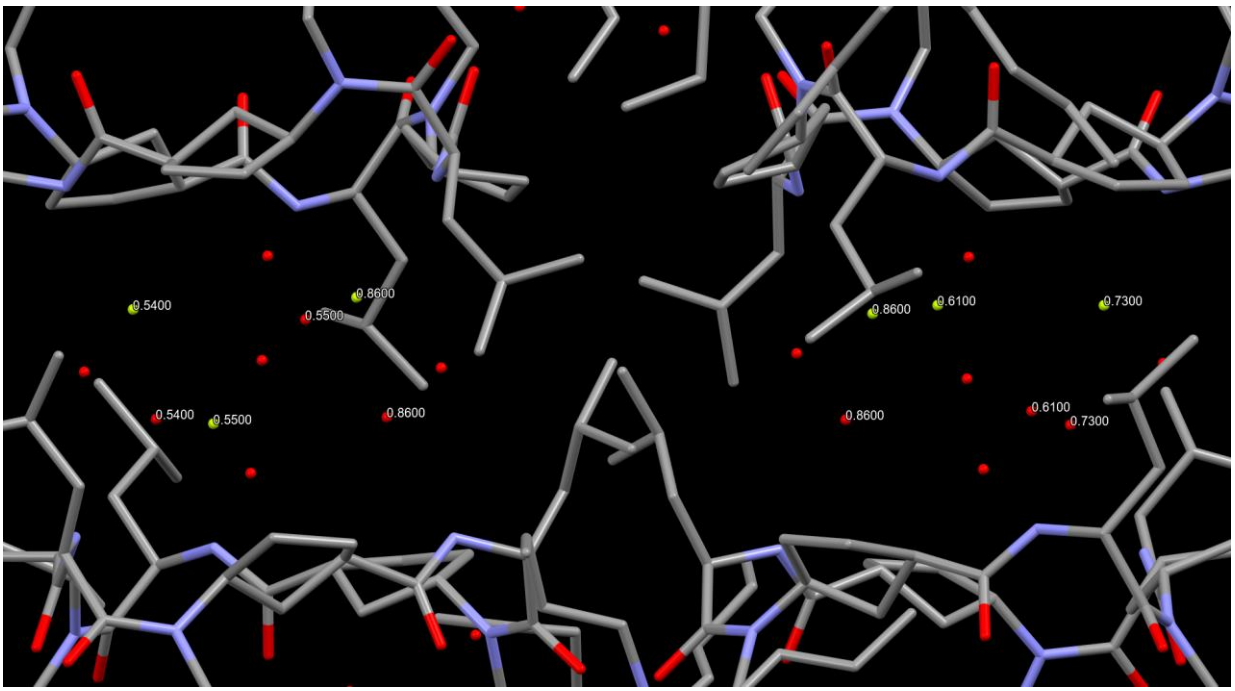


Figure 205. Fluoride occupancy in the two **$(3F^{-}\cdot 8H_2O)\subset$D8** that crystalized together.

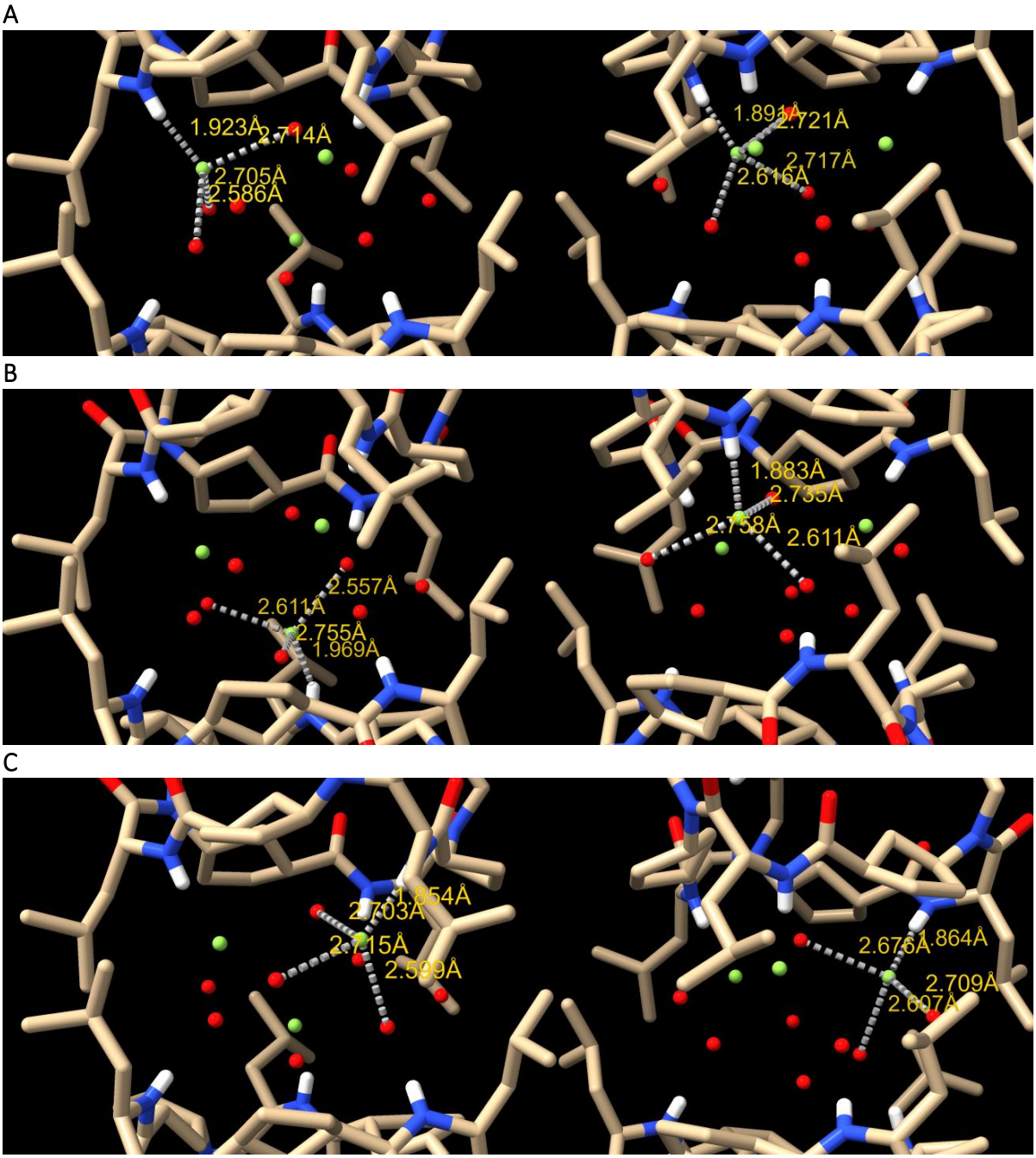


Figure 206. Fluoride hydration shell in $(3F^{-}\cdot 8H_2O)\subset D8$. View of the fluoride cluster in the crystal structure in which it can be found that each fluoride is surrounded by three water molecules. The two **$(3F^{-}\cdot 8H_2O)\subset D8$** complexes are displayed. The distances are indicated for both of them, starting from the fluoride on the left (A), middle (B) and right (C) side of the view. The NH···F distances are also given.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

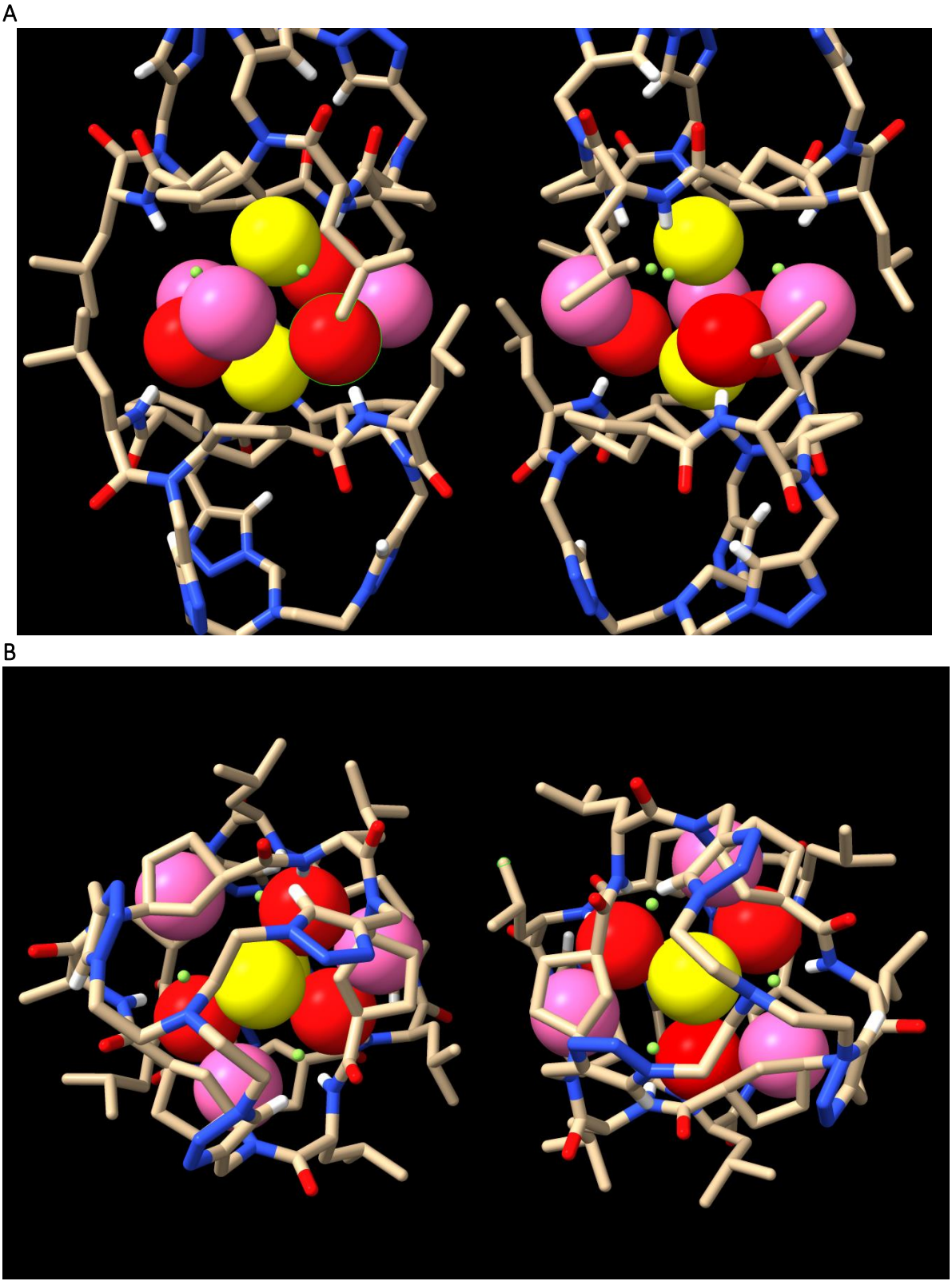


Figure 207. Apical and equatorial water molecules in **$(3F^{-}\cdot nH_2O)\subset D8$**. Front view (A) and top view (B) of the complex. The water molecules are depicted in CPK model. In yellow, the two apical water molecules that are the only two water molecules that are hydrogen bonded to different fluorides. In pink, the equatorial ones. In cyan, the fluoride atoms. In red, the three water molecules that share disordered positions with the three fluoride anions.

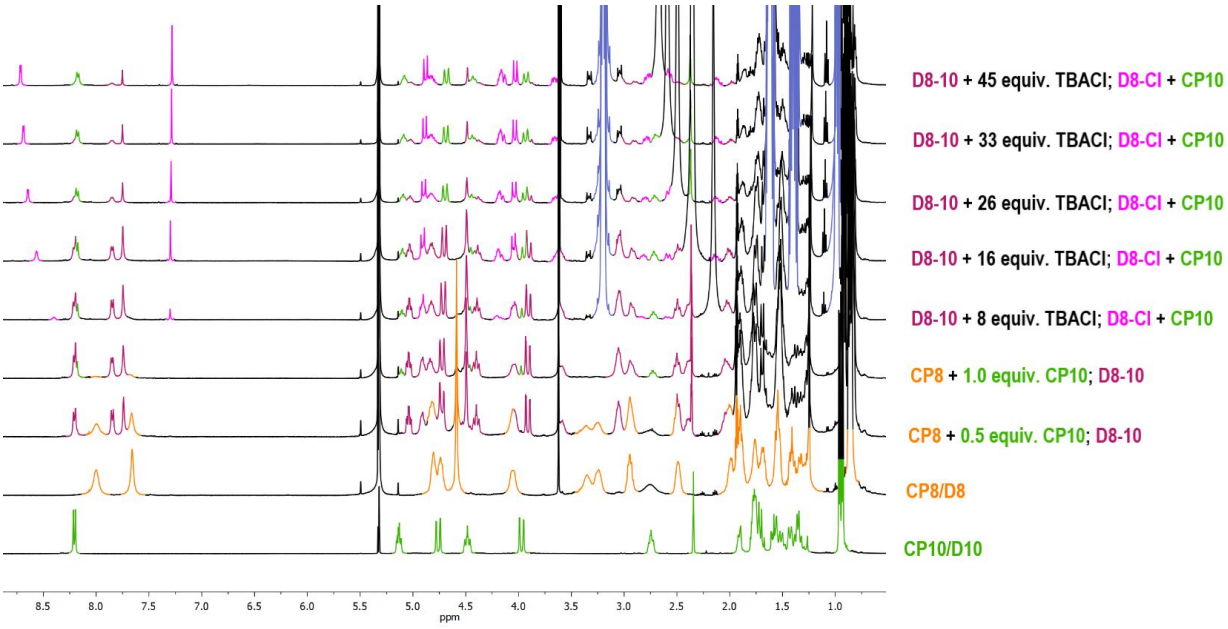


Figure 208. Formation of heterodimer **D8-10** and subsequent additions of TBACl. Stack of ^{1}H NMR spectra of a solution of **CP8** (6.4 mM) in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2 containing dioxane as internal standard, after different additions, initially **CP10** and subsequently the different equivalents of TBACl. In orange are labelled the most relevant signals of free **D8**, in green the signals corresponding to **D10** while those corresponding to the heterodimer (**D8-10**) are in wine red. Finally, after the addition of TBACl the signals assigned to the **$(3Cl^{-}\cdot nH_2O)\subset$D8** complex are shown in magenta. Under this conditions **D10** (in green) is formed again. For the full characterization of **D8-10** see spectra section.

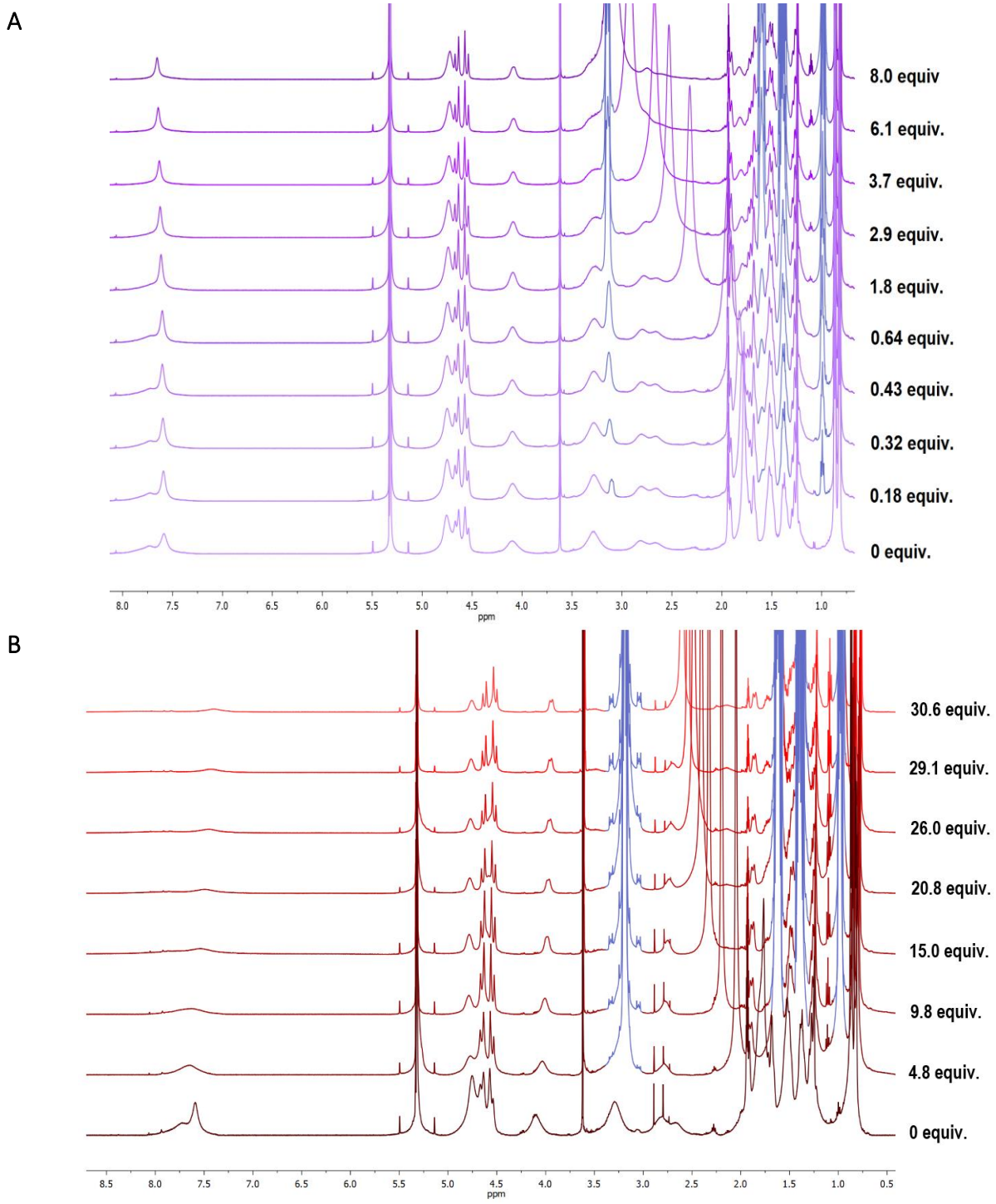


Figure 209. ^{1}H NMR spectra of different additions of fluoride (TBAF) or chloride (TBACl) to a solution of **D11**. A) Stack of ^{1}H NMR spectra of a solution of **CP11** (6.1 mM) in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, containing dioxane as internal standard, after different additions of tetrabutylammonium fluoride (TBAF) stock solutions. B) Stack of ^{1}H NMR spectra of a solution of **CP11** (6.4 mM) in 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, containing dioxane as internal standard, after different additions of tetrabutylammonium chloride (TBACl) stock solutions. No changes similar to those found for **D8** could be observed. The main difference is the broadening of the signals upon addition of the salts that was attributed to addition of water due to the reduced stability of dimer **D11**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

D8/D8-FLUORIDE

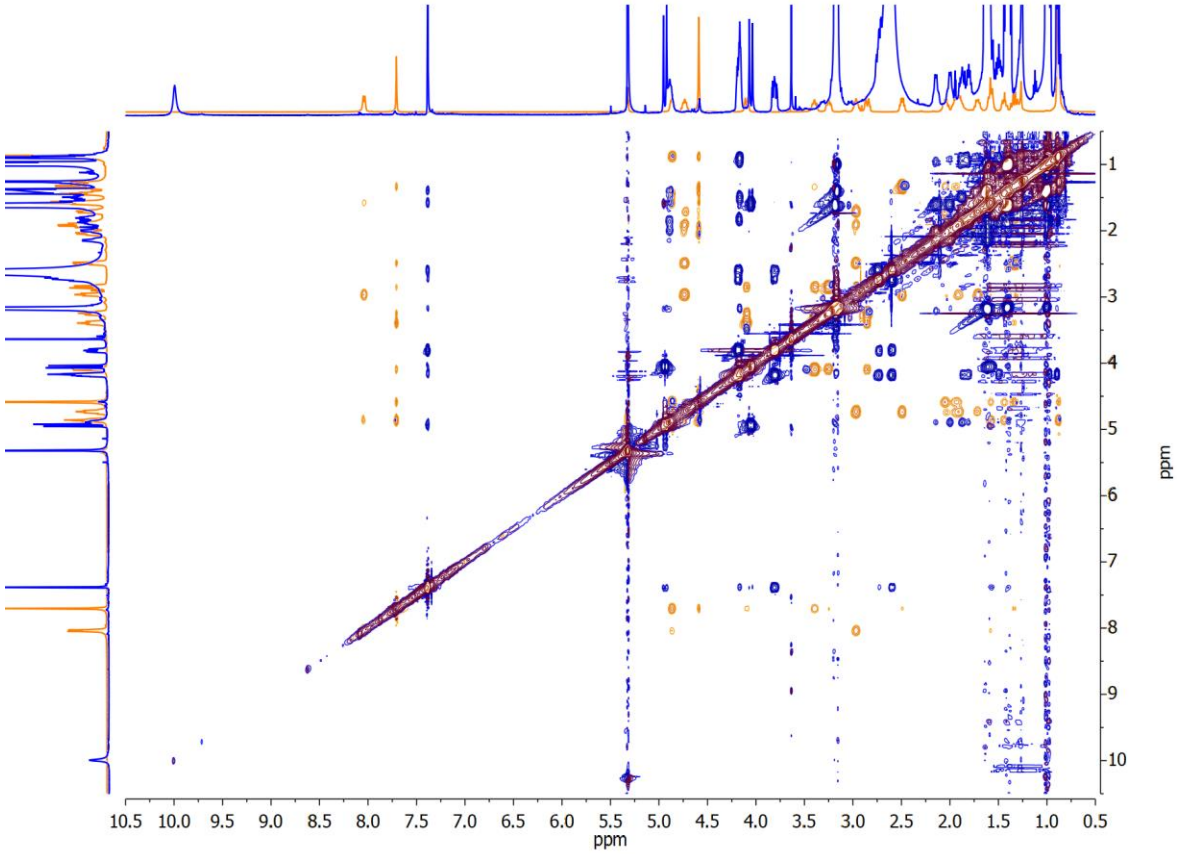


Figure 210. Superimposed ROESY spectra of **D8** (orange) and its complex with fluoride (blue).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

D8/D8-CHLORIDE

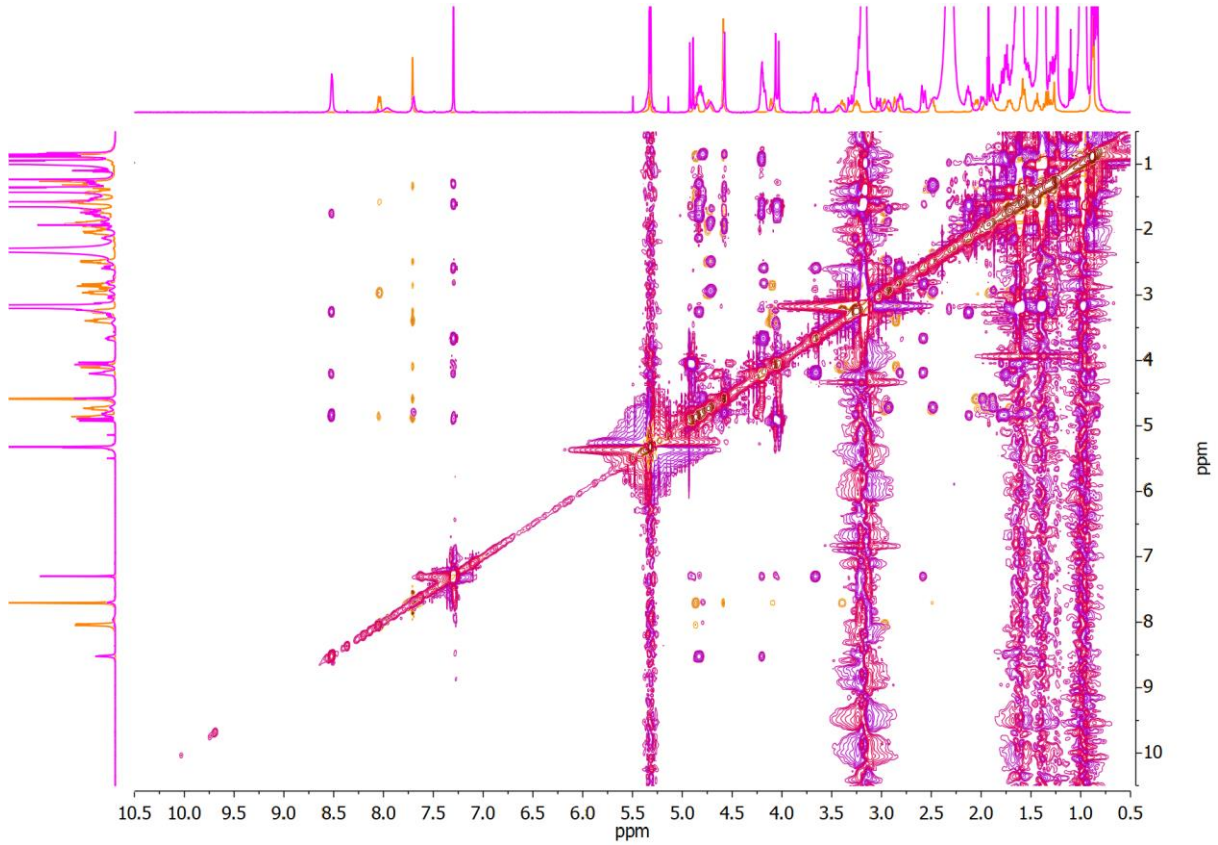


Figure 211. Superimposed ROESY spectra of **D8** (orange) and its complex with chloride (magenta). Note that in the spectrum of the chloride complex also contains some signal corresponding to the remaining free **D8**.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

D8-CHLORIDE/D8-FLUORIDE

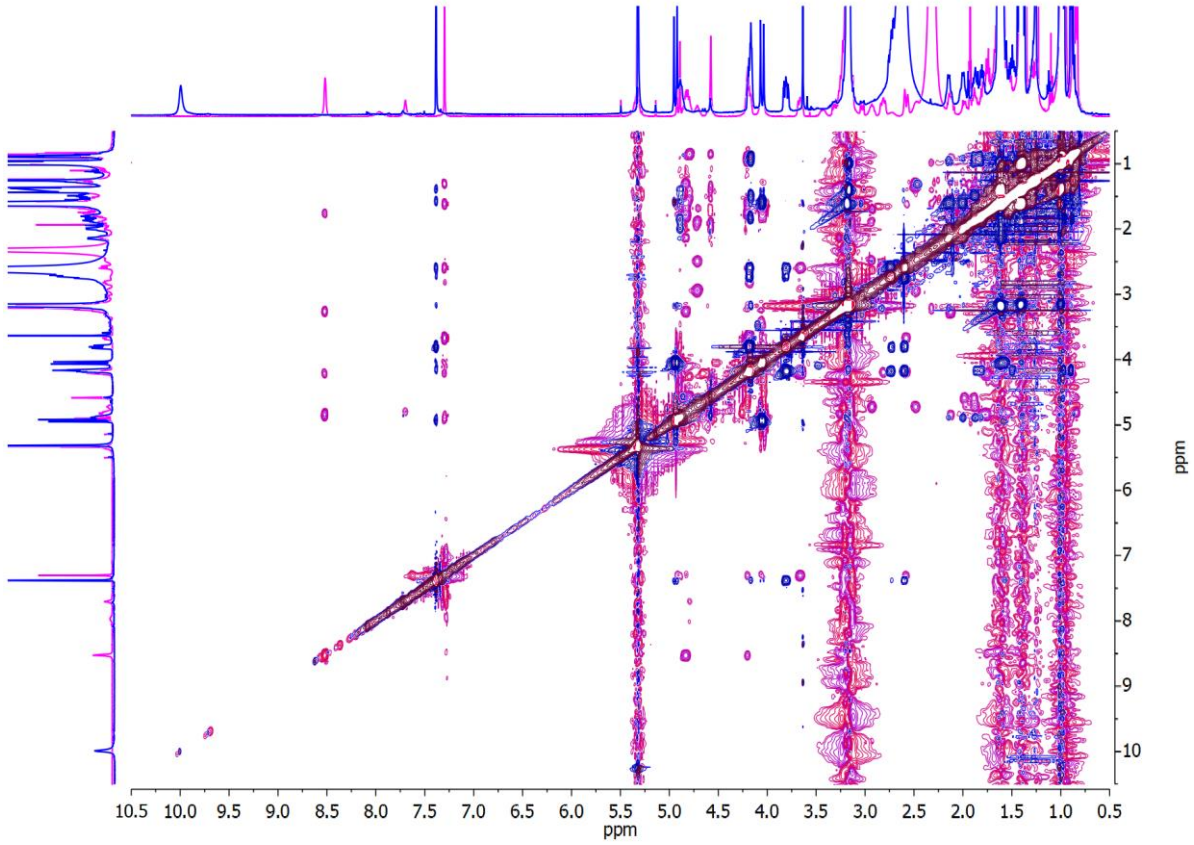


Figure 212. Superimposed ROESY spectra of the complexes of **D8** with chloride (magenta) and fluoride (blue). Note that in the spectrum of the chloride complex also contains some signal corresponding to the remaining free **D8**.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

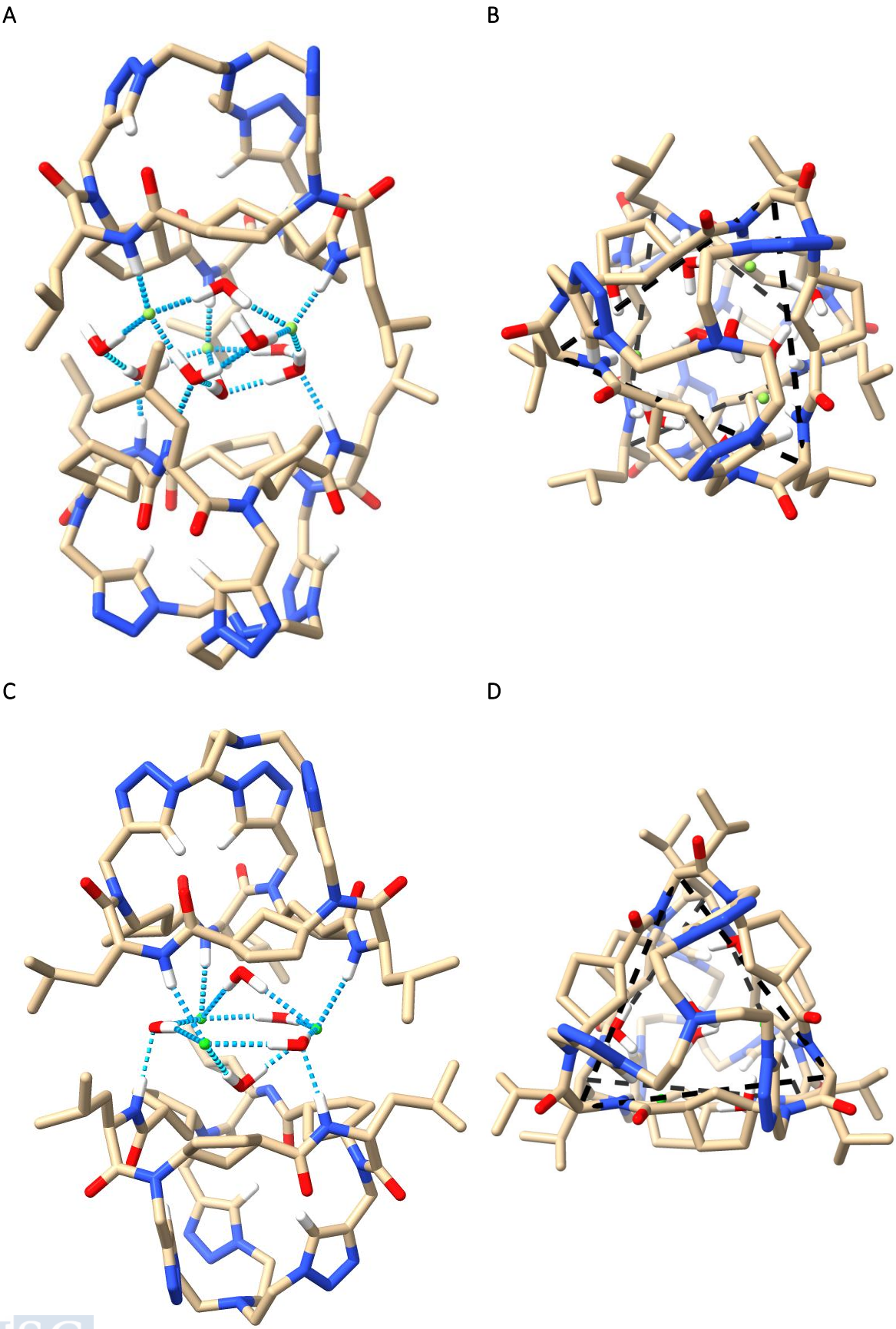


Figure 213. Geometry optimization of the crystalline structure of the complex **(3F⁻·8H2O)⊂D8.**

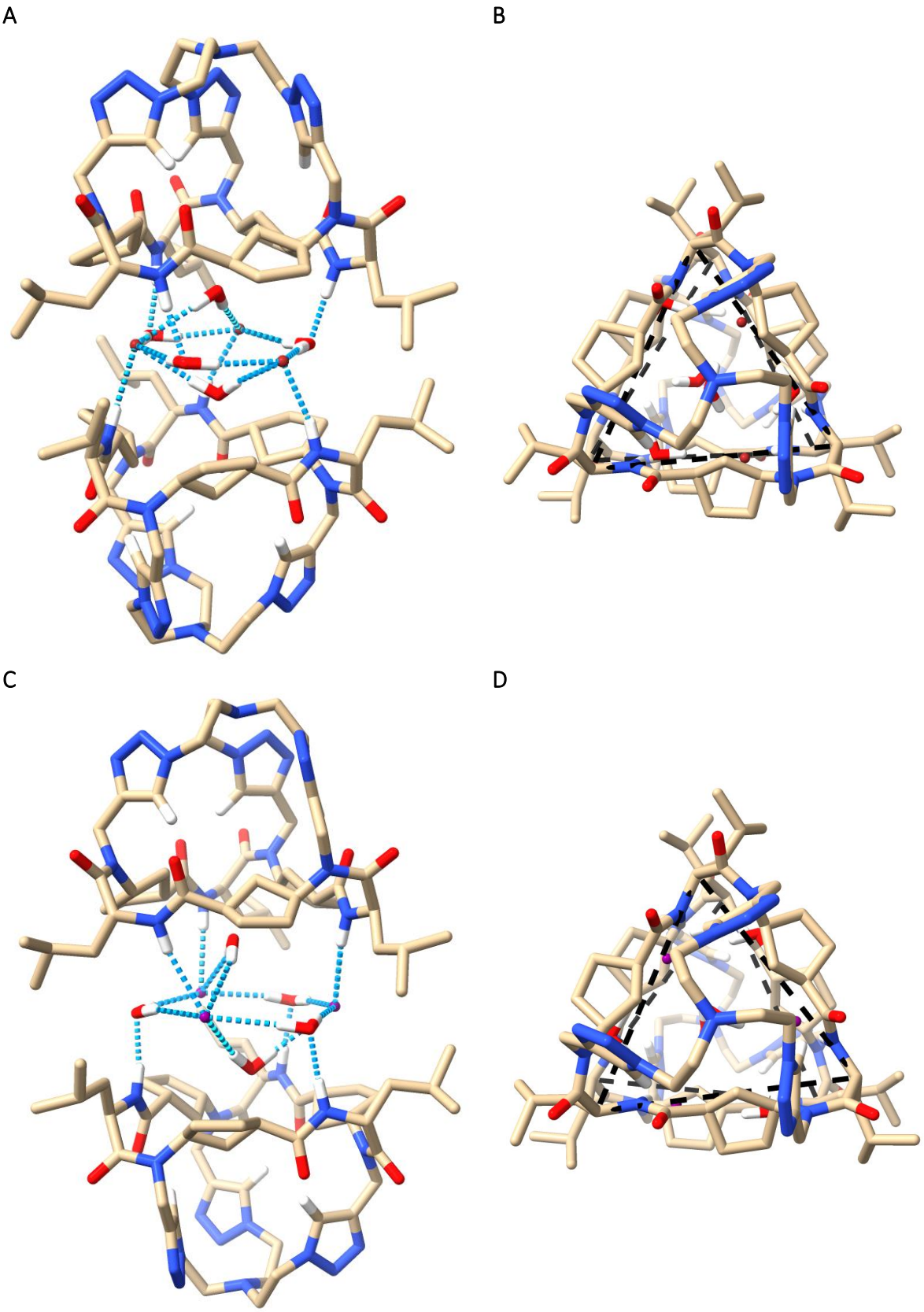
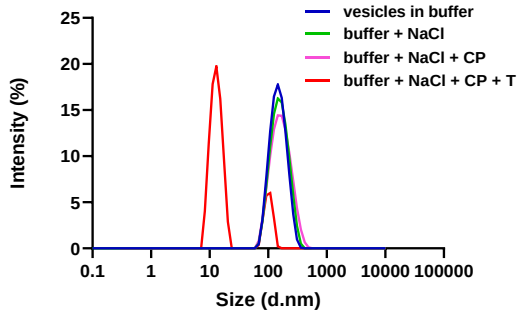


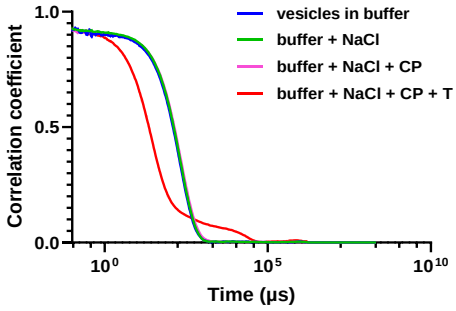
Figure 214. Geometry optimization of the complexes **(3Br⁻·5H2O)⊂D8** and **(3I⁻·5H2O)⊂D8.**

LUCIGENIN ASSAY

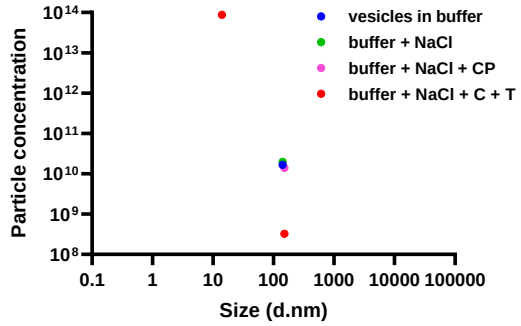
A) Particle Size



B) Correlation Coefficient



C) Particle Concentration

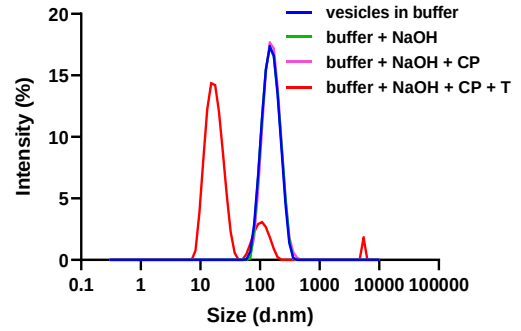


D) Control Values

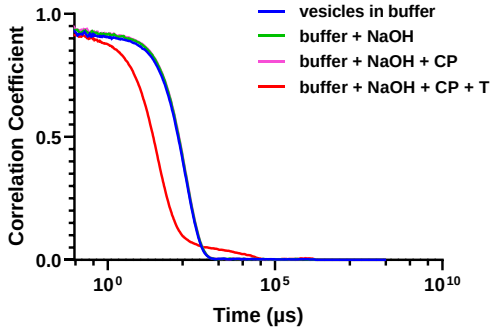
	Mean	St. dev.	RSD	Min	Max
Z-Average	146.6	1.173	0.801	145.2	147..5
Polydispersity Index (PI)	0.1043	0.0076	7.312	0.0992	0.1131
Particle concentration (particle/mL)	$1.65x10^{10}$	-	-	-	-

HPTS ASSAY

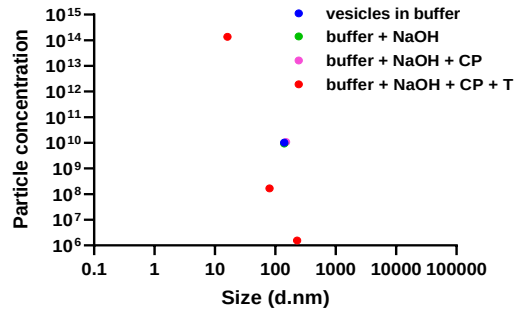
A) Particle Size



B) Correlation Coefficient



C) Particle Concentration



D) Control Values

	Mean	St. dev.	RSD	Min	Max
Z-Average	146.1	1.721	1.17	144.2	147.6
Polydispersity Index (PI)	0.0873	0.0077	8.906	0.0808	0.0960
Particle concentration (particle/mL)	$1.02x10^{10}$	-	-	-	-

Figure 215. Control DLS measures for the lucigenin (top) and the HPTS (bottom) assays.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

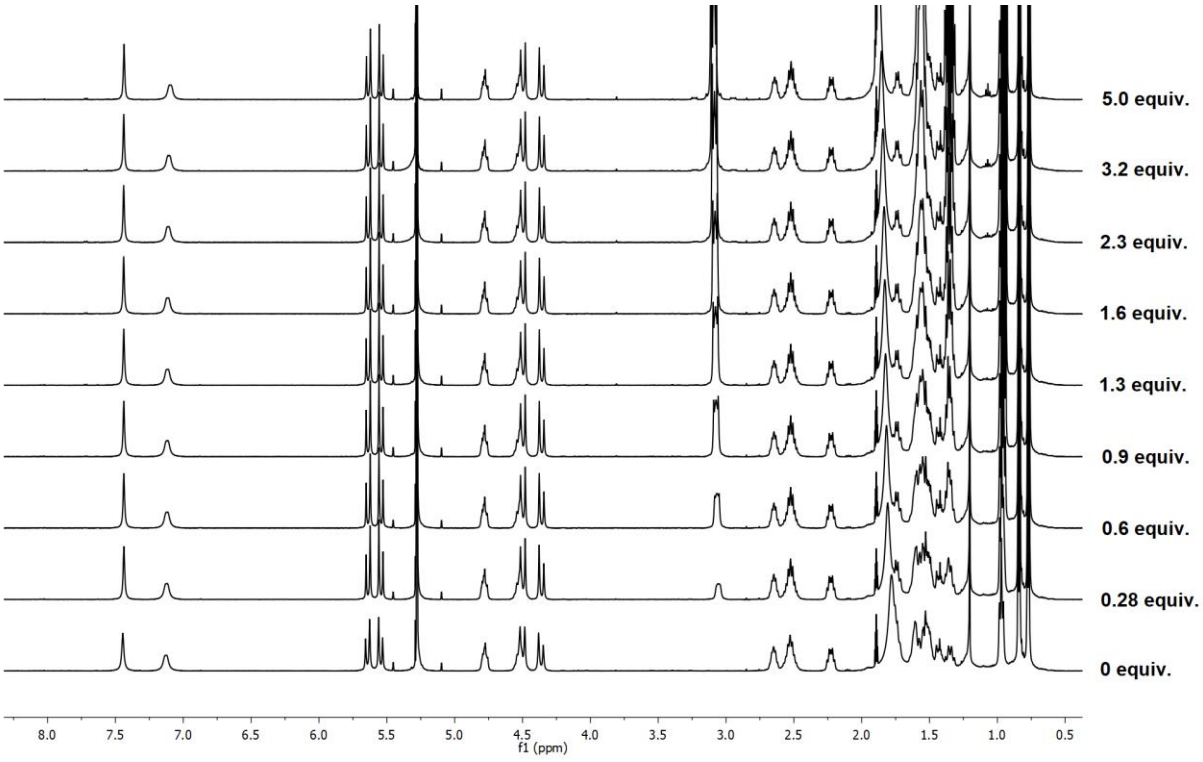


Figure 216. Stacked ^{1}H NRM spectra obtained from the addition of $TBANO_3$ to a solution of **CP9** (3 mM, 10% CD_3CN/CD_2Cl_2, 0.15 mM TMSS as internal standard)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

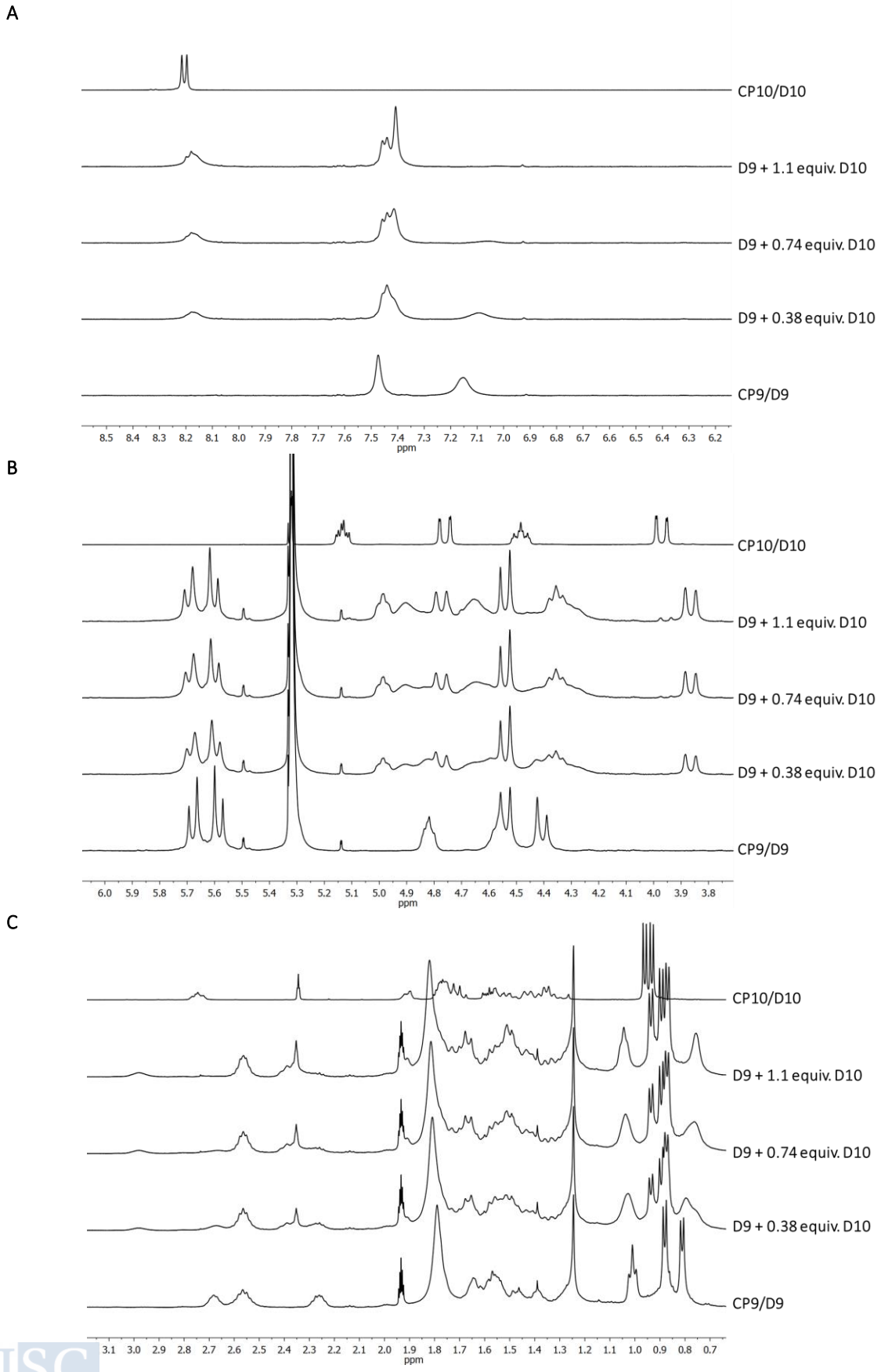
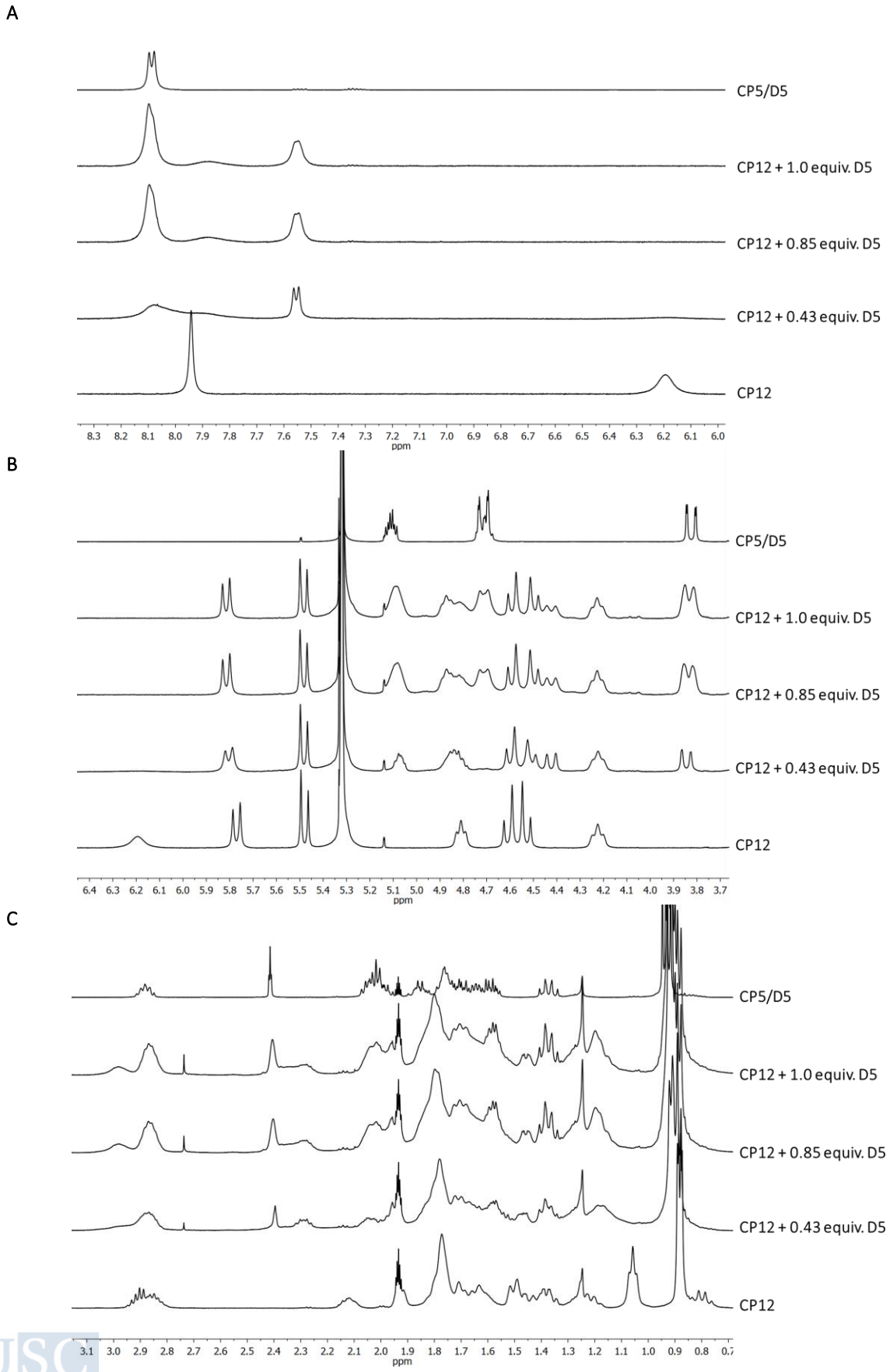


Figure 217. Amplification of several areas from the stacked ^{1}HNMR spectra obtained from the titration **CP9/D9** with **CP10/D10**, illustrated in the Figura 189.



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Figure 218. Amplification of several areas from the stacked ^{1}HNMR spectra obtained from the titration of **CP12** with **CP5/D5**, illustrated in the Figura 189.

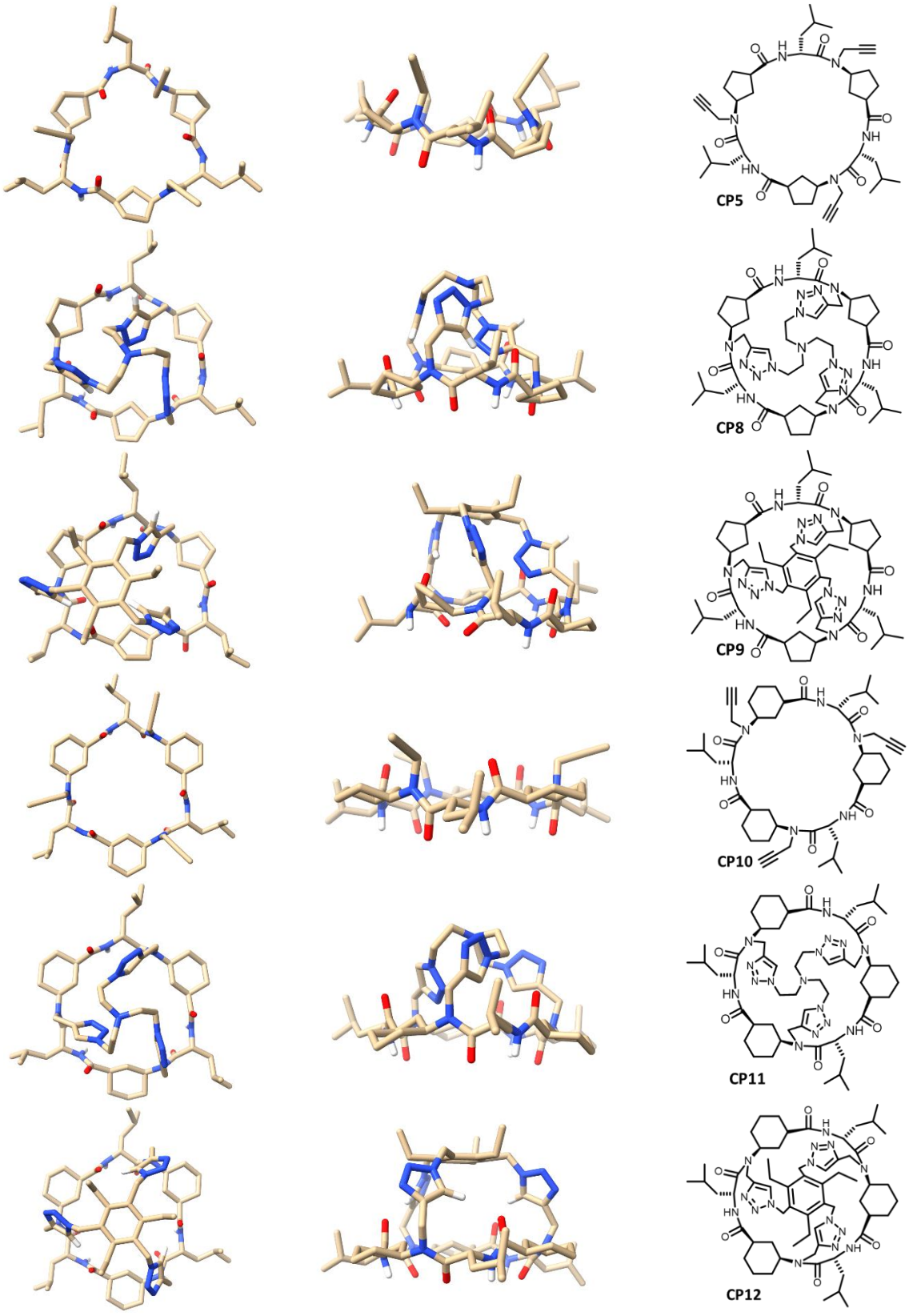
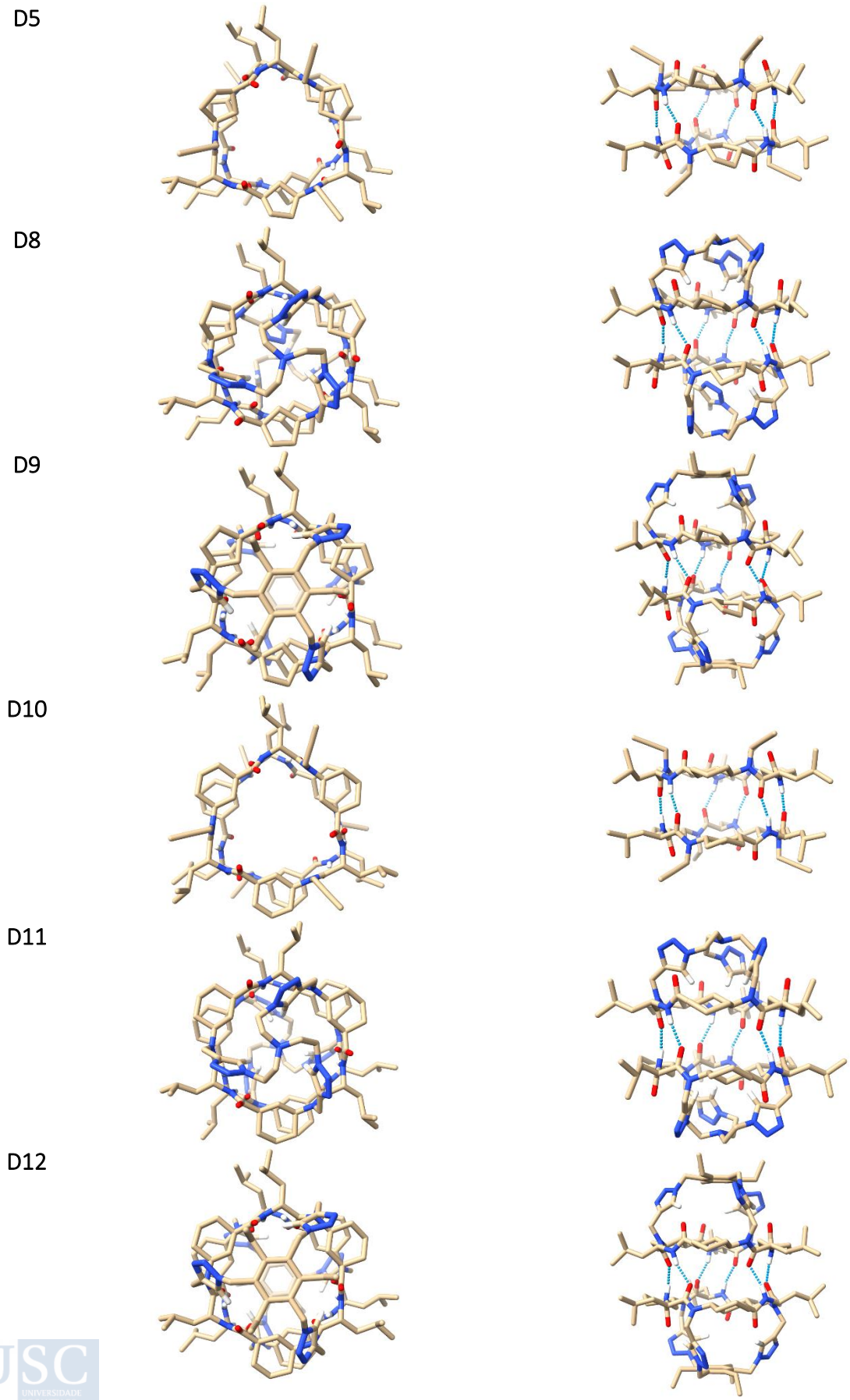


Figure 219. Geometry optimization structures for the monomers **CP5**-**CP12**, obtained with B3LYP/M05-2X.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 220. Geometry optimization structures for the homodimers **D5**-**D12**, obtained with B3LYP/M05-2X.

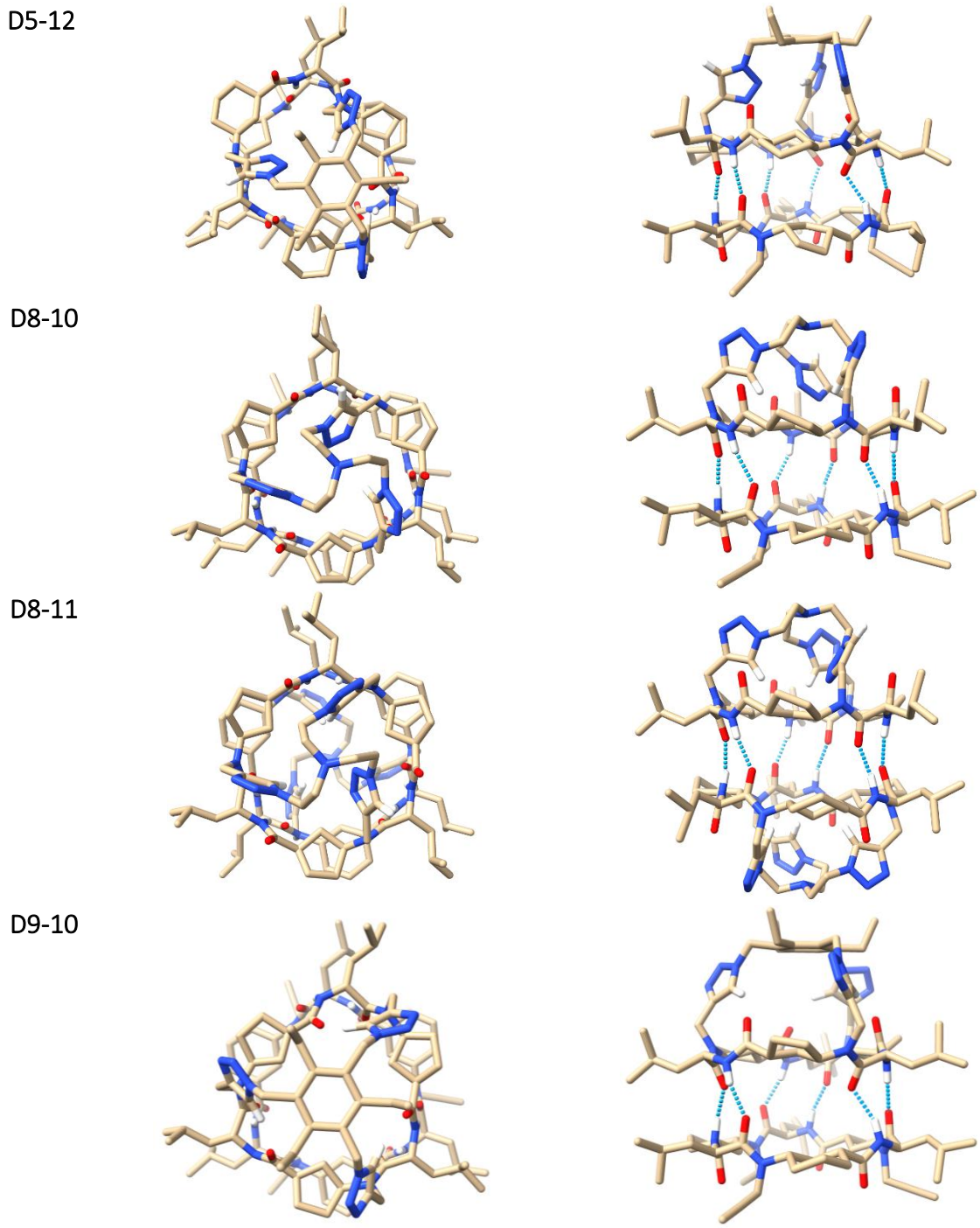


Figure 221. Geometry optimization structures for the heterodimers **D8-10**, **D8-11**, **D9-10** and **D5-D12**, obtained with B3LYP/M05-2X.

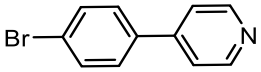
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

11. Appendix

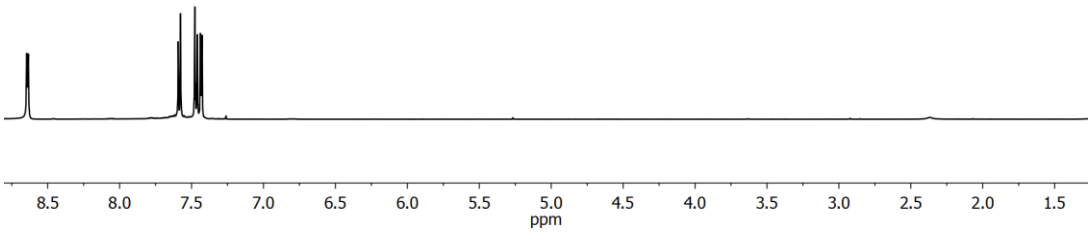
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

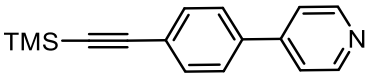
11.1 Spectra

11.1.1 Symbiosis between cyclpeptides and porphyrins in supramolecular receptors with catalytic potential.

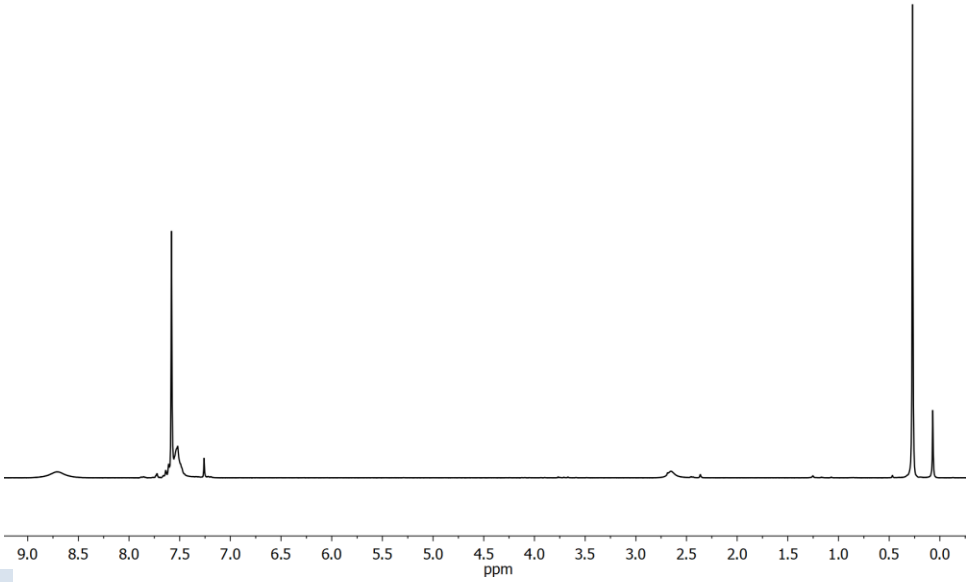


^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

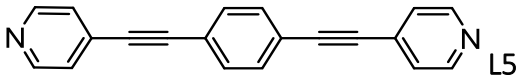




^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

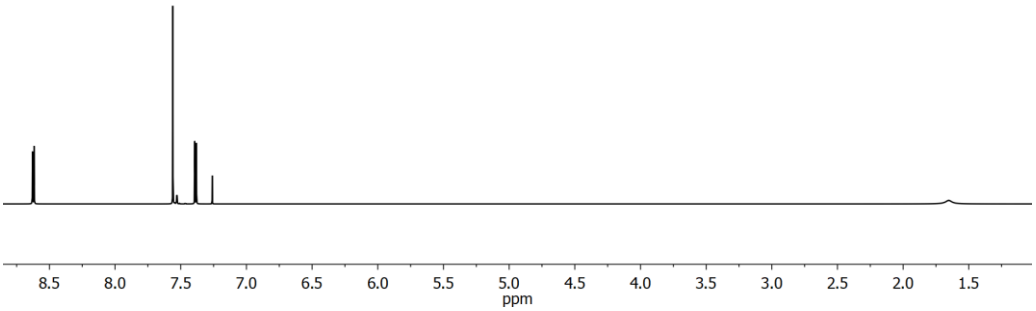


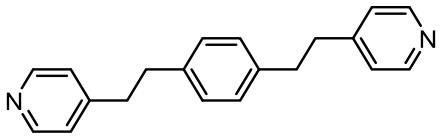
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



L5

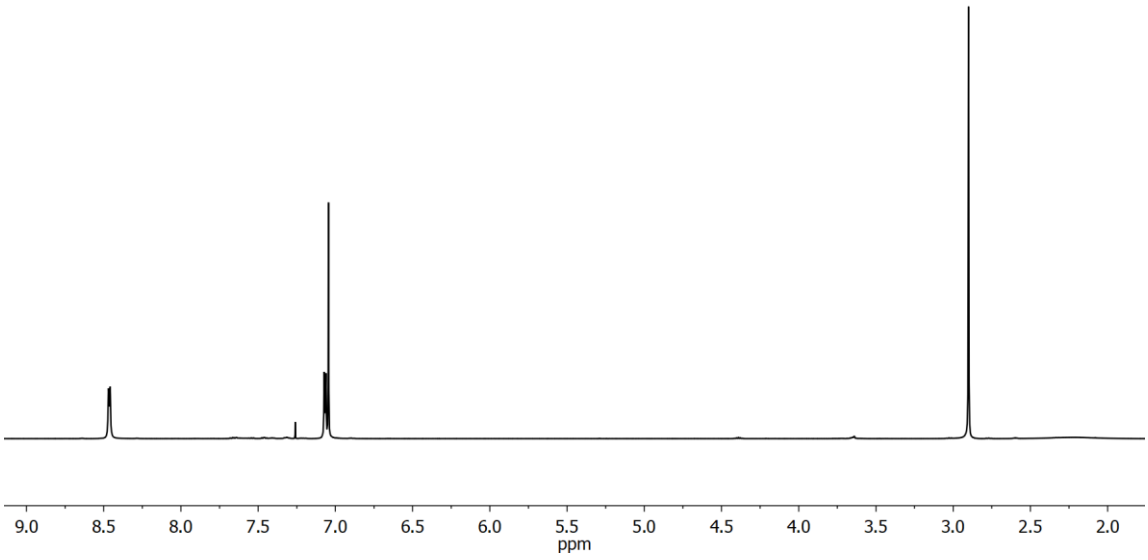
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



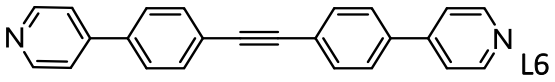


L4

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

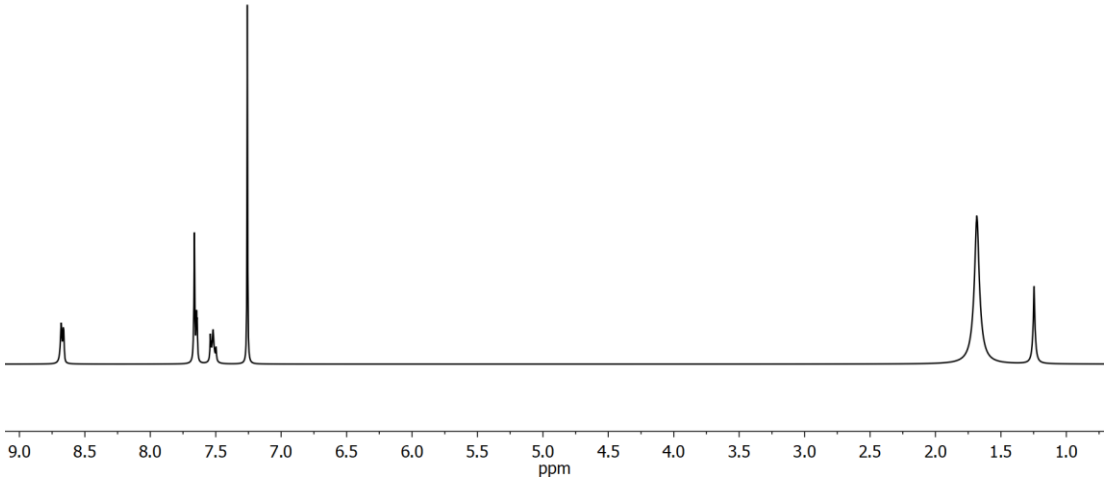


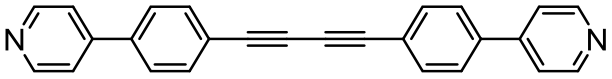
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



L6

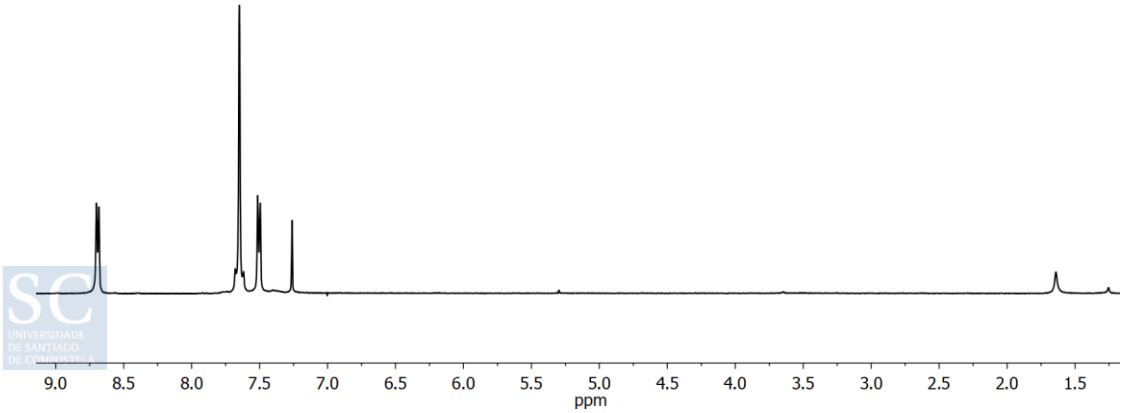
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)



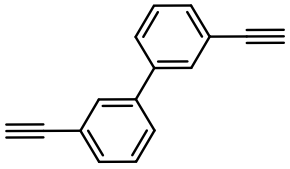


L8

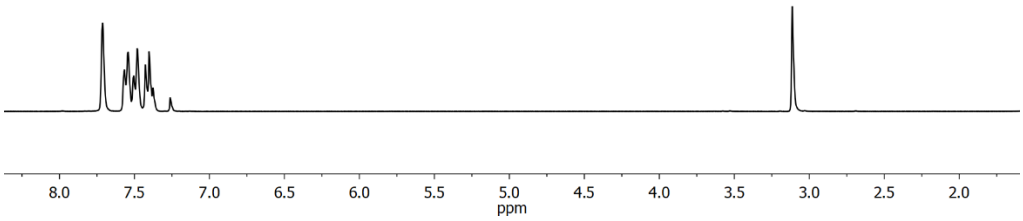
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

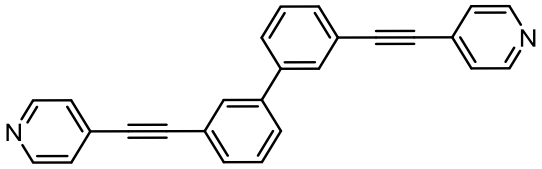


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



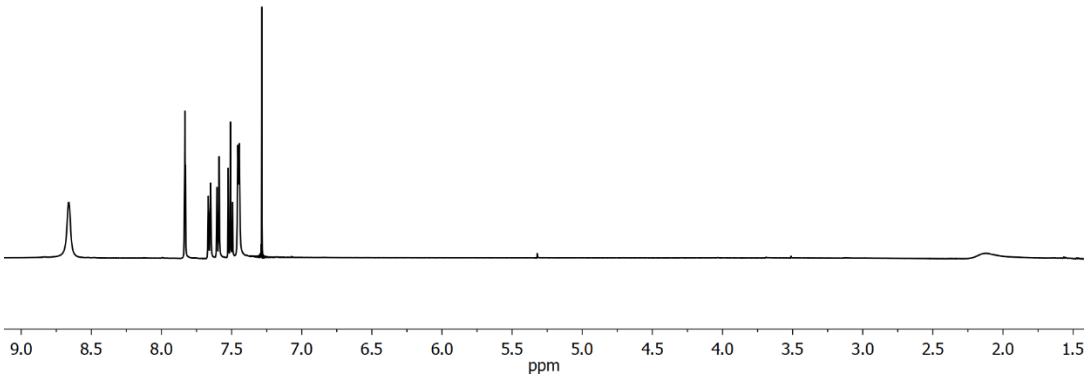
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)



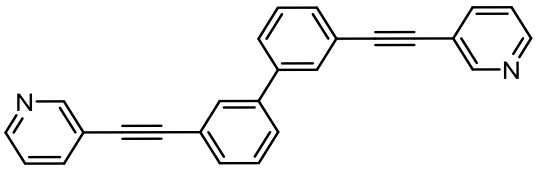


L9

^{1}H NMR (CDCl3, 298 K, 500 MHz)

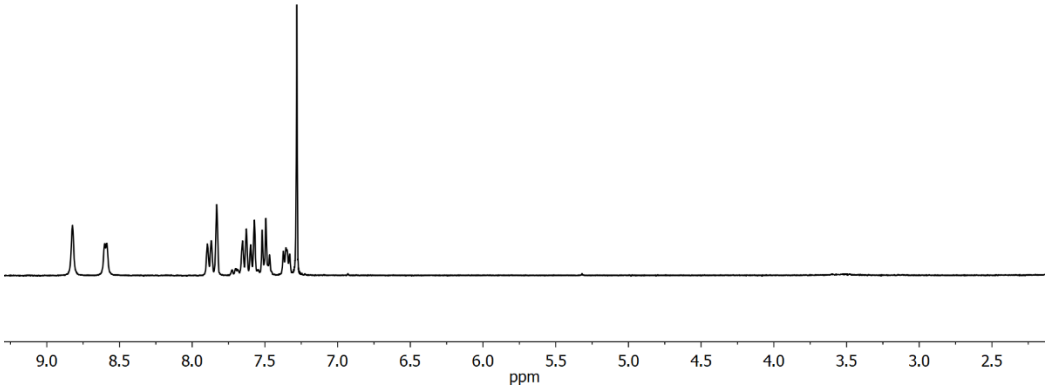


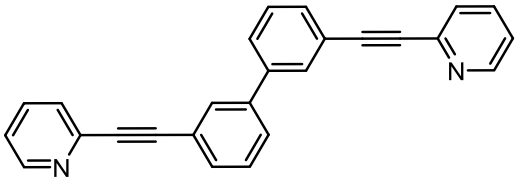
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



L10

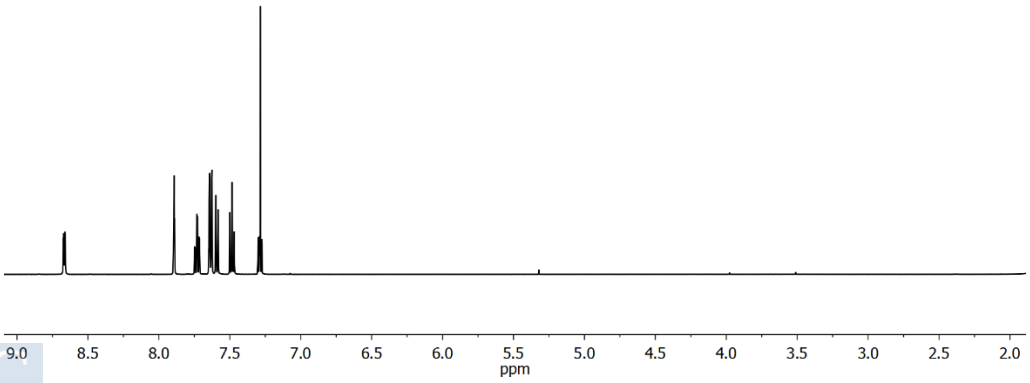
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)



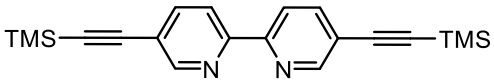


L11

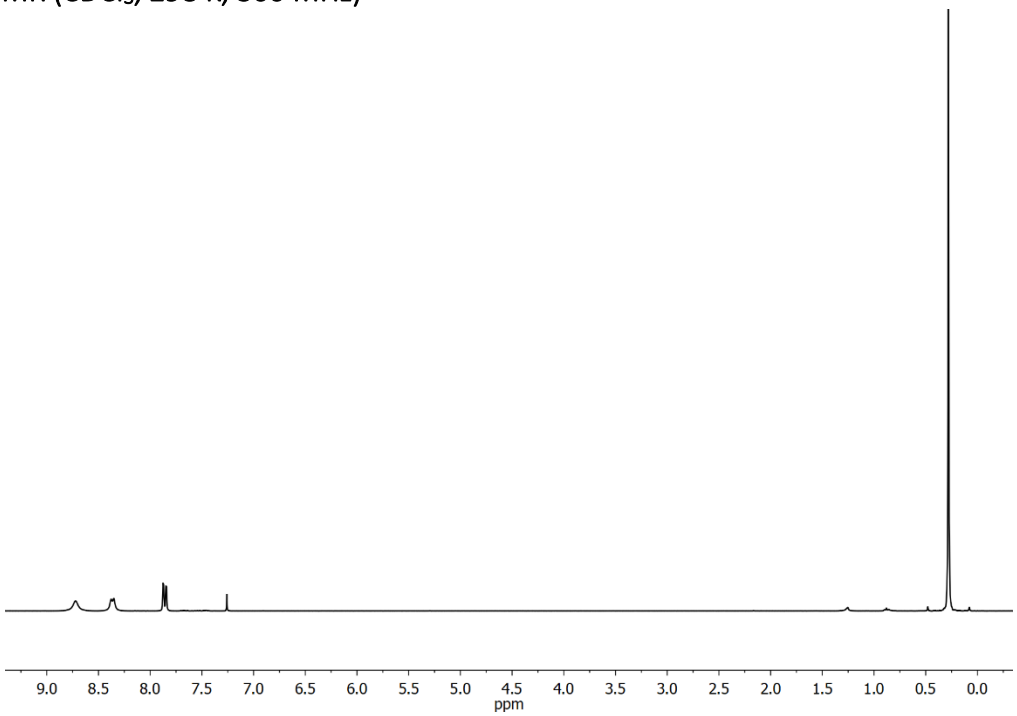
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

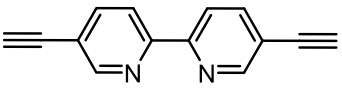


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

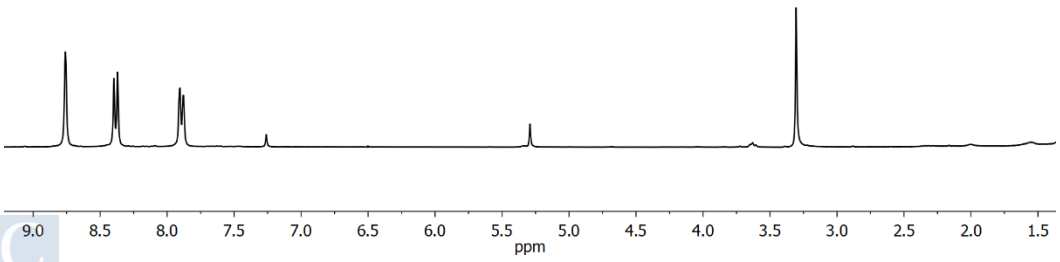


^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

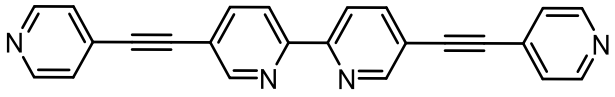




^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

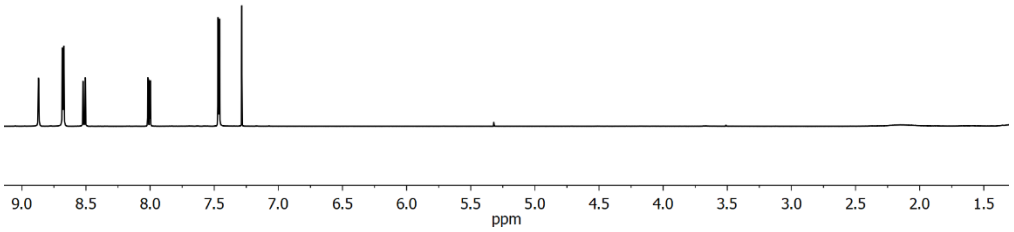


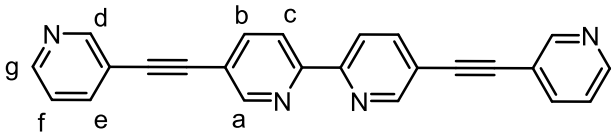
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



L12

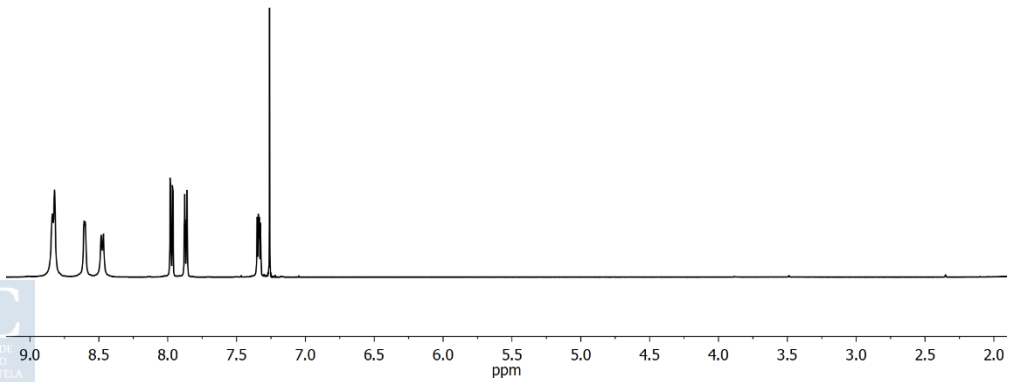
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)





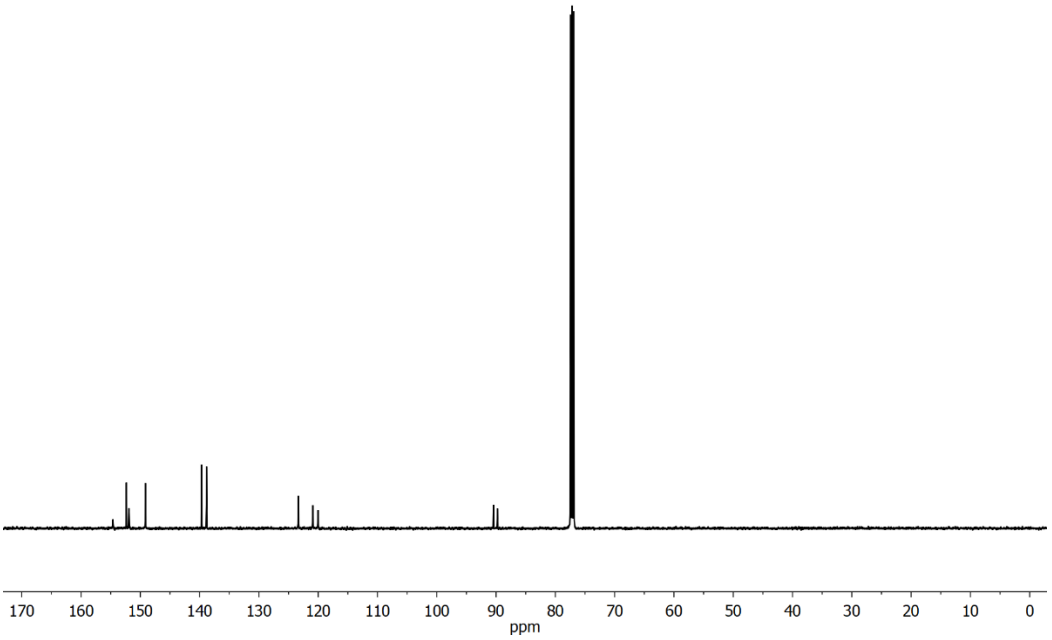
L13

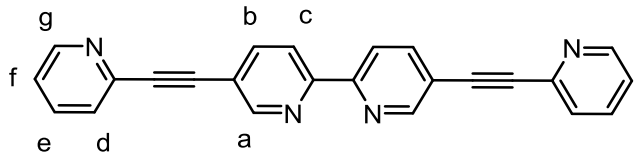
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

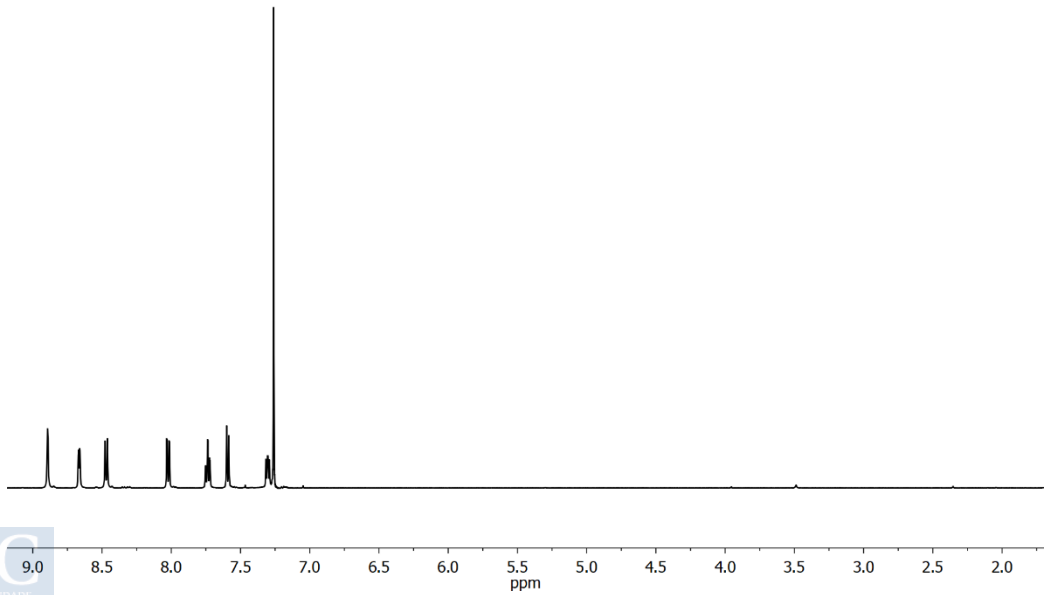
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)





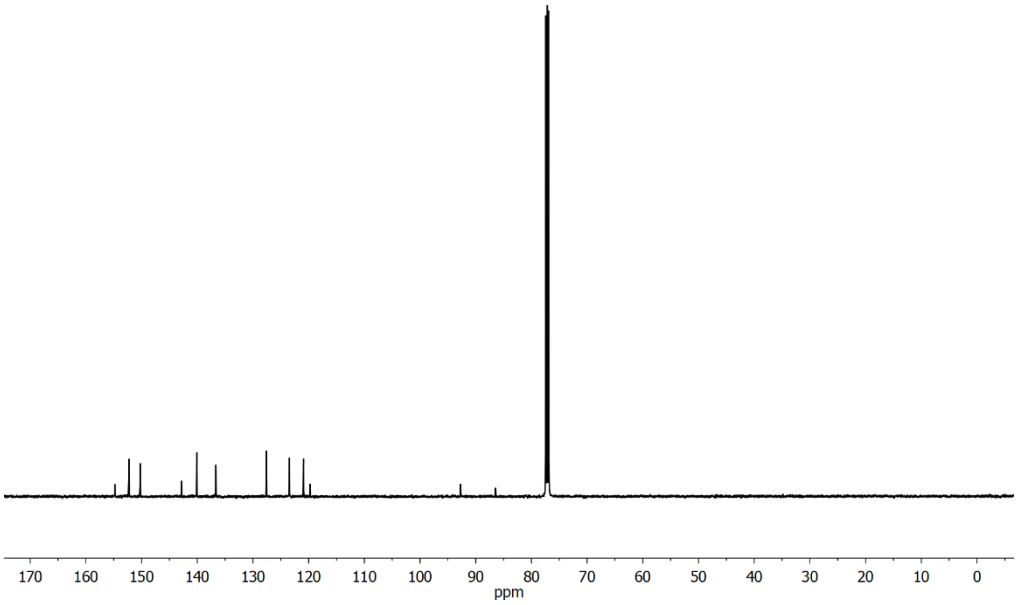
L14

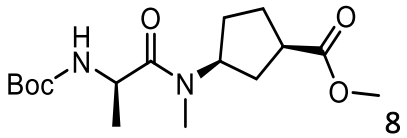
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

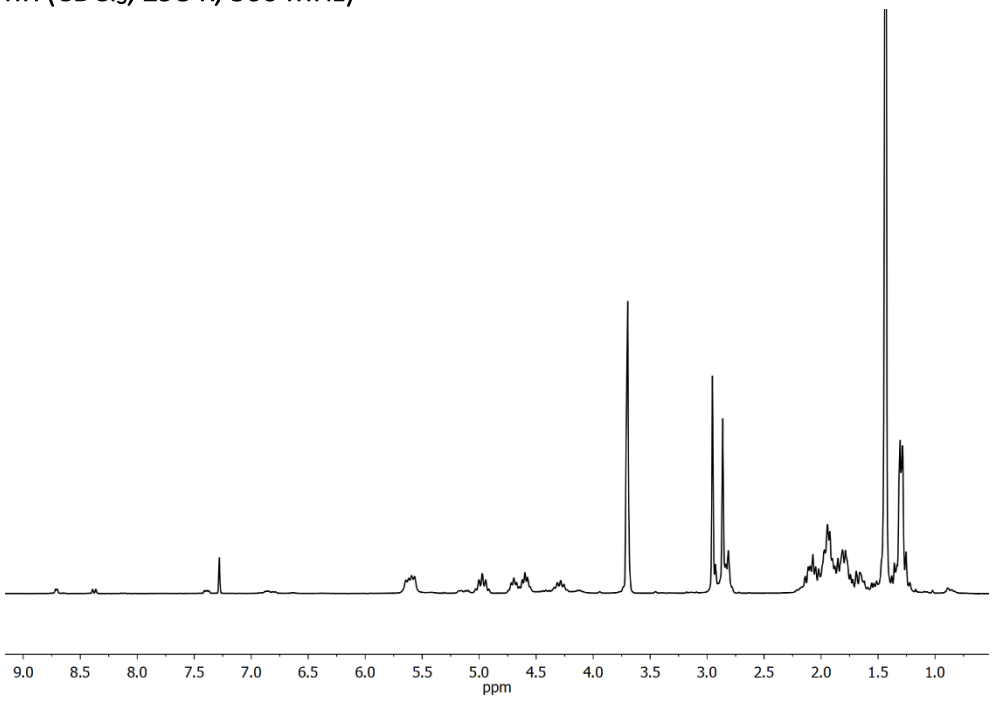
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)





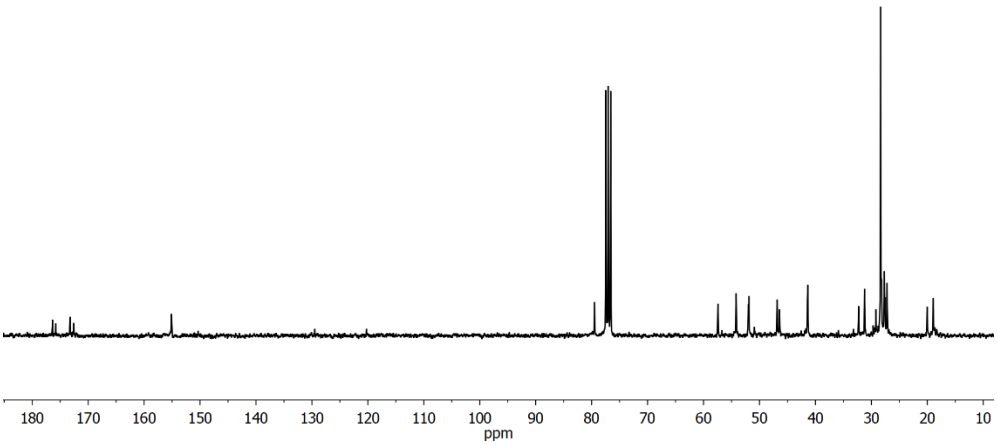
8

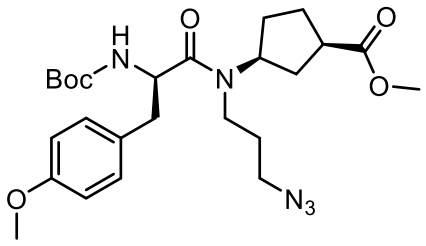
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

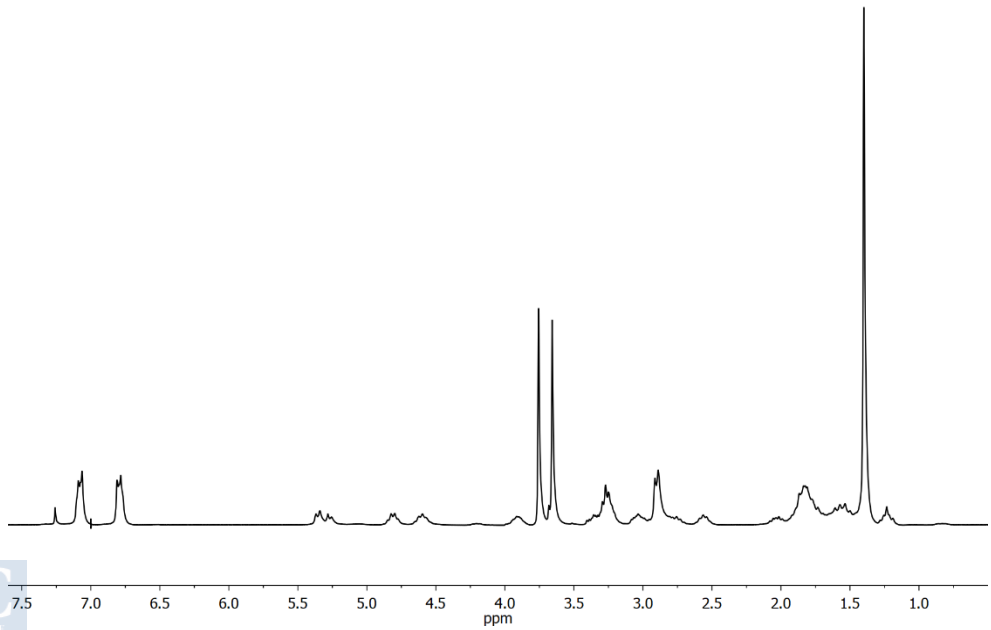
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 298 K, 75 MHz)





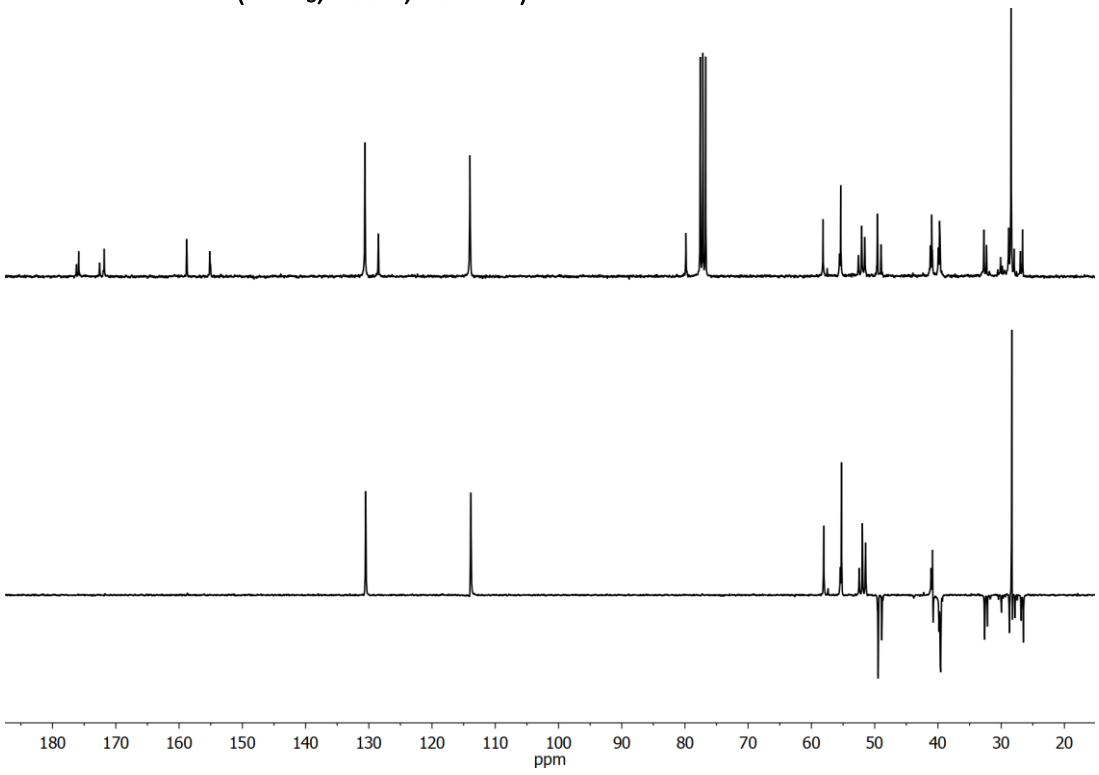
10

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

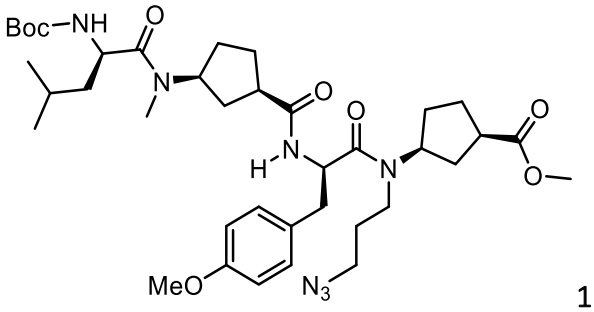


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 75 MHz)

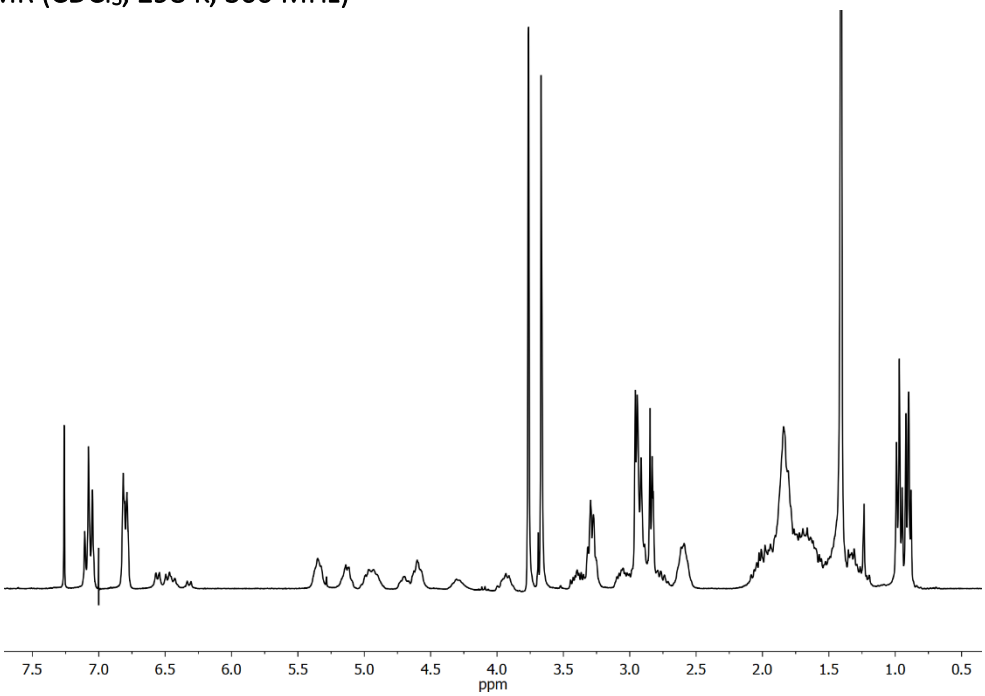


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

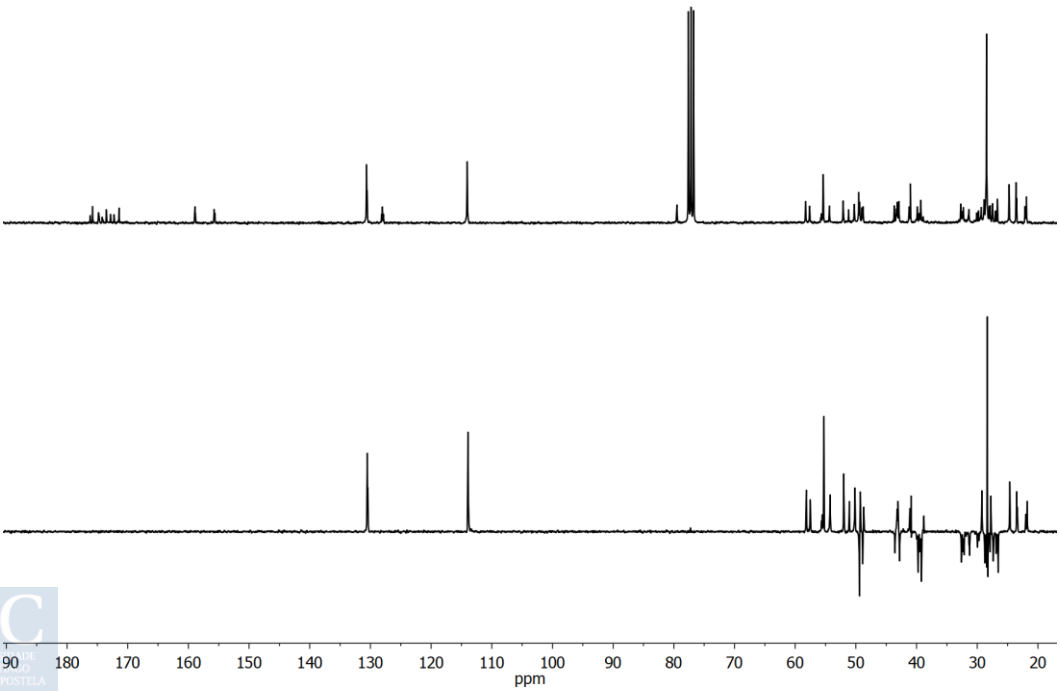


11

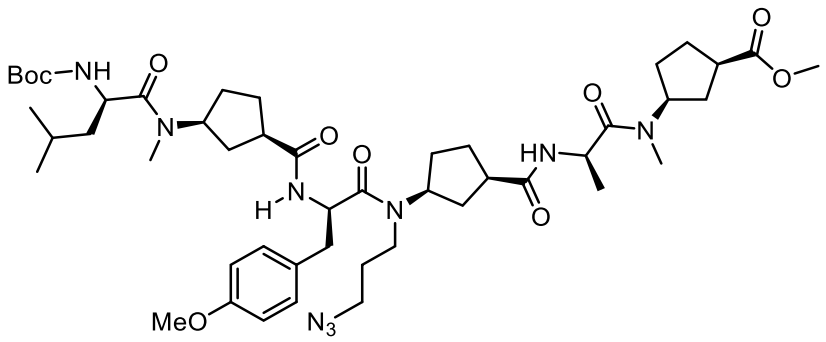
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)



^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 75 MHz)

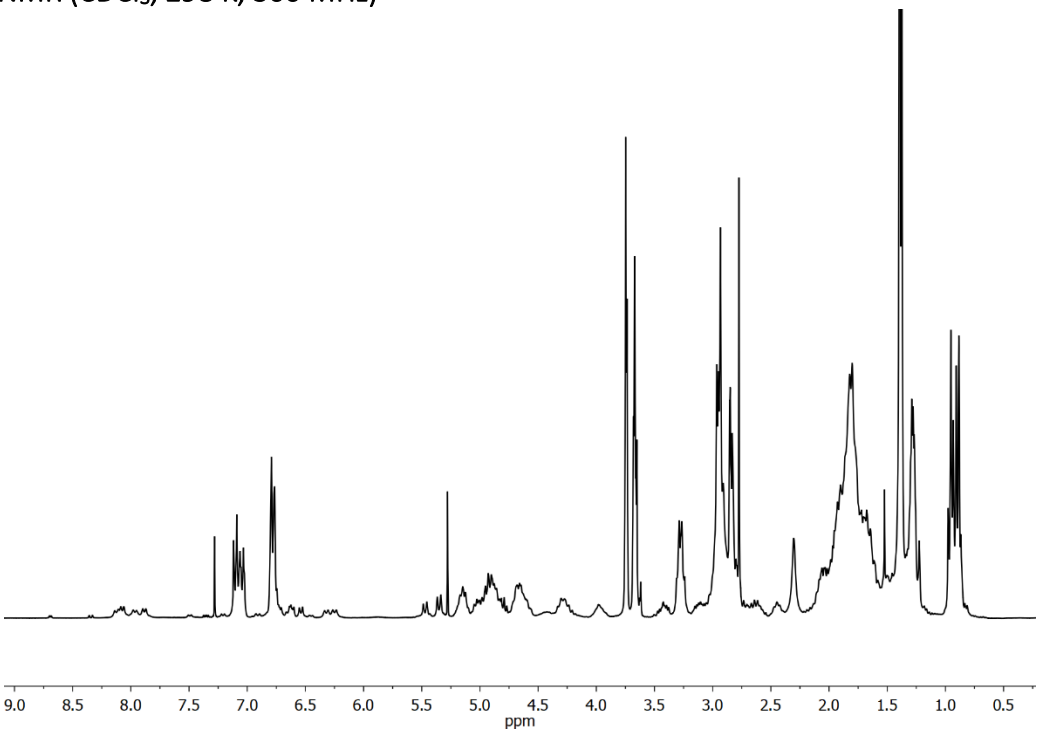


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

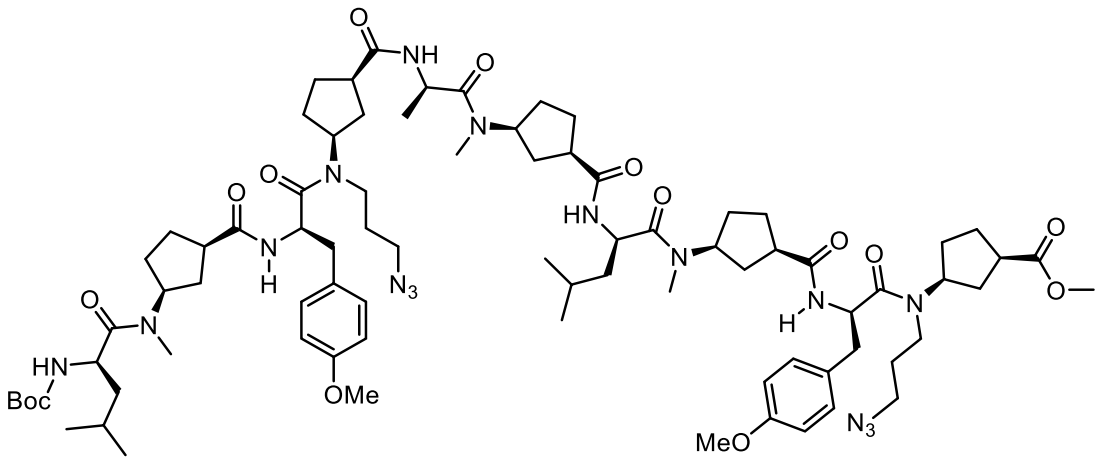


12

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

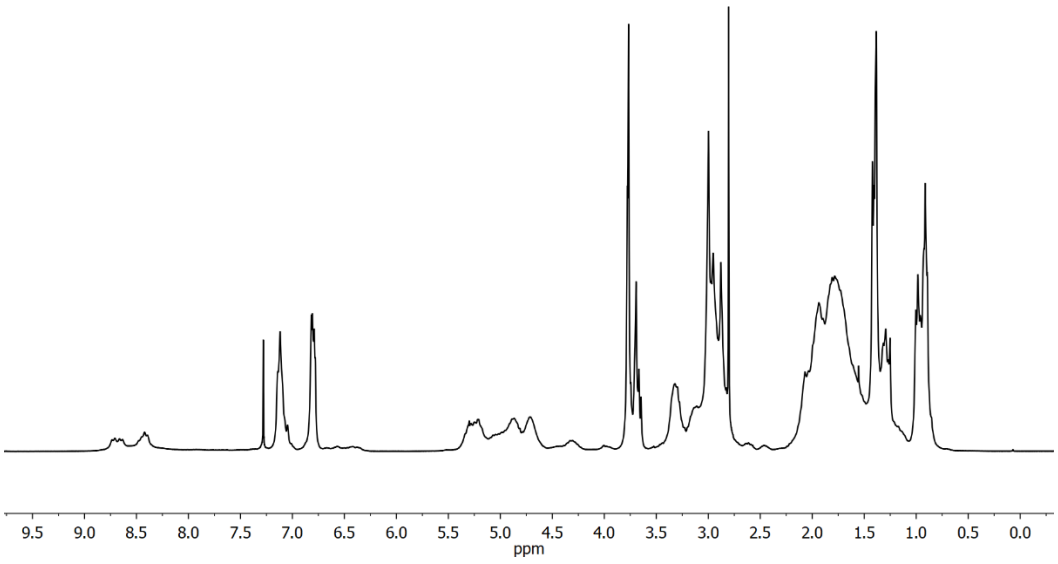


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

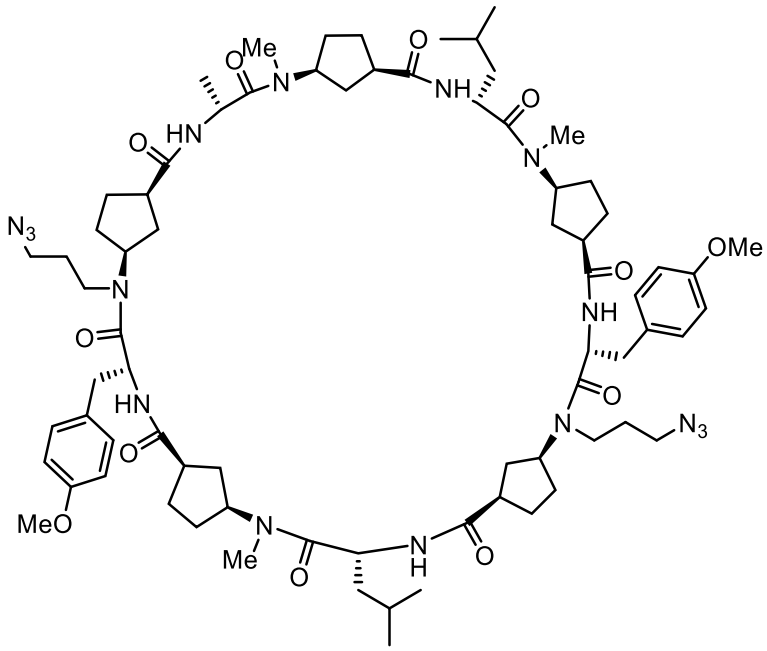


13

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

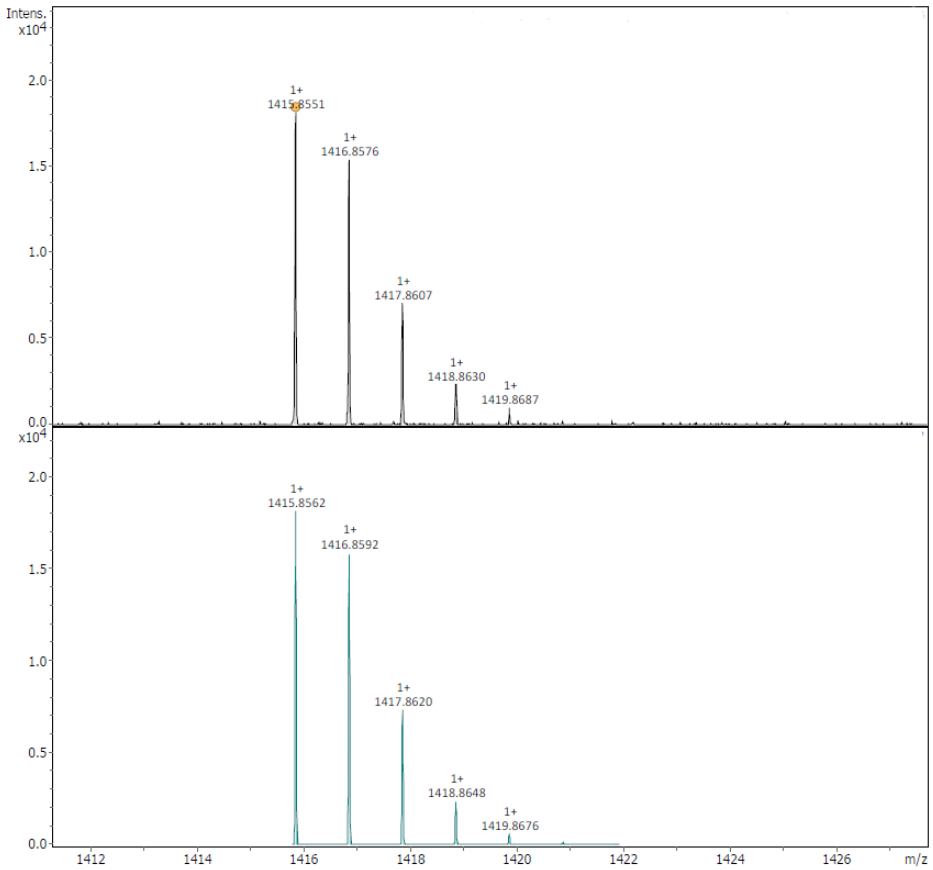


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



CP1

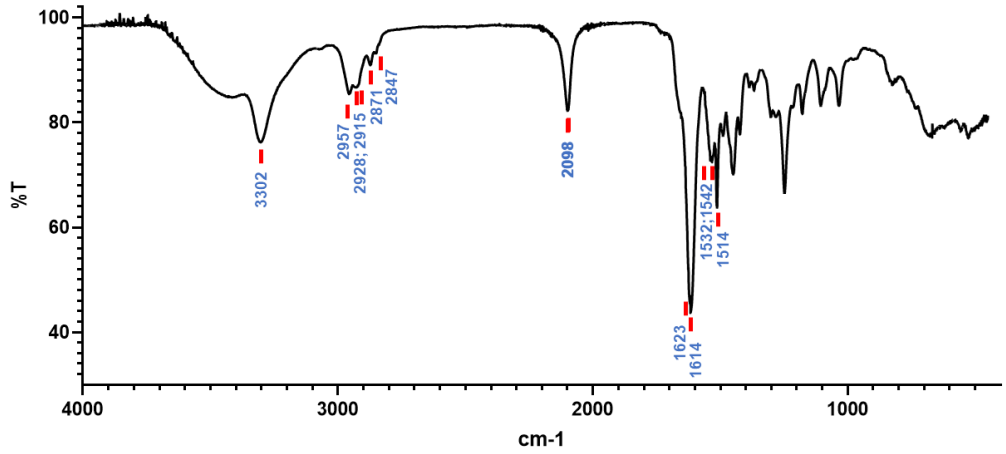
ESI MS (real/predicted)



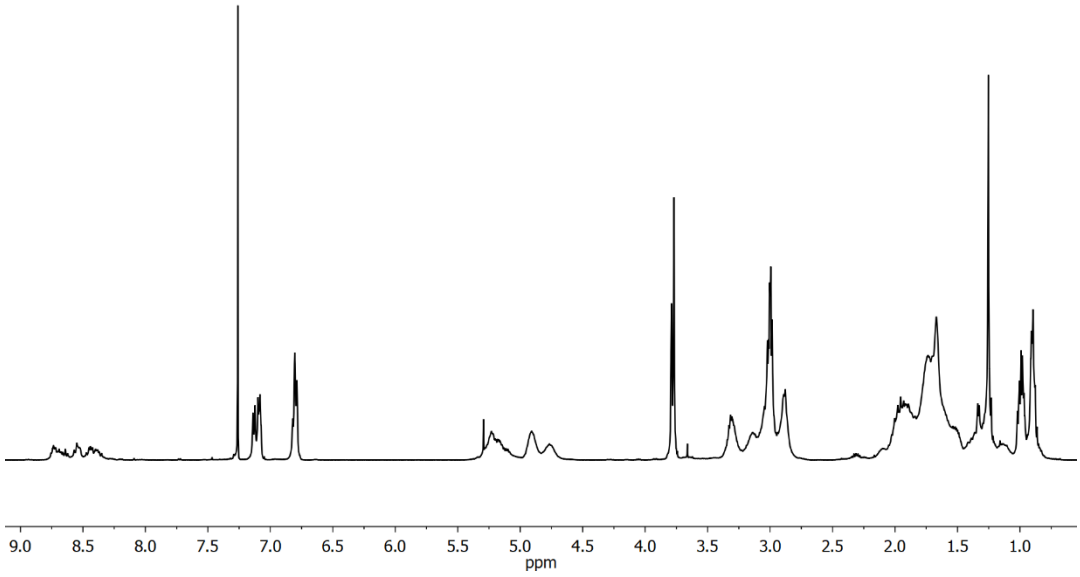
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e¯ Conf	N-Rule
1415.8551	1	C74H111N16O12	100.00	1415.8562	1.1	0.8	17.7	28.0	even	ok

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FTIR (neat, 298 K)

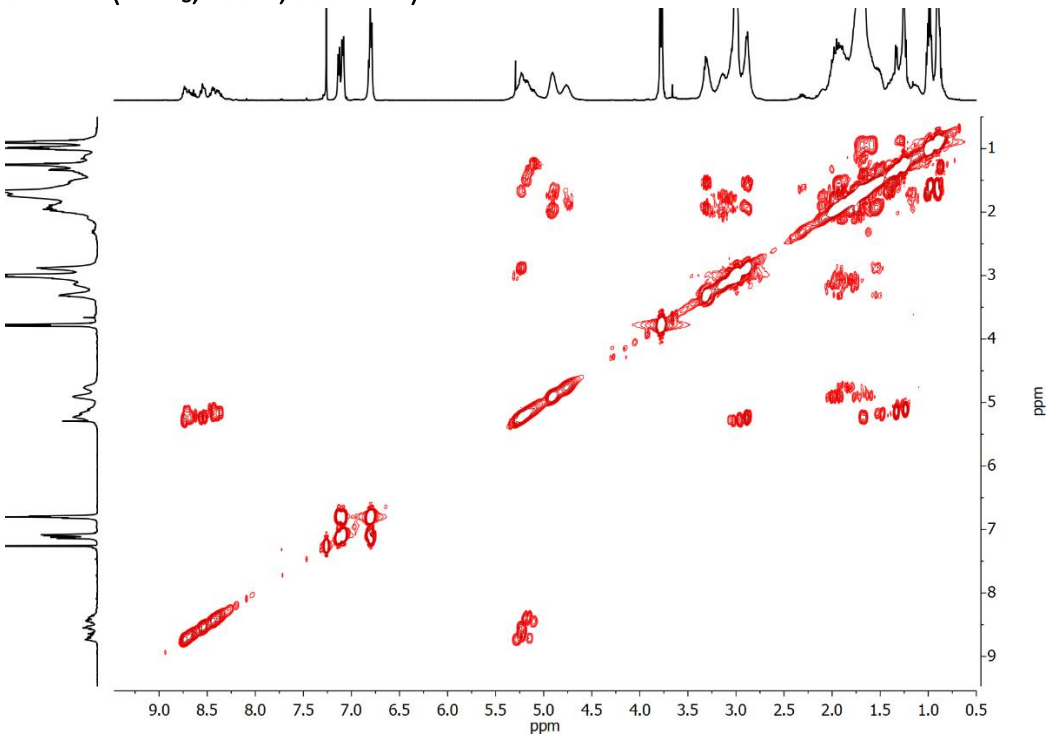


^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

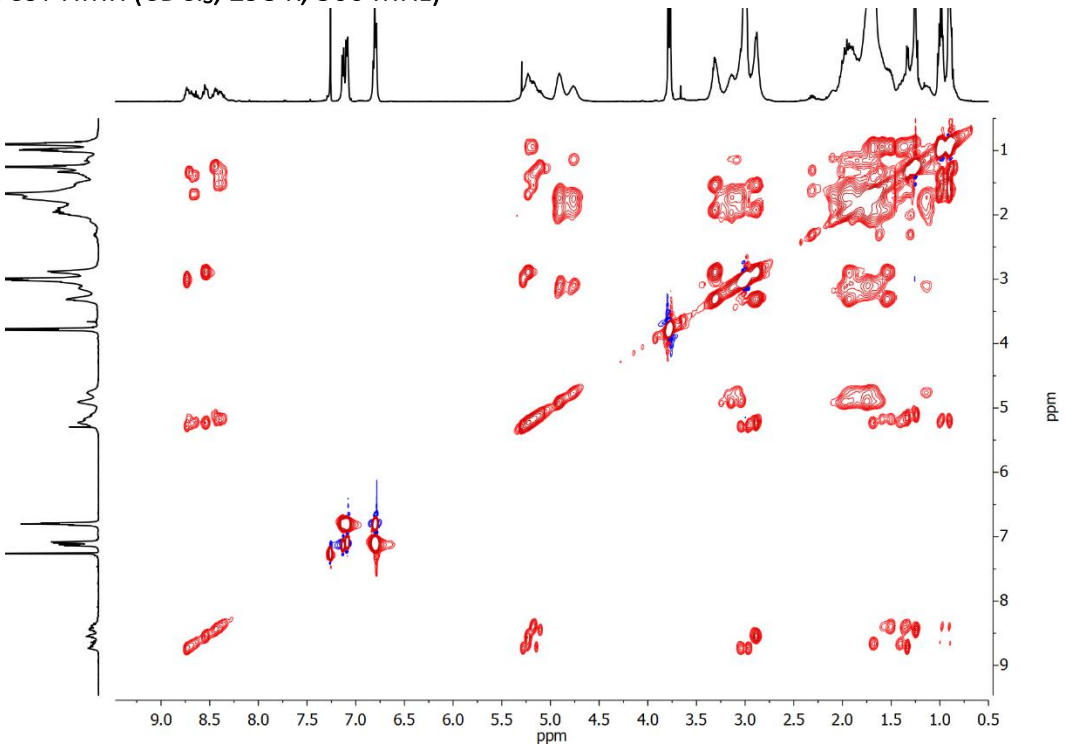


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

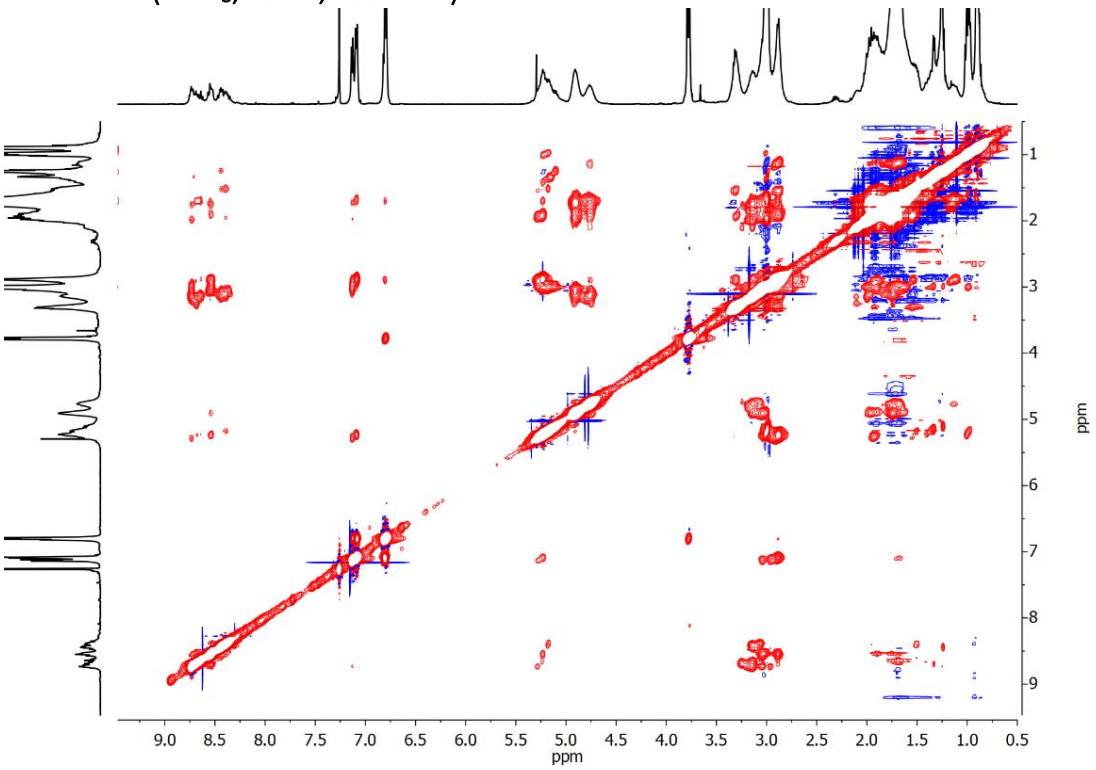


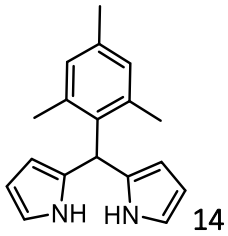
TOCSY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

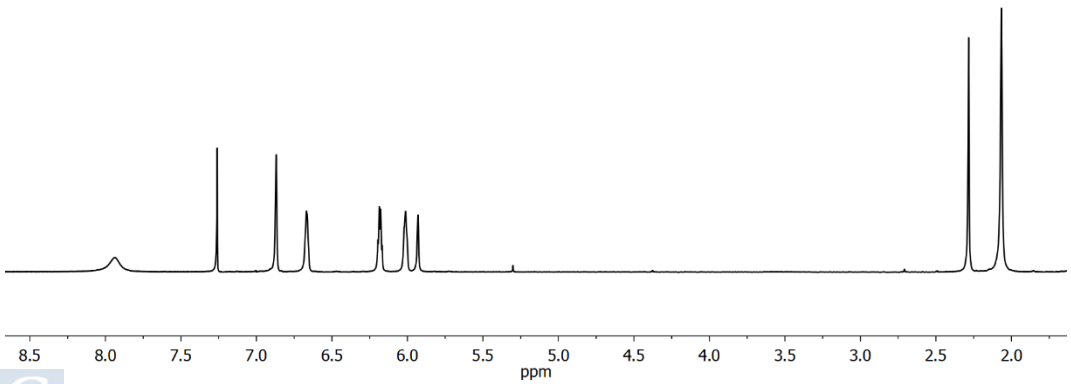
NOESY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



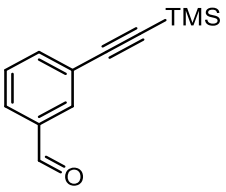


14

^1H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

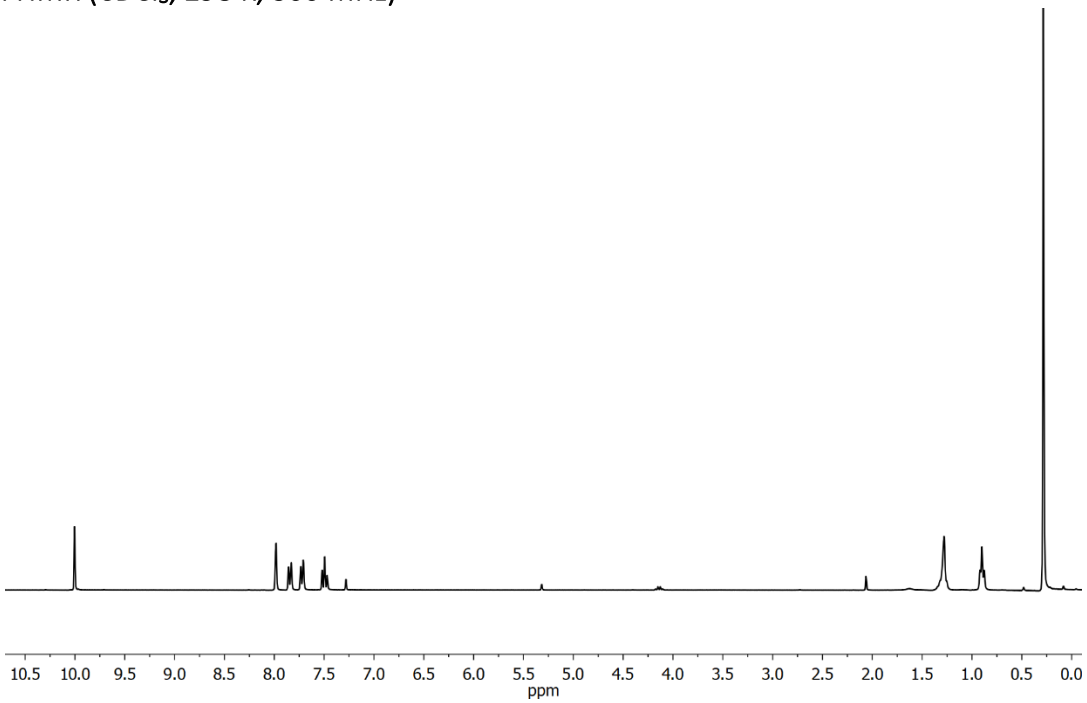


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

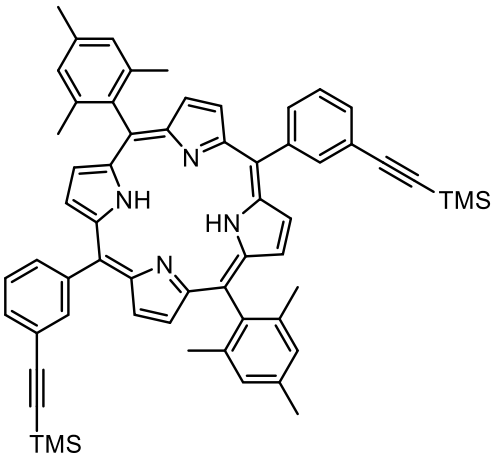


15

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

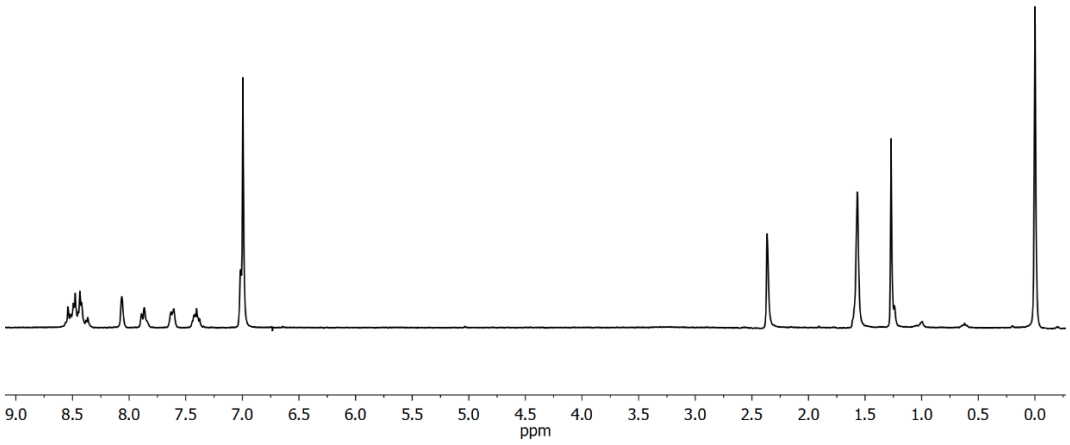


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

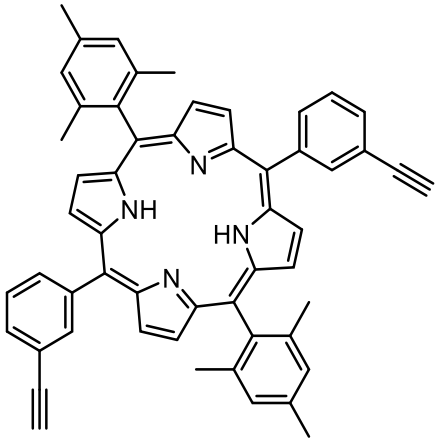


16

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

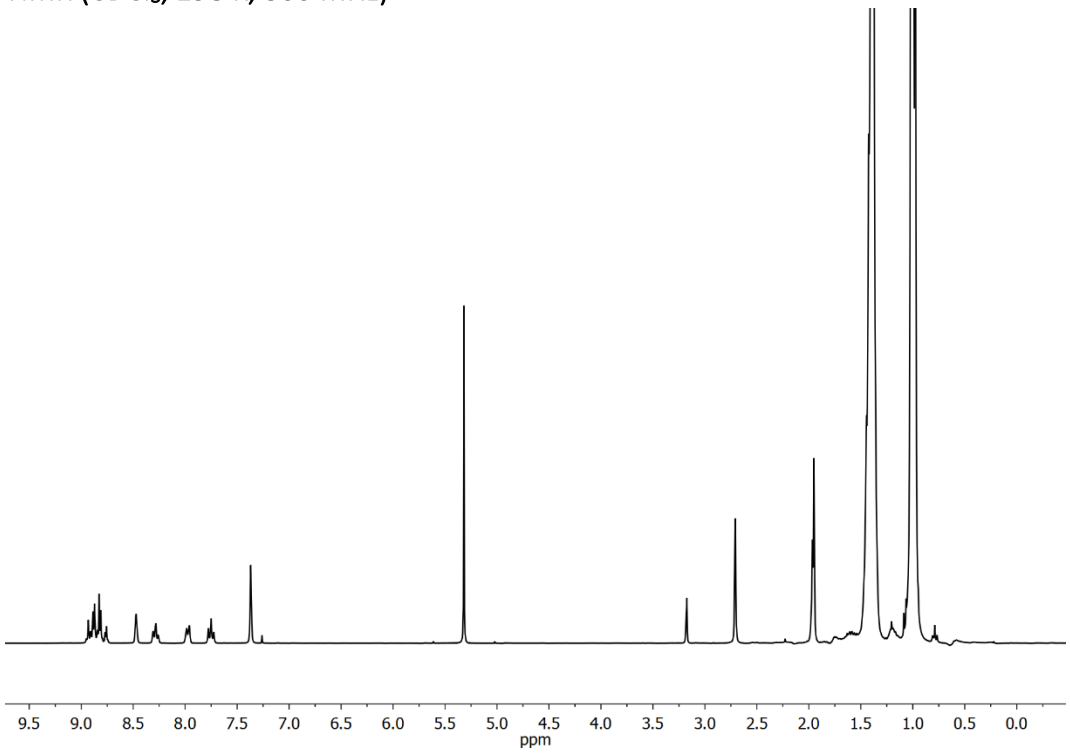


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

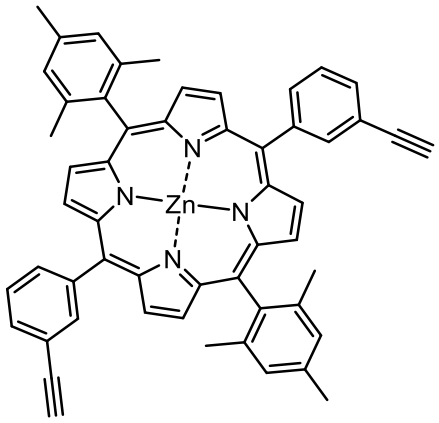


17

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

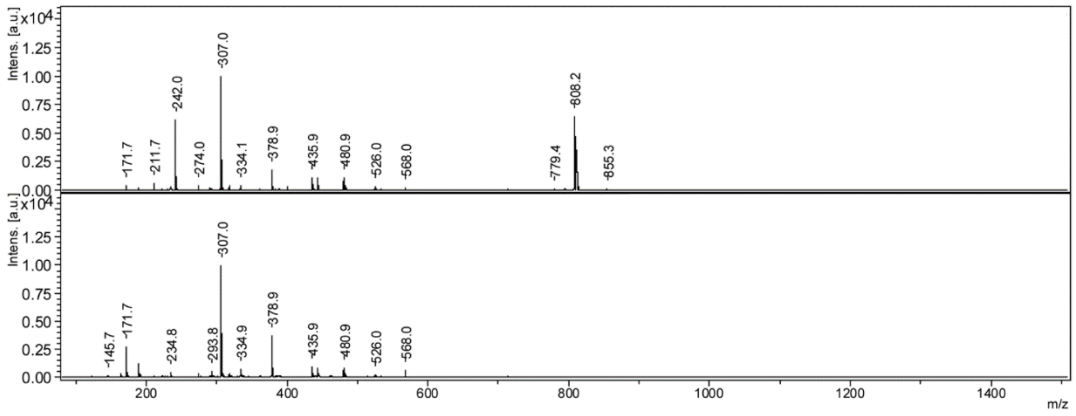


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

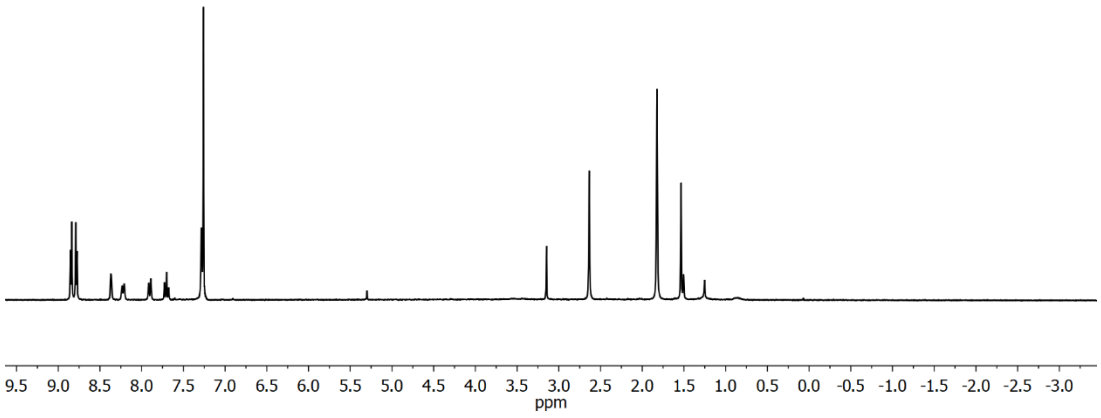


P1

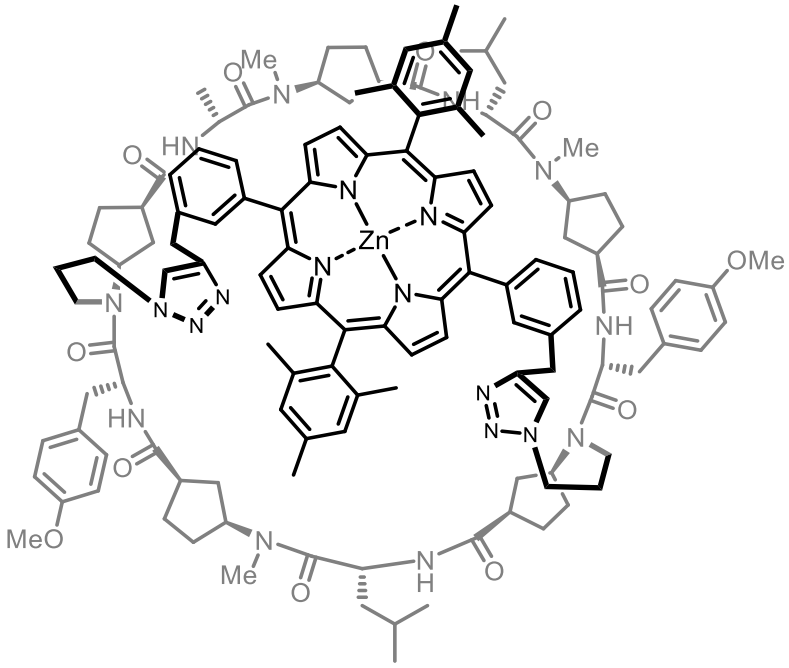
MALDI-TOF MS



^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

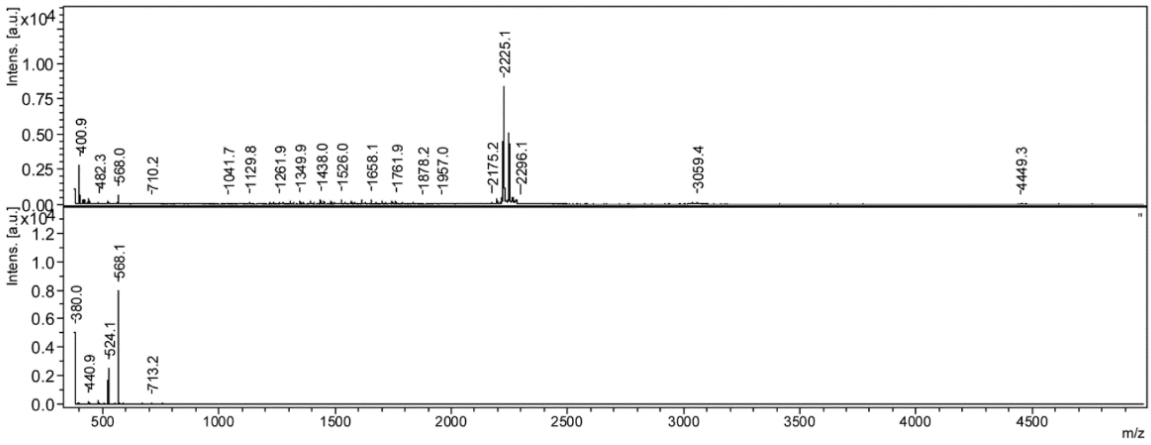


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

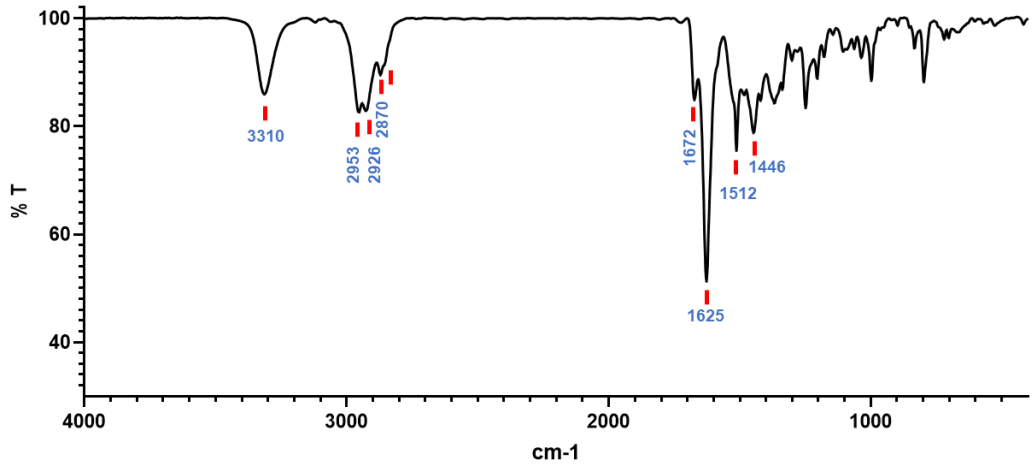


CP2/D2

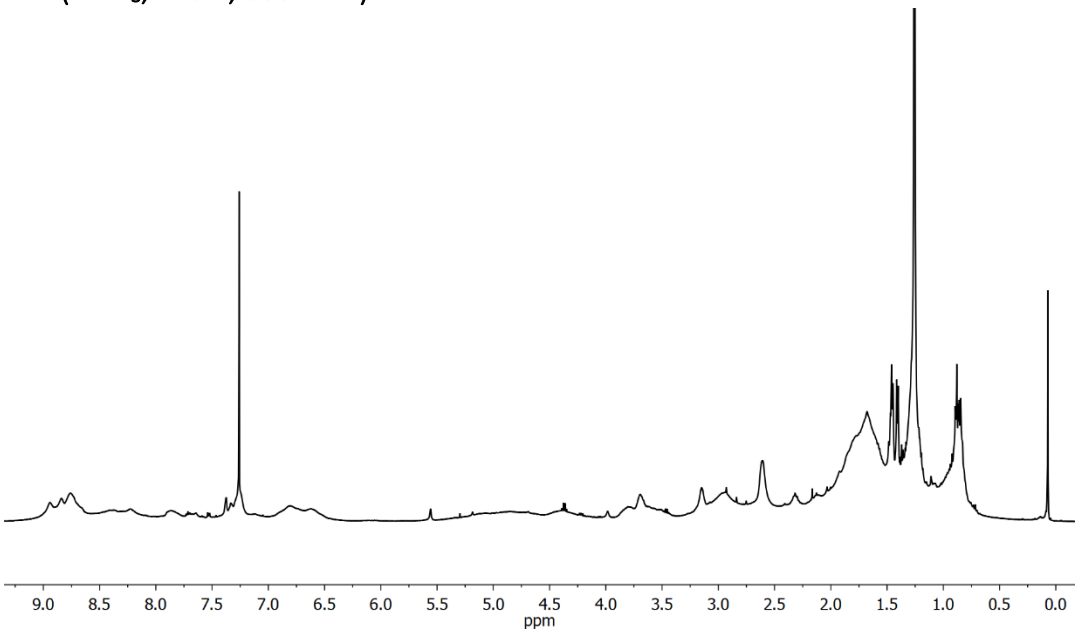
MALDI-TOF MS (sample/matrix)



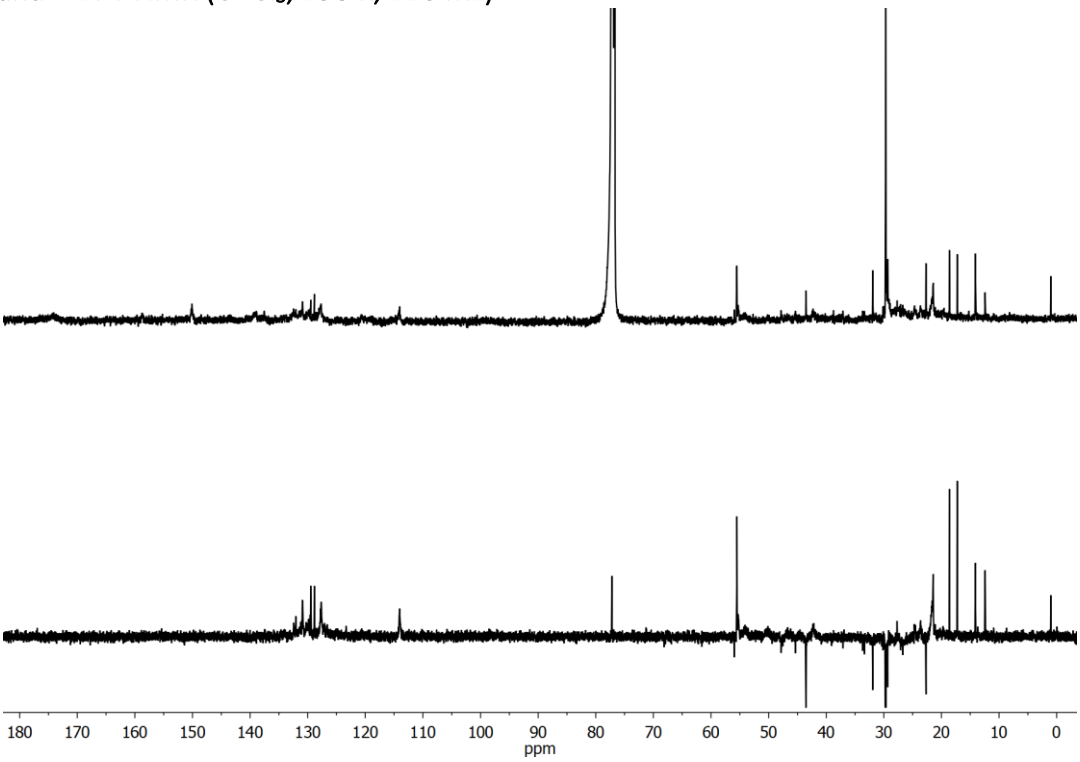
FTIR (neat, 298 K)



^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

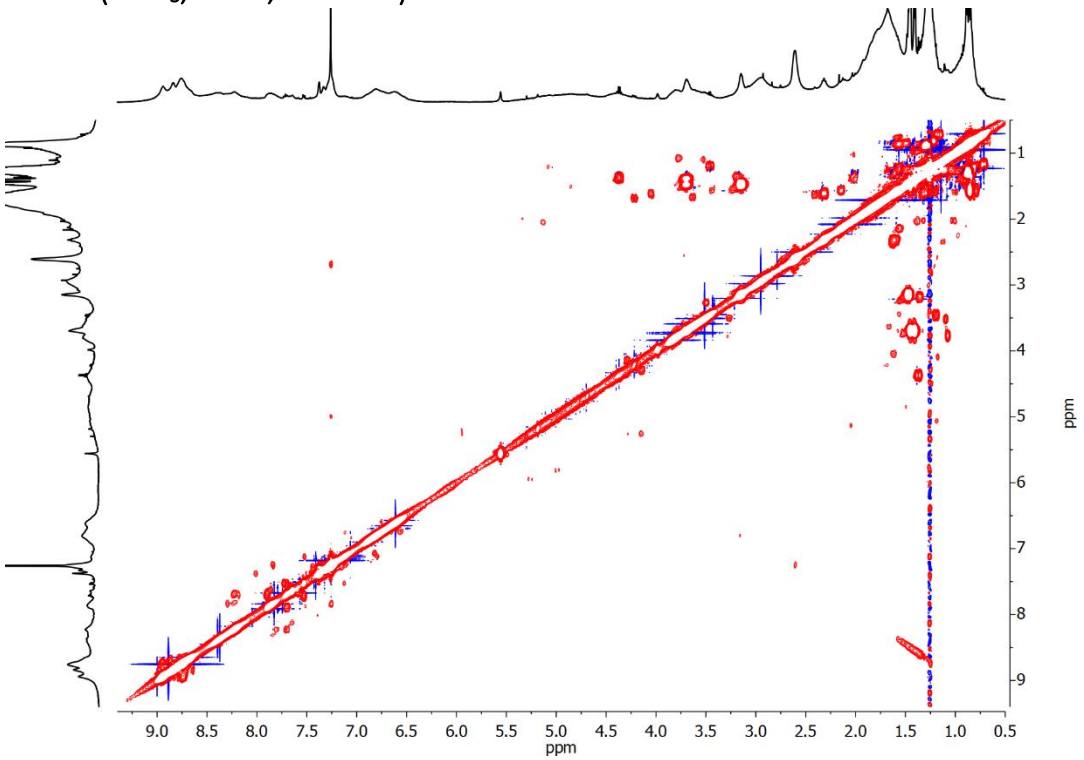


^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 Mz)

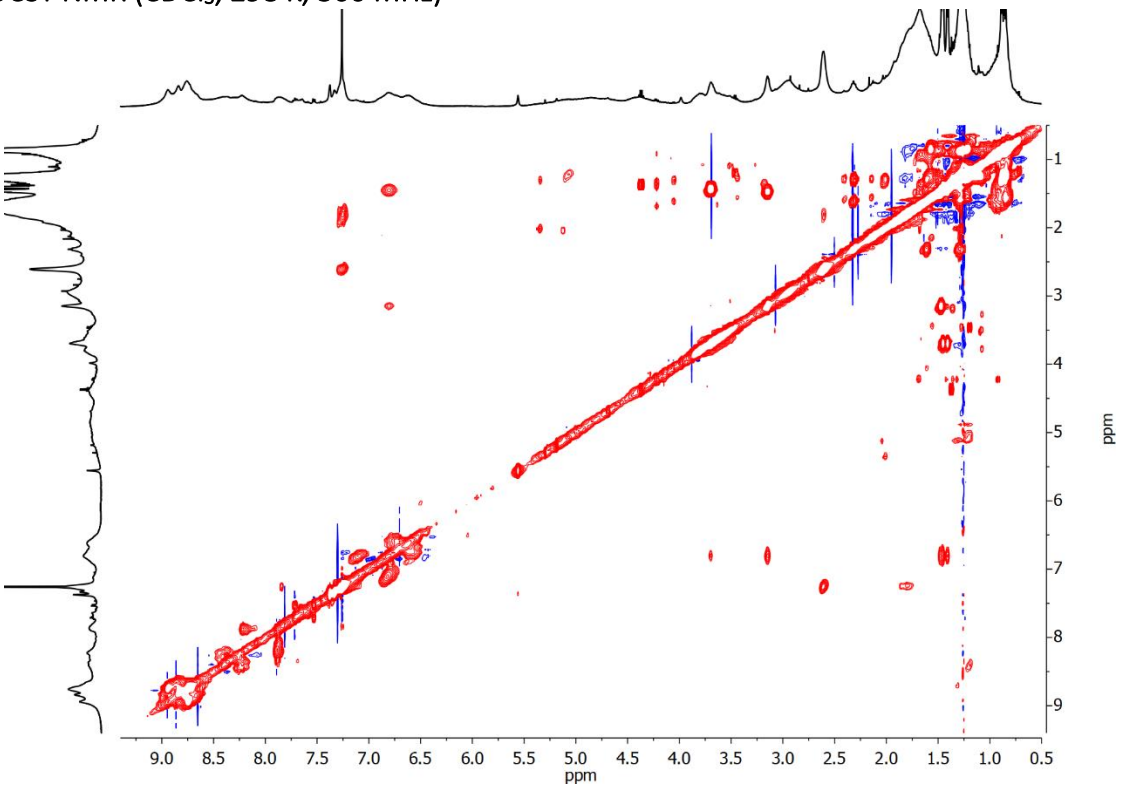


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY RMN ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

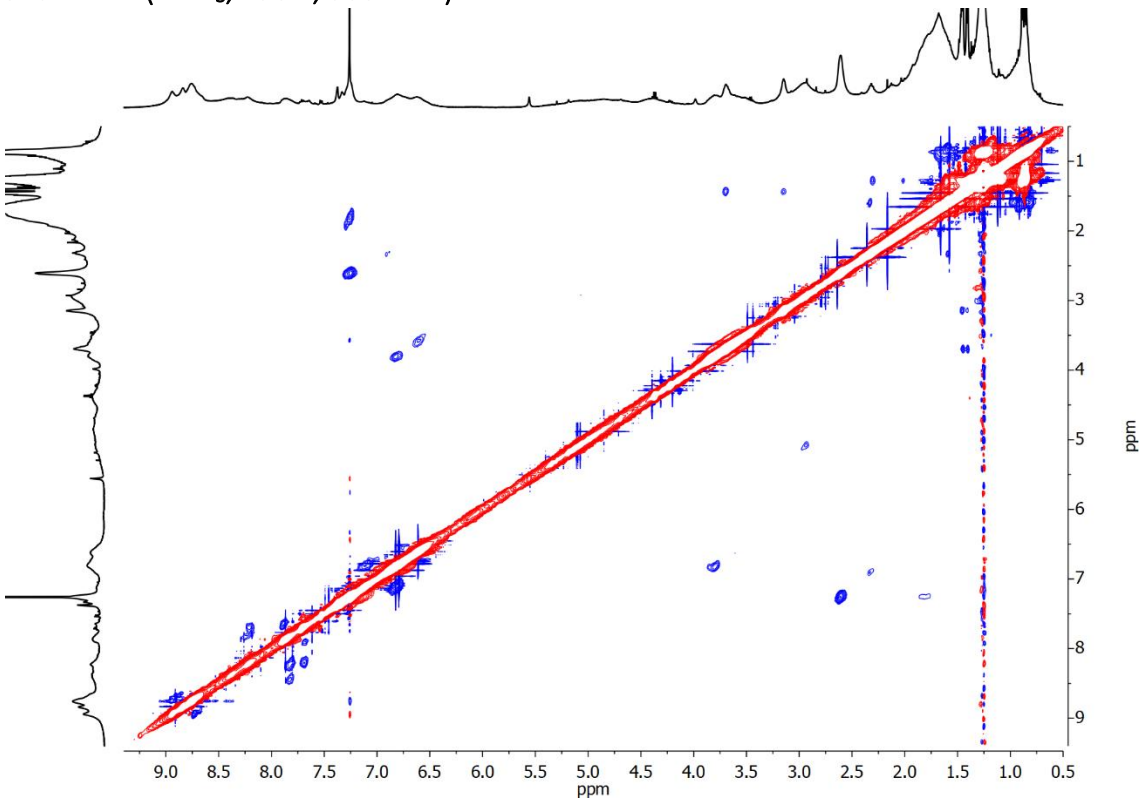


TOCSY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

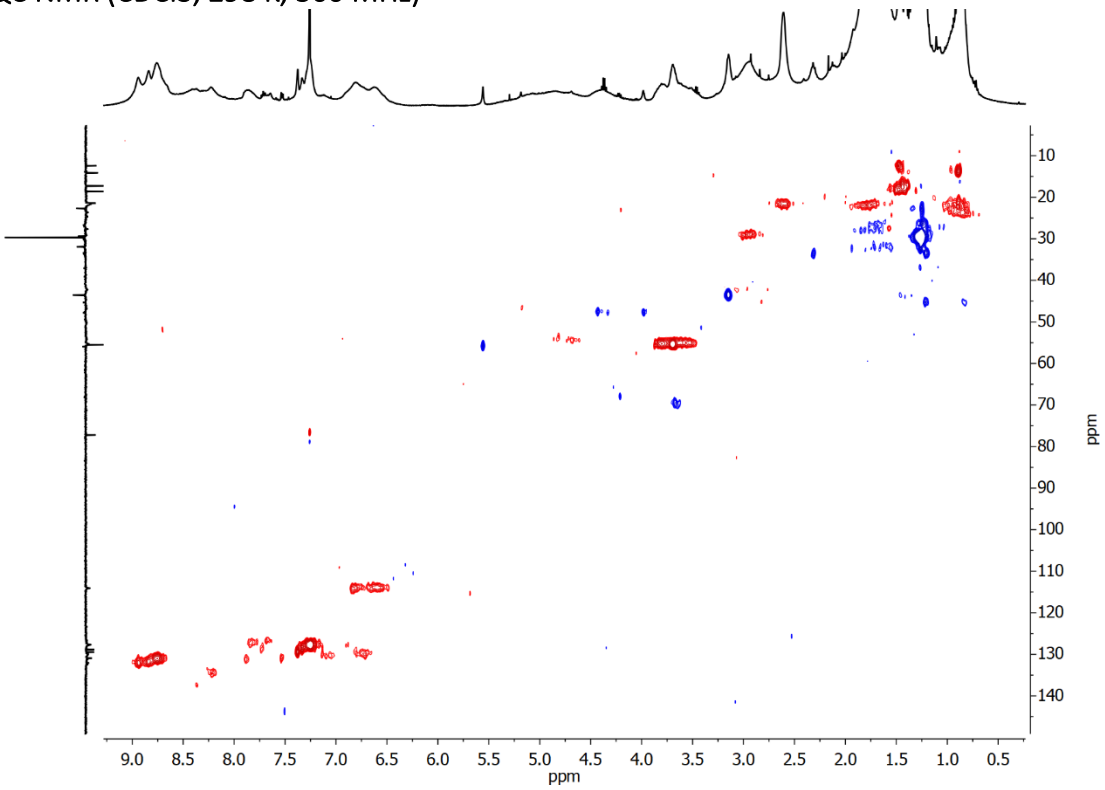


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

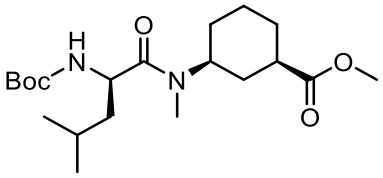
ROESY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



HSQC NMR (CDCl3, 298 K, 500 MHz)

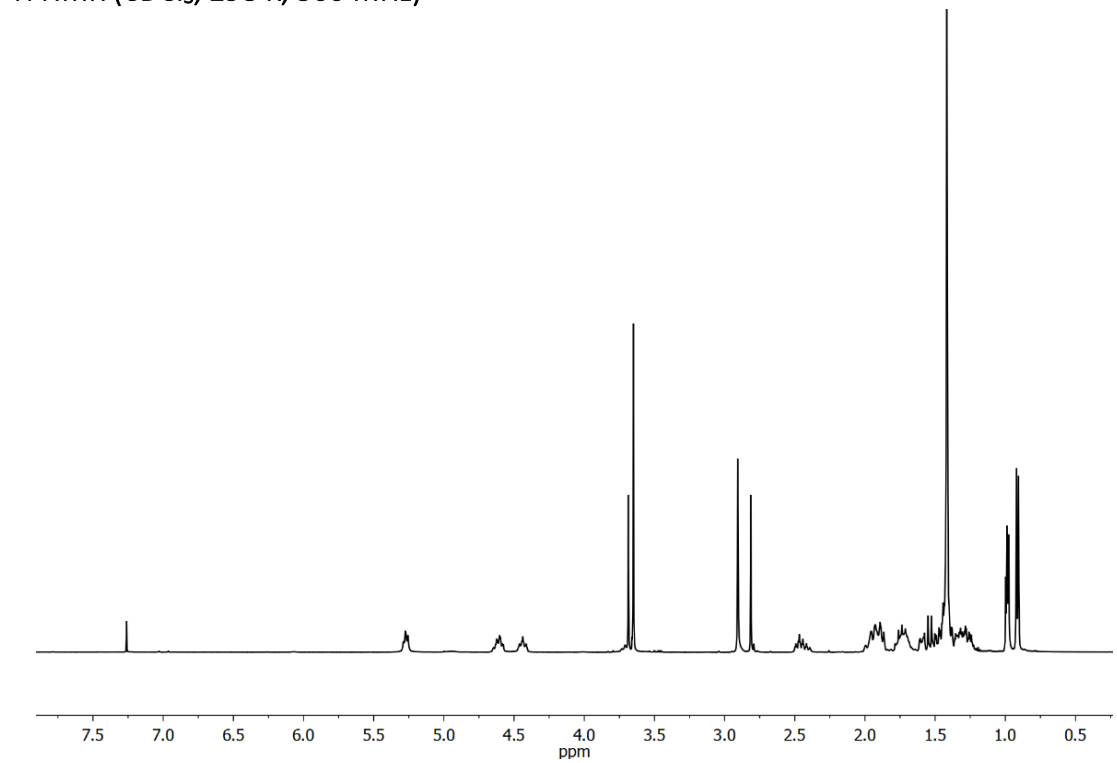


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

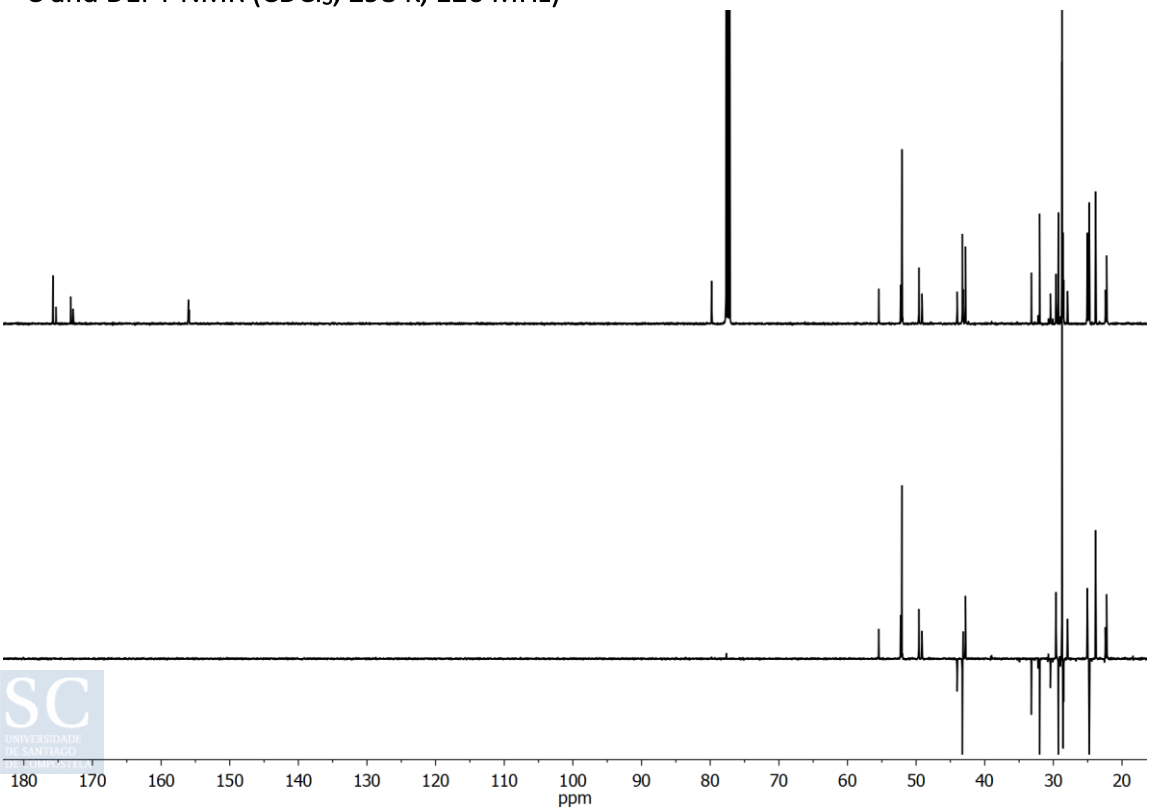


21

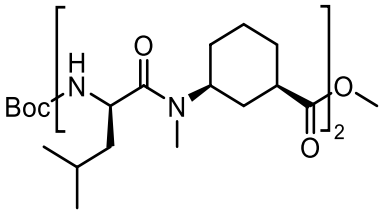
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)

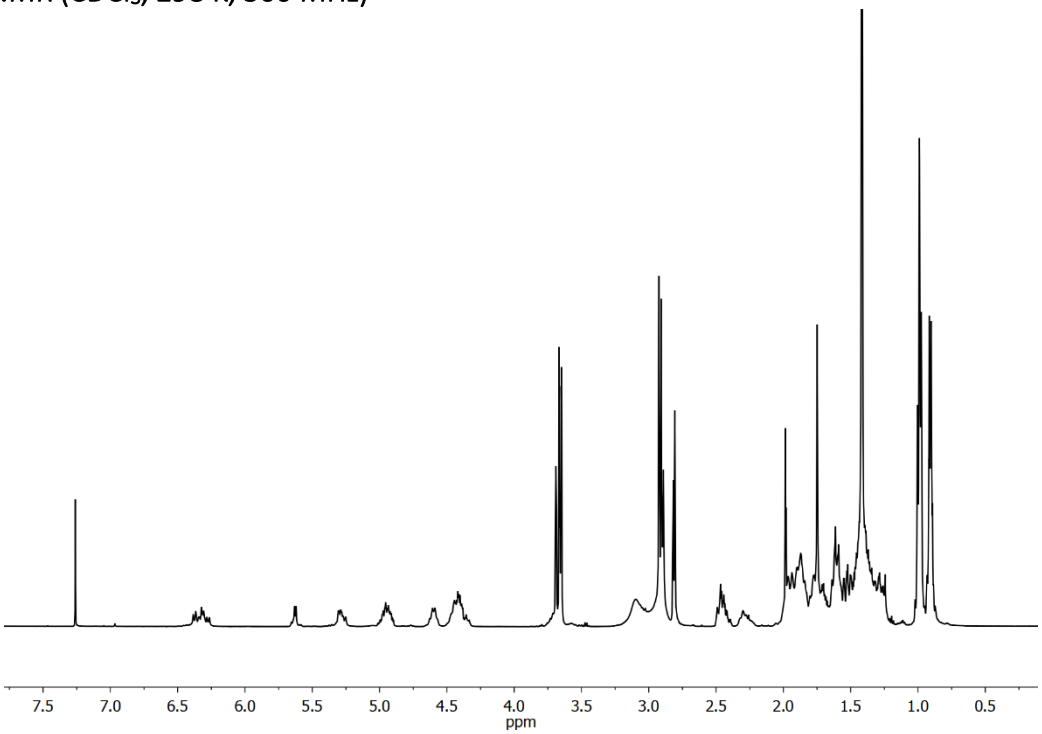


USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO

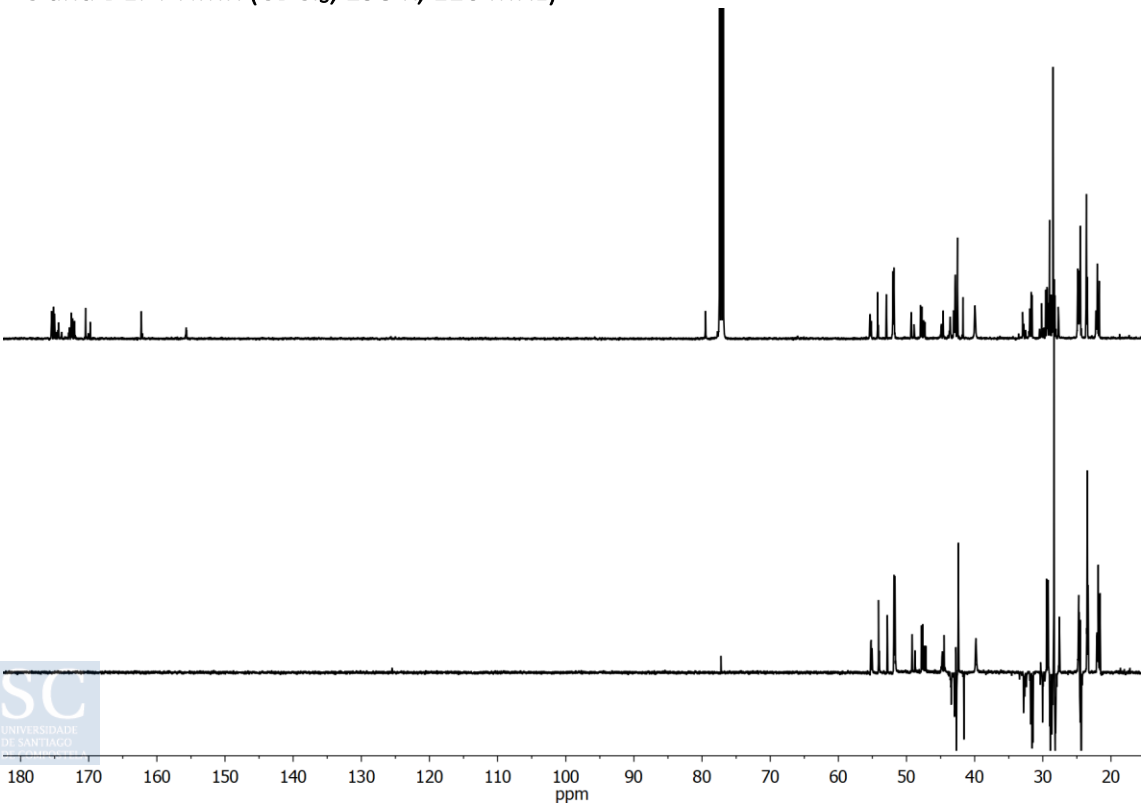


22

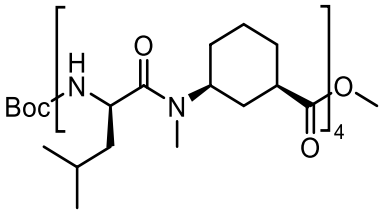
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)

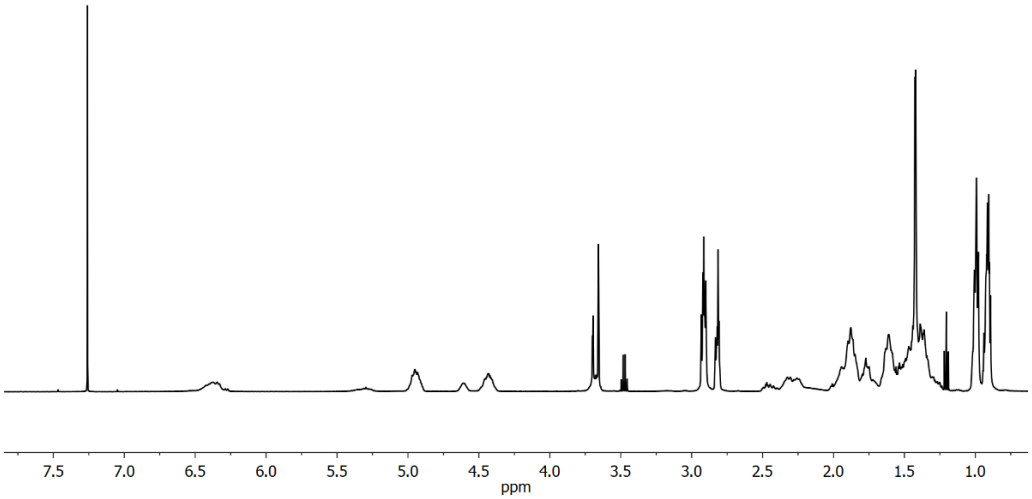


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

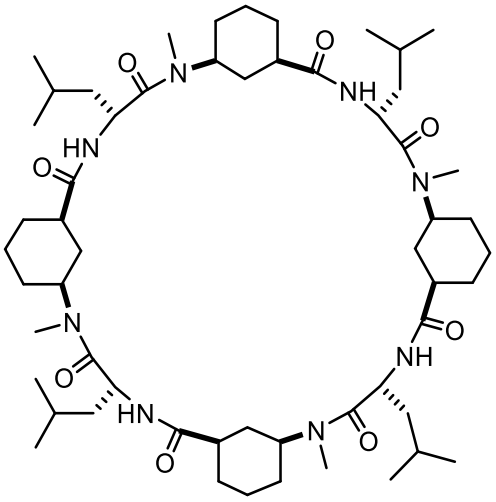


23

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

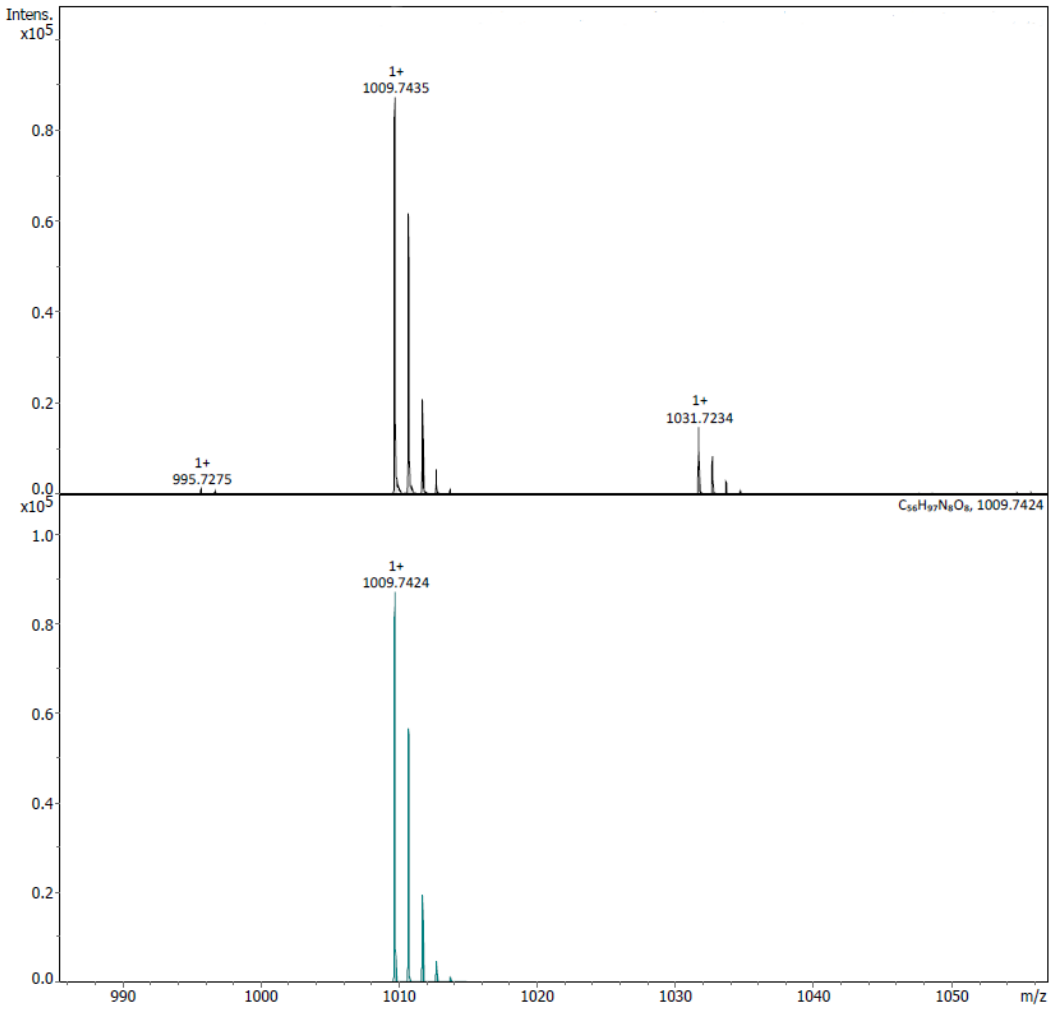


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



CP4/D4

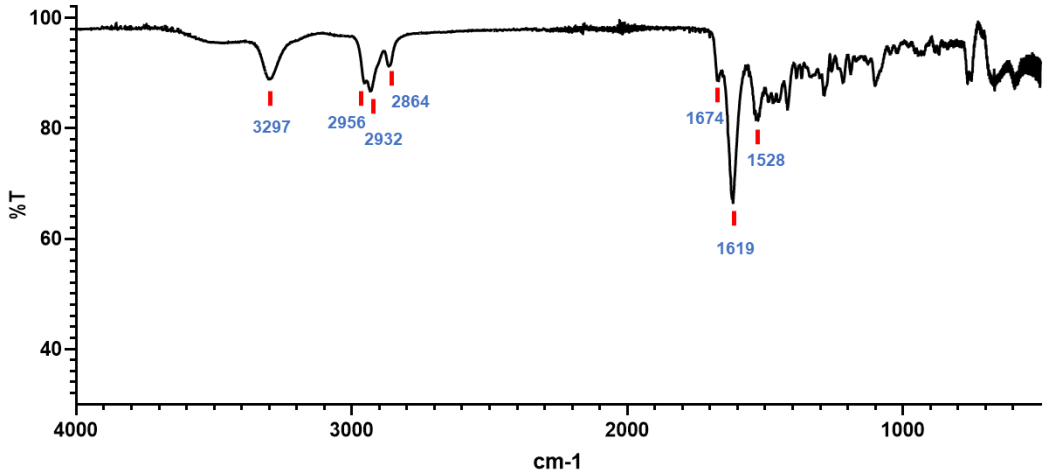
MS-ESI (real/predicted)



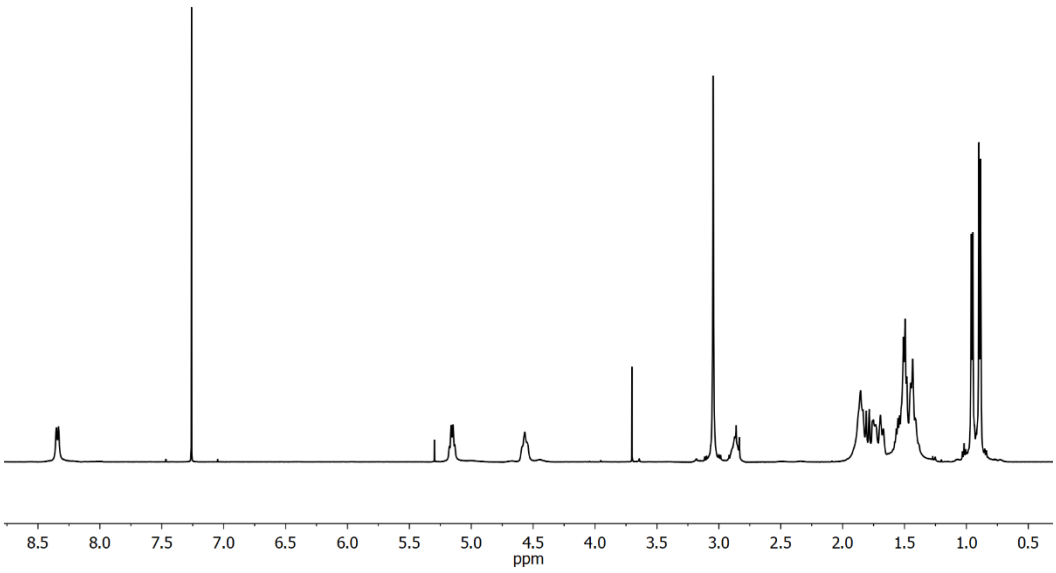
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
1009.7435	1	C56H97N8O8	100.00	1009.7424	-1.1	-1.1	27.8	13.0	even	ok

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FTIR (neat, 298 K)

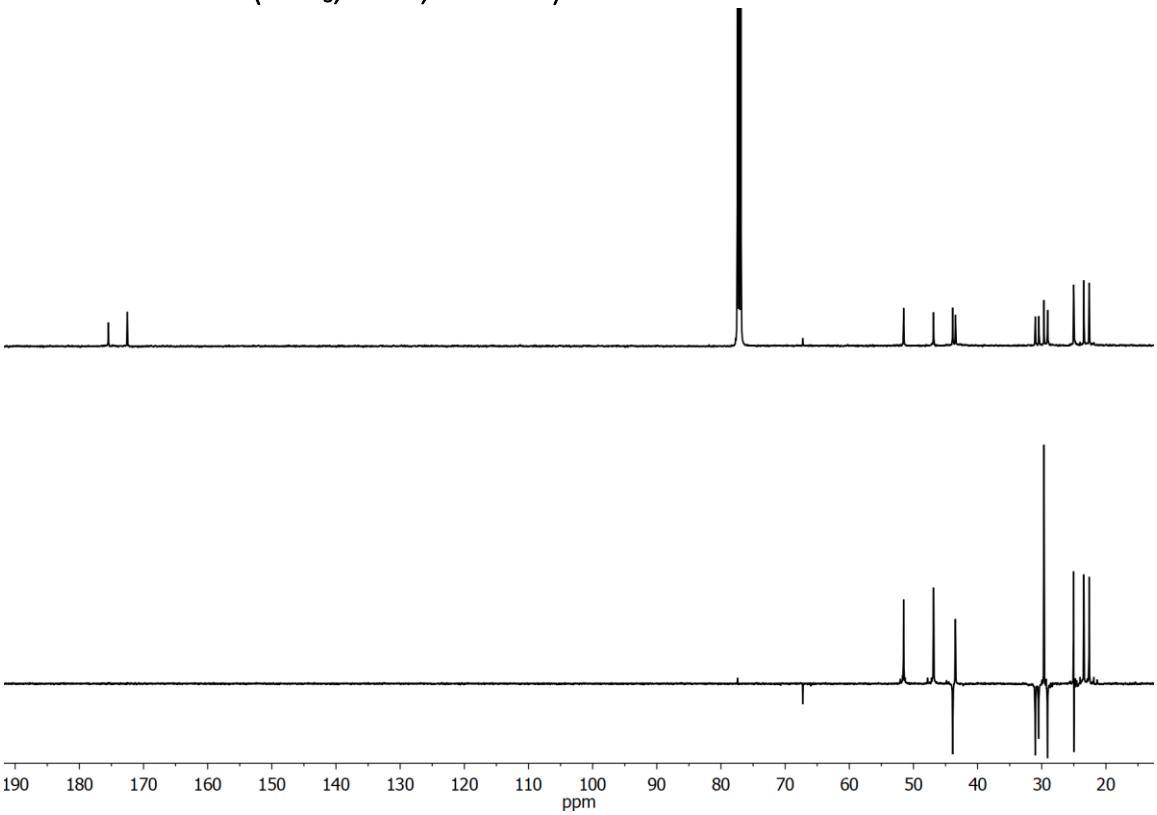


^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

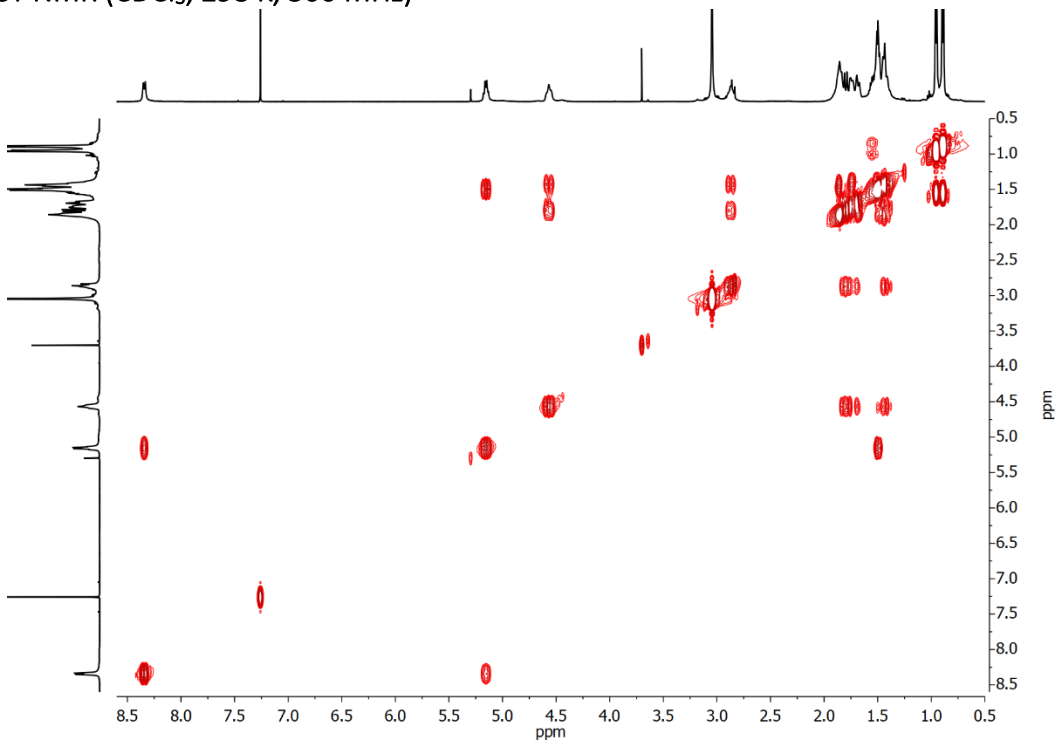


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)

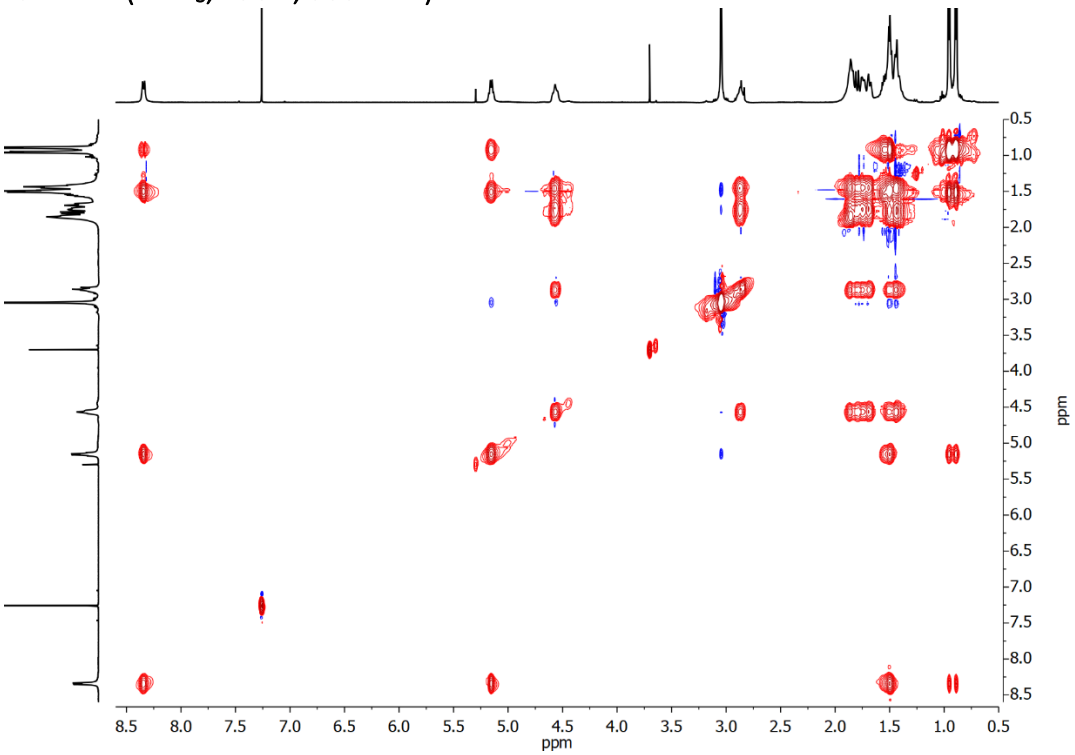


COSY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

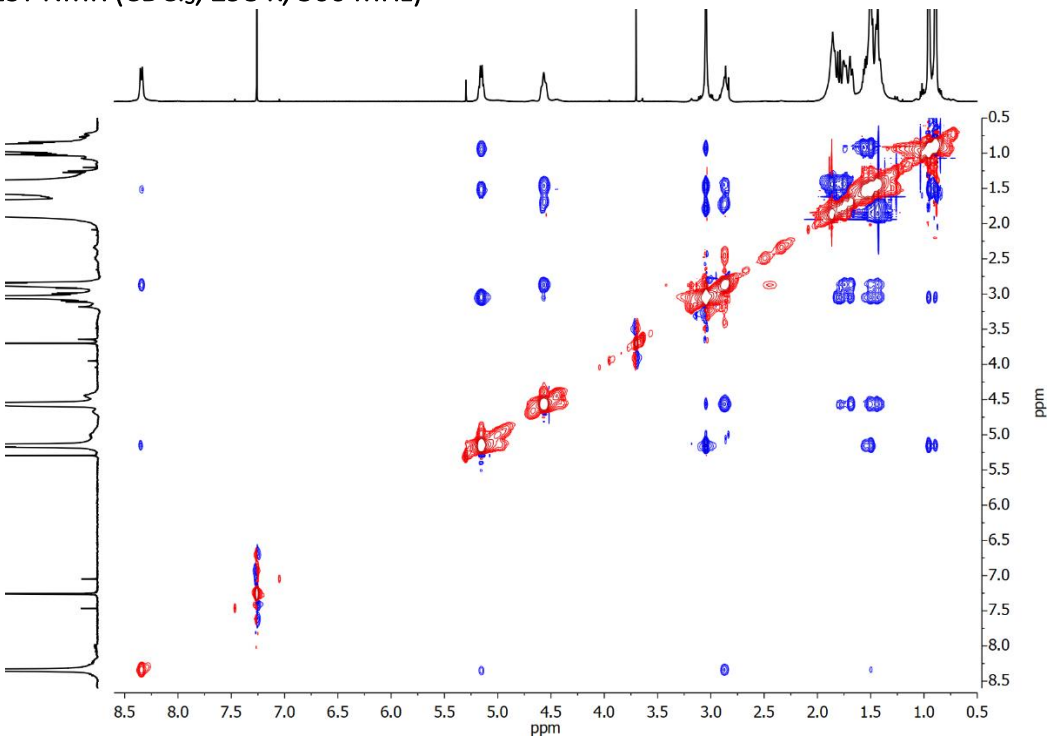


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TOCSY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

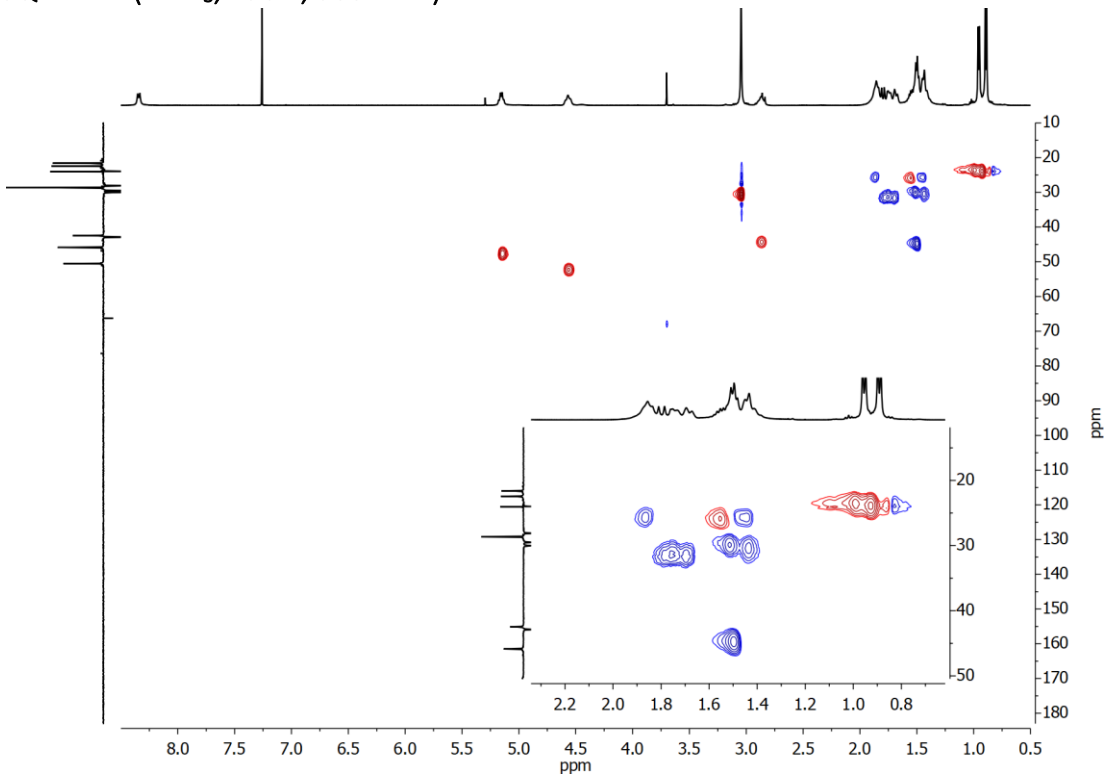


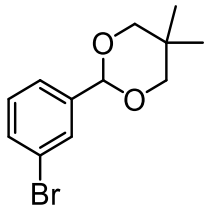
ROESY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

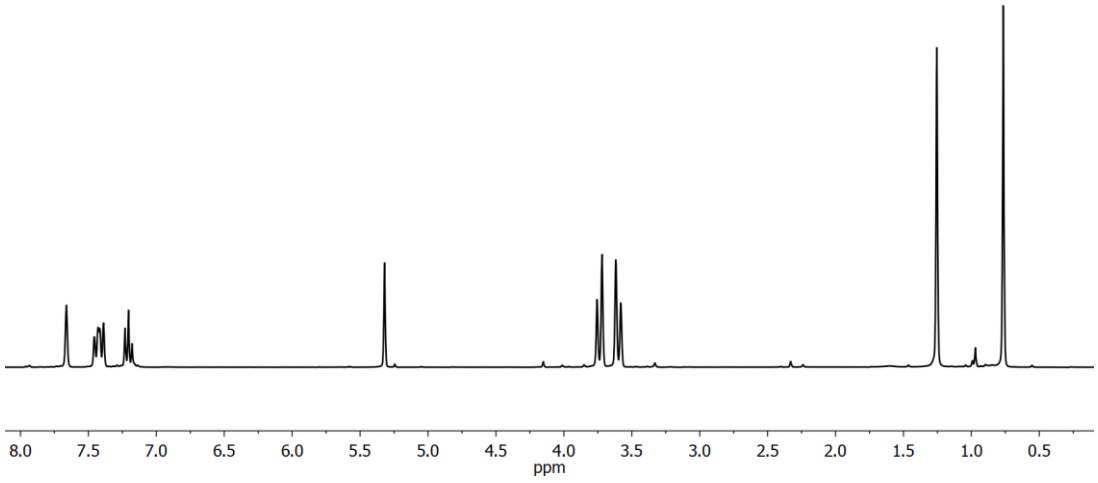
HSQC NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



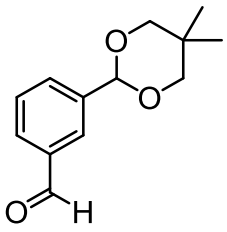


24

^1H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

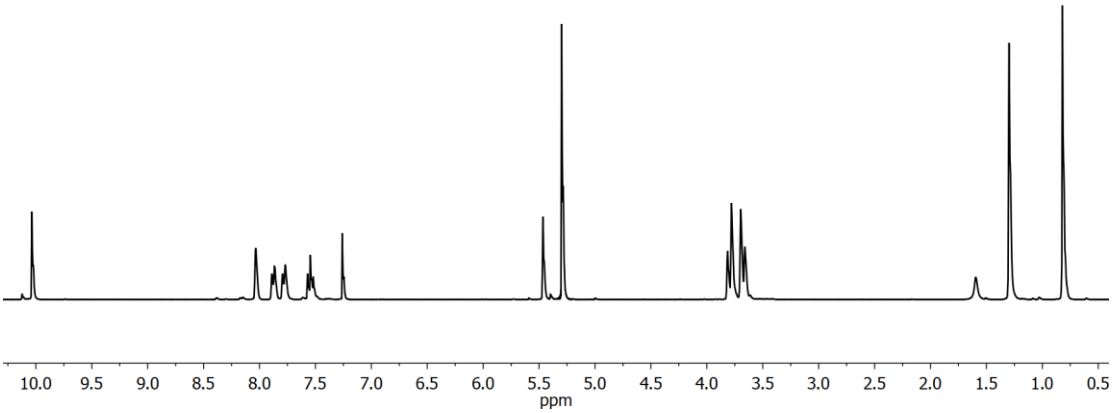


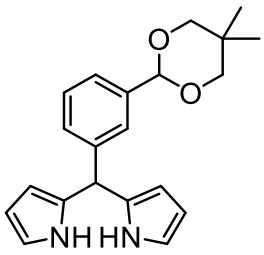
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



25

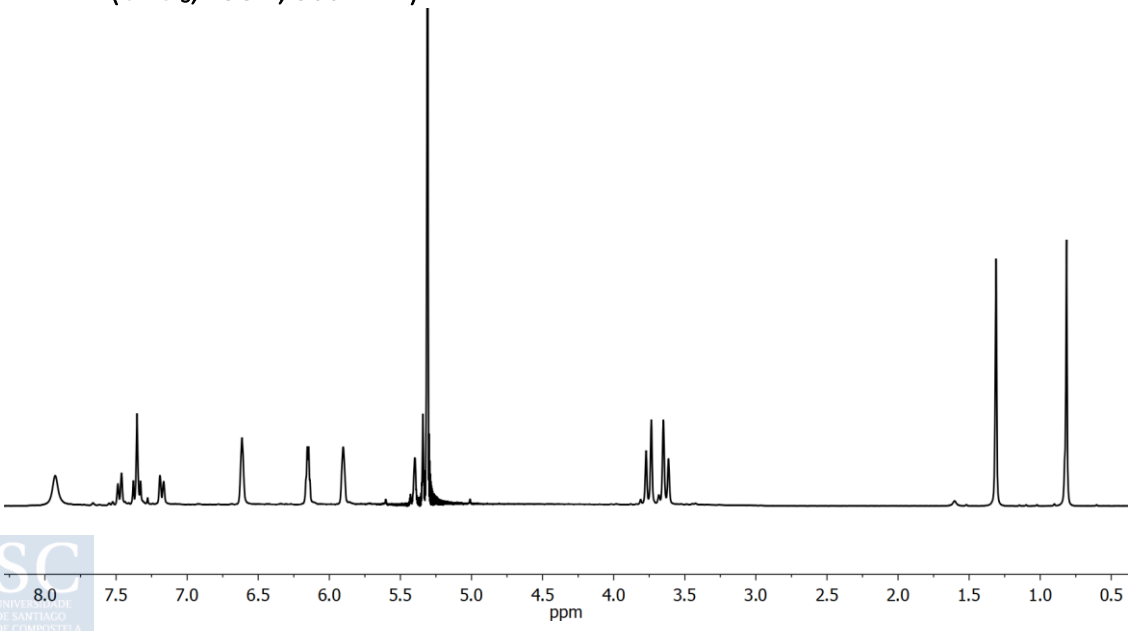
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)



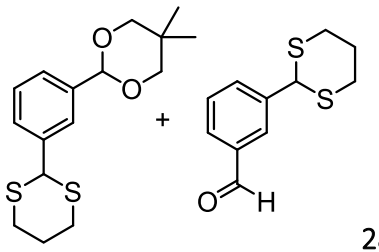


27

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

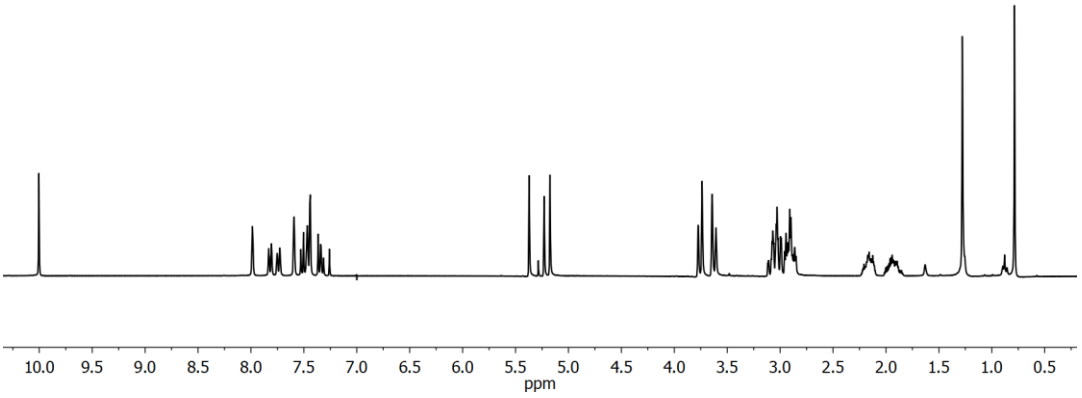


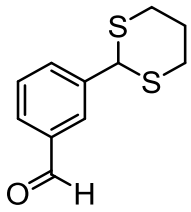
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



28 + 29

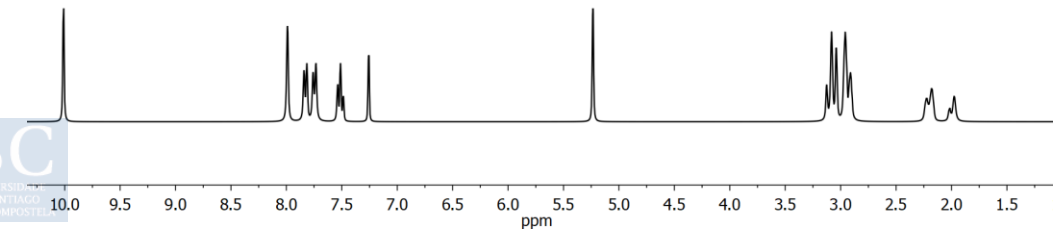
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)



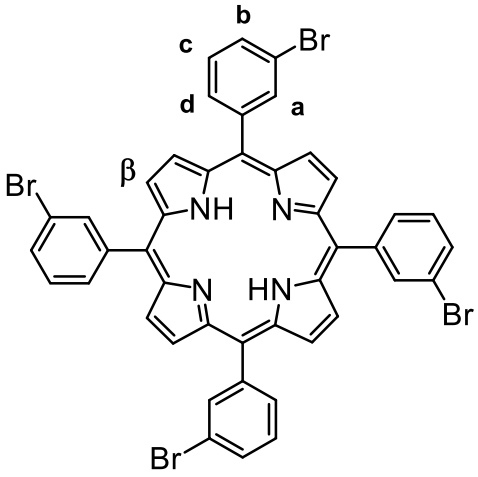


29

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

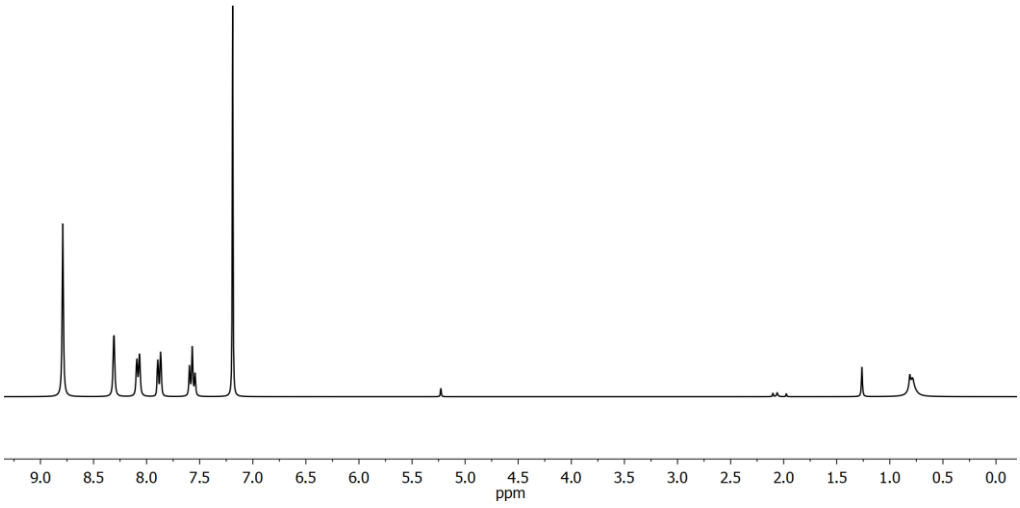


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

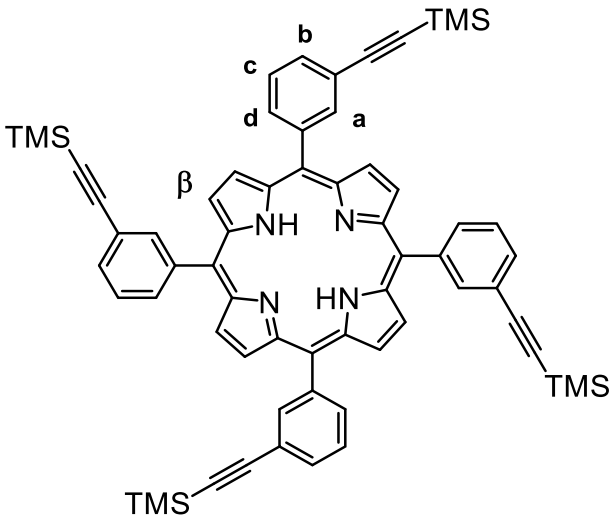


31

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

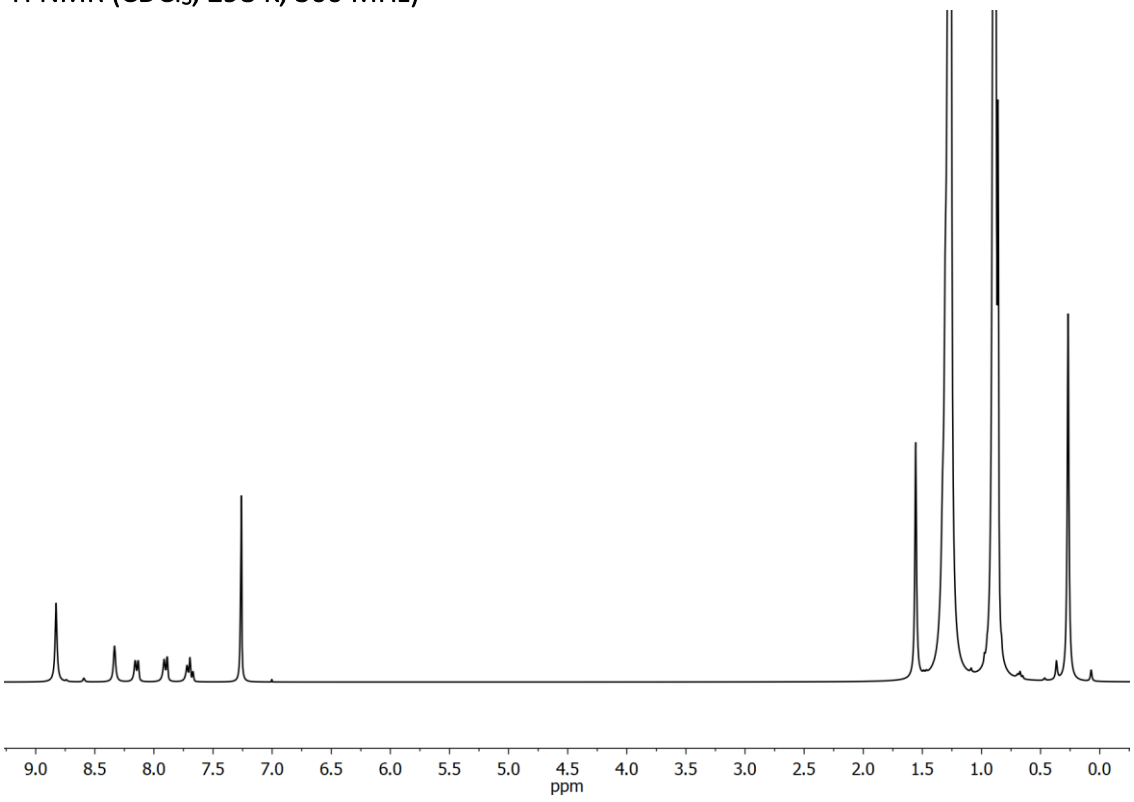


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

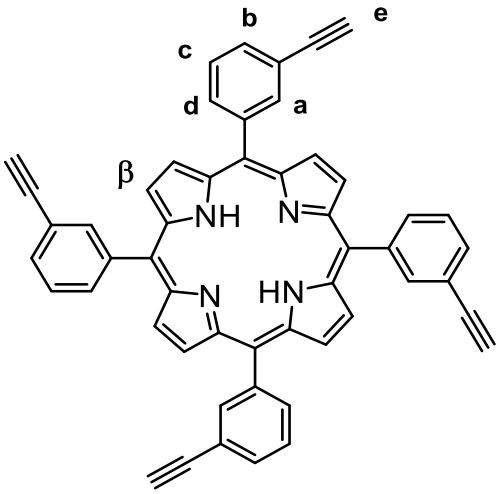


33

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

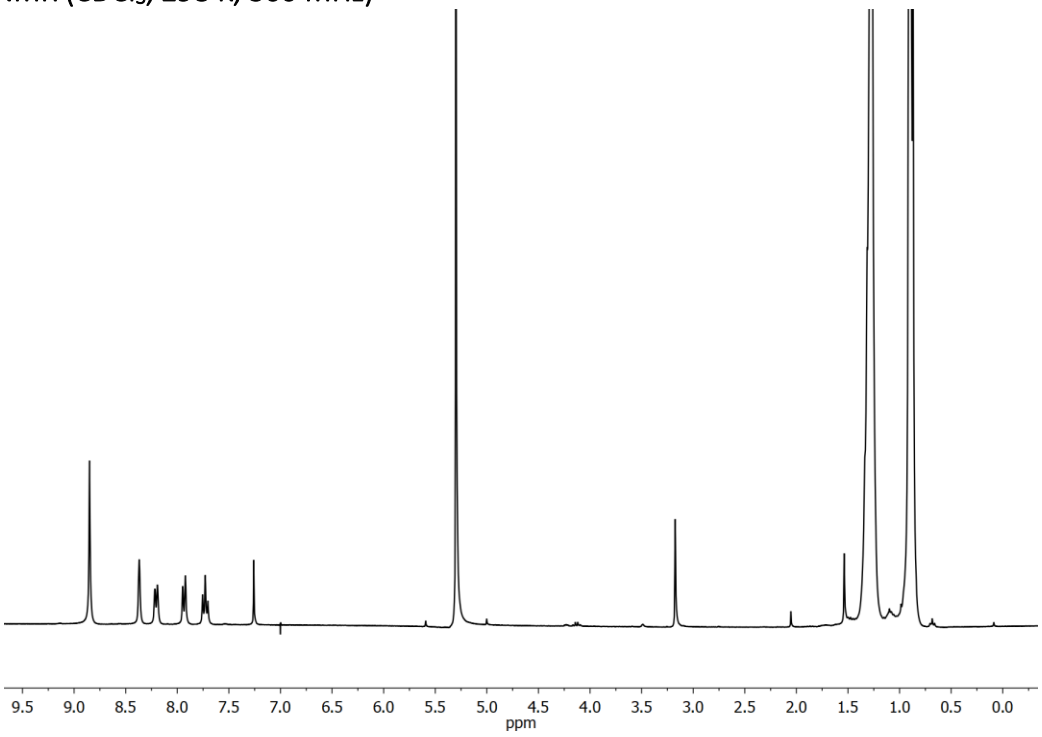


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

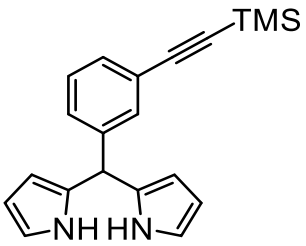


34

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

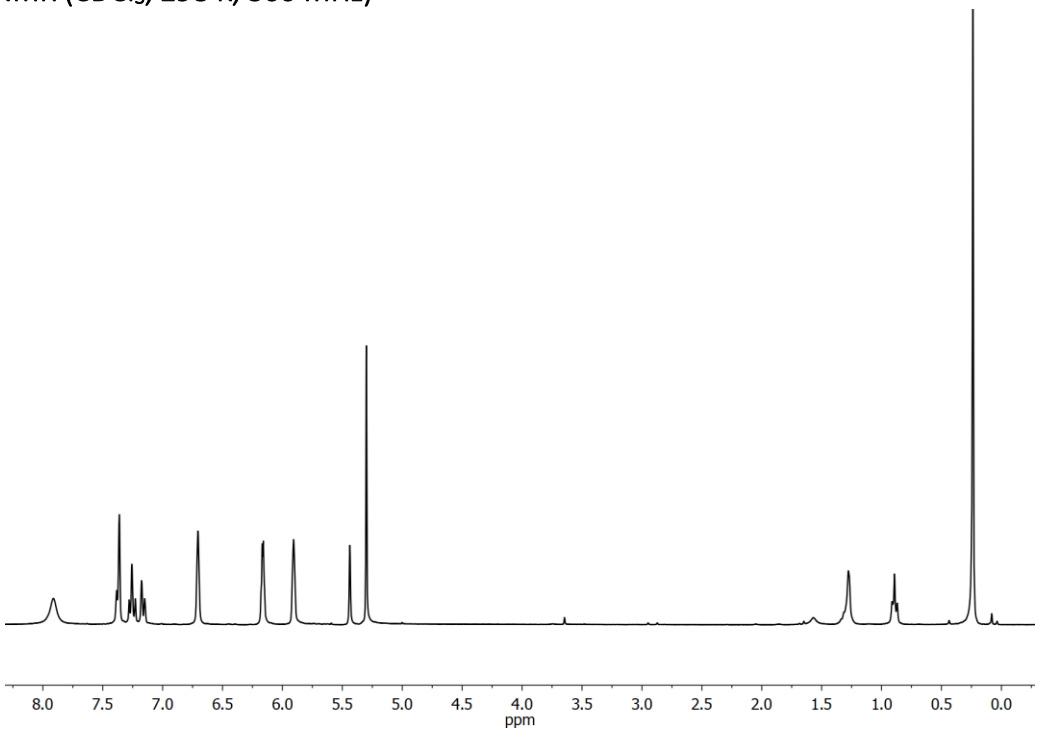


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

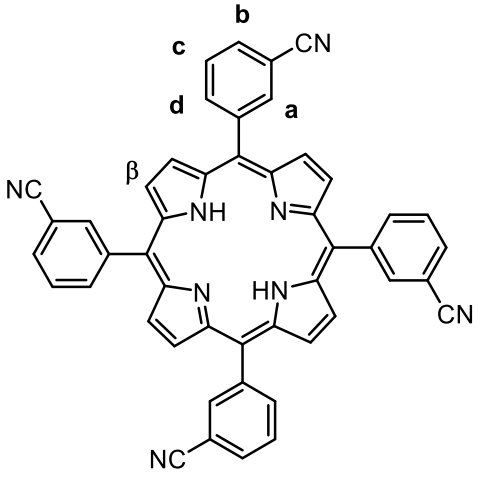


35

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

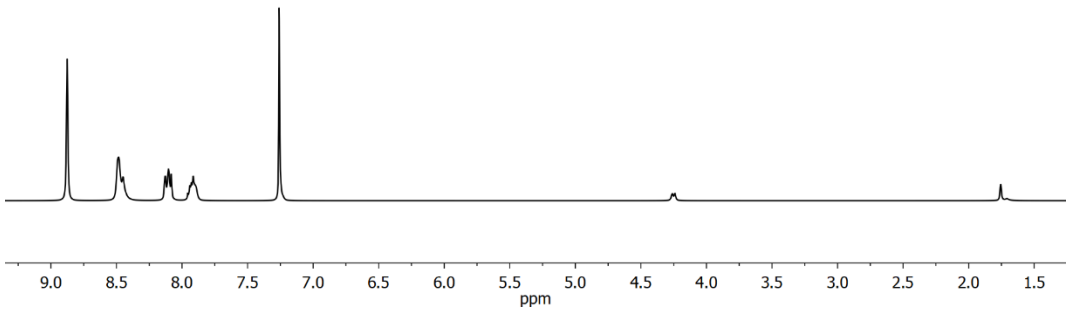


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

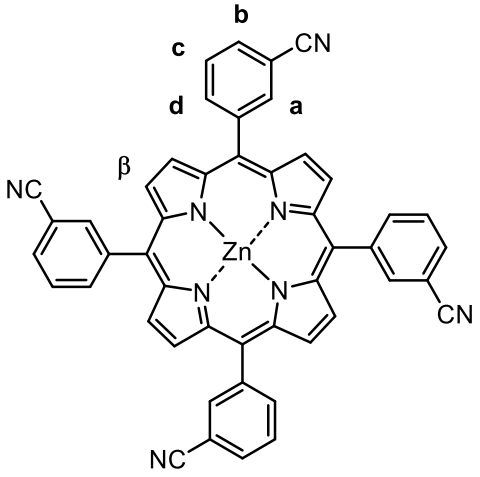


36

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

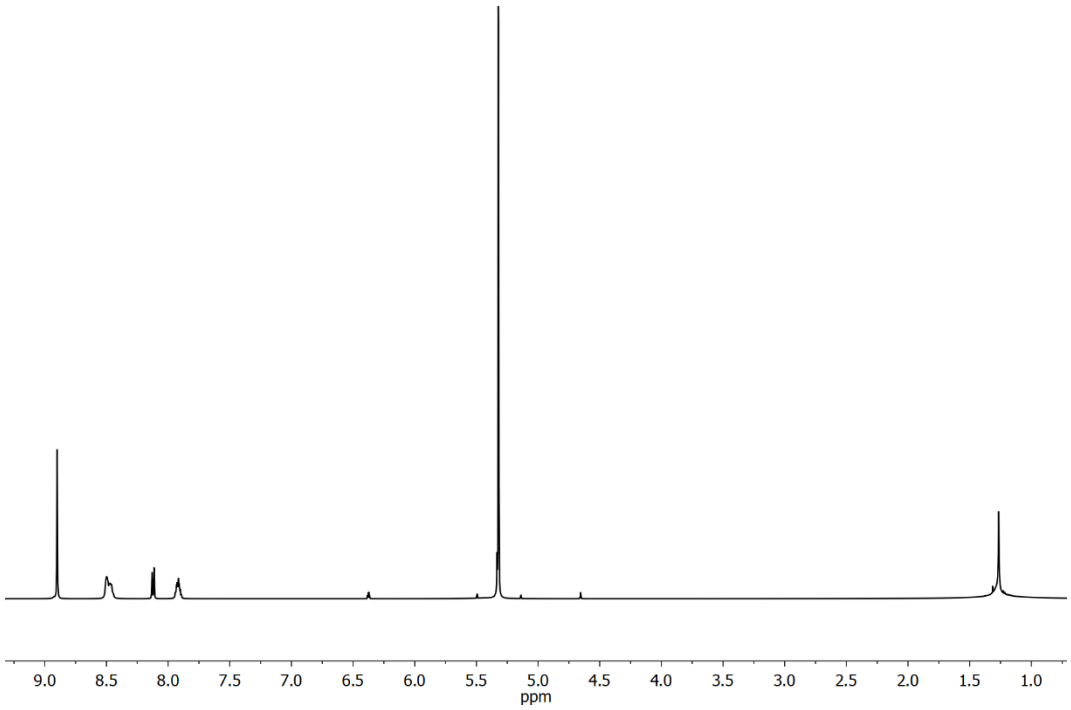


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

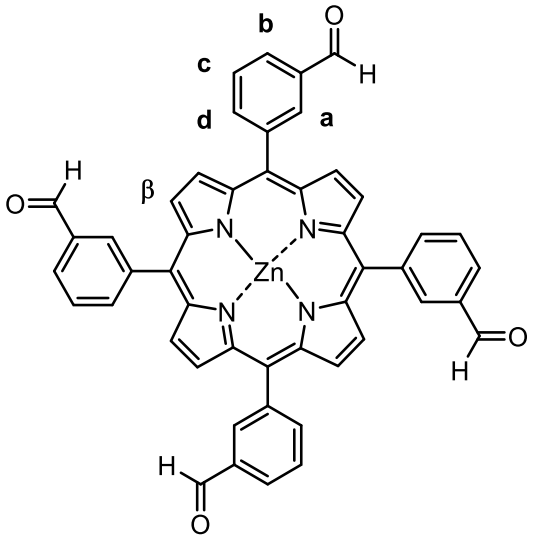


37

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

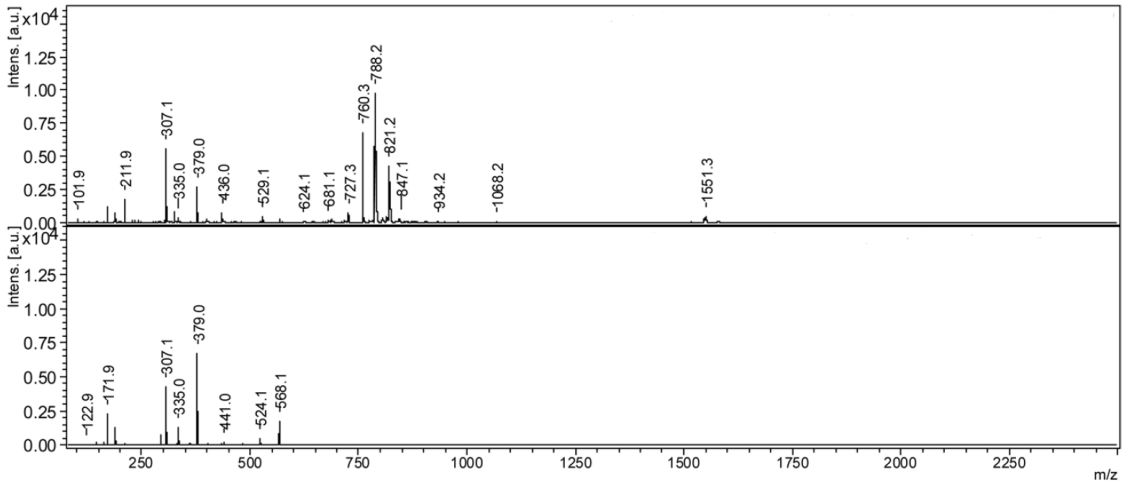


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

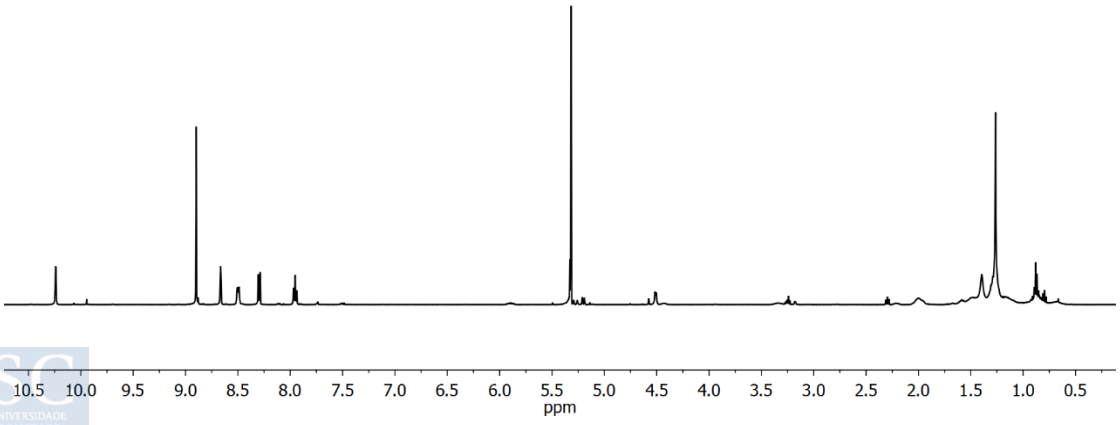


P2

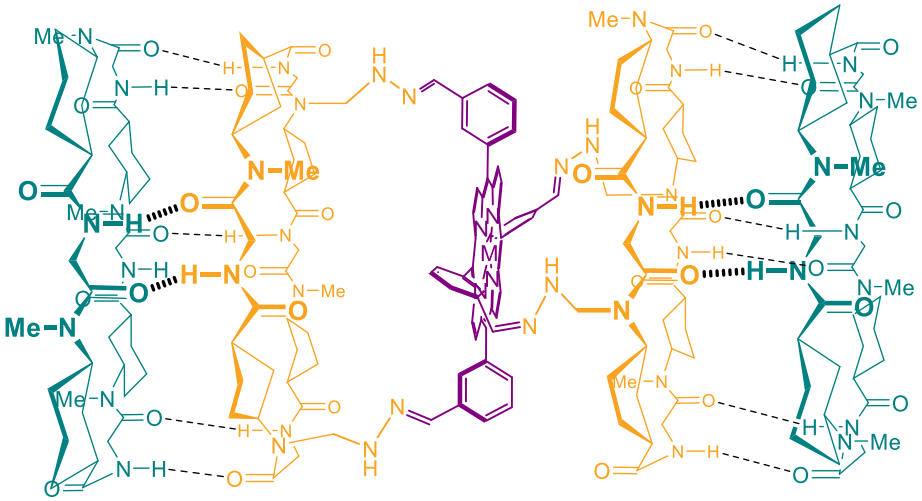
MALDI-TOF (sample/matrix)



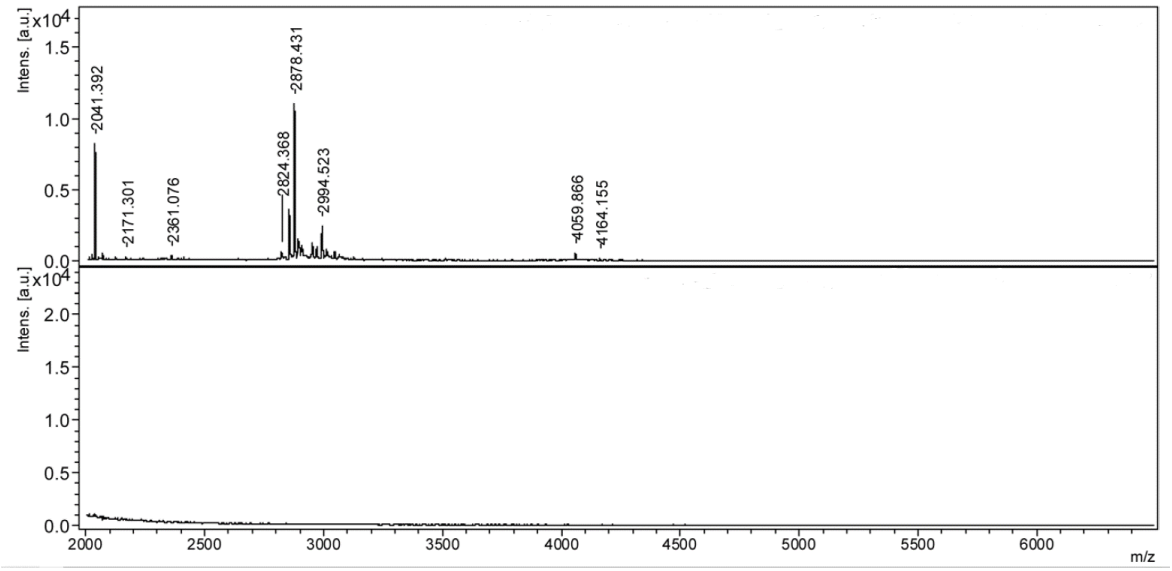
^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



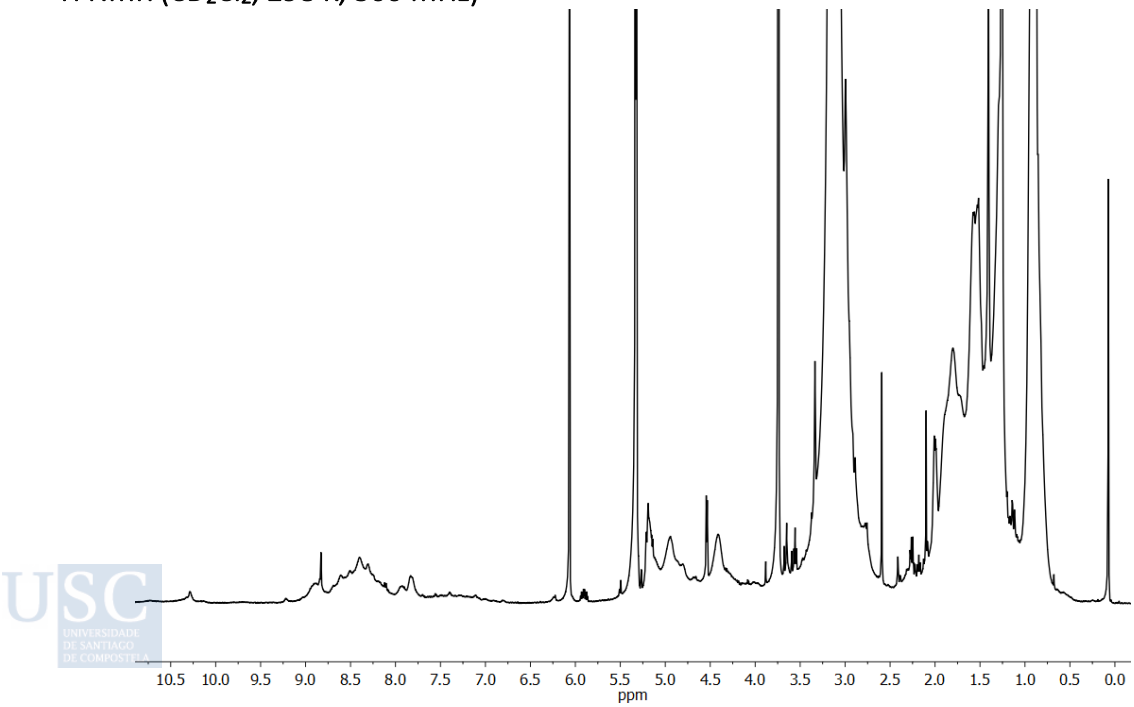
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



MALTI-TOF (sample/matrix)

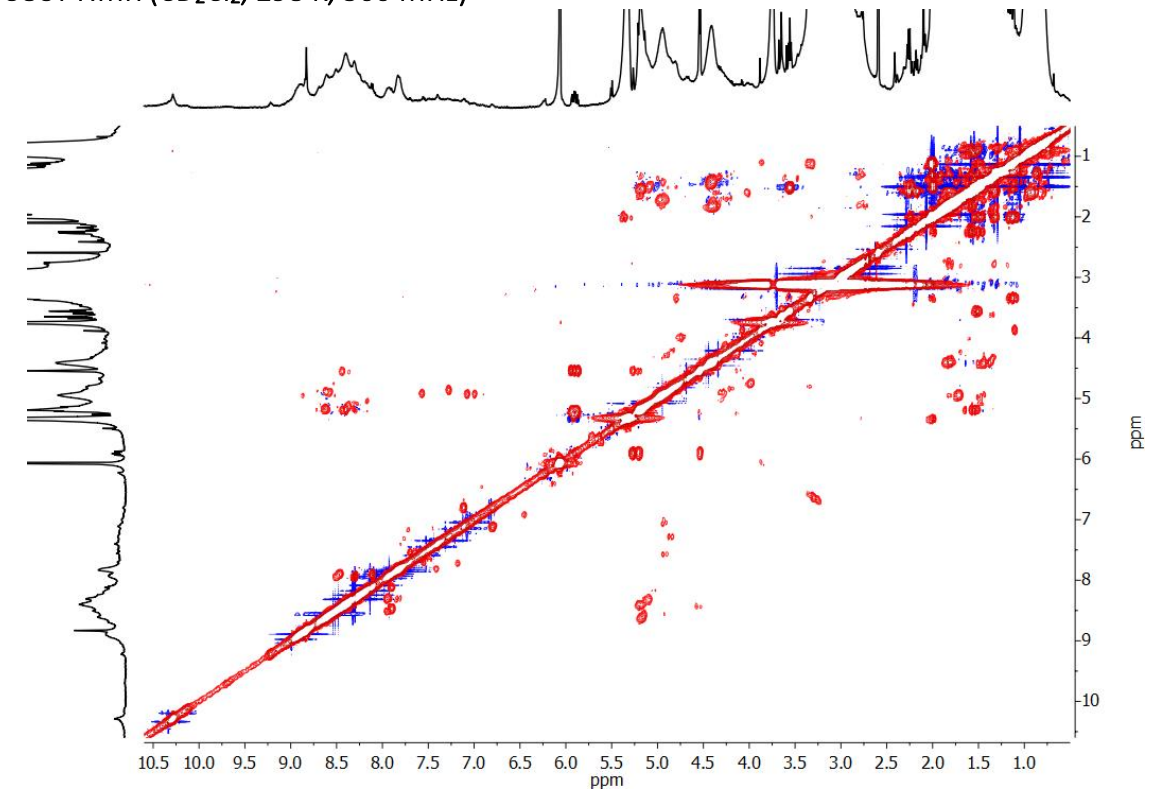


^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

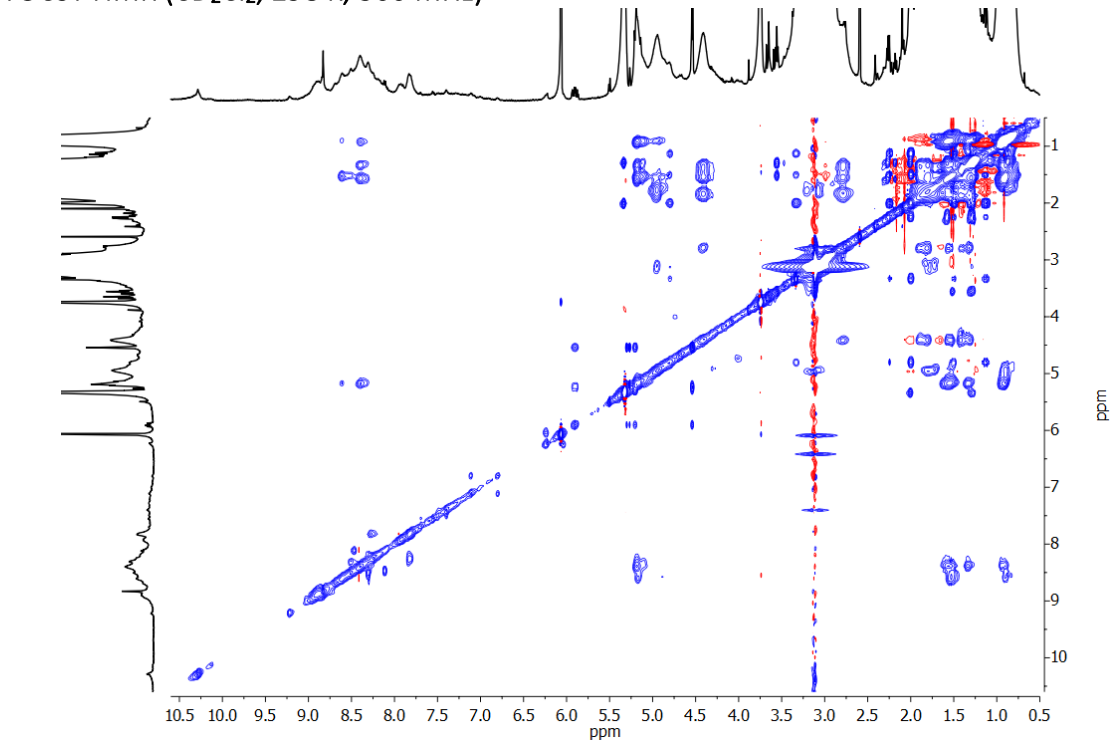


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

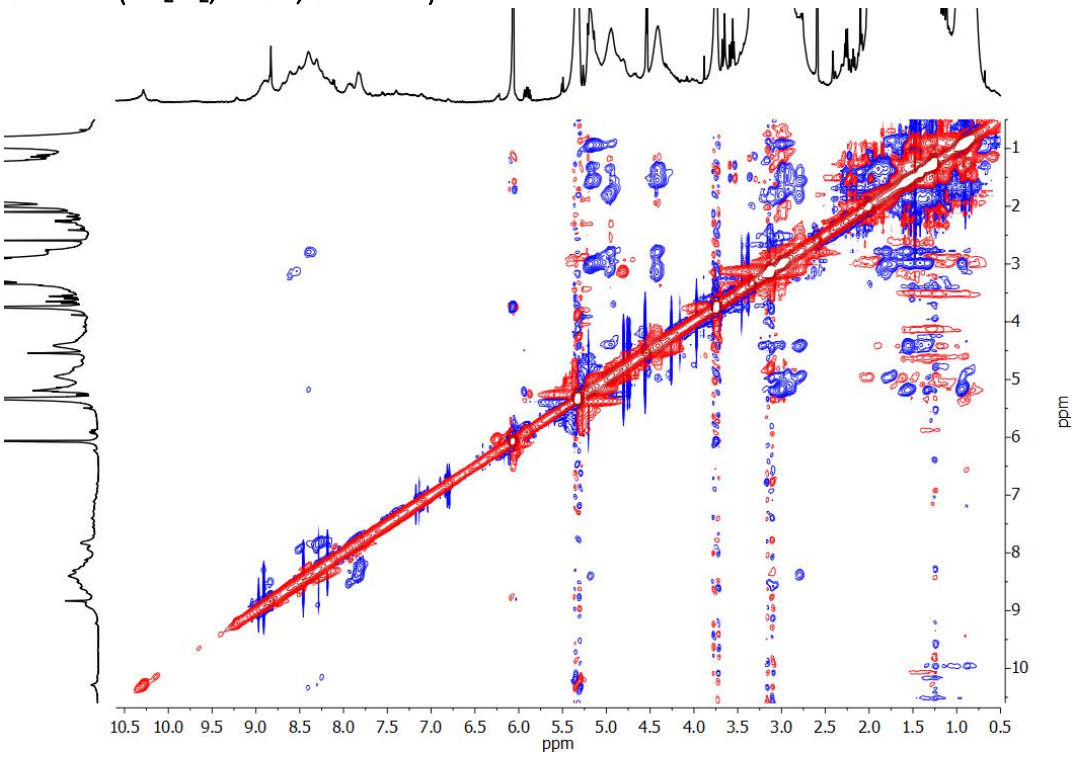


TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

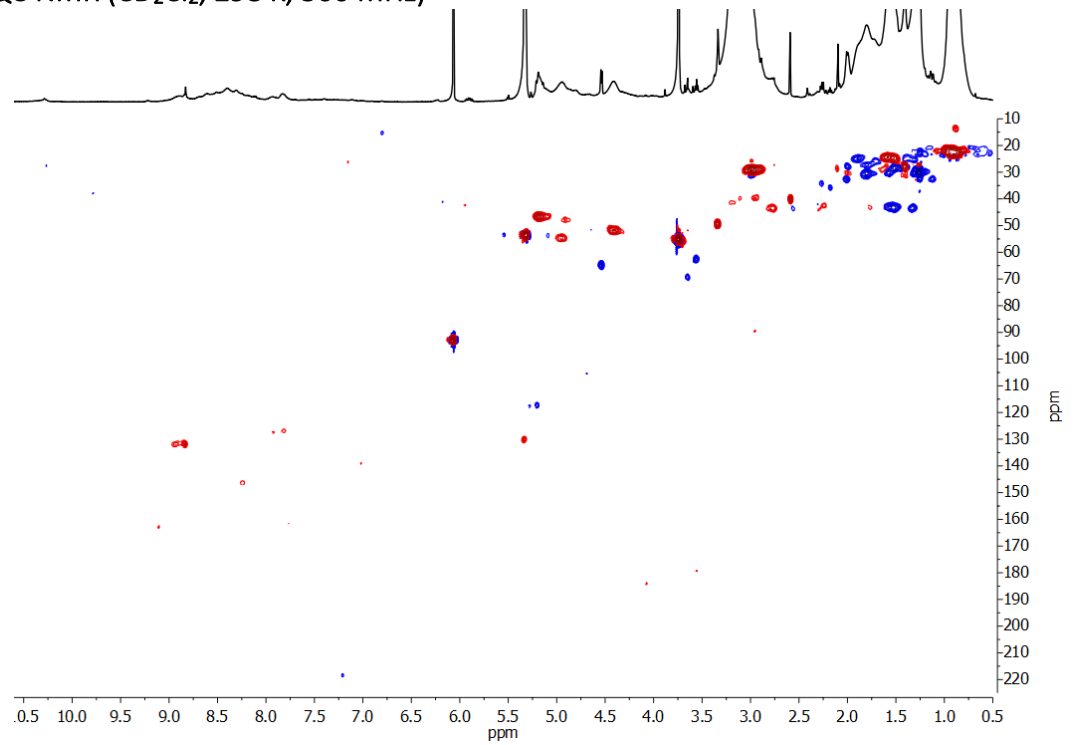


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

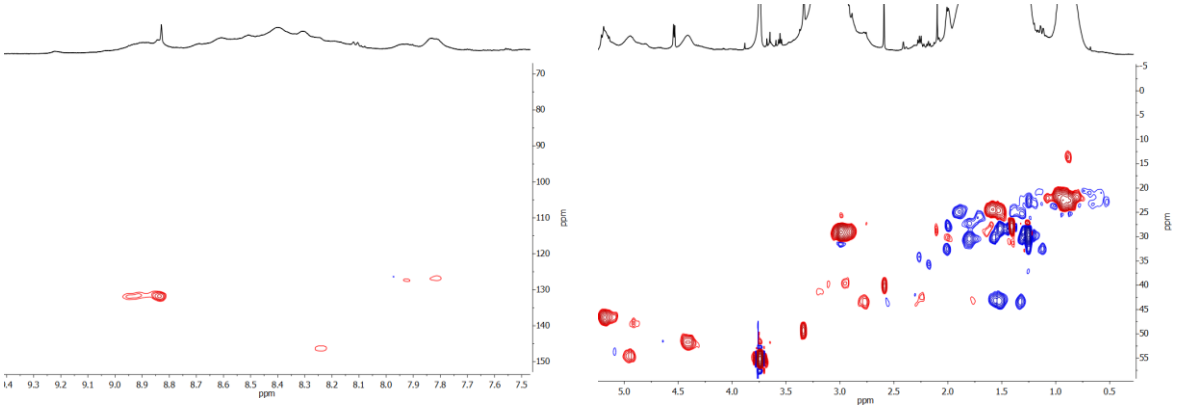
ROESY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



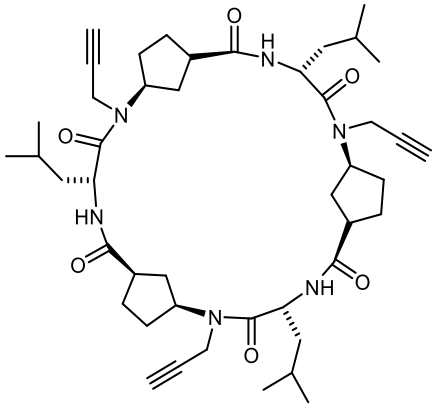
HSQC NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



AMPLIFIED HSQC

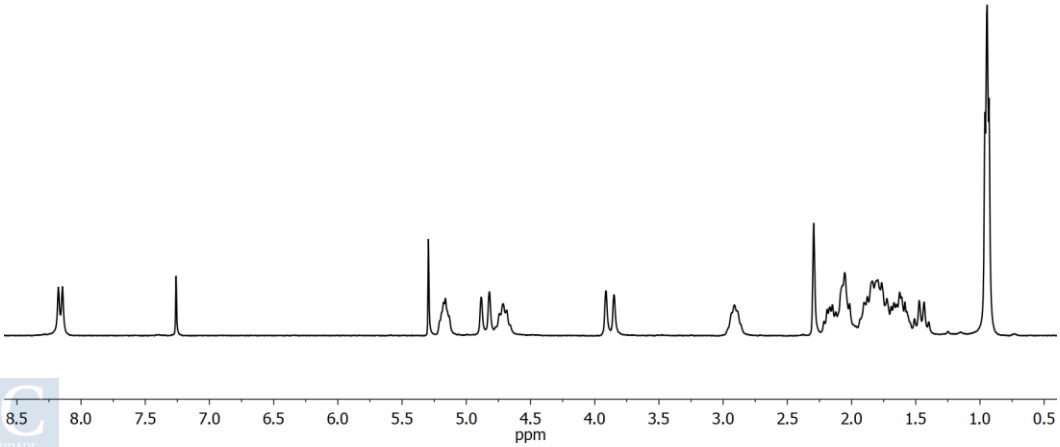


11.1.2 Heterocycles in the molecular arms of an α,γ-cyclohexapeptide: synthesis and preliminary studies on its coordination and esterase activity.

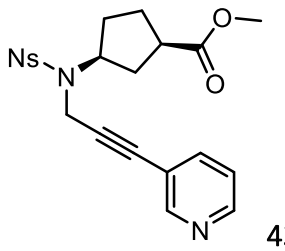


CP5

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

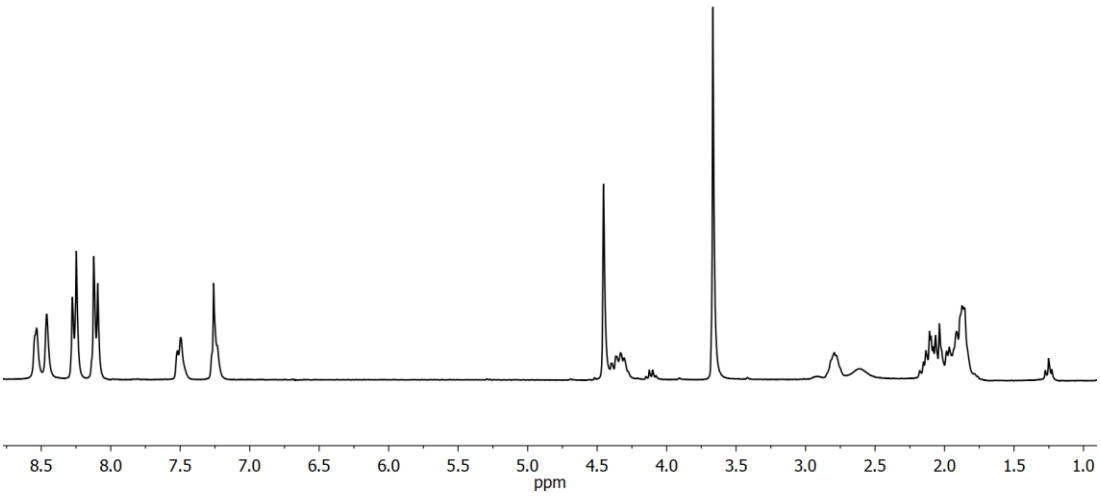


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

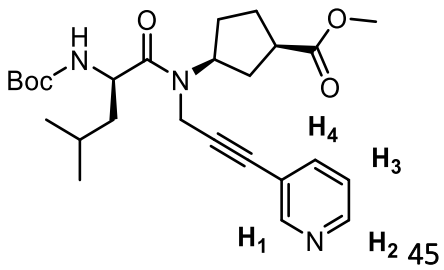


43

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

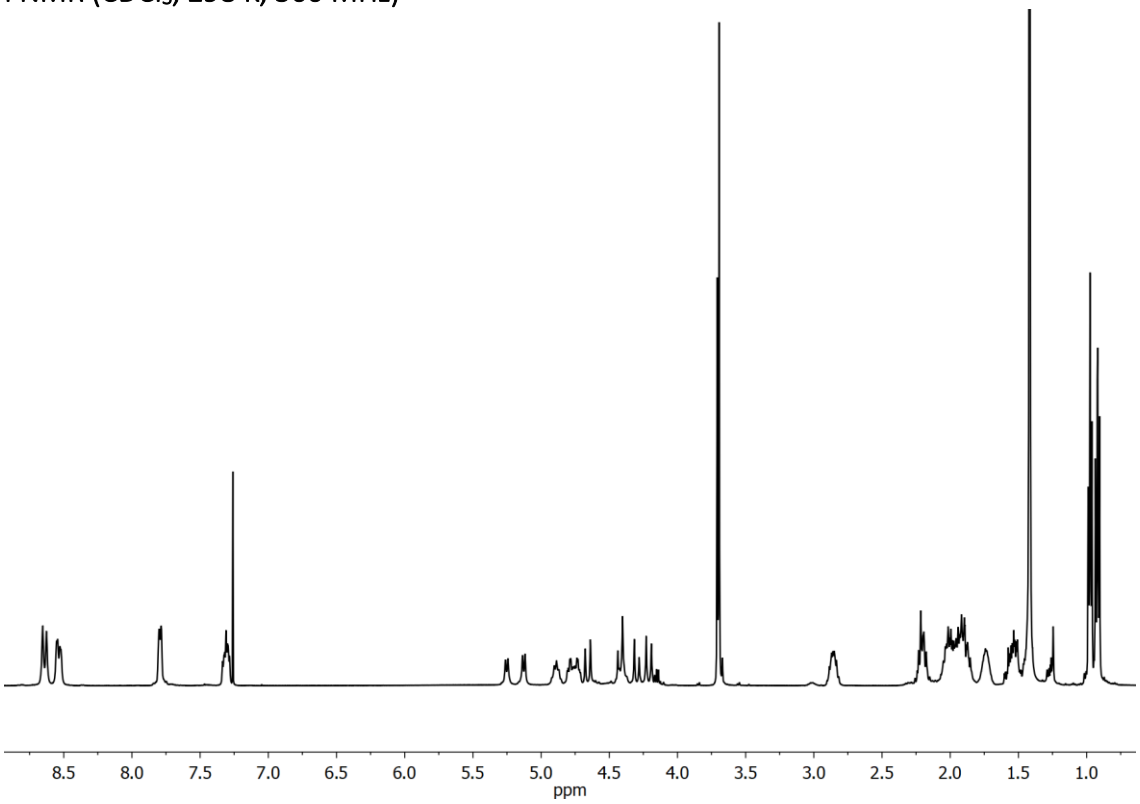


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



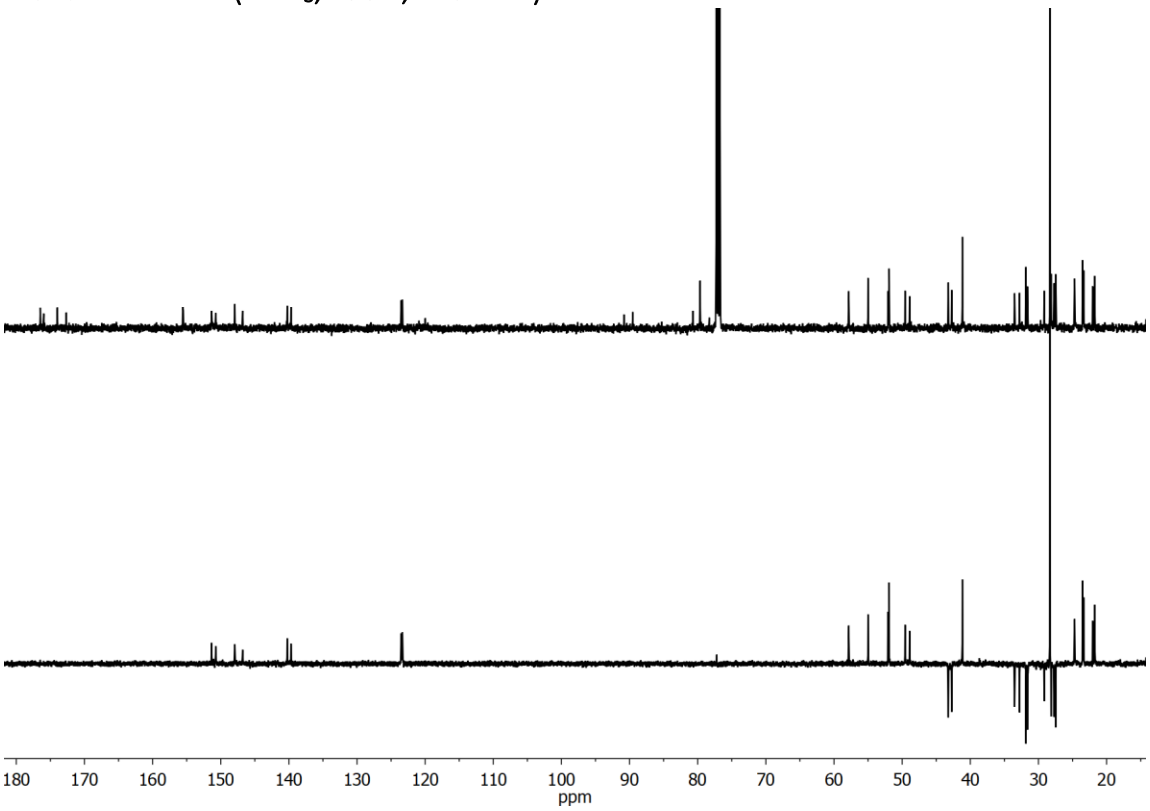
45

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

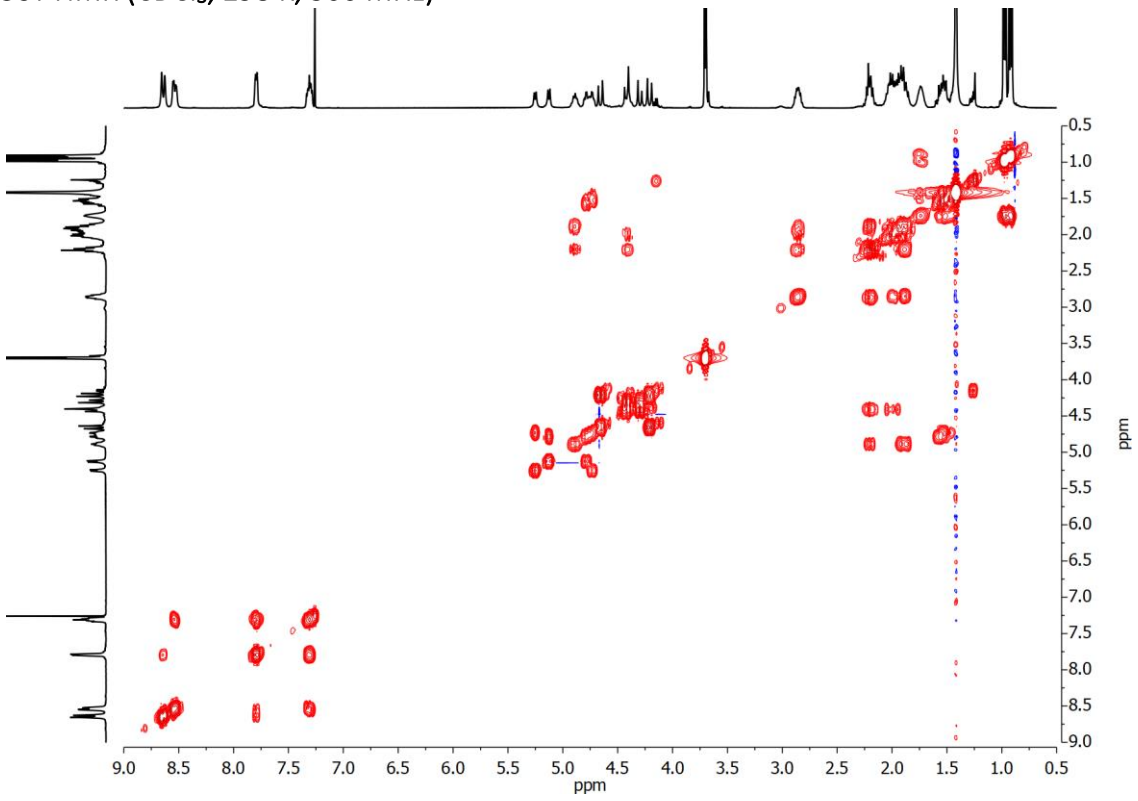


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

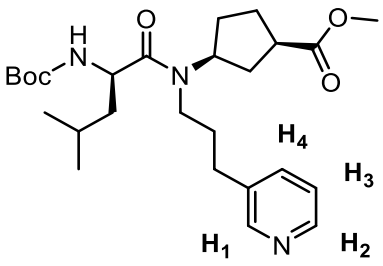
^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)



COSY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

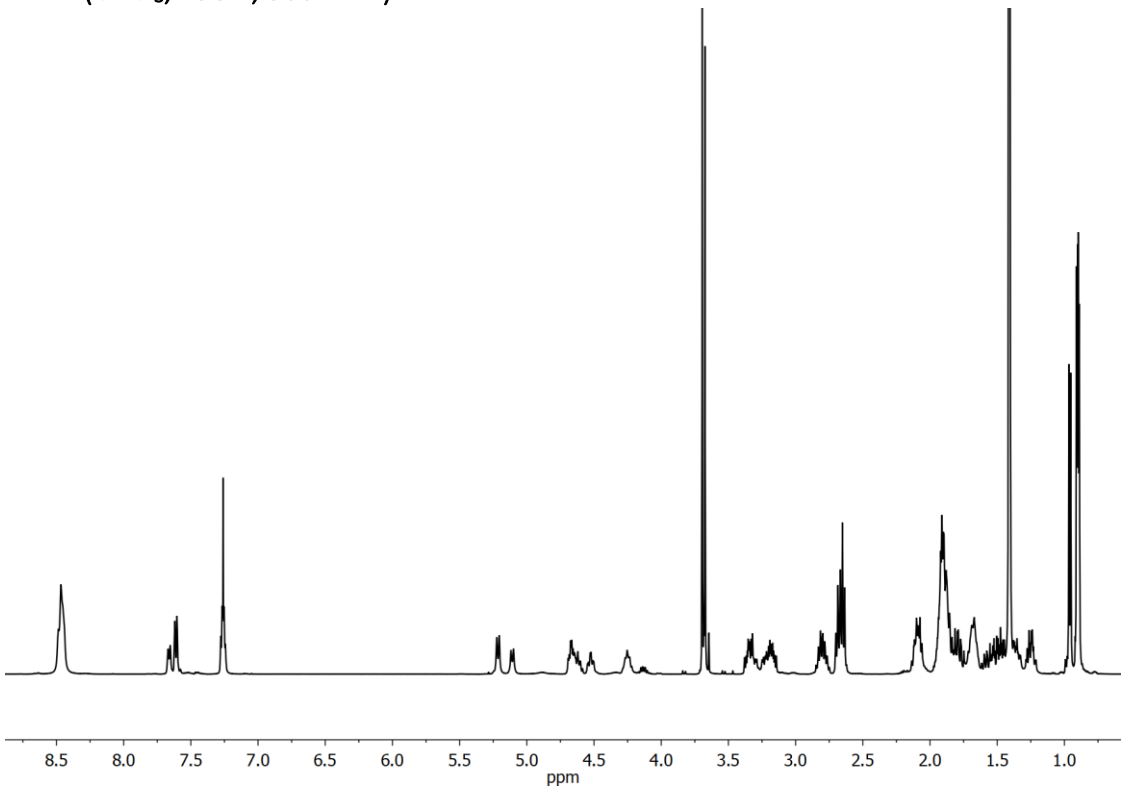


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



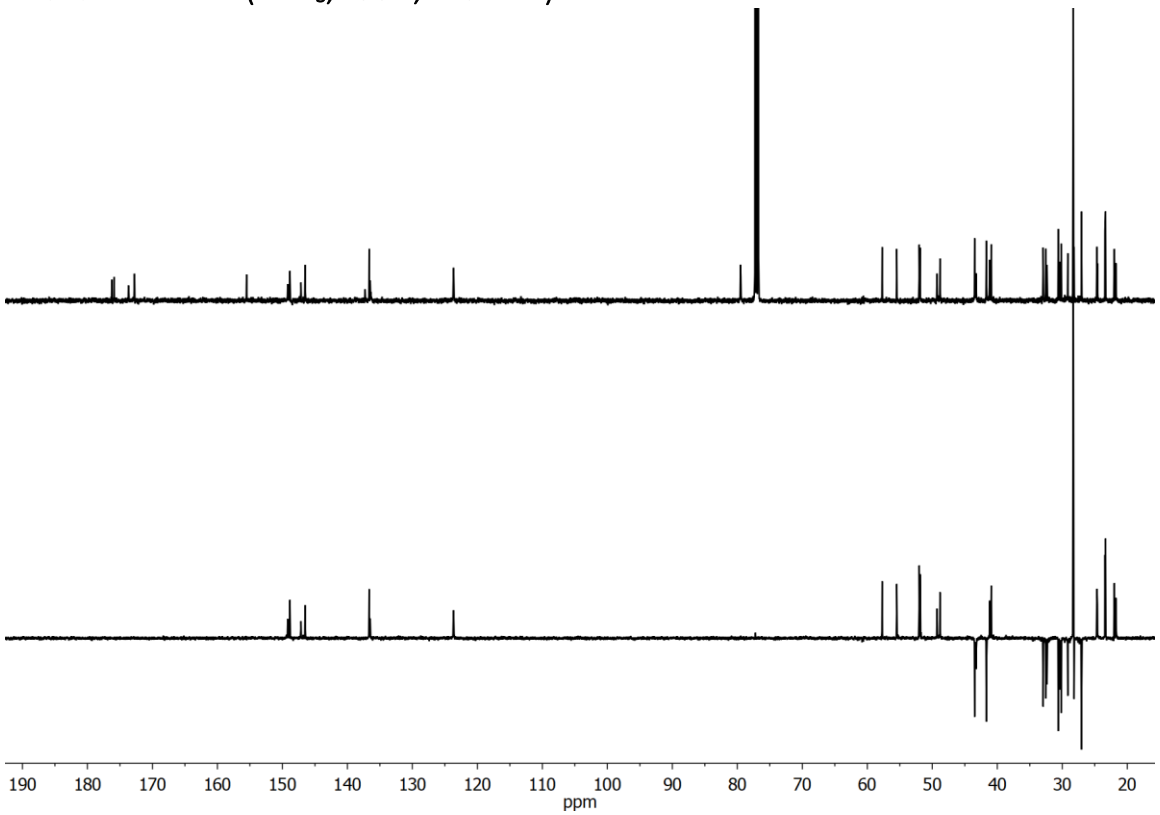
46

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

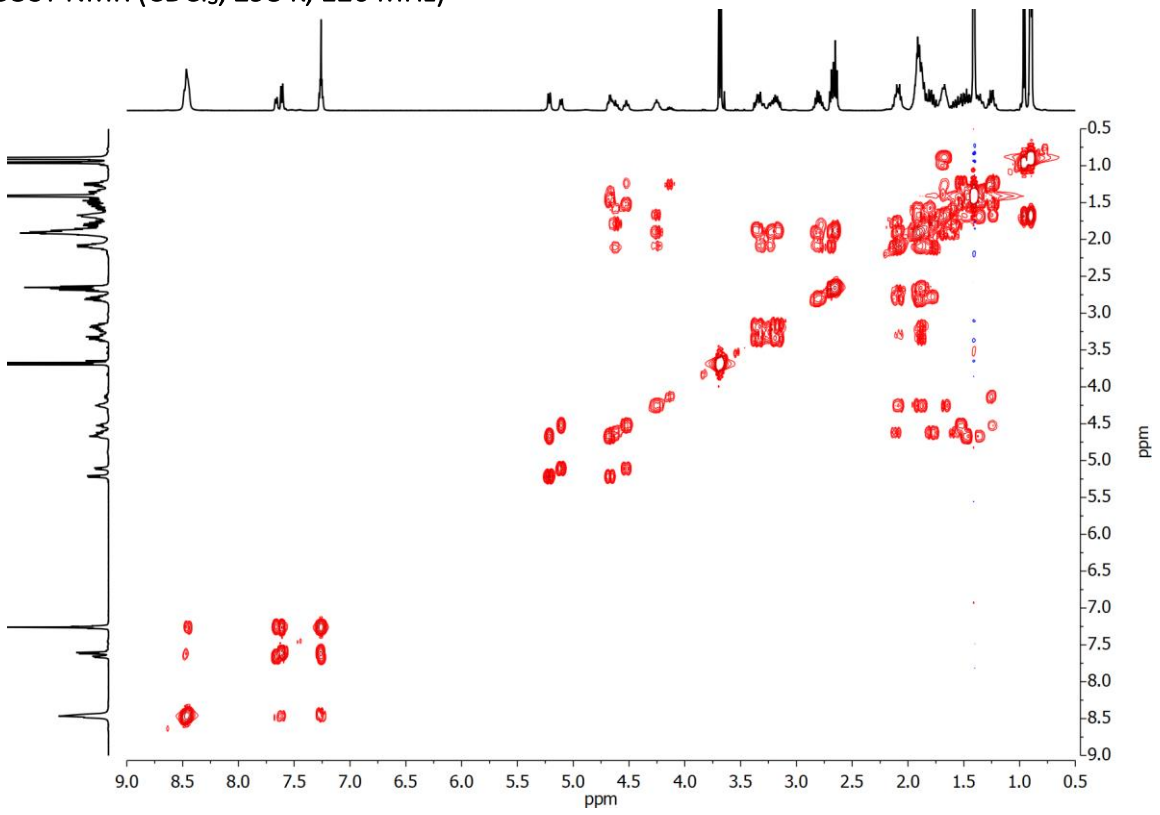


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

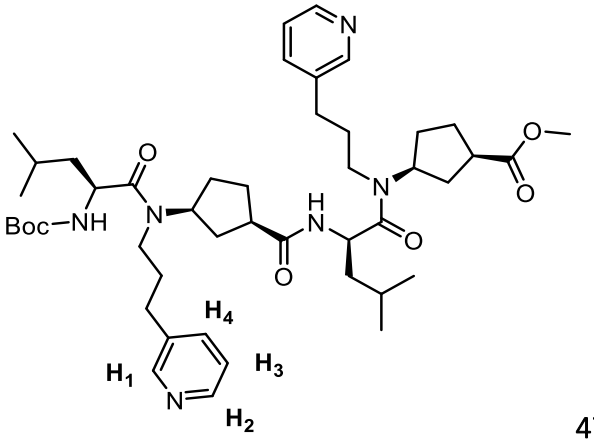
^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)



COSY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)

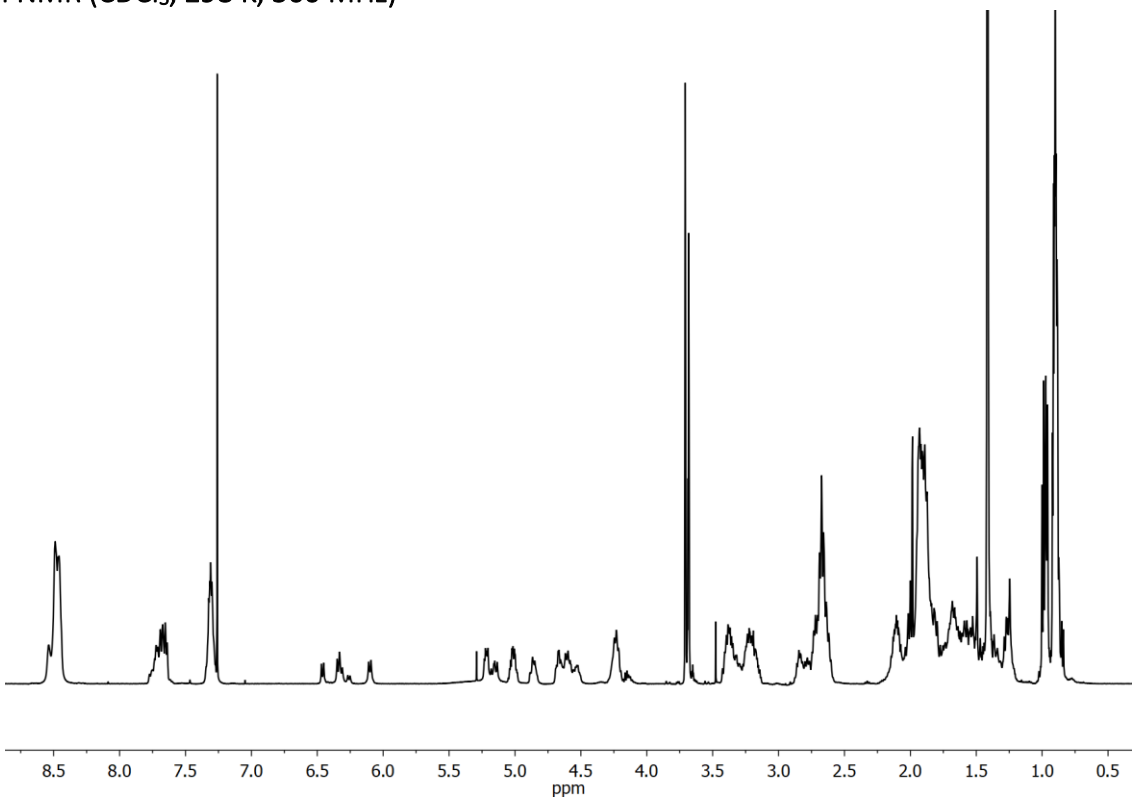


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



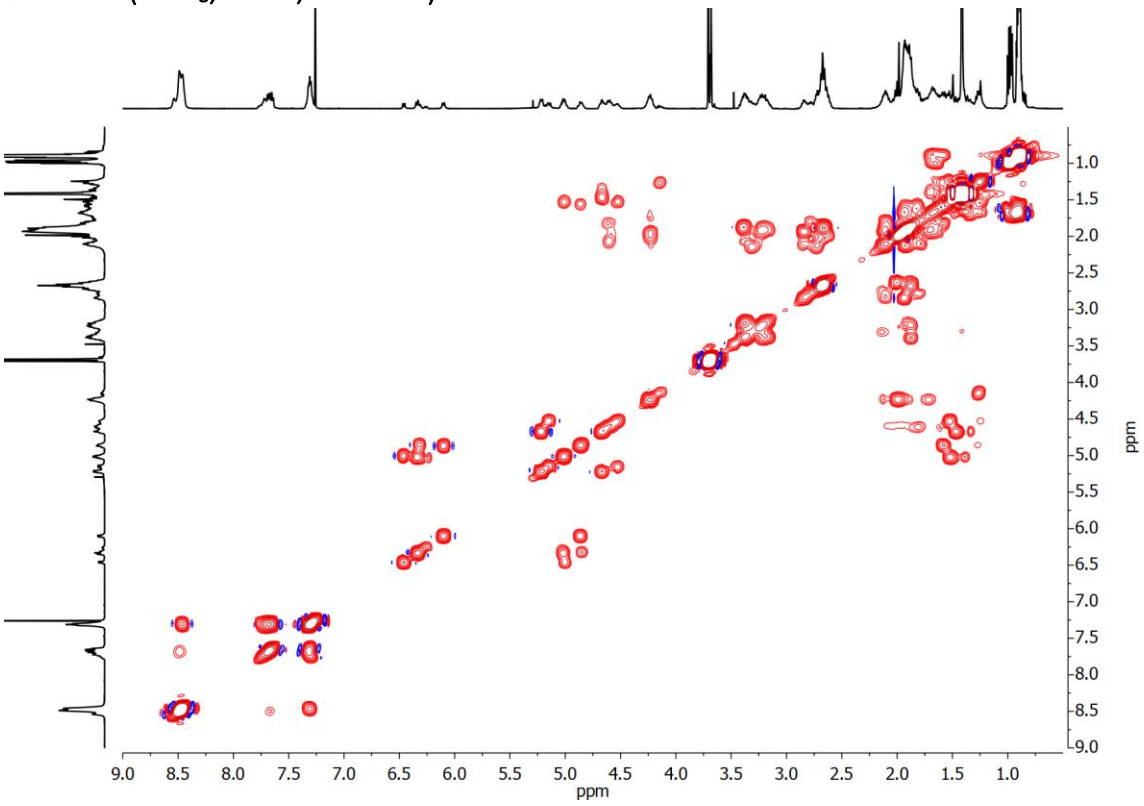
47

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

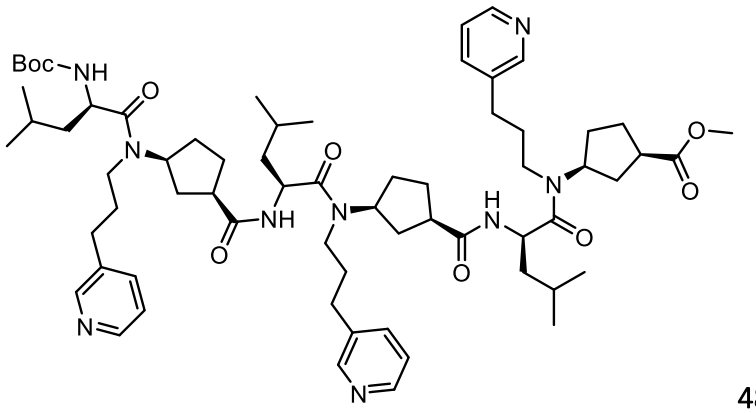


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

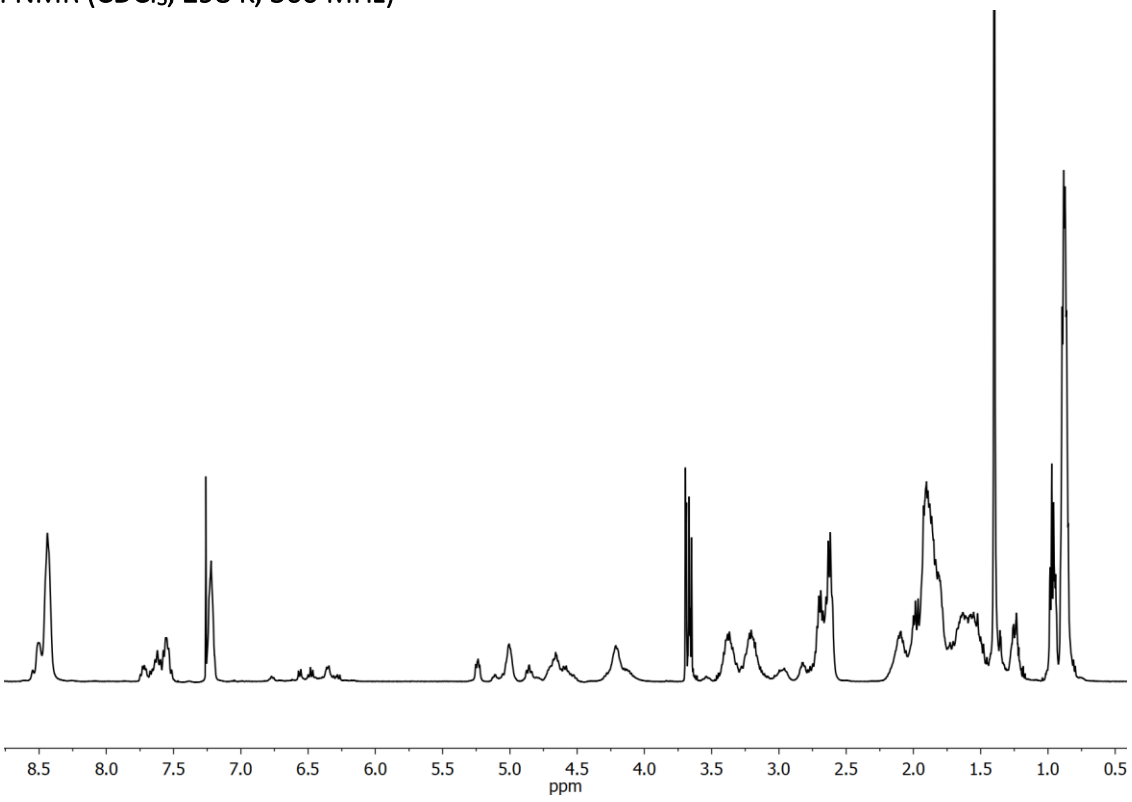


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

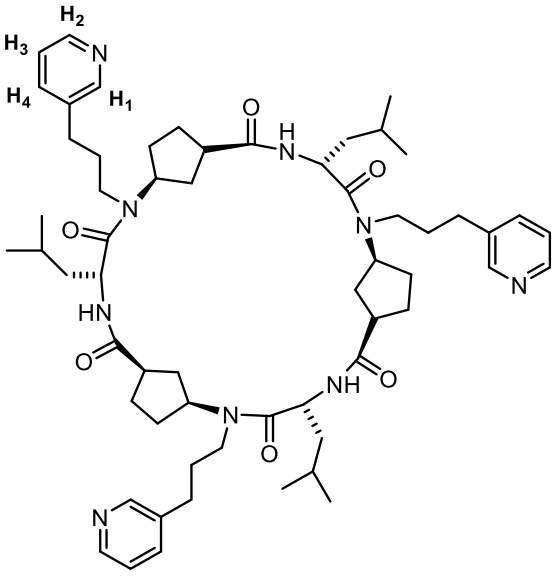


48

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

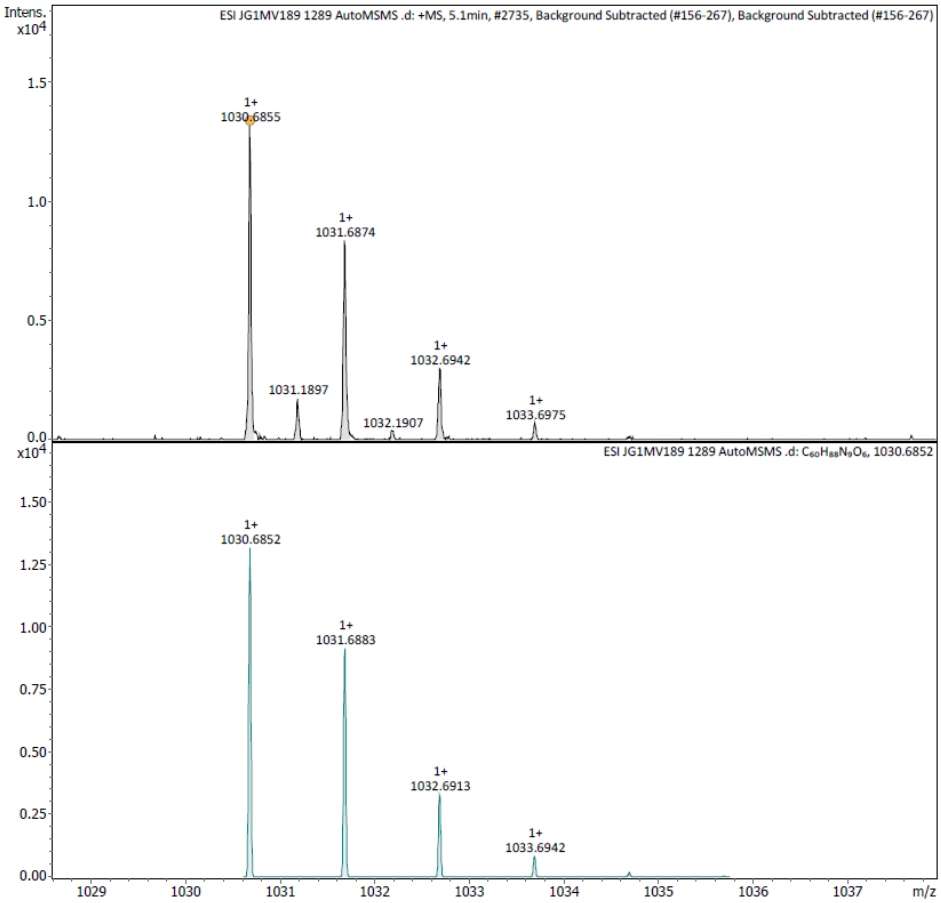


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



CP6e

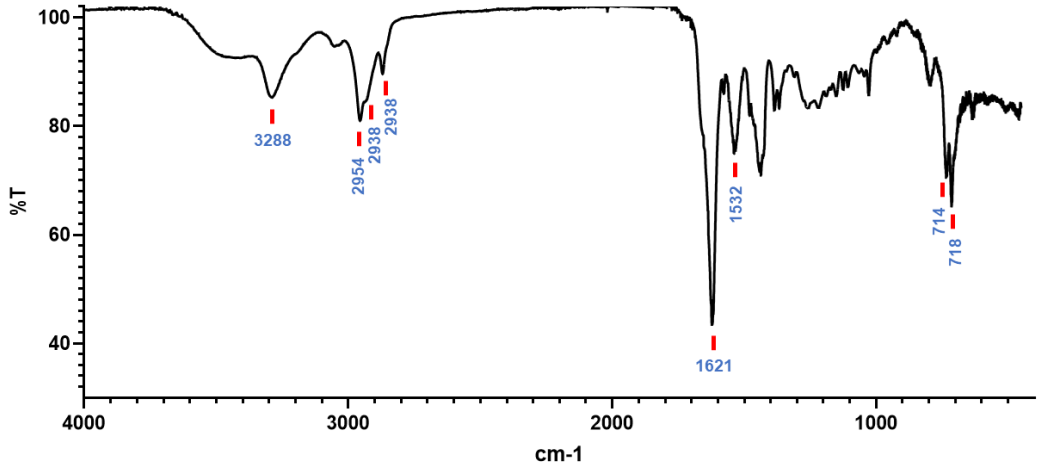
ESI-MS



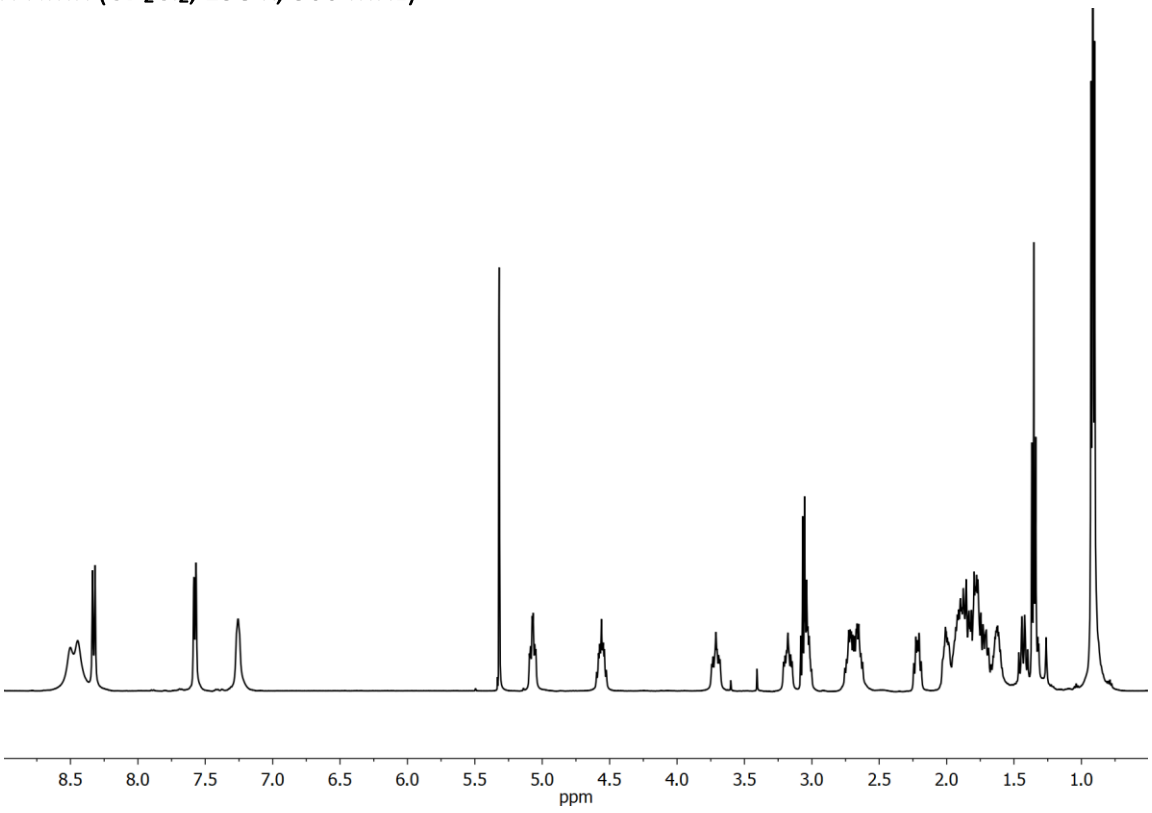
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e¯ Conf	N-Rule
1030.6855	1	C59H92N5O10	54.77	1030.6839	-1.6	-1.5	18.0	17.0	even	ok

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FTIR

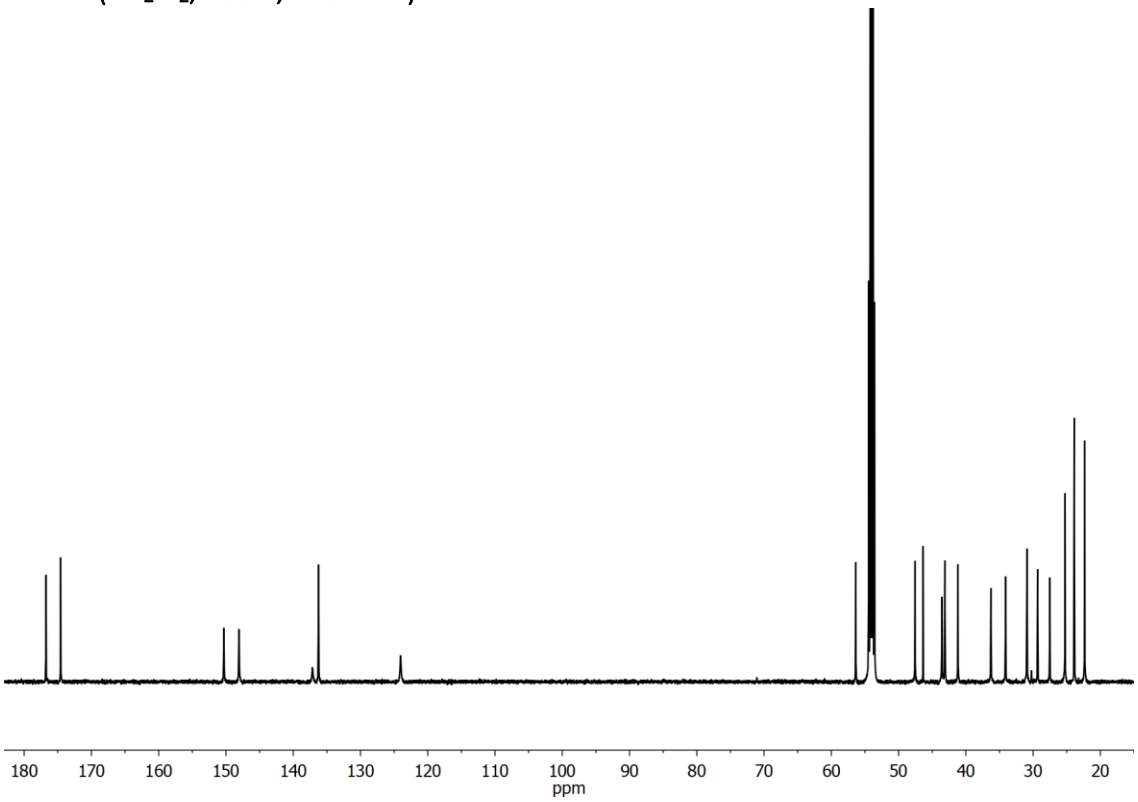


^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

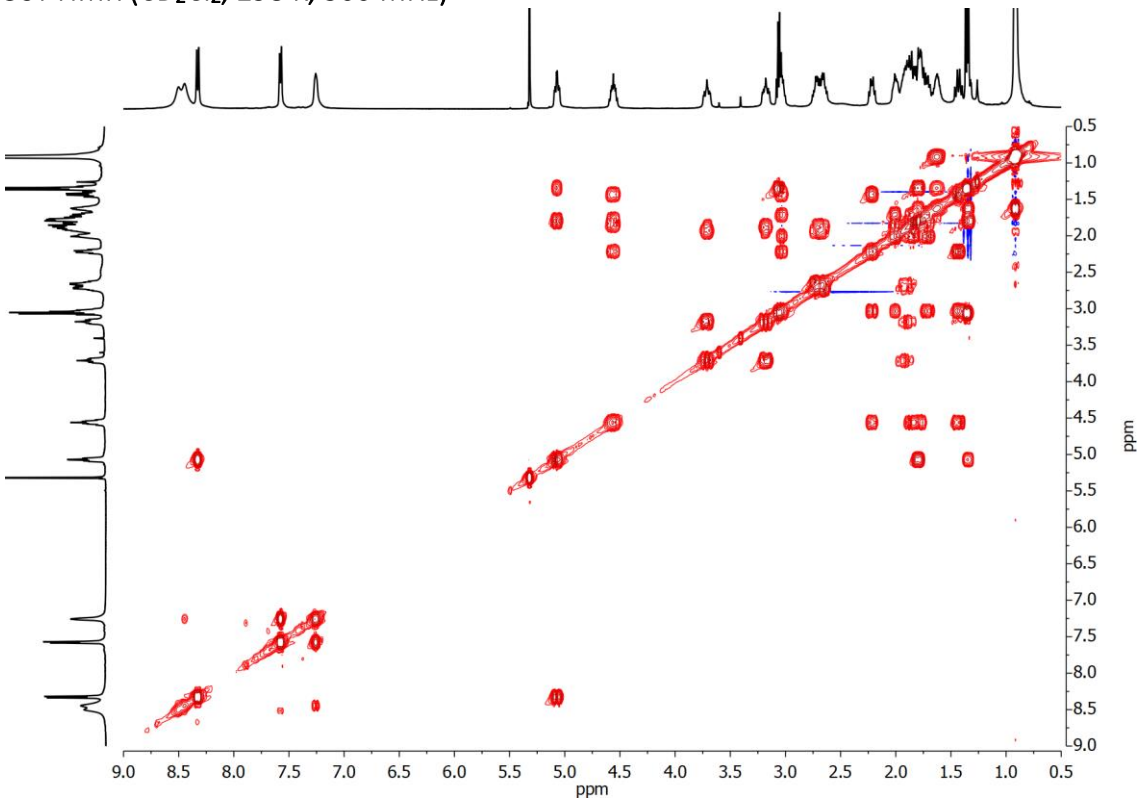


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{13}C NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 126 MHz)

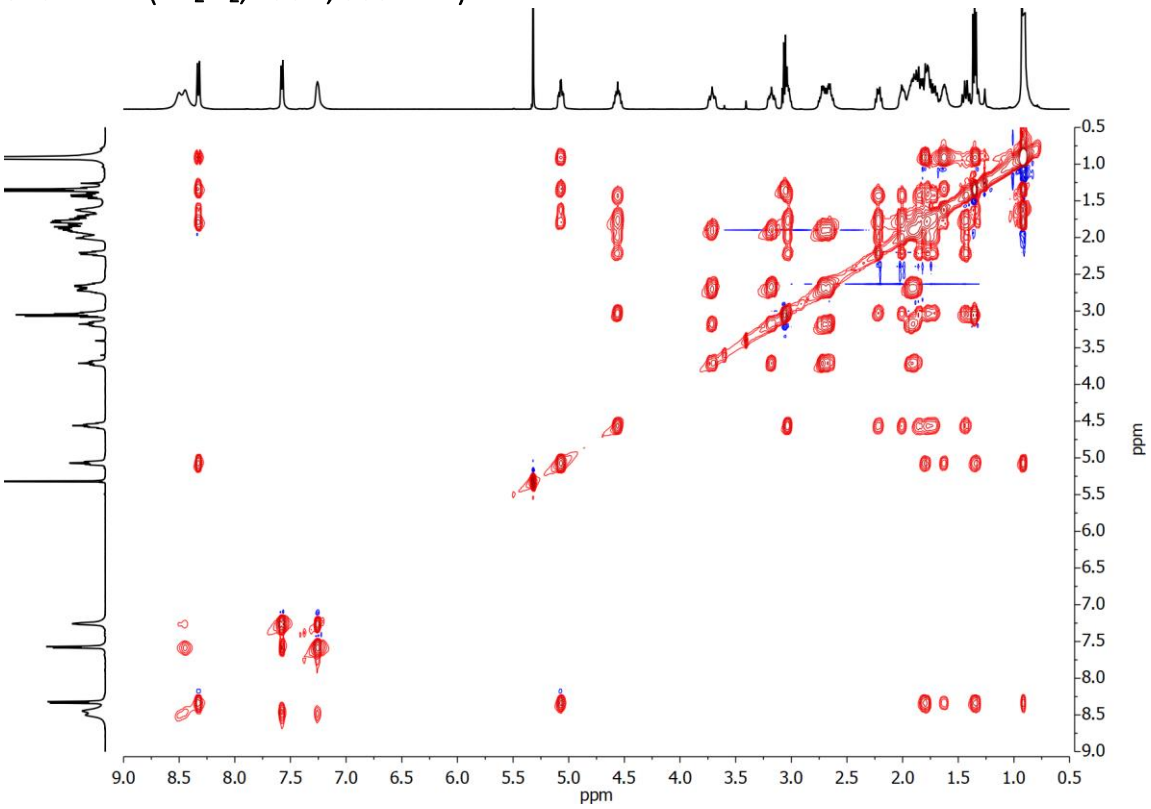


COSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

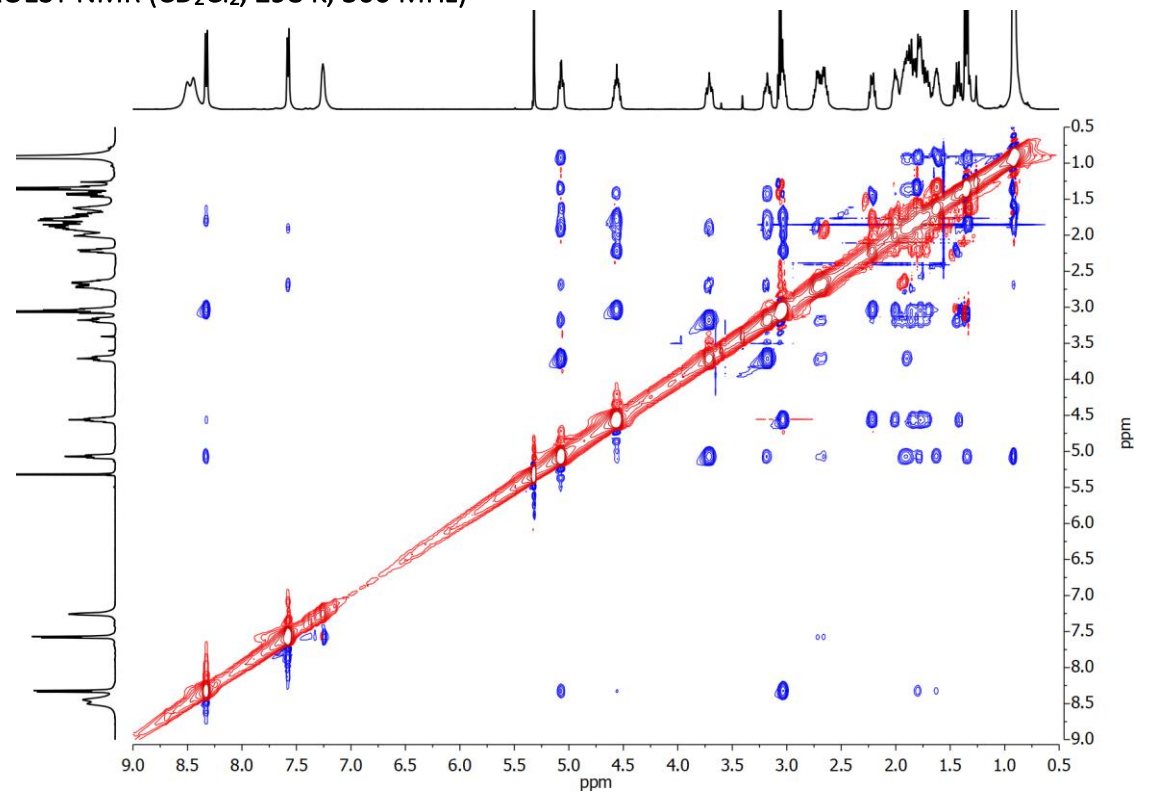


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

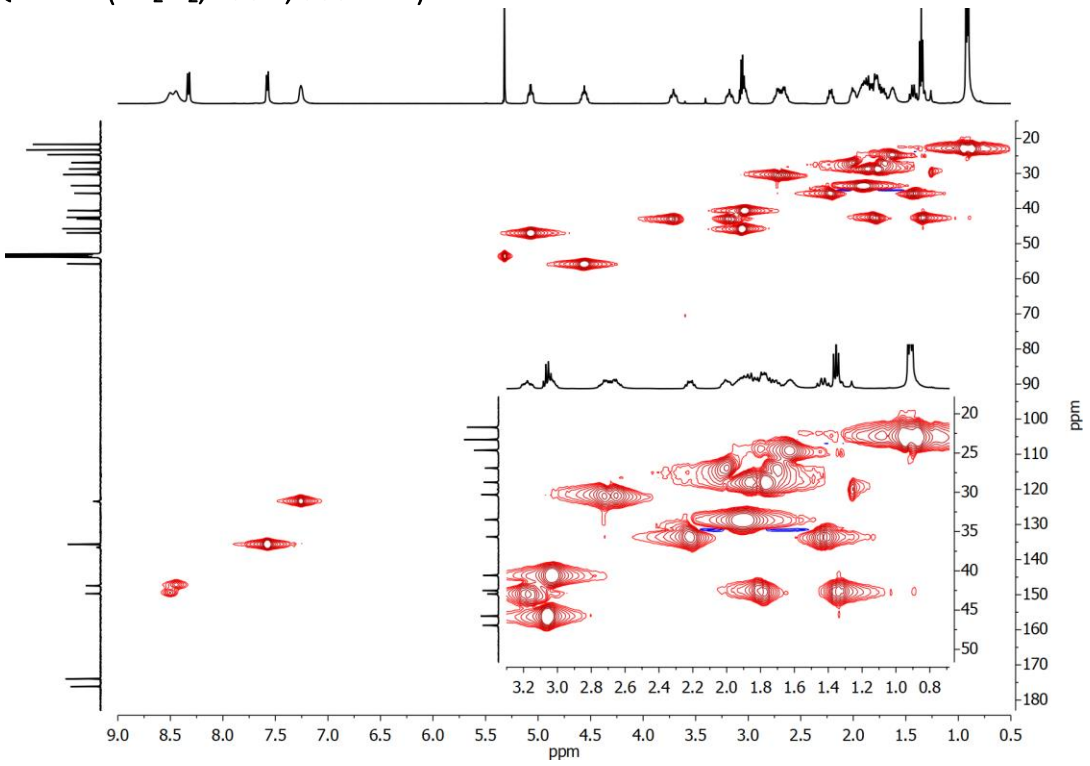


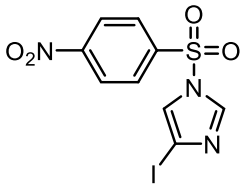
ROESY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

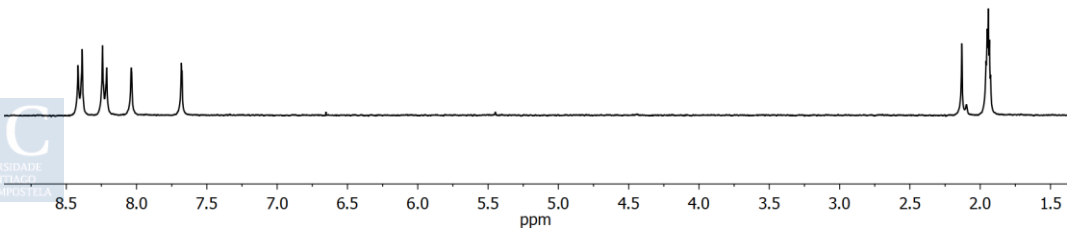
HSQC NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



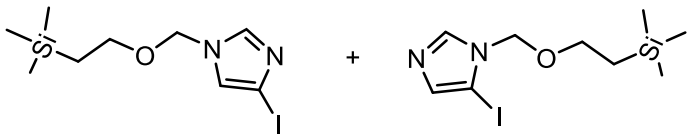


49

^1H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

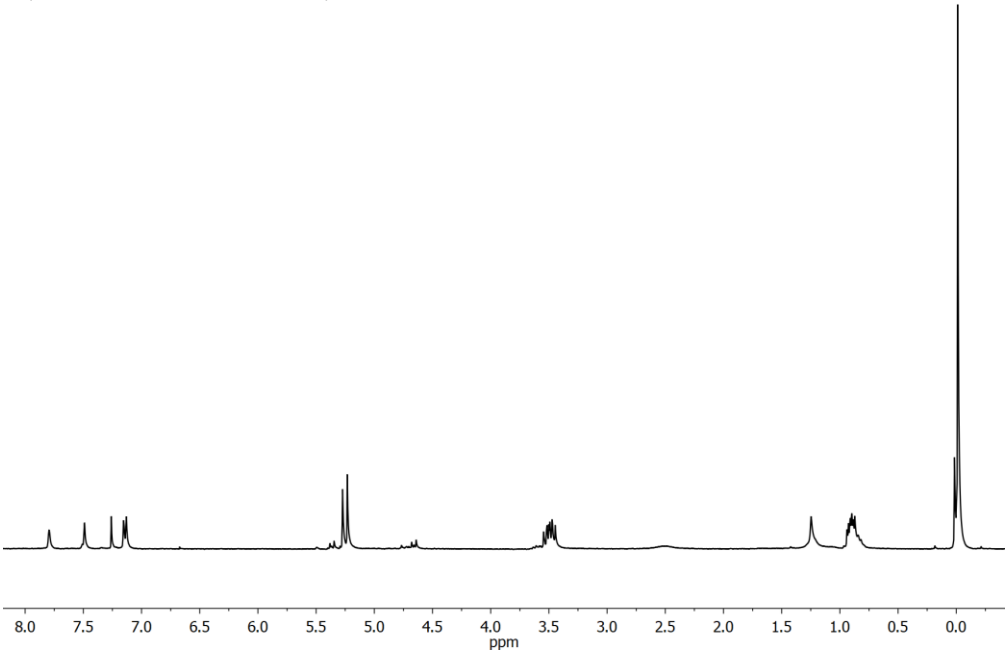


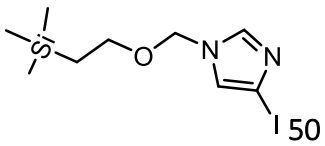
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



50/51

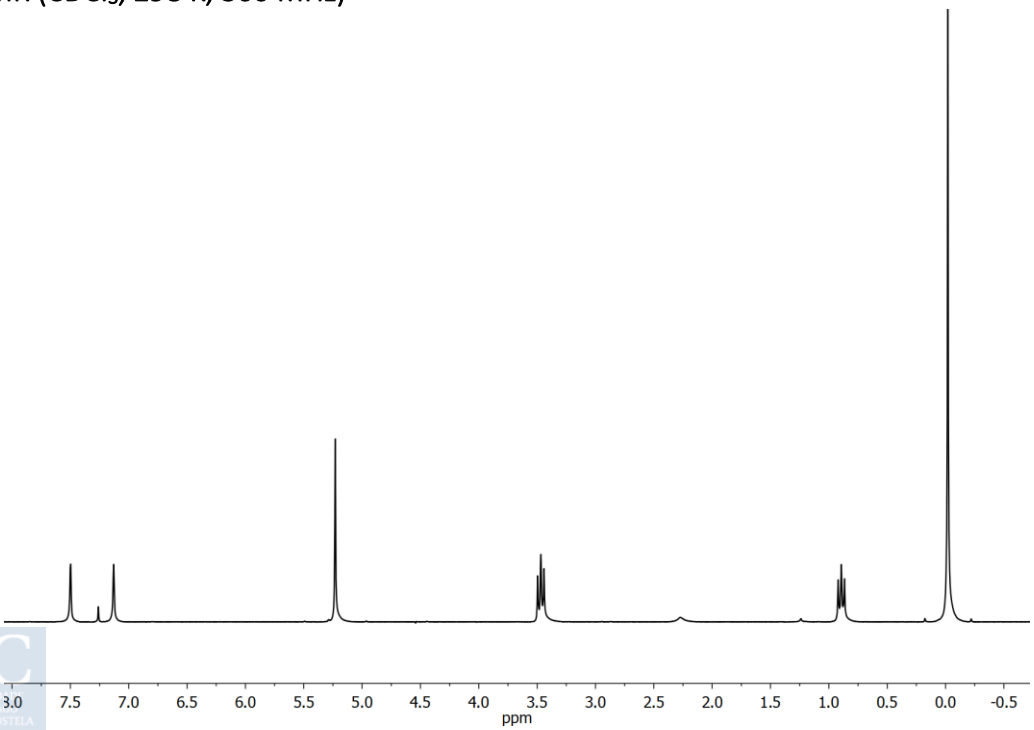
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)



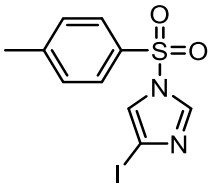


50

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

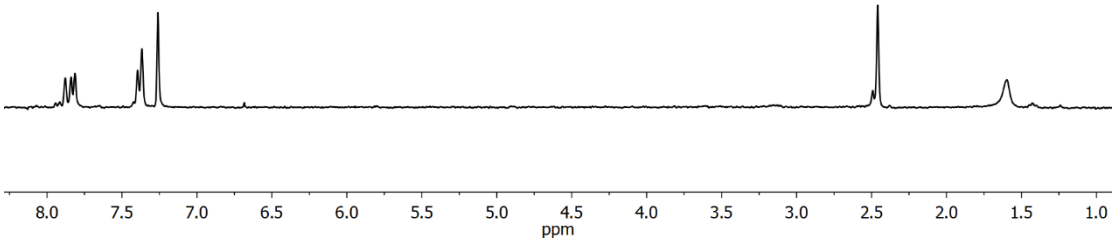


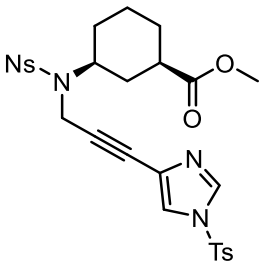
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



56

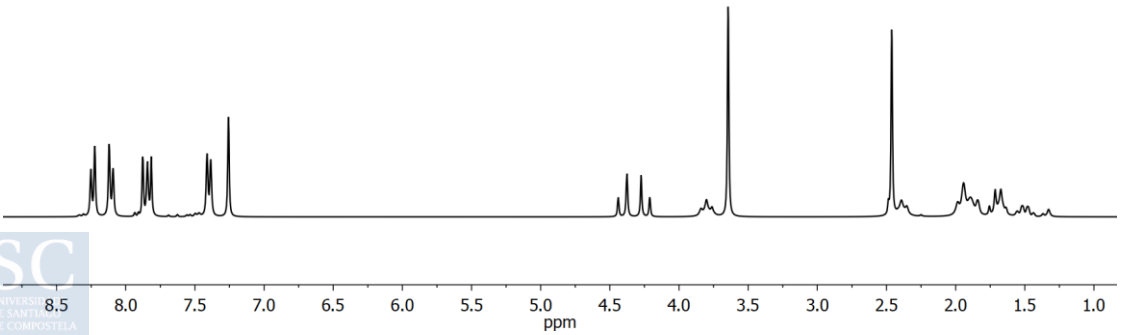
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)



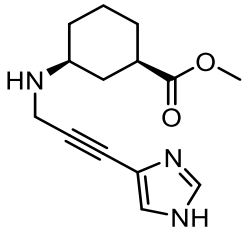


57

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

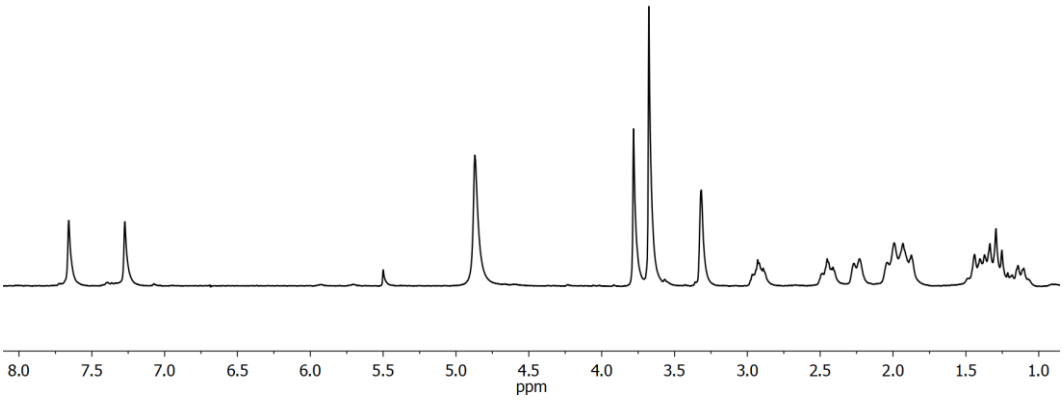


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

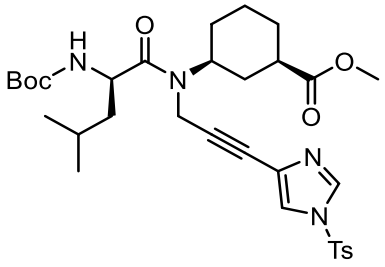


59

^{1}H NMR (MeOH-d_4, 298 K, 300 MHz)

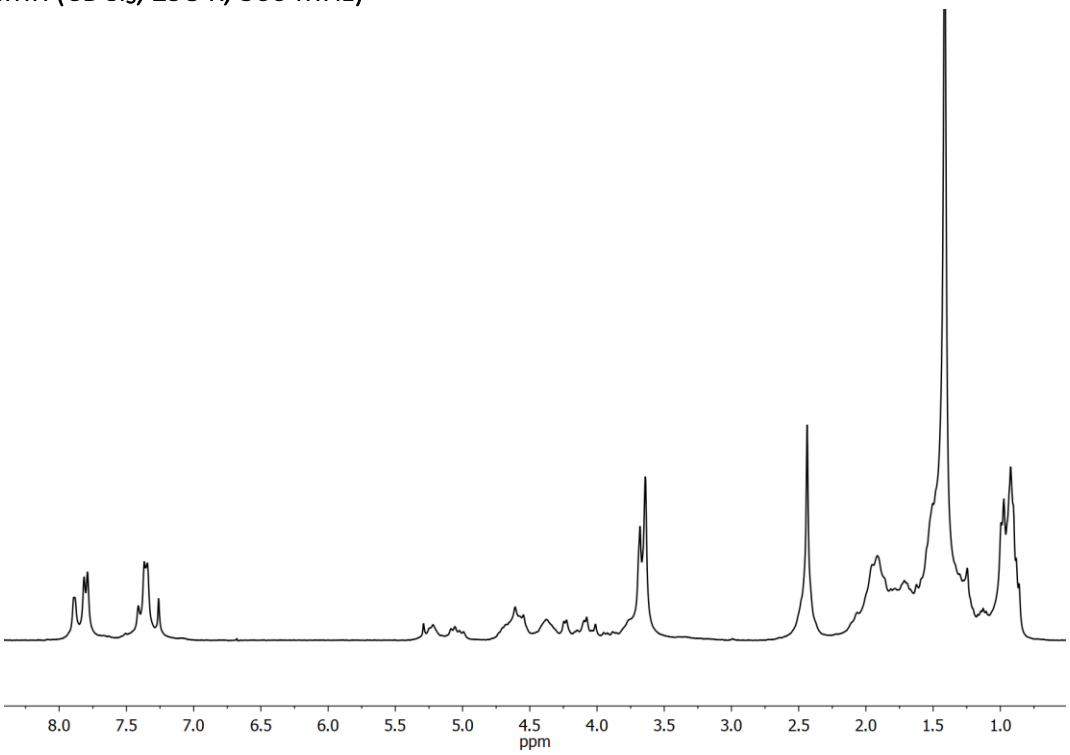


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

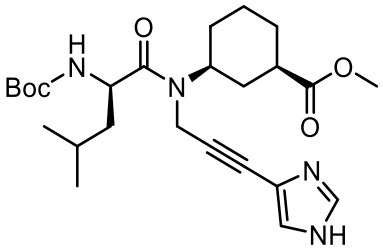


60

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

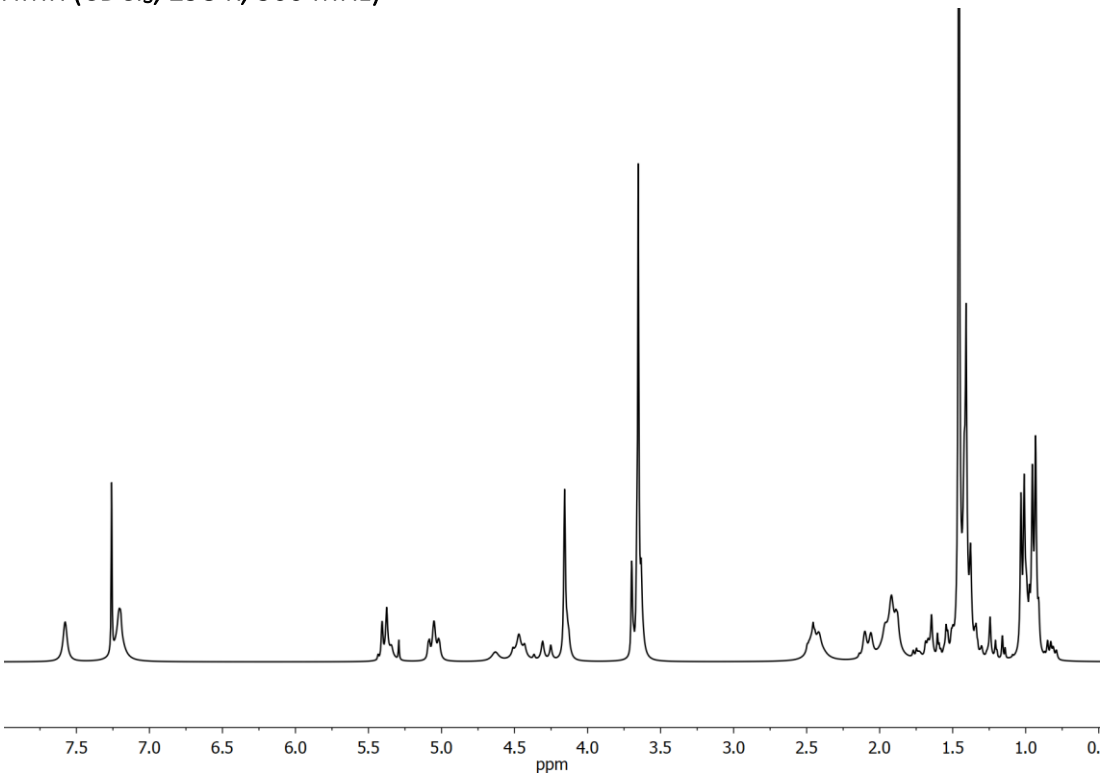


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

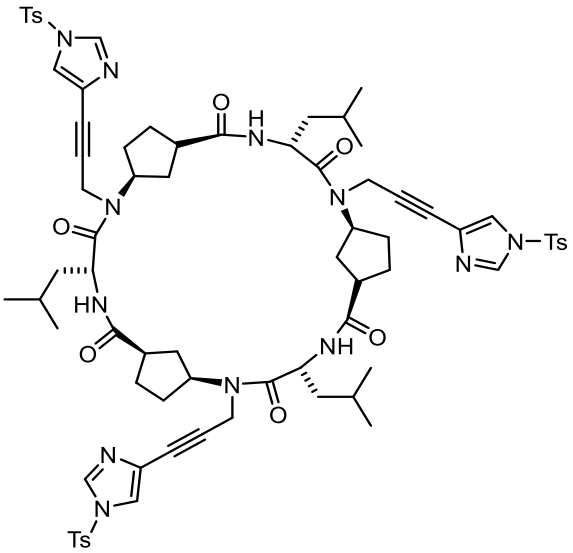


61

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

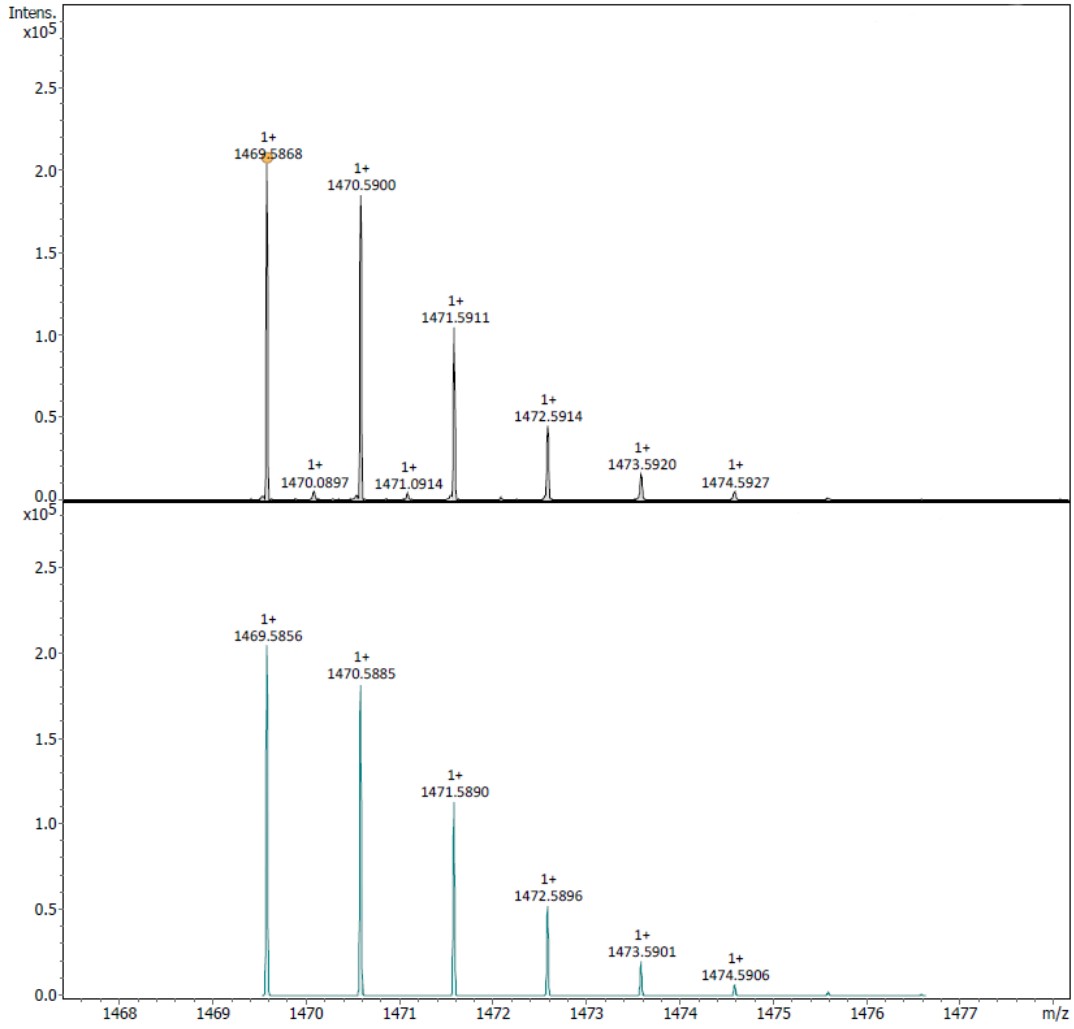


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



CP7a

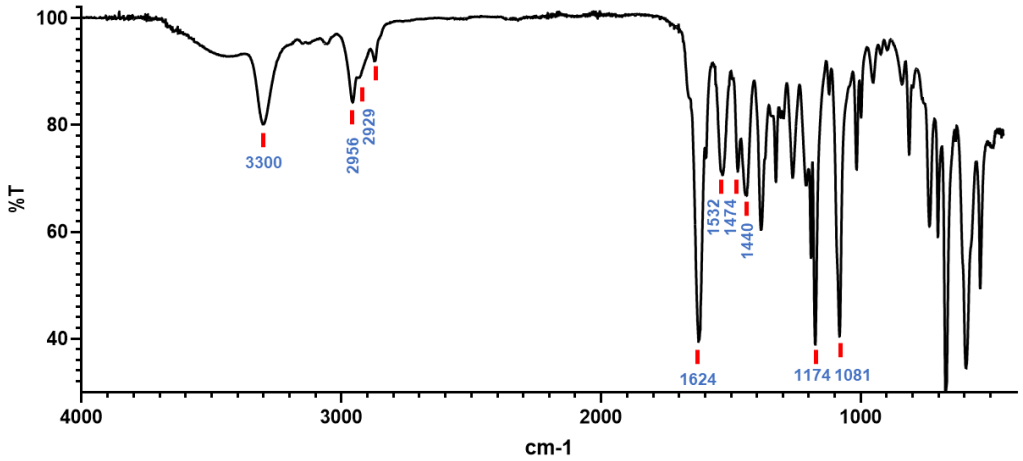
MS-ESI (real/predicted)



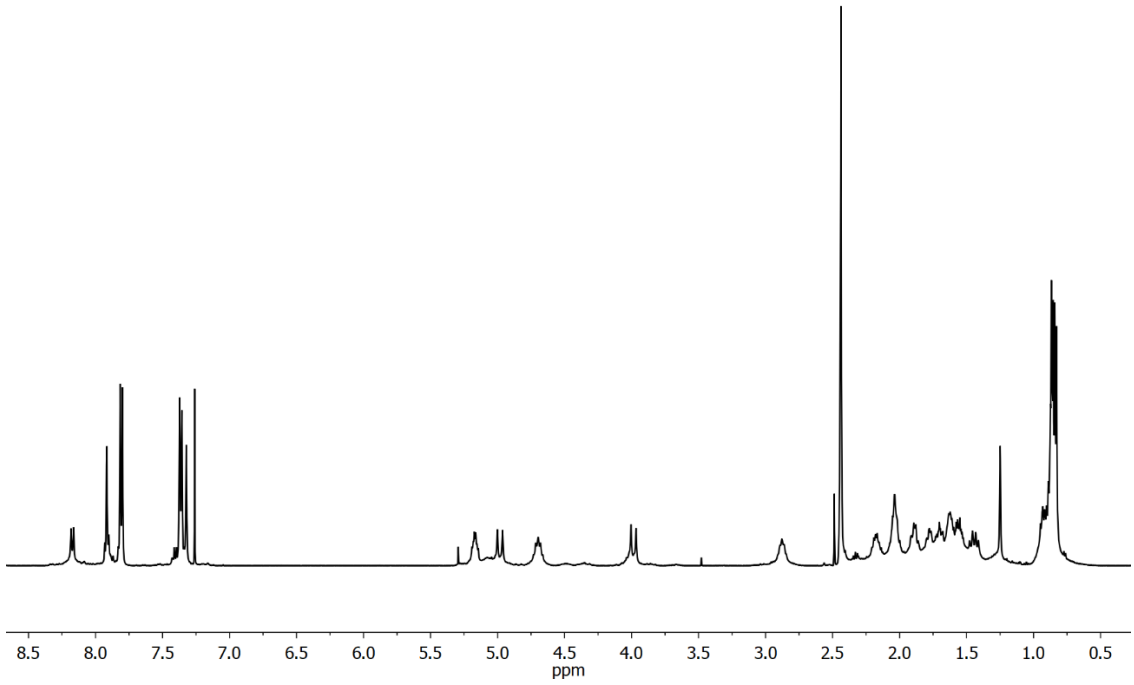
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
1469.5868	1	C75H90N12NaO12S3	100.00	1469.5856	-1.3	-0.9	23.6	43.0	even	ok

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FTIR

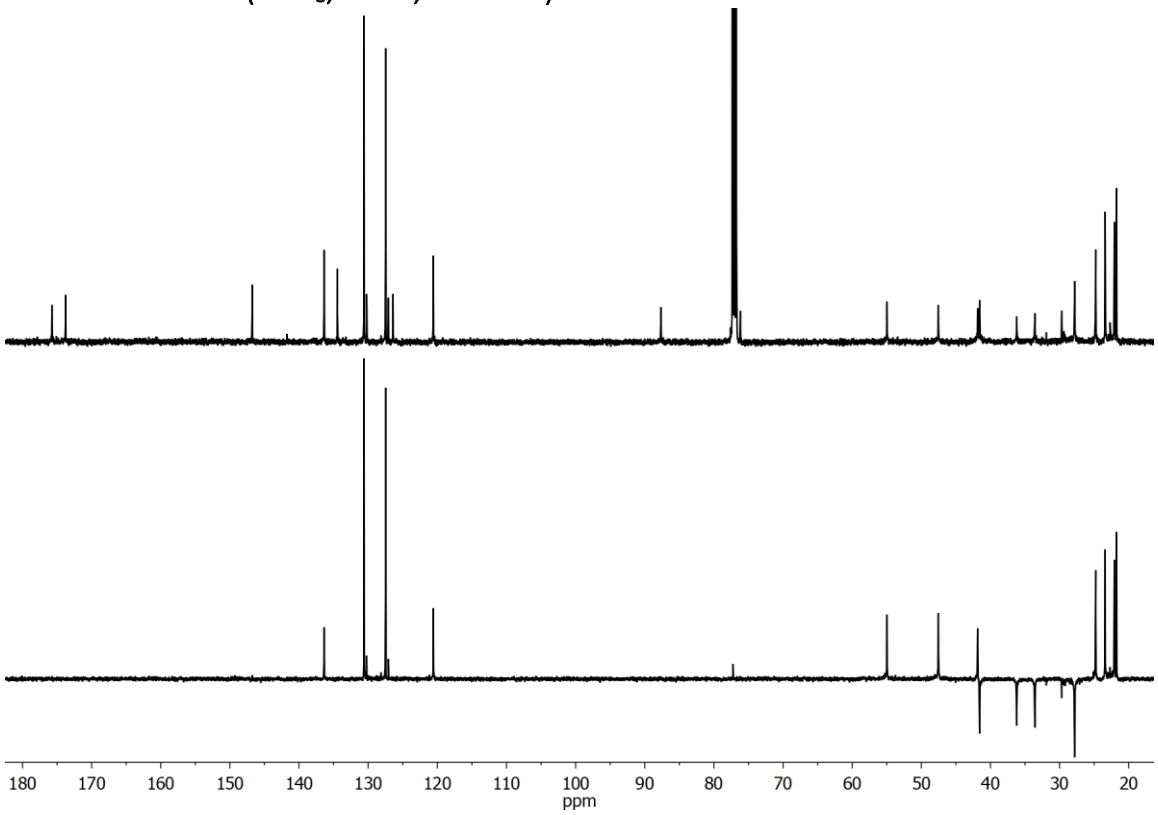


^{1}H NMR (CDCl3, 298 K, 500 MHz)

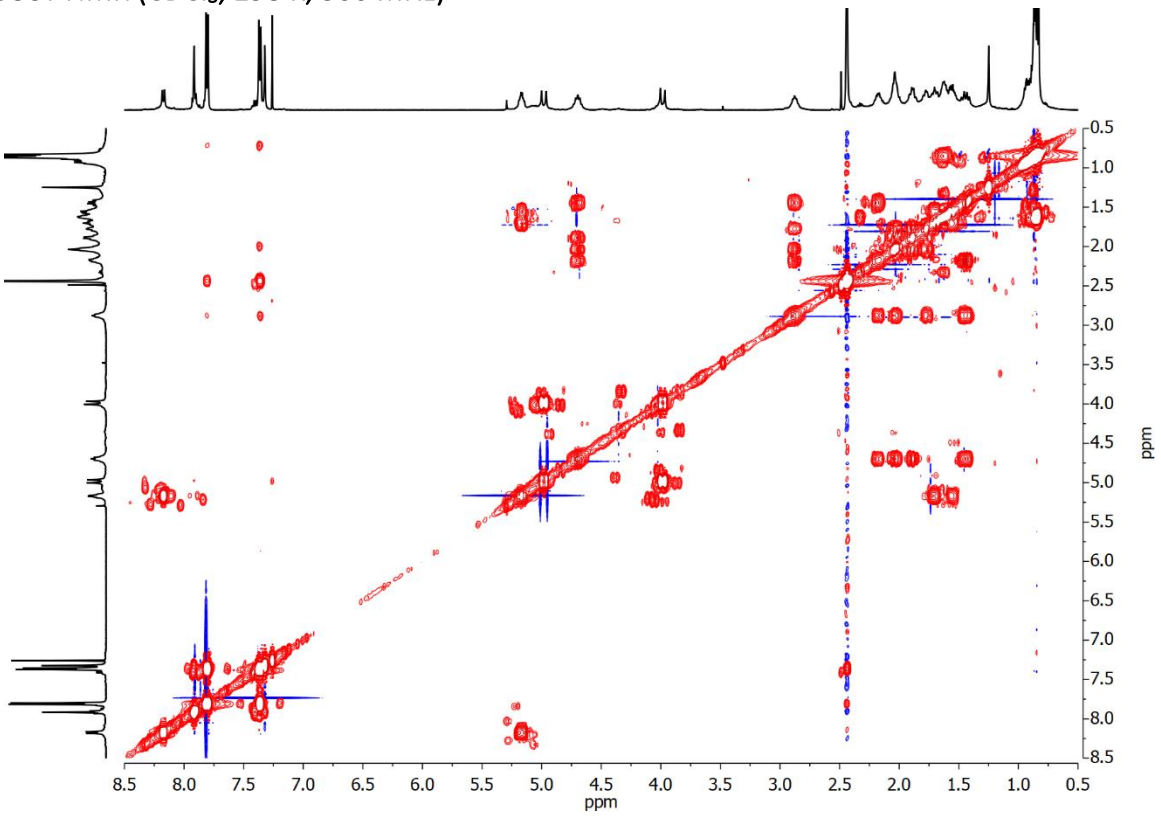


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)

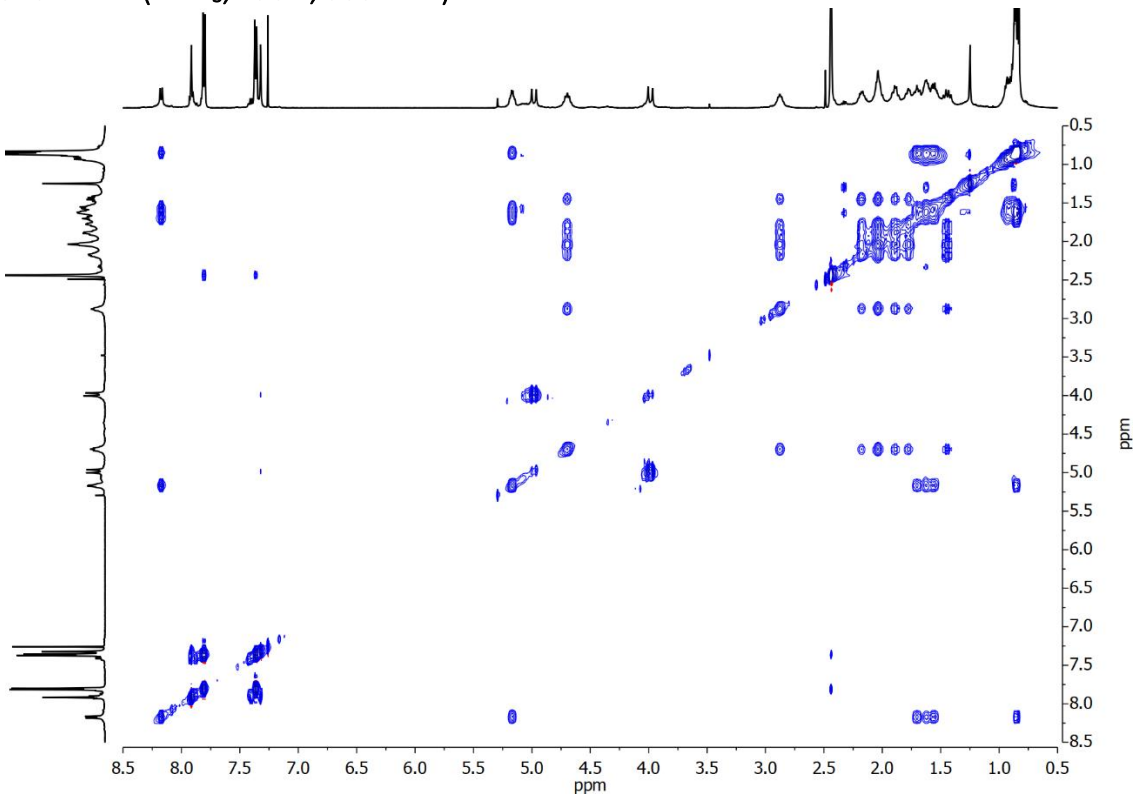


COSY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

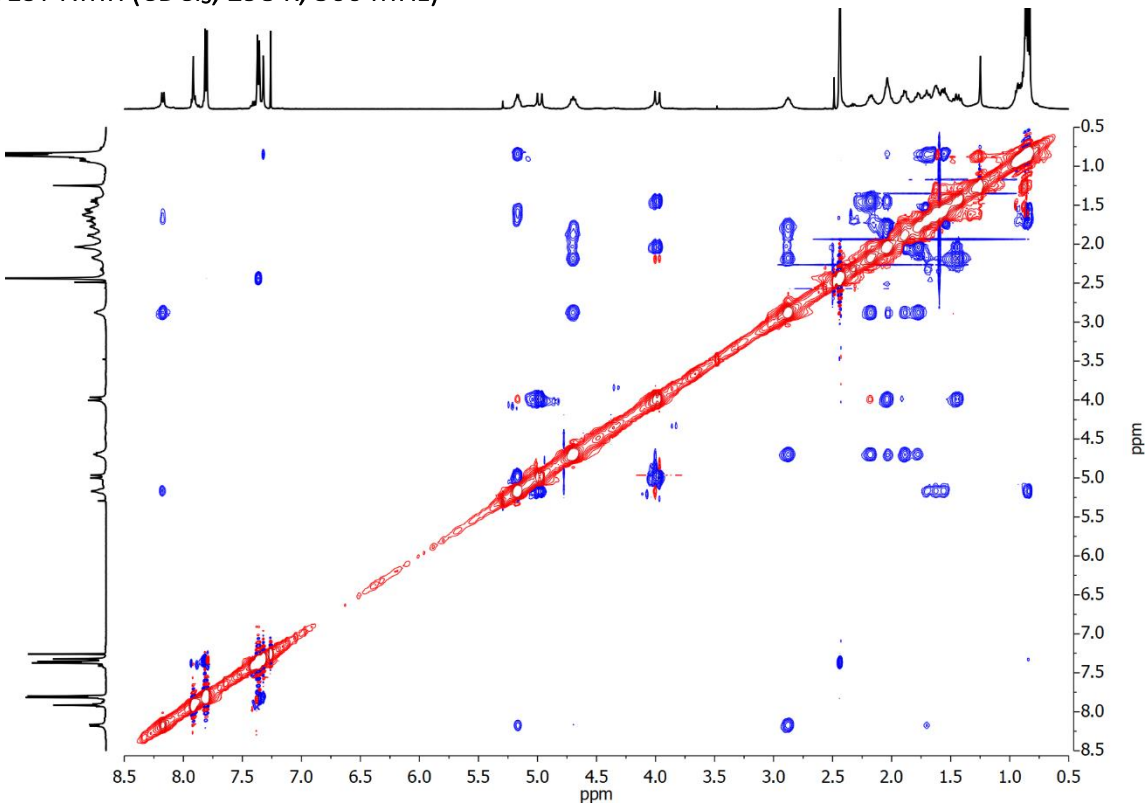


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TOCSY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

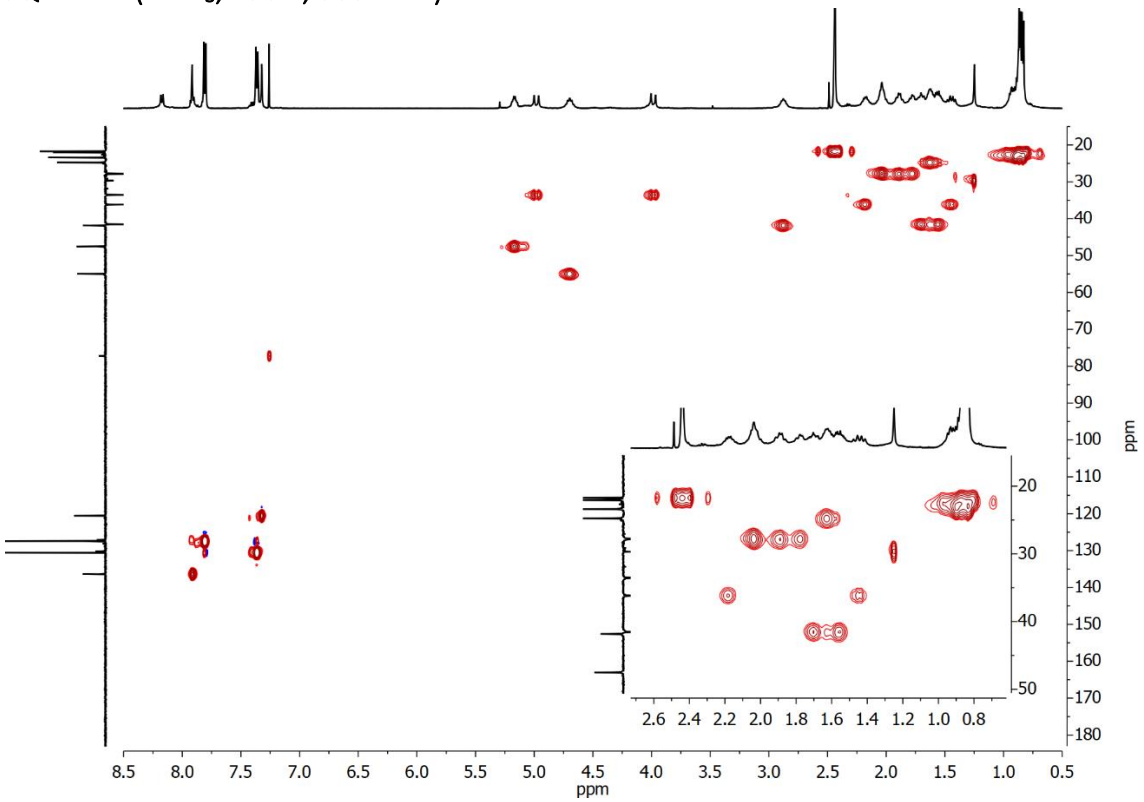


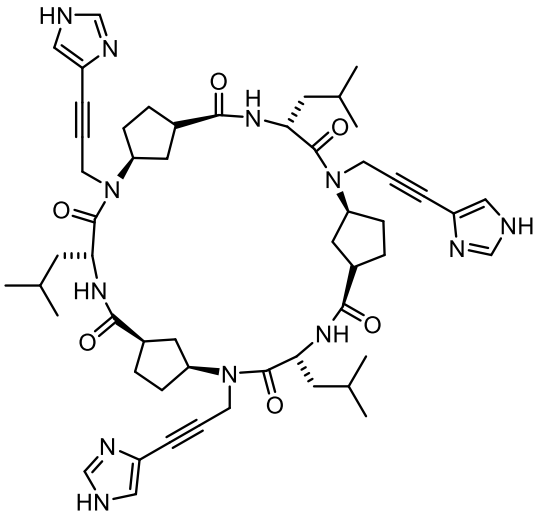
OESY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

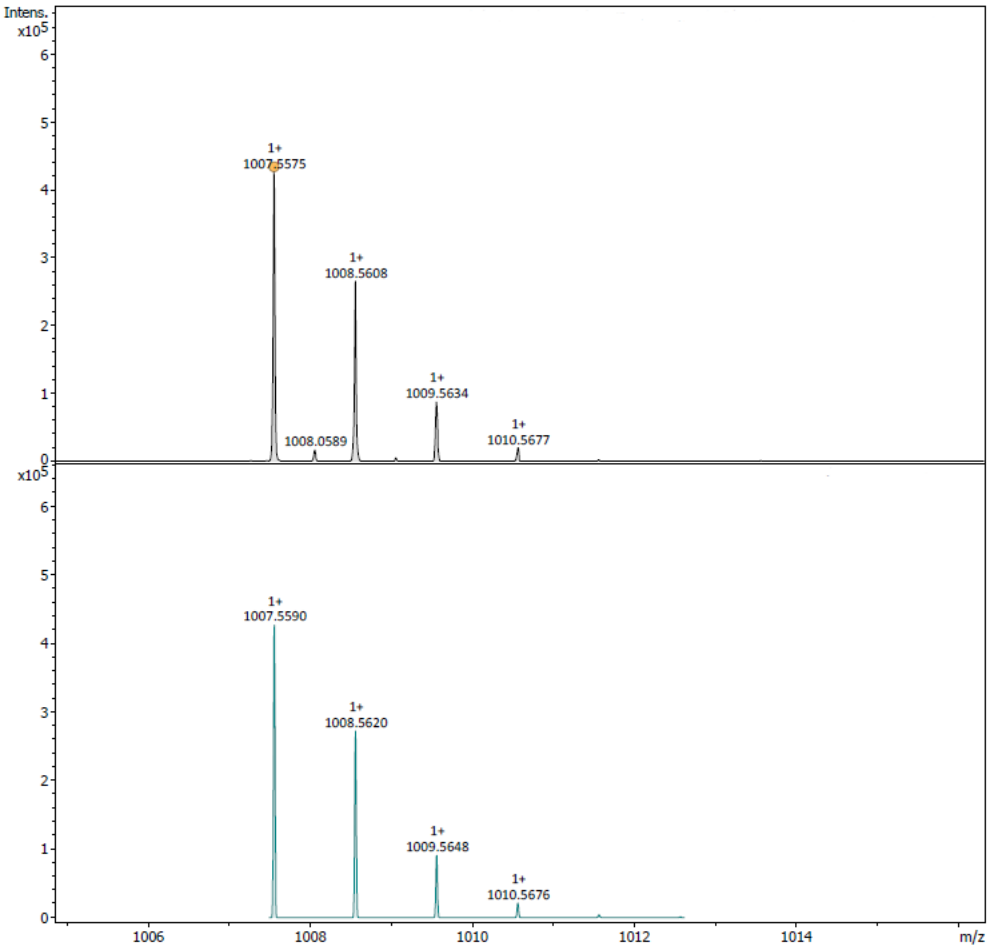
HSQC NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)





CP7b

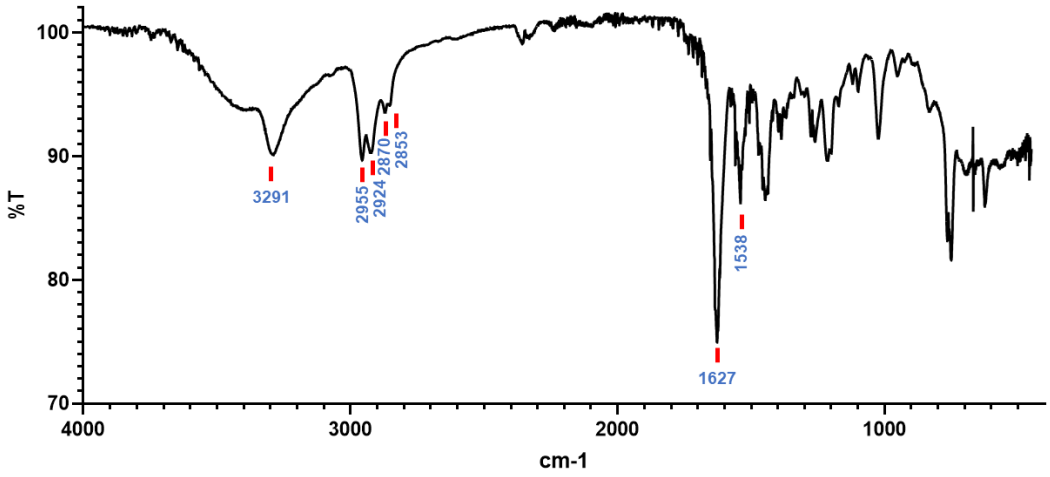
MS-ESI



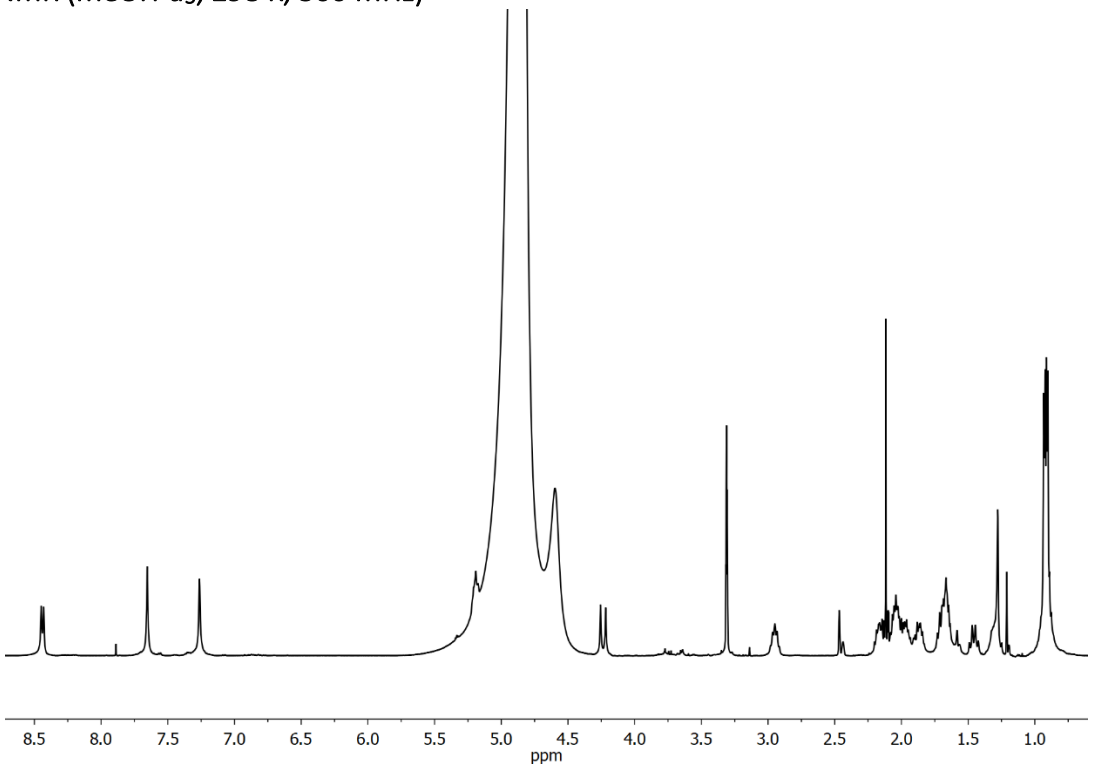
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e¯ Conf	N-Rule
1007.5575	1	C52H70N15NaO5	100.00	1007.5577	0.1	0.1	2.5	25.5	odd	ok
	2	C50H65N21O3	96.65	1007.5574	-0.2	-0.2	3.6	29.5	odd	ok
	3	C50H68N18NaO4	53.61	1007.5563	-1.2	-1.2	6.0	26.0	even	ok
	4	C52H67N18O4	53.05	1007.5587	1.2	1.2	7.9	29.0	even	ok
	5	C54H72N12NaO6	54.96	1007.5590	1.5	1.5	8.5	25.0	even	ok

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FTIR

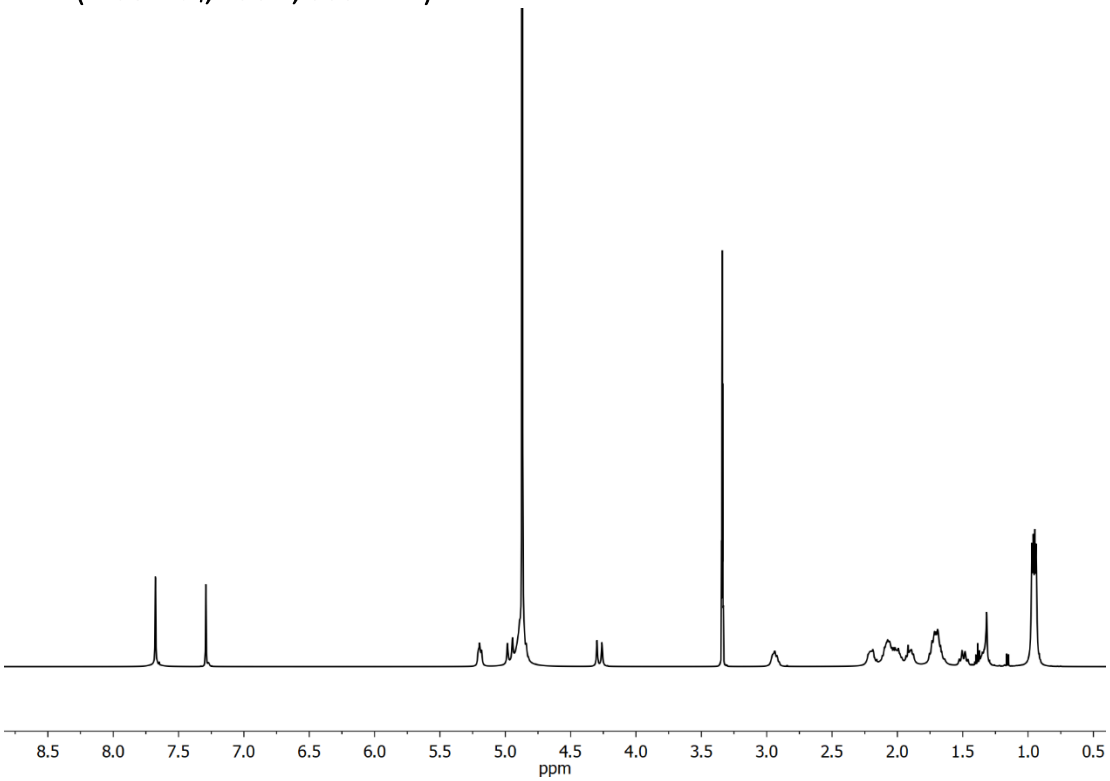


^{1}H NMR (MeOH-d_3, 298 K, 500 MHz)

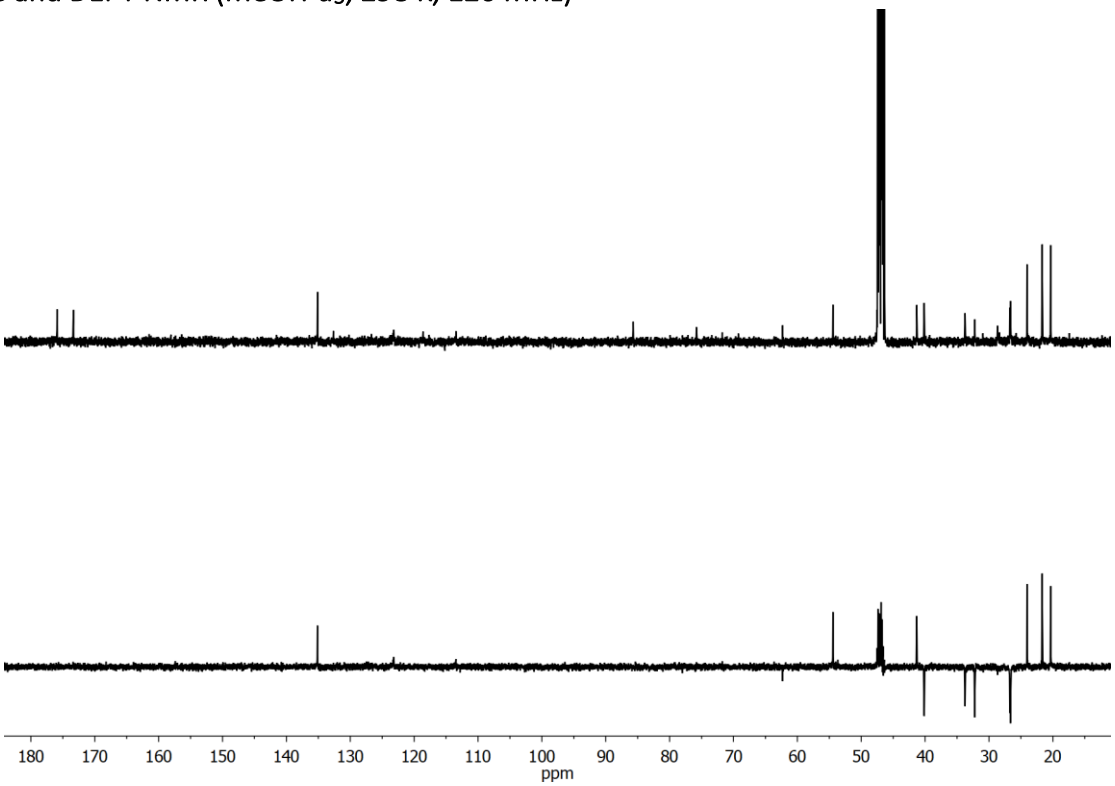


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{1}H NMR (MeOH-d_4, 298 K, 300 MHz)

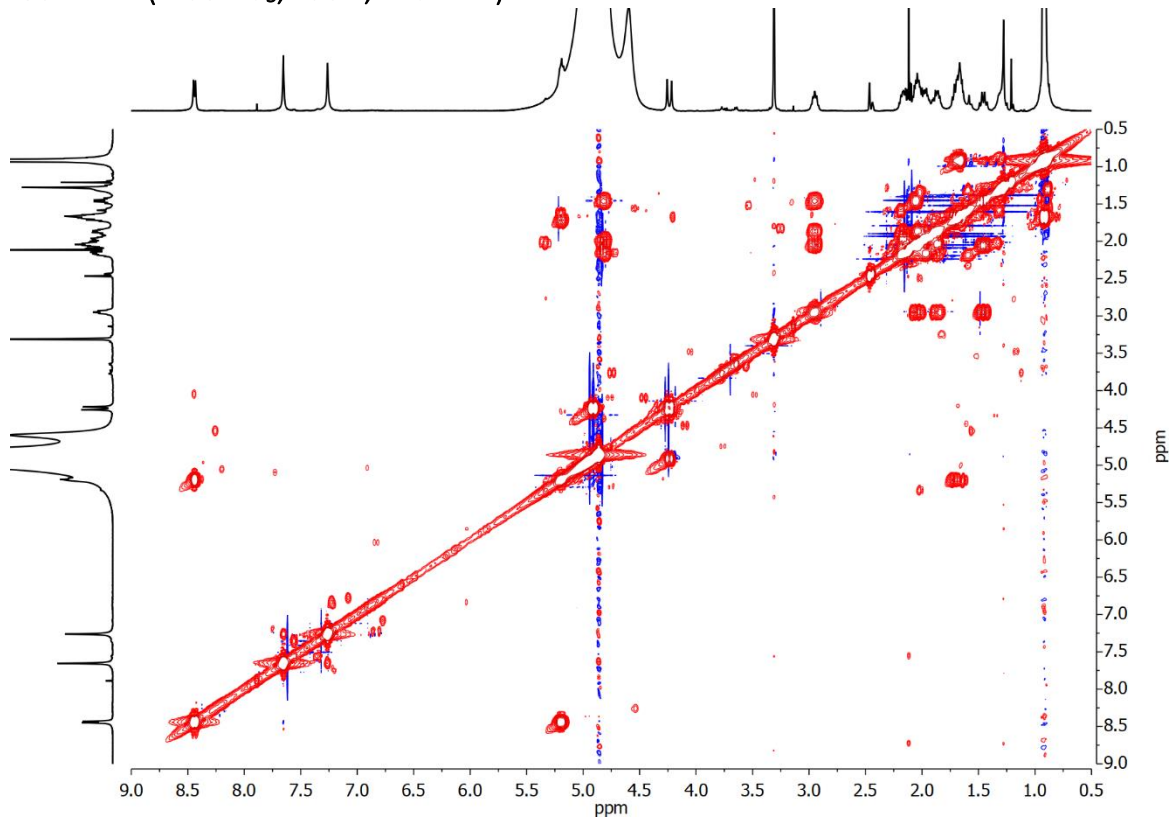


^{13}C and DEPT NMR (MeOH-d_3, 298 K, 126 MHz)

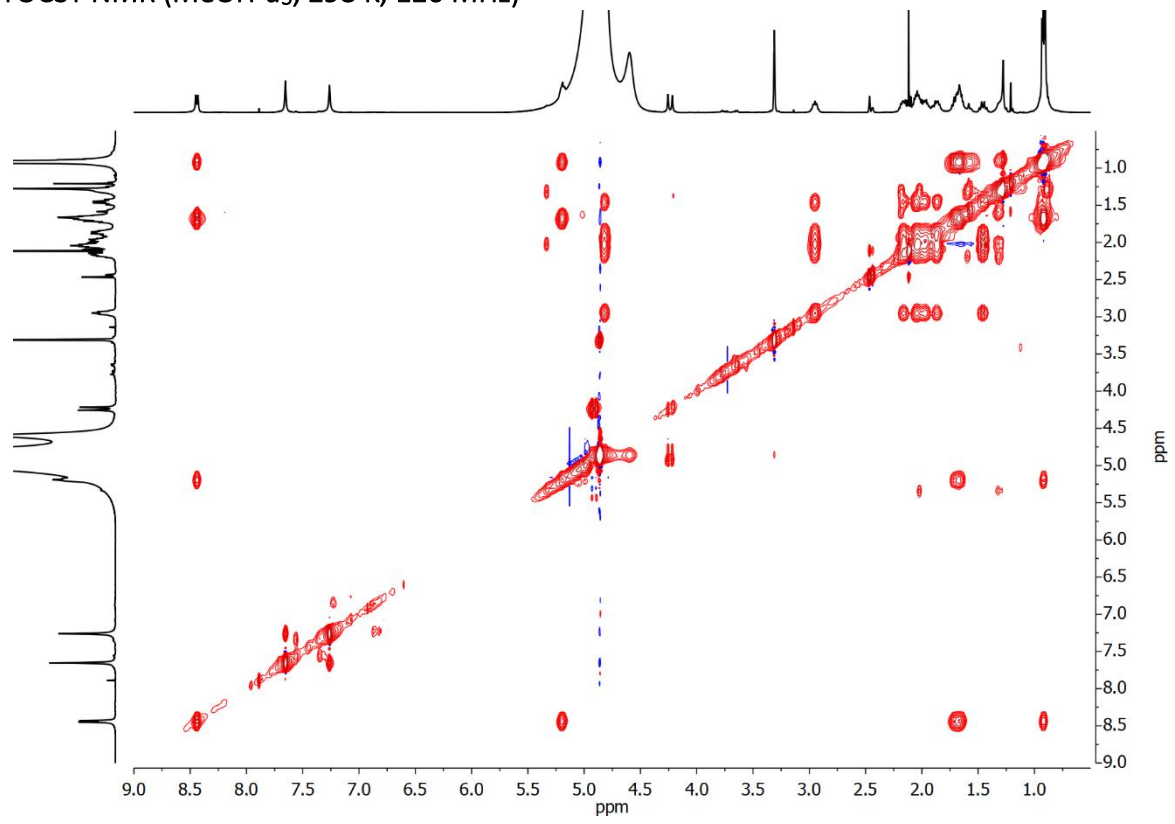


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (MeOH-d_3, 298 K, 126 MHz)

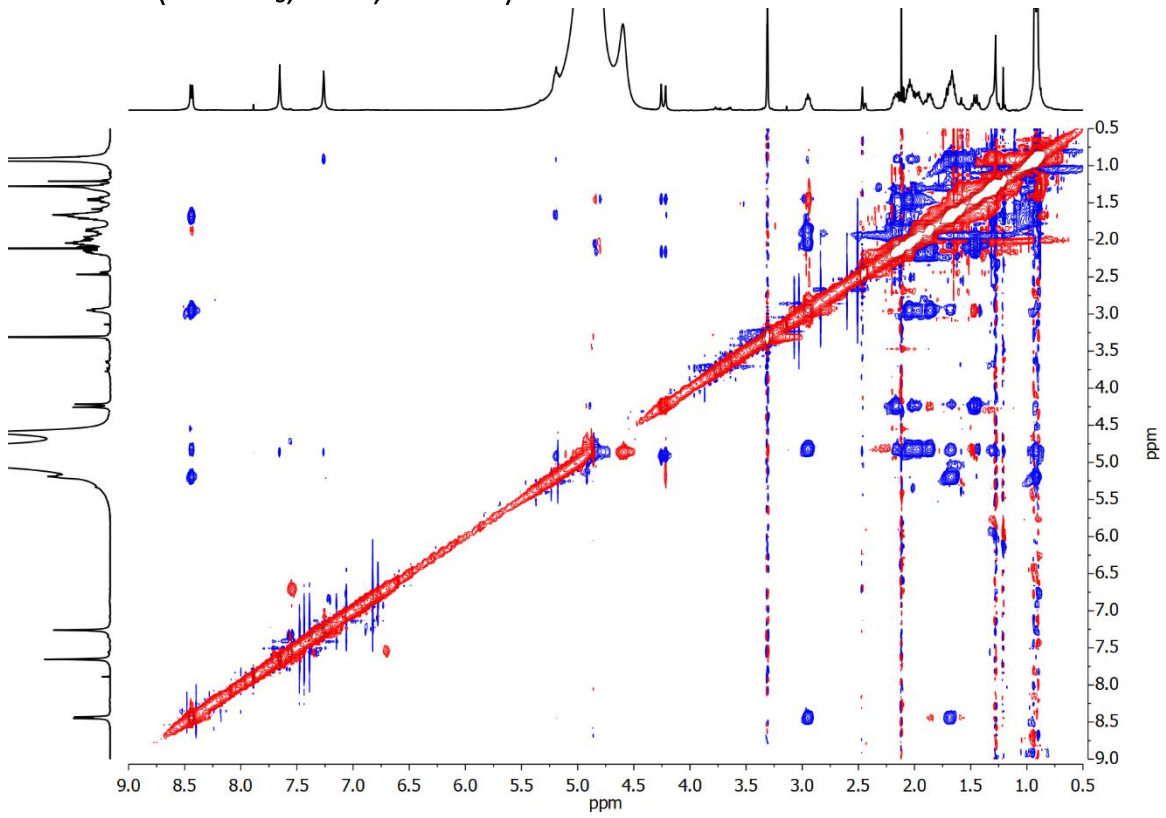


TOCSY NMR (MeOH-d_3, 298 K, 126 MHz)

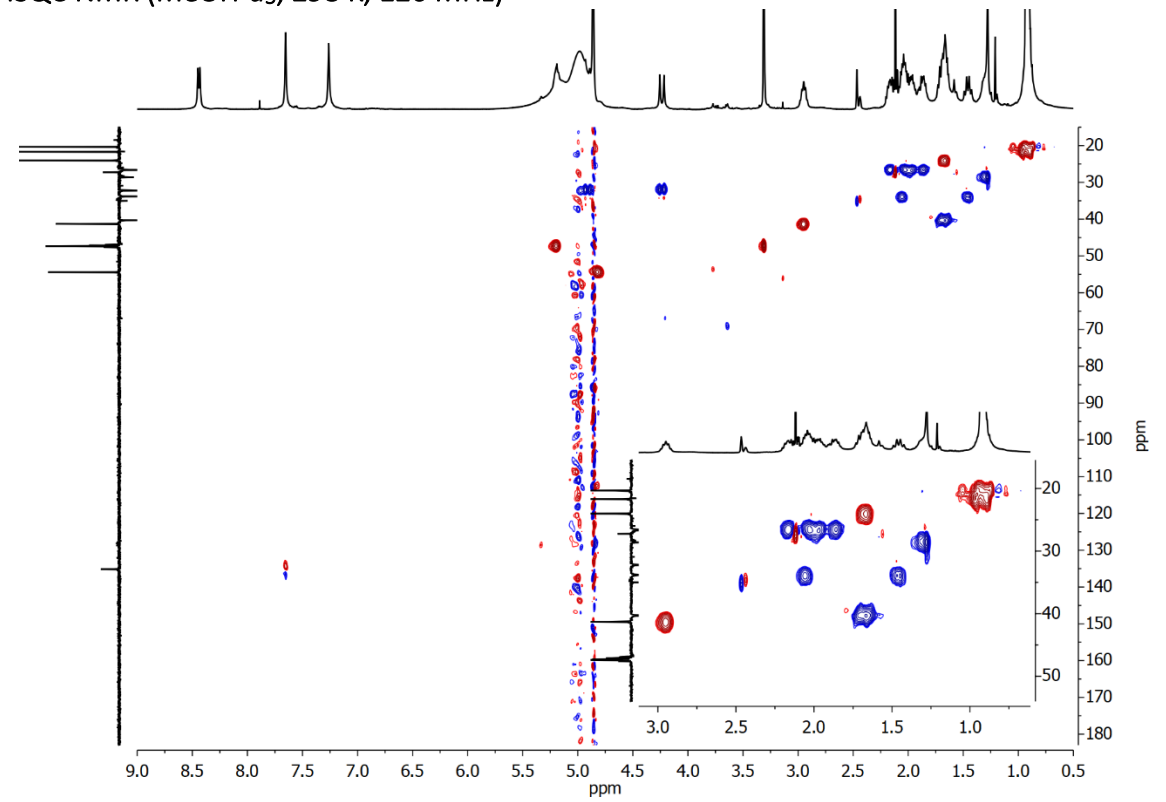


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ROESY NMR (MeOH-d_3, 298 K, 126 MHz)



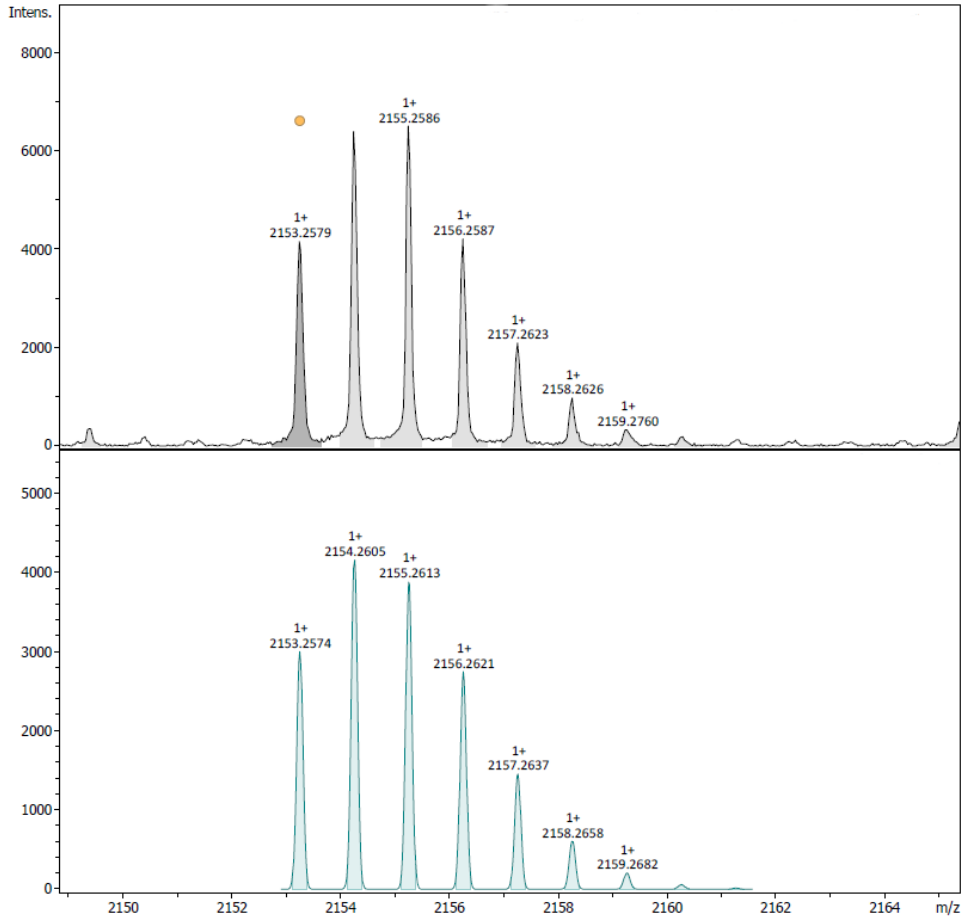
HSQC NMR (MeOH-d_3, 298 K, 126 MHz)



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CP6e + $CoCl_2$ + bipyridine + acetylene dicarboxylic acid

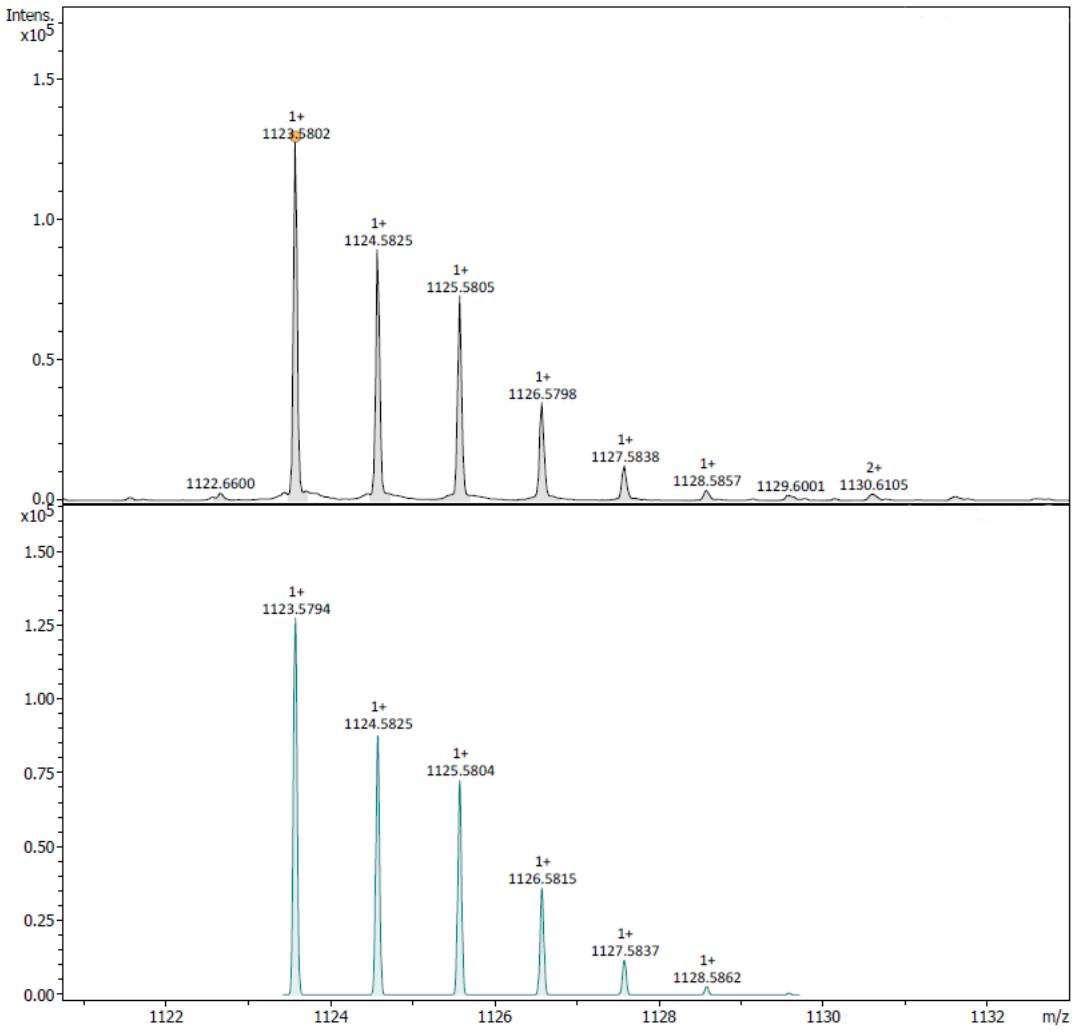
MS-ESI real/predicted for $[D6e{\cdot}CoCl]^+$



Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e¯ Conf	N-Rule
1123.5802	1	C60H87ClCoN9O6	98.63	1123.5794	-0.7	-0.6	6.2	25.5	odd	ok
2153.2579	1	C120H174ClCoN18O12	100.00	2153.2574	-0.5	-0.2	45.0	46.5	odd	ok

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

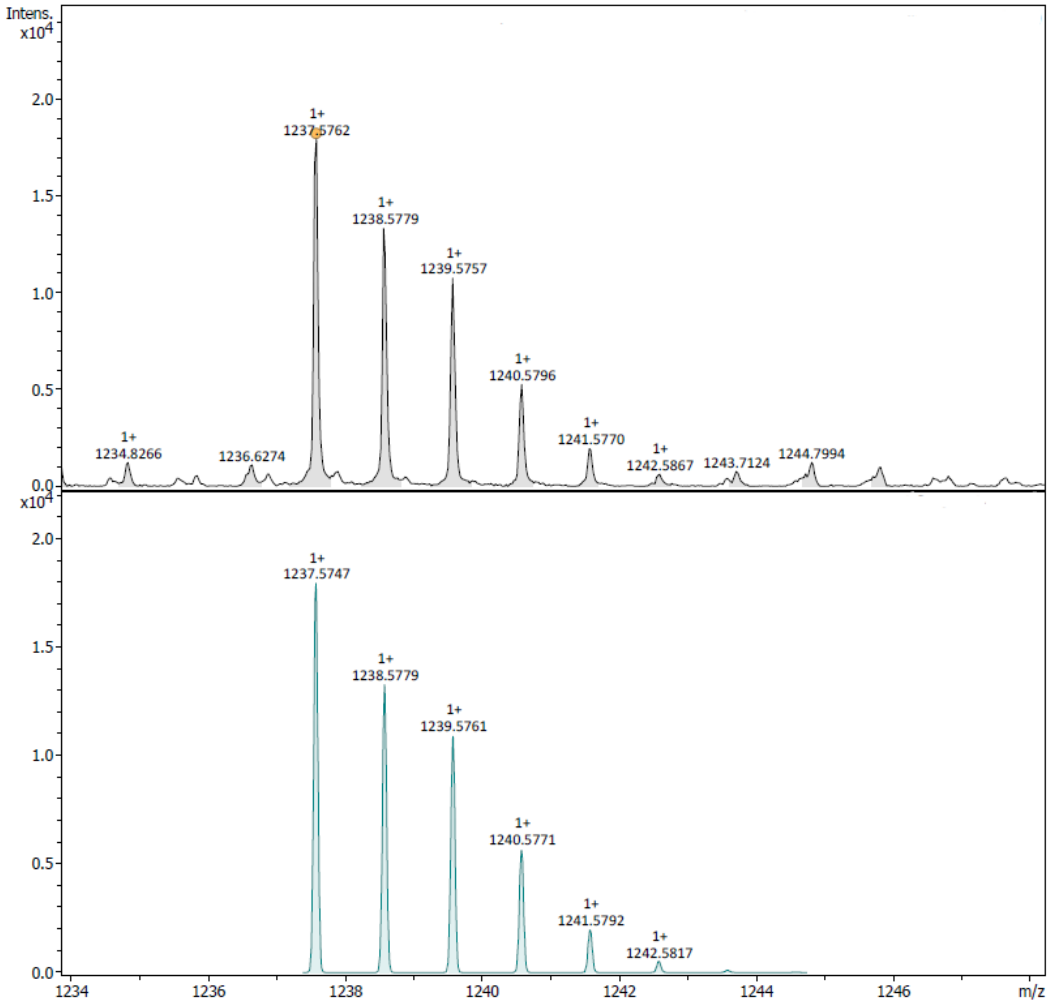
MS-ESI real/predicted for $[CP6e{\cdot}CoCl]^+$



Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e¯ Conf	N-Rule
1123.5802	1	C60H87ClCoN9O6	98.63	1123.5794	-0.7	-0.6	6.2	25.5	odd	ok

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

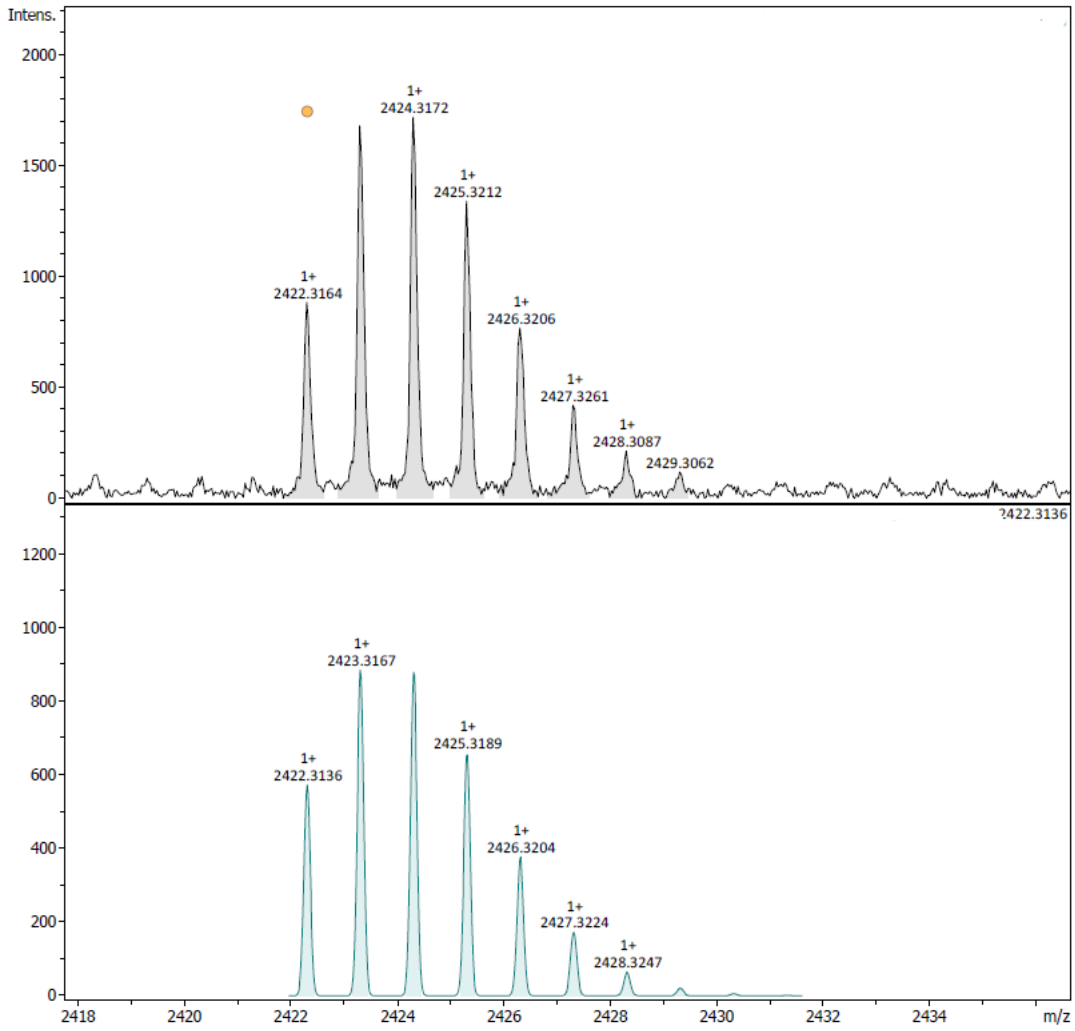
MS-ESI real/predicted for [CP6e·CoCl·ADC]$^{+}$



Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e^{-} Conf	N-Rule
1123.5802	1	C60H87ClCoN9O6	98.63	1123.5794	-0.7	-0.6	6.2	25.5	odd	ok
1237.5762	1	C64H89ClCoN9O10	100.00	1237.5747	-1.5	-1.2	10.4	28.5	odd	ok

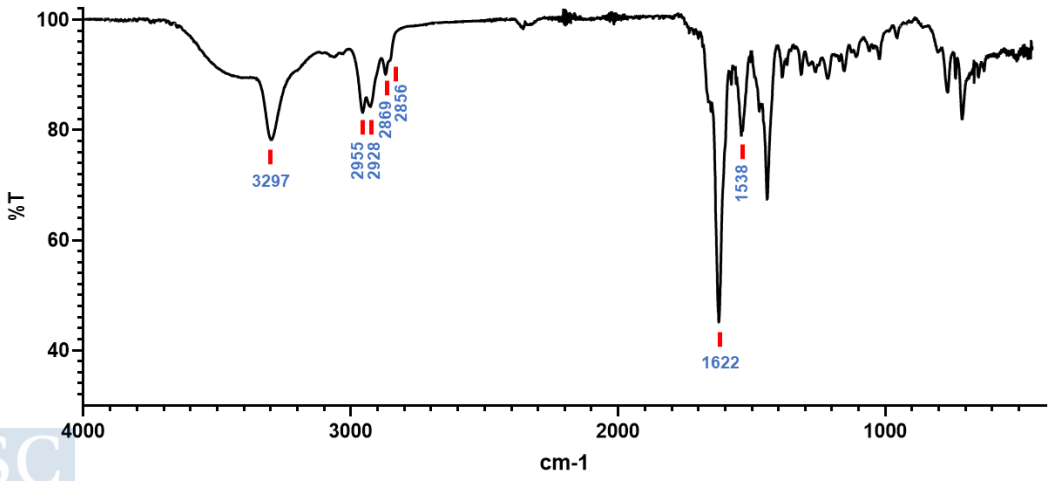
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MS-ESI real/predicted for [D6e·CoCl·ADC·bipyridine]$^+$



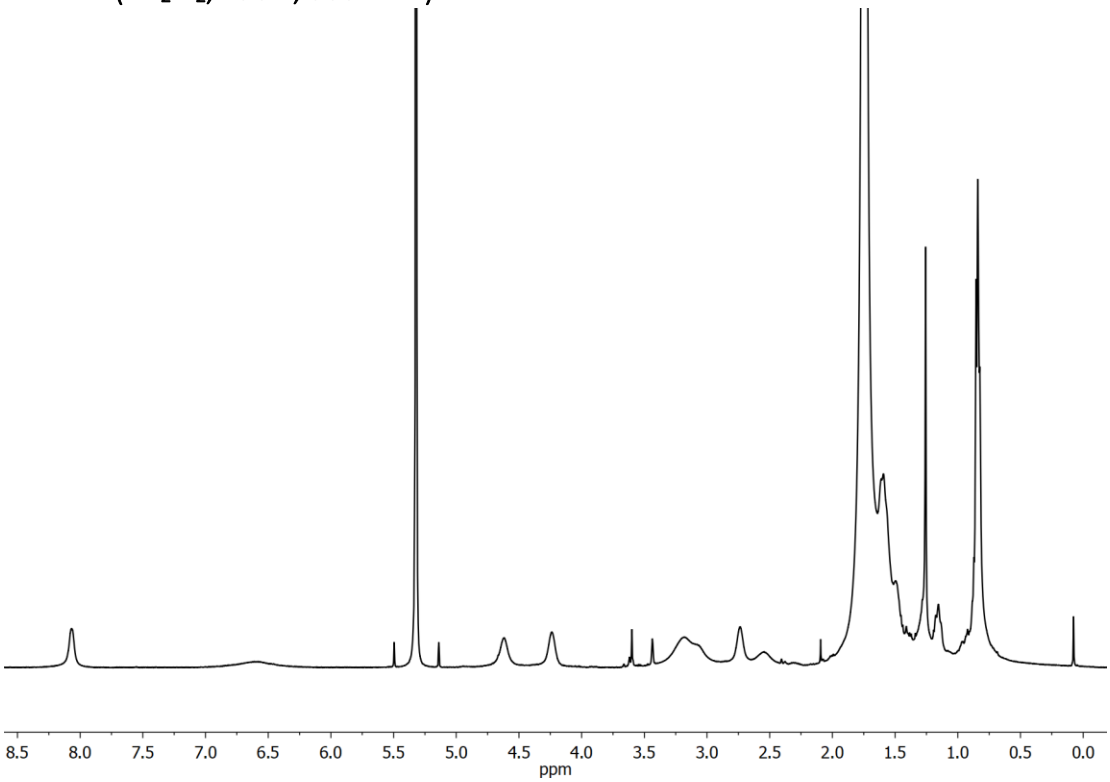
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e¯ Conf	N-Rule
1123.5802	1	C60H87ClCoN9O6	98.63	1123.5794	-0.7	-0.6	6.2	25.5	odd	ok
2153.2579	1	C120H174ClCoN18O12	100.00	2153.2574	-0.5	-0.2	45.0	46.5	odd	ok
2422.3164	1	C134H183ClCoN20O16	100.00	2422.3136	-2.8	-1.1	58.7	57.0	even	ok

IR

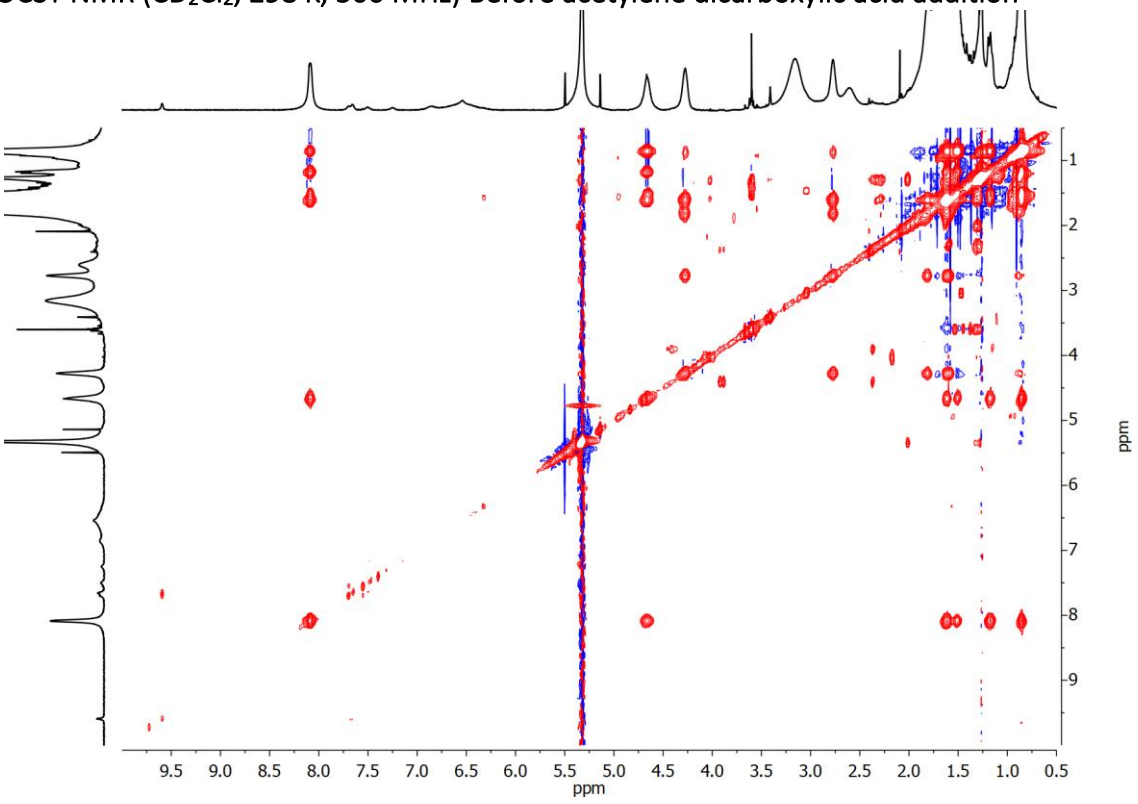


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



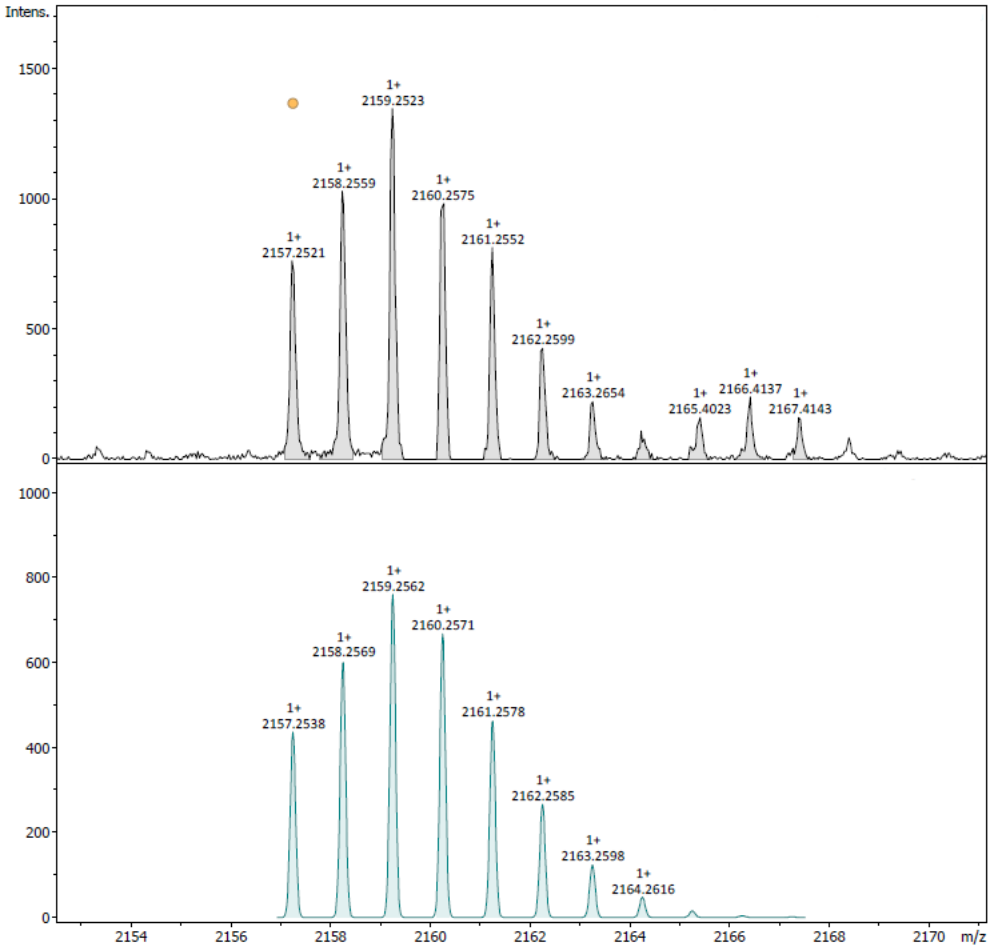
TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz) Before acetylene dicarboxylic acid addition



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CP6e + $CuCl_2$ + bipyridine + acetylene dicarboxylic acid

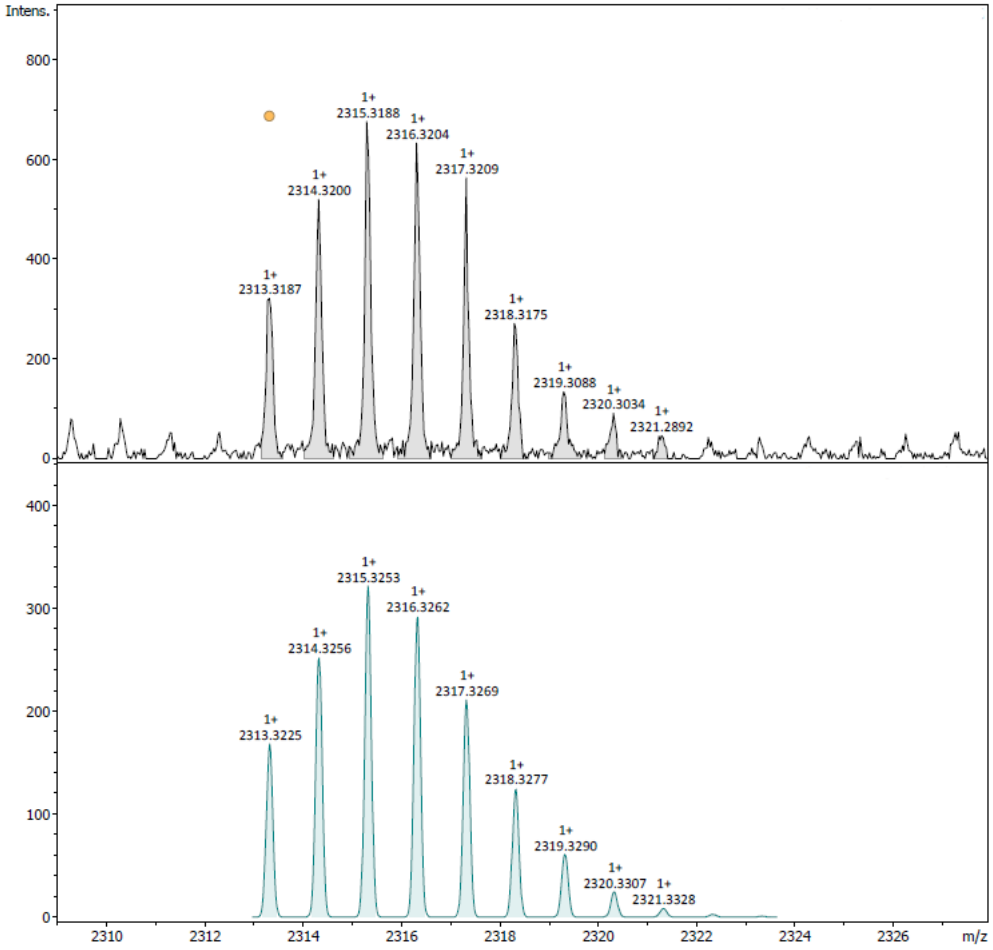
MS-ESI real/predicted for $[D6e{\cdot}CuCl]^+$



Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e¯ Conf	N-Rule
1127.5736	1	C60H87ClCuN9O6	100.00	1127.5758	2.2	2.0	35.7	25.0	even	-
1241.5732	1	C64H89ClCuN9O10	100.00	1241.5711	-2.0	-1.6	35.1	28.0	even	-
2157.2521	1	C120H174ClCuN18O12	100.00	2157.2538	1.7	0.8	52.7	46.0	even	-
2313.3187	1	C130H182ClCuN20O12	100.00	2313.3225	3.8	1.6	92.5	53.0	even	-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

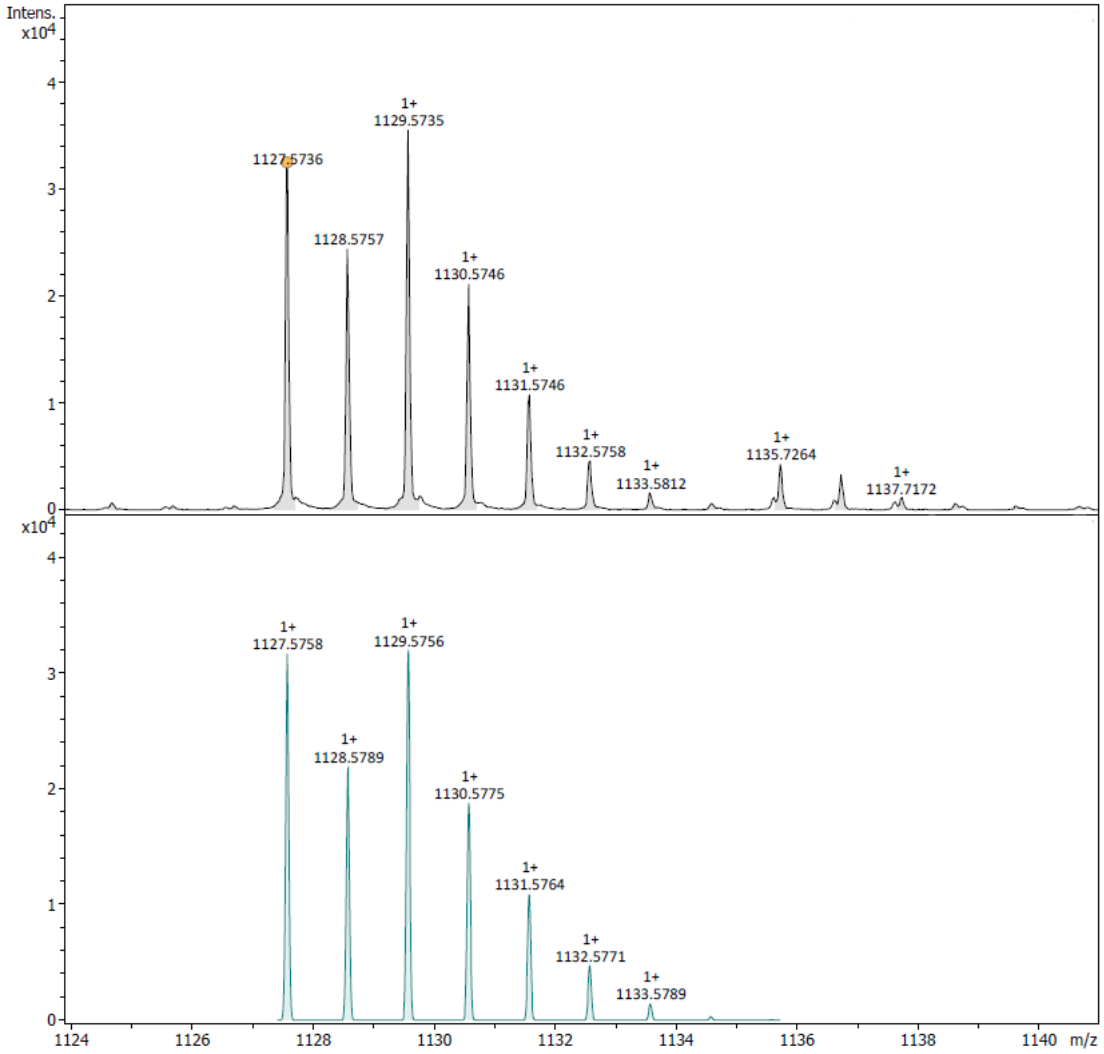
MS-ESI real/predicted for [D6e·CuCl·bipy]⁺



Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
1127.5736	1	C60H87ClCuN9O6	100.00	1127.5758	2.2	2.0	35.7	25.0	even	-
1241.5732	1	C64H89ClCuN9O10	100.00	1241.5711	-2.0	-1.6	35.1	28.0	even	-
2157.2521	1	C120H174ClCuN18O12	100.00	2157.2538	1.7	0.8	52.7	46.0	even	-
2313.3187	1	C130H182ClCuN20O12	100.00	2313.3225	3.8	1.6	92.5	53.0	even	-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

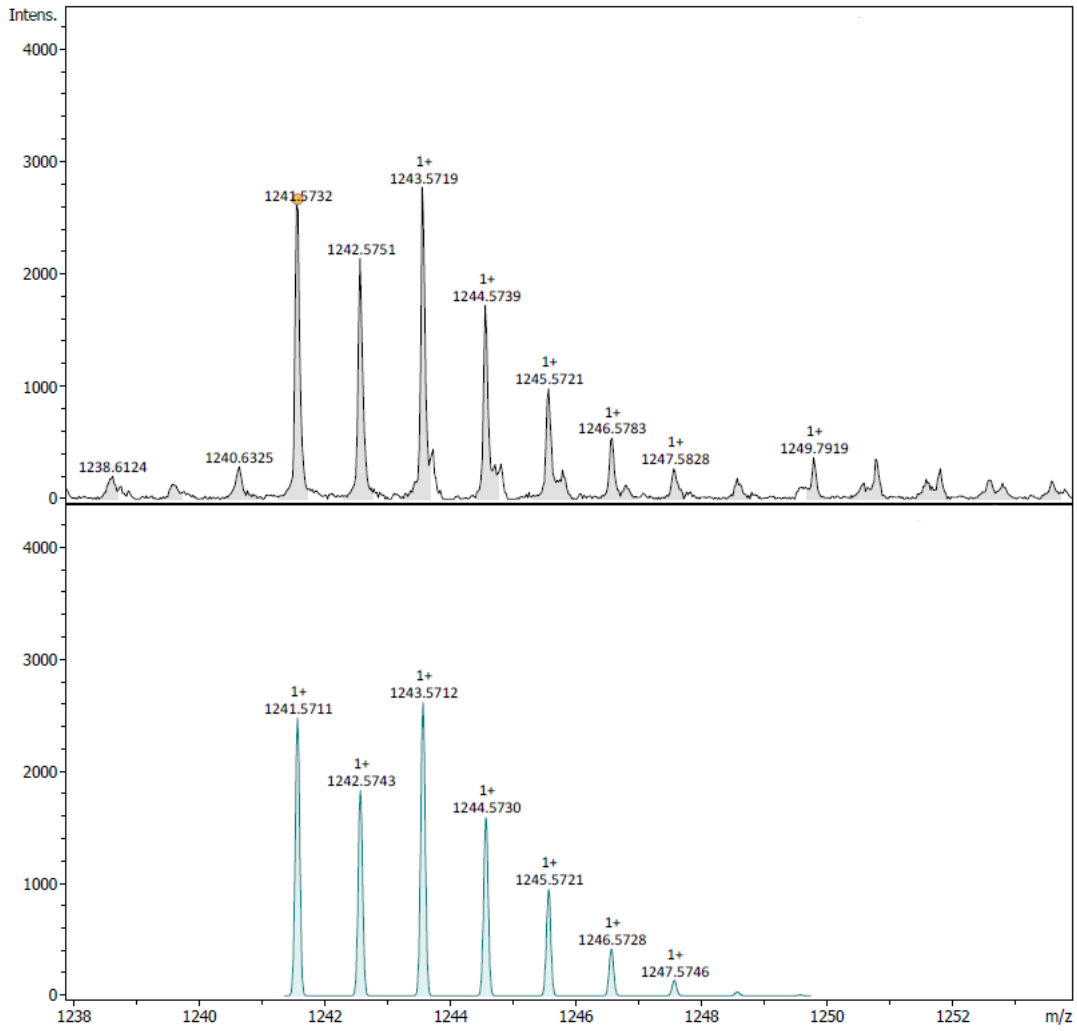
MS-ESI real/predicted for $[CP6e{\cdot}CuCl]^+$



Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
1127.5736	1	C60H87ClCuN9O6	100.00	1127.5758	2.2	2.0	35.7	25.0	even	-

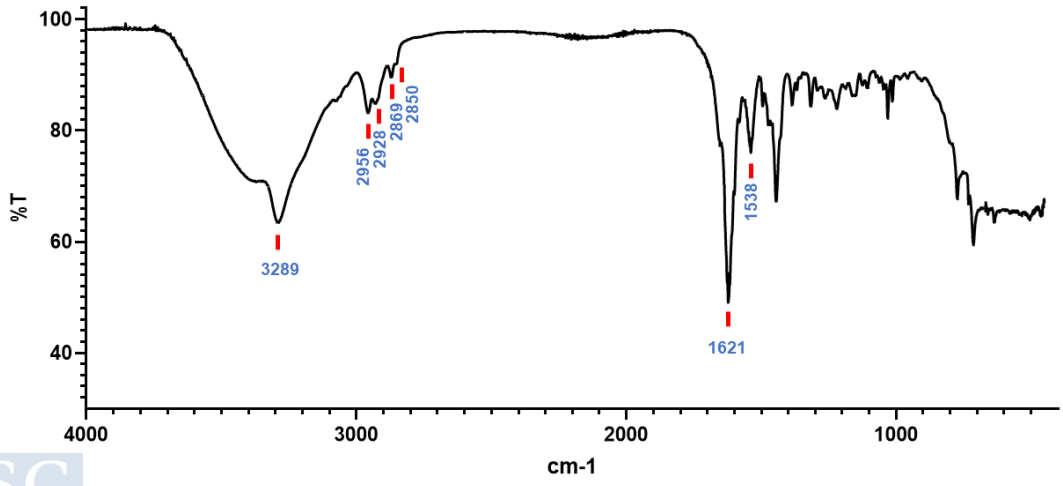
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MS-ESI real/predicted for [CP6e·CuCl·ADC]⁺

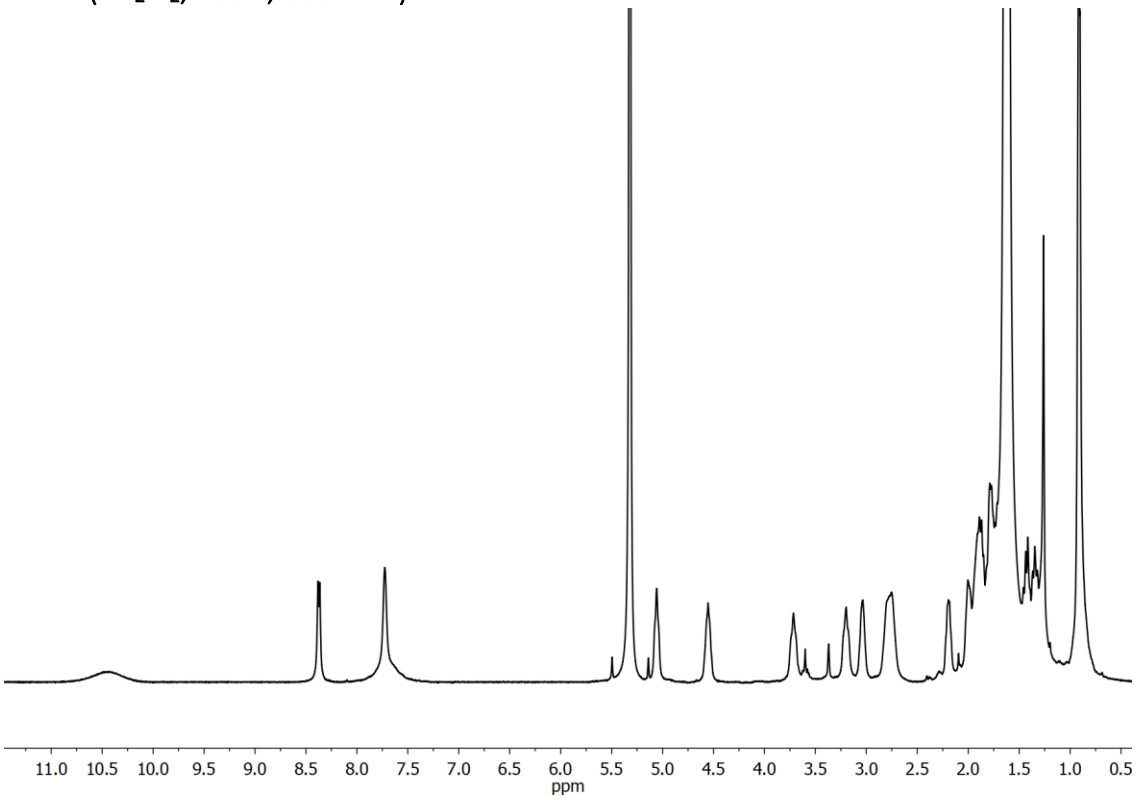


Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
1127.5736	1	C60H87ClCuN9O6	100.00	1127.5758	2.2	2.0	35.7	25.0	even	-
1241.5732	1	C64H89ClCuN9O10	100.00	1241.5711	-2.0	-1.6	35.1	28.0	even	-

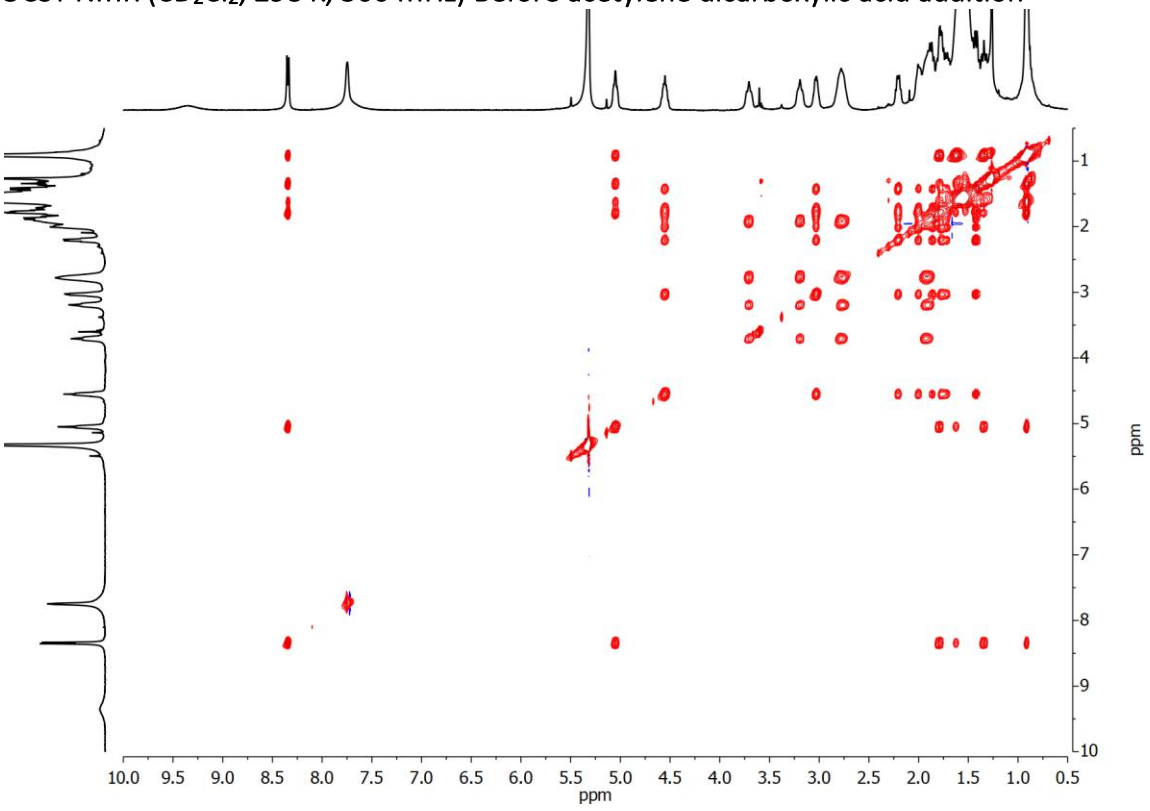
IR



^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



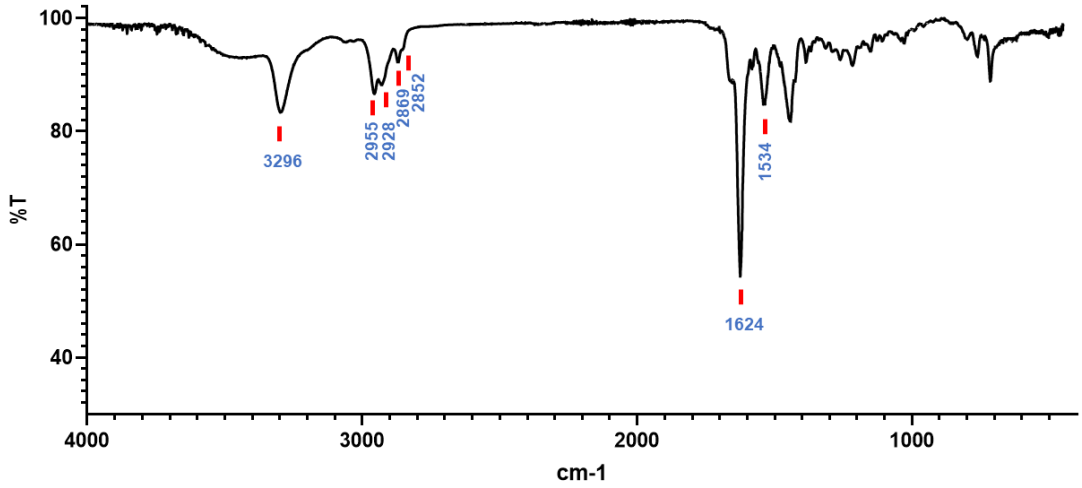
TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz) Before acetylene dicarboxylic acid addition



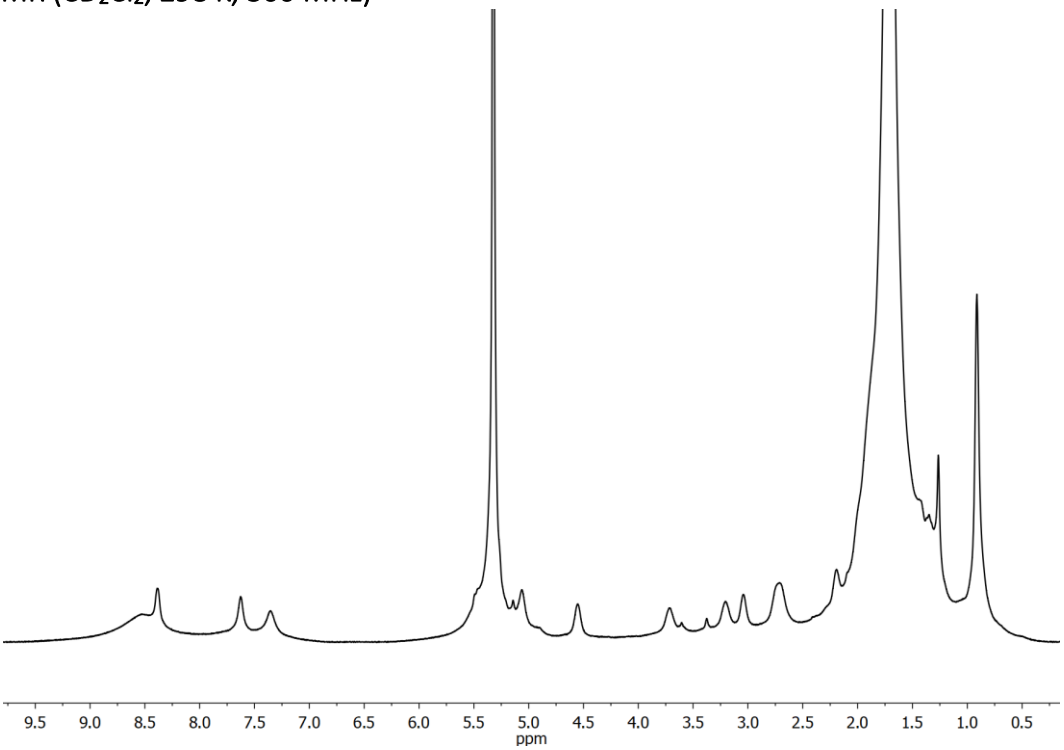
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CP6e + $MnCl_2$ + bipyridine + acetylene dicarboxylic acid

IR

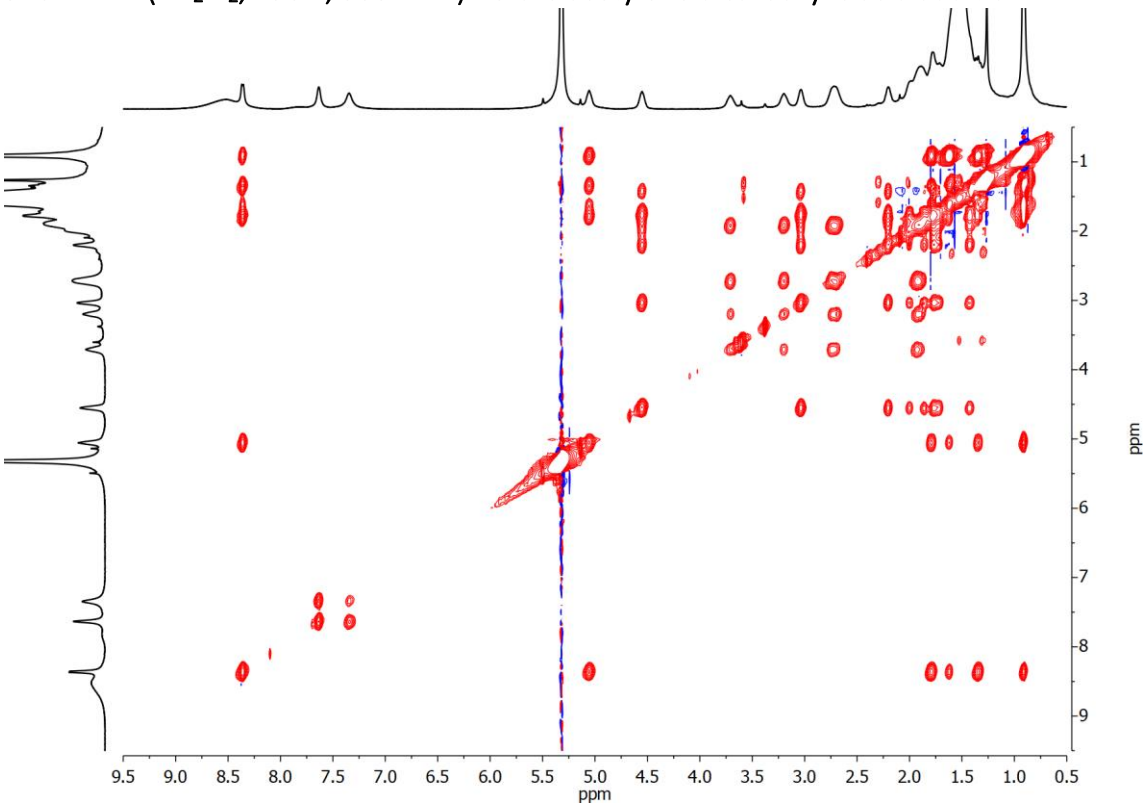


^1H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

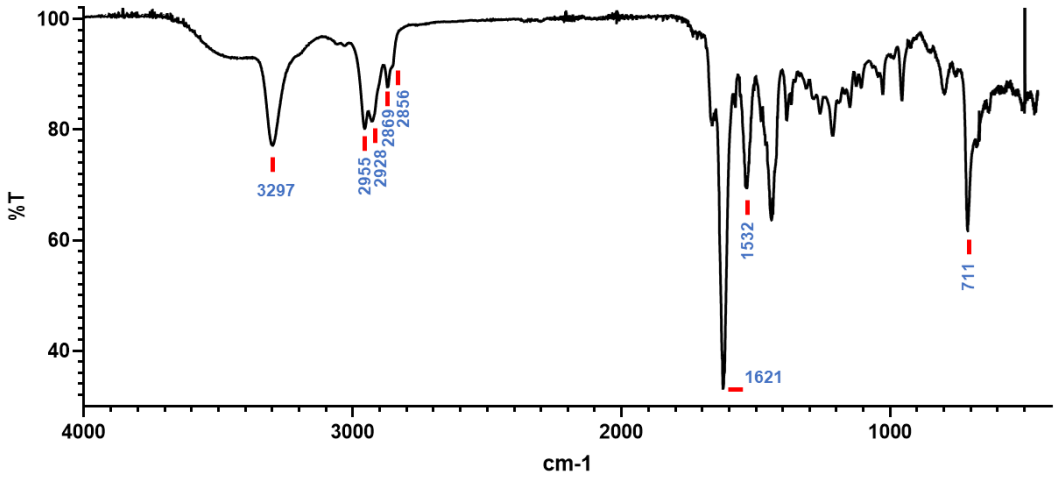
TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz) Before acetylene dicarboxylic acid addition



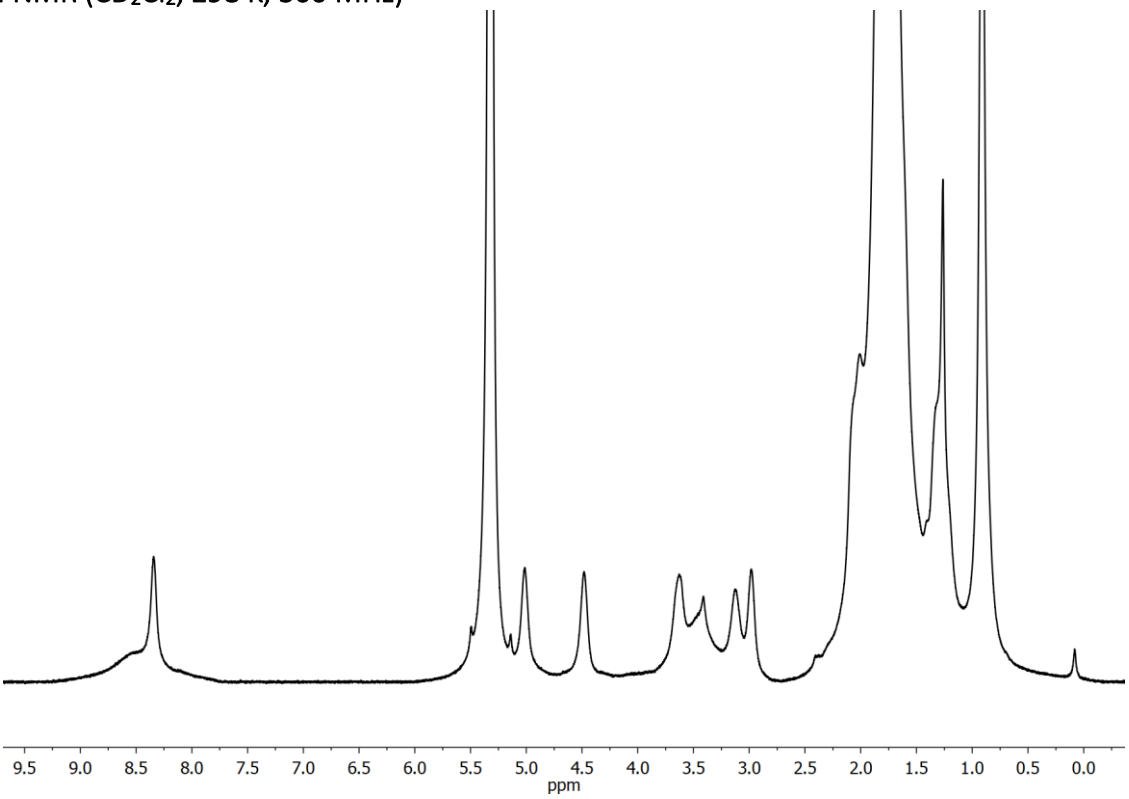
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CP6e + $FeCl_2$ + bipyridine + acetylene dicarboxylic acid

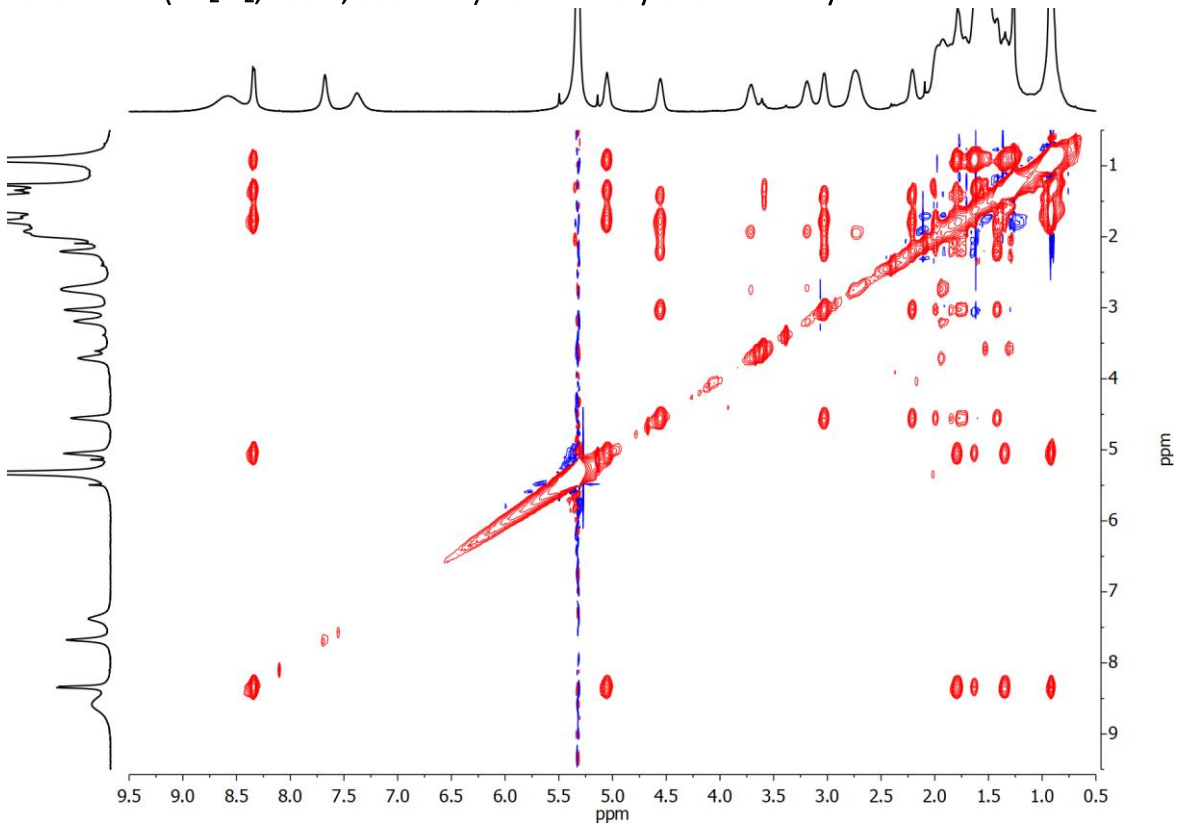
IR



^1H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

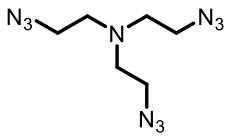


TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz) Before acetylene dicarboxylic acid addition



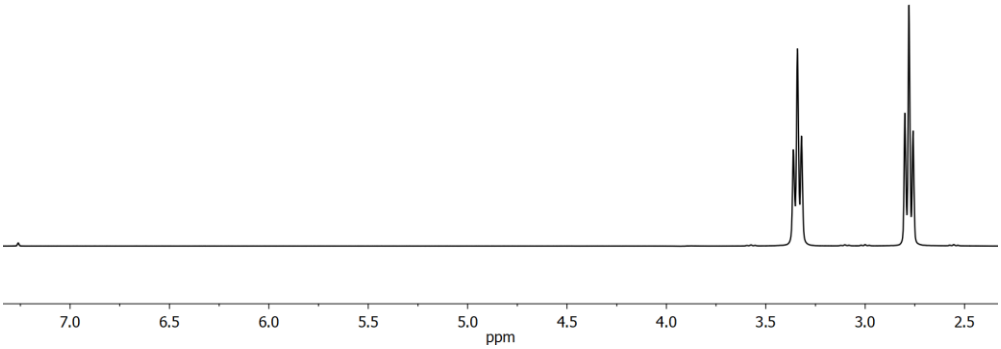
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

11.1.3 Supramolecular capsules for anion recognition

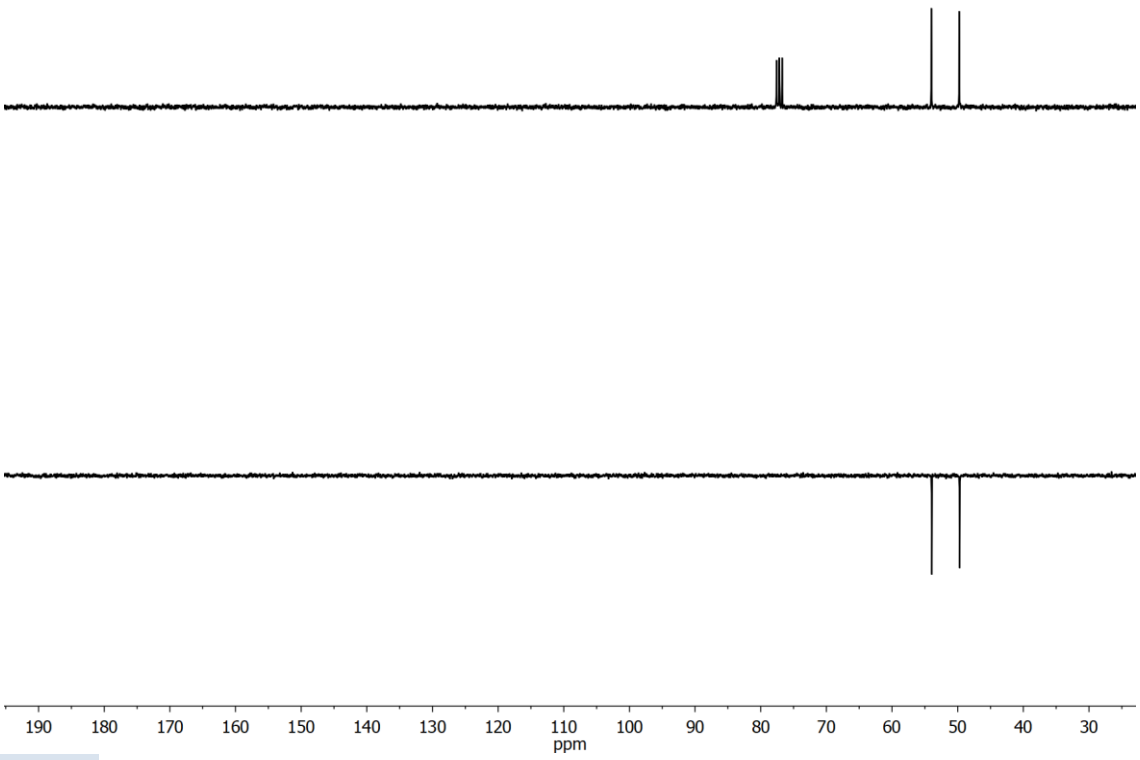


pre-cap A

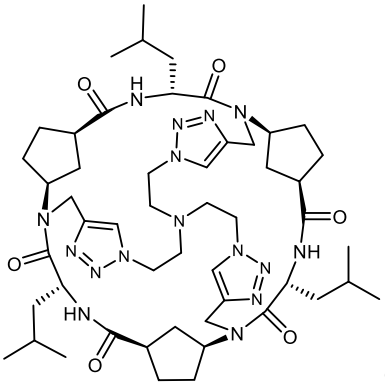
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)



^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 75 MHz)

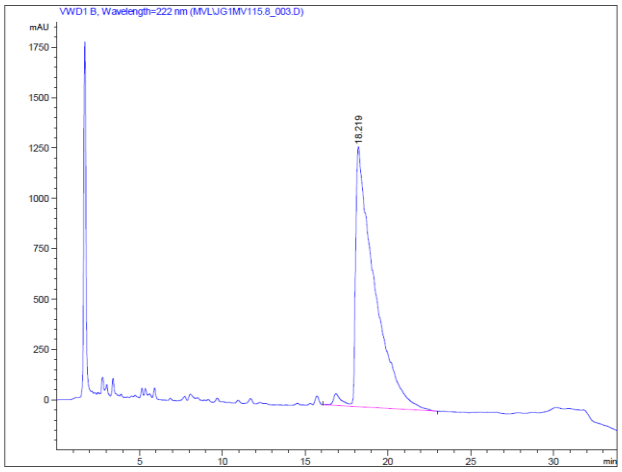


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

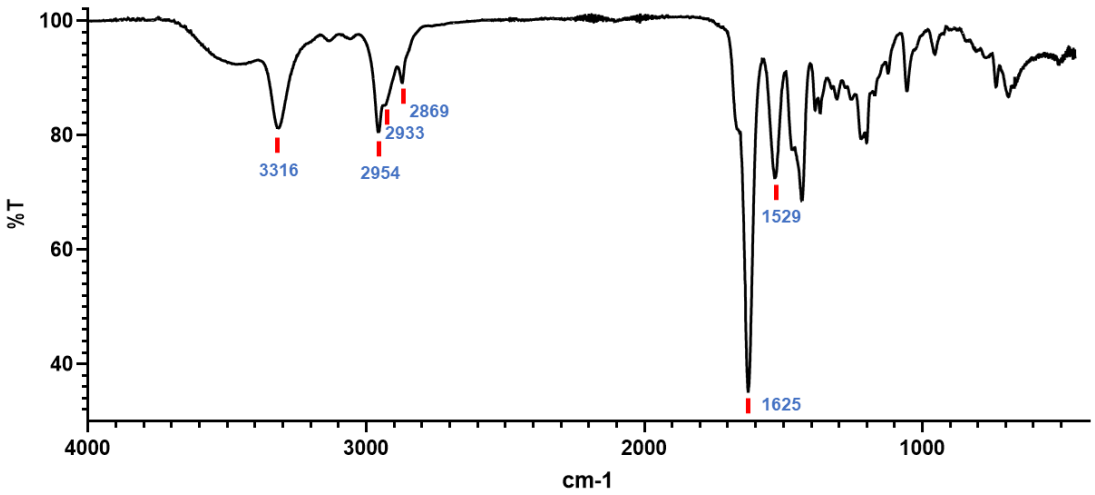


CP8/D8

HPLC-CROMATOGRAM

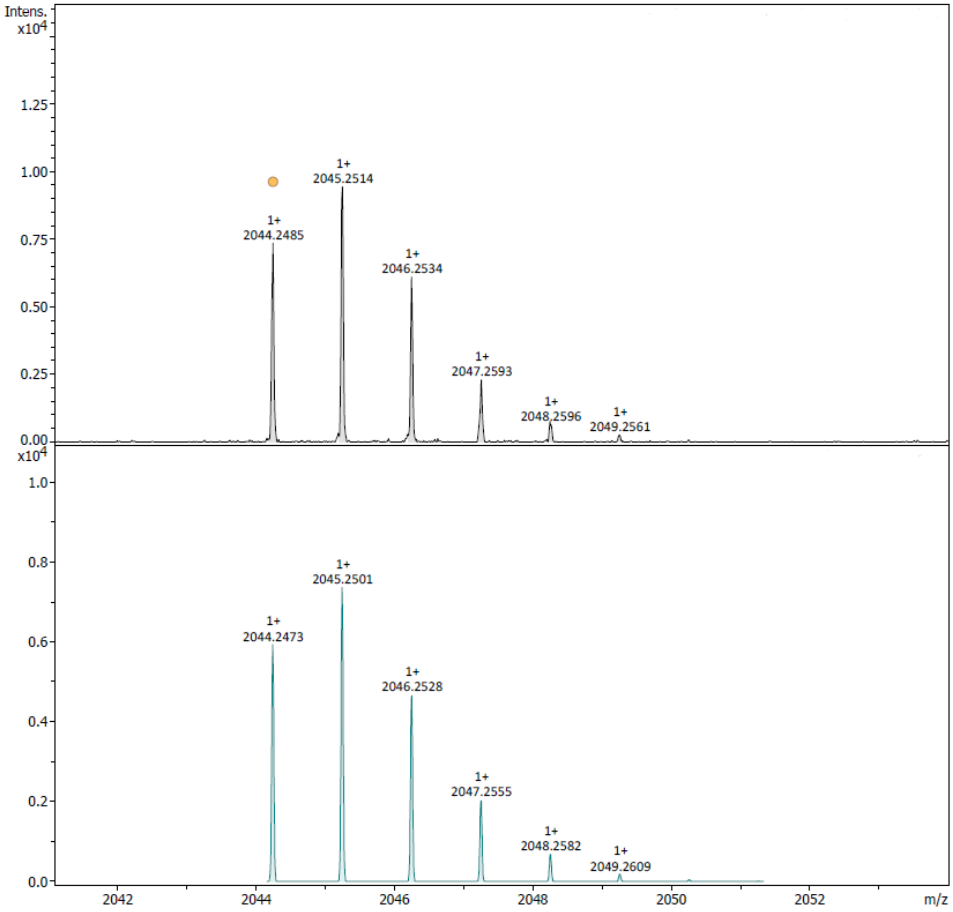


FTIR



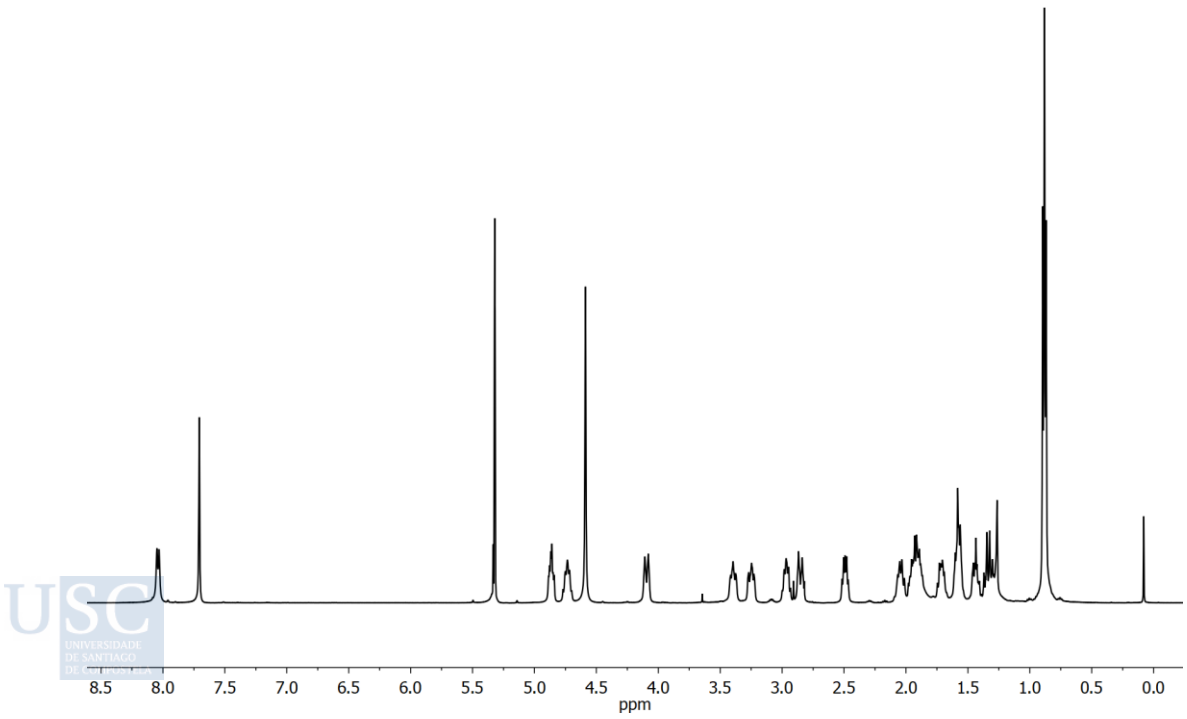
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MS-ESI (real/prediction)



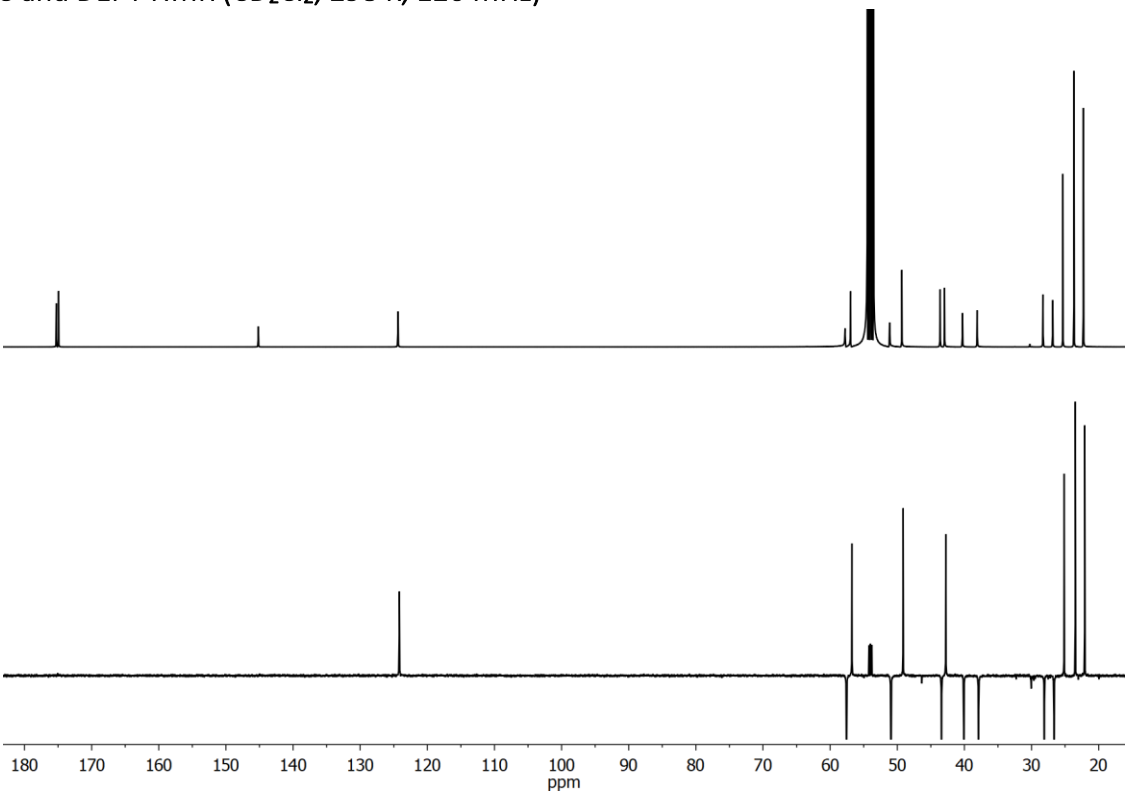
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
1033.6189	1	C51H78N16NaO6	100.00	1033.6182	-0.7	-0.6	21.6	21.0	even	ok

^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

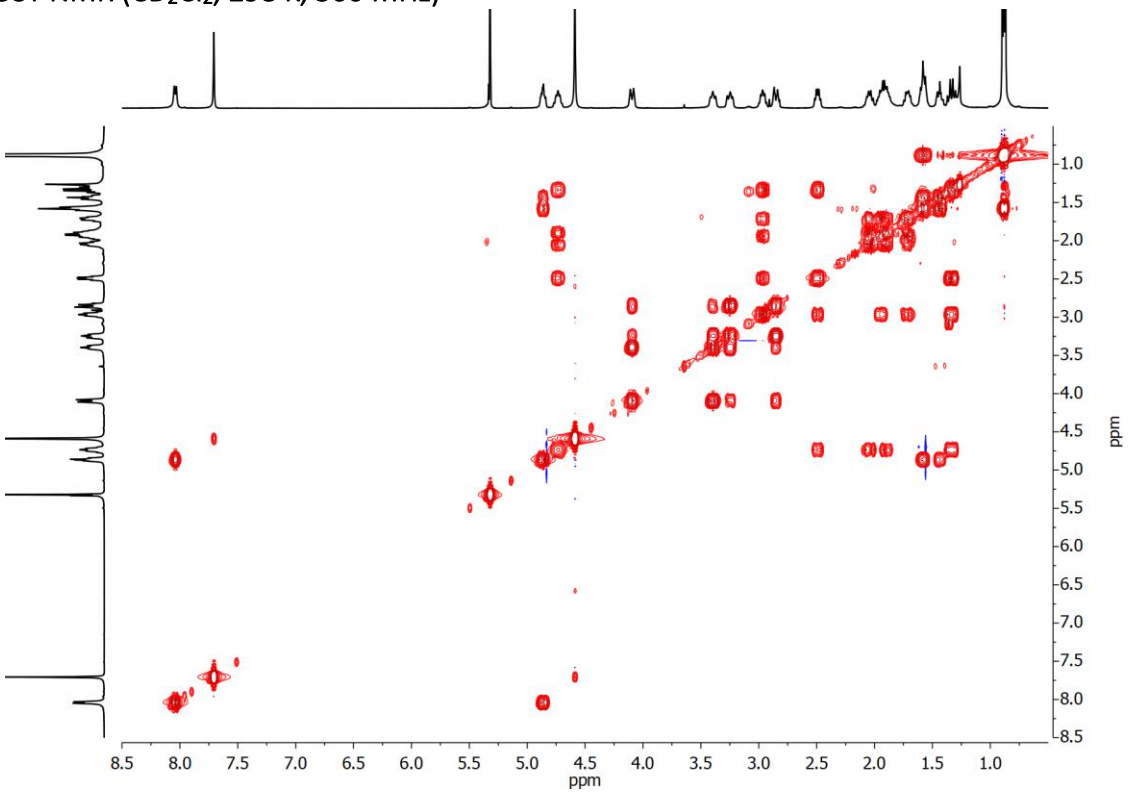


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{13}C and DEPT NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 126 MHz)

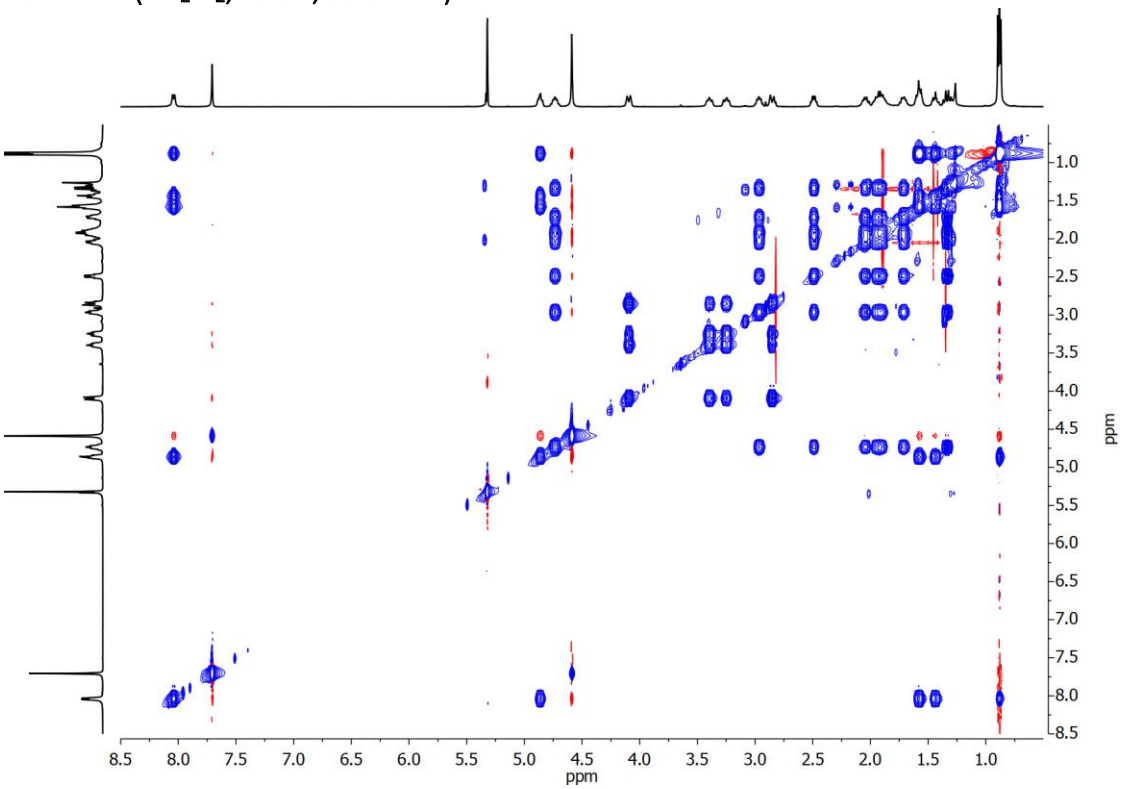


COSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

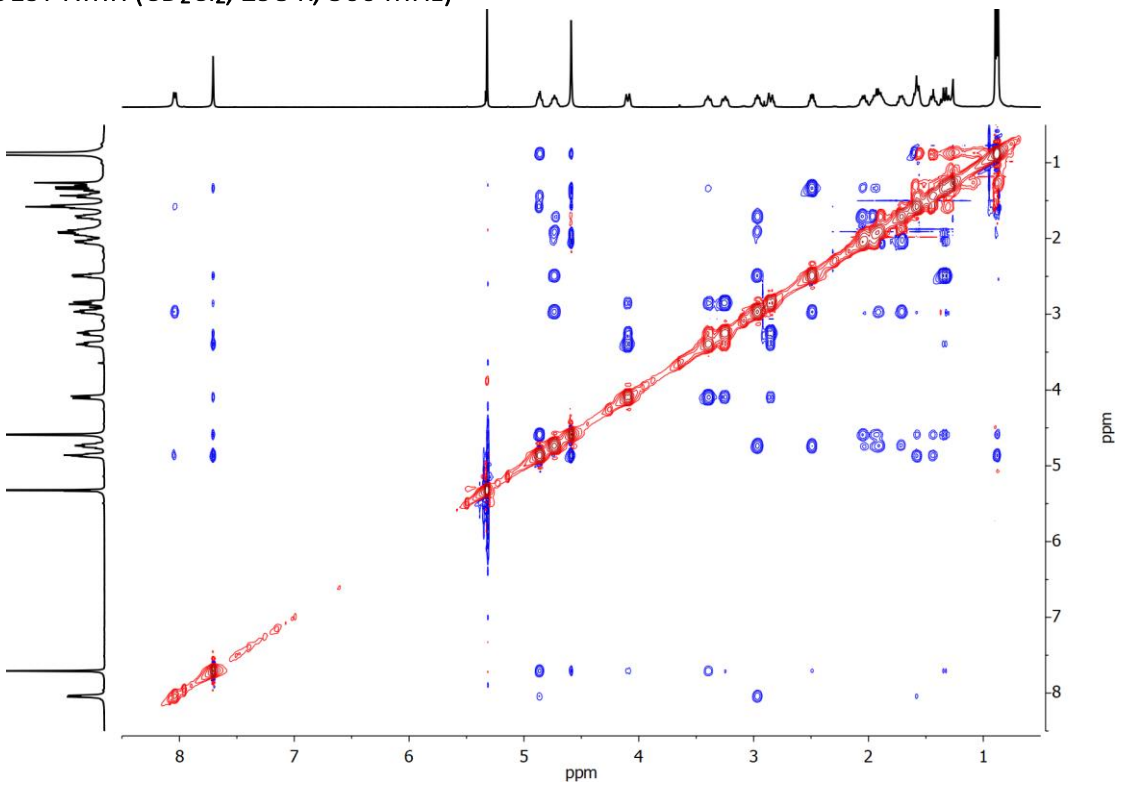


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

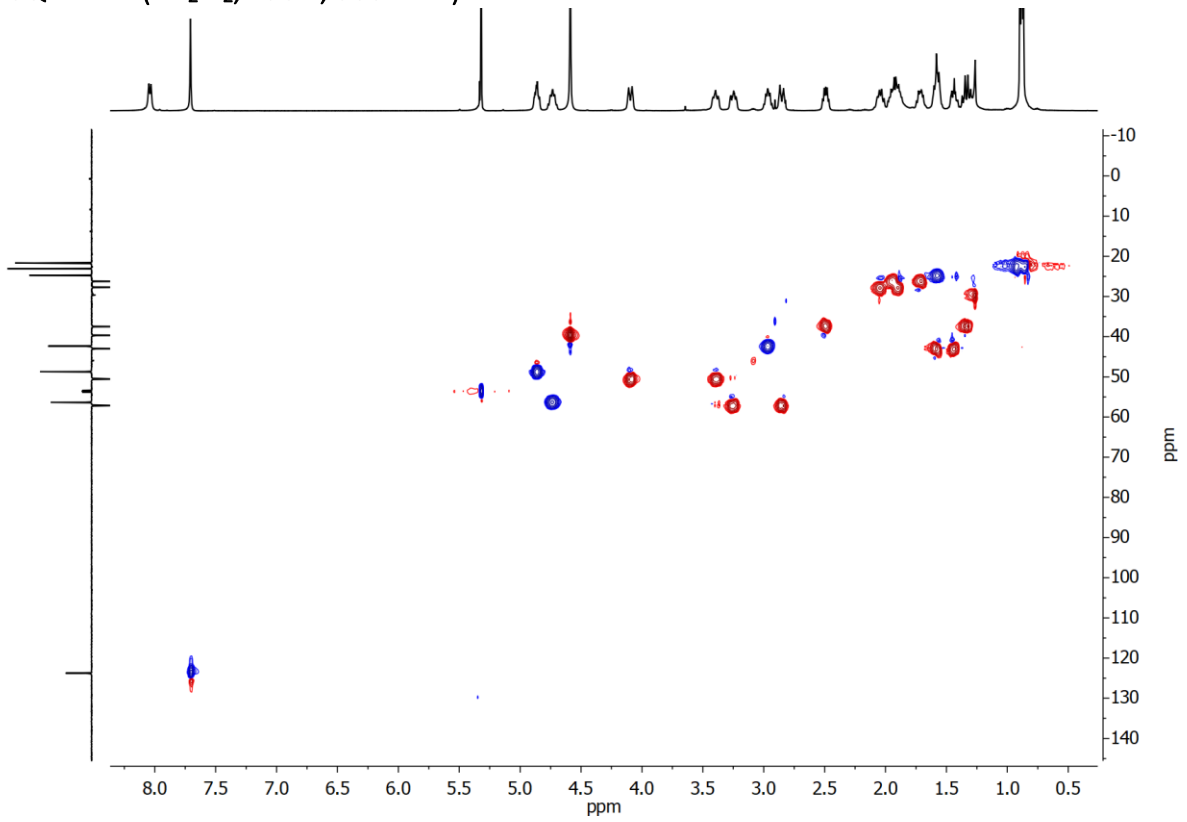


ROESY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

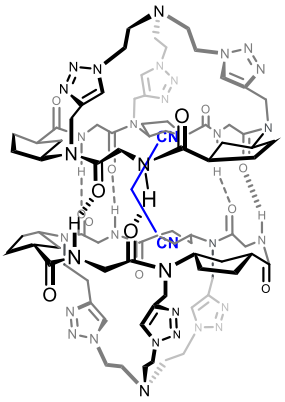


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HSQC NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

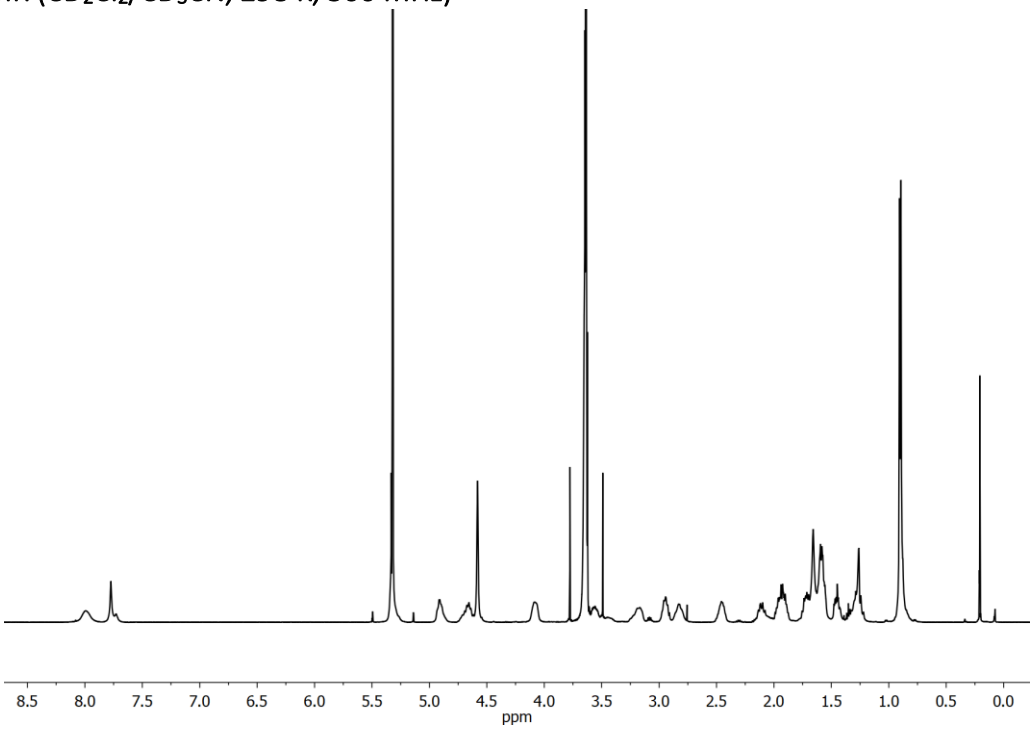


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



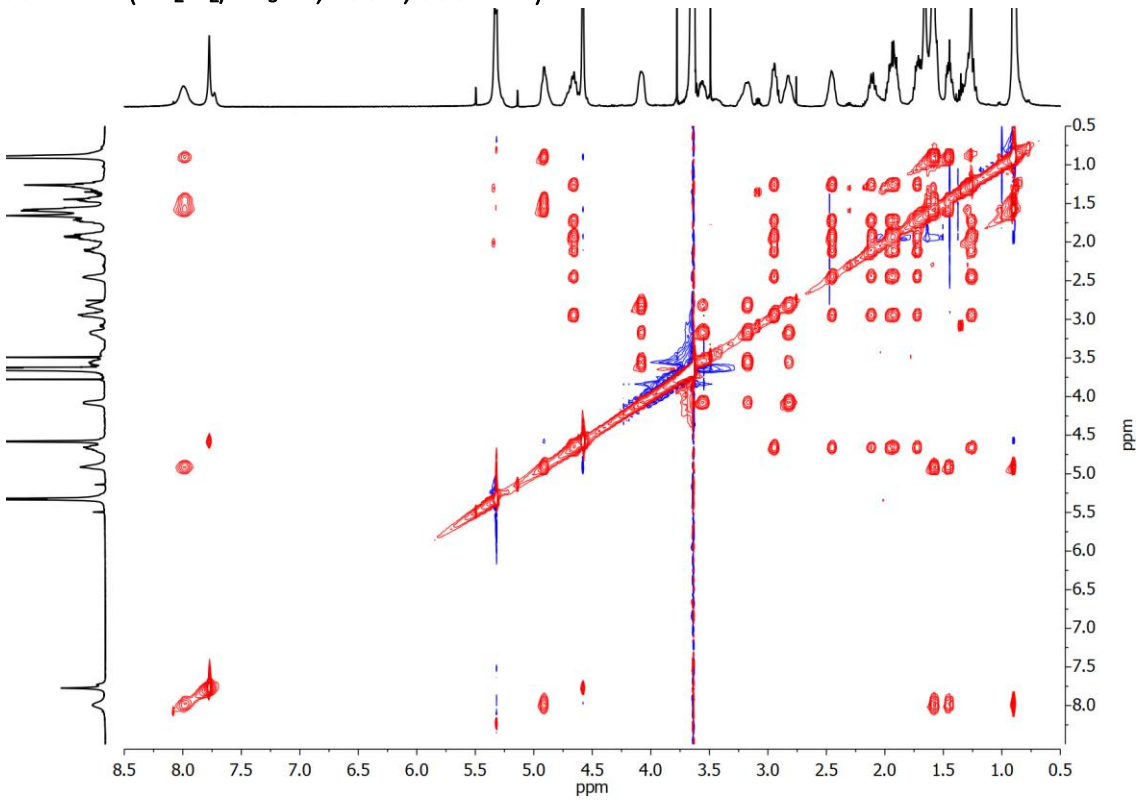
MN⊂D8

^{1}H NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

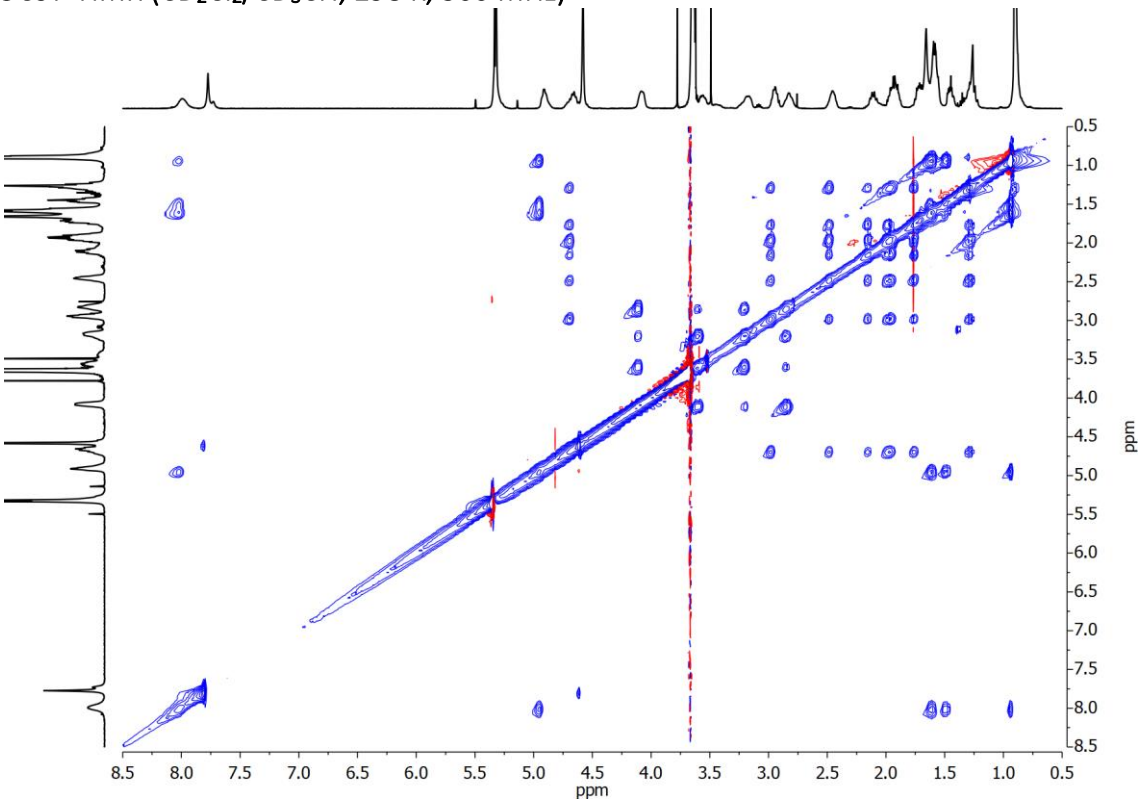


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

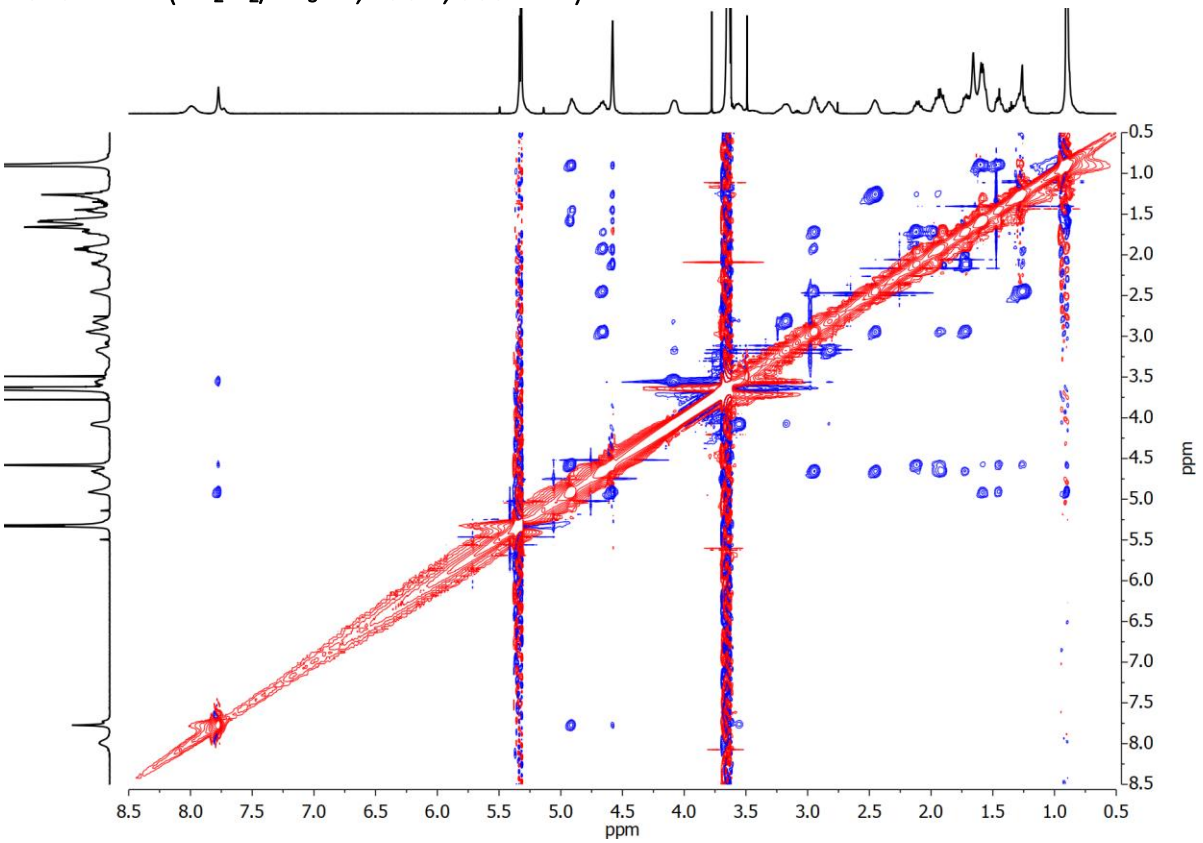


TOCSY NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

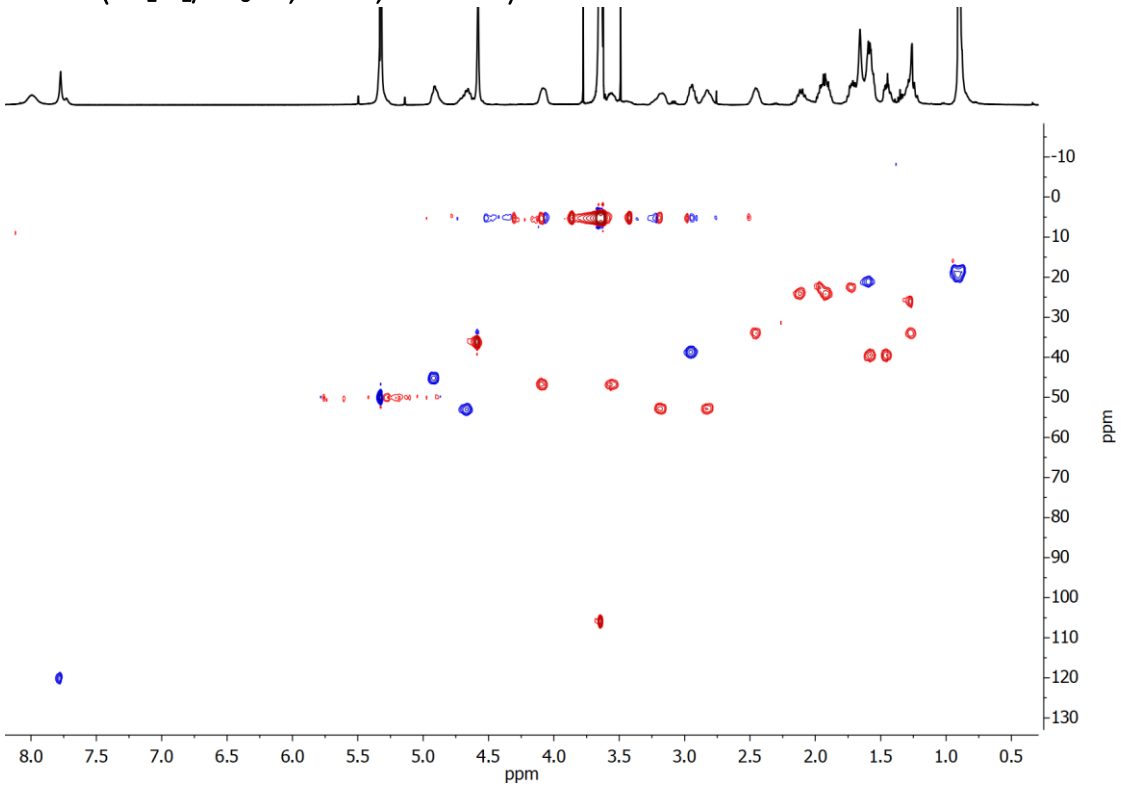


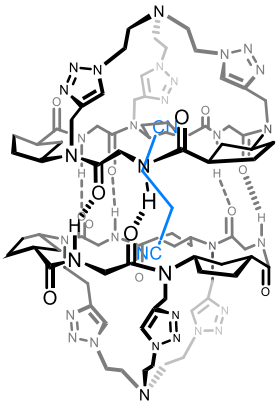
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ROESY NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)



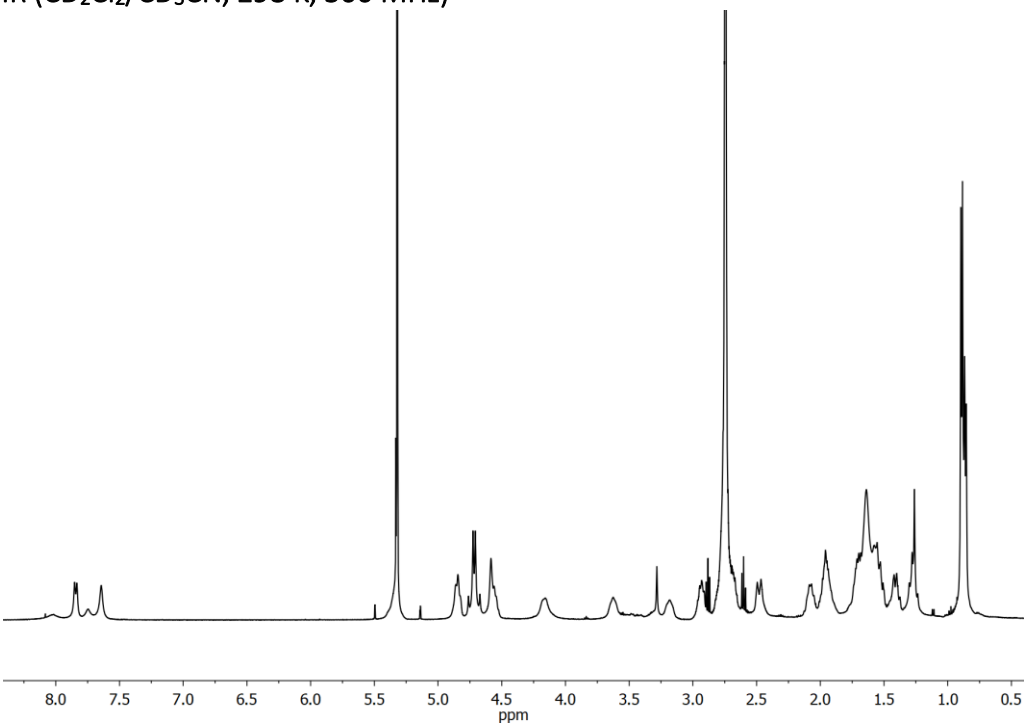
HSQC NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)



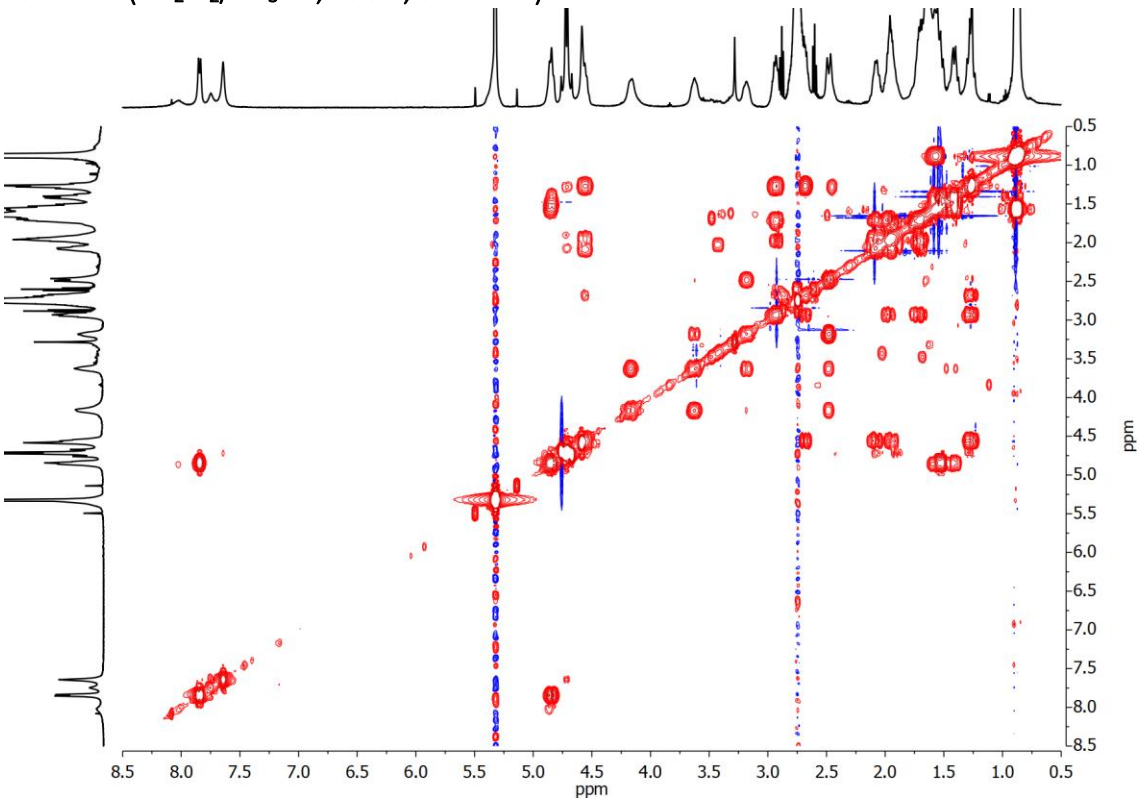


SN⊂D8

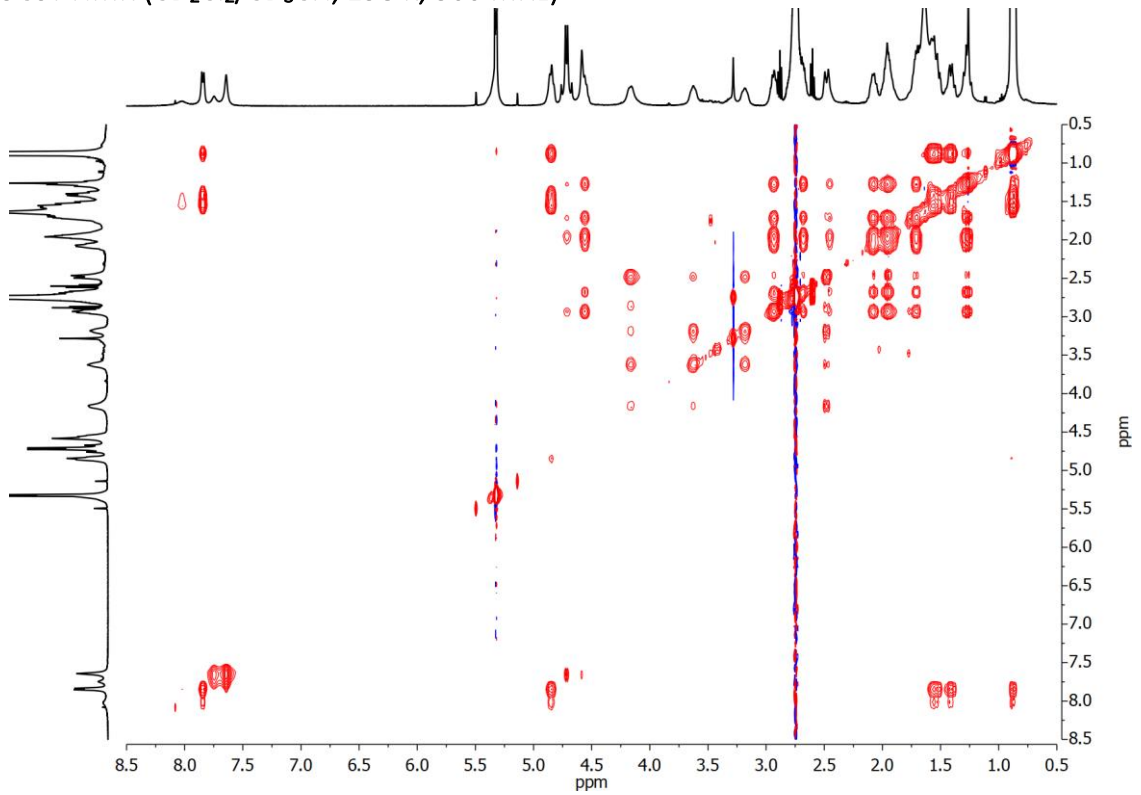
^{1}H NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)



COSY NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

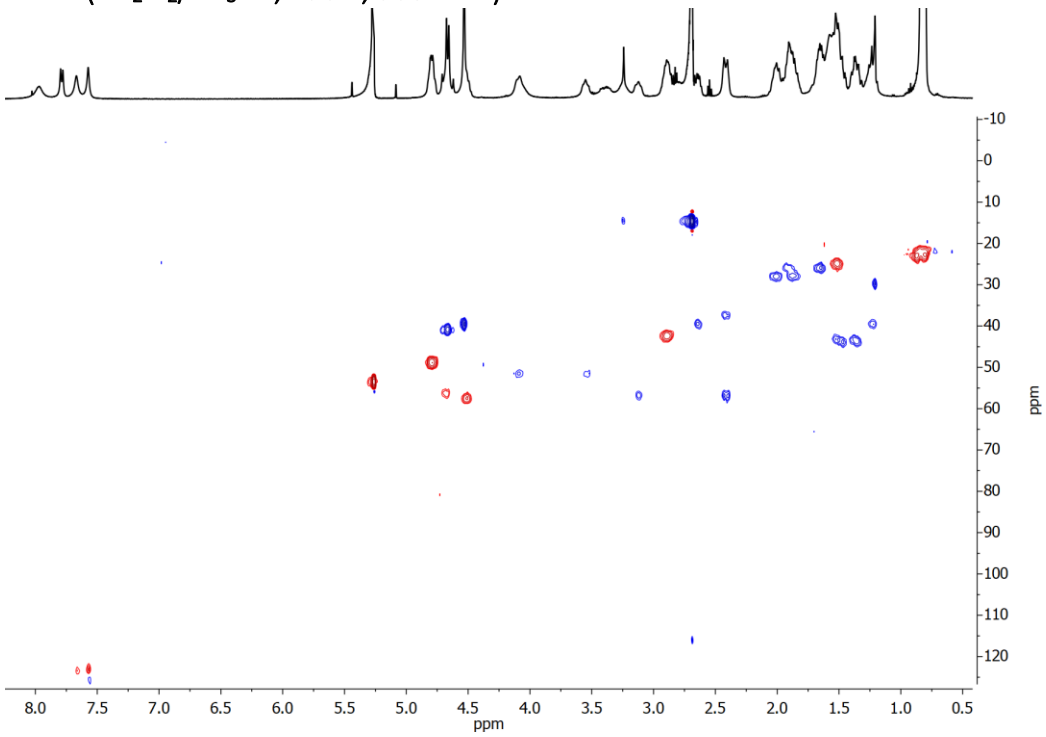


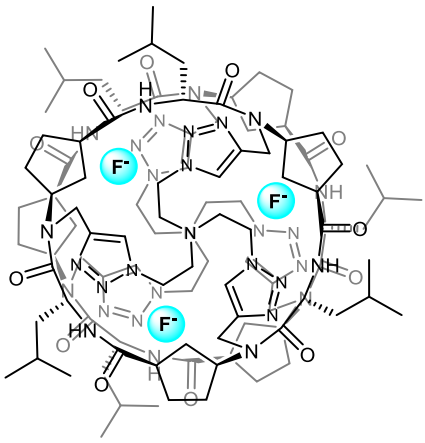
TOCSY NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

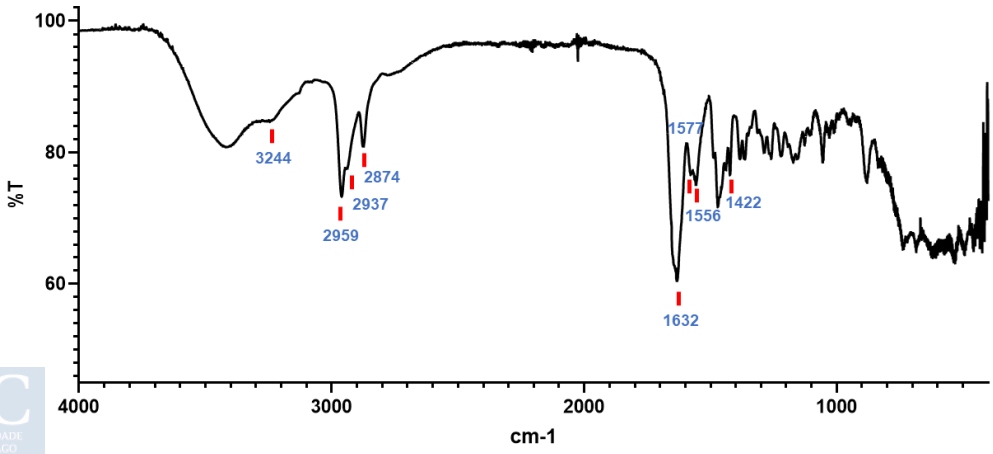
HSQC NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)





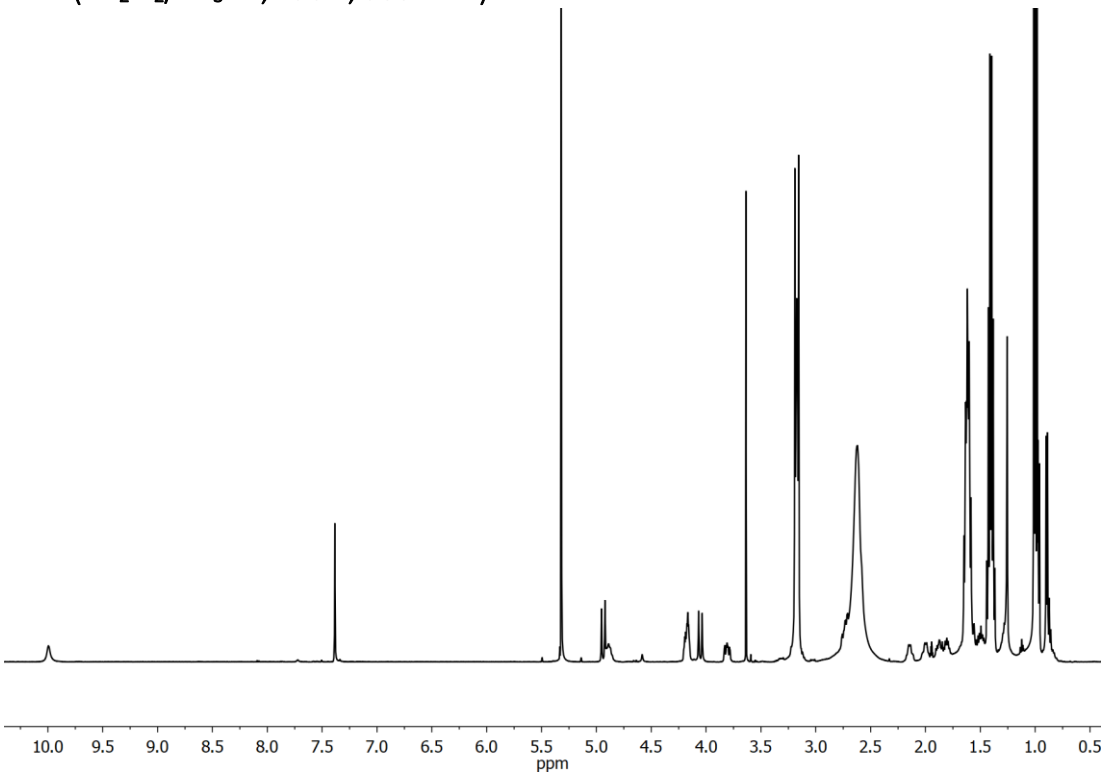
D8-fluoride

FTIR

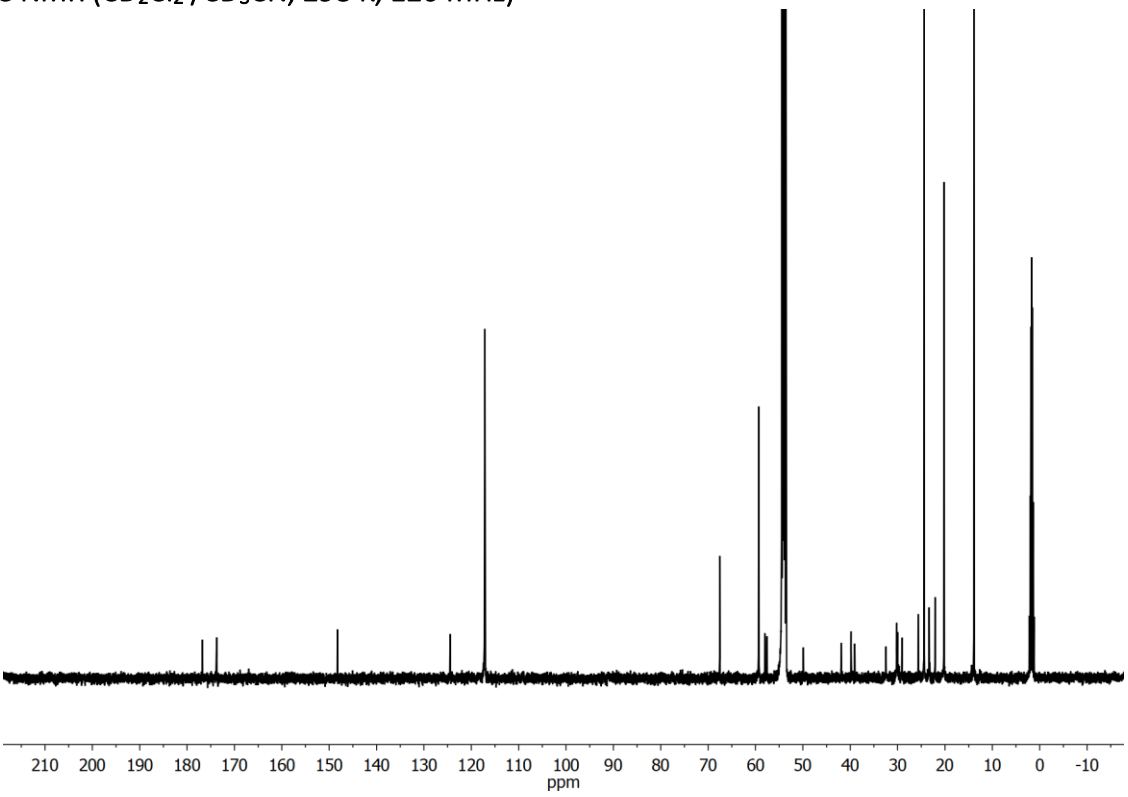


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{1}H NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

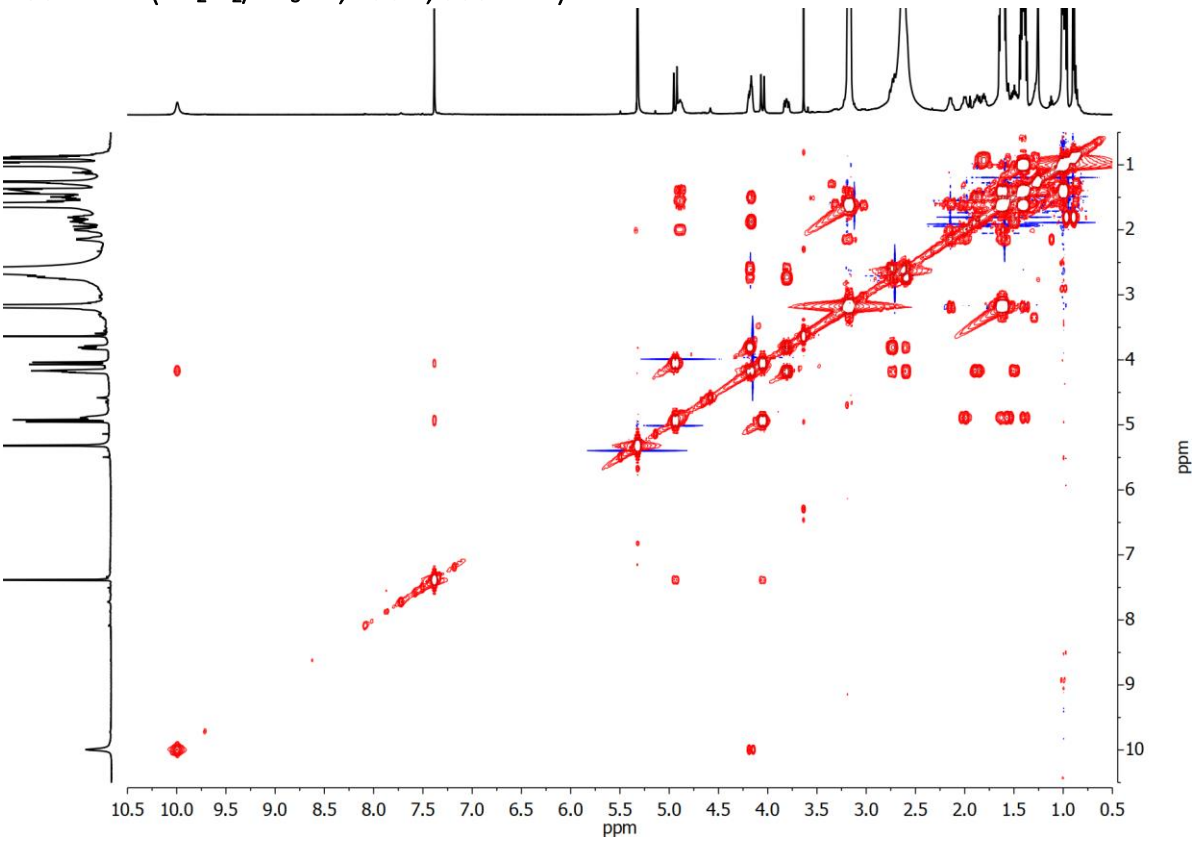


^{13}C NMR (CD_2Cl_2 /CD_3CN, 298 K, 126 MHz)

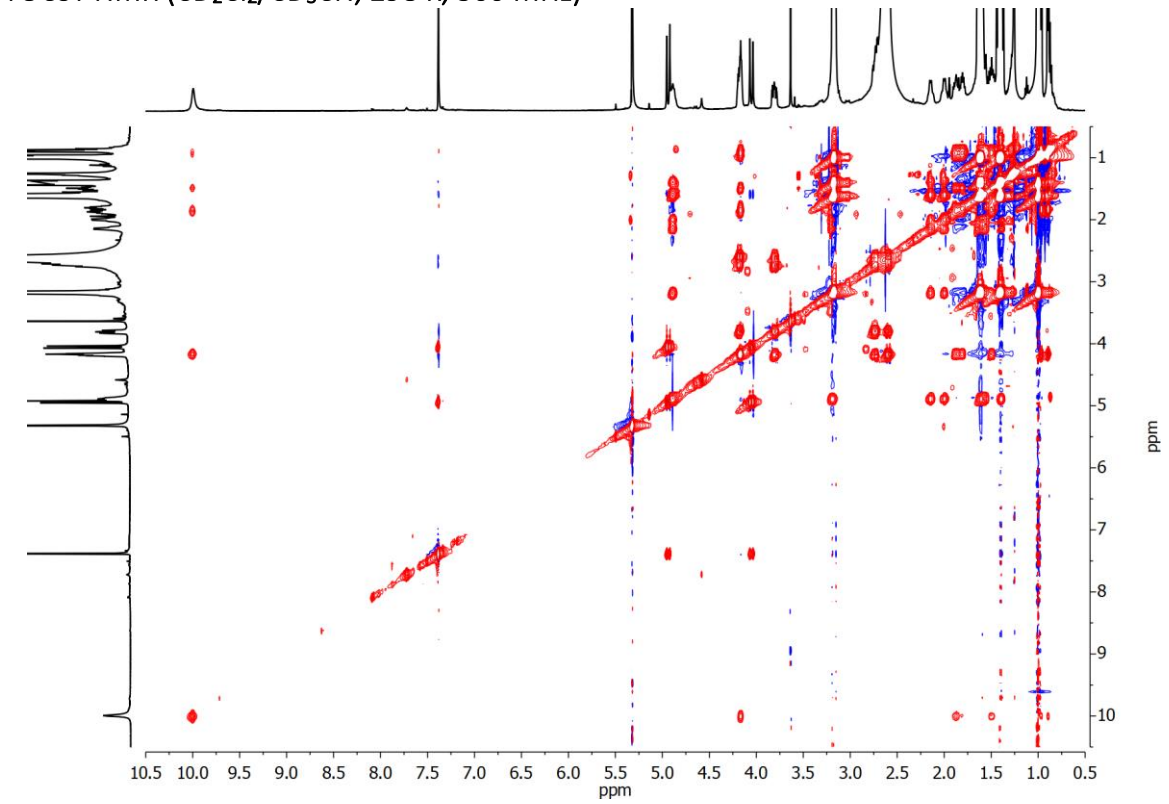


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

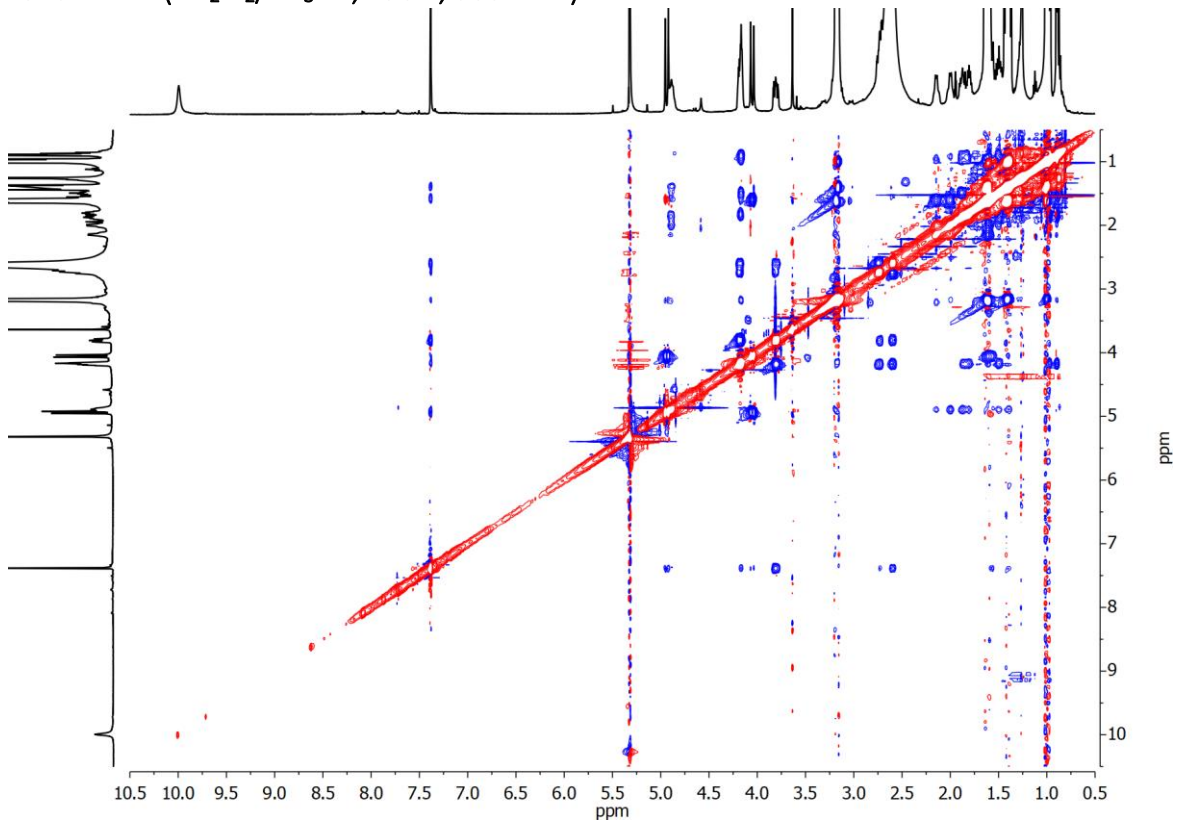


TOCSY NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

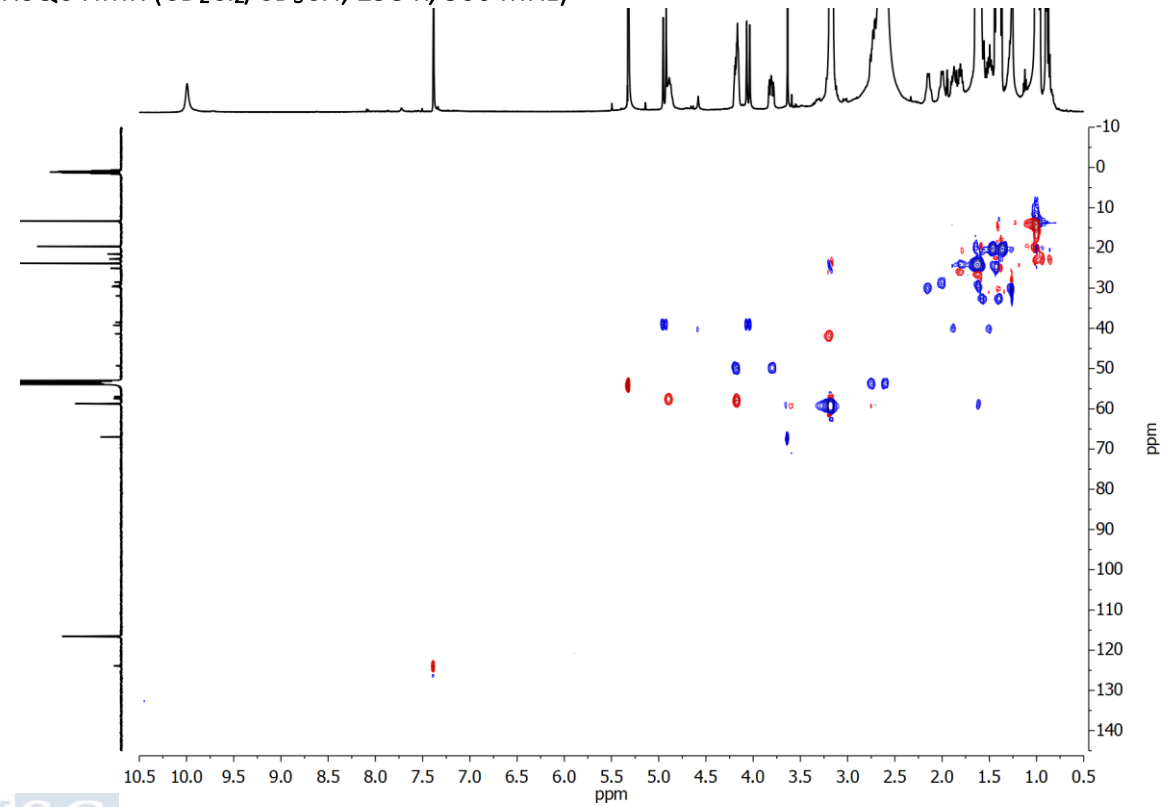


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

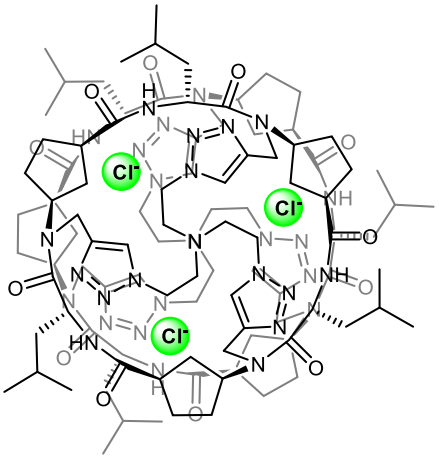
ROESY NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)



HSQC NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

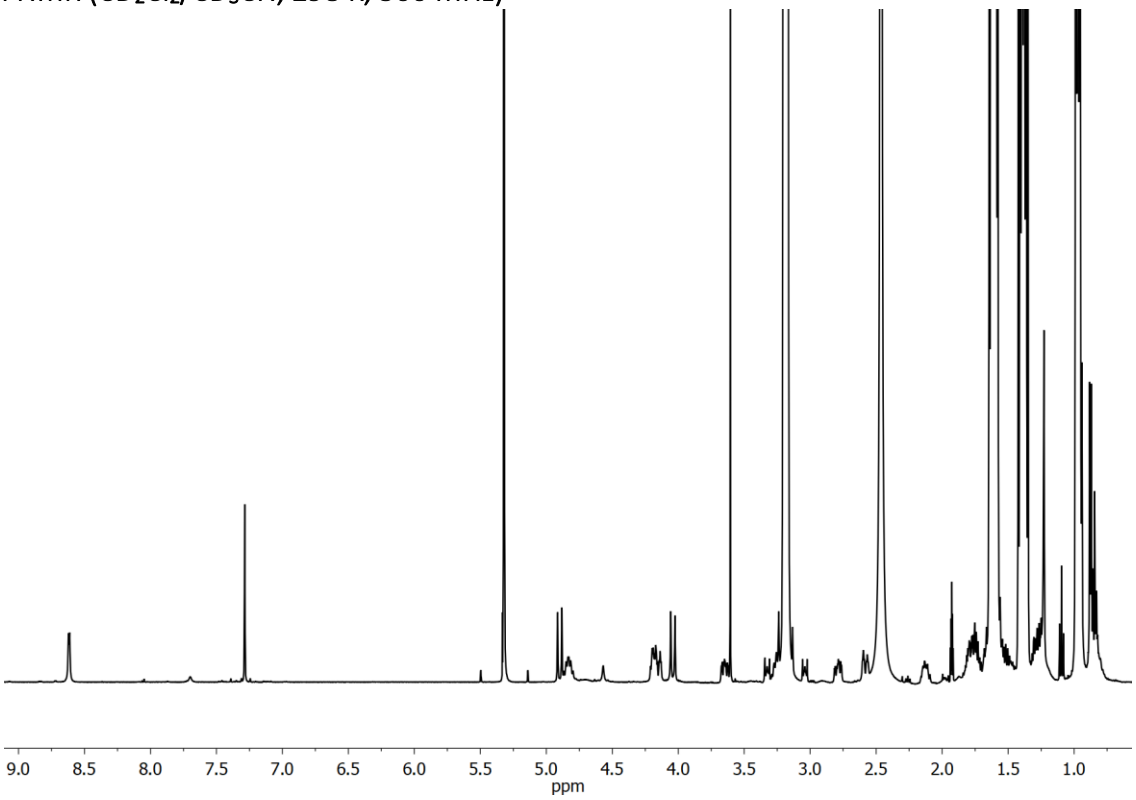


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



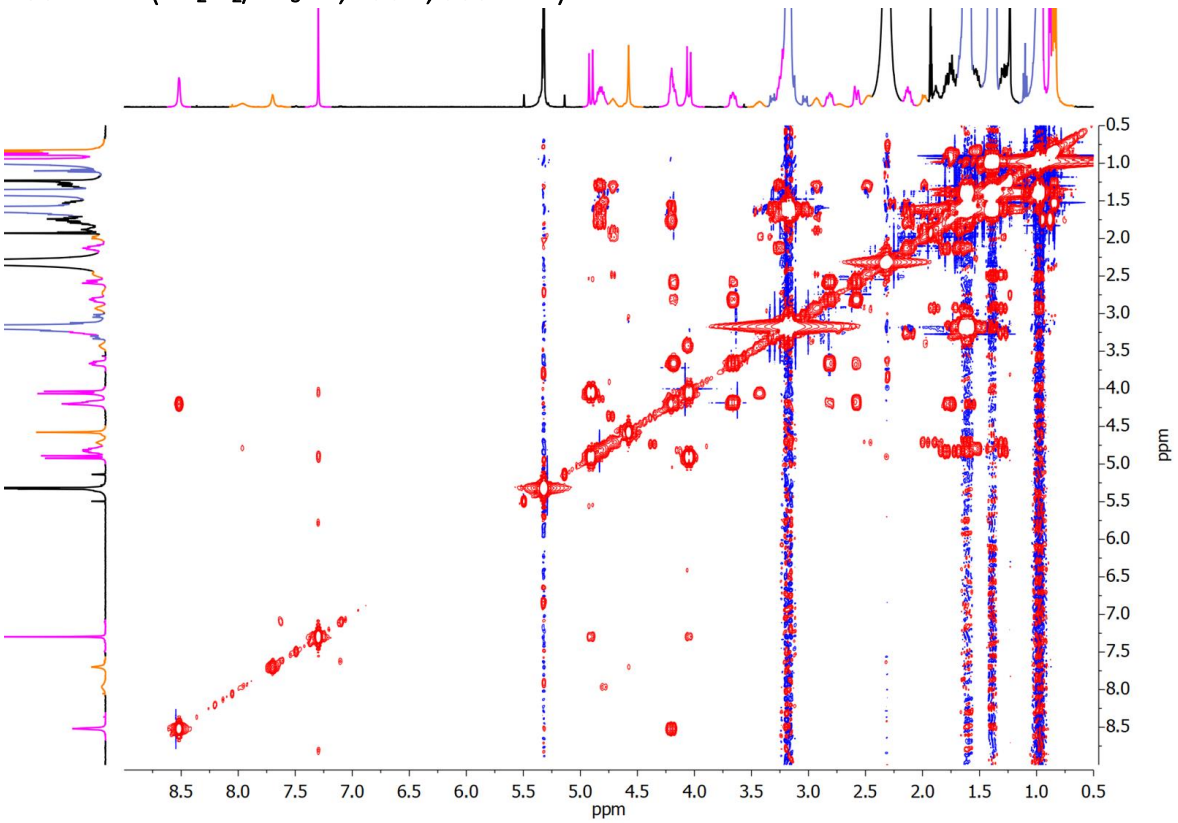
D8-chloride

^{1}H NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

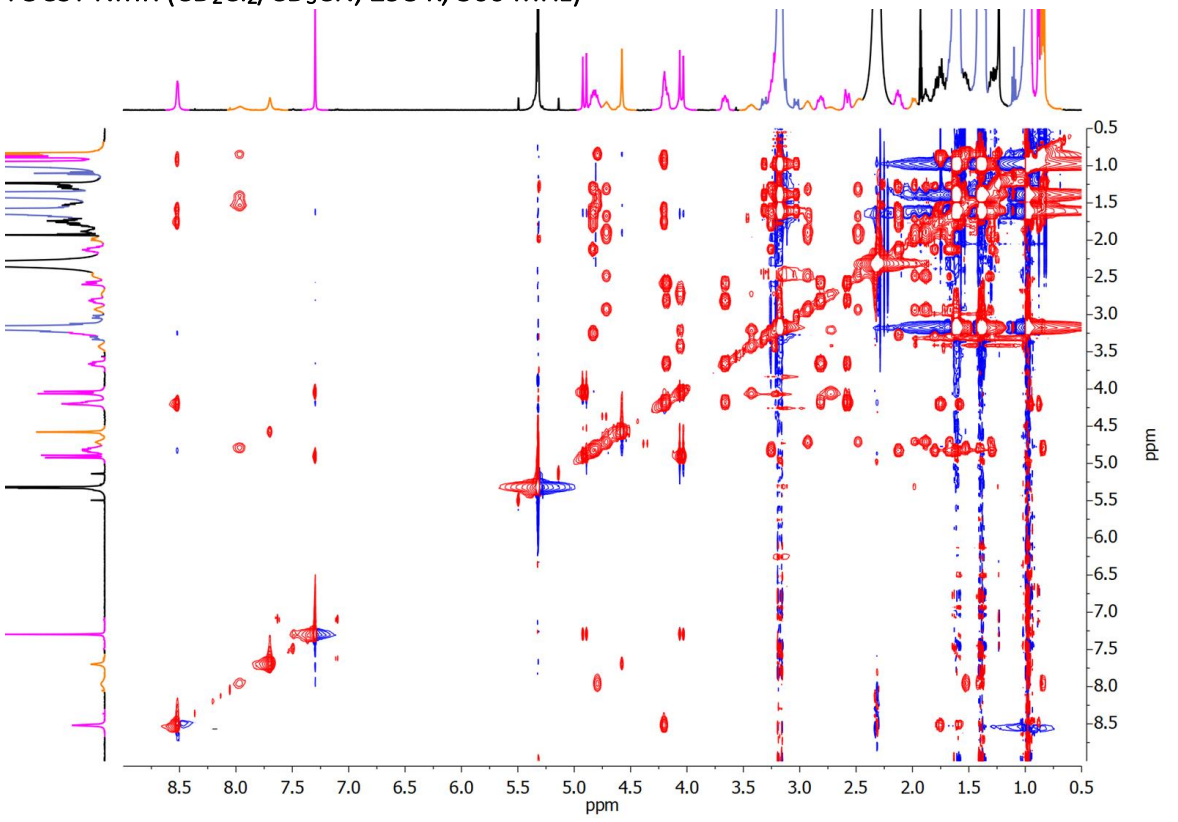


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

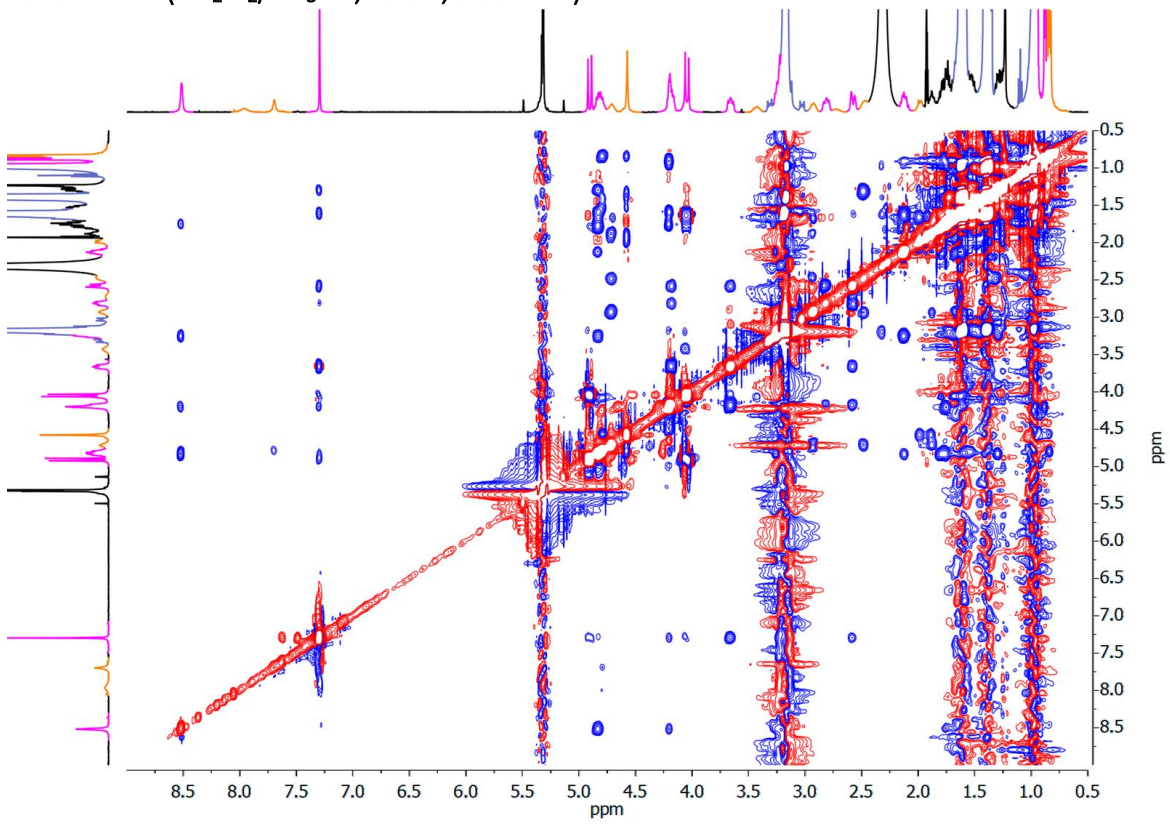


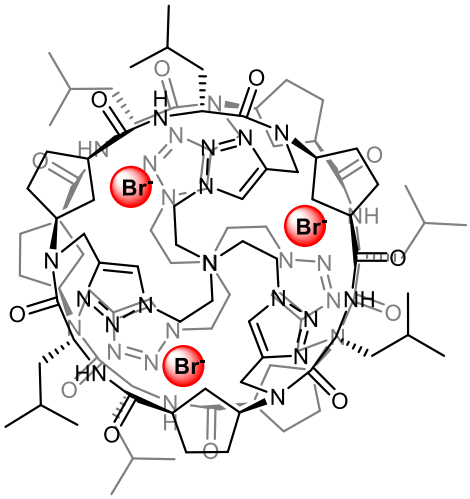
TOCSY NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

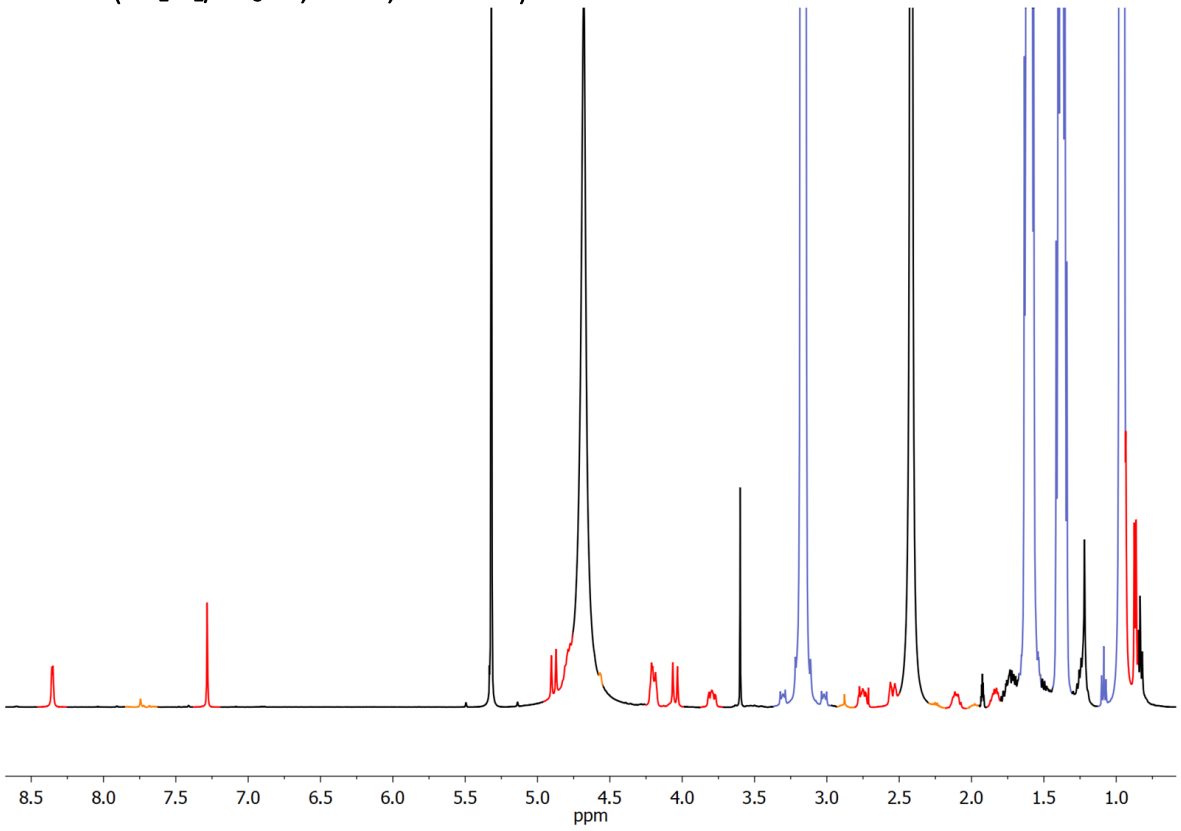
ROESY NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)



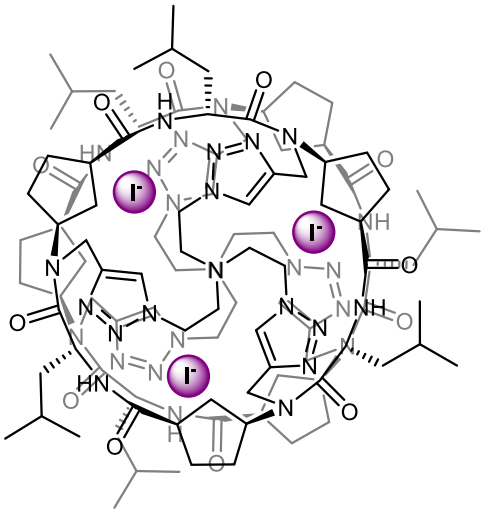


D8-bromide

^{1}H NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

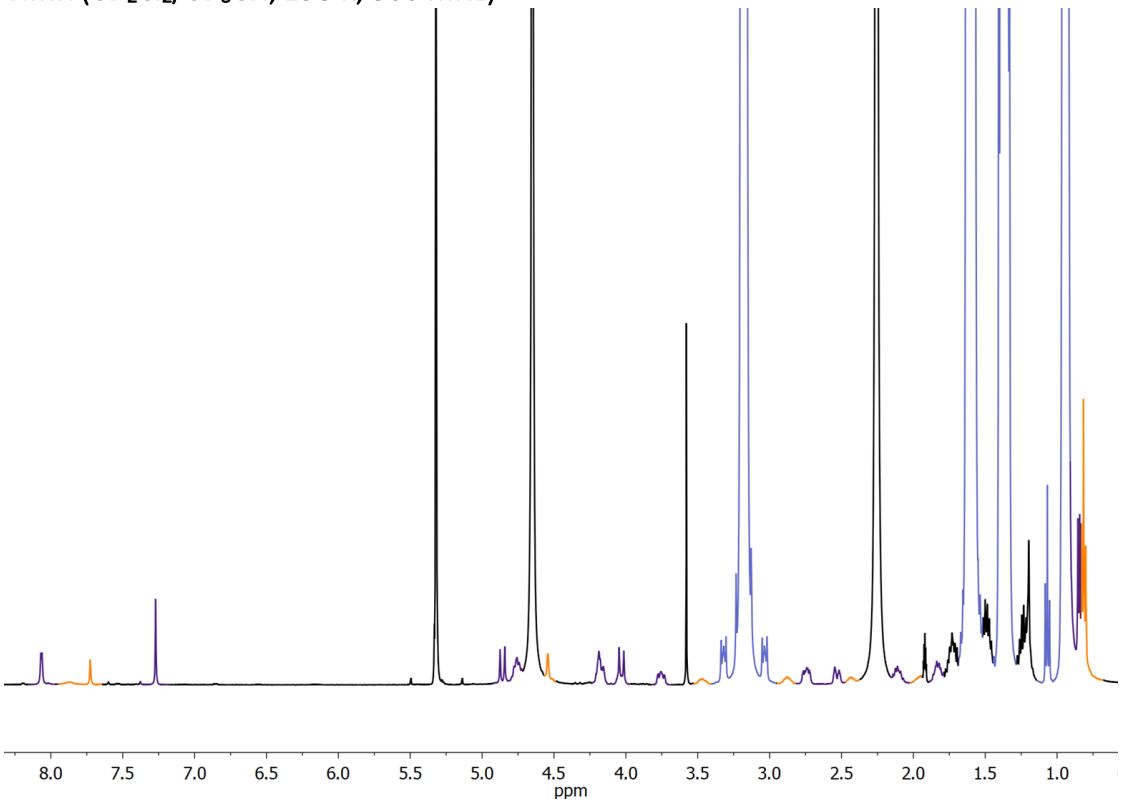


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

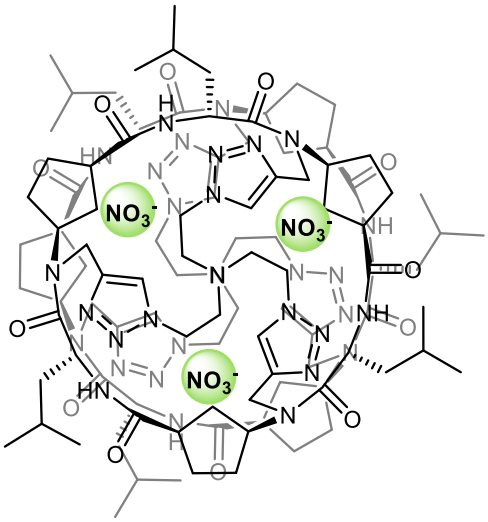


D8-iodide

^{1}H NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

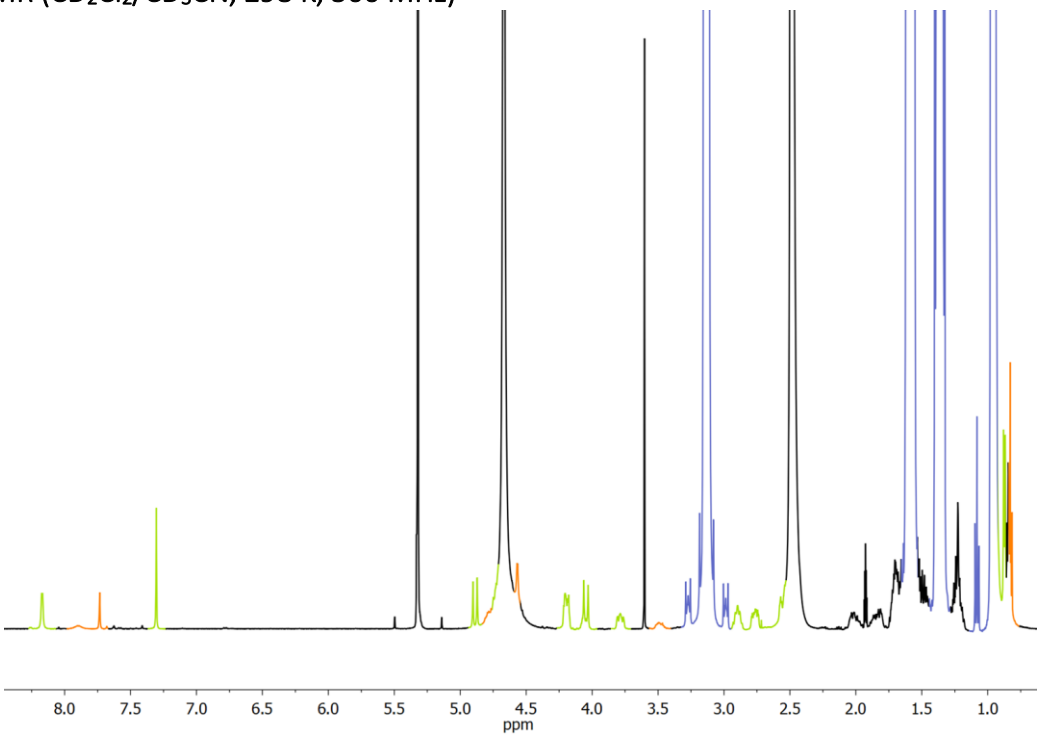


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



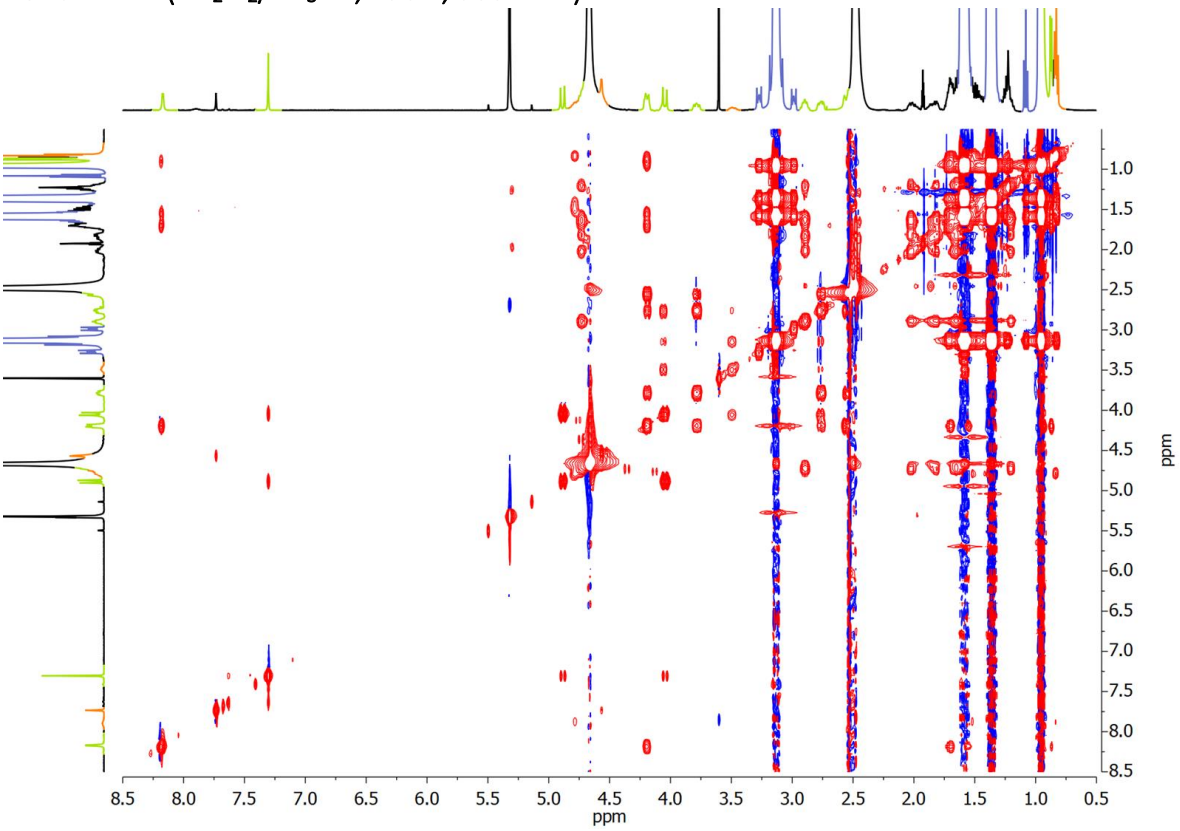
D8-nitrate

^{1}H NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

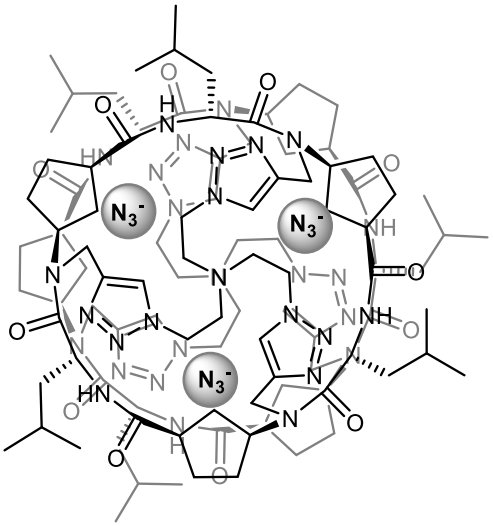


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TOCSY NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

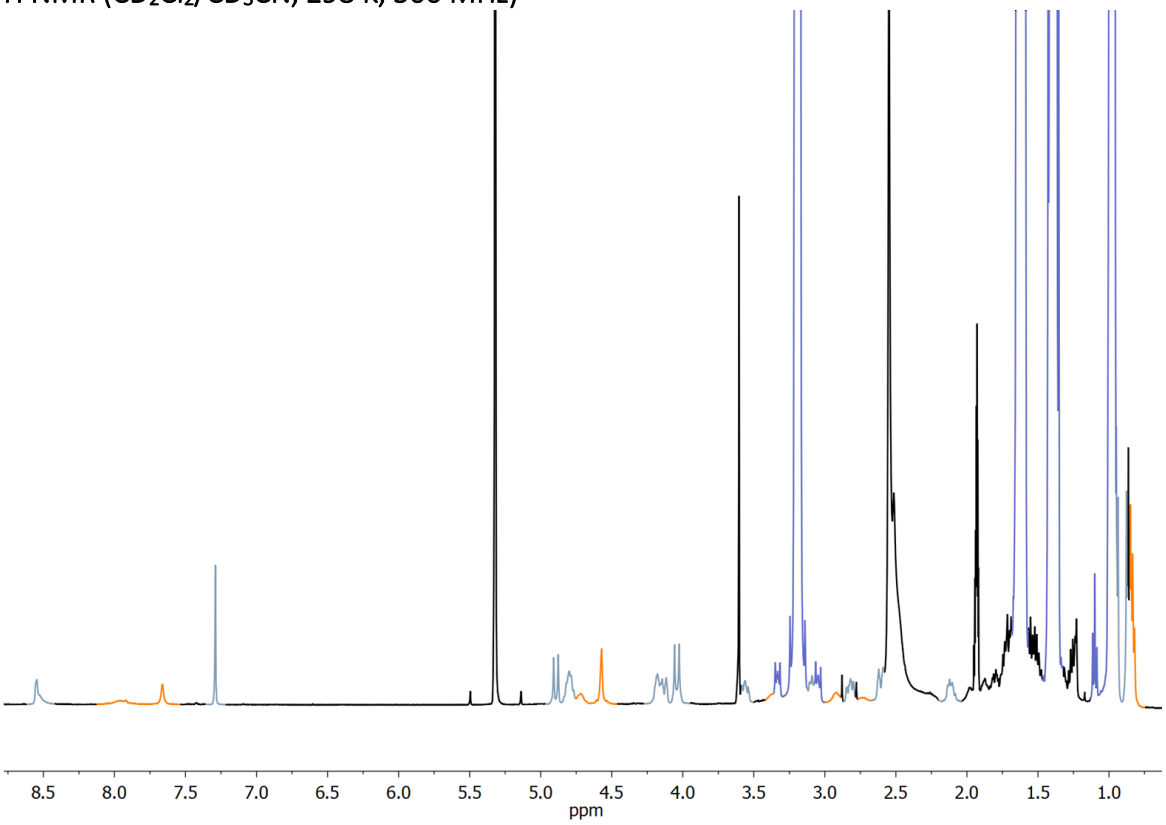


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

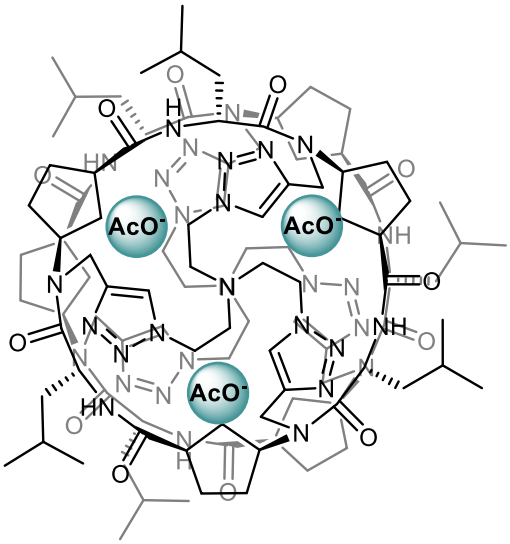


D8-azide

^{1}H NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

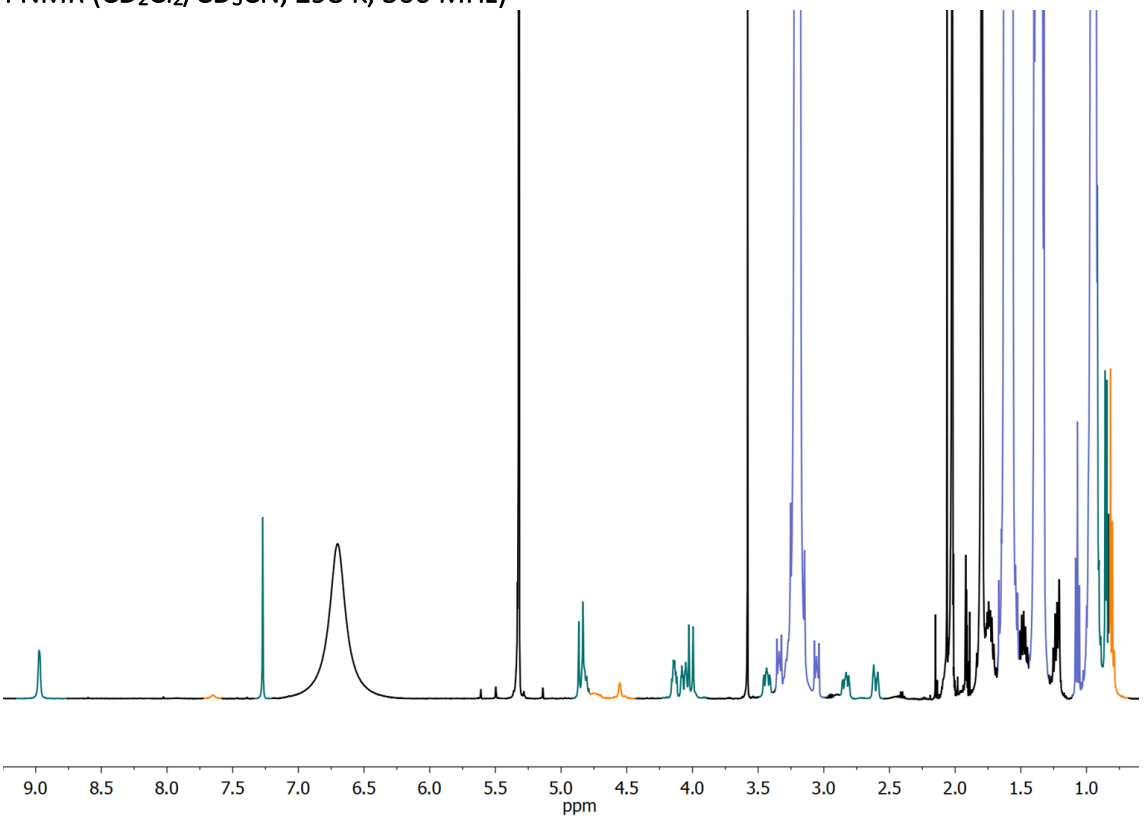


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

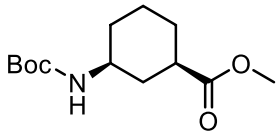


D8-acetate

^{1}H NMR (CD_2Cl_2/CD_3CN, 298 K, 500 MHz)

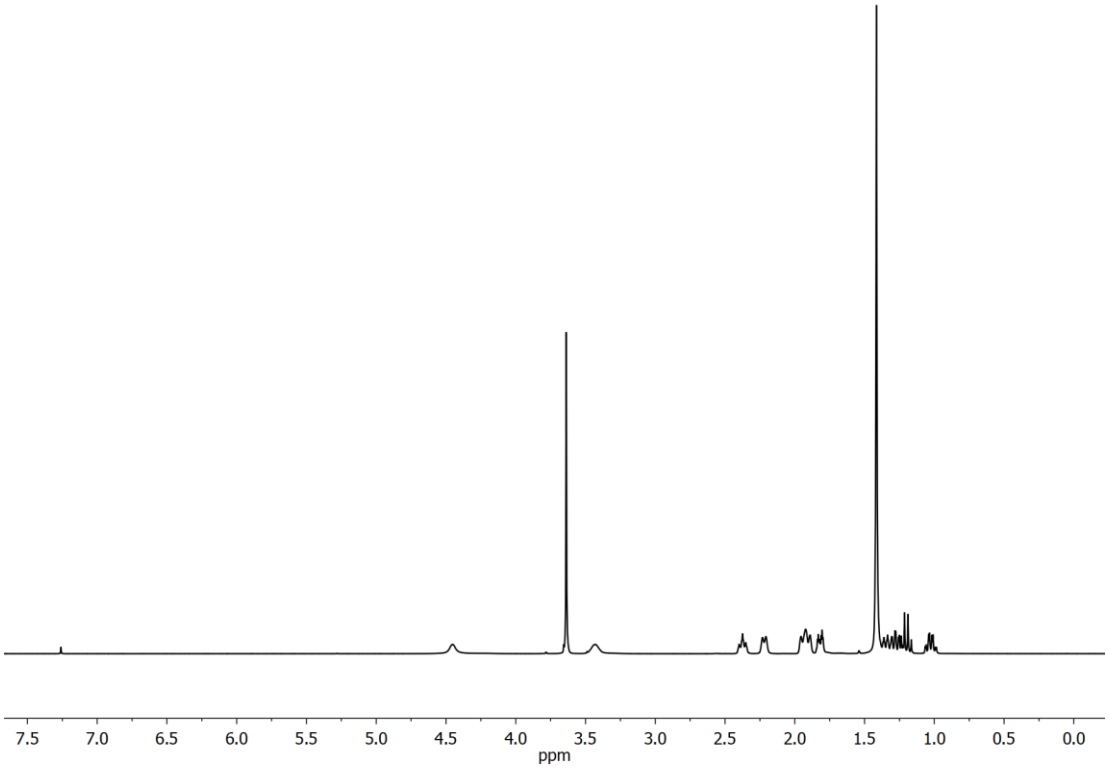


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

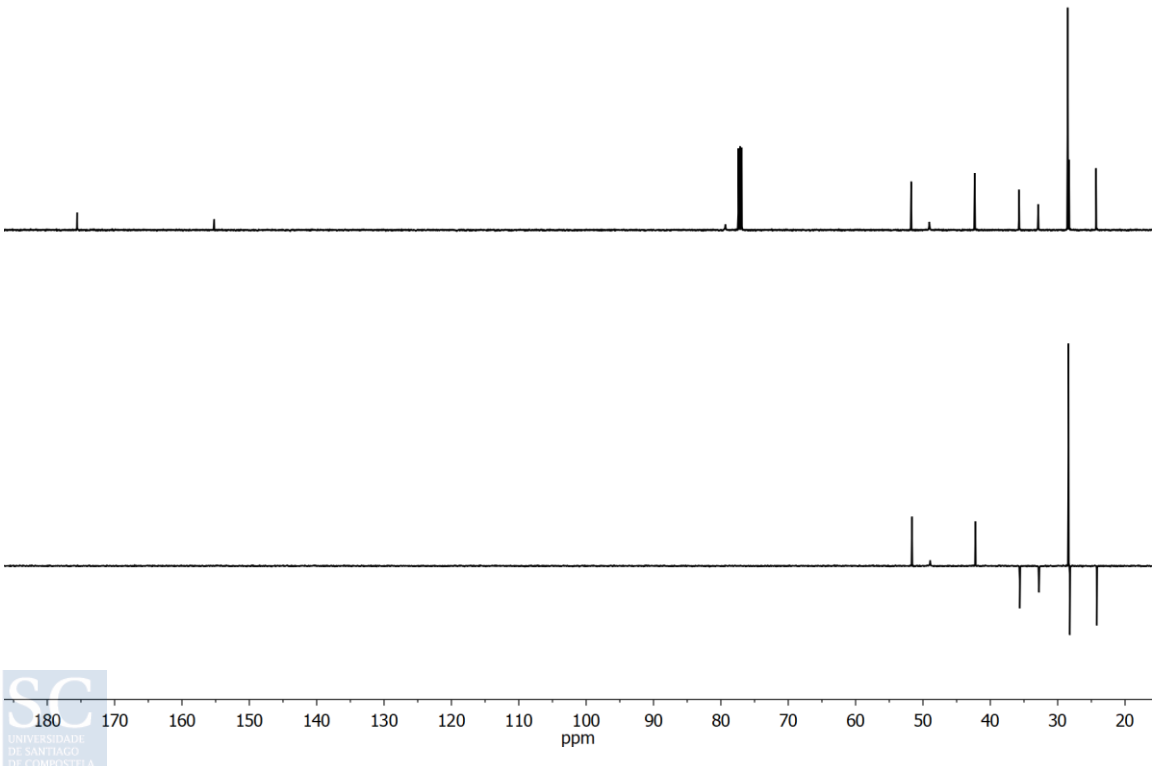


Boc-*L*-γ-Ach-OMe

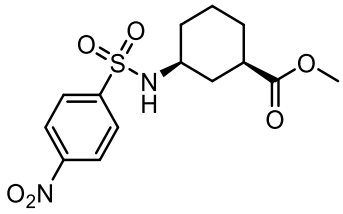
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)

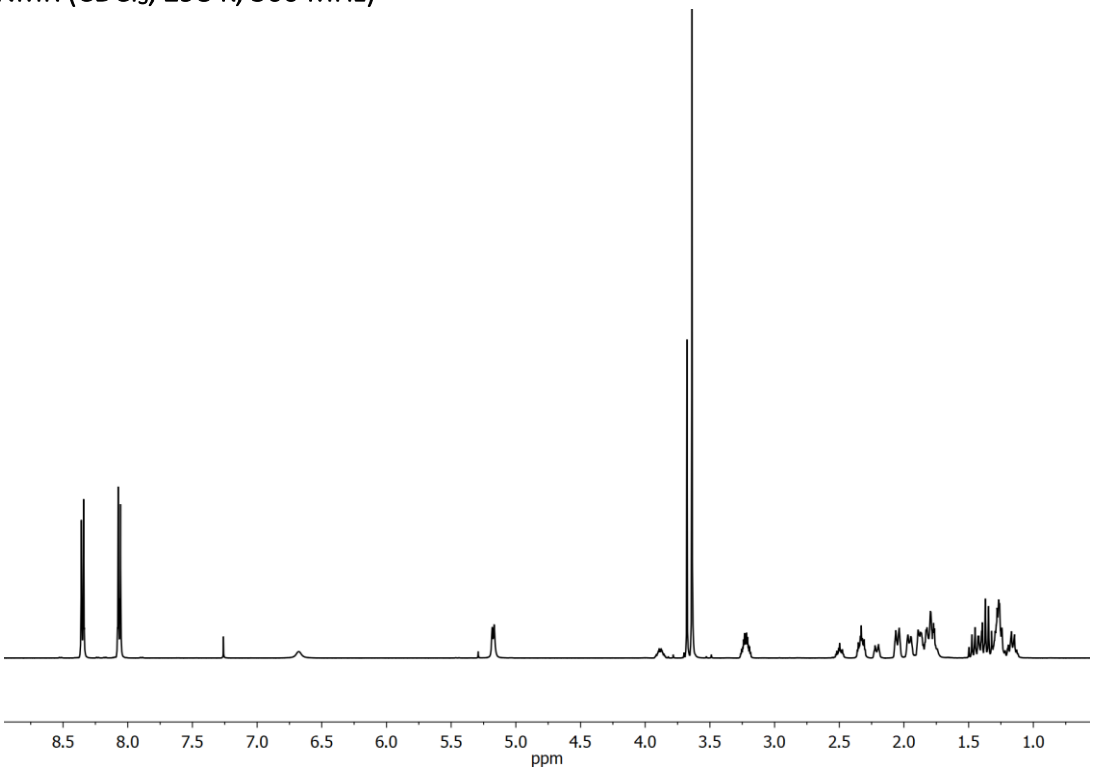


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

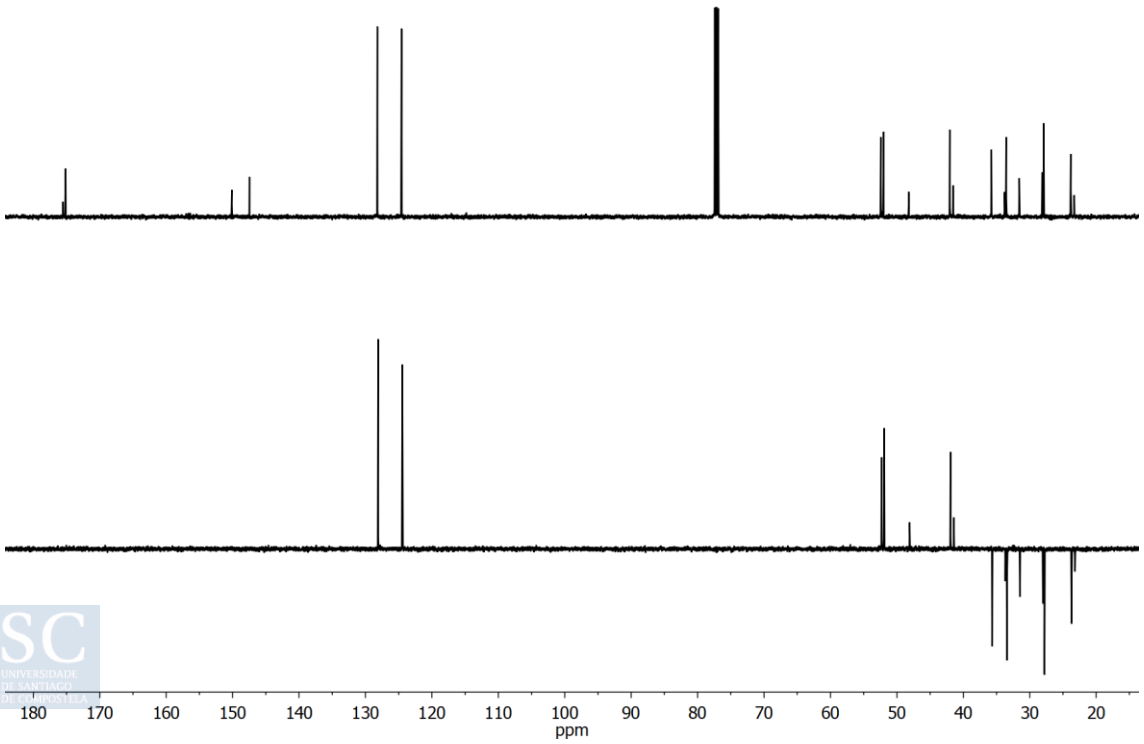


Ns-*L*-γ-Ach-OMe

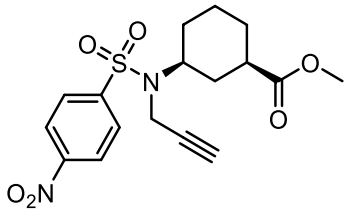
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)

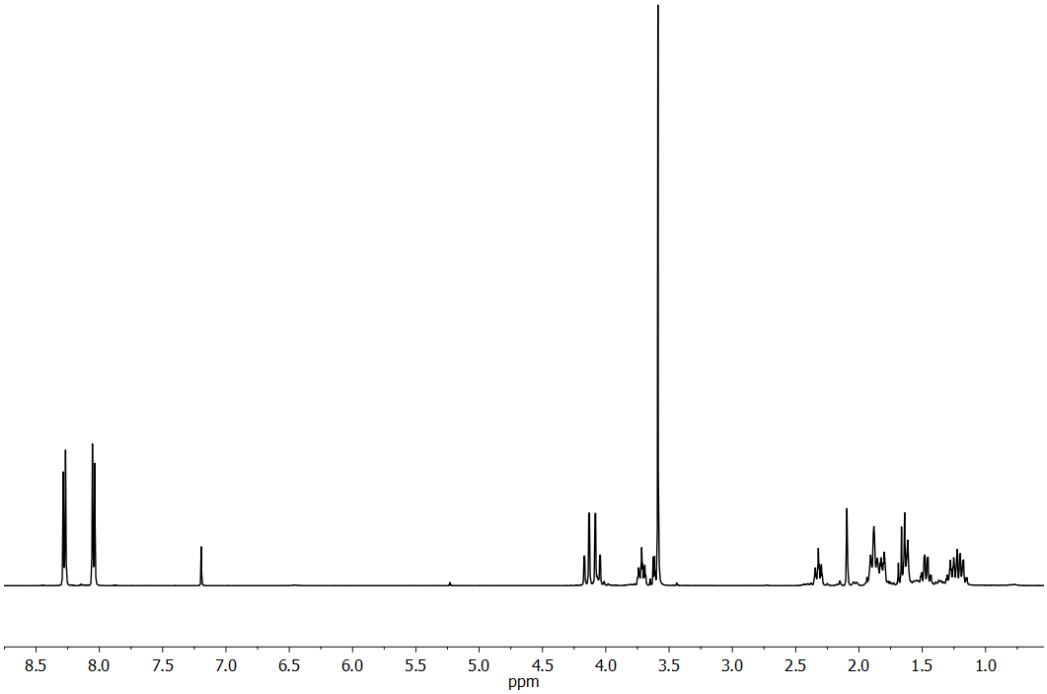


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

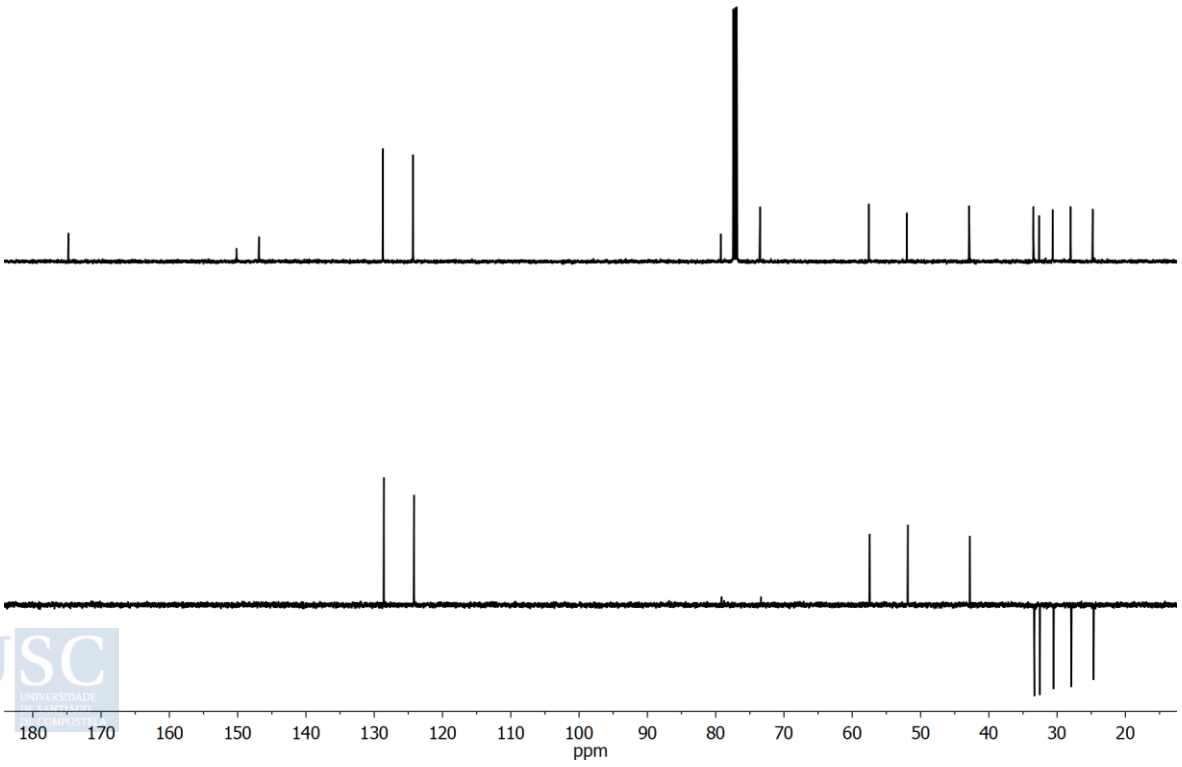


Ns-*propargyl*-*N*-*L*-γ-Ach-OMe (52)

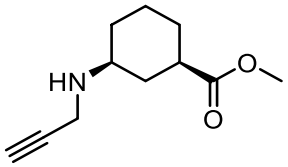
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)

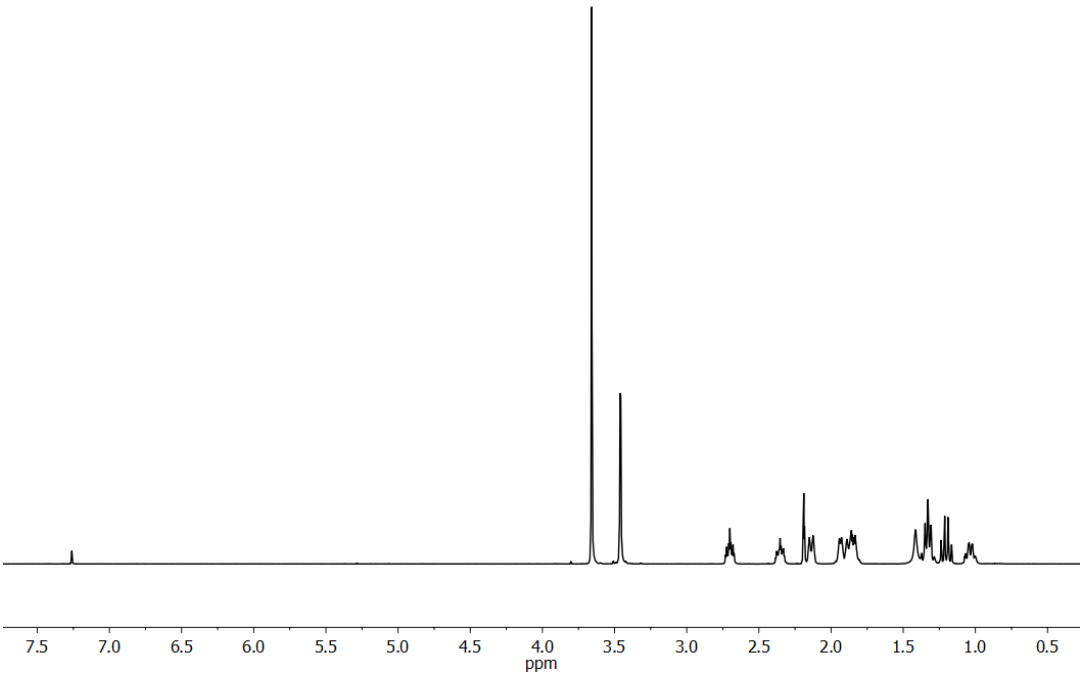


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

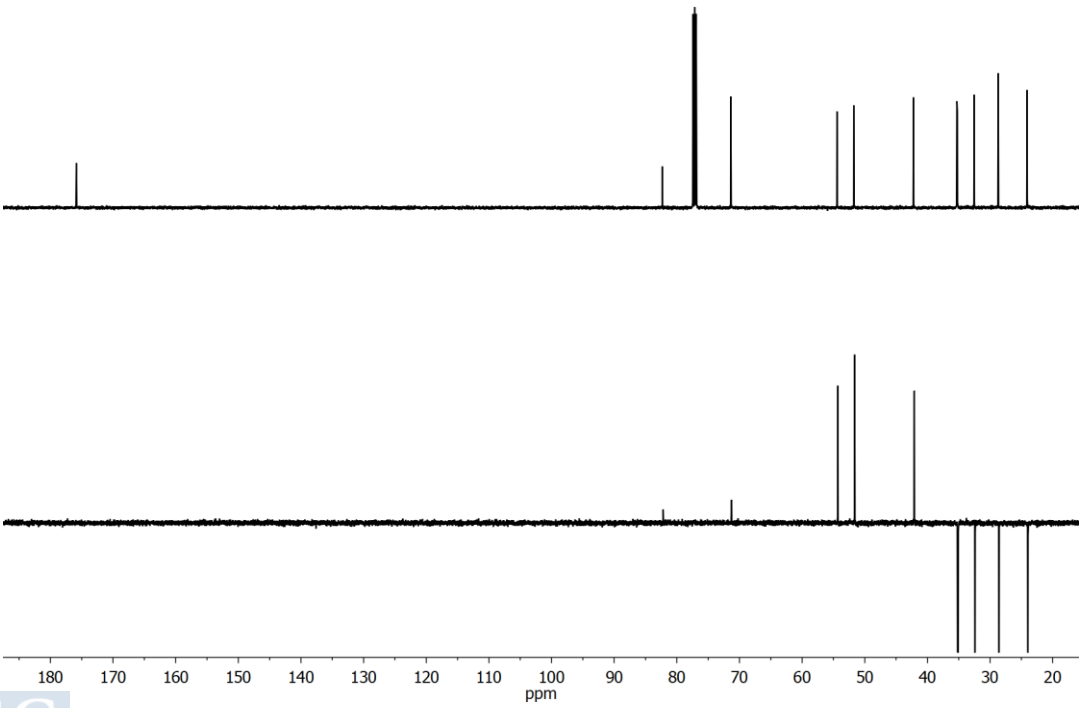


propargyl-*N*-*L*-γ-Ach-OMe

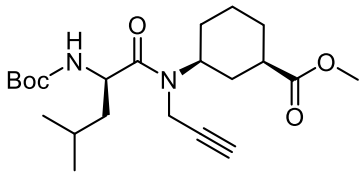
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)

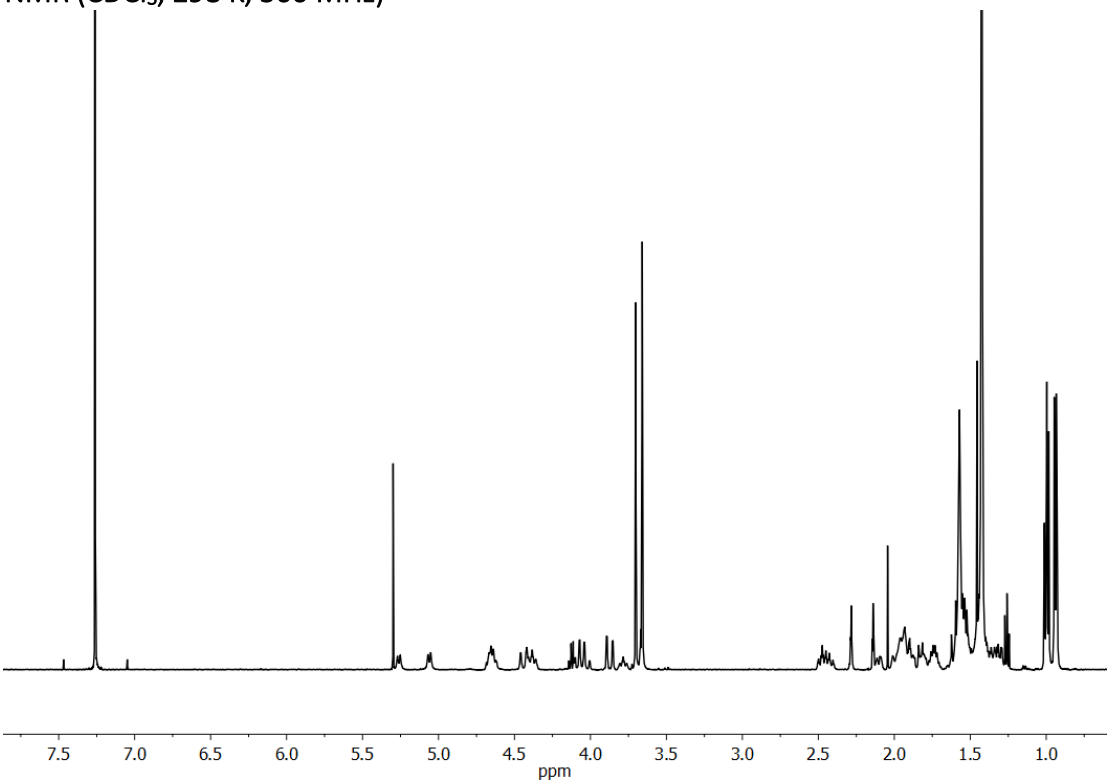


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

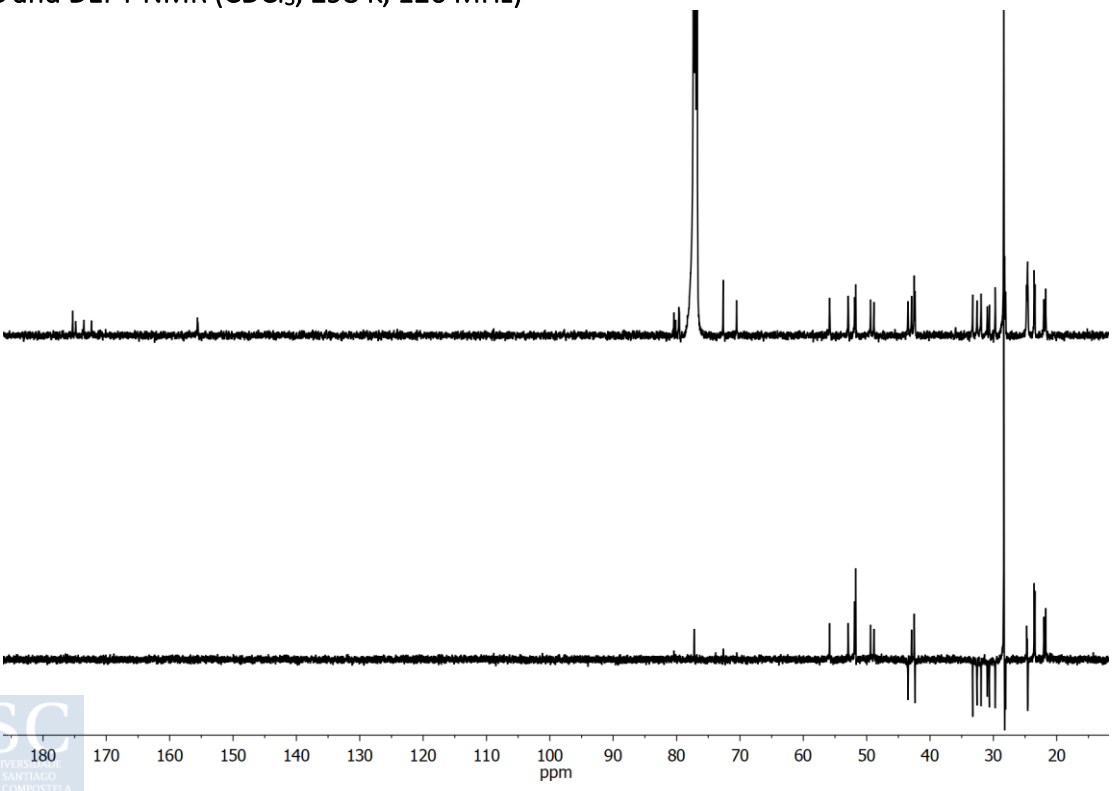


Boc-*D*-Leu-^{propargyl}*N*-*L*-γ-Ach-OMe

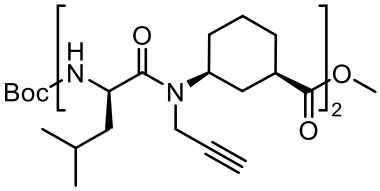
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



^{13}C and DEPT NMR ($CDCl_3$, 298 K, 126 MHz)

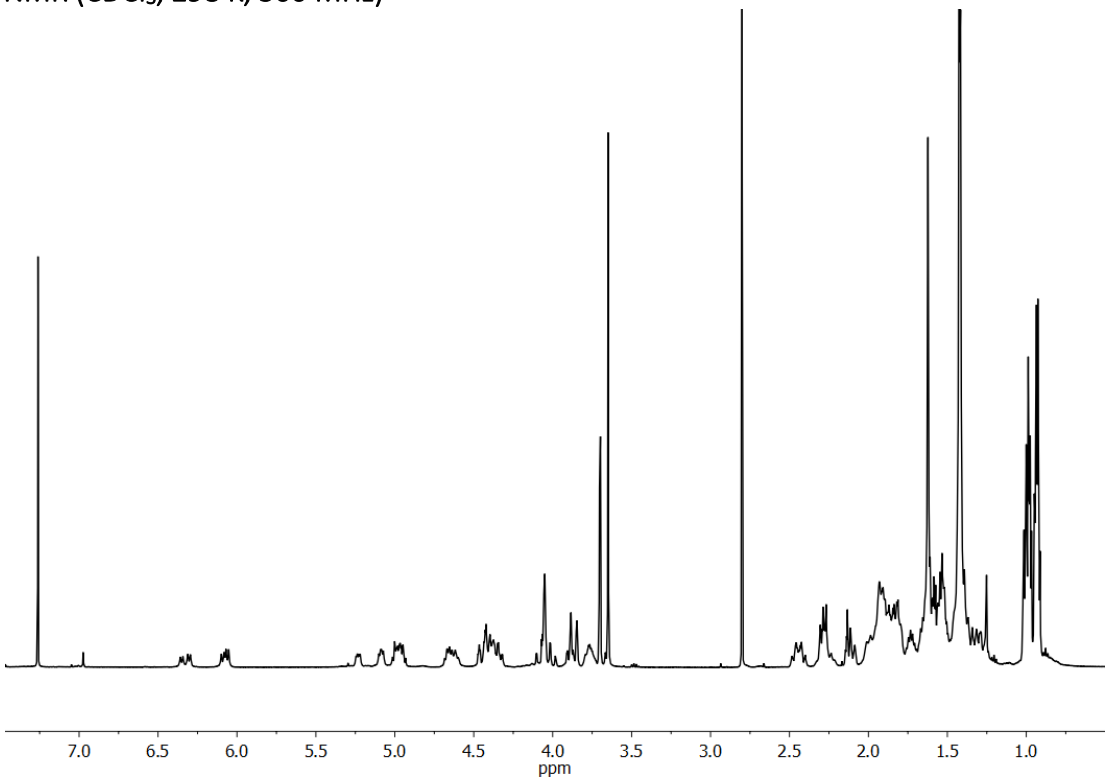


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

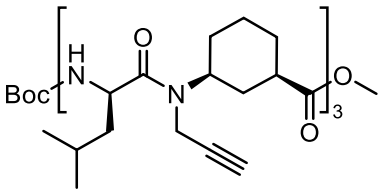


Boc-[*D*-Leu-*propargyl*-*N*-*L*-γ-Ach]$_2$-OMe

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

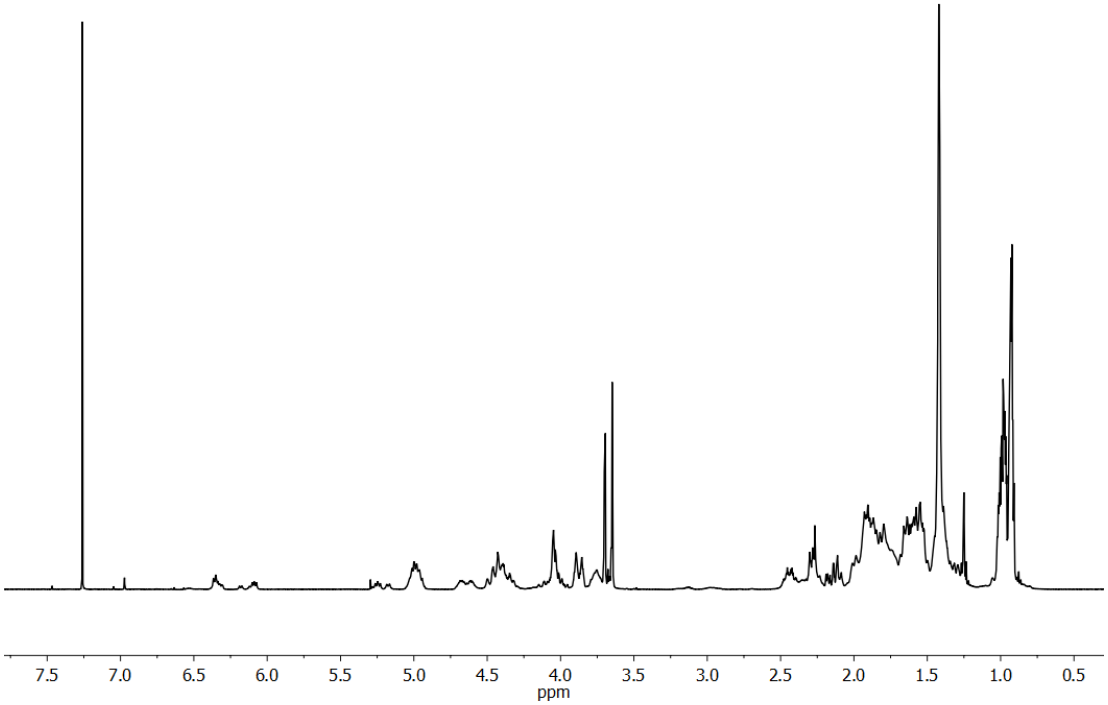


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

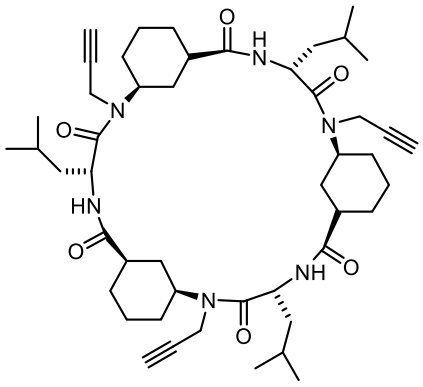


Boc-[*D*-Leu-*propargyl*-*N*-*L*-γ-Ach]$_3$-OMe

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

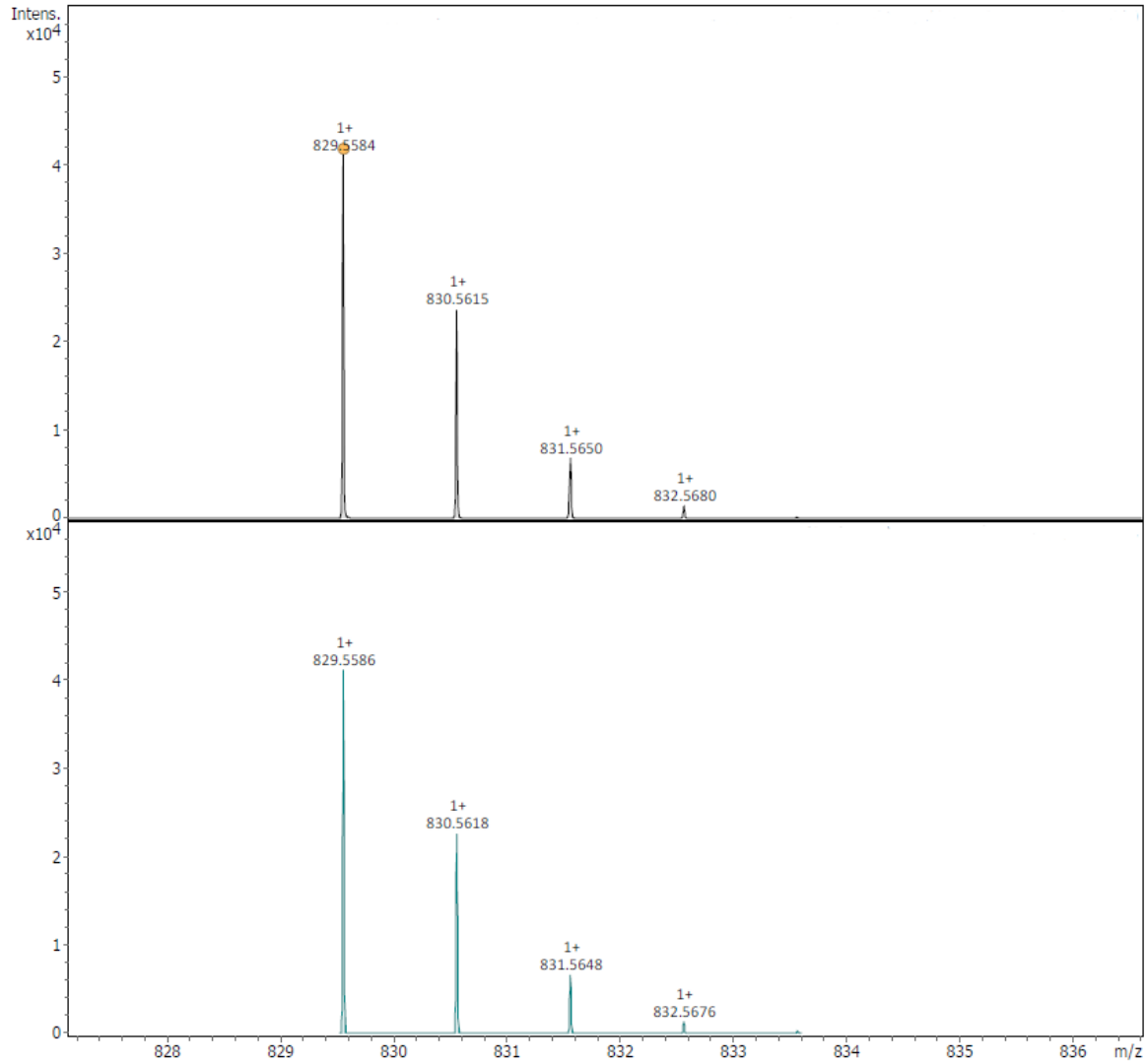


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



CP10/D10

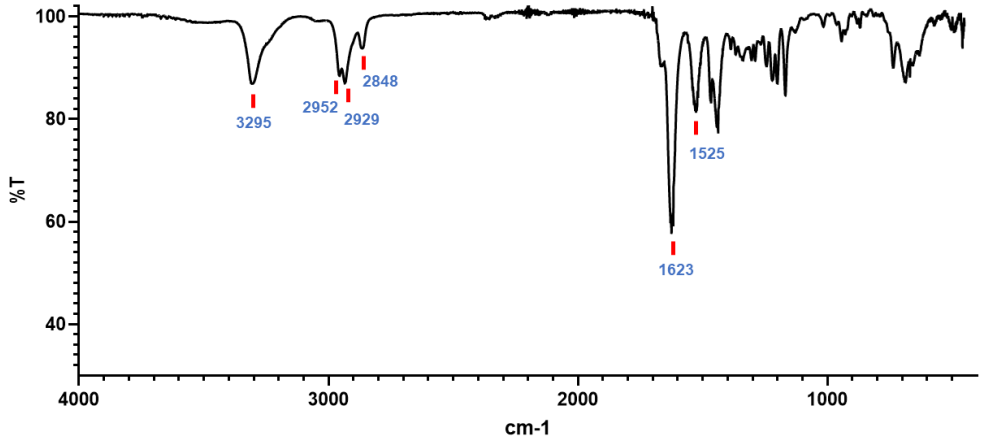
MS-ESI (real/prediction)



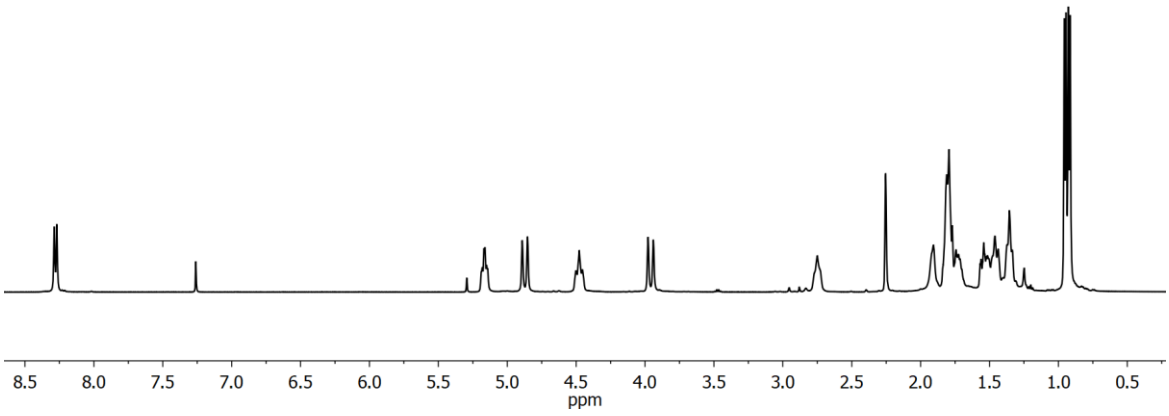
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
829.5584	1	C50H75N3O7	52.20	829.5600	1.6	1.9	6.2	15.5	odd	ok

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FTIR

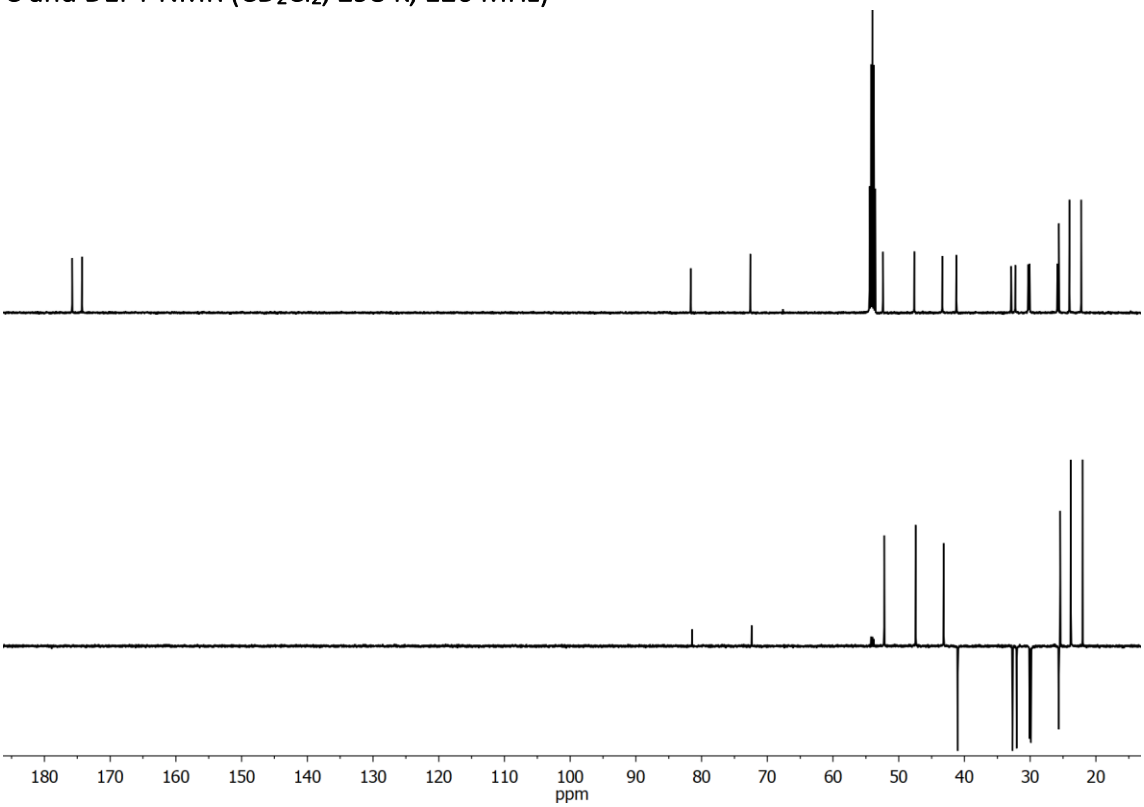


^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

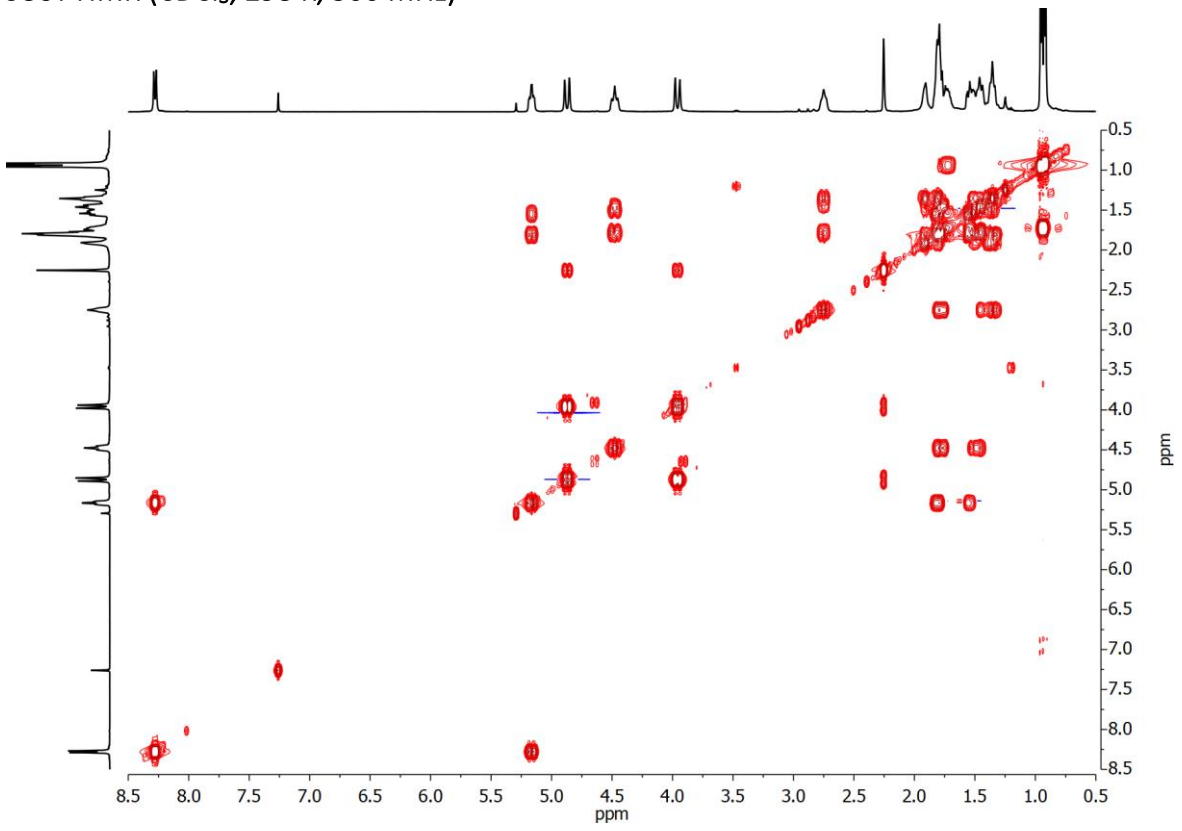


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{13}C and DEPT NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 126 MHz)

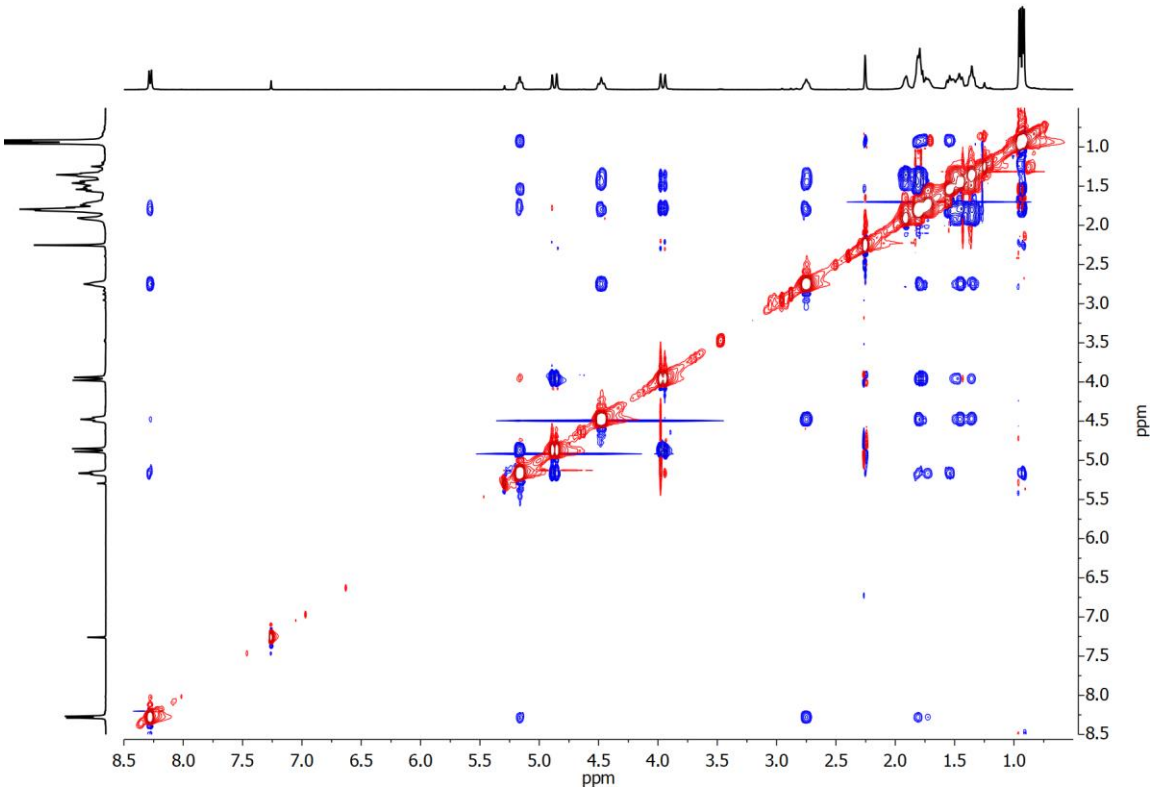


COSY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

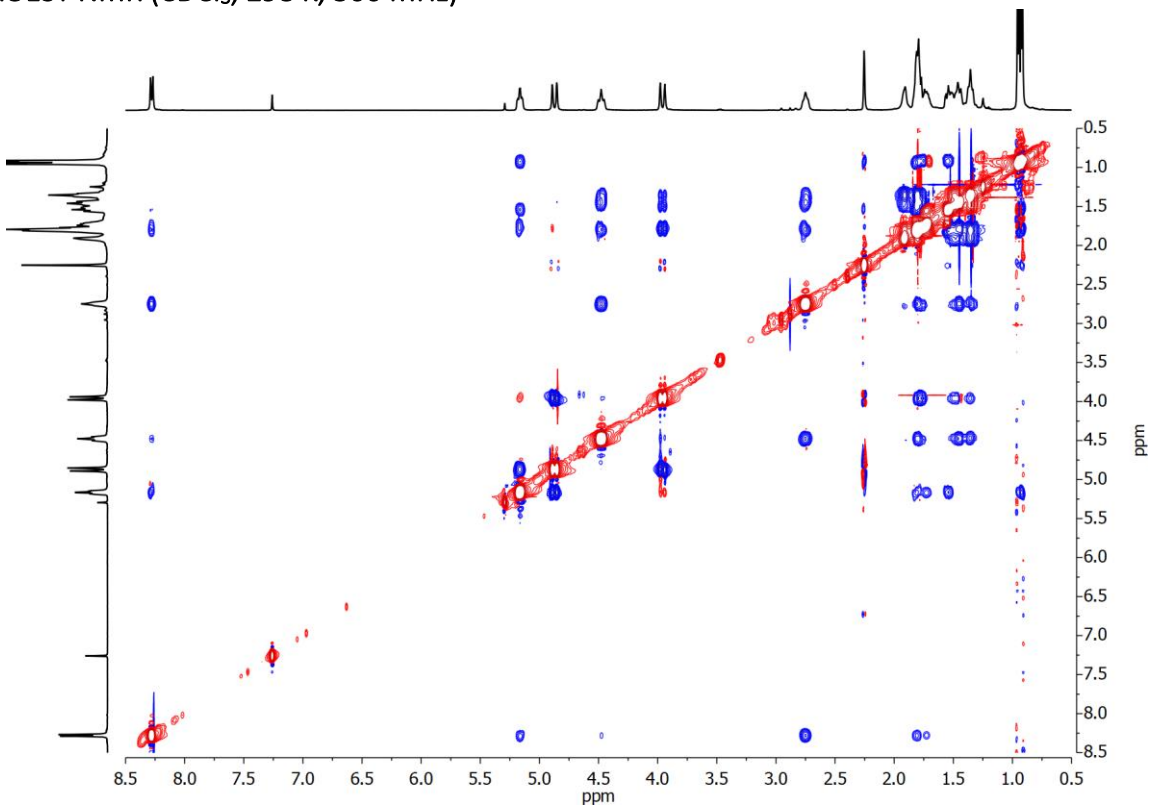


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

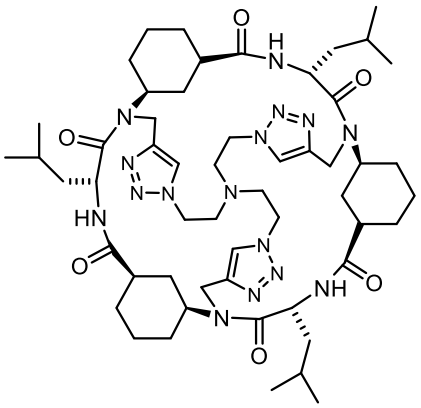
TOCSY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)



ROESY NMR ($CDCl_3$, 298 K, 500 MHz)

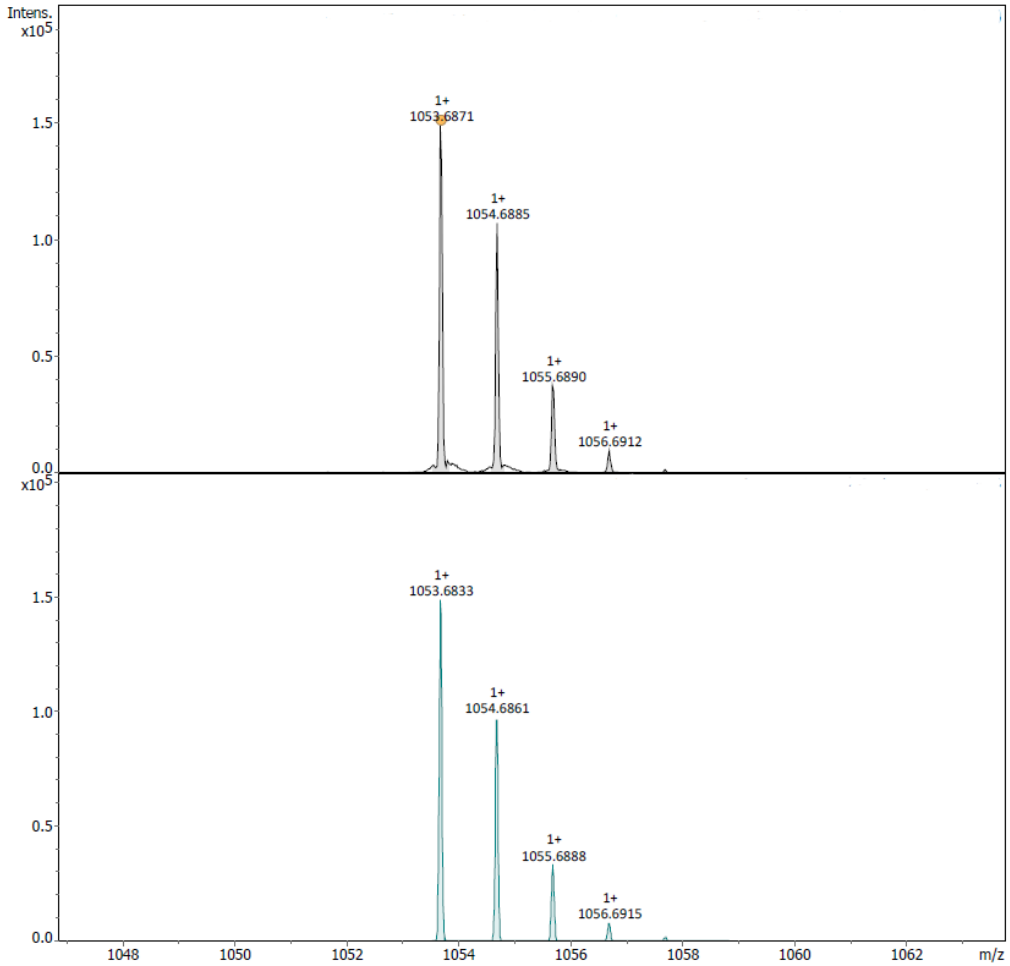


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



CP11/D11

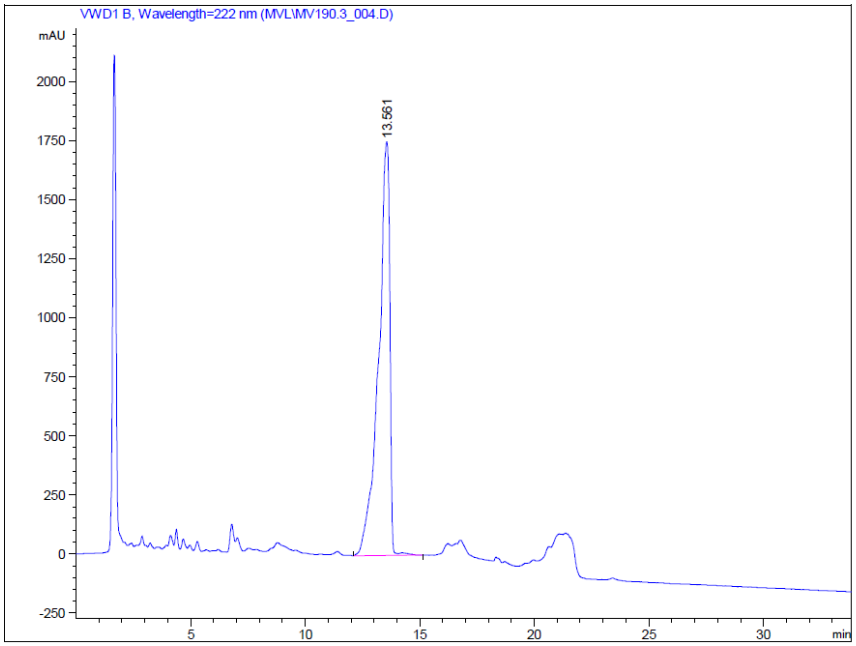
MS-ESI (real/predicted)



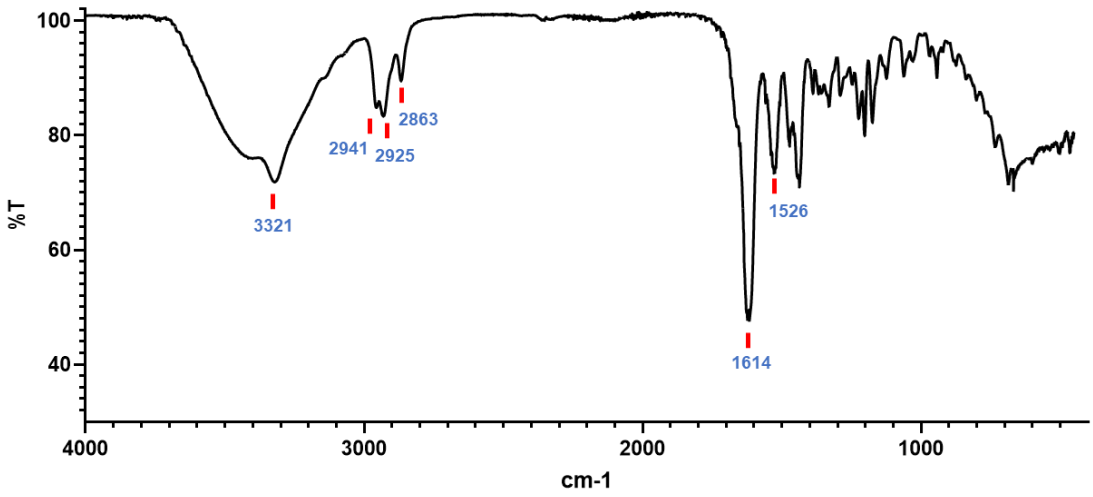
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
1053.6871	1	C54H85N16O6	100.00	1053.6833	-3.8	-3.6	32.1	21.0	even	ok

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HPLC-CROMATOGRAM

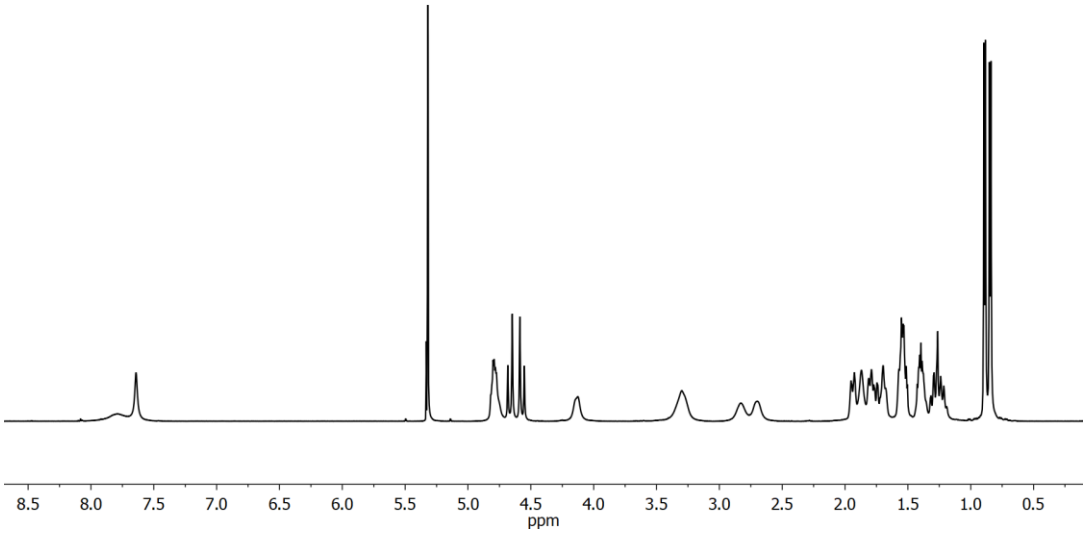


FTIR

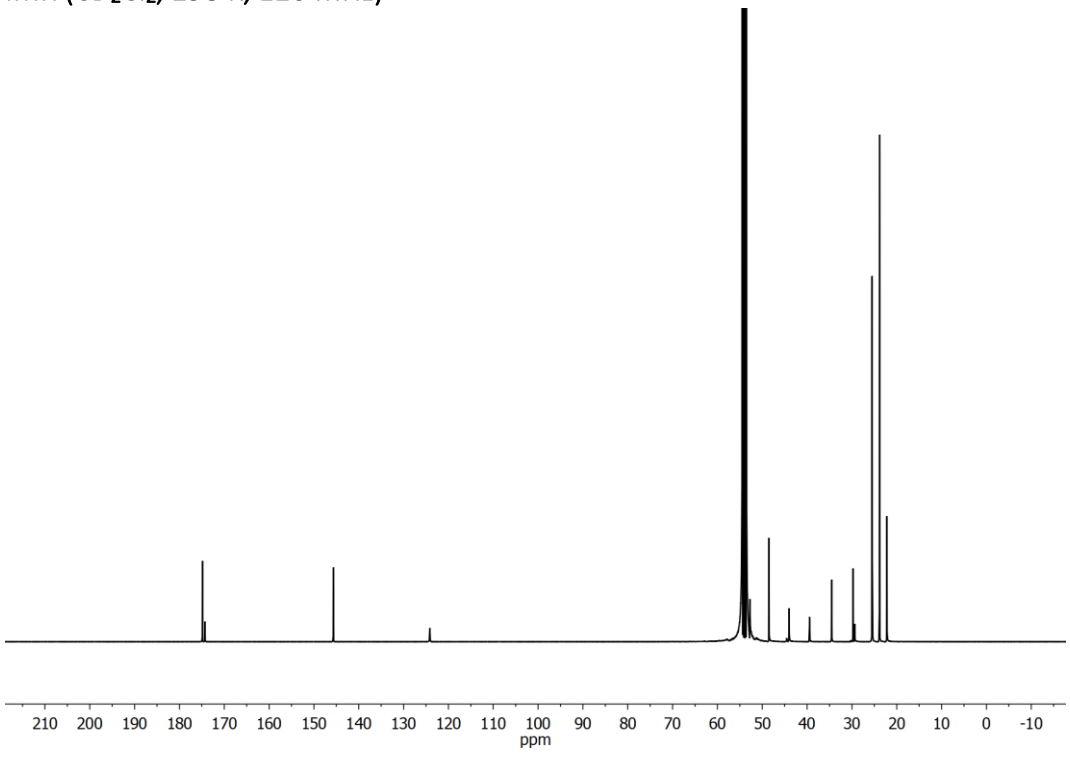


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

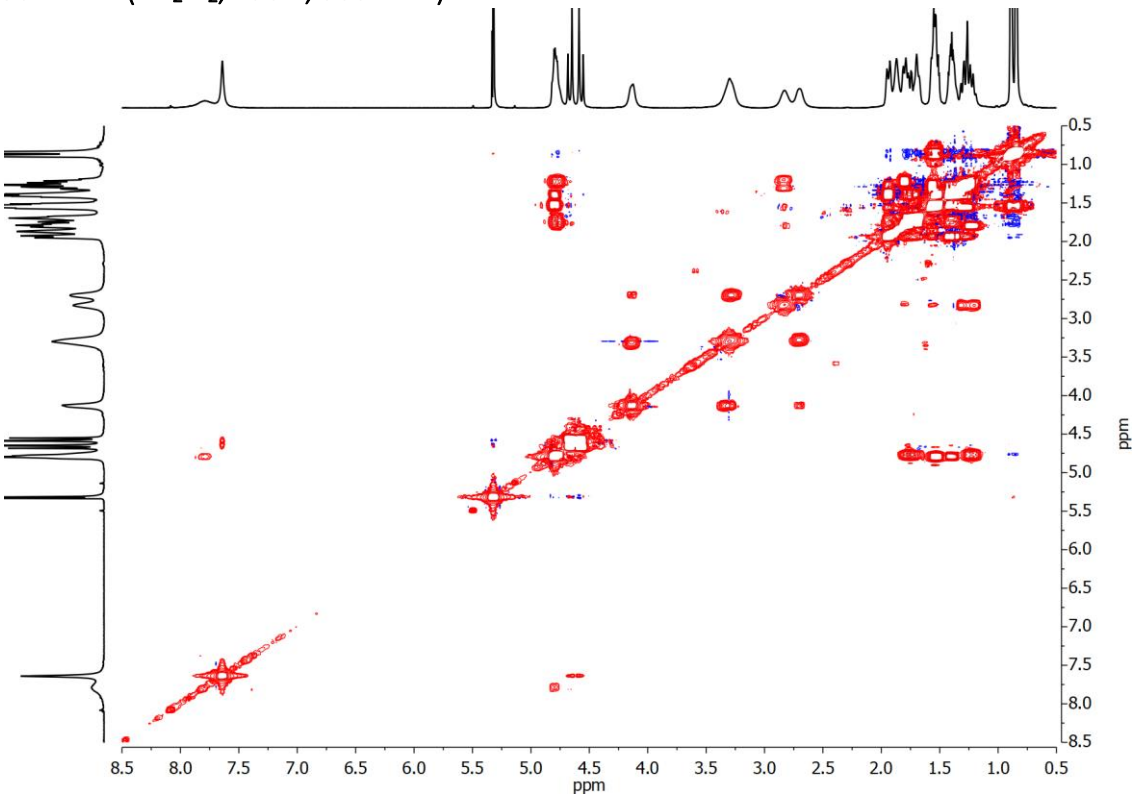


^{13}C NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 126 MHz)

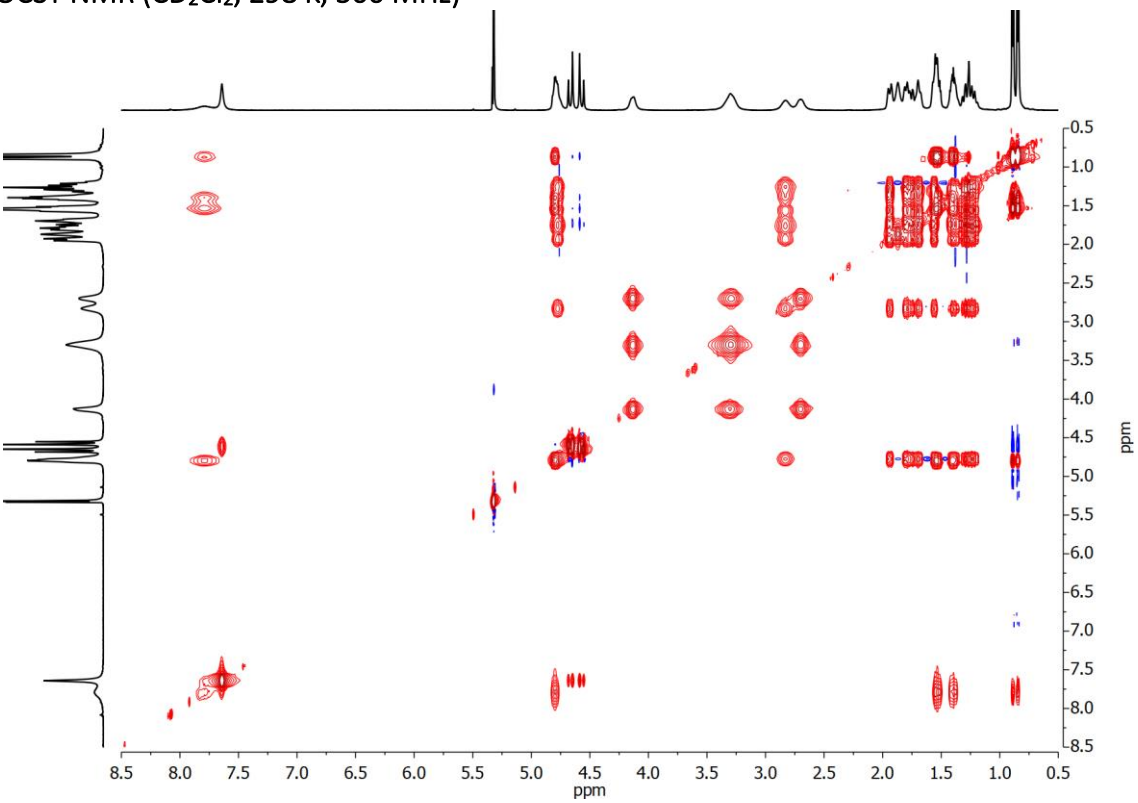


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

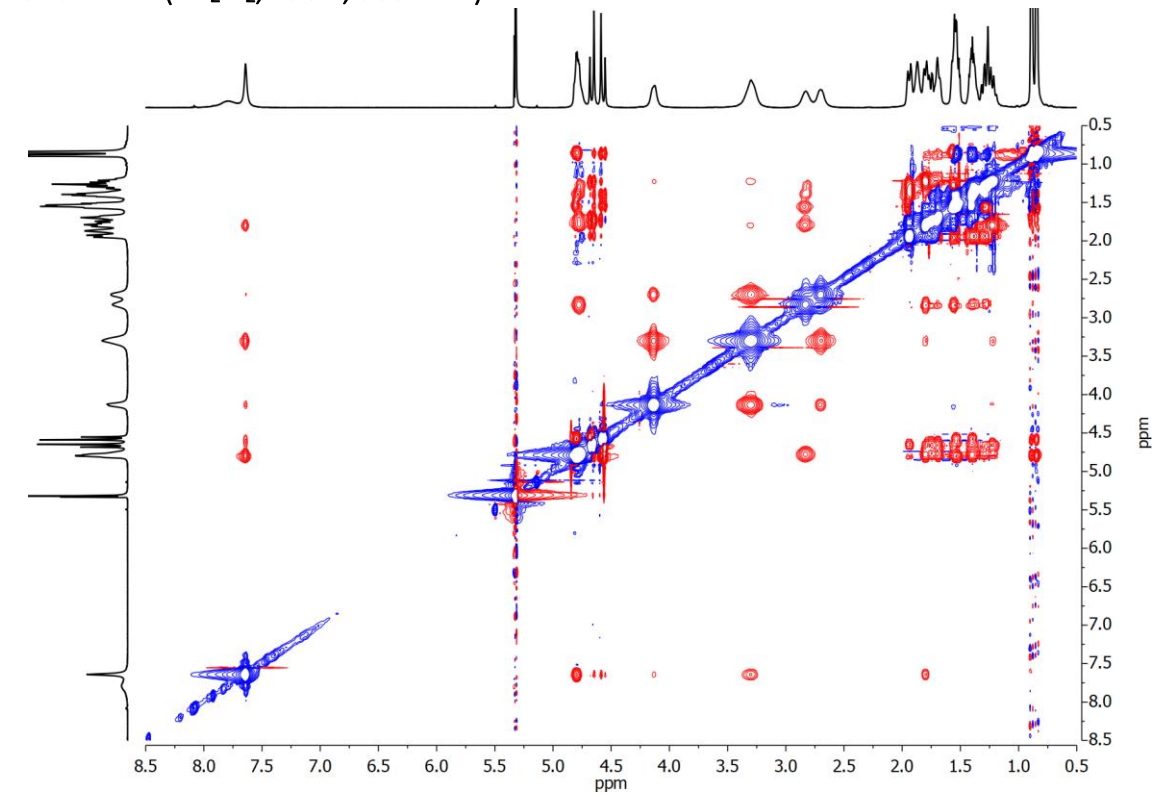


TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

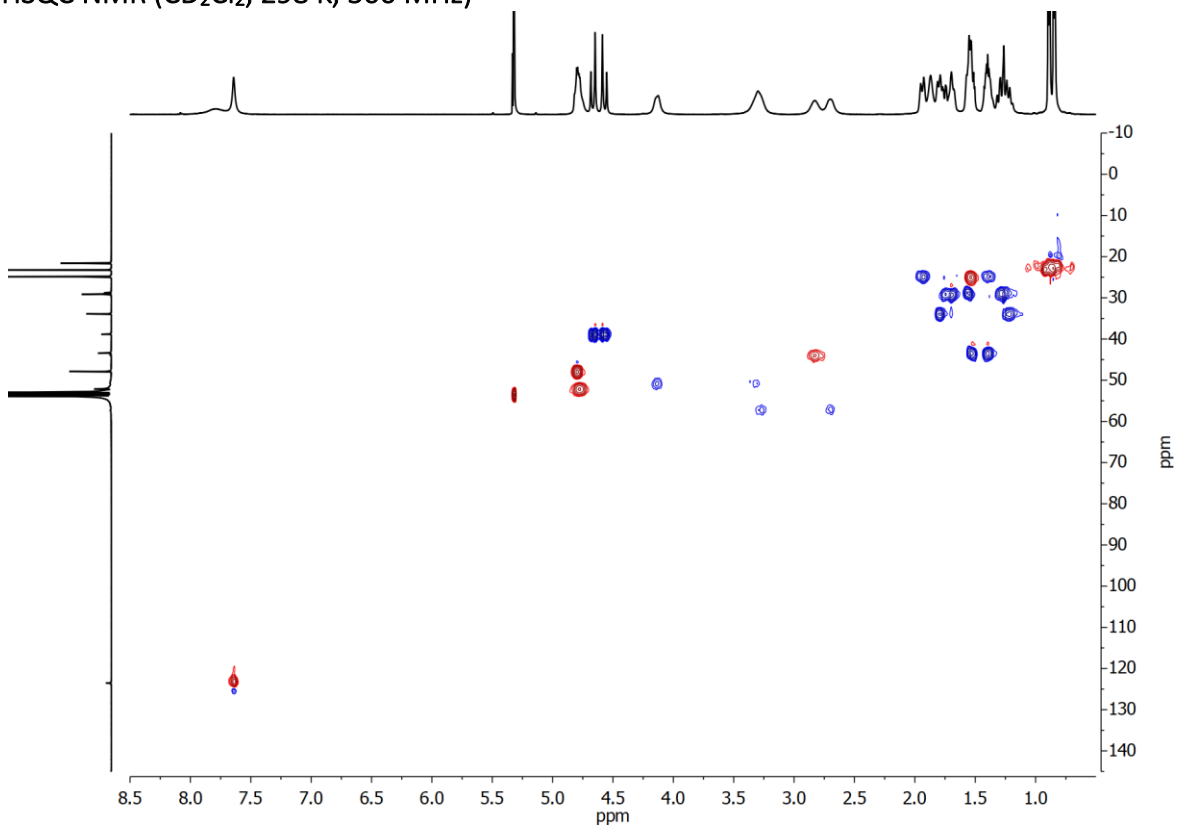


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

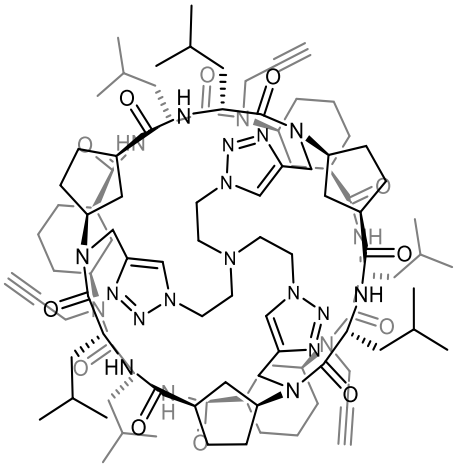
ROESY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



HSQC NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

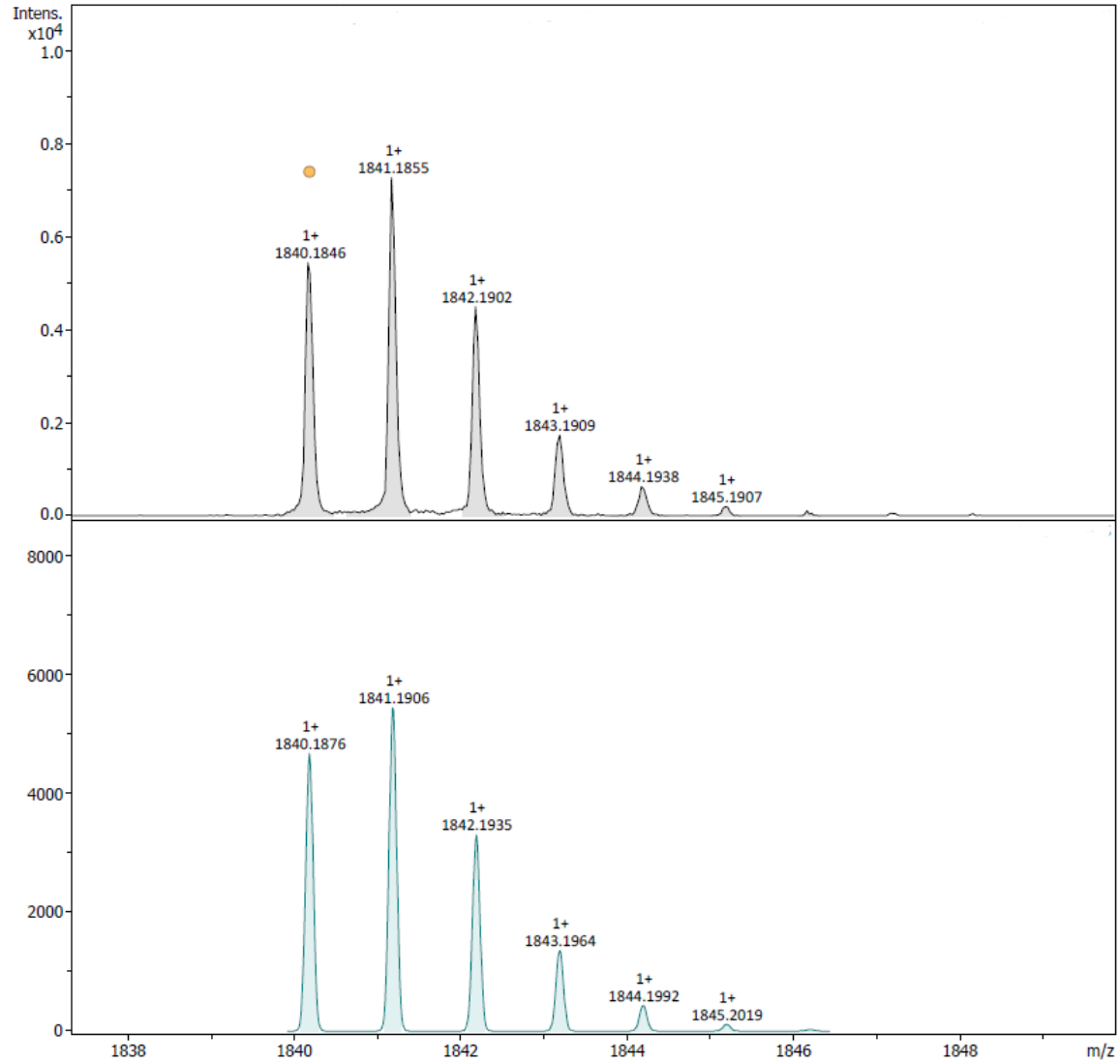


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



D8-10

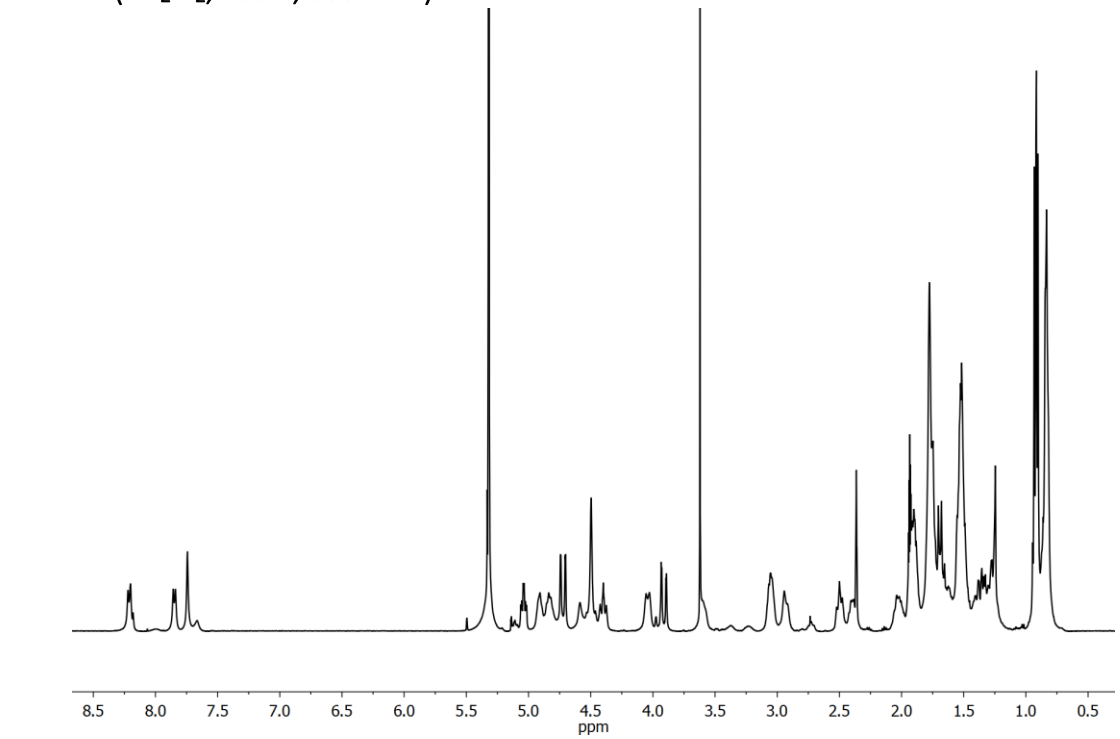
MS-ESI (real/predicted)



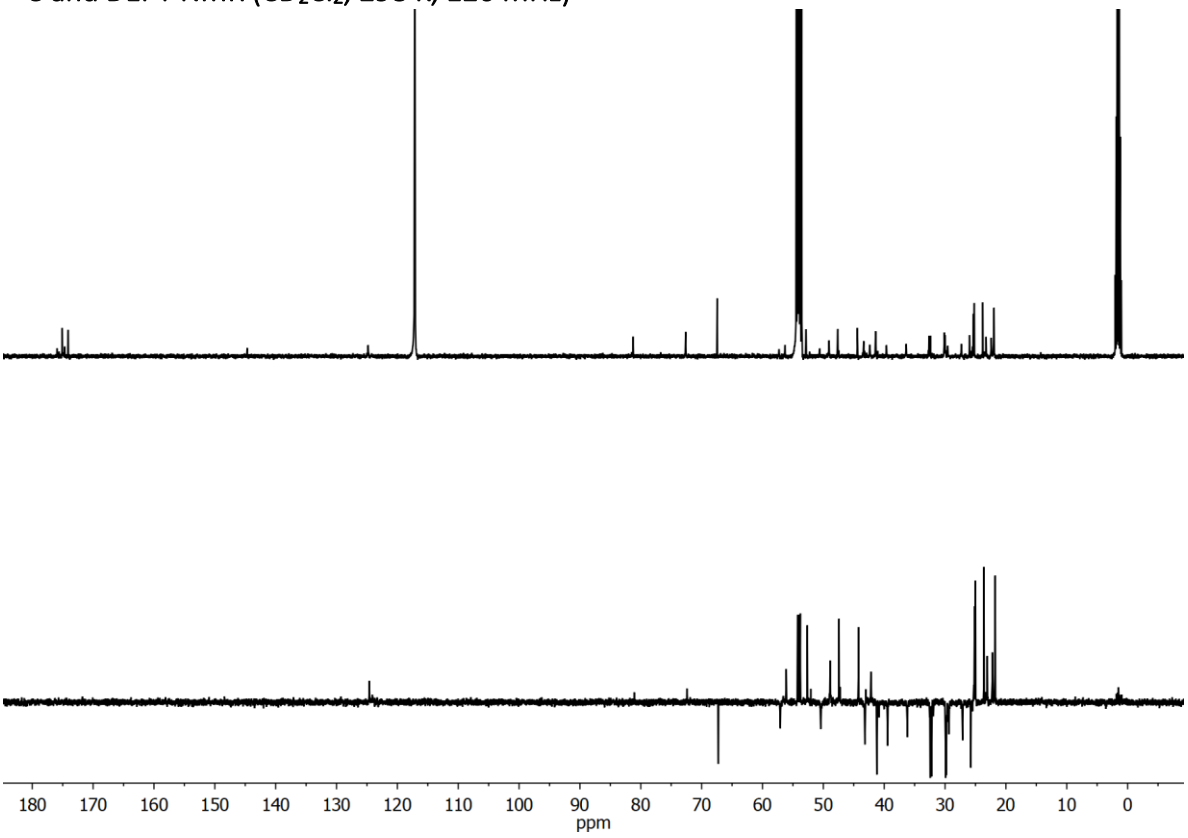
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
1840.1846	1	C99H151N22O12	100.00	1840.1876	3.0	1.6	44.1	36.0	even	ok

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

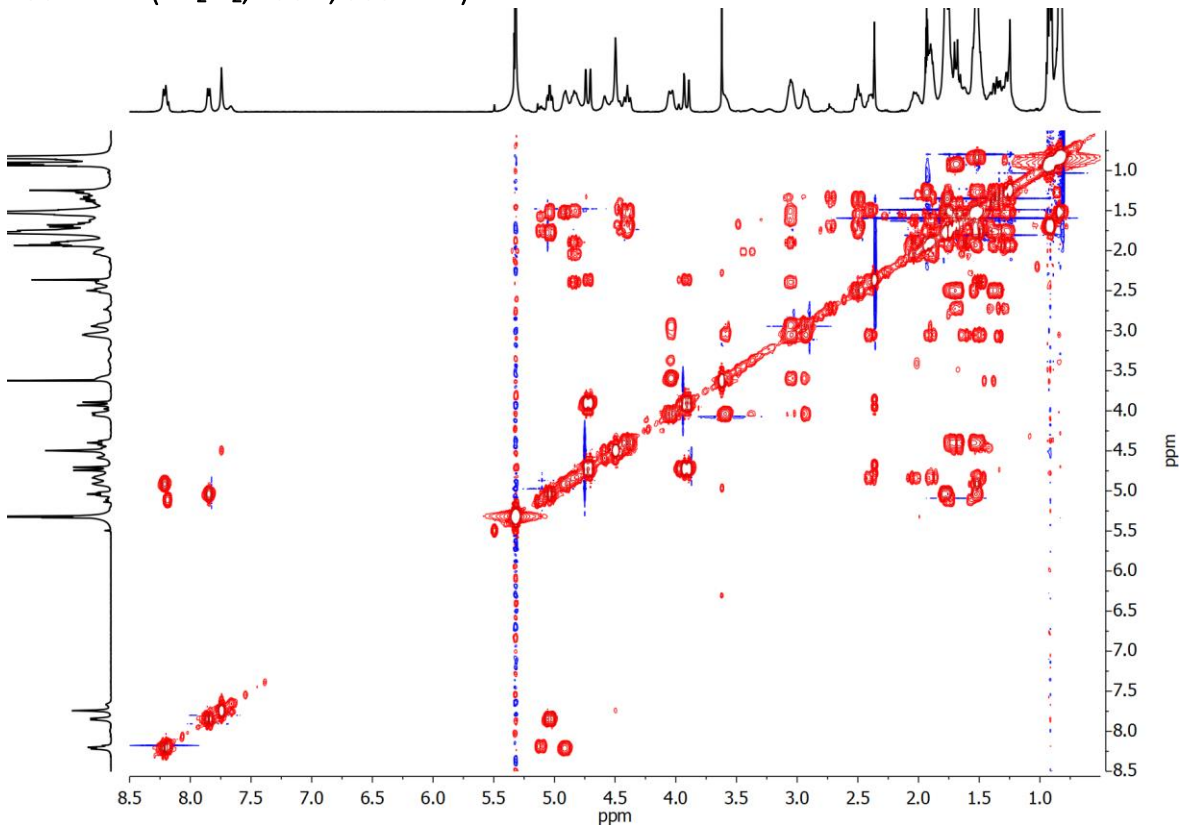


^{13}C and DEPT NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 126 MHz)

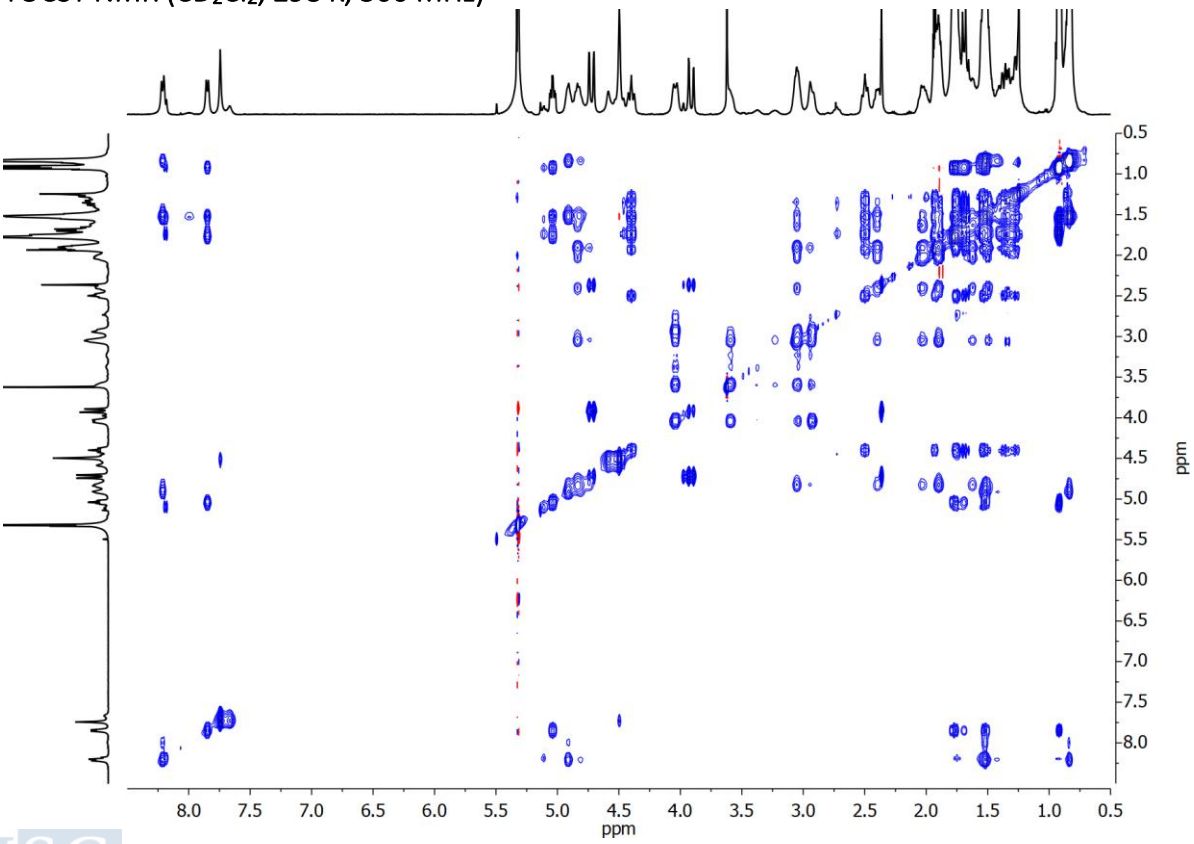


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

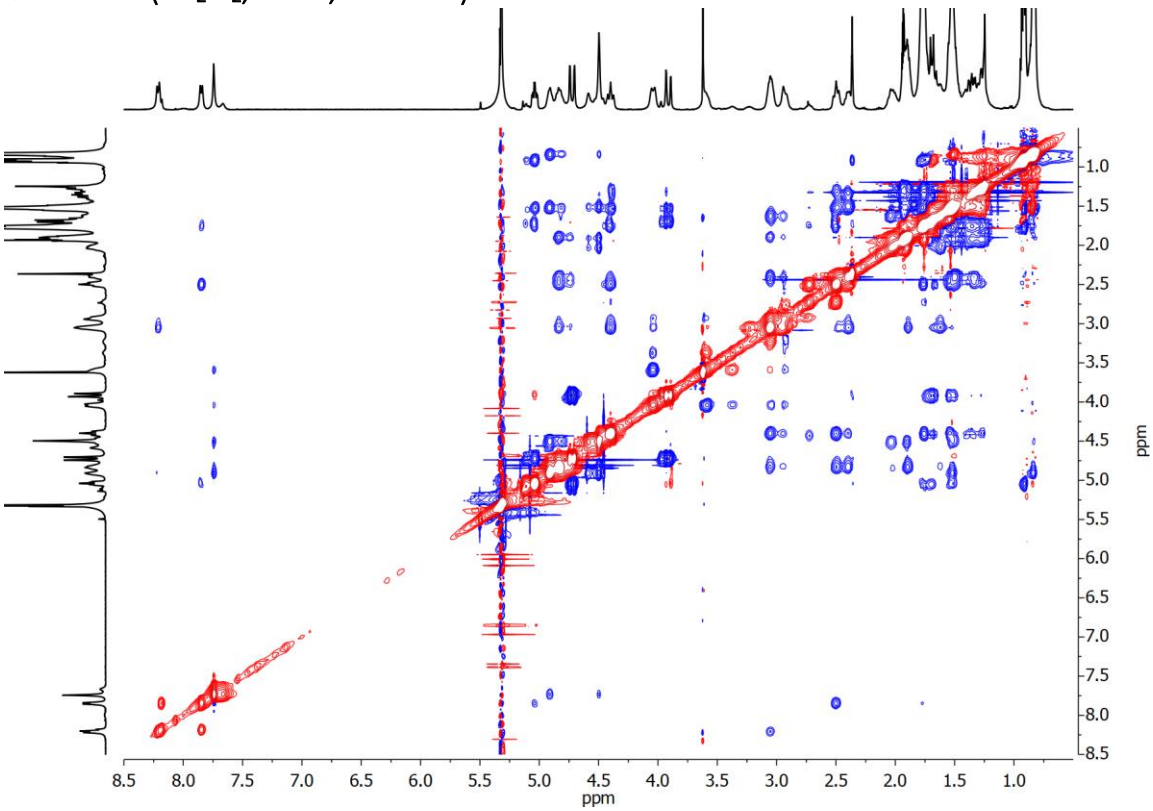


TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

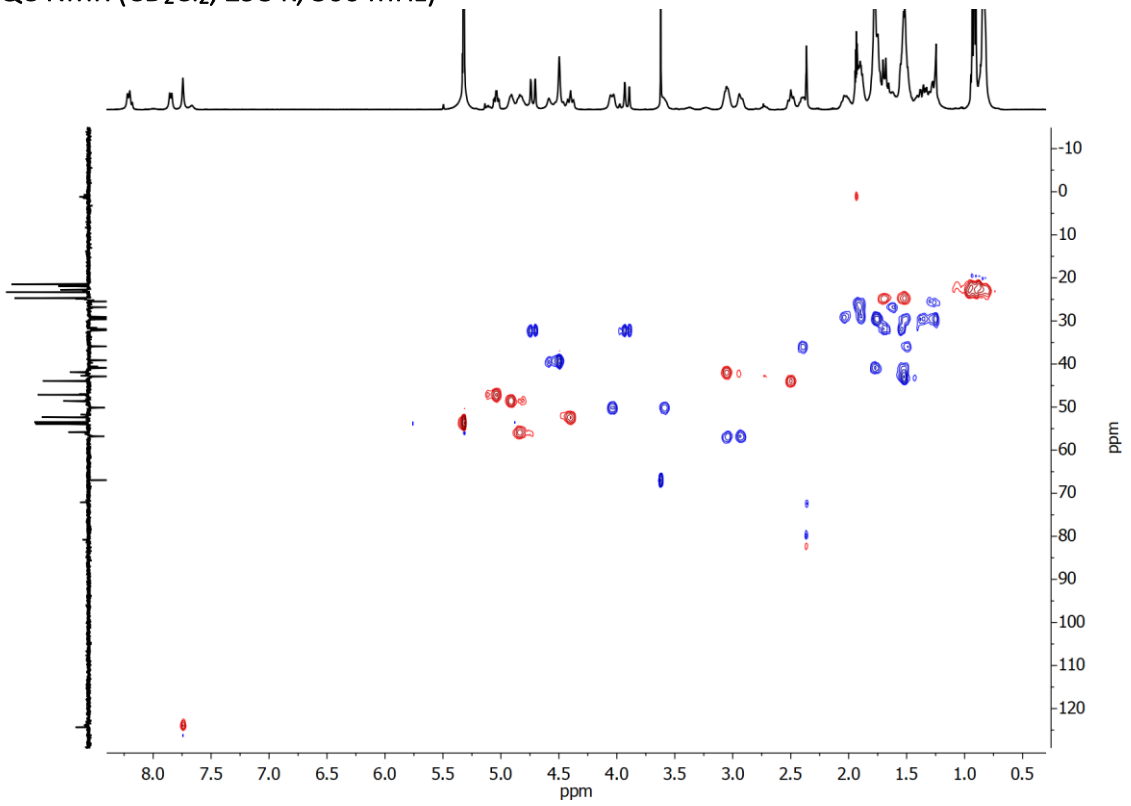


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

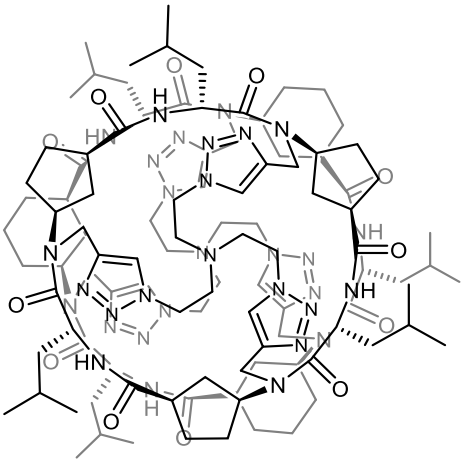
ROESY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



HSQC NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

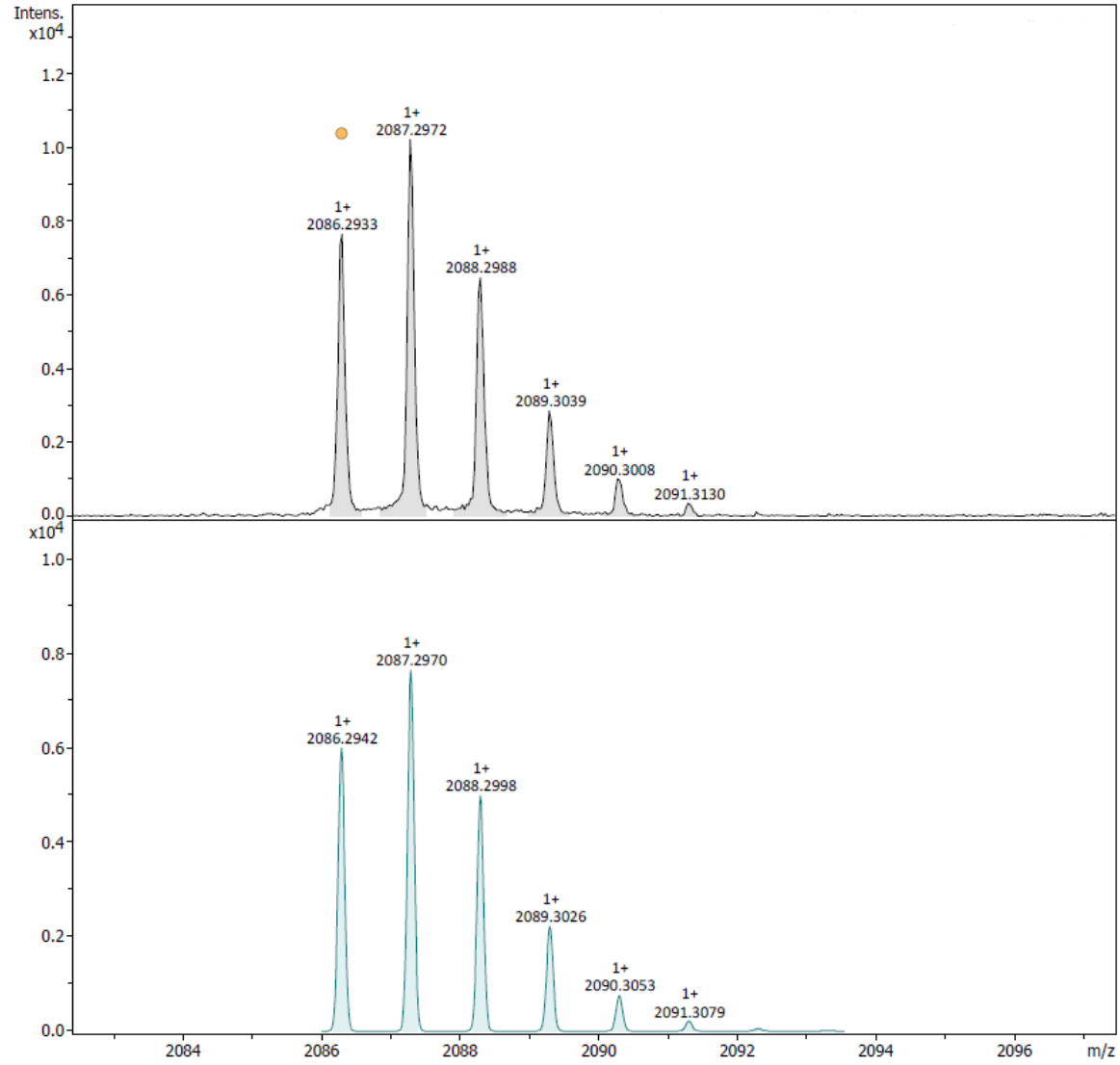


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



D8-11

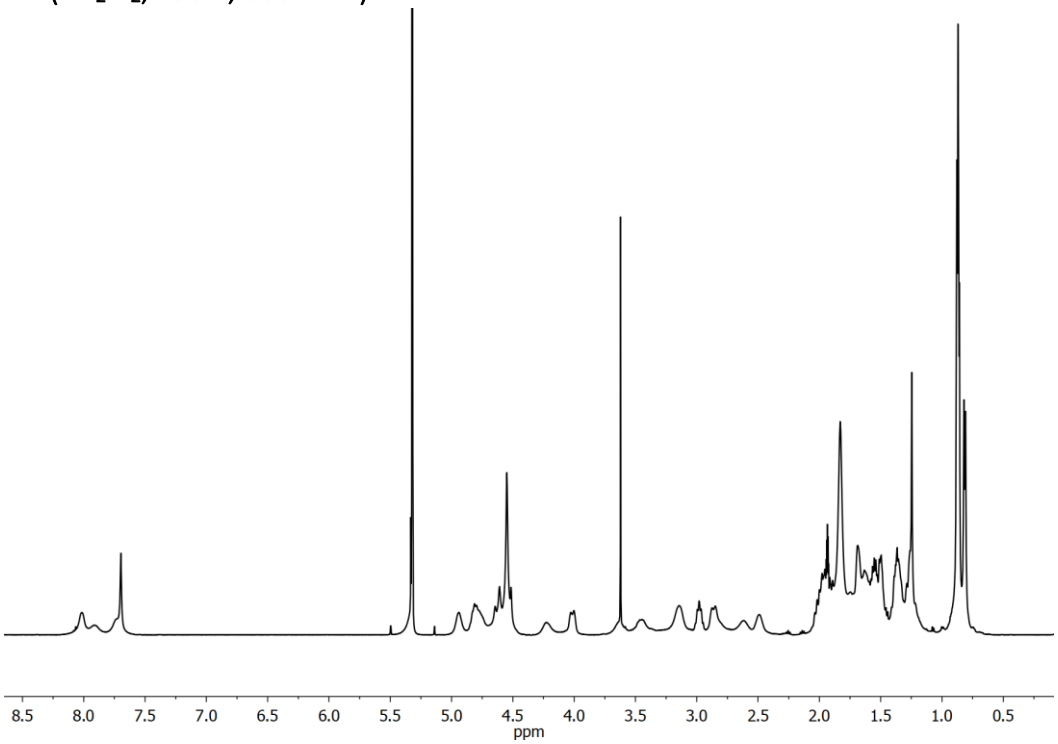
MS-ESI



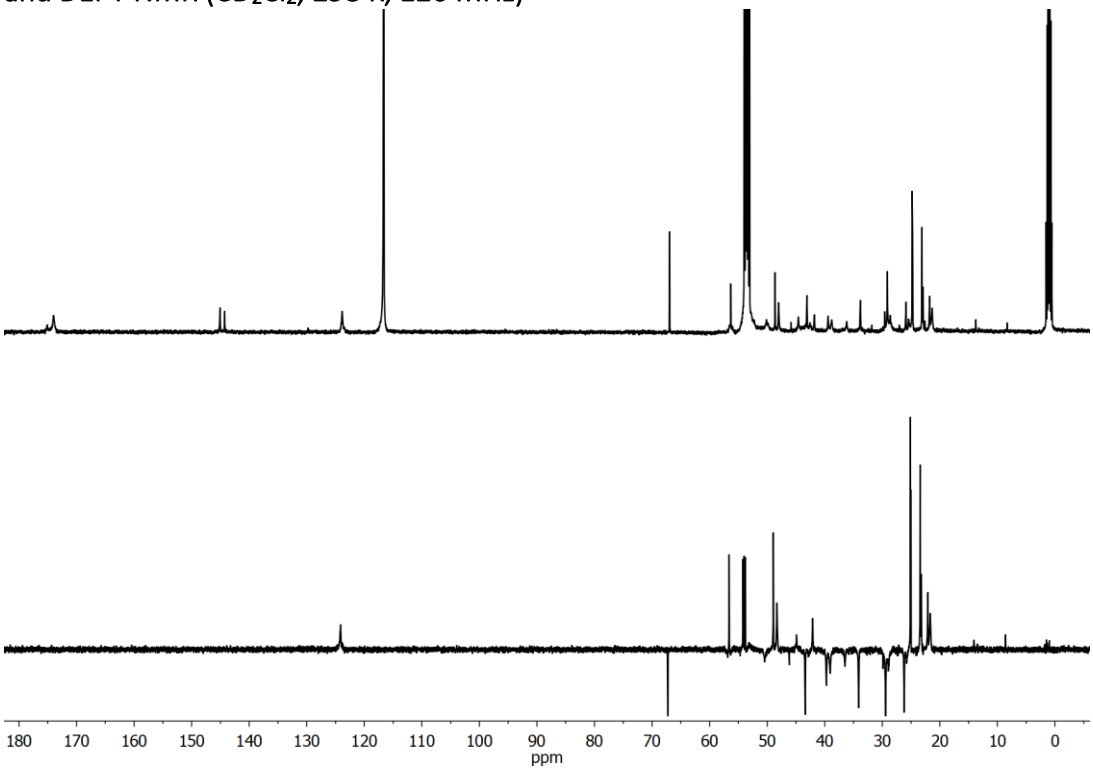
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
2086.2933	1	C105H162N32NaO12	100.00	2086.2942	1.0	0.5	17.7	41.0	even	ok

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

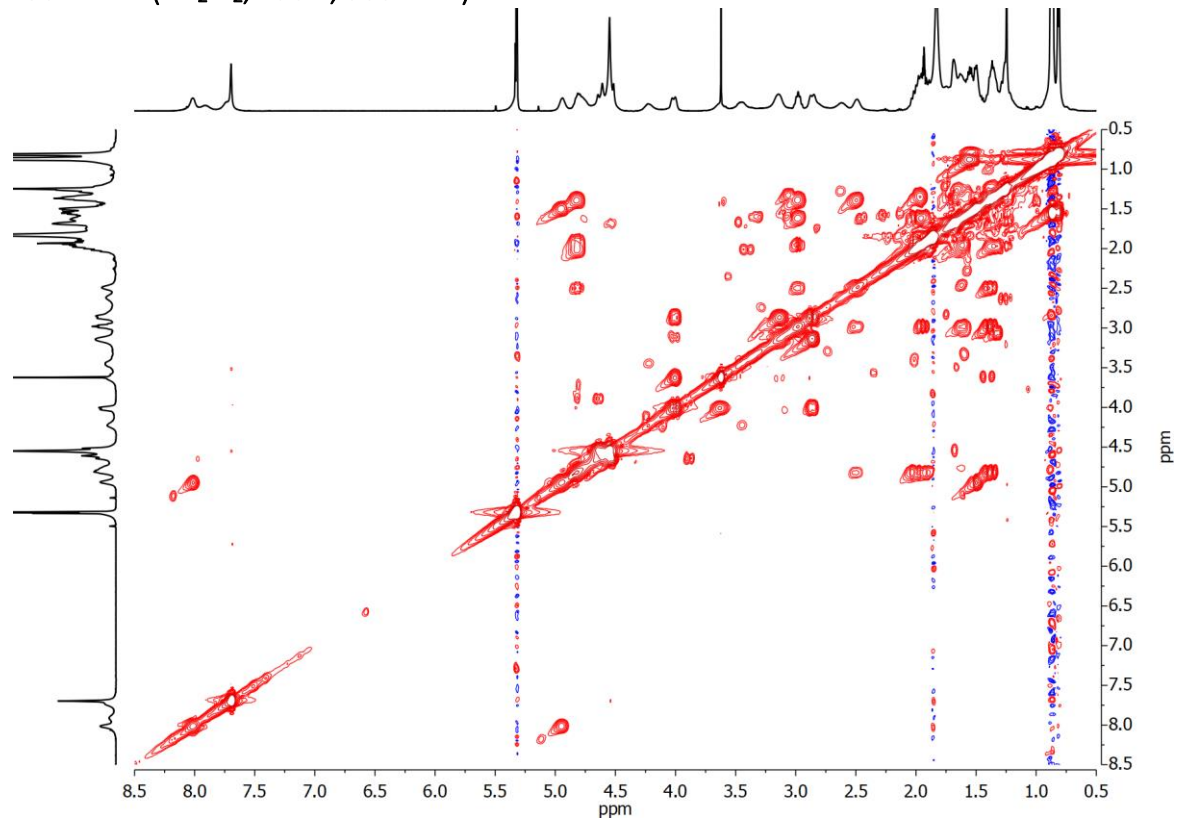


^{13}C and DEPT NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 126 MHz)

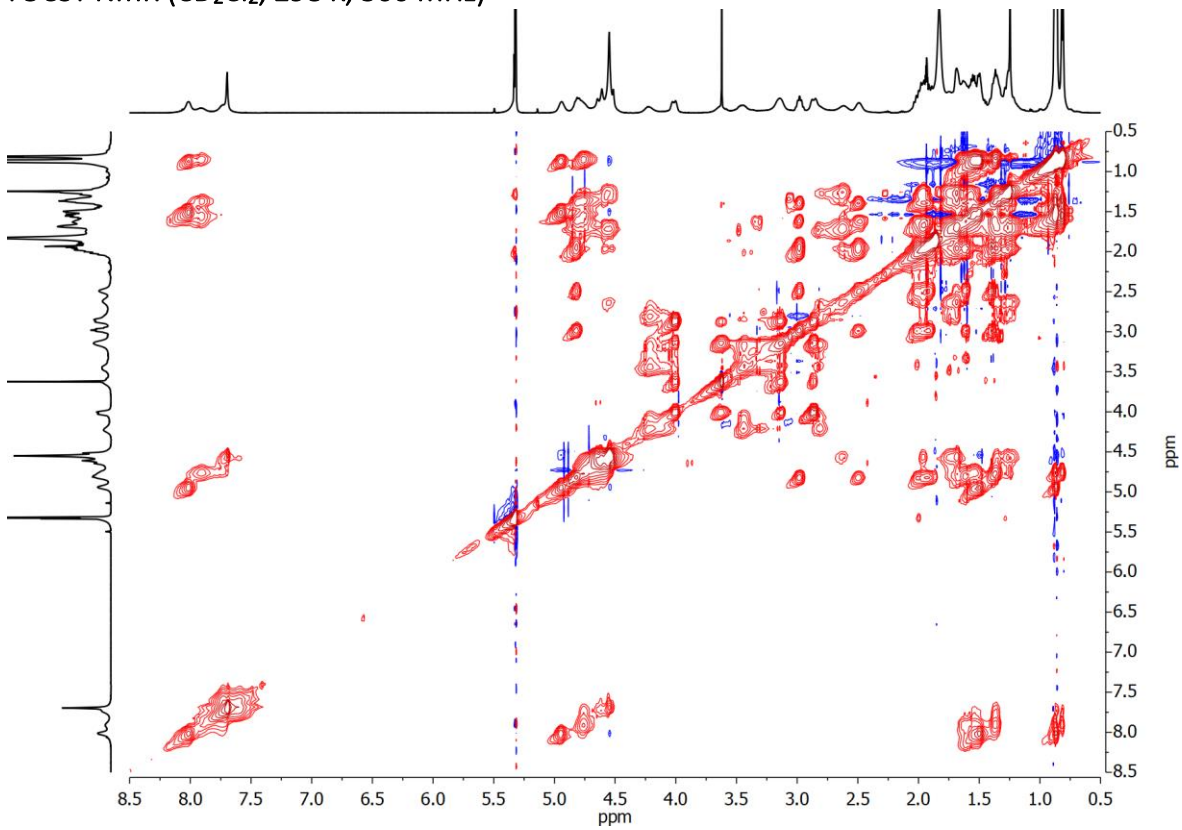


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

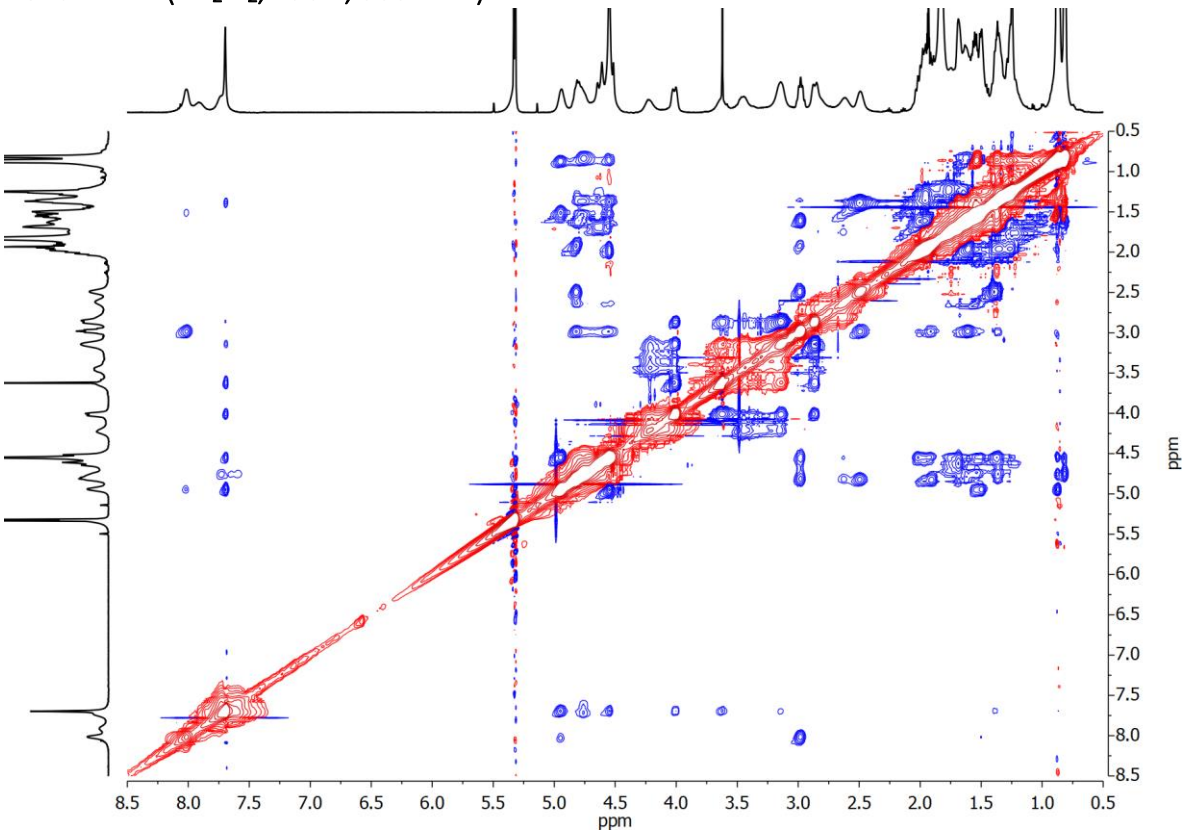


TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

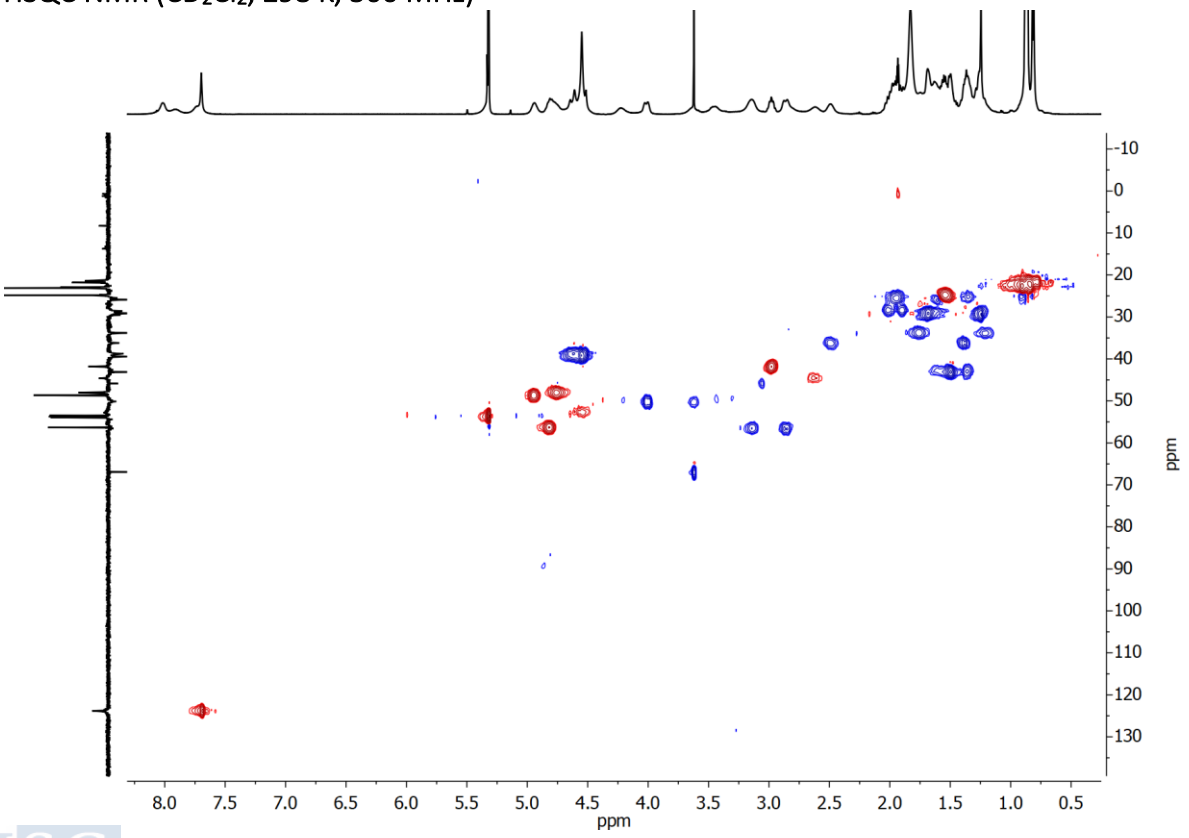


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

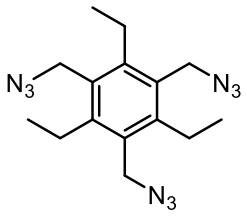
ROESY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



HSQC NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

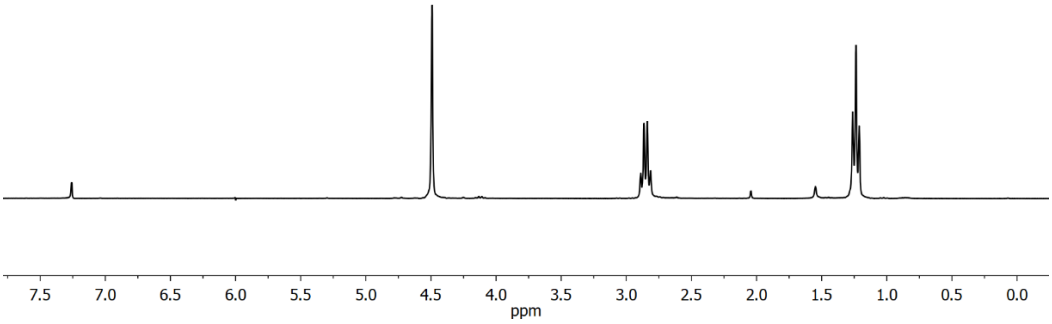


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

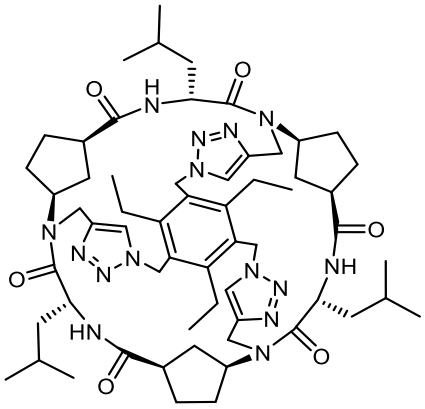


pre-cap B

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

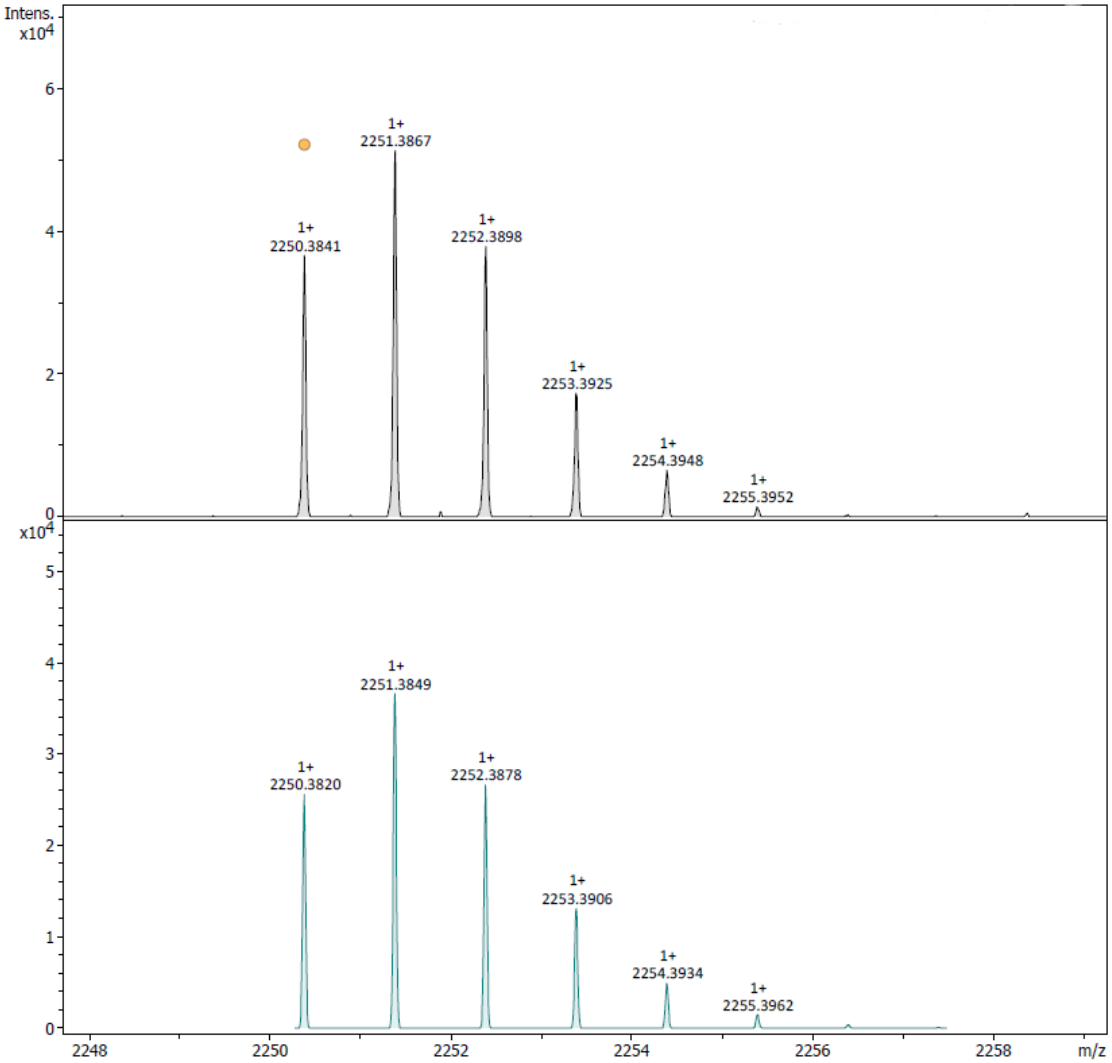


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



CP9/D9

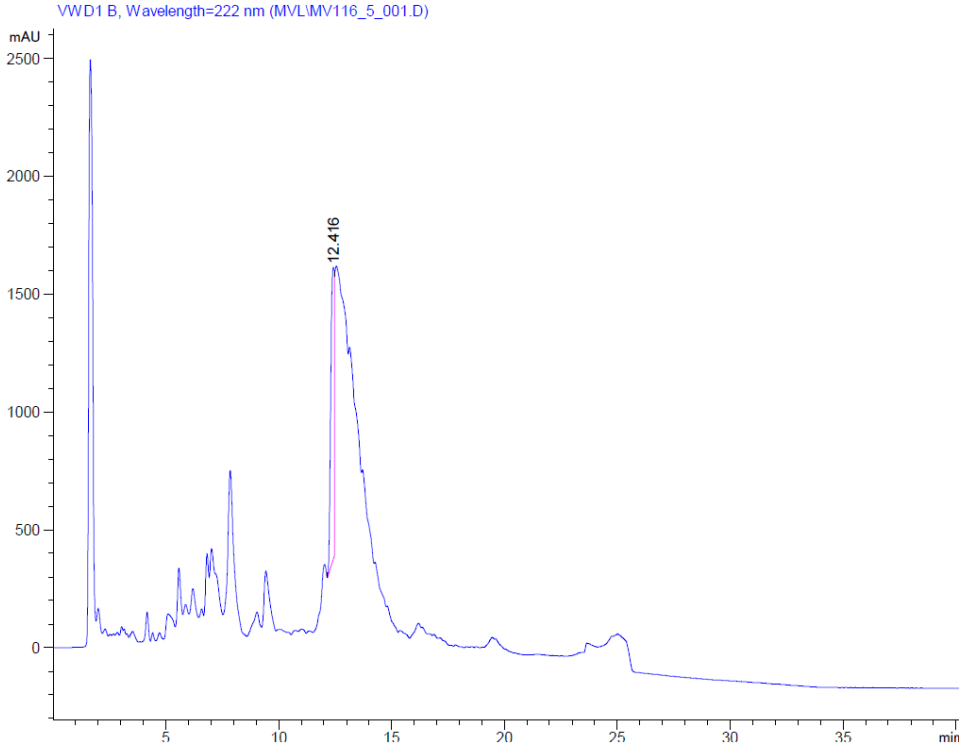
MS-ESI (real/predicted)



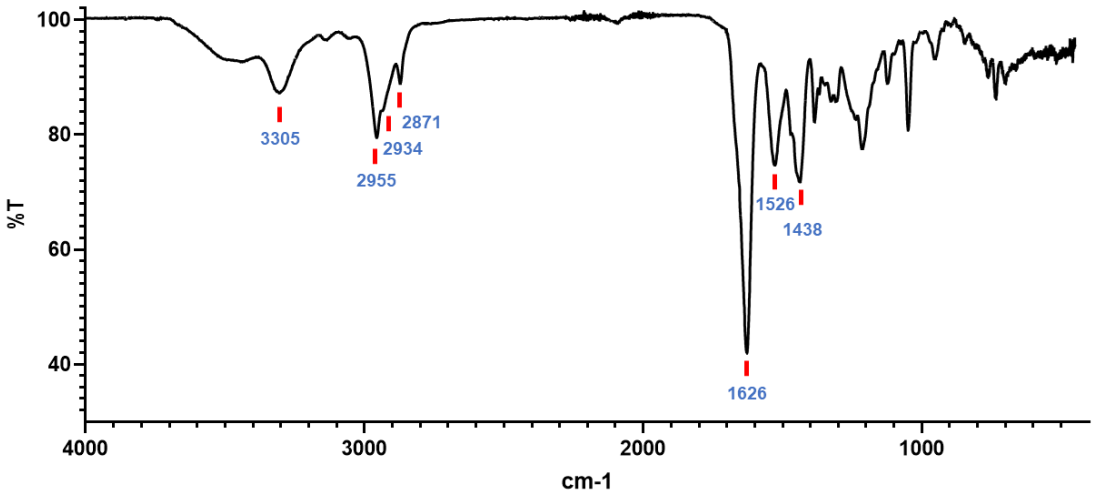
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e¯ Conf	N-Rule
1136.6878	1	C60H87N15NaO6	100.00	1136.6856	-2.3	-2.0	9.7	25.0	even	ok
2250.3841	1	C120H174N30NaO12	100.00	2250.3820	-2.1	-0.9	21.0	49.0	even	ok

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

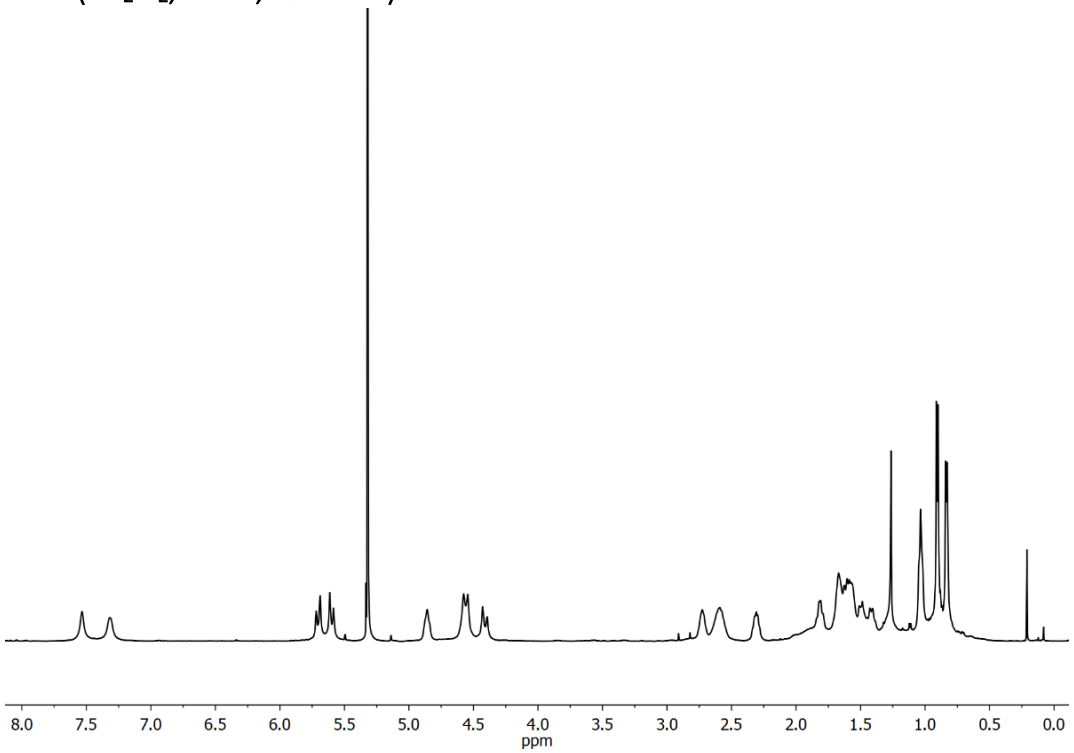
HPLC CROMATOGRAM



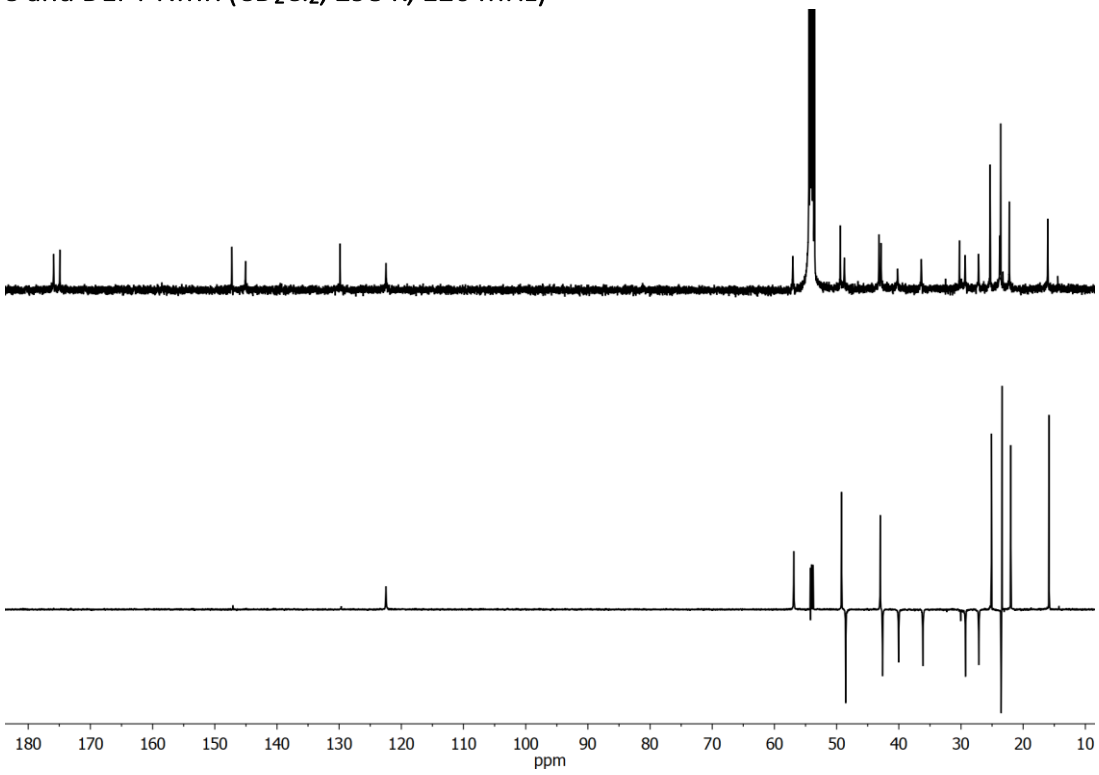
FTIR



^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

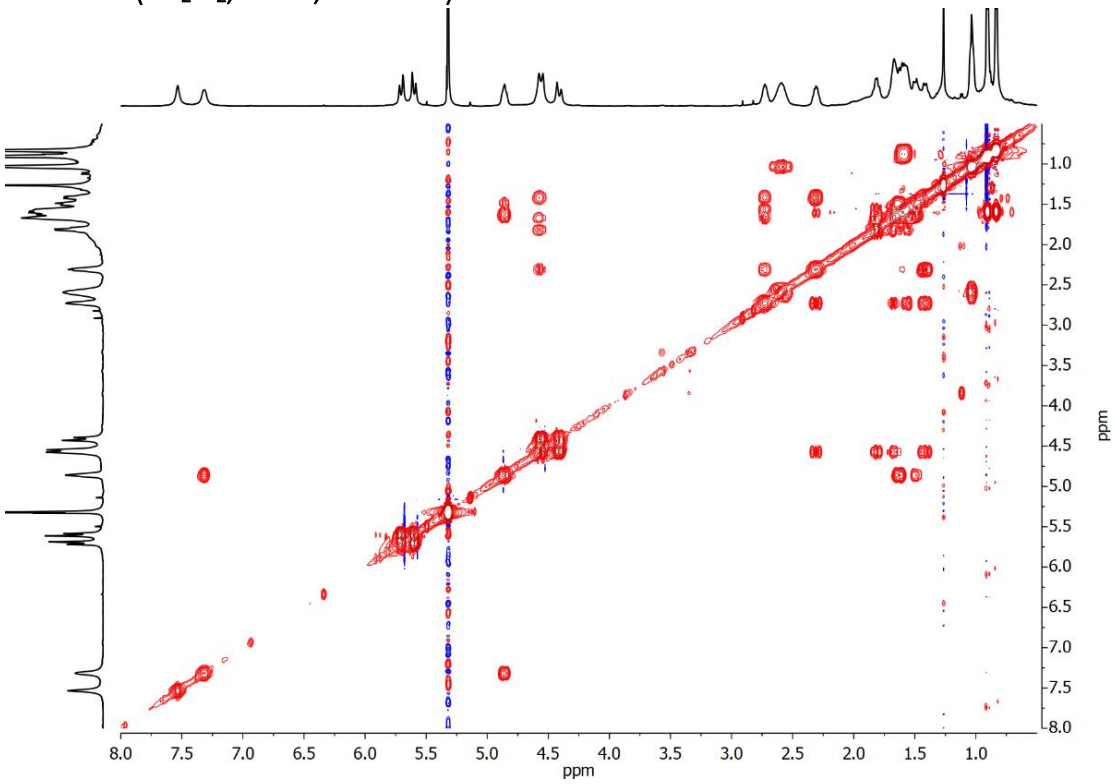


^{13}C and DEPT NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 126 MHz)

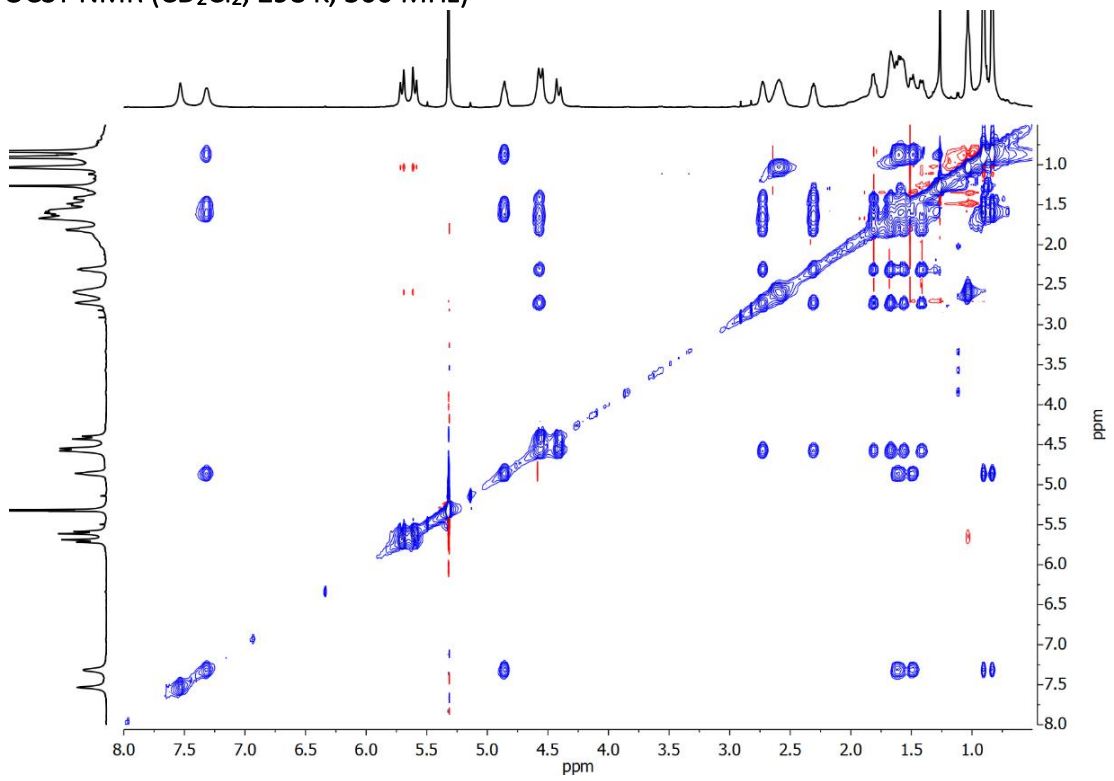


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

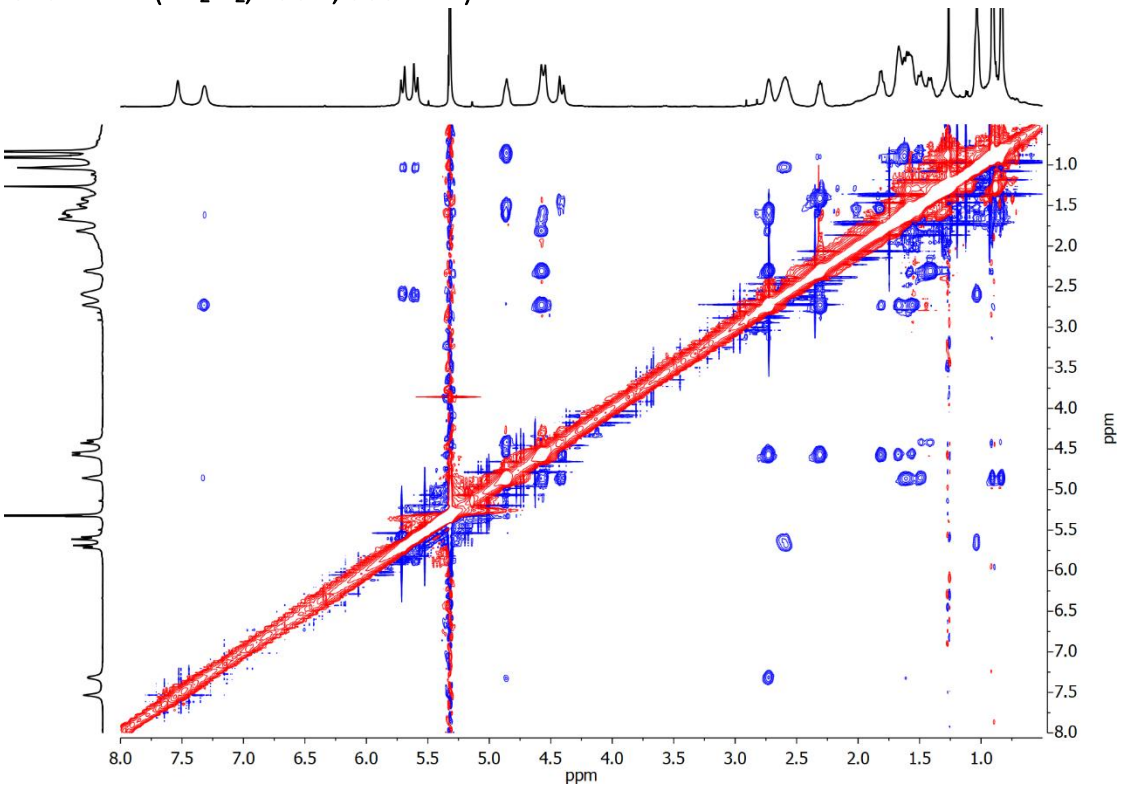


TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

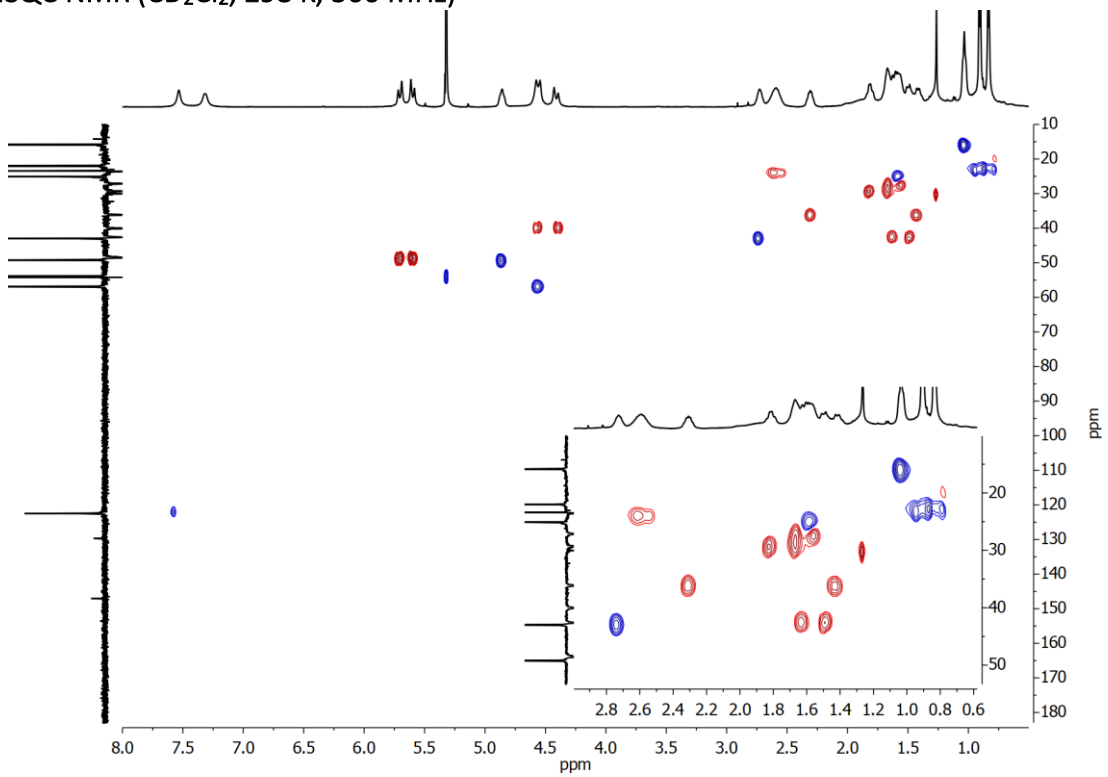


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

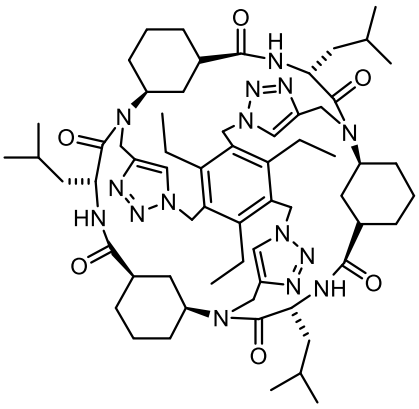
ROESY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



HSQC NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

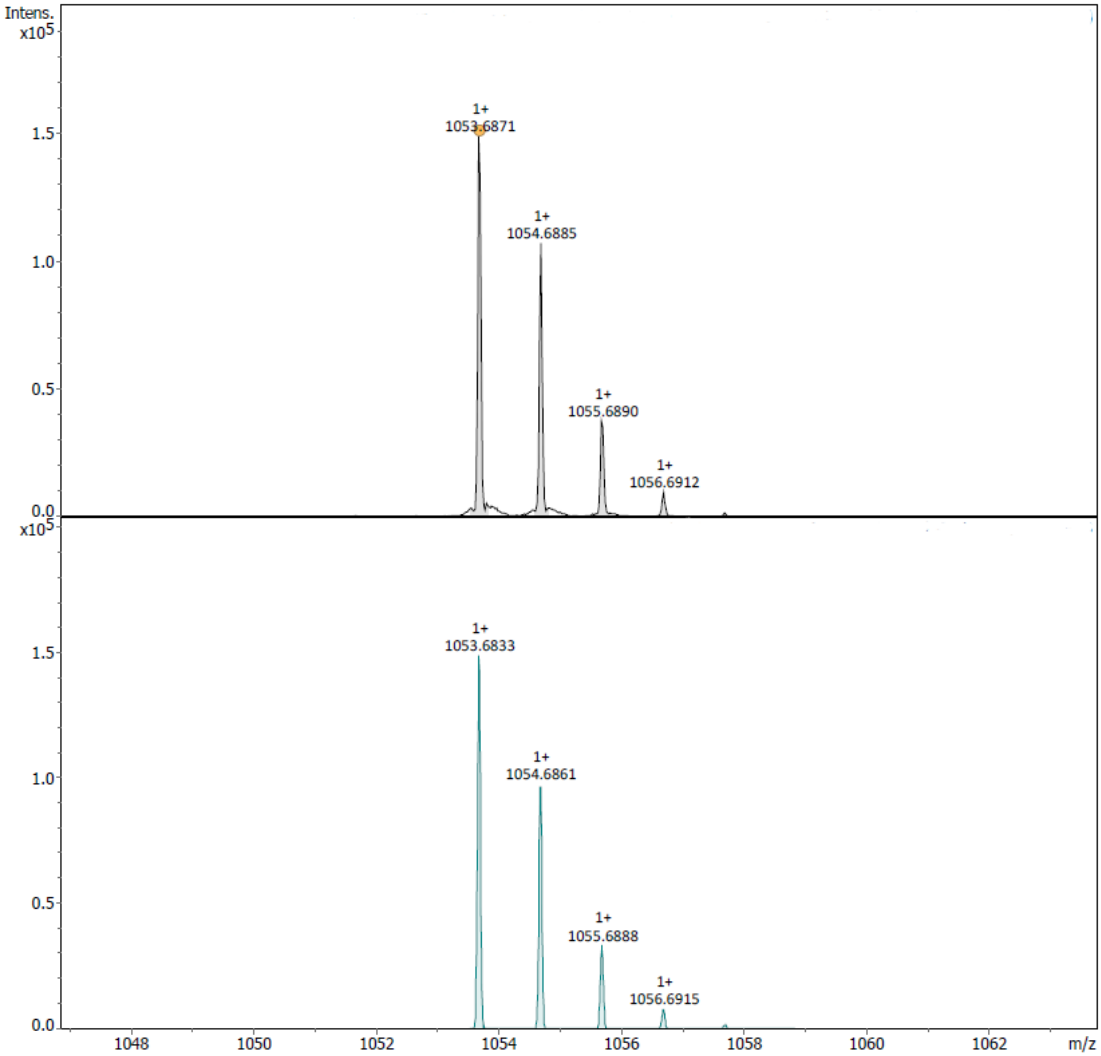


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



CP12

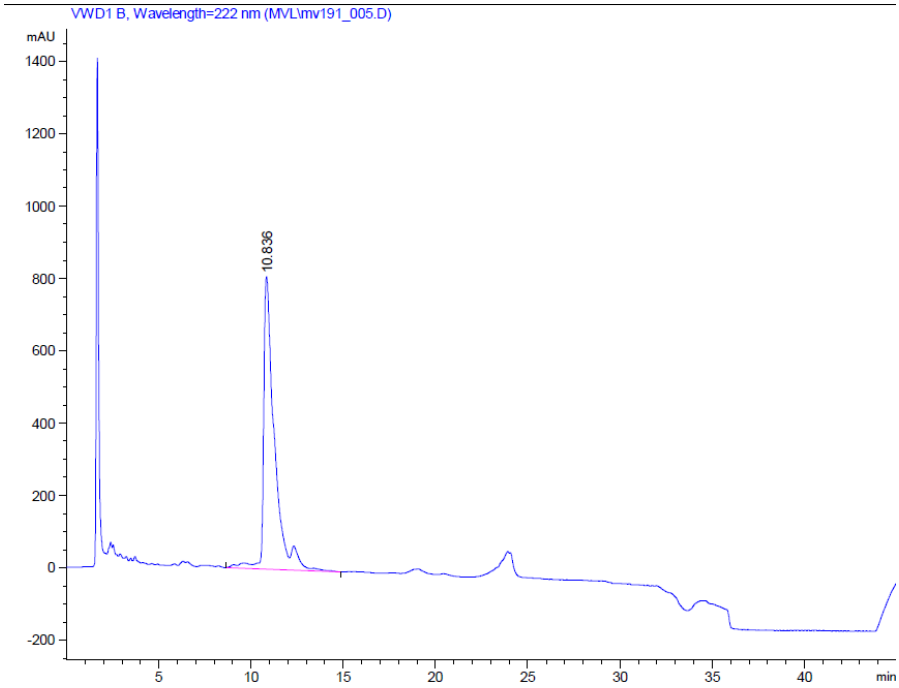
MS-ESI (real/predicted)



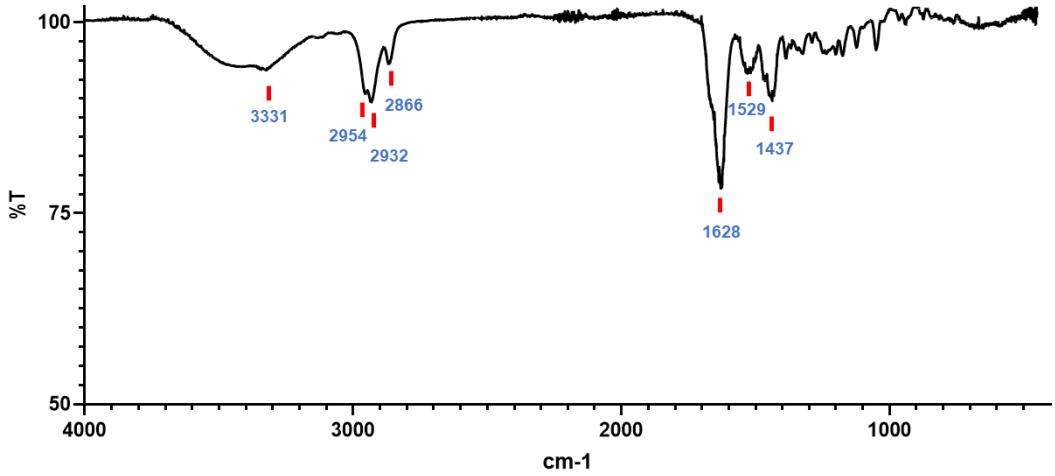
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e¯ Conf	N-Rule
1053.6871	1	C54H85N16O6	100.00	1053.6833	-3.8	-3.6	32.1	21.0	even	ok

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HPLC CROMATOGRAM

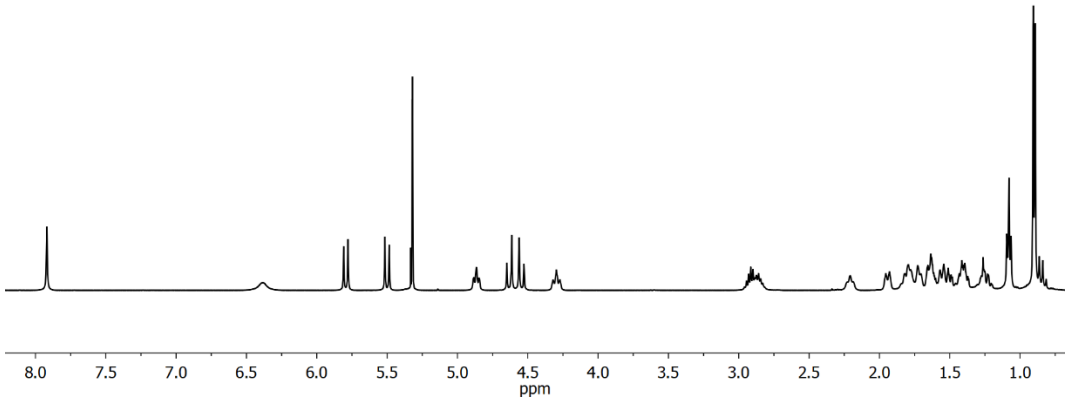


FTIR

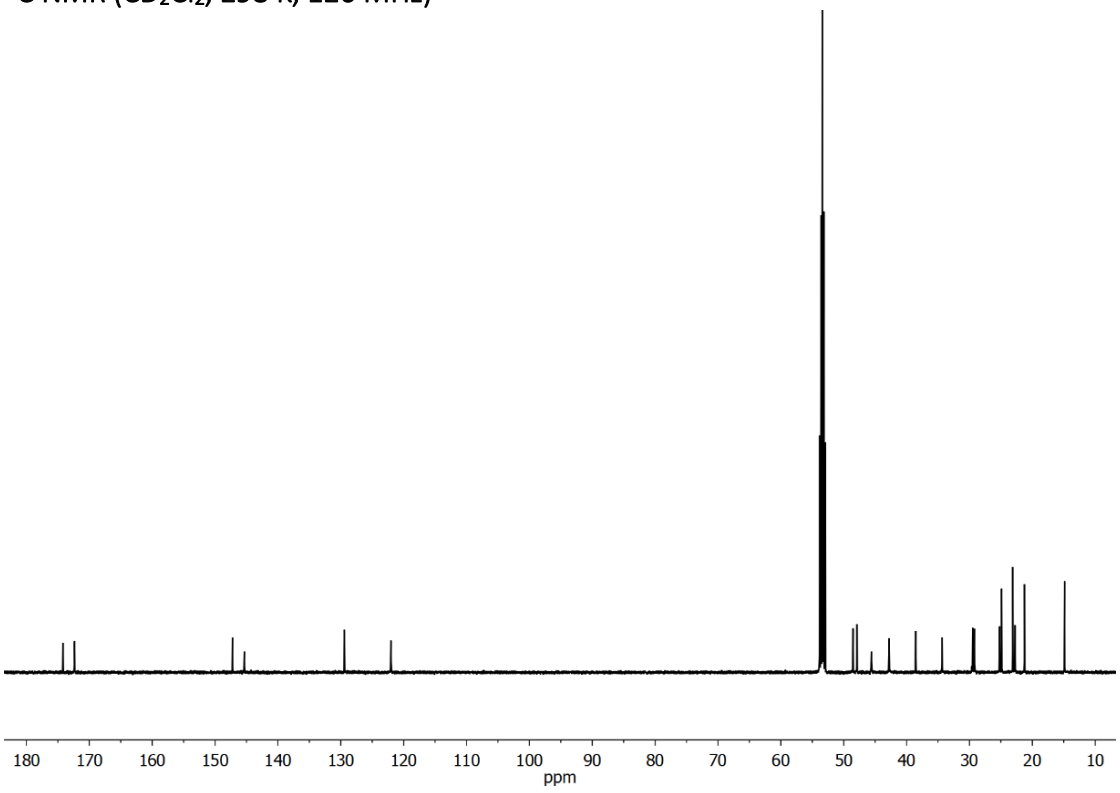


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

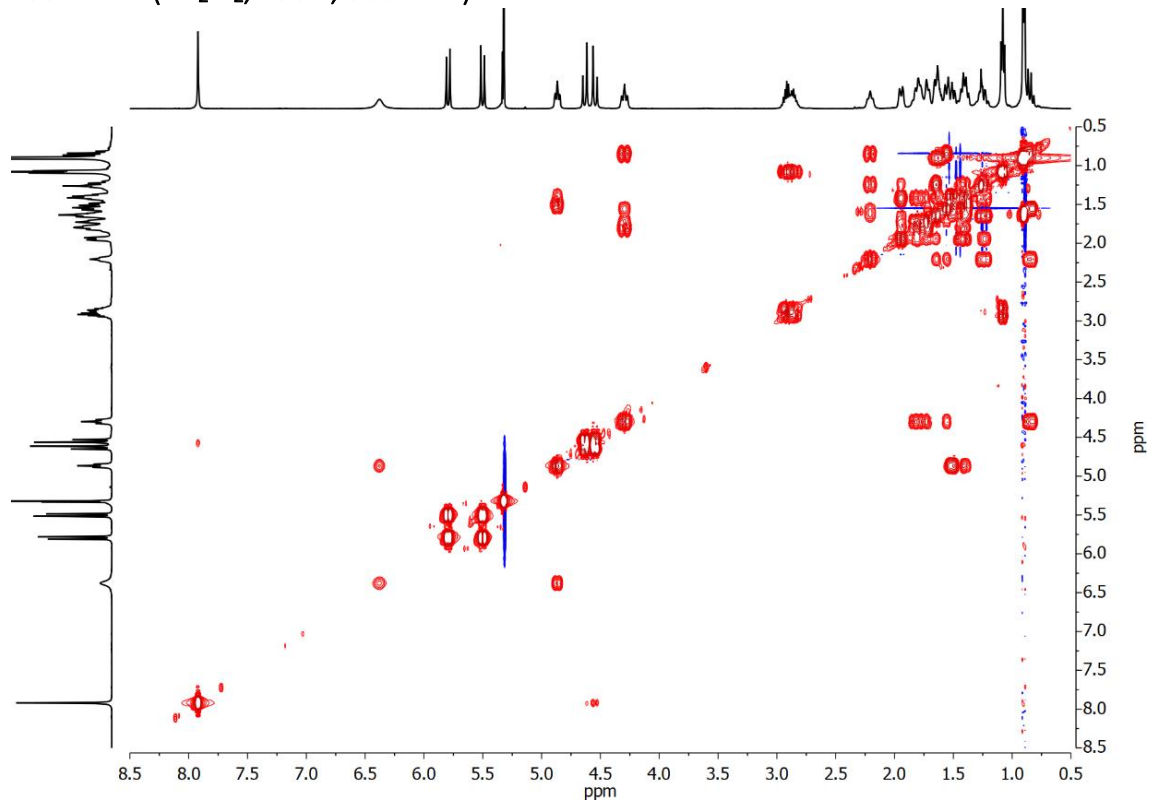


^{13}C NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 126 MHz)

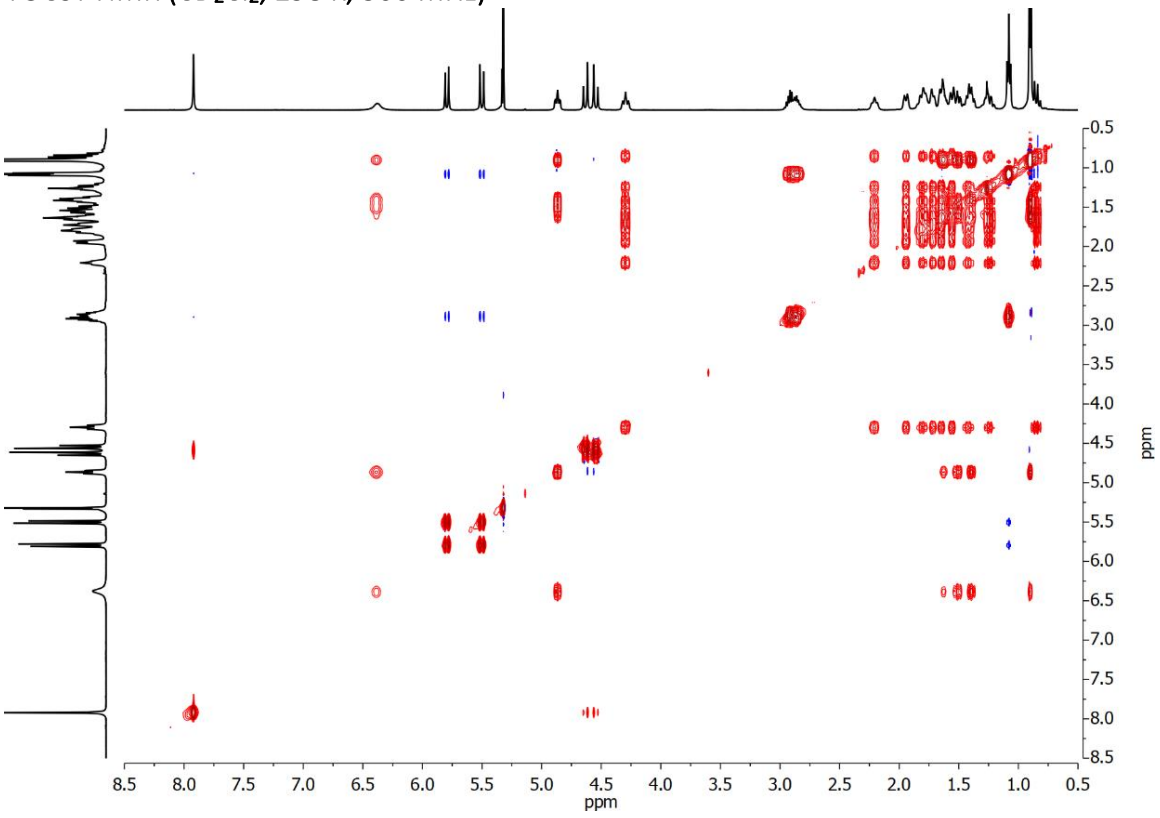


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

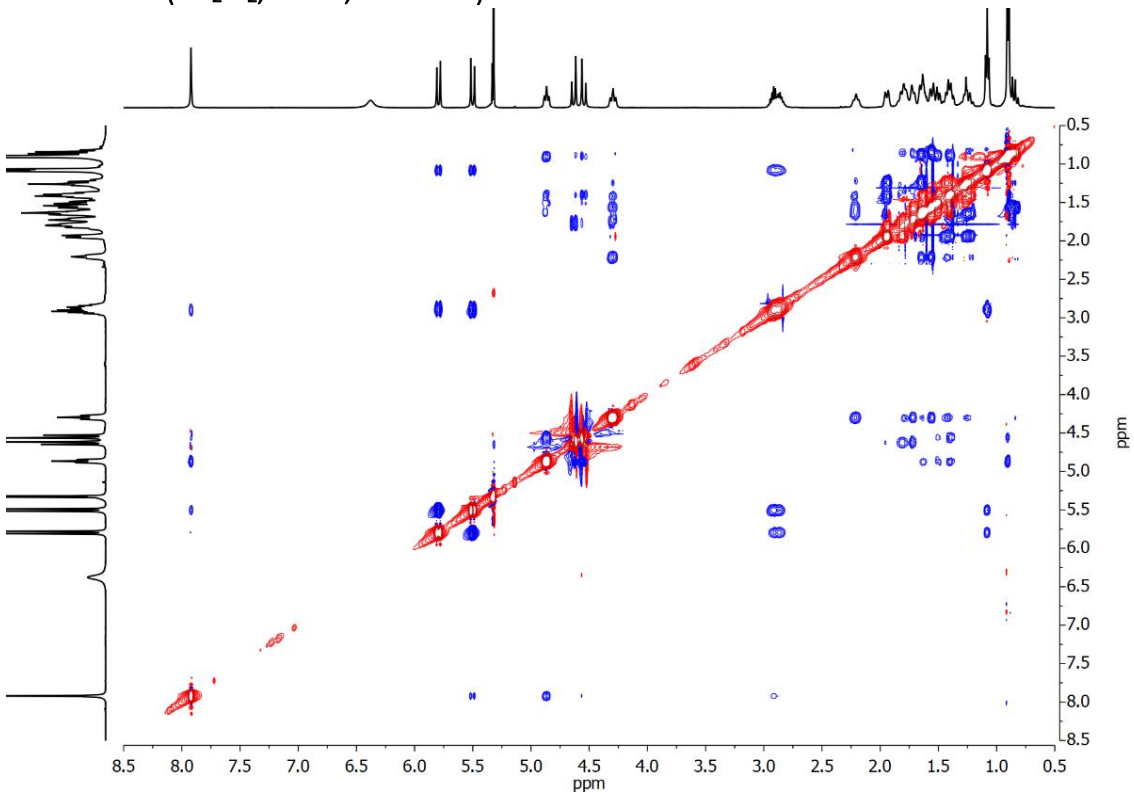


TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

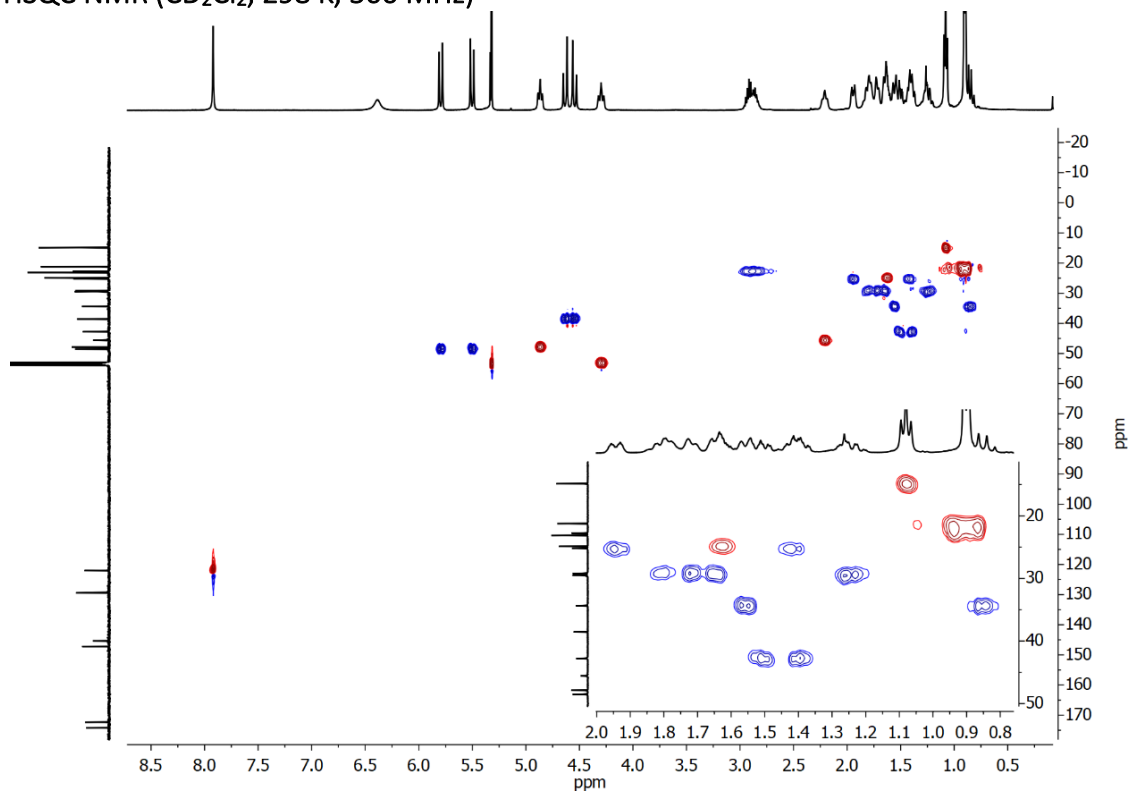


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

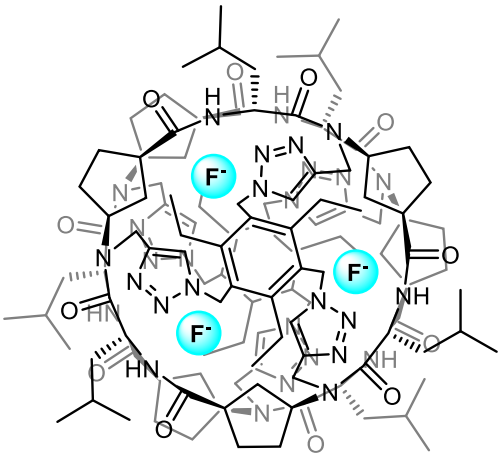
ROESY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



HSQC NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

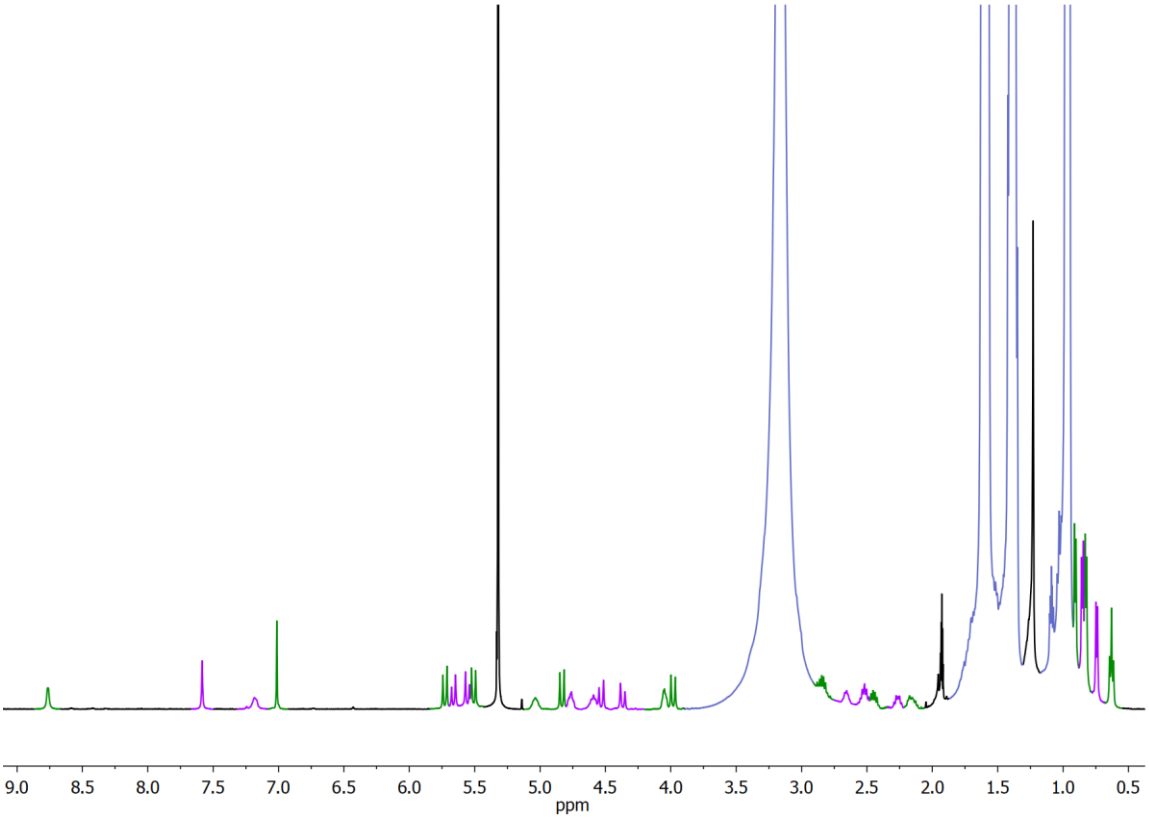


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



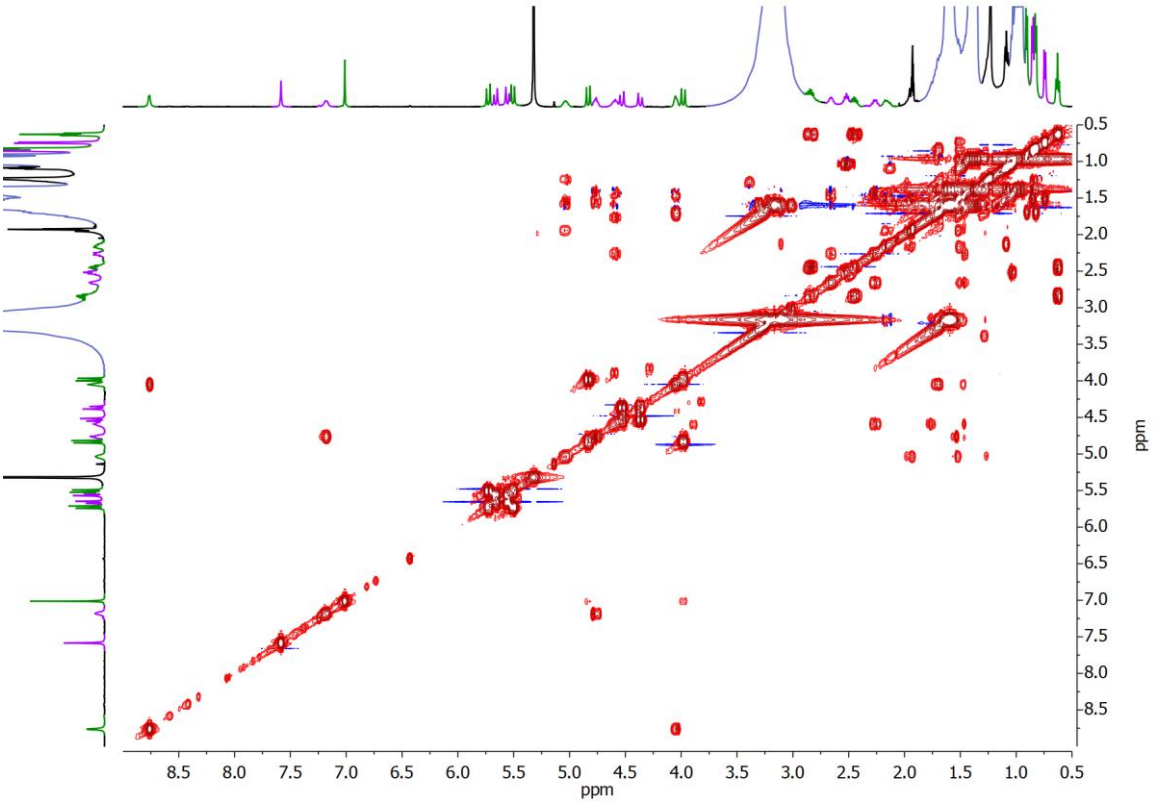
D9/D9-Fluoride

^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

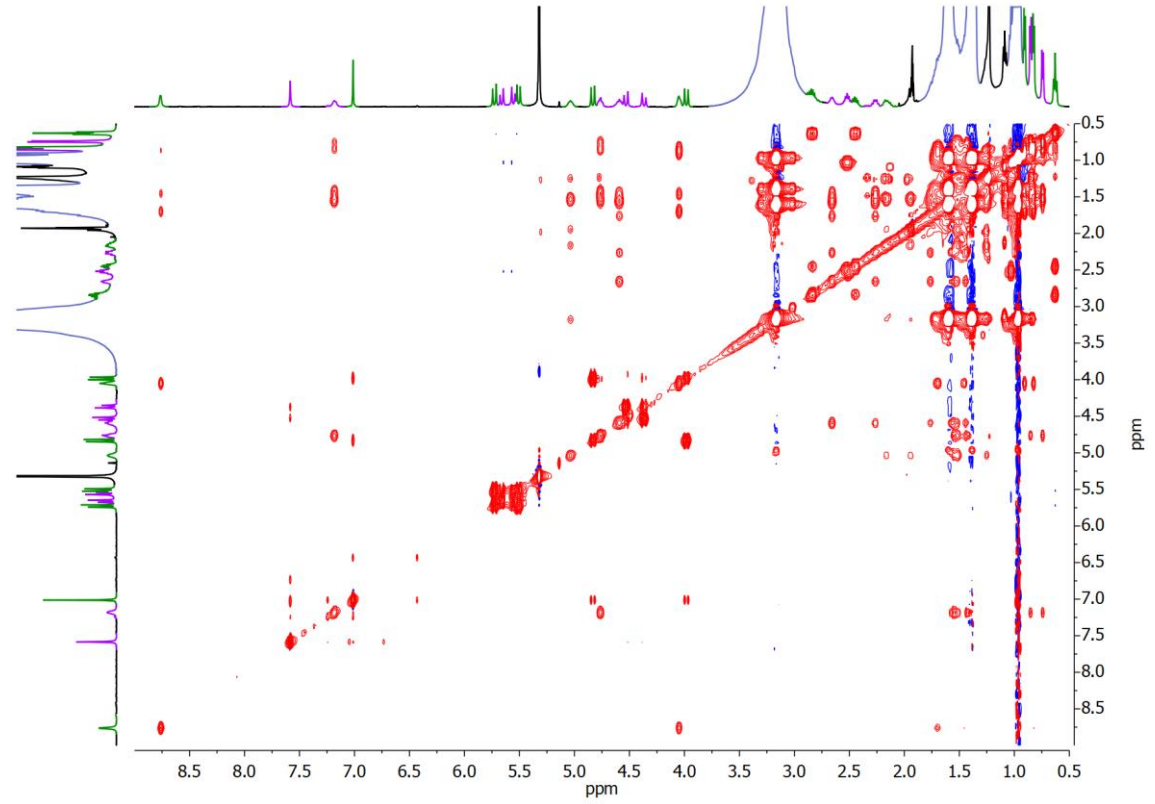


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

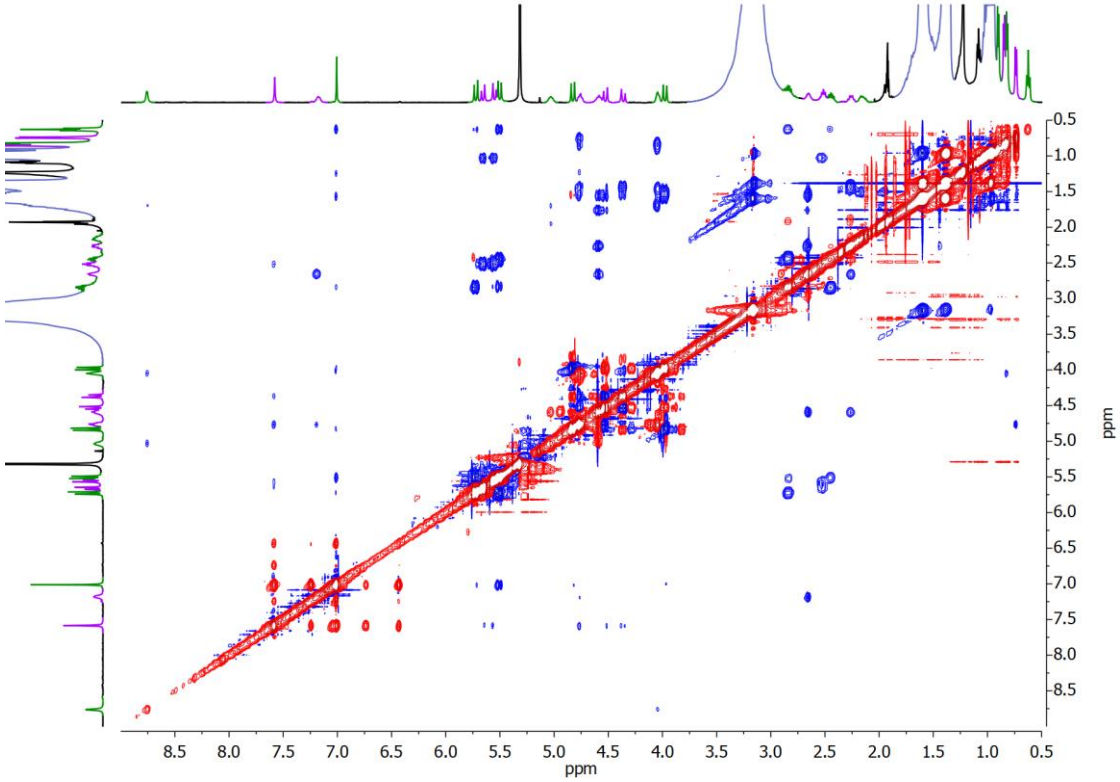


TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

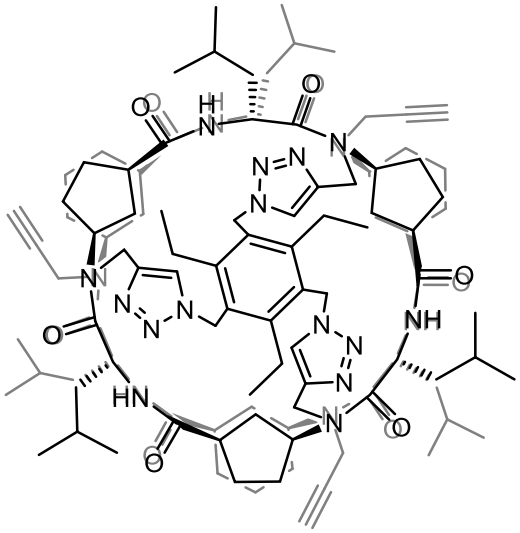


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ROESY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

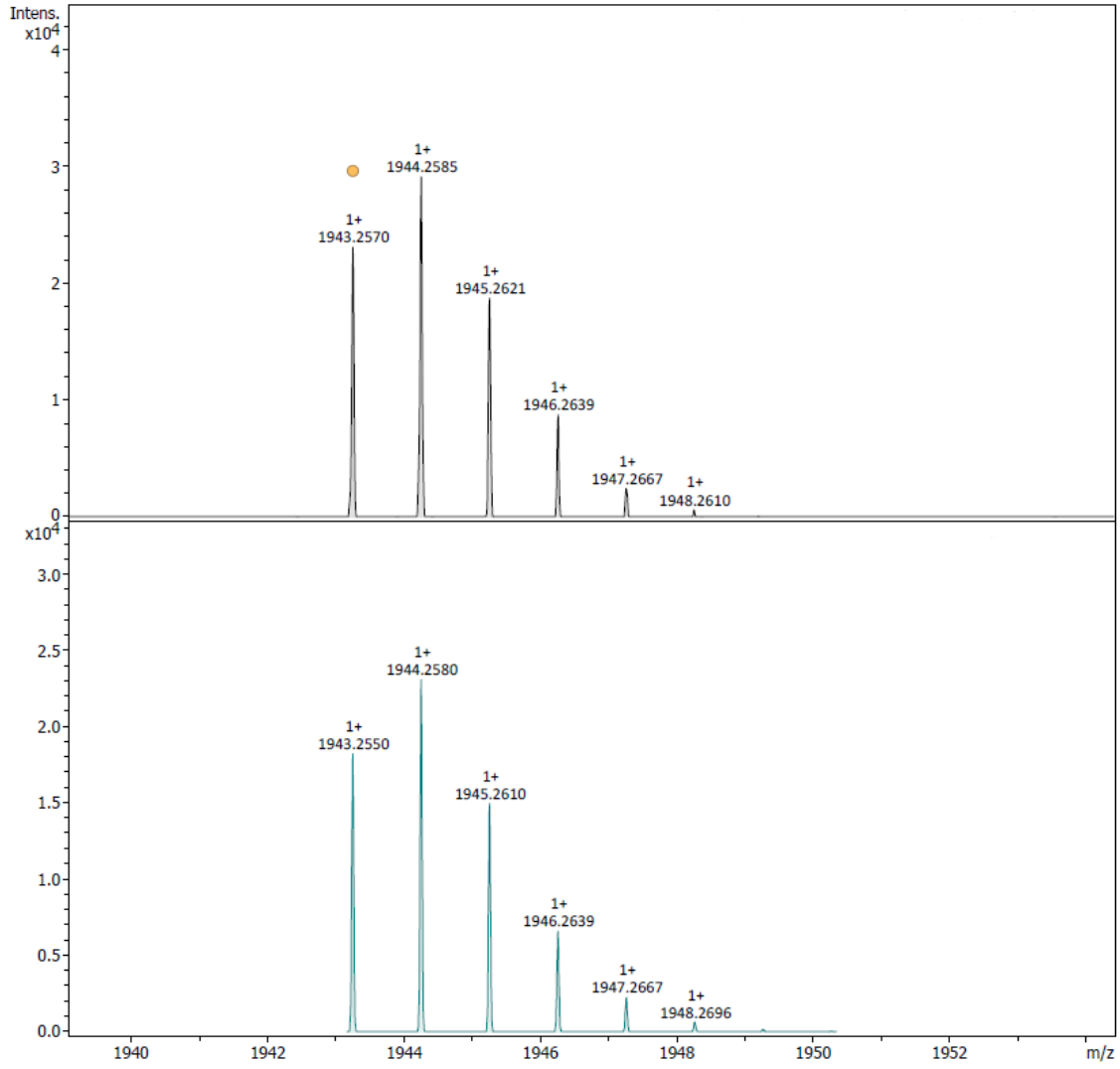


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



D9-10

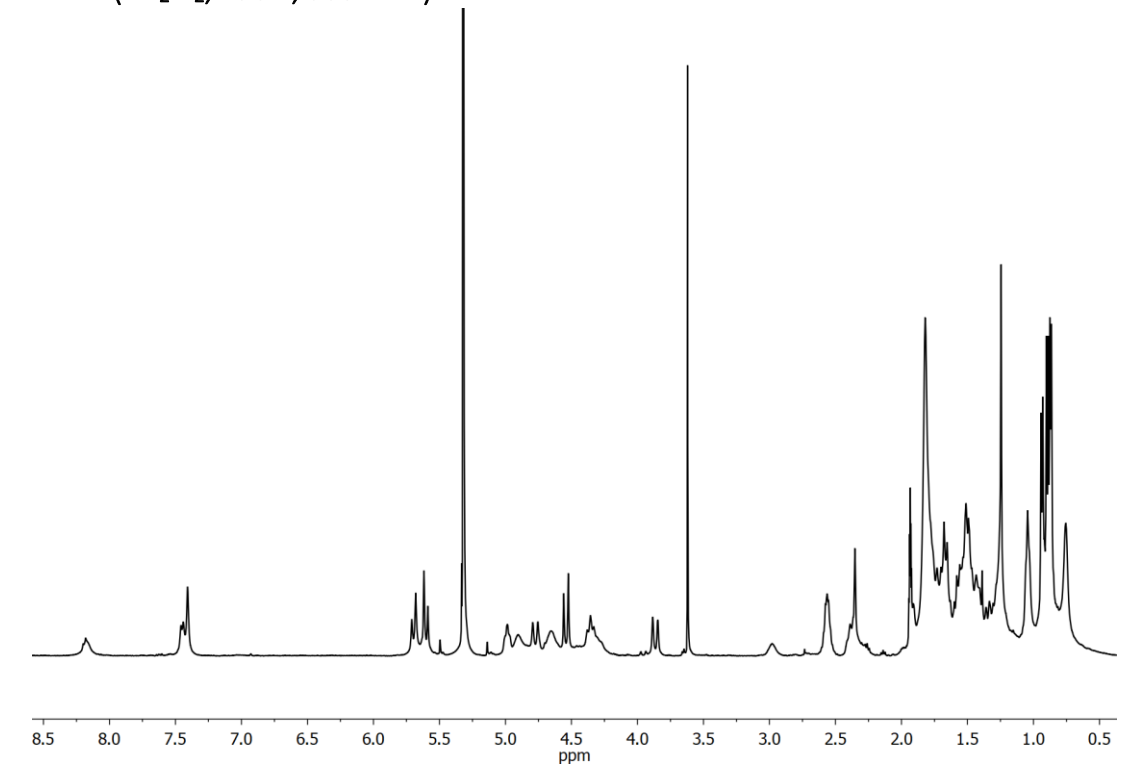
MS-ESI



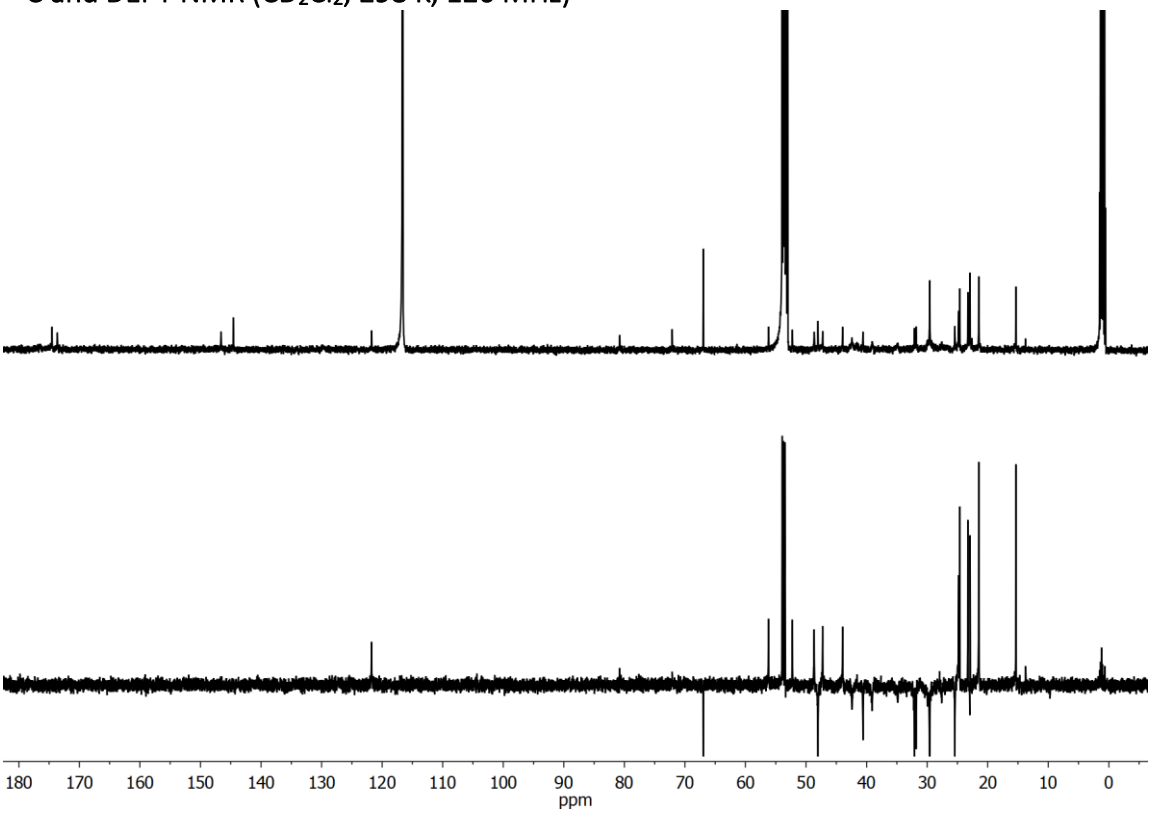
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
1943.2570	1	C108H160N21O12	100.00	1943.2550	-2.0	-1.0	13.7	40.0	even	ok

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

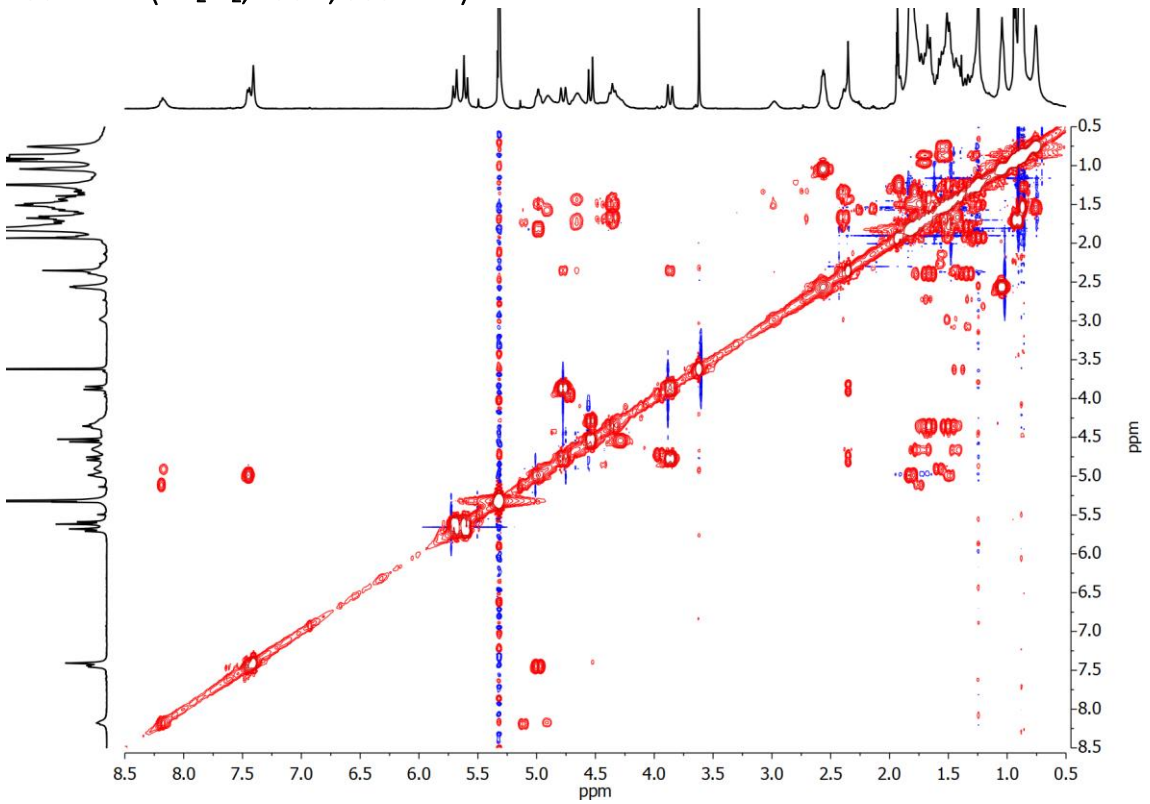


^{13}C and DEPT NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 126 MHz)

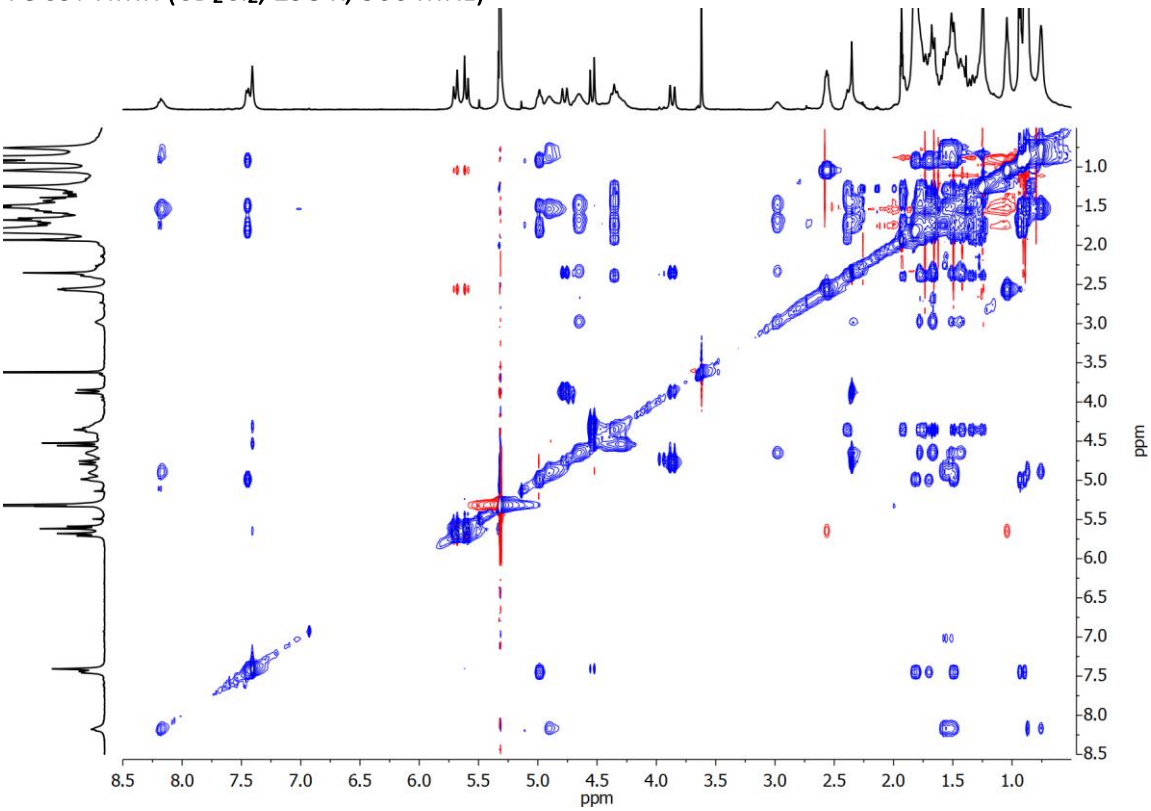


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

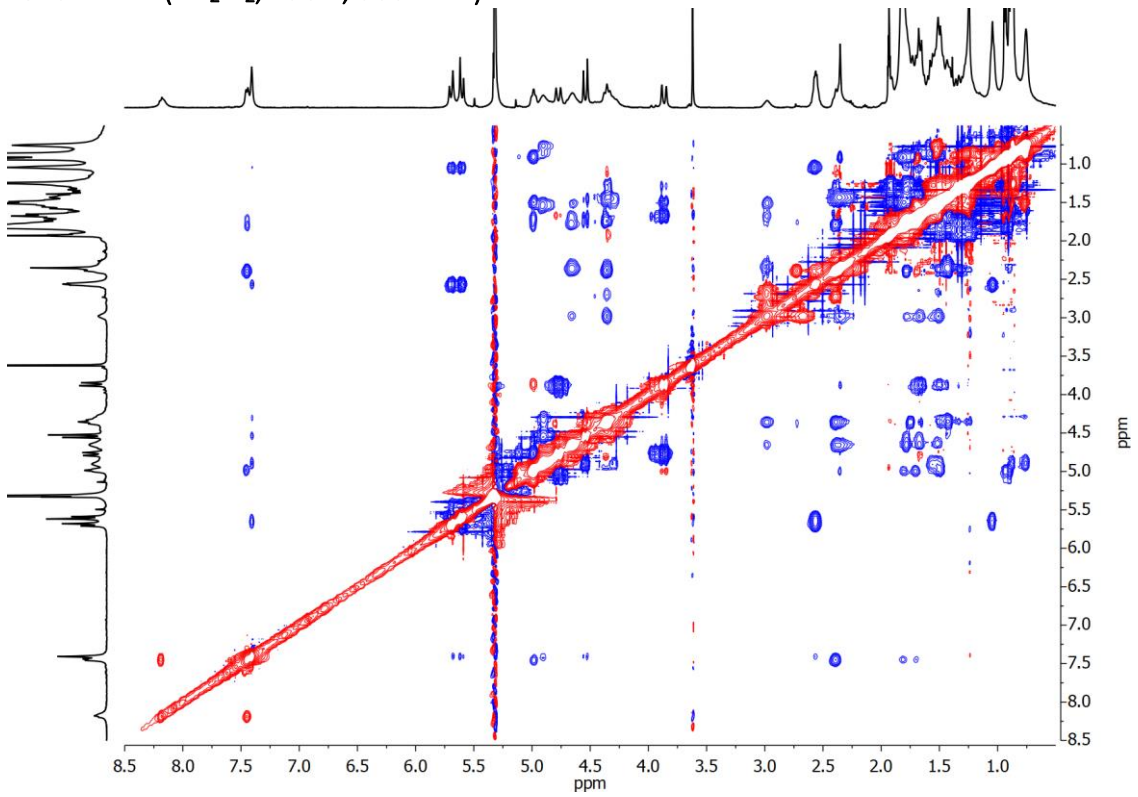


TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

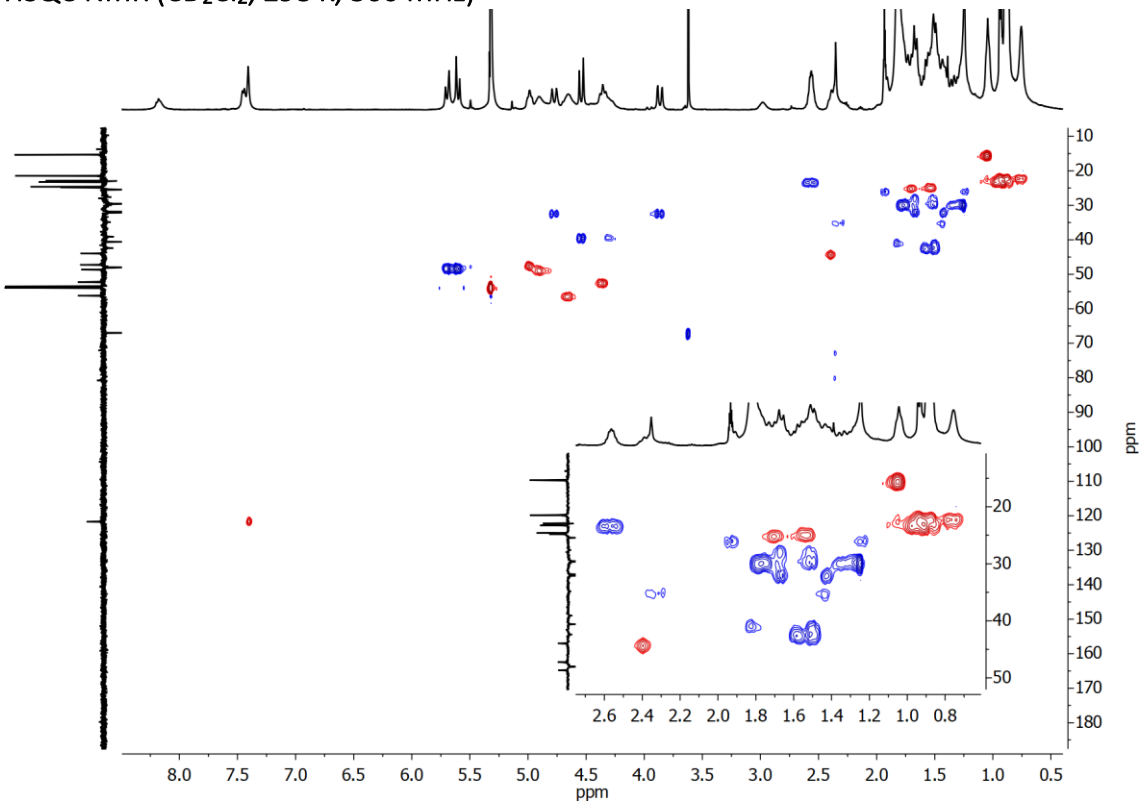


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

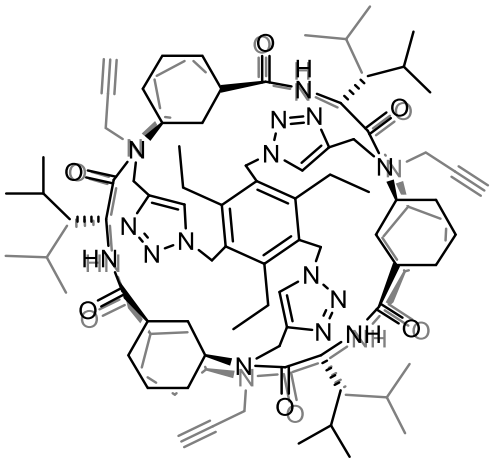
ROESY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



HSQC NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

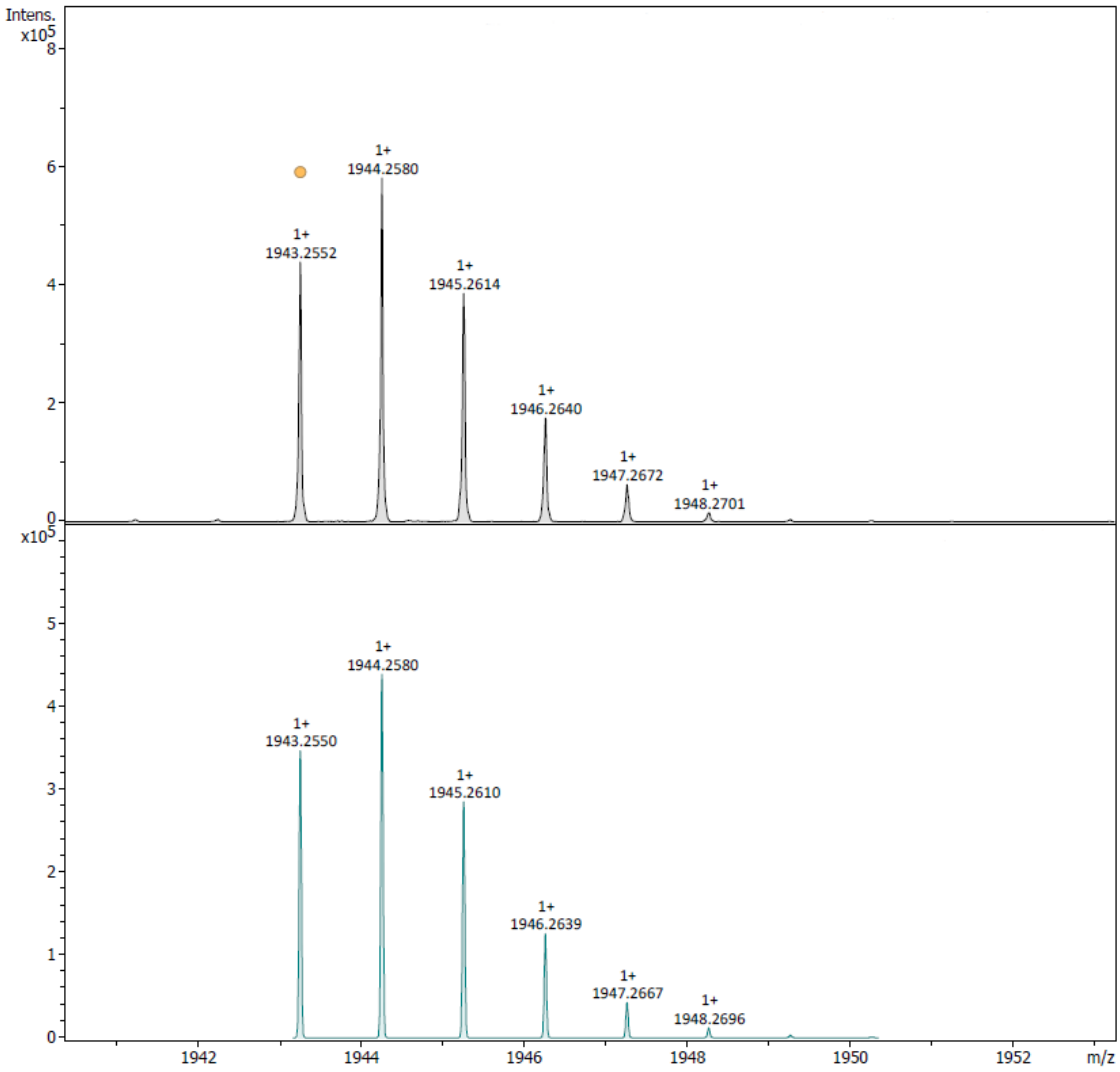


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



D5-12

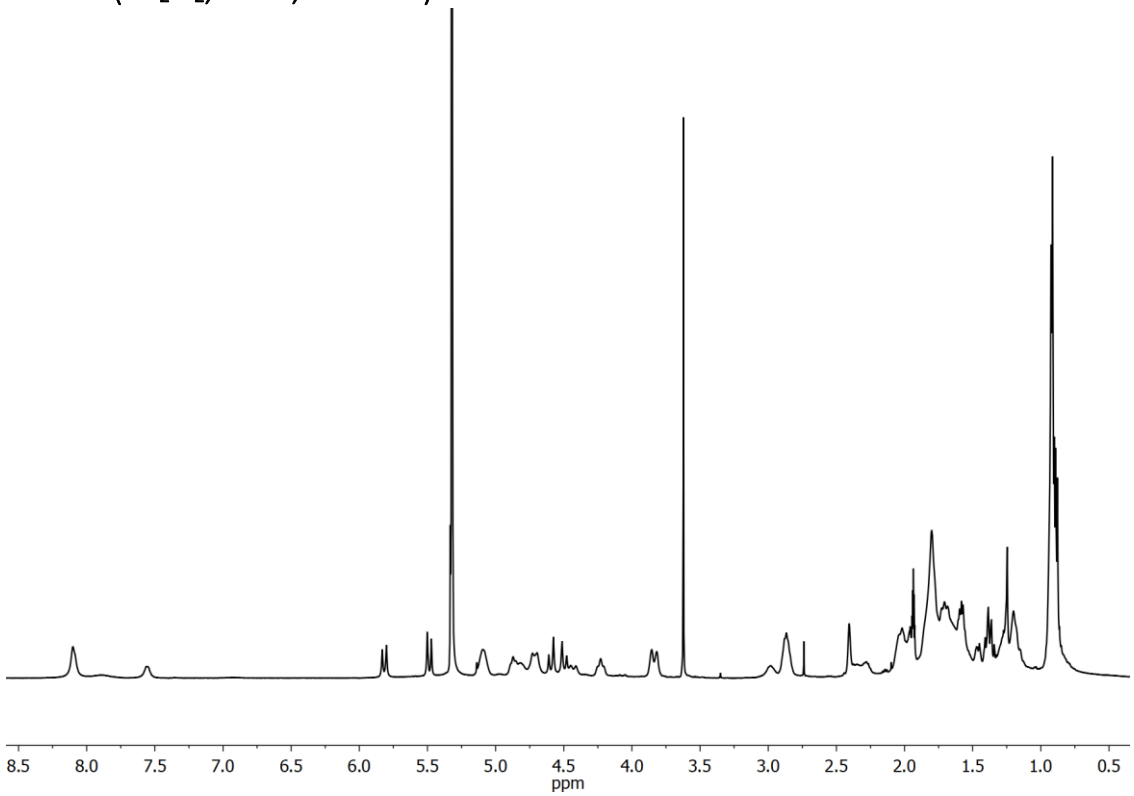
MS-ESI



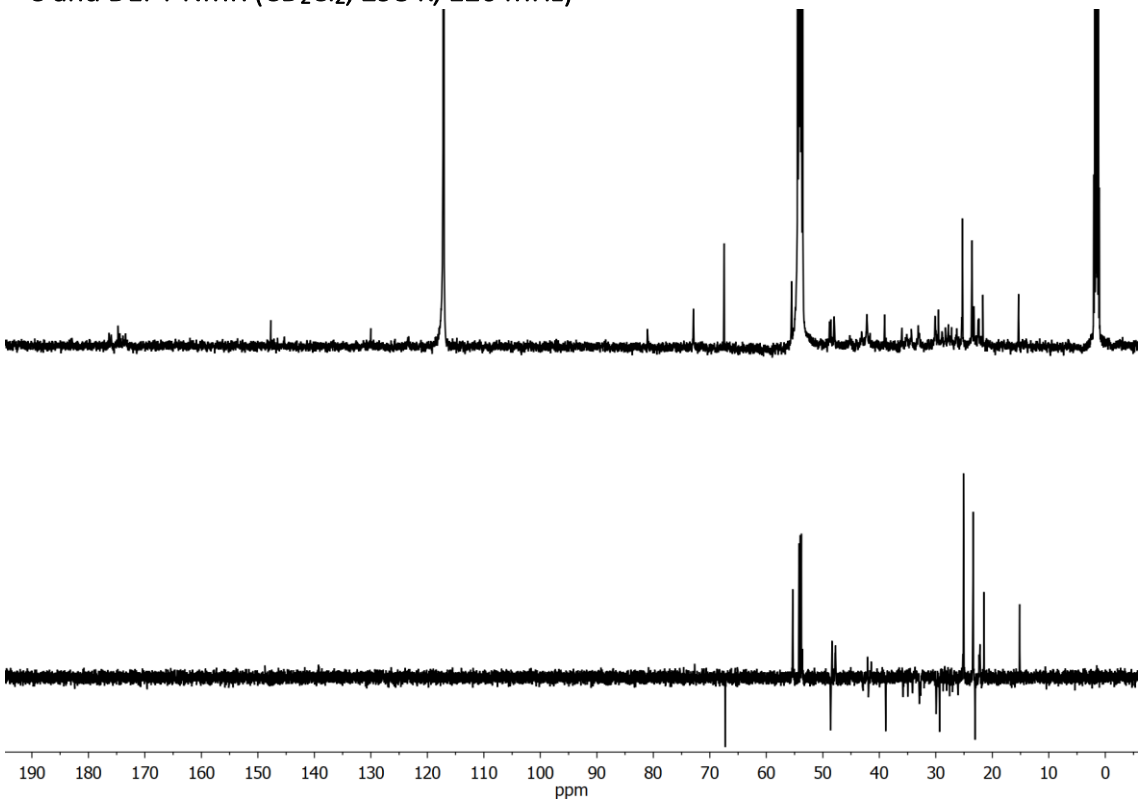
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
1943.2552	1	C108H160N21O12	100.00	1943.2550	-0.2	-0.1	17.1	40.0	even	ok

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

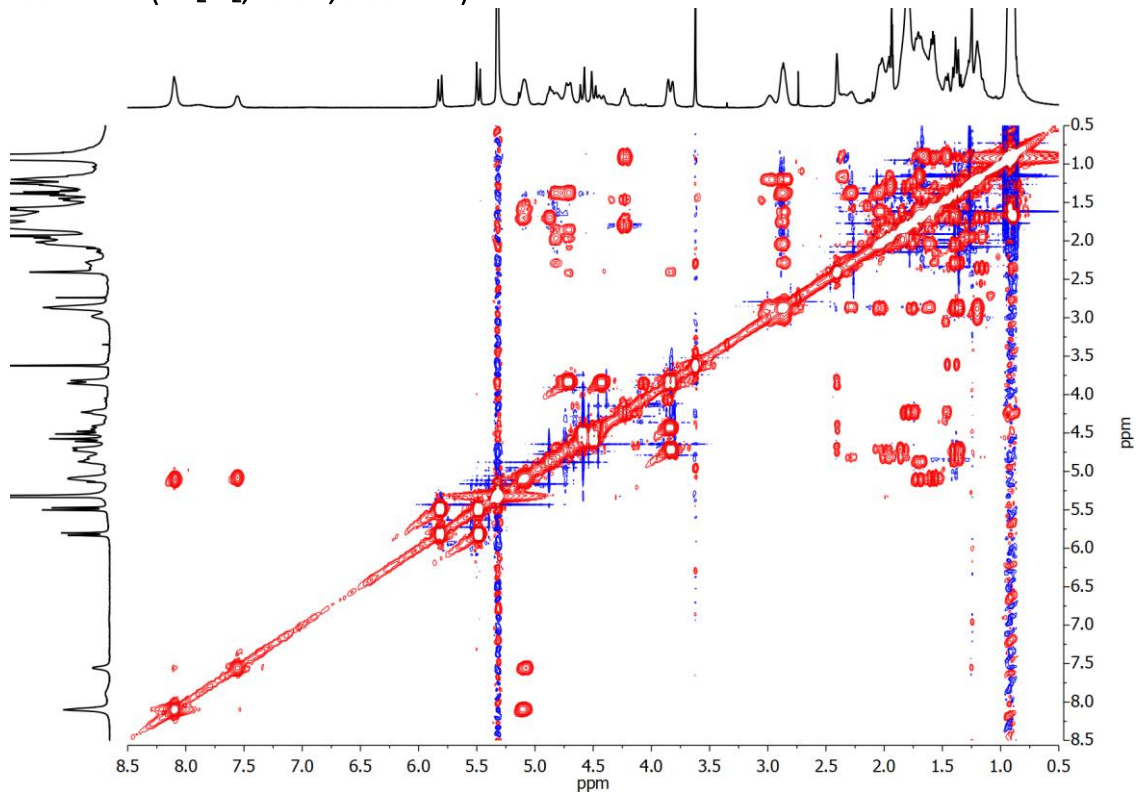


^{13}C and DEPT NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 126 MHz)

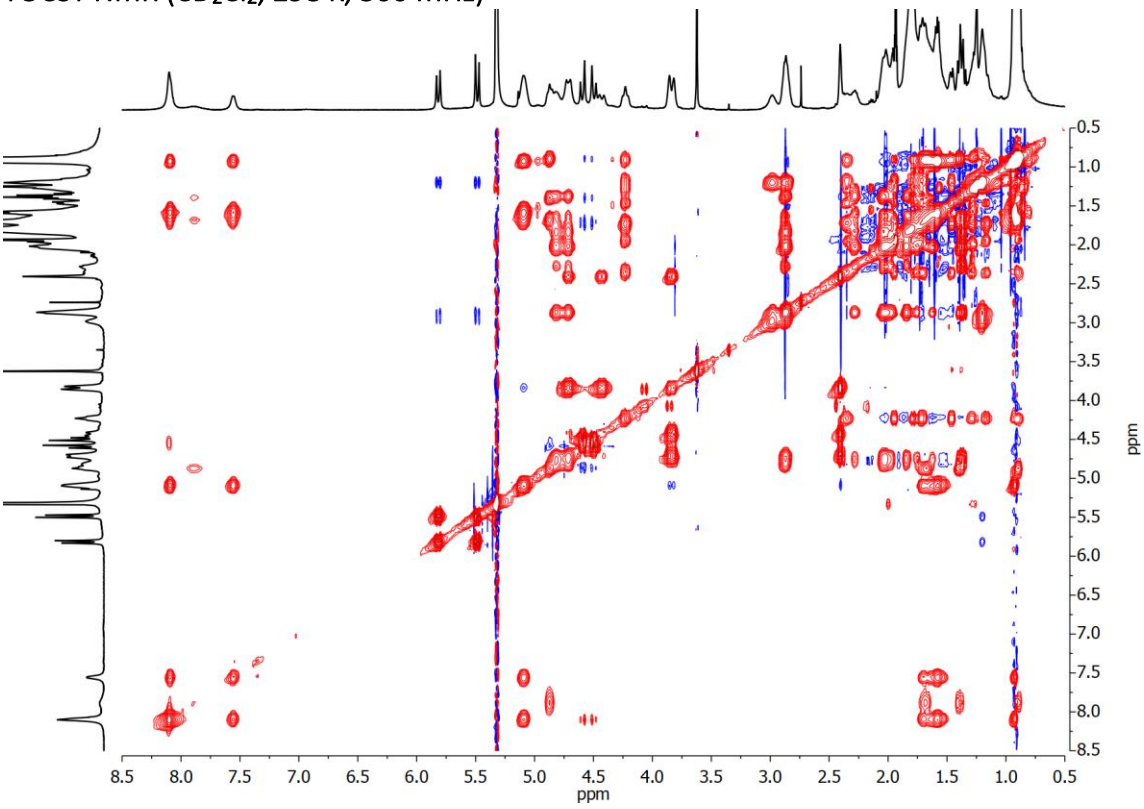


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

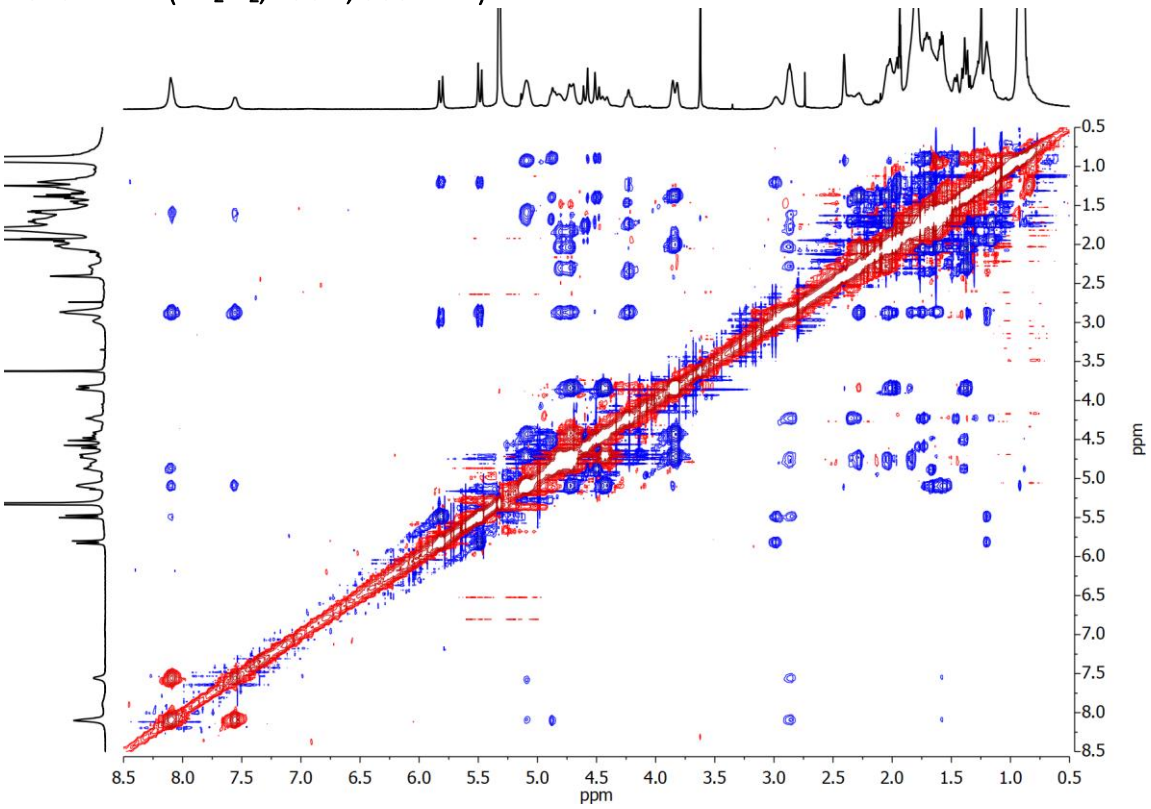


TOCSY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)

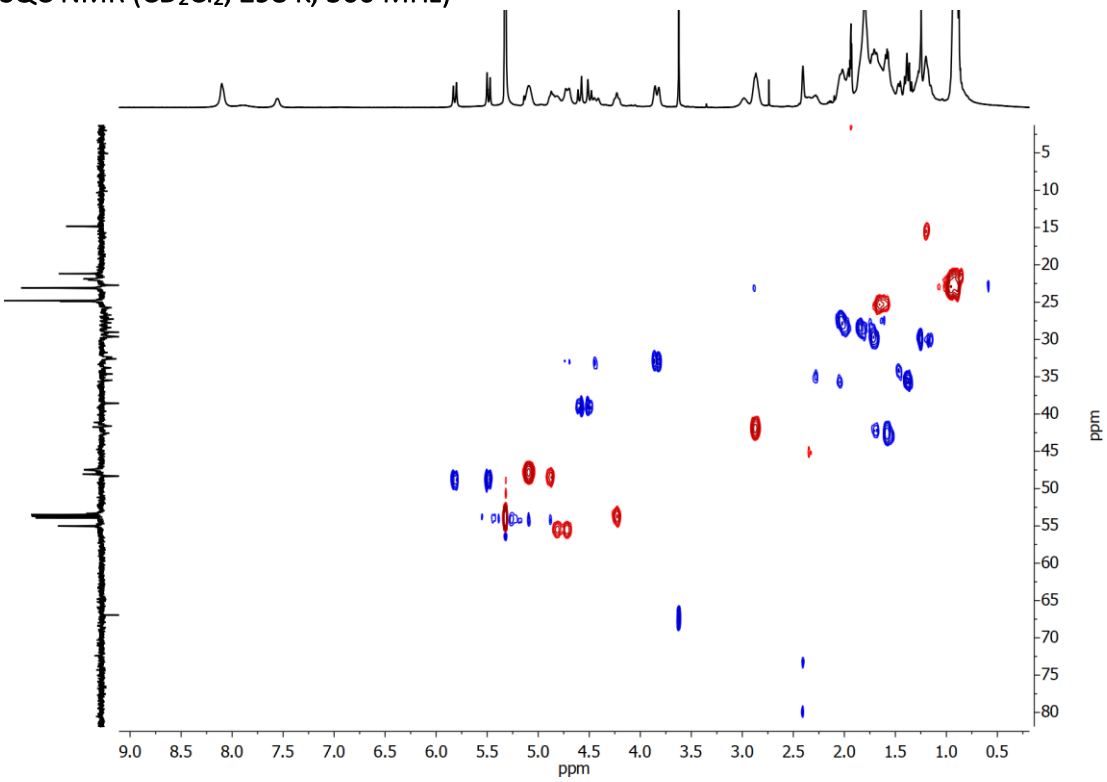


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ROESY NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



HSQC NMR (CD_2Cl_2, 298 K, 500 MHz)



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

11.2 Conflict of interest

The PhD candidate María Victoria López Corbalán declares no conflict of interest in relation to the doctoral thesis.

Santiago de Compostela, December 30th 2023.

11.3 Rights and permissions of the images

Figure 36

Order Summary

Licensee:	Universidade de Santiago de Compostela
Order Date:	Dec 18, 2023
Order Number:	5692040453380
Publication:	Springer eBook
Title:	Self-Assembled Coordination Cages and Organic Capsules as Catalytic Supramolecular Reaction Vessels
Type of Use:	Thesis/Dissertation
Order Total:	0.00 EUR

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

Figure 39

Order Summary

Licensee:	Universidade de Santiago de Compostela
Order Date:	Dec 18, 2023
Order Number:	5692050311283
Publication:	Chemistry - A European Journal
Title:	The Hexameric Resorcinarene Capsule at Work: Supramolecular Catalysis in Confined Spaces
Type of Use:	Dissertation/Thesis
Order Total:	0.00 EUR

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

Figure 40A

Order Summary

Licensee:	Universidade de Santiago de Compostela
Order Date:	Dec 18, 2023
Order Number:	5692051154533
Publication:	ChemPhotoChem
Title:	Perylene Diimide Based Imine Cages for Inclusion of Aromatic Guest Molecules and Visible-Light Photocatalysis
Type of Use:	Dissertation/Thesis
Order Total:	0.00 EUR

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

Figure 50A

CCC Marketplace

This is a License Agreement between Maria Victoria López Corbalán ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	18-Dec-2023	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1428756-1	Publisher	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY
ISSN	1460-4744	Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Chemical Society reviews	Publication Type	e-Journal
Article Title	Biomimetic cavity-based metal complexes.	Start Page	467
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain)	End Page	489
Date	01/01/1972	Issue	2
Language	English	Volume	44
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland	URL	http://www.rsc.org/csr
Rightsholder	Royal Society of Chemistry		

Figure 50B

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Closing a Calix[6]arene-Based Funnel Zn2 Complex at Its Large Rim Entrance: Consequences on Metal Ion Affinity and Host–Guest Properties

Author: Nicolas Nyssen, Daniela Ajami, Adrien Ardelean, et al

Publication: The Journal of Organic Chemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Sep 1, 2021

Copyright © 2021, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

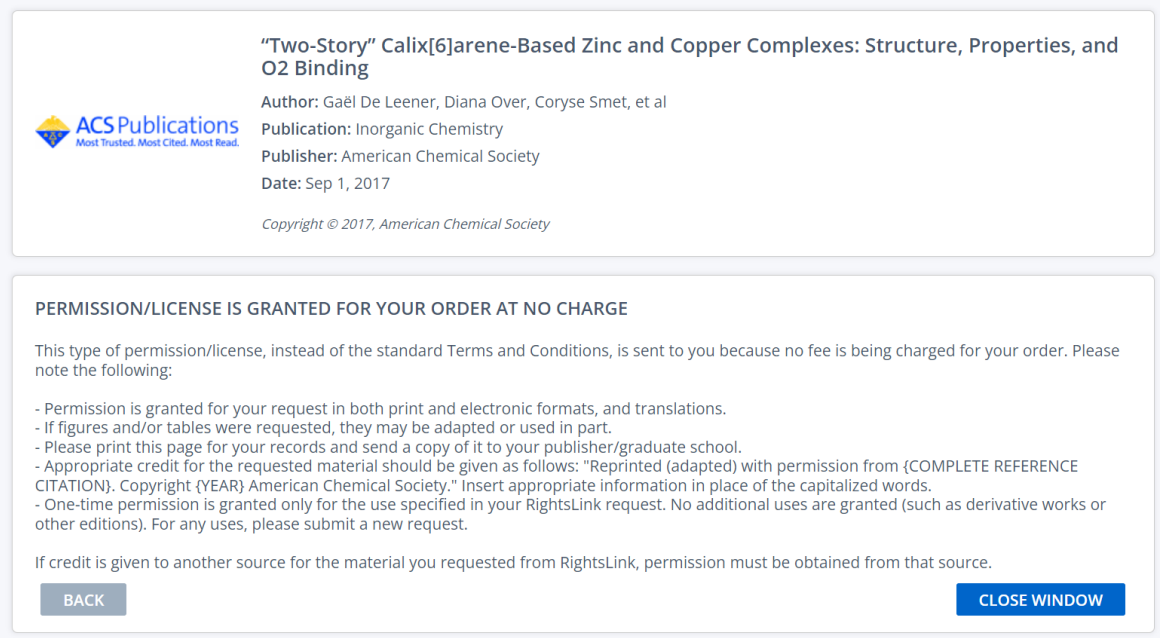
- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 50C



"Two-Story" Calix[6]arene-Based Zinc and Copper Complexes: Structure, Properties, and O2 Binding

Author: Gaël De Leener, Diana Over, Coryse Smet, et al
Publication: Inorganic Chemistry
Publisher: American Chemical Society
Date: Sep 1, 2017

Copyright © 2017, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

Figure 50D

Guest exchange in a biomimetic Zn^{II} cavity-complex: kinetic control by a catalytic water, through pore selection, 2nd sphere assistance, and induced-fit processes

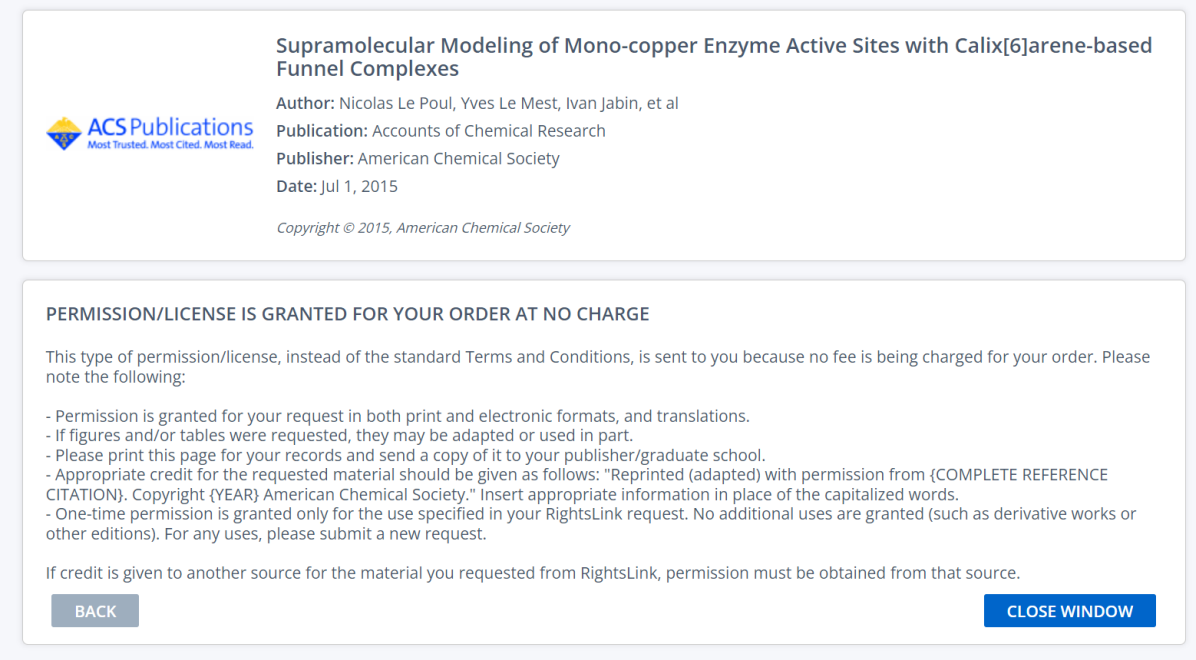
N. Nyssen, N. Giraud, J. Wouters, I. Jabin, L. Leherte and O. Reinaud, *Inorg. Chem. Front.*, 2023, **10**, 5772 **DOI:** 10.1039/D3QI01271A

This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence. **You can use material from this article in other publications, without requesting further permission** from the RSC, provided that the correct acknowledgement is given and it is not used for commercial purposes.

To request permission **to reproduce material from this article in a commercial publication**, please go to the Copyright Clearance Center request page.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 50E and 50F



Supramolecular Modeling of Mono-copper Enzyme Active Sites with Calix[6]arene-based Funnel Complexes

Author: Nicolas Le Poul, Yves Le Mest, Ivan Jabin, et al
Publication: Accounts of Chemical Research
Publisher: American Chemical Society
Date: Jul 1, 2015

Copyright © 2015, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

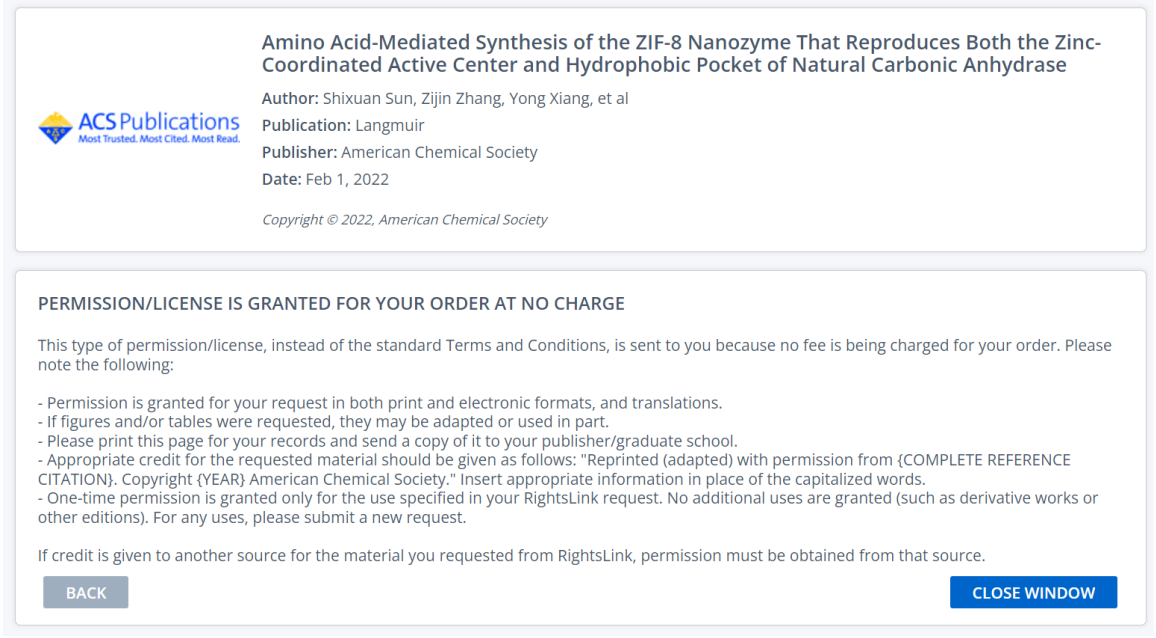
This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

Figure 52



Amino Acid-Mediated Synthesis of the ZIF-8 Nanozyme That Reproduces Both the Zinc-Coordinated Active Center and Hydrophobic Pocket of Natural Carbonic Anhydrase

Author: Shixuan Sun, Zijin Zhang, Yong Xiang, et al
Publication: Langmuir
Publisher: American Chemical Society
Date: Feb 1, 2022

Copyright © 2022, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

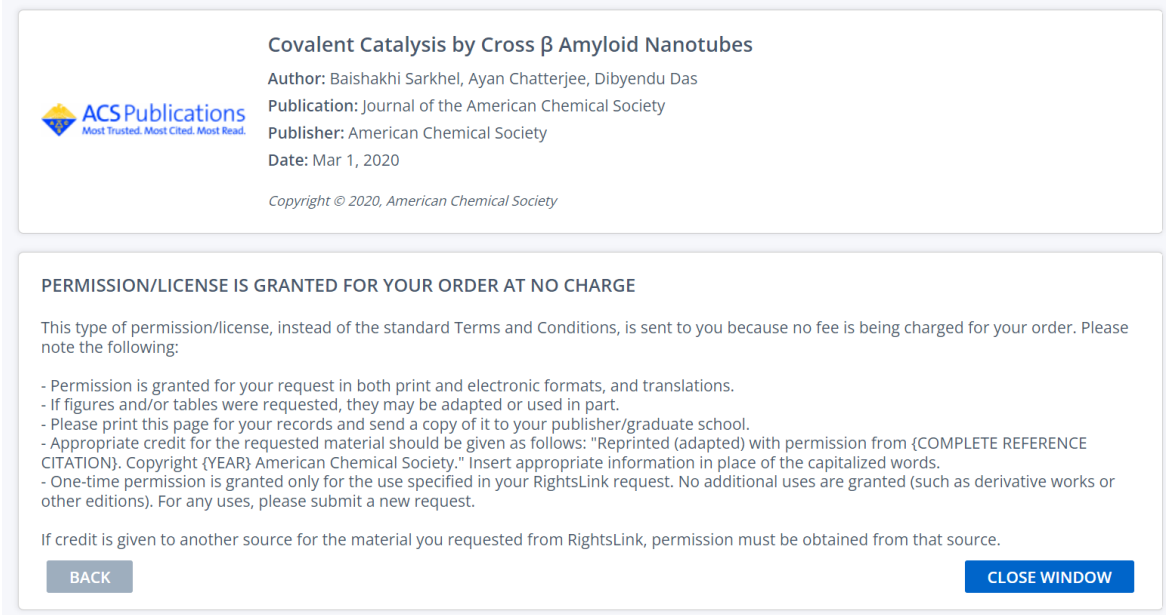
- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 53A



ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Covalent Catalysis by Cross β Amyloid Nanotubes

Author: Baishakhi Sarkhel, Ayan Chatterjee, Dibyendu Das
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: Mar 1, 2020

Copyright © 2020, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

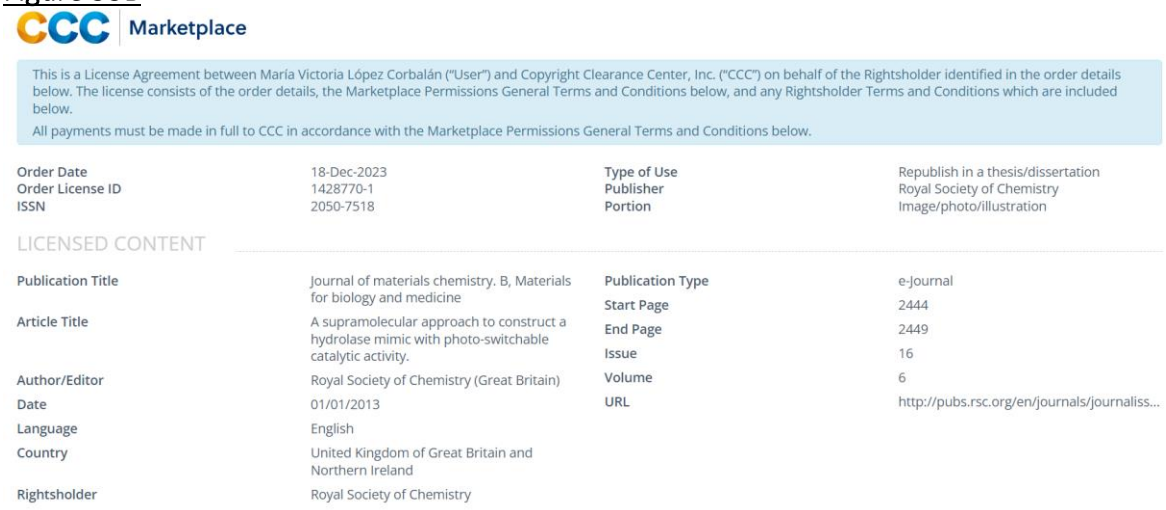
This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

Figure 53B



CCC Marketplace

This is a License Agreement between María Victoria López Corbalán ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

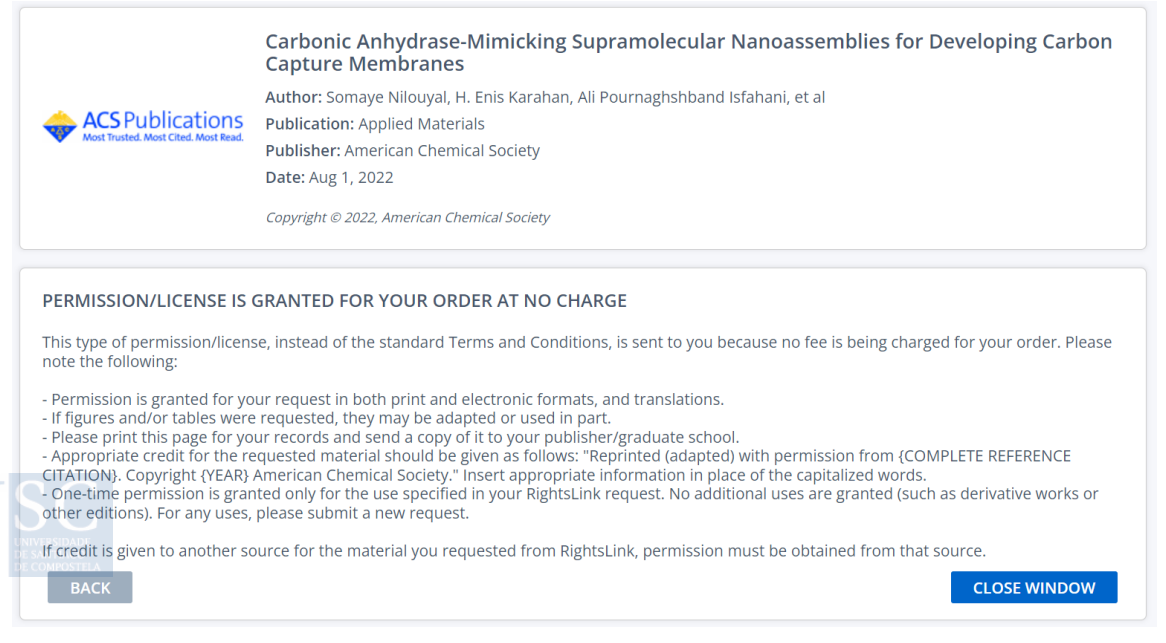
All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	18-Dec-2023	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1428770-1	Publisher	Royal Society of Chemistry
ISSN	2050-7518	Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Journal of materials chemistry. B, Materials for biology and medicine	Publication Type	e-Journal
Article Title	A supramolecular approach to construct a hydrolase mimic with photo-switchable catalytic activity.	Start Page	2444
		End Page	2449
		Issue	16
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain)	Volume	6
Date	01/01/2013	URL	http://pubs.rsc.org/en/journals/journaliss...
Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		
Rightsholder	Royal Society of Chemistry		

Figure 53C



ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Carbonic Anhydrase-Mimicking Supramolecular Nanoassemblies for Developing Carbon Capture Membranes

Author: Somaye Nilouyal, H. Enis Karahan, Ali Pournaghshband Isfahani, et al
Publication: Applied Materials
Publisher: American Chemical Society
Date: Aug 1, 2022

Copyright © 2022, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 55, molecule 26

Order Summary

Licensee:	Universidade de Santiago de Compostela
Order Date:	Dec 19, 2023
Order Number:	5692410541744
Publication:	Coordination Chemistry Reviews
Title:	Recent advances in selective recognition of fluoride with macrocyclic receptors
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Total:	0.00 EUR

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

Figure 57

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Hydrophobic Collapse of Foldamer Capsules Drives Picomolar-Level Chloride Binding in Aqueous Acetonitrile Solutions

Author: Yuran Hua, Yun Liu, Chun-Hsing Chen, et al
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: Sep 1, 2013

Copyright © 2013, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

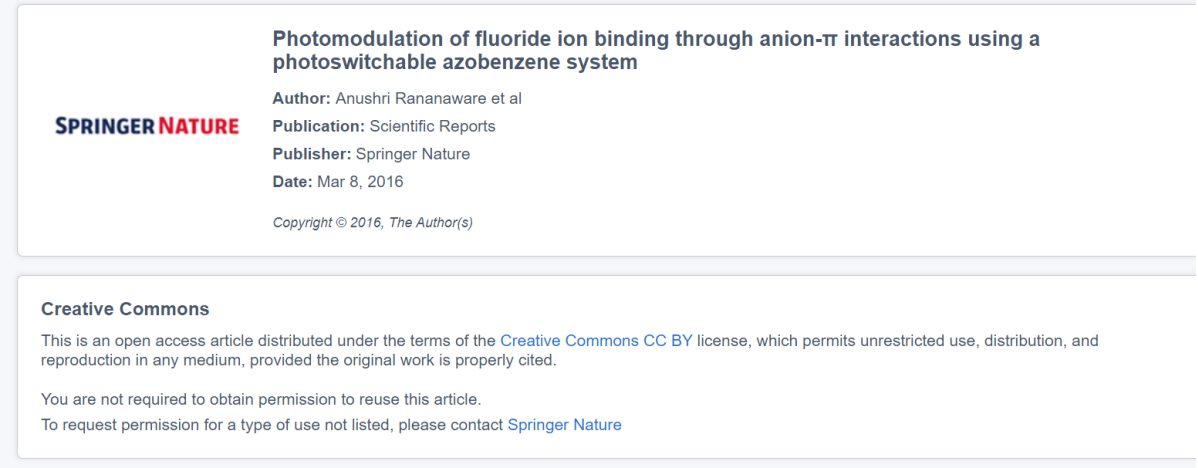
- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 58A



Photomodulation of fluoride ion binding through anion-π interactions using a photoswitchable azobenzene system

Author: Anushri Rananaware et al
Publication: Scientific Reports
Publisher: Springer Nature
Date: Mar 8, 2016

Copyright © 2016, The Author(s)

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.
To request permission for a type of use not listed, please contact Springer Nature

Figure 58B

A photoswitchable strapped calix[4]pyrrole receptor: highly effective chloride binding and release

D. Villarón, M. A. Siegler and S. J. Wezenberg, *Chem. Sci.*, 2021, **12**, 3188 **DOI:** 10.1039/D0SC06686A

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence. **You can use material from this article in other publications without requesting further permissions** from the RSC, provided that the correct acknowledgement is given.

Read more about how to correctly acknowledge RSC content.

Figure 59

Order Summary

Licensee:	Universidade de Santiago de Compostela
Order Date:	Dec 18, 2023
Order Number:	5692020925120
Publication:	Proteins: Structure, Function and Bioinformatics
Title:	The role of conserved water molecules in the catalytic domain of protein kinases
Type of Use:	Dissertation/Thesis
Order Total:	0.00 USD

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

Figure 60

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Binding Hydrated Anions with Hydrophobic Pockets

Author: Punidha Sokkalingam, Joshua Shraberg, Steven W. Rick, et al
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: Jan 1, 2016

Copyright © 2016, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 61

CCC Marketplace

This is a License Agreement between María Victoria López Corbalán ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	19-Dec-2023	**Type of Use**	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1429063-1	**Publisher**	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY
ISSN	0003-2654	**Portion**	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	The Analyst	**Rightsholder**	Royal Society of Chemistry
Article Title	Techniques for recording reconstituted ion channels.	**Publication Type**	Journal
		Start Page	1077
Author/Editor	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (GREAT BRITAIN), SOCIETY OF PUBLIC ANALYSTS (GREAT BRITAIN), SOCIETY OF PUBLIC ANALYSTS AND OTHER ANALYTICAL CH, SOCIETY FOR ANALYTICAL CHEMISTRY., CHEMICAL SOCIETY (GREAT BRITAIN), SOCIETY OF PUBLIC ANALYSTS (GREAT BRITAIN).	**End Page**	1089
		Issue	6
		Volume	136
Date	01/01/1876		
Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		

Figure 64A

Order Summary

Licensee:	Universidade de Santiago de Compostela
Order Date:	Dec 19, 2023
Order Number:	5692471242671
Publication:	Angewandte Chemie International Edition
Title:	A Glutathione Activatable Ion Channel Induces Apoptosis in Cancer Cells by Depleting Intracellular Glutathione Levels
Type of Use:	Dissertation/Thesis
Order Total:	0.00 EUR

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 64B

RETURN TO ISSUE | < PREV **ARTICLE** NEXT >

Transmembrane Ion Channels Formed by a Star of David [2]Catenane and a Molecular Pentafoil Knot

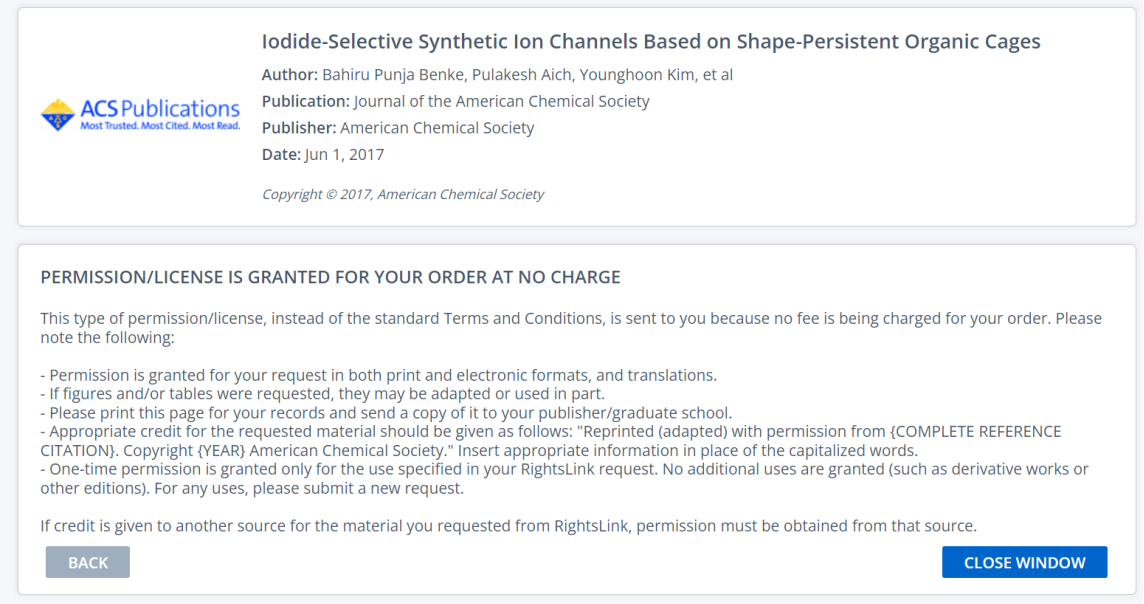
David P. August, Stefan Borsley, Scott L. Cockroft, Flavio della Sala, David A. Leigh*, and Simon J. Webb

Cite this: *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142, 44, 18859–18865
Publication Date: October 21, 2020
https://doi.org/10.1021/jacs.0c07977
Copyright © 2020 American Chemical Society. This publication is licensed under CC-BY.
Open Access

Article Views 5590 | Altmetric 15 | Citations 38
LEARN ABOUT THESE METRICS

Share Add to Export RIS

Figure 64C



ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Iodide-Selective Synthetic Ion Channels Based on Shape-Persistent Organic Cages

Author: Bahiru Punja Benke, Pulakesh Aich, Younghoon Kim, et al
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: Jun 1, 2017

Copyright © 2017, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

Figure 64D

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Artificial Chloride-Selective Channel: Shape and Function Mimic of the ClC Channel Selective Pore

Author: Wen-Long Huang, Xu-Dong Wang, Yu-Fei Ao, et al
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: Aug 1, 2020

Copyright © 2020, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 65B

Order Summary

Licensee:	Universidade de Santiago de Compostela
Order Date:	Dec 18, 2023
Order Number:	5692040821844
Publication:	Angewandte Chemie International Edition
Title:	A Dimeric Bis(melamine)-Substituted Bispidine for Efficient Transmembrane H /Cl− Cotransport
Type of Use:	Dissertation/Thesis
Order Total:	0.00 EUR

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

Figure 65C

CCC Marketplace

This is a License Agreement between María Victoria López Corbalán ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	18-Dec-2023	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1428786-1	Publisher	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY
ISSN	1364-548X	Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Chemical communications	Rightsholder	Royal Society of Chemistry
Article Title	Tuning the solubility of ionophores: glutathione-mediated transport of chloride ions across hydrophobic membranes.	Publication Type	e-Journal
		Start Page	8482
		End Page	8485
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain)	Issue	58
Date	01/01/1996	Volume	55
Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		

Figure 66, Na^+ complex

Open Access Review

Synthetic Receptors Based on Abiotic Cyclo(pseudo)peptides

by Stefan Kubik

Fachbereich Chemie—Organische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Str. 54, 67663 Kaiserslautern, Germany

Molecules **2022**, *27*(9), 2821; **https://doi.org/10.3390/molecules27092821**

Submission received: 8 April 2022 / Revised: 26 April 2022 / Accepted: 27 April 2022 / Published: 28 April 2022

(This article belongs to the Special Issue **Synthetic Receptor Molecules for and with Amino Acids and Peptides**)

Download Browse Figures Versions Notes

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 69A

Order Summary

Licensee:	Universidade de Santiago de Compostela
Order Date:	Dec 18, 2023
Order Number:	5692061091235
Publication:	Colloids and Surfaces B: Biointerfaces
Title:	Membrane targeting antimicrobial cyclic peptide nanotubes – an experimental and computational study
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Total:	0.00 EUR

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

Figure 69B

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

1D to 2D Self Assembly of Cyclic Peptides

Author: Ignacio Insua, Javier Montenegro
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: Jan 1, 2020

Copyright © 2020, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 70A

CCC Marketplace

This is a License Agreement between María Victoria López Corbalán ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

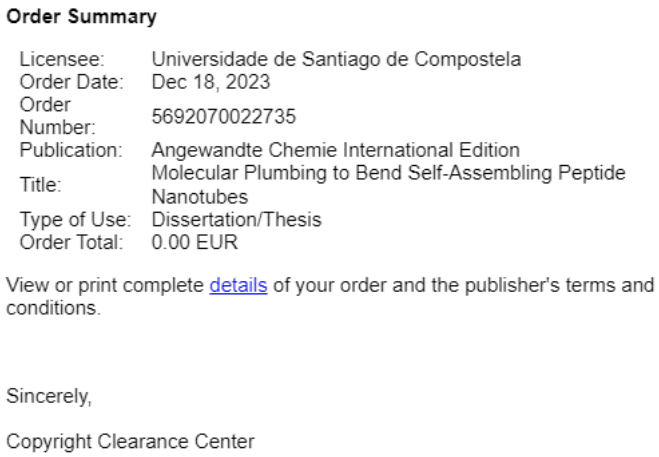
All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	18-Dec-2023	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1428773-1	Publisher	Royal Society of Chemistry
ISSN	2055-6756	Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Nanoscale Horizons	Rightsholder	Royal Society of Chemistry
Article Title	pH-Triggered self-assembly and hydrogelation of cyclic peptide nanotubes confined in water micro-droplets.	Publication Type	Journal
		Start Page	391
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain), Guo jia na mi ke xue zhong xin (China)	End Page	396
		Issue	4
Date	01/01/2016	Volume	3
Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		

Figure 70B



Order Summary

Licensee:	Universidade de Santiago de Compostela
Order Date:	Dec 18, 2023
Order Number:	5692070022735
Publication:	Angewandte Chemie International Edition
Title:	Molecular Plumbing to Bend Self-Assembling Peptide Nanotubes
Type of Use:	Dissertation/Thesis
Order Total:	0.00 EUR

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 71

Order Summary

Licensee:	Universidade de Santiago de Compostela
Order Date:	Dec 18, 2023
Order Number:	5692060723647
Publication:	Angewandte Chemie International Edition
Title:	Hierarchical Self-Assembled Photo-Responsive Tubisomes from a Cyclic Peptide-Bridged Amphiphilic Block Copolymer
Type of Use:	Dissertation/Thesis
Order Total:	0.00 EUR

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

Figure 75A

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Controlling Multiple Fluorescent Signal Output in Cyclic Peptide-Based Supramolecular Systems

Author: Roberto J. Brea, M. Eugenio Vázquez, Manuel Mosquera, et al

Publication: Journal of the American Chemical Society

Publisher: American Chemical Society

Date: Feb 1, 2007

Copyright © 2007, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 76A

Order Summary

Licensee:	Universidade de Santiago de Compostela
Order Date:	Dec 18, 2023
Order Number:	5692030908102
Publication:	Angewandte Chemie International Edition
Title:	Anion Recognition and Induced Self-Assembly of an α,γ-Cyclic Peptide To Form Spherical Clusters
Type of Use:	Dissertation/Thesis
Order Total:	0.00 EUR

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

Figure 76B

Self-assembling α,γ-cyclic peptides that generate cavities with tunable properties

N. Rodríguez-Vázquez, R. García-Fandiño, M. Amorín and J. R. Granja, *Chem. Sci.*, 2016, **7**, 183 **DOI:** 10.1039/C5SC03187G

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence. **You can use material from this article in other publications without requesting further permissions** from the RSC, provided that the correct acknowledgement is given.

Read more about how to correctly acknowledge RSC content.

Figure 77

CCC Marketplace

This is a License Agreement between Maria Victoria López Corbalán ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	18-Dec-2023	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1428764-1	Publisher	RSC Pub
ISSN	2040-3372	Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Nanoscale	Publication Type	e-Journal
Article Title	Self-assembling Venturi-like peptide nanotubes.	Start Page	748
		End Page	753
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain), National Center for Nanoscience and Technology.	Issue	2
		Volume	9
Date	01/01/2009	URL	http://www.rsc.org/Publishing/Journals/N...
Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		
Rightsholder	Royal Society of Chemistry		

Figure 78

CCC Marketplace

This is a License Agreement between María Victoria López Corbalán ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	18-Dec-2023	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1428778-1	Publisher	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY
ISSN	1364-548X	Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Chemical communications	Rightsholder	Royal Society of Chemistry
Article Title	Versatile symport transporters based on cyclic peptide dimers.	Publication Type	e-Journal
		Start Page	46
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain)	End Page	49
Date	01/01/1996	Issue	1
Language	English	Volume	56
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		

Figure 79

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Self-Assembling Molecular Capsules Based on α,γ-Cyclic Peptides

Author: Haxel Lionel Ozores, Manuel Amorín, Juan R. Granja
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: Jan 1, 2017

Copyright © 2017, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

BACK CLOSE WINDOW

Figure 95

Order Summary

Licensee:	Universidade de Santiago de Compostela
Order Date:	Dec 23, 2023
Order Number:	5694851029885
Publication:	Chemistry - A European Journal
Title:	Intermediates Stabilized by Tris(triazolylmethyl)amines in the CuAAC Reaction
Type of Use:	Dissertation/Thesis
Order Total:	0.00 EUR

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

11.4 Origin of images without reference of reproduction right or permission.

The PhD candidate María Victoria López Corbalán declares that all those images that are not referenced to the corresponding reproduction or adaptation permission have been created by herself.

In reference to the three-dimensional images that appear in the Introduction section to illustrate the concepts discussed, all those that come from a crystalline structure are referenced with the corresponding CCDC code. The images of molecules for which said code does not appear in the reference correspond to geometry optimizations carried out by the PhD candidate.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La química supramolecular es un área que se encuentra en constante crecimiento y que se presenta como una buena alternativa para el desarrollo de receptores moleculares. A su vez, las aplicaciones de estos receptores se expanden hacia diferentes ramas, como la catálisis o el desarrollo de receptores de aniones, siendo los modelos naturales fuente de inspiración. En este sentido, los péptidos cíclicos capaces de autoensamblarse se estudian como una buena alternativa para crear espacios confinados. En esta tesis doctoral se ha explorado la introducción de tapas y brazos moleculares sobre el esqueleto peptídico, que permiten el cierre tridimensional de la cavidad. De este modo, en función del diámetro del péptido y de las características de la tapa incorporada, es posible modular la actividad del receptor.