

VNiVERSiDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE QVÍMiCA ORGÁNiCA



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

RECEPTORES MOLECULARES
ENANTIOSELECTIVOS PARA AMINOÁCIDOS

Rachid Taouil Hammouti

2016

ÍNDICE

1. Introducción y Antecedentes.....	1
1.1. Antecedentes en el Grupo de Investigación.....	10
2. Objetivos.....	13
3. Métodos y Resultados	15
3.1. Preparación del receptor 1	15
3.2. Preparación del receptor 2	17
3.3. Preparación del receptor 3	19
3.4. Estructura cristalina del complejo con alanina.....	23
3.5. Cristalización del receptor 3 racémico y la <i>L</i> -alanina.....	25
3.6. Resolución de la mezcla racémica del receptor 3	26
3.7. Estructura del complejo del receptor 3 con glicina.....	29
3.8. Selectividad del receptor 3 en la extracción de disoluciones acuosas de amoniácidos naturales.....	30
4. Conclusiones.....	33
5. Desarrollo Experimental.....	35
5.1. Técnicas instrumentales y cromatográficas.....	35
5.2. Preparación y caracterización de los compuestos.....	36

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los aminoácidos son compuestos que presentan un grupo amino y un grupo ácido en su estructura. Debido a las características ácido-base de estos grupos funcionales, estos compuestos se encuentran ionizados a valores de pH fisiológico (7,2) al transferirse el protón del grupo ácido al grupo amino, obteniéndose el correspondiente zwitterión. La presencia de los grupos amino y carboxilato hace que estos compuestos sean esencialmente sólidos iónicos solubles en agua e insolubles en disolventes orgánicos.¹

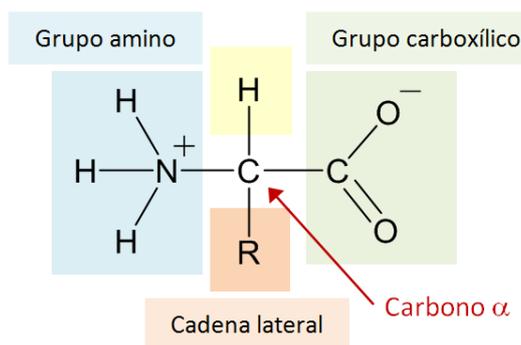


Figura 1. Estructura básica de los aminoácidos.

Existen aminoácidos de gran importancia en los que el grupo amino no se encuentra situado en el carbono α del carboxilato (figura 2).² Es el caso del ácido γ -aminobutírico (GABA), que es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central de los mamíferos; la β -alanina, que es precursora de la síntesis del coenzima A; el ácido aminolevulínico; o el ácido 4-aminobenzoico (PABA).

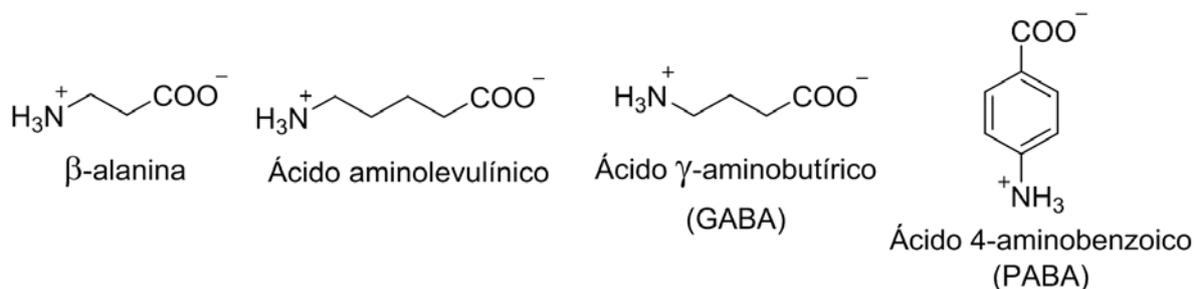


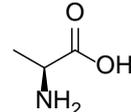
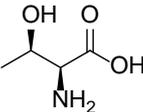
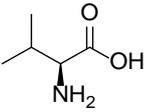
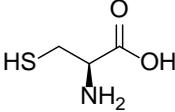
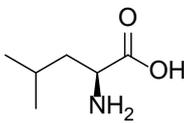
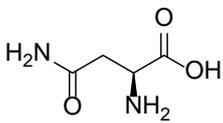
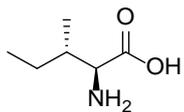
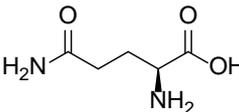
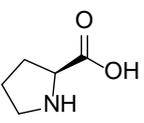
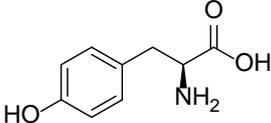
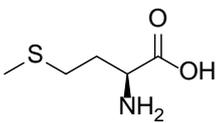
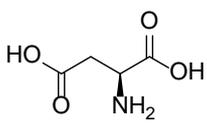
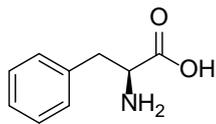
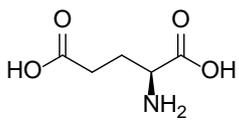
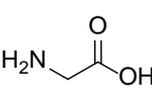
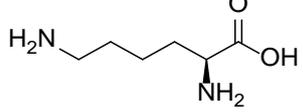
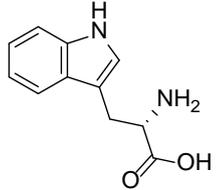
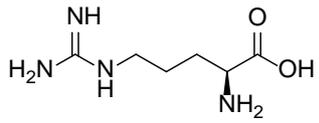
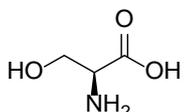
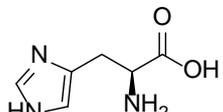
Figura 2. Aminoácidos que no presentan el grupo amino en la posición α del carboxilo.

¹ Smith, B. D. "Synthetic receptors for biomolecules: Design, principles and applications" *Roy. Soc. Chem.* **2015**.

² Hughes, A. B. "Amino acids, peptides and proteins in organic chemistry, analysis and function of amino acids" *Wiley-VCH* **2011**, Vol. 5.

Los aminoácidos más interesantes son, sin embargo, los que presentan el grupo amino en la posición α del ácido y, en particular, los que forman parte de las cadenas proteicas de los seres vivos, los denominados aminoácidos proteínogénicos, que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Aminoácidos proteínogénicos.

AMINOÁCIDO	ESTRUCTURA	AMINOÁCIDO	ESTRUCTURA
Alanina		Treonina	
Valina		Cisteína	
Leucina		Asparagina	
Isoleucina		Glutamina	
Prolina		Tirosina	
Metionina		Ácido aspártico	
Fenilalanina		Ácido glutámico	
Glicina		Lisina	
Triptófano		Arginina	
Serina		Histidina	

Entre los aminoácidos naturales, los denominados aminoácidos esenciales presentan una mayor importancia en nutrición dado que éstos no se pueden sintetizar en el organismo y, por ello, deben ser suministrados en la dieta. Un problema importante de ello es el del aminoácido limitante. Aunque la dieta sea rica en proteínas, si alguno de los aminoácidos que se requieren para el metabolismo se encuentra en cantidades muy limitadas o insuficientes (aminoácido limitante), la pequeña concentración del mismo limita e impide la biosíntesis de nuevas proteínas en la cantidad suficiente para el buen funcionamiento del organismo. Por este motivo, es importante la obtención de aminoácidos mediante métodos baratos.

La correcta estereoquímica de los aminoácidos es esencial para sus aplicaciones biológicas. Por ejemplo, si los aminoácidos se requieren como complementos de la nutrición humana, sólo se pueden utilizar los que presentan configuración *L*; es decir, aquellos cuya configuración del carbono α corresponde con la geometría de los aminoácidos naturales, ya que los correspondientes aminoácidos con estereoquímica *D* presentan toxicidad y, en consecuencia, no se pueden suministrar en la dieta.³ Por ello, el mayor problema para la síntesis química de los aminoácidos dirigidos a la alimentación humana es la necesidad de comercializar sólo el enantiómero *L*.

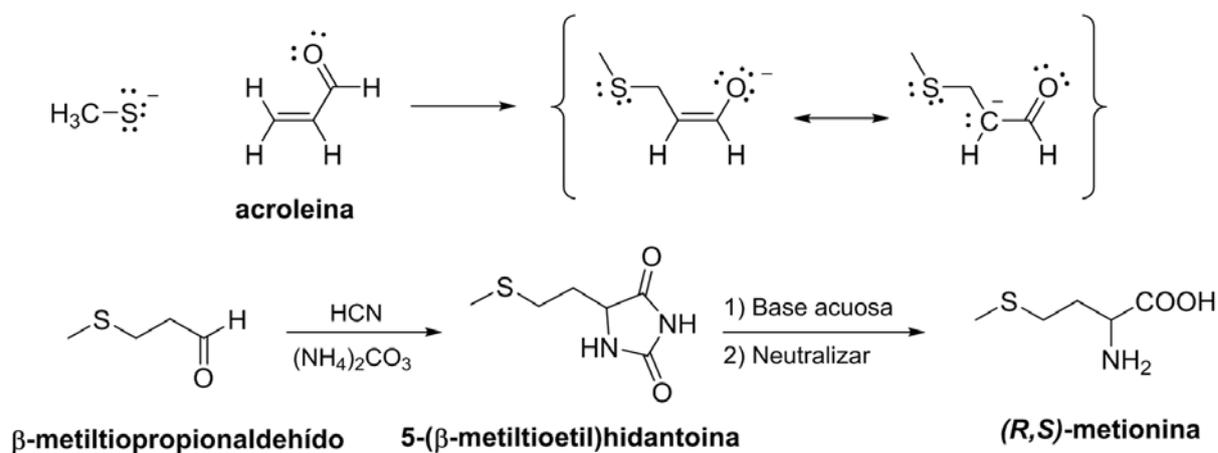


Figura 3. Síntesis química de la metionina.

Aunque existen numerosas síntesis enantioselectivas de aminoácidos, estos procedimientos no pueden competir en precio con la obtención de los *L*-aminoácidos a partir de fermentaciones. La excepción son los casos en los que no existen problemas de enantiomería, como ocurre en la obtención de glicina. En el caso de la alimentación de las aves de corral, la dieta habitual a base de

³ (a) Yoshimura, T.; Goto, M. “*D*-Amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases” *FEBS Journal* **2008**, *275*, 3527-3537. (b) Yoshimura, T.; Esak, N. “Amino acid racemases: Functions and mechanisms” *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, *96*, 103-109.

maíz conduce a una carencia de metionina.⁴ Debido a que éstas poseen un enzima que racemiza la metionina, pueden asimilar los dos enantiómeros de este aminoácido. Por este motivo, el aminoácido se obtiene como racémico por síntesis química a partir de acroleína,⁵ tal como se muestra en la figura 3. En este caso, la síntesis química es más económica que las fermentaciones.

Un caso similar es el de la lisina, que se obtiene también por síntesis química debido a que se han encontrado enzimas que permiten la obtención del enantiómero *L* de una forma sencilla. La figura 4 muestra la preparación industrial de la lisina a partir de caprolactama.⁶

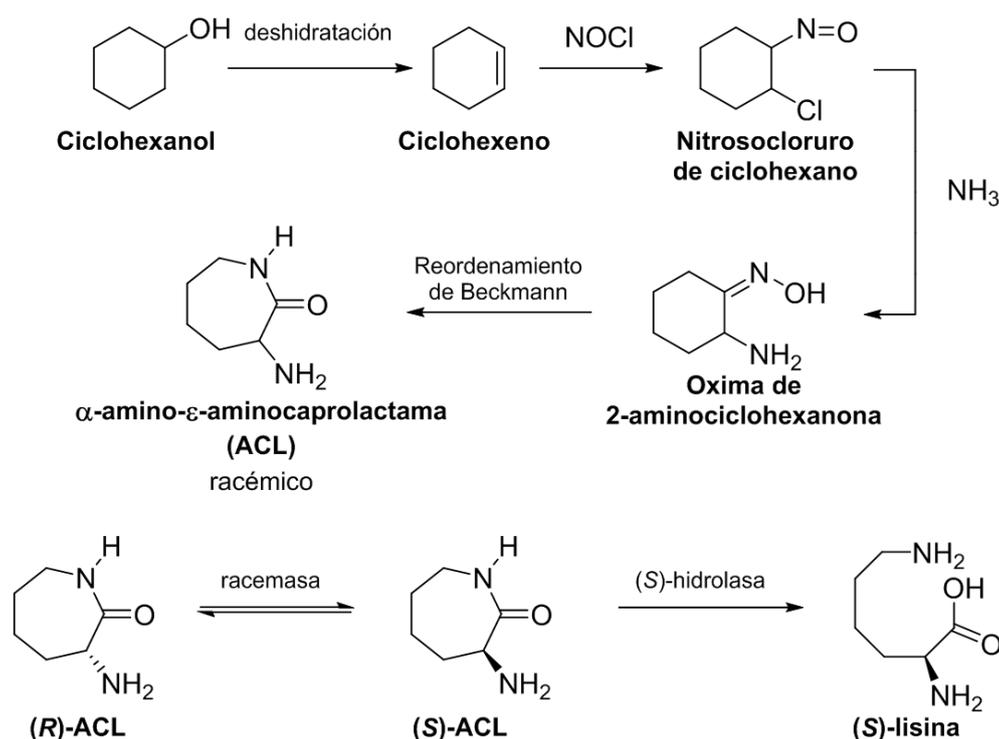


Figura 4. Síntesis industrial de la lisina.

En el caso de los demás aminoácidos, se recurre a su obtención a partir de fermentaciones, esencialmente porque no existe ningún método sencillo para separar los enantiómeros obtenidos por síntesis química y esta técnica permite obtener directamente el aminoácido con la configuración natural *L*. Sin embargo, las síntesis tradicionales como las de Strecker,⁷ Erlenmeyer⁸ o Büchner,⁹ combinadas con una resolución sencilla del racémico, serían muy

⁴ Maynard, L. A.; Loosli, J. K.; Hintz, H. F.; Warner, R. G. "Nutrición Animal" *McGraw-Hill* **1981**, Méjico.

⁵ Weissmehl, K.; Arpe, H. J. "Química orgánica industrial" *Reverte* **1981**.

⁶ Ault, A. "The Monosodium Glutamate Story: The Commercial Production of MSG and Other Amino Acids Chemistry for Everyone" *J. Chem. Educ.* **2004**, *81*, 347-355.

⁷ Strecker, A. "Über die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocoll homologen Körper" *Ann. Chem. Pharm.* **1850**, *75*, 27-45.

⁸ Erlenmeyer, F. "Über die Kondensation der Hippursäure mit Phthalsäureanhydrid und mit Benzaldehyd" *Liebigs Ann. Chem.* **1893**, *275*, 1-8.

atractivas para obtener otros aminoácidos enantioméricamente puros. La figura 5 muestra las síntesis tradicionales de aminoácidos racémicos.

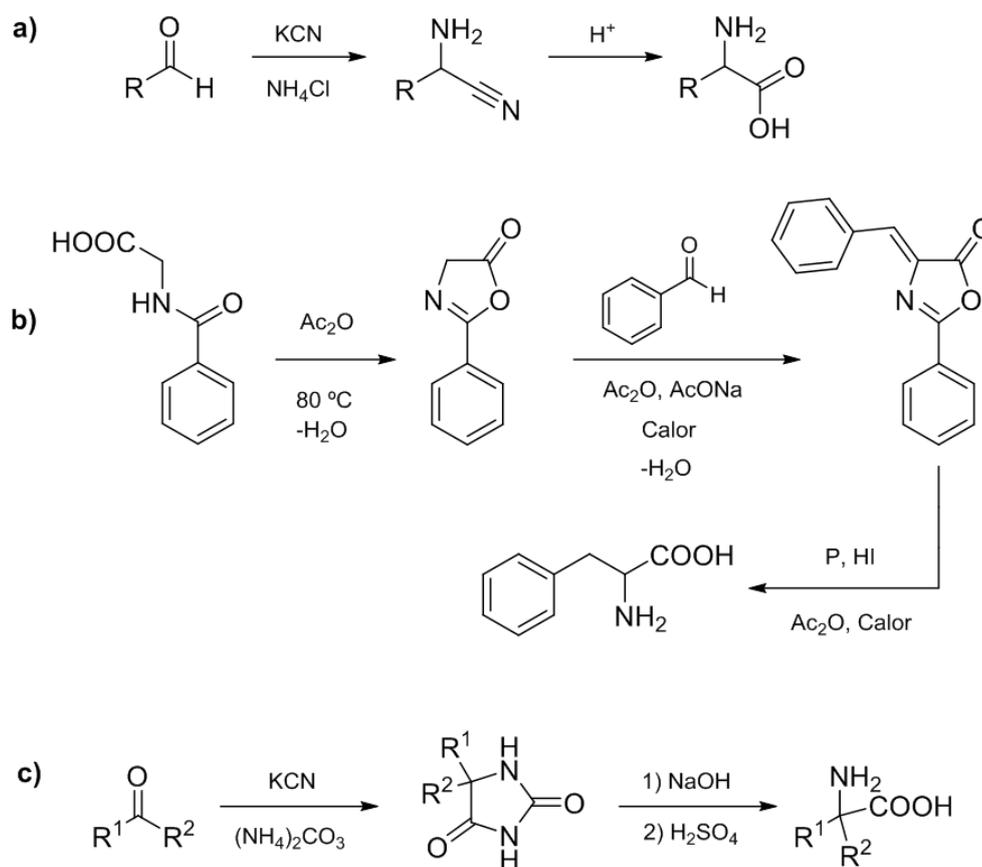


Figura 5. Síntesis tradicionales de aminoácidos racémicos.

Existe, además, un elevado interés por los aminoácidos con configuración *D*, que no se pueden obtener tampoco por fermentaciones puesto que presentan la configuración contraria a la natural. El *D*-aminoácido más abundante entre los seres vivos es la *D*-alanina como consecuencia de su presencia en la cadena de peptidoglicano que forma parte de la pared bacteriana.¹⁰ Probablemente, ése es también el motivo por el que una gran cantidad de antibióticos comerciales (figura 6), como la penicilina y las cefalosporinas, presentan fragmentos de *D*-aminoácidos en su estructura.¹¹

⁹ Büchner, E.; Curtius, T. "Über die Einwirkung von Diazoessigäther auf aromatisch Kohlenwasserstoffe" *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, 8, 2377-2379.

¹⁰ (a) Heijenoort, J. "Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan" *Glycobiology* **2001**, 11, 25R-36R. (b) Van Heijenoort, J. "Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit" *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 503-519.

¹¹ Gao, X.; Ma, Q.; Zhu, H. "Distribution, industrial applications, and enzymatic synthesis of *D*-amino acids" *Appl. Micro. Biotech.* **2015**, 99, 3341-3349.

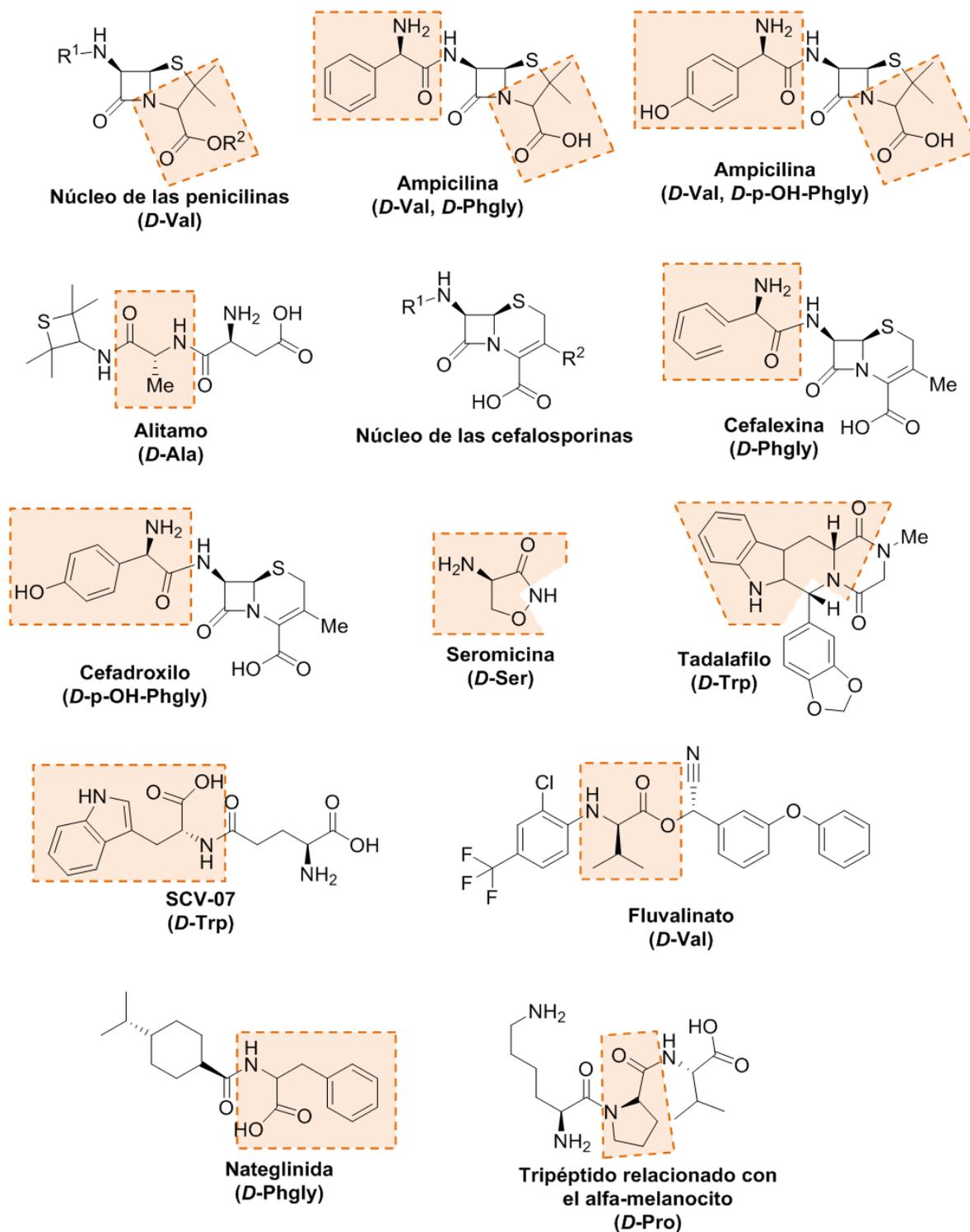


Figura 6. Antibióticos comerciales que presentan D-aminoácidos en su estructura.

En este trabajo, se propone la síntesis de receptores moleculares que permitan la resolución de mezclas racémicas de α -aminoácidos. El procedimiento se fundamenta en la llamada Máquina

de Cram,¹² que permite resolver mezclas de aminoácidos por transporte a través de membranas apolares y cuyo esquema se muestra en la figura 7.

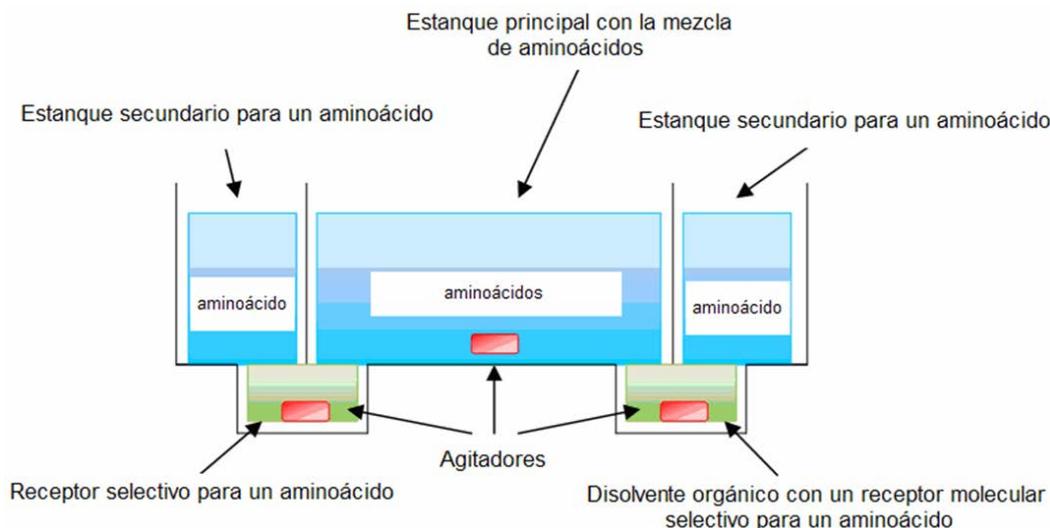


Figura 7. Máquina de Cram.

El funcionamiento de la Máquina de Cram se basa en transportar solo un enantiómero de la mezcla racémica de aminoácidos, que se encuentra en el estanque principal, a través de una membrana apolar hasta un estanque secundario, en el que un cambio de pH permite que el transporte no se efectúe en sentido contrario. El transporte debe realizarse por un receptor molecular suficientemente enantioselectivo para que, esencialmente, solo asocie un enantiómero del aminoácido.

El motivo por el que en la actualidad no se utiliza la Máquina de Cram es la falta de receptores suficientemente enantioselectivos para los aminoácidos. El problema en el desarrollo de receptores enantioselectivos para la Máquina de Cram es doble. Por una parte, resulta difícil encontrar receptores que tengan la suficiente afinidad por los aminoácidos como para que puedan extraerlos del agua al cloroformo. Los aminoácidos son compuestos iónicos, presentan puntos de fusión elevados y solubilidades relativamente grandes en agua; en cambio, son muy insolubles en disolventes orgánicos apolares, ya que estos últimos no pueden estabilizar las cargas de los grupos amonio o carboxilato por formación de enlaces de hidrógeno. Por otra parte, aunque existen receptores moleculares que extraen los aminoácidos a disolventes orgánicos como el cloroformo, resulta difícil obtener enantioselectividades elevadas debido a que la geometría de ambos enantiómeros de cada aminoácido es relativamente similar.

¹² Cram, D. J. "The Design of Molecular Hosts, Guests and their Complexes" Chemistry Nobel Lecture 1987.

Es por ello que en este trabajo nos hemos planteado abordar la preparación y el estudio de nuevos receptores que pudiesen ser útiles en una futura Máquina de Cram. La obtención de receptores moleculares enantioselectivos que permitiesen la utilización de la Máquina de Cram, abarataría el coste en la resolución de las mezclas racémicas de aminoácidos, ya que permitiría su obtención por síntesis química.

Para ello, se han empleado como punto de partida ciertas ideas obtenidas a partir de receptores enantioselectivos para aminoácidos encontrados en la bibliografía (figura 8), los cuales permiten la extracción de estos compuestos desde una fase acuosa al cloroformo. Sin embargo, por lo general las enantioselectividades obtenidas no han sido suficientemente elevadas como para su utilización en la Máquina de Cram.¹³

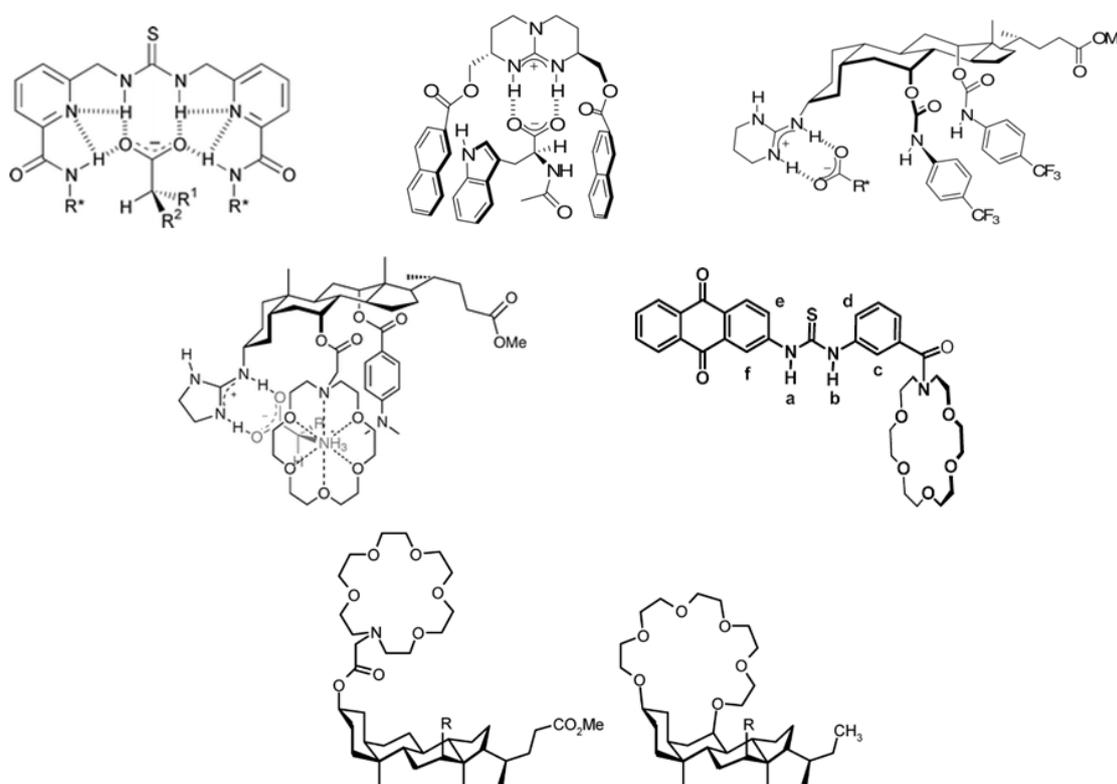


Figura 8. Receptores moleculares enantioselectivos para aminoácidos.

¹³ (a) Galan, A.; Andreu, D.; Echavarren, A. M.; Prados, P.; de Mendoza, J. "A receptor for the enantioselective recognition of phenylalanine and tryptophan under neutral conditions" *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1511–1512. (b) Graham, M.; Kyne, A.; Mark, E.; Light, A.; Mike, B.; Hursthouse, A.; de Mendoza, J.; Kilburn, J. D. "Enantioselective amino acid recognition using acyclic thiourea receptors" *J. Chem. Soc.: Perkin Trans. 1* **2001**, 1258–1263. (c) Lawless, L. J.; Blackburn, A. G.; Ayling, A. J.; Perez-Payan, M. N.; Davis, A. P. "Steroidal guanidines as enantioselective receptors for N-acyl α -amino acids. Part 1. 3α -Guanylated carbamates derived from cholic acid" *J. Chem. Soc.: Perkin Trans. 1* **2001**, 1329–1341. (d) Tamminen, J.; Kolehmainen, E. "Bile Acids as Building Blocks of Supramolecular Hosts" *Molecules* **2001**, *6*, 21–46. (e) Karbarz, M.; Romanski, J. "Dual Sensing by Simple Heteroditopic Salt Receptors Containing an Anthraquinone Unit" *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 3616–3623.

Por otro lado, en los últimos años se han empezado a emplear péptidos como tratamiento para ciertas enfermedades.¹⁴ Este tipo de compuestos poseen un interés farmacológico muy elevado, como por ejemplo en la síntesis de nuevas líneas de antineoplásicos, antibióticos, citostáticos, inmunosupresores, etc. Sin embargo, hasta el momento se han obtenido pocos resultados,¹⁵ ya que el organismo los metaboliza con relativa facilidad y la concentración en el torrente sanguíneo no es lo suficientemente elevada como para mantener una concentración mínima efectiva y por lo tanto, no produce un efecto farmacológico adecuado. Es por ello que se ha comenzado a desarrollar un interés creciente en la preparación de aminoácidos no proteinogénicos, los cuales, posteriormente, se emplean para la síntesis de nuevos péptidos. En comparación con el péptido al que pretenden emular, presentan mayor estabilidad metabólica, mayor afinidad y selectividad por el receptor y, al mismo tiempo, presentan una actividad farmacológica mejorada (figura 9).¹⁶

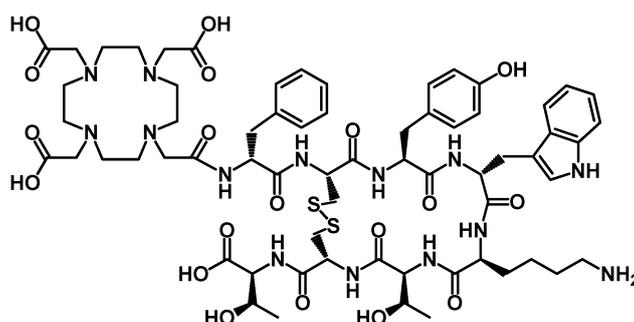


Figura 9. Péptido empleado para el tratamiento del cáncer.¹⁷

Estas ventajas hacen que cada vez se recurra más a la síntesis de estos nuevos aminoácidos (figura 10), pero nuevamente nos encontramos con la limitación de que se obtienen mezclas racémicas que es necesario separar en los enantiómeros correspondientes para, posteriormente, formar el péptido con la estereoquímica adecuada.

¹⁴ (a) Krieger, D. "Brain peptides: what, where, and why?" *Science* **1983**, 222, 975-985. (b) Bryson, J. W.; Betz, S. F.; Lu, H. S.; Suich, D. J.; Zhou, H. X.; O'Neil, K. T.; Degradó, W. F. "Protein Design: A Hierarchic Approach" *Science* **1995**, 270, 935-941.

¹⁵ Giannis, A.; Kolter, T. "Peptidomimetics for Receptor Ligands? Discovery, Development, and Medical Perspectives" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, 32, 1244-1267.

¹⁶ Veber, D.; Freidinger, R. "The design of metabolically-stable peptide analogs" *Trends Neurosci.* **1985**, 8, 392-396.

¹⁷ Jamous, M.; Haberkorn, U.; Mier, W. "Synthesis of Peptide Radiopharmaceuticals for the Therapy and Diagnosis of Tumor Diseases" *Molecules* **2013**, 18, 3379-3409.

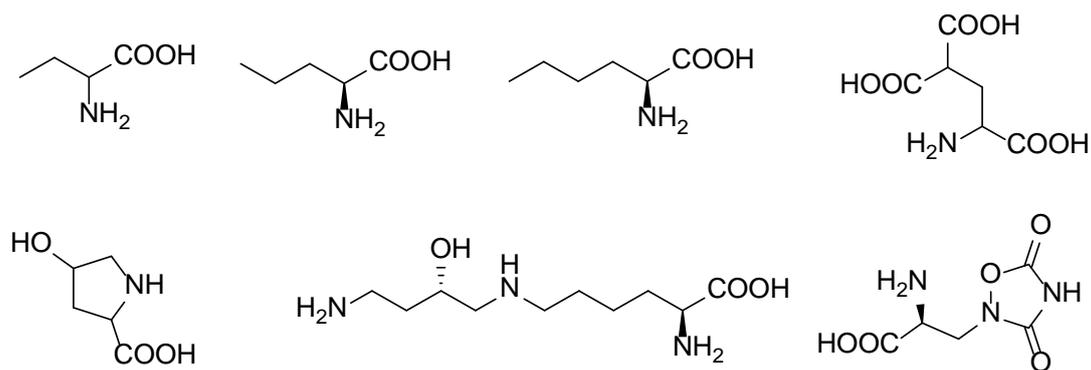


Figura 10. Aminoácidos no proteínogénicos que se podrían obtener fácilmente combinando la síntesis tradicional con la Máquina de Cram.

Una estrategia útil en este sentido podría ser la obtención de aminoácidos no proteínogénicos en mezcla racémica y posteriormente resolver dicha mezcla mediante la Máquina de Cram.

1.1. ANTECEDENTES EN EL GRUPO DE TRABAJO

En nuestro laboratorio, se han encontrado ya varios receptores moleculares enantioselectivos para aminoácidos. La figura 11 muestra un receptor enantioselectivo para la prolina (izquierda)¹⁸ y otro para la fenilalanina (derecha).¹⁹

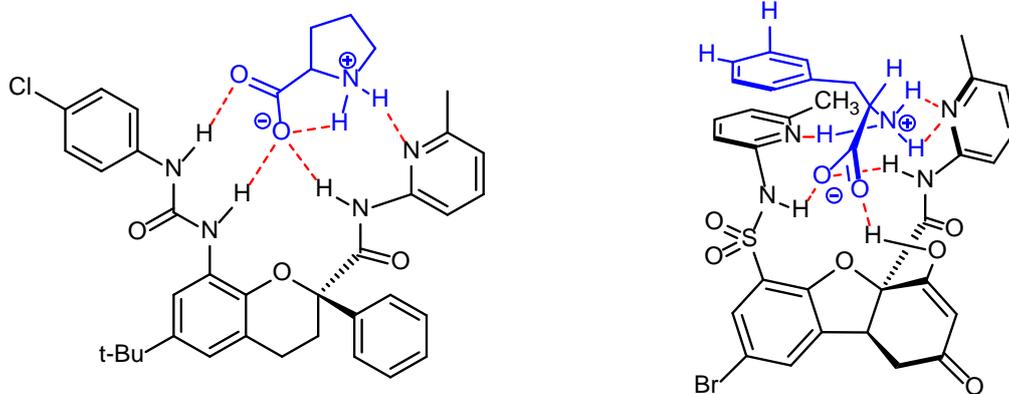


Figura 11. Receptores enantioselectivos para la prolina y la fenilalanina.

Aunque el primero de ellos extrae bien la prolina del agua, la enantioselectividad que hemos medido es relativamente baja, de solo un factor de tres. En el caso del segundo de ellos, el

¹⁸ Temprano, A. G.; Monleón, L. M.; Rubio, O. H.; Simón, L.; Pérez, A. B.; Sanz, F.; Morán, J. R. "A highly selective receptor for zwitterionic proline" *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 1325–1331.

¹⁹ Gómez Herrero, F.; Rubio, O. H.; Monleón, L. M.; Fuentes de Arriba, A. L.; Simón, L.; Morán, J. R. "A molecular receptor for zwitterionic phenylalanine" *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 3906–3912.

receptor extrae la fenilalanina del agua con una elevada preferencia a cualquier otro aminoácido natural, pero la enantioselectividad sigue siendo relativamente baja.

Pese a la obtención de los dos receptores moleculares anteriores, el diseño de receptores para aminoácidos es un reto difícil de conseguir. Uno de los factores estructurales que más ayuda en su diseño es la utilización de éteres corona. La figura 12 muestra un receptor que permite la extracción de aminoácidos zwitteriónicos del agua al cloroformo y que presenta un éter corona en su estructura.²⁰

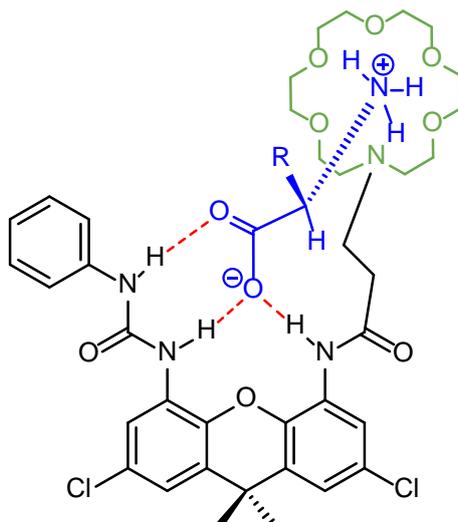


Figura 12. Receptor molecular para aminoácidos que presenta un éter corona en su estructura.

El receptor anterior no presenta centros quirales y, por ello, carece totalmente de enantioselectividad, lo que le hace totalmente inútil para su utilización en la Máquina de Cram. Para conseguir enantioselectividad, se intentó introducir centros quirales en la estructura, pero ninguno de los receptores sintetizados, mostrados en la figura 13, permitió la extracción de aminoácidos a una fase orgánica.²¹ Creemos que este resultado se explica porque el pequeño

²⁰ Hernández, J.; Muñiz, F. M.; Oliva, A.; Simón, L.; Pérez, E.; Morán, J. R. "A xanthone-based neutral receptor for zwitterionic amino acids" *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6983-6985.

²¹ (a) Pérez, E. M.; Oliva, A. I.; Hernández, J. V.; Simón, L.; Morán, J. R.; Sanz, F. "Trans-Benzoxanthene receptors for enantioselective recognition of amino acid derivatives" *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5853-5856. (b) Oliva, A. I.; Simón, L.; Hernández, J. V.; Muñiz, F. M.; Lithgow, A.; Jiménez, A.; Morán, J. R. "Enantioselective recognition of α -amino acid derivatives with a *cis*-tetrahydrobenzoxanthene receptor" *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, *2*, 1050-1052. (c) Oliva, A. I.; Simón, L.; Muñiz, F. M.; Sanz, F.; Morán, J. R. "A *trans*-tetrahydrobenzoxanthene receptor for the resolution of racemic mixtures of sulfonylamino acids" *Chem. Commun.* **2004**, 426-427. (d) Oliva, A. I.; Simón, L.; Muñiz, F. M.; Sanz, F.; Morán, J. R. "Enantioselective Lutidine-Tetrahydrobenzoxanthene Receptors for Carboxylic Acids" *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1698-1702. (e) Oliva, A. I.; Simón, L.; Muñiz, F. M.; Sanz, F.; Ruiz-Valero, C.; Morán, J. R. "Chromogenic Charge Transfer Cleft-Type Tetrahydrobenzoxanthene Enantioselective Receptors for Dinitrobenzoylamino Acids" *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6883-6885. (f) Oliva, A. I.; Simón, L.; Muñiz, F. M.; Sanz, F.; Morán, J. R. "Aminopyridine-Benzoxanthene Enantioselective Receptor for Sulfonylamino Acids" *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1155-1157. (g) Oliva, A. I.; Simón, L.; Muñiz, F. M.; Sanz, F.; Morán, J. R. "Urea-tetrahydrobenzoxanthene receptors for carboxylic acids" *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3755-3762.

impedimento estérico que genera la introducción de los grupos metilo en la estructura es suficiente para desestabilizar el complejo en la fase orgánica.

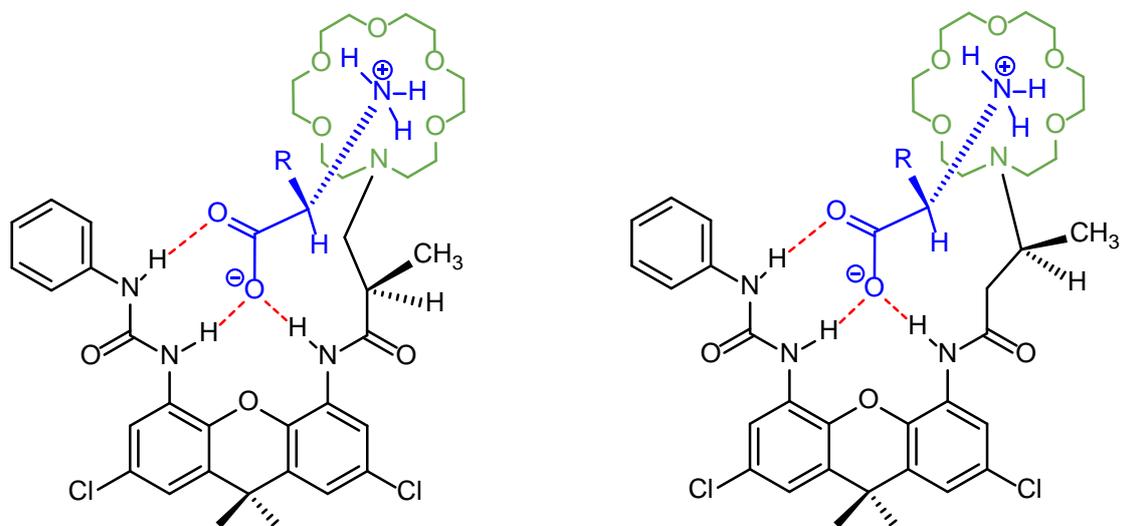


Figura 13. Receptores moleculares quirales para aminoácidos que no permiten la extracción al cloroformo.

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo, nos planteamos el estudio de receptores moleculares que permitan el reconocimiento enantioselectivo de aminoácidos de manera que sea posible llevar a cabo la resolución de las mezclas racémicas de los mismos por transporte a través de membranas apolares.

Para alcanzar dicho resultado, los objetivos concretos que se plantean son los siguientes:

1. Síntesis de un esqueleto quiral de cromano que sirva de base para la elaboración de receptores que delimiten una cavidad con estructura de agujero oxianiónico y que sean enantioselectivos para aminoácidos en su estado natural.
2. Funcionalización de dicho esqueleto para el desarrollo de receptores moleculares que permitan la asociación de derivados de α -aminoácidos u otros huéspedes.
3. Separación de los enantiómeros del receptor cuando el receptor racémico resulte prometedor para el reconocimiento enantioselectivo de los sustratos.
4. Cristalización del receptor para proceder a la determinación de su geometría estructural mediante difracción de rayos X.
5. Estudio de las propiedades supramoleculares del nuevo receptor con aminoácidos u otros huéspedes que sean adecuados y que permitan determinar la morfología y el tamaño de la cavidad formada por el receptor.

3. MÉTODOS Y RESULTADOS

3.1. PREPARACIÓN DEL RECEPTOR 1

Para preparar un receptor que permita la extracción enantioselectiva de aminoácidos se requiere que, al menos, presente un centro quiral. Para conseguir la presencia del centro quiral sin que el impedimento estérico perjudique la formación del asociado, nos planteamos la utilización del esqueleto de cromano que habíamos preparado con anterioridad en el laboratorio. La estructura de este receptor, que presenta un centro quiral (figura 14), sería muy similar a la del xanteno, con el que se han obtenido buenos resultados en el grupo.

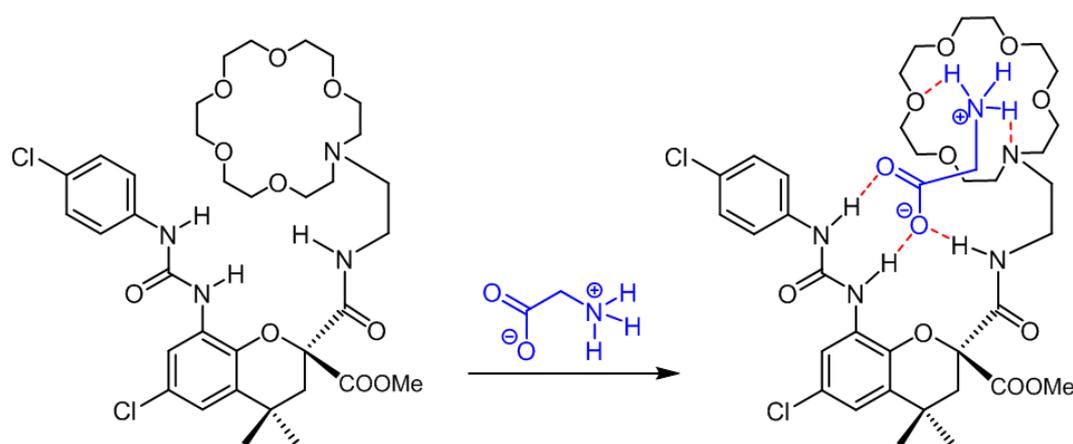


Figura 14. Estructura del receptor **1** propuesto para la asociación enantioselectiva de aminoácidos y su asociado con la glicina.

Pensábamos que, siguiendo la síntesis que se muestra en la figura 15, la preparación del receptor **1** debería de ser sencilla. Sin embargo, el proceso resultó ser más difícil de lo que habíamos imaginado.

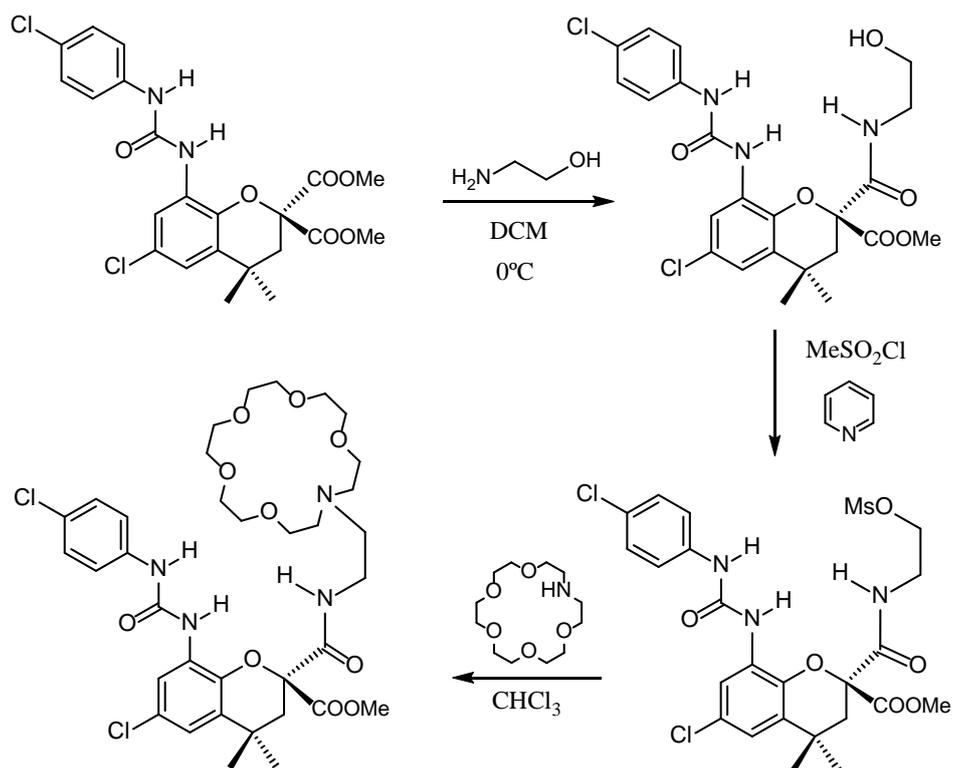


Figura 15. Preparación del receptor **1**.

El problema fundamental fue que el desplazamiento del grupo mesilo con el aza-éter corona no transcurre limpiamente hacia la formación del receptor **1**, sino que se genera como intermedio la aziridina correspondiente (figura 16), y este compuesto ya no reacciona bien con el aza-éter corona, conduciendo a un rendimiento muy bajo, de alrededor del 10%.

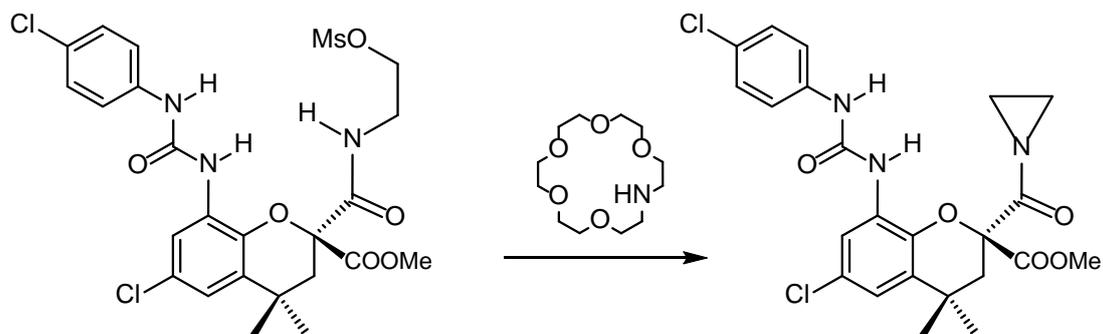


Figura 16. Generación de la aziridina durante la síntesis del receptor **1**.

Teniendo en cuenta el elevado precio del aza-éter corona (230 €/gramo), el procedimiento para la preparación del receptor **1** es poco atractivo. Por otra parte, con la pequeña cantidad obtenida del receptor **1** deseado, se consiguió demostrar que, efectivamente, es capaz de extraer aminoácidos como la leucina del agua al cloroformo. Este hecho se puede constatar porque después de tratar una disolución del receptor **1** en cloroformo con una disolución acuosa de leucina y registrar el espectro de RMN ^1H , se observan las señales del isopropilo de la leucina

como dos dobletes a 1,06 ppm y 1,11 ppm. Debido a la pequeña cantidad que hemos obtenido de este receptor **1**, no hemos podido establecer el exceso enantiomérico que se alcanza durante la extracción, pero creemos que es pequeño.

3.2. PREPARACIÓN DEL RECEPTOR 2

El estudio de la estructura del receptor **1** y del asociado con el aminoácido nos ha llevado a la conclusión de que este primer receptor molecular diseñado no muestra las propiedades óptimas para la asociación del aminoácido. Uno de los problemas que presenta es la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el nitrógeno de aza-éter corona y el NH de la amida que lo une al cromano. La formación del asociado con el aminoácido hace que este enlace intramolecular se rompa y, en consecuencia, se pierde su energía, desfavoreciéndose así la formación del complejo. Para evitar la formación del enlace de hidrógeno intramolecular y mejorar el rendimiento de la síntesis, nos planteamos la preparación de un nuevo receptor, cuya estructura se muestra en la figura 17.

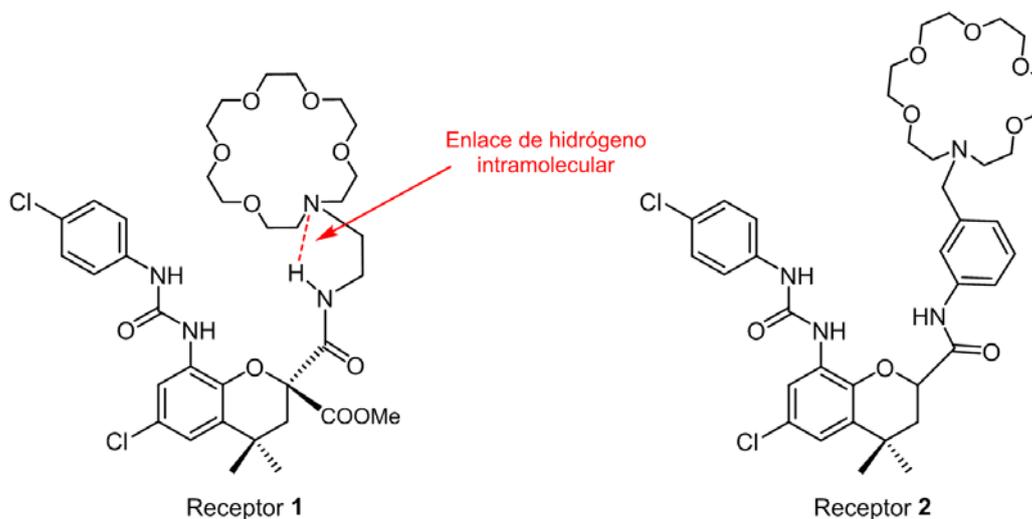


Figura 17. Receptor **1** (en el que se observa la presencia del enlace de hidrógeno intramolecular) y receptor **2** para aminoácidos.

Como se puede observar en la nueva estructura, la presencia del anillo aromático de (3-aminofenil)metanol evita la aproximación del nitrógeno del aza-éter corona al NH de la amida y, durante la síntesis, evita la formación del ciclo entre el NH y el mesilato. En estas condiciones, esperábamos un rendimiento razonablemente bueno durante el desplazamiento del mesilo por el nitrógeno del aza-éter corona. La preparación del receptor **2** se muestra en la figura 18.

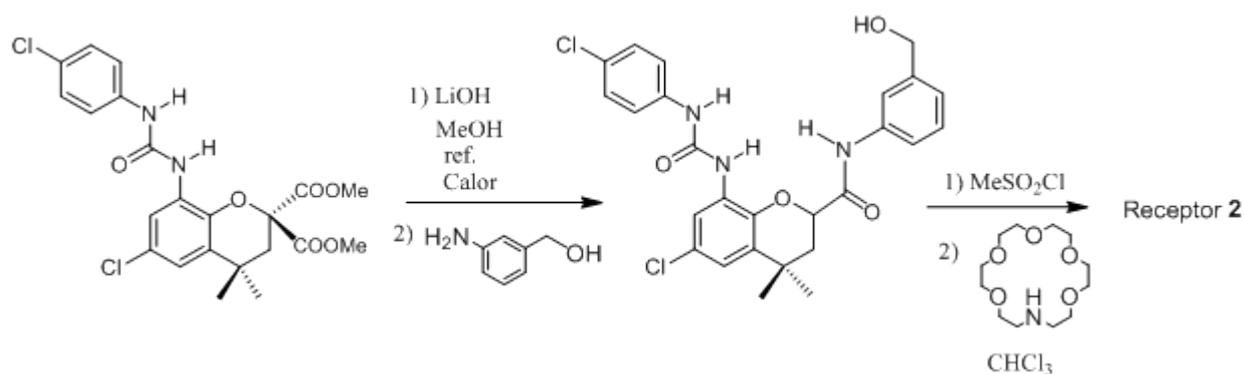


Figura 18. Preparación del receptor **2**, el cual no presenta el enlace de hidrógeno intramolecular con el nitrógeno del aza-éter corona.

Sin embargo, la preparación del receptor **2** volvió a no ser sencilla. En este caso, el problema radica en la obtención del mesilato. Debido a que ahora el mesilato obtenido se encuentra en una posición bencílica, resulta mucho más reactivo que en el caso del receptor **1**, siendo la propia piridina que se utiliza de disolvente en el medio de reacción suficientemente nucleófila como para producir el desplazamiento del mesilato. Se obtiene así una sal de piridinio tal como se muestra en la figura 19.

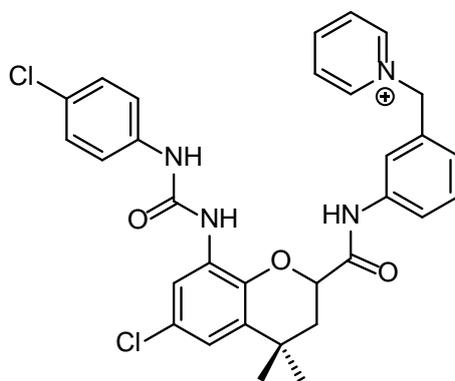


Figura 19. Sal de piridinio obtenida durante la preparación del receptor **2**.

La reacción posterior de la sal de piridinio con el aza-éter corona no transcurre limpiamente debido, probablemente, a que el nitrógeno del aza-éter puede atacar a los carbonos aromáticos de la piridina. Por lo tanto, buscamos un procedimiento alternativo para obtener el mesilato.

Para evitar el problema de la alquilación del nitrógeno piridínico recurrimos a la utilización de lutidina como disolvente, ya que al presentar dos sustituyentes voluminosos a ambos lados del nitrógeno (grupos metilo), pierde el carácter nucleófilo. De este modo sí que se consigue obtener el mesilato, aunque el rendimiento de la reacción no es muy elevado porque el propio cloruro

generado en la sustitución desplaza al mesilato, obteniéndose finalmente mezclas del mesilato y del cloruro.

El tratamiento de la mezcla anterior con el aza-éter corona conduce a la rápida sustitución del mesilato, mientras que el desplazamiento del cloruro resulta mucho más lento. Finalmente, se obtuvo el receptor **2** con un rendimiento aceptable. Sin embargo, su purificación cromatográfica nos permitió obtener únicamente una pequeña cantidad del compuesto deseado.

Los experimentos de extracción de aminoácidos desde una disolución acuosa a una disolución en cloroformo del receptor **2**, nos mostraron que probablemente no era muy enantioselectivo y, además, parecía que no extraía una cantidad elevada del aminoácido, por lo que pensamos en desarrollar un receptor molecular capaz de formar más enlaces de hidrógeno con el aminoácido.

3.3. PREPARACIÓN DEL RECEPTOR 3

Para conseguir este propósito, nos planteamos la síntesis del receptor **3** mostrado en la figura 20. La preparación y estudio de este receptor constituye el objetivo de este trabajo.

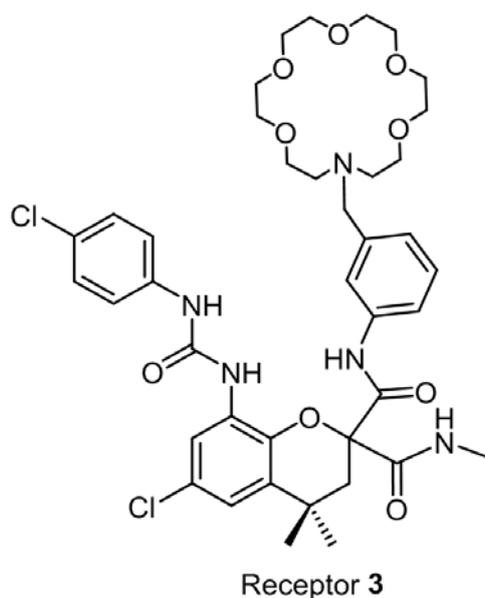


Figura 20. Receptor molecular 3 para aminoácidos que puede formar cuatro enlaces de hidrógeno con el grupo carboxilato del huésped.

La preparación de este compuesto, que se muestra en la figura 21, ha sido muy parecida a la del anterior, pero evitando la descarboxilación del ácido malónico intermedio y llevando a cabo la aminólisis del éster con metilamina.

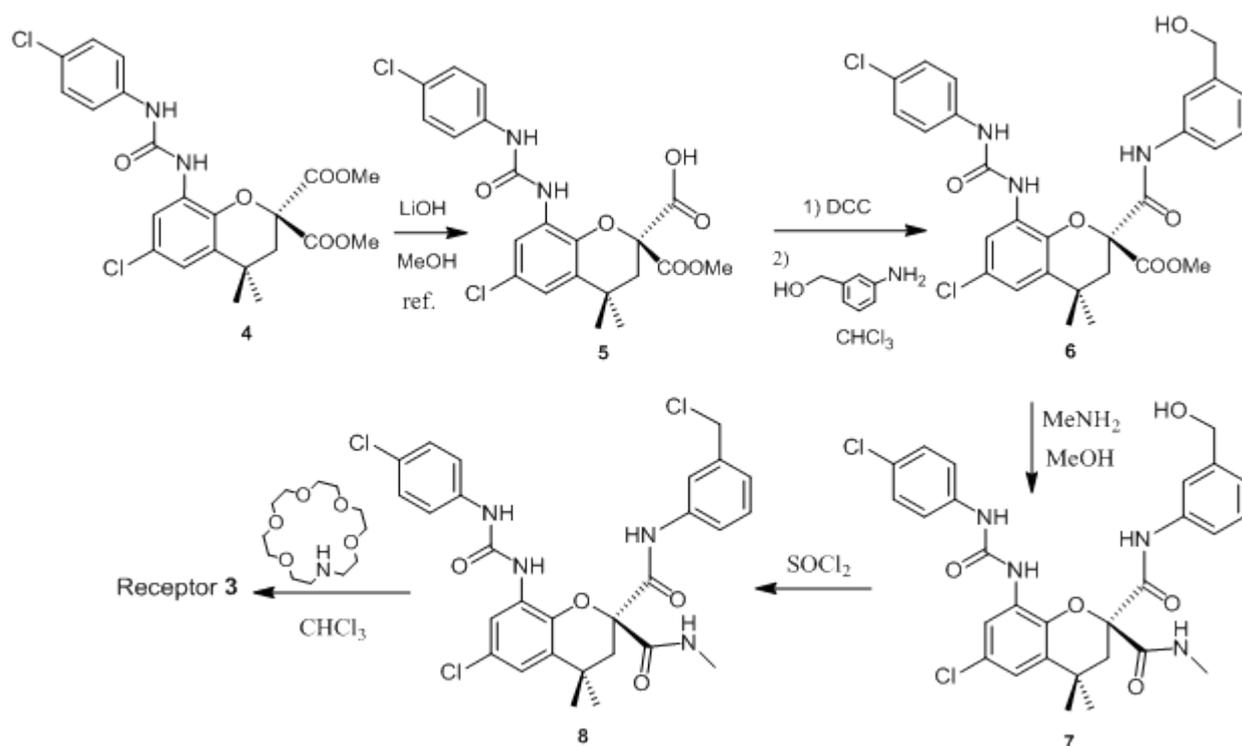


Figura 21. Preparación del receptor 3.

Como curiosidad, cabe destacar que la introducción de la metilamida en el compuesto 7 conduce a un marcado cambio en la conformación de la urea de estos compuestos, ya que ésta, en lugar de quedar en una geometría *anti/anti* como en el compuesto 6, pasa a una geometría *sin/anti* en la que el compuesto 7 puede formar enlaces de hidrógeno entre los dos donadores de las amidas y el carbonilo de la urea, tal como se muestra en la figura 22.

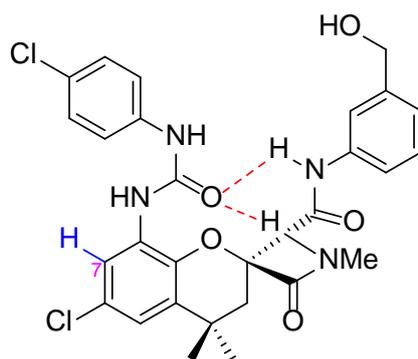


Figura 22. Conformación del compuesto 7 en la que se muestran los enlaces de hidrógeno intramoleculares de las dos amidas con el carbonilo de la urea.

Este cambio de conformación se confirma en las señales de los protones aromáticos del clorofenilo en el espectro de RMN ^1H , debido al fuerte apantallamiento que experimenta el protón de la posición C-7, que pasa de resonar a 7,6 ppm en el compuesto 6 a hacerlo a 6,5 ppm

en el compuesto **7**. Los NHs de las ureas, por su parte, experimentan fuertes desapantallamientos, moviéndose desde 9,5 ppm en el éster **6** a 10,7 ppm en la metilamida **7**.

La mayor dificultad en la obtención del receptor **3** volvió a ser la formación del mesilato del alcohol bencílico, ya que nuevamente se obtenían mezclas del mesilato y del cloruro. Puesto que habíamos observado que el cloruro también es reactivo en presencia del aza-éter corona, nos planteamos la obtención directa del cloruro, evitando el mesilato intermedio, esperando obtener en estas condiciones un mayor rendimiento del receptor **3**.

La obtención del cloruro se llevó a cabo por disolución del alcohol bencílico en cloruro de tionilo y resultó ser un procedimiento ideal, ya que una vez destilado el cloruro de tionilo en exceso, se obtuvo el cloruro correspondiente con un rendimiento cuantitativo.

Una vez purificado el cloruro por cristalización en DCM, se disolvió en cloroformo y se añadió el aza-éter corona. Hay que destacar que el rendimiento de esta reacción no tiene que ser necesariamente bueno puesto que la bibliografía muestra que es normal obtener productos de dialquilación en el nitrógeno. En nuestro caso, los productos de dialquilación generarían sales de amonio cuaternarias (figura 23), que deben perjudicar la formación del complejo, pues en el asociado, el grupo amonio cuaternario quedaría próximo al grupo amonio del aminoácido, produciéndose una repulsión electrostática perjudicial.

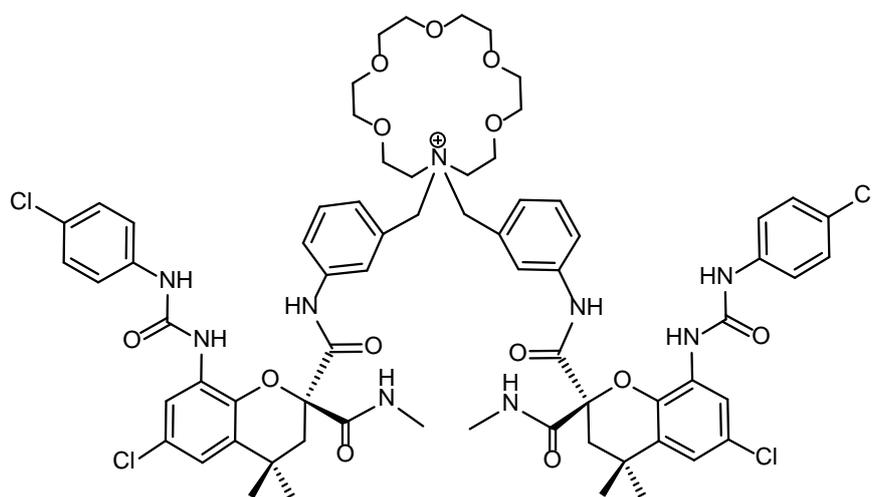


Figura 23. Producto de la dialquilación del aza-éter corona con el cloruro bencílico precursor del receptor **3**.

Sin embargo, teniendo en cuenta que el receptor **3** debe asociar el clorhidrato, tal como se muestra en la figura 24, creemos que no debe de haber una tendencia fuerte a ceder el protón a otro nitrógeno del aza-éter corona, ya que, en ese caso, se debilitaría el complejo.

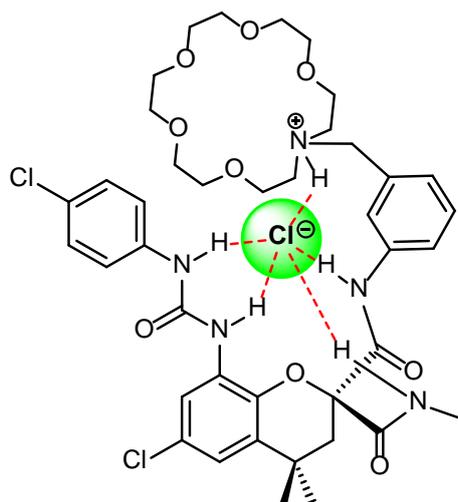


Figura 24. Asociado del receptor **3** con el cloruro durante la reacción de alquilación del aza-éter corona.

Si no se cede el protón a otro aza-éter corona, el receptor **3** no puede experimentar una segunda alquilación y, en estas condiciones, creemos que el rendimiento de la reacción debe ser bueno. No obstante, como precaución, hemos trabajado con un pequeño exceso del aza-éter para evitar, en la medida de lo posible, la doble alquilación de su nitrógeno.

En las condiciones en las que se ha llevado a cabo la reacción, el rendimiento ha sido razonablemente bueno, pero para poder estudiar el receptor **3**, es necesario purificarlo.

La purificación de este receptor **3** no es obvia, ya que no cristaliza en los disolventes que hemos utilizado. La cromatografía sobre sílice también es problemática debido a que la sílice que utilizamos presenta algún tipo de ión que tiende a bloquear la cavidad del receptor **3**. Aunque hemos intentado lavar la sílice antes de su utilización en la cromatografía con ácido clorhídrico y posteriormente con amoníaco, no hemos conseguido resolver totalmente el problema, y el rendimiento del receptor **3** obtenido sigue siendo pobre. Debido a estos problemas, nos planteamos llevar a cabo la purificación del receptor **3** a partir del asociado con un aminoácido, pues esperábamos que este tipo de estructura fuese más rígida y, en consecuencia, que cristalizase más fácilmente.

Inicialmente, confirmamos por RMN ^1H que efectivamente se forman los complejos con los aminoácidos naturales. En concreto, se confirmó la formación del asociado con glicina, alanina, fenilalanina, fenilglicina, valina, leucina e isoleucina, mientras que no quedó clara la formación del asociado con triptófano y serina.

Debido a que, de acuerdo con la regla de Wallach,²² la mezcla de enantiómeros suele producir compuestos con puntos de fusión mayores que la de los compuestos enantioméricamente puros y, en todo caso, mayores que las de mezclas de diastereoisómeros, se utilizaron las mezclas racémicas de los aminoácidos para estudiar la cristalización.

Los experimentos se llevaron a cabo preparando una disolución de unos diez miligramos del receptor **3** en 0,5 mL de deuterocloroformo, registrando el espectro de RMN ¹H y añadiendo entonces una disolución acuosa saturada del aminoácido. Una vez alcanzado el equilibrio, se confirma la formación del asociado con el aminoácido. En el caso de la alanina, es posible observar dos complejos diastereoméricos distintos en proporción 3/1. Una vez decantadas las disoluciones, la fase del cloroformo se seca sobre celulosa para evitar la presencia de iones que puedan romper el asociado, y se deja evaporar el cloroformo. En todos los casos, se obtuvieron aceites o vidrios, pero la adición de metanol y la evaporación posterior de este disolvente, permitió obtener cristales para los complejos obtenidos con *D,L*-alanina (P.f. = 218-220°C), con *L*-alanina (P.f. = 220-223°C) y con glicina (P.f. = 221-223°C).

Cualquiera de los tres aminoácidos anteriores resulta adecuado para la purificación del receptor **3**, pero elegimos la alanina racémica debido a la facilidad con la que cristaliza el complejo en metanol. Cuando una disolución del receptor **3** impuro en metanol deuterado se trata con alanina racémica, se observa inicialmente la formación de los dos complejos diastereoméricos, debido al desdoblamiento de las señales del receptor **3** en el espectro de RMN ¹H. Pasados unos minutos las señales del receptor **3** empiezan a decrecer, y al cabo de 10 minutos dichas señales desaparecen totalmente, quedando únicamente las señales de las impurezas. Este fenómeno se debe a que ambos complejos diastereoméricos del receptor **3** con la alanina racémica cristalizan y desaparecen por ello del espectro de RMN. La filtración de los cristales permite obtener los complejos puros. La redisolución de los complejos en deuterocloroformo y el lavado de la disolución resultante con agua destilada repetidas veces permite obtener el receptor **3** racémico puro.

3.4. ESTRUCTURA CRISTALINA DEL COMPLEJO DEL RECEPTOR 3 CON *D,L*-ALANINA

La evaporación lenta de una disolución del complejo del receptor racémico **3** con alanina racémica en metanol con una pequeña cantidad de cloruro de metileno nos permitió obtener

²² Wallach, O. "Zur Kenntniss der Terpene und der ätherischen Öle" *Liebigs Ann. Chem.* **1895**, 286, 90-143.

cristales de suficiente calidad para su estudio por difracción de rayos X. La estructura obtenida se muestra en la figura 25.

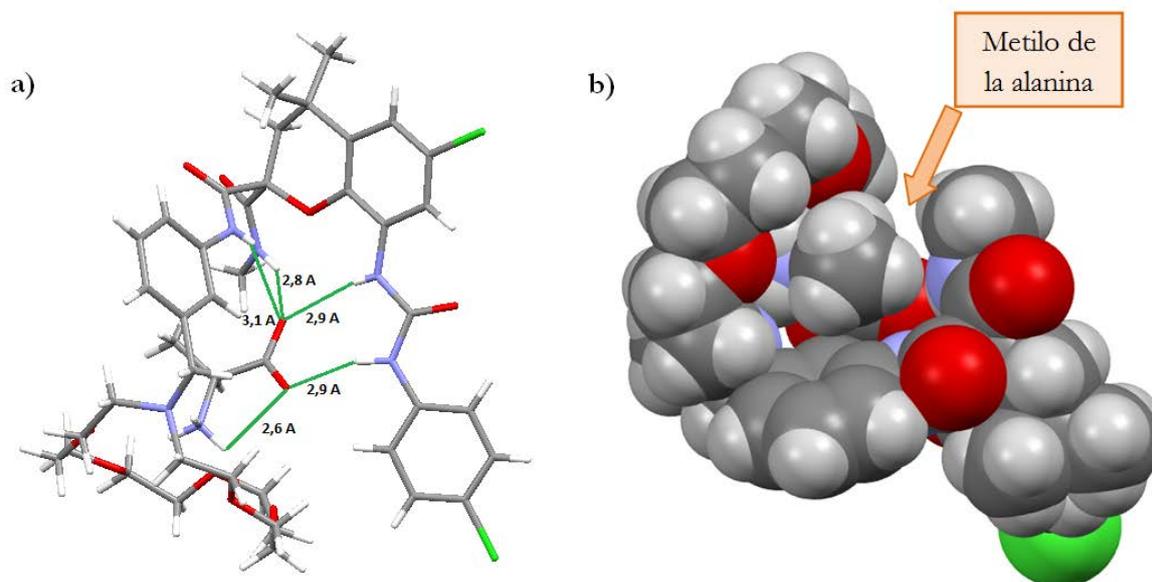


Figura 25. Estructura obtenida por difracción de rayos X para el complejo del receptor **3** racémico con alanina racémica.

El cristal obtenido es centrosimétrico debido a la cristalización de los dos enantiómeros del complejo más estable entre el receptor **3** y la alanina, mostrando la estructura una combinación del (*R*)-receptor con la *D*-alanina y del (*S*)-receptor con la *L*-alanina. La estructura presenta el grupo amonio del aminoácido en la cavidad del éter corona, formando todos los enlaces de hidrógeno posibles; mientras que el carboxilato de la alanina establece enlaces de hidrógeno con los cuatro dadores del receptor **3**, siendo éstos de fuerza moderada de acuerdo con la clasificación de Jeffrey.²³ El oxígeno del carboxilato próximo al cromano forma el enlace de hidrógeno más corto, de solo 2,8 Å, con el NH de la metilamida; mientras que el enlace que forma con el NH de la amida aromática se extiende hasta los 3,1 Å. La urea, por su parte, forma enlaces de 2,9 Å con cada uno de los oxígenos de los carboxilatos. El oxígeno del carboxilato del aminoácido más alejado del cromano debe presentar un enlace de hidrógeno con el amonio, ya que se encuentran solo a 2,6 Å. Todos estos enlaces de hidrógeno hacen que este agregado sea notablemente estable y el complejo se forme incluso en disolventes fuertemente competitivos por los enlaces de hidrógeno, como el metanol.

El rasgo más interesante de esta estructura es la posición que ocupa el metilo de la alanina, que se encuentra, aparentemente, en la zona más impedida del asociado, próximo al fenilo de la

²³ Jeffrey, G. A. "An introduction to hydrogen bonding" Oxford University Press 1997.

amida que hace el papel de espaciador entre el cromano y el aza-éter corona. Este metilo se encuentra totalmente rodeado de grupos, tal como se muestra en la figura 25 (b), en la que se ha usado una representación “space filling”. Como consecuencia, la alanina debe formar el complejo más estable, mientras que aminoácidos con cadenas laterales más voluminosas deben conducir a complejos más débiles debido a la aparición de tensiones estéricas.

3.5. CRISTALIZACIÓN DEL RECEPTOR **3** RACÉMICO Y LA *L*-ALANINA

Debido a la facilidad con la que el receptor racémico **3** cristaliza con alanina, intentamos llevar a cabo la resolución de la mezcla de receptores con *L*-alanina. La utilización de solo un isómero del aminoácido conduce a la formación de dos complejos diastereoméricos, que deben presentar propiedades físicas distintas, tales como la solubilidad en disolventes orgánicos o los puntos de fusión. El experimento se llevó a cabo en condiciones similares a las empleadas anteriormente, disolviendo 100 mg de la mezcla racémica del receptor **3** en 20 mL de metanol con 1 mL de cloruro de metileno. La evaporación lenta del disolvente permitió la generación de cristales con forma de prismas (figura 26). La filtración de estos cristales y la realización del espectro de RMN ¹H mostró que eran mezcla 1/1 de los complejos diastereoméricos de la mezcla racémica del receptor **3** y la *L*-alanina, reconociéndose en el espectro las señales de los dos enantiómeros del receptor **3**. En particular, los NHs del complejo fuerte aparecen a 9,75 ppm, 10,37 ppm y 10,56 ppm, y los del complejo débil a 10,06 ppm, 10,63 ppm y 10,74 ppm; mientras que los metilos de las alaninas se observan a 1,27 ppm en el fuerte y a 1,02 ppm en el débil.

Los cristales obtenidos de la mezcla del receptor **3** racémico y la *L*-alanina se han podido estudiar por difracción de rayos X y muestran que se trata de la cristalización de un quasiracemato²⁴ en el que se encuentran los dos complejos, el fuerte y el débil, con la alanina. Aunque estos cristales no sirvan para resolver el racémico del receptor **3**, sí han servido para conocer la estructura del complejo débil, en el que, como se espera, el metilo de la alanina queda colocado próximo al metilo de la metilamida (figura 26).

²⁴ Wheeler, K. A.; Grove, R. C.; Davis, R. E.; Kassel, W. S. “Rediscovering Pasteur’s Quasiracemates” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *47*, 78-81.

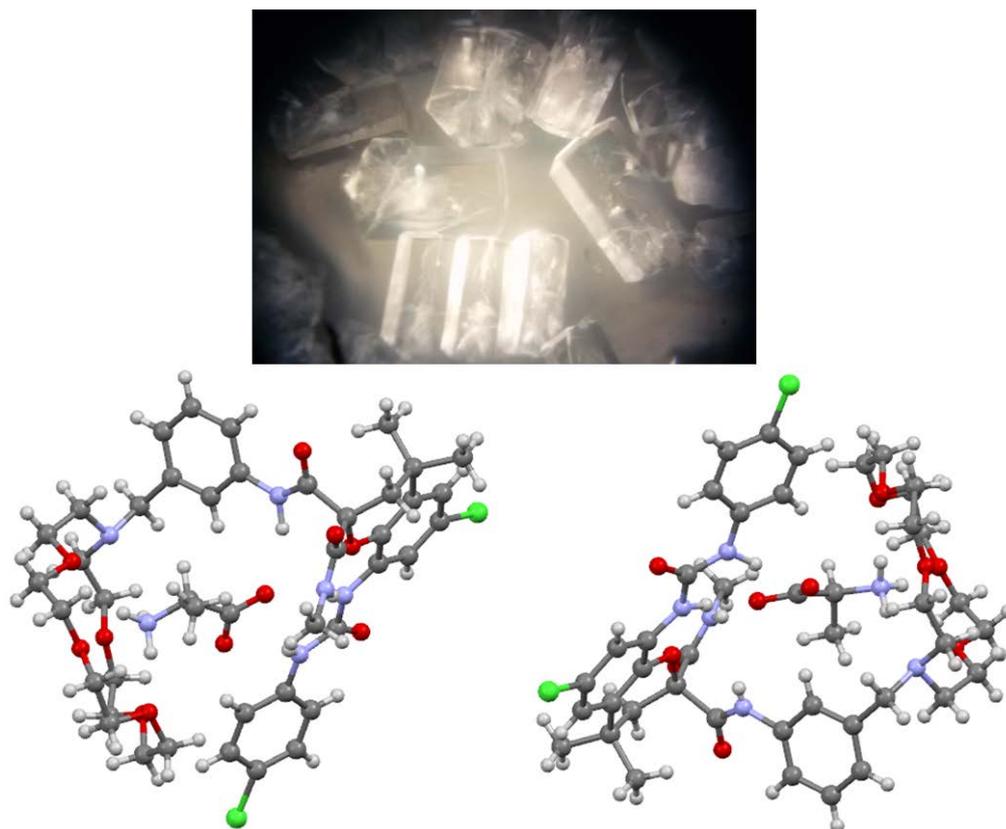


Figura 26. Cristales formados a partir del receptor **3** racémico y la L-alanina y estructura obtenida por difracción de rayos X para dichos cristales, en la que se encuentran conjuntamente las estructuras del complejo débil (izquierda) y el fuerte (derecha).

3.6. RESOLUCIÓN DE LA MEZCLA RACÉMICA DEL RECEPTOR **3**

Puesto que no era fácil la resolución de la mezcla racémica del receptor **3** por cristalización, recurrimos a llevar a cabo la separación por cromatografía. Aunque la sílice que íbamos a usar como fase estacionaria no es quiral, esperábamos que la utilización de un aminoácido enantioméricamente puro permitiese la resolución, pues la formación de los complejos diastereoméricos debe conducir a R_f s distintos para los enantiómeros del receptor **3**. Este procedimiento nos había permitido la resolución de otras mezclas racémicas.²⁵

Para estudiar qué aminoácido generaba la mayor diferencia de R_f , se impregnaron placas cromatográficas de capa fina de sílice con disoluciones acuosas al 1% de los aminoácidos con los que habíamos confirmado la formación de complejos, evaporándose a continuación el agua. Una vez cargadas las placas con la mezcla racémica del receptor **3**, se procedió a su elución con varios

²⁵ (a) Martín, M.; Raposo, C.; Almaraz, M.; Crego, M.; Caballero, M. C.; Grande, M.; Morán, J. R. "Efficient Recognition of Chiral Carbamoyl- α -Hydroxyacids with a Cleft-Type Receptor" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2386-2388. (b) Almaraz, M.; Raposo, C.; Martín, M.; Caballero, M. C.; Morán, J. R. "Chiral Recognition of Lactic Acid Derivatives with Chromenone-Benzoxazole Receptors" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3516-3517.

disolventes, llegándose a la conclusión de que una mezcla de cloruro de metileno:isopropanol (95:5) era la más adecuada. Los resultados obtenidos se pueden ver en la figura 27.



Figura 27. Cromatografías en capa fina de la mezcla racémica de receptores **3** eluida con cloruro de metileno:isopropanol (95:5) en placas impregnadas con varios aminoácidos.

Los resultados mostraron que el aminoácido más prometedor era la alanina, por lo que intentamos optimizar las condiciones con este compuesto, cambiando la concentración de la disolución acuosa con la que se impregnaban las placas y la polaridad del disolvente con la que se eluían. En la figura 28 se muestran los resultados obtenidos.



Figura 28. Estudio de la separación de los enantiómeros de la mezcla racémica de receptores **3** por CCF en presencia de cantidades variables de L-alanina.

Nuestro estudio muestra que cantidades pequeñas de la alanina, por debajo del 1% de concentración, conducen a diferencias pequeñas de R_f s, y que una concentración de entre el 2 y el 3% resulta ideal. Hacia el 4% de concentración de alanina, la diferencia de R_f s no mejora y, en cambio, esta concentración hace que la elución de las placas sea más lenta.

Una vez decididas las mejores condiciones para llevar a cabo la separación de los enantiómeros del receptor **3**, incrementamos el factor de escala utilizando placas preparativas.

Las placas de 20x20 cm se prepararon utilizando 16 g de sílice 60 PF 254 + 366 para cromatografía en capa fina preparativa. La sílice se prepara con el doble de agua, que contiene además la *L*-alanina en una proporción del 3%. Una vez activadas las placas, se cargan con una disolución de la mezcla racémica del receptor **3** (40 mg en 5 mL de DCM) y se eluyen esta vez con una mezcla de cloruro de metileno:isopropanol (98:2), ya que observamos que es preferible eluir varias veces la placa para obtener una separación óptima de los dos enantiómeros del receptor **3**. El resultado de la separación se muestra en la figura 29.

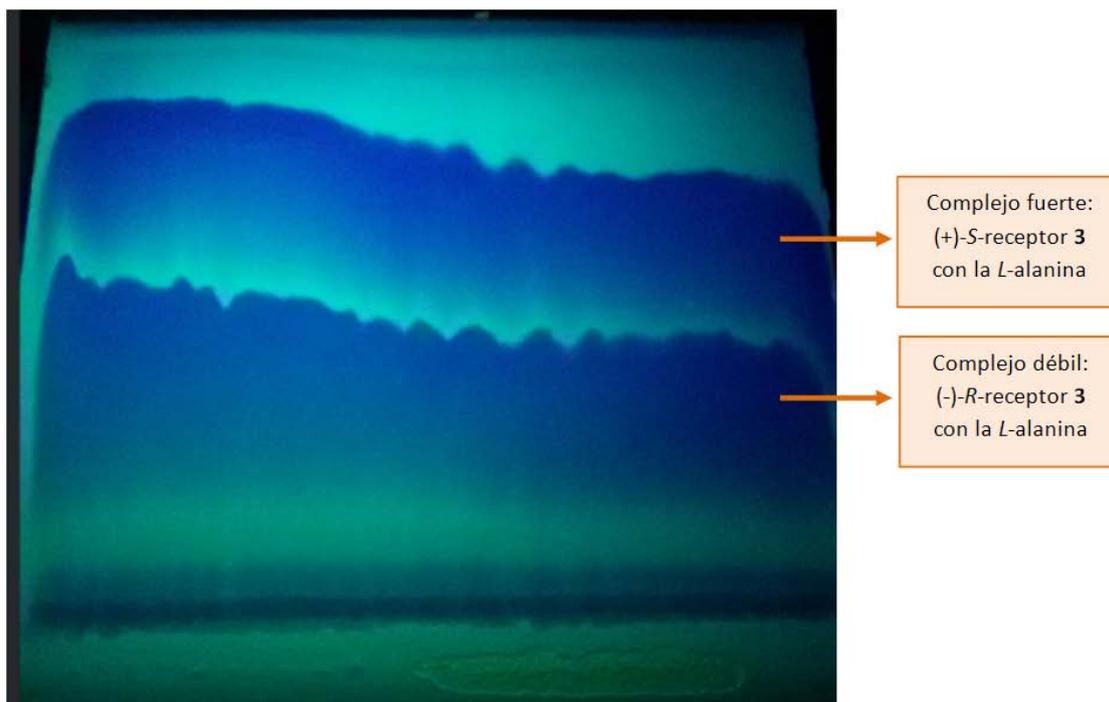


Figura 29. Separación cromatográfica de la mezcla racémica del receptor **3** en presencia de *L*-alanina.

El aislamiento de las franjas que contienen los complejos diastereoméricos del receptor **3** y su elución sobre pequeñas columnas de cromatografía con una mezcla de cloruro de metileno:metanol (9:1), nos permitió obtener 15 mg de cada uno de los complejos, cuyos espectros de RMN ^1H confirman la total separación de los dos enantiómeros del receptor **3**.

Para romper los complejos y obtener los receptores libres, se lavaron cuatro veces las disoluciones de los complejos en cloroformo con agua.

Una vez obtenidos los receptores libres, se llevó a cabo su caracterización y, en concreto, las medidas del poder rotatorio ($[\alpha]_{\text{D}} = +61,5$; $[\alpha]_{\text{D}} = -61,3$. ($c = 6,1$ mg/mL; CHCl_3)) y los espectros de dicroísmo circular (figura 30), los cuales han permitido confirmar la configuración absoluta de cada uno de los enantiómeros.

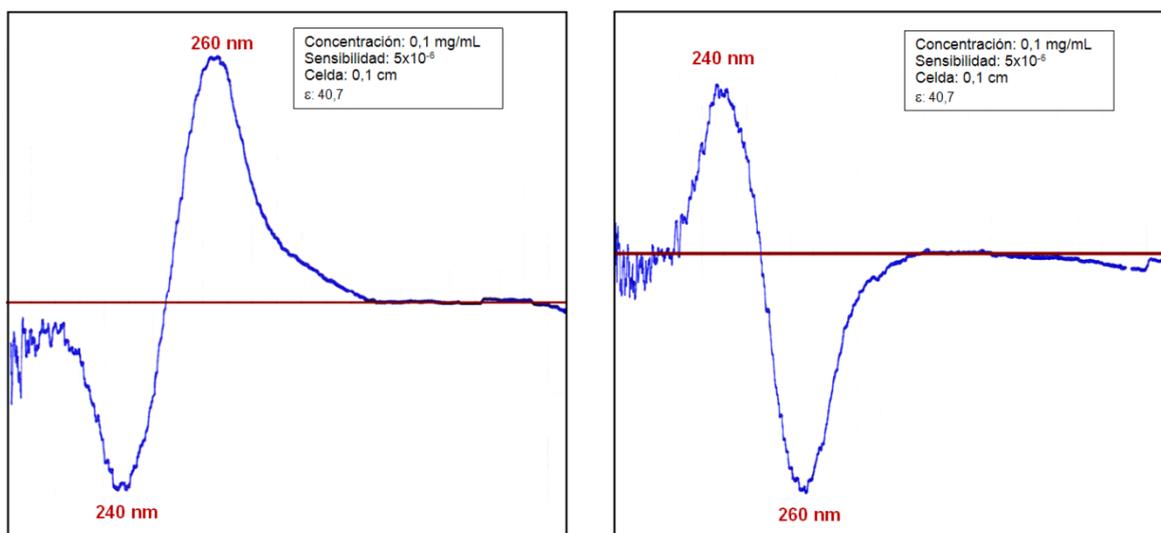


Figura 30. Espectros de dicroísmo circular de (-)-R-receptor **3** (izquierda) y de (+)-S-receptor **3** (derecha).

3.7. ESTRUCTURA DEL COMPLEJO DEL RECEPTOR **3** CON GLICINA

El estudio de la estructura obtenida para el complejo entre el receptor **3** y la alanina mostraba que el metilo de la alanina encajaba, en una de las configuraciones de la alanina, perfectamente en la cavidad del receptor **3**, mientras que en la otra configuración, deben aparecer tensiones estéricas entre el metilo de la alanina y el metilo de la metilamida del receptor **3**. Esta observación se confirmó gracias al estudio de difracción de rayos X de los cristales obtenidos para el complejo con la glicina. La estructura obtenida se muestra en la figura 31.

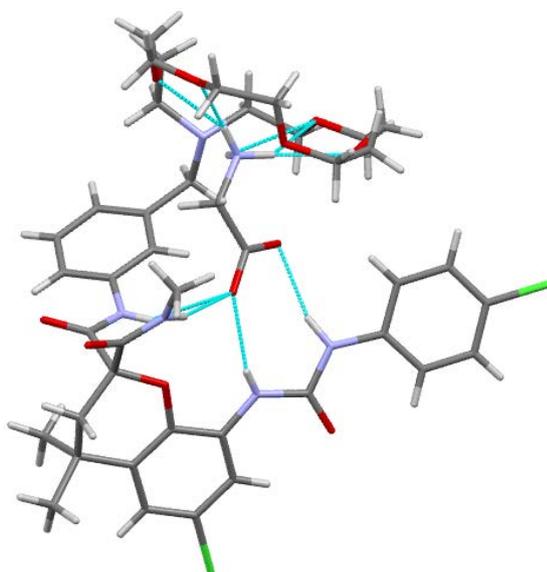


Figura 31. Estructura de rayos X del complejo del receptor **3** racémico y la glicina. Se puede observar una cavidad grande a la derecha, donde alojar el metilo de la alanina, y otra a la izquierda de menor tamaño.

La estructura del complejo con la glicina es muy parecida a la del complejo fuerte con alanina. En concreto, los cuatro enlaces de hidrógeno que muestra el carboxilato con los NHs del receptor **3** son prácticamente iguales, lo que demuestra que la presencia del metilo de la alanina en la cavidad del receptor no genera tensiones estéricas significativas. En cambio, la presencia del metilo de la alanina que tiene la configuración contraria, deja este metilo entre el éter corona y el metilo de la metilamida, generando tensiones estéricas que deforman los enlaces de hidrógeno del complejo y lo hacen más débil.

3.8. SELECTIVIDAD Y RECONOCIMIENTO QUIRAL DEL RECEPTOR 3 EN LA EXTRACCIÓN DE DISOLUCIONES ACUOSAS DE AMINOÁCIDOS NATURALES

En el caso de aminoácidos con cadenas laterales más voluminosas que las de la glicina o la alanina, las tensiones estéricas deberían ser mayores y, en consecuencia, pensamos que la alanina podría ser el aminoácido quiral más adecuado para este receptor, que, además, sería selectivo para solo uno de los enantiómeros de la alanina.

Para estudiar la preferencia del receptor **3** por la alanina en presencia de otros aminoácidos, llevamos a cabo extracciones de parejas de disoluciones acuosas saturadas de aminoácidos con el receptor **3** en cloroformo, de manera que uno de los aminoácidos fuera siempre alanina. Para realizar este estudio, se eligió el receptor **3** racémico, ya que permite determinar el reconocimiento quiral cuando se utilizan mezclas racémicas de aminoácidos y, en consecuencia, puede permitir determinar, en un único experimento, la selectividad a favor de la alanina y el reconocimiento quiral con el nuevo aminoácido utilizado.

Para llevar a cabo los experimentos, se prepararon disoluciones 10^{-2} M del receptor racémico **3** en deuterocloroformo. Estas muestras se trataron en cada caso con una disolución acuosa del aminoácido problema en forma racémica y se registró el espectro de RMN ^1H , del cual es posible determinar el reconocimiento quiral por simple integración de las nuevas señales generadas por la formación de los correspondientes complejos diastereoméricos. La adición de un exceso de alanina racémica a la mezcla anterior conduce a la formación de nuevos complejos diastereoméricos, y la integración de las señales de estos nuevos complejos frente a las señales de los anteriores, permite conocer la preferencia que presenta el receptor **3** por la alanina.

El primer experimento se llevó a cabo con leucina. El espectro de RMN ^1H muestra que se forman dos complejos distintos con la leucina racémica: uno más abundante que presenta las

señales grandes de los metilos de la leucina a 0,88 ppm y 0,53 ppm, y el otro que muestra los dos metilos juntos en una señal ancha a 0,61 ppm. La integración de las dos parejas de metilos nos ha permitido obtener una relación de concentraciones de $K_{rel}=5$.

La adición de alanina racémica a la disolución anterior conduce a las señales propias de los dos complejos con la alanina, que muestran las señales de los metilos de la alanina a 1,02 y 1,39 ppm. La integración de la señal del metilo de la alanina a 1,02 ppm frente al metilo de la leucina a 0,88 ppm nos condujo a una relación de constantes de asociación de $K_{sel}=2$, lo que muestra que el asociado fuerte de la alanina se extrae dos veces mejor que el de la leucina, un hecho que es curioso porque, siendo la leucina un aminoácido mucho más lipófilo, debería haberse extraído mucho mejor.

La determinación del reconocimiento quiral existente en el caso de la fenilalanina fue más difícil debido a que no presenta metilos que se puedan integrar fácilmente. Fue por ello necesario recurrir a las señales de los NHs de la urea y la amida aromática del receptor **3**. Estas señales aparecen como singletes anchos, solapados entre ellos, lo que dificulta la integración. Para determinar el reconocimiento quiral del receptor **3**, se eligió la señal de uno de los NHs del complejo débil que resuena a 10,83 ppm, y se integró respecto a cuatro señales formadas por tres de los NHs del complejo fuerte y uno del complejo débil, que resuenan entre 9,89 ppm y 10,19 ppm. La relación de integrales obtenida fue de 1/6, de lo que se puede deducir que el reconocimiento quiral corresponde a un valor de $K_{rel} = 1,67$.

La adición de alanina racémica nos permitió obtener un nuevo espectro de protón en el que la señal del complejo fuerte de la alanina a 10,36 ppm se puede integrar frente a las señales del complejo de la fenilalanina a 10,19 ppm, mostrando una preferencia de $K_{sel} = 3$ a favor de la alanina.

El experimento con valina racémica mostró las señales de los metilos del complejo fuerte a 0,79 ppm y 0,85 ppm; mientras que el complejo débil presenta solo una señal clara a 0,53 ppm, ya que el otro metilo está solapado con las señales del complejo fuerte. La integración del metilo del complejo débil frente a los otros tres mostró una relación de 3,6, lo que permite deducir una $K_{rel} = 1,3$.

La adición de alanina a la disolución anterior nos permitió llevar a cabo la integración de las señales de los metilos de la alanina a 1,02 ppm y 1,39 ppm frente a las anteriores de los complejos de la valina. La relación de integrales fue de 5,5 y, teniendo en cuenta que el número de metilos

de la valina es doble que el de la alanina, se puede calcular una $K_{sel} = 11$, lo que corresponde a una buena selectividad a favor de la alanina.

Debido a que no disponíamos de cisteína racémica, en este caso se llevó a cabo el estudio con *L*-cisteína. La adición de *L*-cisteína a la disolución 10^{-2} M del receptor **3** muestra en el espectro de RMN ^1H los NHs de las ureas y la amida aromática de los dos complejos diastereoméricos a 12,32 ppm, 12,23 ppm, dos a 11,75 ppm, 11,62 ppm y 11,53 ppm, sin que se pueda decidir cuales corresponden al complejo fuerte y cuáles al débil, ya que todos presentan la misma intensidad. La adición de *L*-alanina genera señales nuevas debidas a los NHs de los nuevos complejos. La señal del NH del complejo débil de la alanina a 10,72 ppm muestra una intensidad relativa de 0,4 frente a la de 10,35 del complejo fuerte, mientras que las sumas de las señales de dos de los NHs del complejo fuerte de la *L*-cisteína y otro de los NHs del complejo débil de la alanina integran 1,4. De estos datos, se puede concluir que el complejo fuerte de la alanina se extrae con una concentración doble que el de la cisteína ($K_{sel} = 2$). Por otra parte, la integración de la señal a 9,90 ppm, asignable a un NH del complejo débil de la cisteína, que integra con una intensidad de 0,33, indica que este complejo débil se encuentra en una relación de concentraciones de $K_{rel} = 0,6$ respecto al complejo fuerte, lo que corresponde a un reconocimiento quiral pequeño para la cisteína.

Tabla 2. Resultados obtenidos en la extracción de disoluciones acuosas de varios aminoácidos al cloroformo en presencia del receptor **3** (10^{-2} M) a 20°C .

AMINOÁCIDOS	K_{sel}	K_{rel}
Leucina	2	5
Fenilalanina	3	1,67
Valina	11	1,3
Cisteína	2	0,6

4. CONCLUSIONES

Tras analizar todos los resultados experimentales obtenidos a lo largo del trabajo, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- 1) Se han diseñado tres receptores moleculares para estudiar su reconocimiento enantioselectivo con aminoácidos naturales.
- 2) La síntesis del receptor **1** ha mostrado un rendimiento muy pequeño debido a la formación de la aziridina intermedia, que no reacciona con un rendimiento elevado con el aza-éter corona.
- 3) Se ha sintetizado una pequeña cantidad del receptor **2**, pero no se ha llevado a cabo su estudio porque los resultados preliminares han mostrado que el reconocimiento enantioselectivo de aminoácidos es pobre.
- 4) Se ha sintetizado un receptor **3**, que forma un enlace de hidrógeno adicional con el carboxilo de los aminoácidos.
- 5) La estructura del receptor **3** se ha confirmado por difracción de rayos X de su complejo con alanina y con la glicina.
- 6) La mezcla racémica del receptor **3** y la *L*-alanina cristaliza formando un quasiracemato, de acuerdo con el estudio de difracción de rayos X.
- 7) Se ha establecido que el reconocimiento quiral del receptor **3** y la alanina es de $K_{rel} = 3$, siendo el complejo fuerte el que presenta la misma configuración en el receptor y el huésped.
- 8) Se ha medido el reconocimiento enantioselectivo del receptor **3** y la leucina, siendo el valor obtenido de $K_{rel} = 5$. Éste ha sido el mejor reconocimiento obtenido para aminoácidos naturales.
- 9) Se ha estudiado la selectividad del receptor **3** en la extracción de aminoácidos naturales, siendo la alanina el aminoácido que se asocia preferentemente.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y CROMATOGRÁFICAS

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en un espectrómetro *Bruker WP-200-SY* (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C), *Varian 200 Mercury VS 2000* (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C) y *Bruker Advance DRX* (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C ; Servicio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad de Salamanca). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) empleando la señal del disolvente como estándar interno. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz), con las siguientes abreviaturas para explicar las multiplicidades: s, singlete; d, doblete; t, triplete; m, multiplete; c, cuartete; q, quintuplete; dd, doblete de dobletes; dt, doblete de tripletes; td, triplete de dobletes.

Los espectros de infrarrojo (IR) fueron realizados en forma de película o en nujol, con una ventana de NaCl, y se registraron en un espectrofotómetro *Nicolet IR100*. Las bandas se expresan en cm^{-1} .

Los puntos de fusión (P.f.) se determinaron con un microscopio *Leica Galen III*.

Los espectros de masas se realizaron en el Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Salamanca. Los espectros fueron registrados con un espectrómetro cuadrupolo-tiempo de vuelo (TOF) *Applied Biosystems QSTAR XL* y *Waters ZQ 4000* usando ionización por electrospray (ESI).

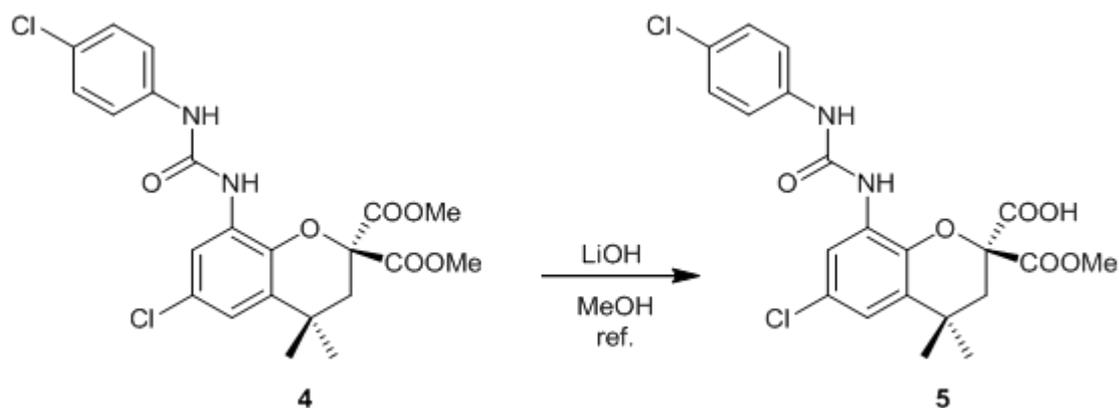
La cromatografía de capa fina se realizó sobre placas de 0,2 mm de gel de sílice 60 F₂₅₄ soportada en aluminio (*Merck*) y se revelaron con una lámpara ultravioleta de $\lambda = 254$ nm. Para la cromatografía en columna se empleó gel de sílice *Chromagel 60 A. C. C.* 70-200 μm .

Todos los cálculos de modelización se realizaron con el software Gaussian 09,²⁶ a cargo del doctor Luis Simón del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Salamanca.

²⁶ R. B. Gaussian 09, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J., Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Journal* 2009.

5.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Ácido 6-cloro-8-(3-(4-clorofenil)ureido)-2-(metoxicarbonil)-4,4-dimetilcroman-2-carboxílico (5)



Se suspenden 6,0 g del compuesto **4**²⁷ (12,5 mmol) en metanol (50 mL) y se añaden 0,52 g de LiOH·H₂O (12,5 mmol). Se calienta a continuación la mezcla de reacción en baño de silicona a 80°C en atmósfera de argón hasta su total disolución. En ese momento, se elimina el metanol por destilación a presión reducida, se disuelve el bruto en AcOEt y se lava con una disolución acuosa 2 M de HCl. La fase orgánica resultante se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se elimina el disolvente por destilación a presión reducida. De esta forma, se aislaron 4,6 g (79%) del producto deseado, el compuesto **5**, en forma de sólido blanco.

P.f.: 170–178 °C.

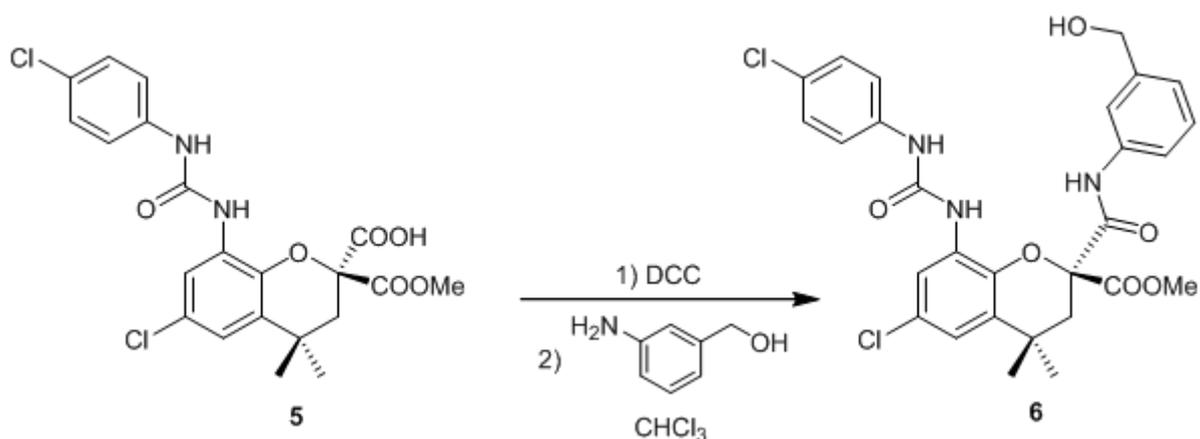
IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 1158, 1216, 1314, 1541, 1599, 1990, 1948, 3364.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,19 (3H, s); 1,25 (3H, s); 2,45 (2H, dd, *J* = 13,0 Hz); 3,77 (3H, s); 6,78 (1H, d, *J* = 2,5 Hz); 7,19 (2H, d, *J* = 8,8 Hz); 7,37 (2H, d, *J* = 8,8 Hz); 8,13 (1H, d, *J* = 2,5 Hz).

MS (ESI): 467,0 (M + H)⁺; calculado para C₂₁H₂₁Cl₂N₂O₆: 467,3.

²⁷ Hernández Rubio, O. “Catalizadores biomiméticos para la obtención de biocombustibles” *Tesis doctoral (en realización)*, Universidad de Salamanca, 2016.

6-cloro-8-(3-(4-clorofenil)ureido)-2-((3-(hidroximetil)fenil)carbamoil)-4,4-dimetilcroman-2-carboxilato de metilo (6)



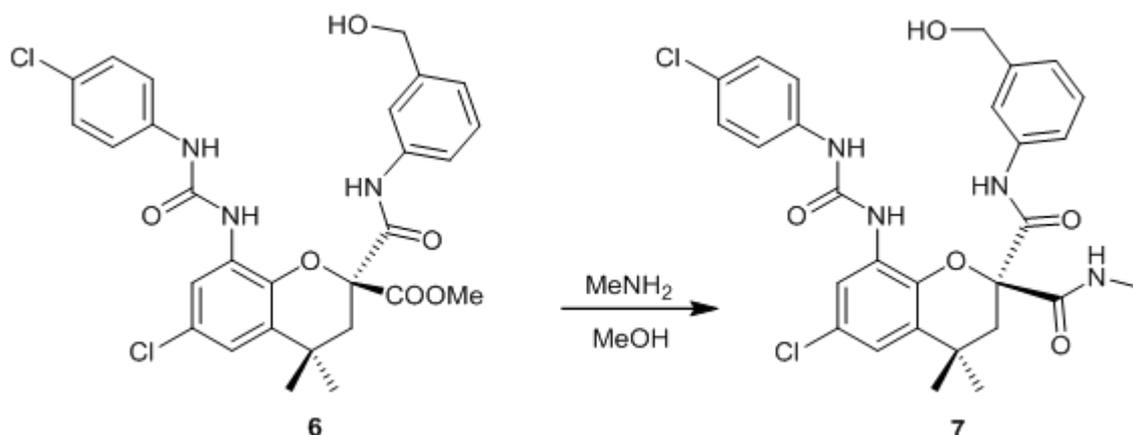
Se disuelven 4,0 g del ácido **5** (8,6 mmol) en cloroformo (100 mL) y se añaden 1,7 g de *N,N'*-diclohexilcarbodiimida (8,2 mmol). Al cabo de 2 minutos en agitación constante, se comprueba que la reacción ha terminado registrando el espectro de RMN ^1H de una alícuota tomada del medio de reacción y se añaden 1,0 g de 3-(3-aminofenil)metanol (8,1 mmol). La evolución de la reacción se sigue por RMN ^1H . El bruto de reacción obtenido se redissuelve en DCM y se purifica mediante cromatografía en columna (DCM:AcOEt 6:4), obteniéndose 3.9 g de del compuesto **6** (6,8 mmol, 79%) en forma de sólido vidrioso.

IR (CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 1123, 1541, 1606, 1670, 1730, 3299.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,24 (3H, s); 1,30 (3H, s); 2,53 (2H, dd, $J = 14,3$ Hz); 3,76 (3H, s); 4,61 (2H, s); 6,96 (1H, d, $J = 2,4$ Hz); 7,03 (1H, d, $J = 7,5$ Hz); 7,11 (2H, d, $J = 8,8$ Hz); 7,19 (1H, t, $J = 8,0$ Hz); 7,23 (2H, d, $J = 9,6$ Hz); 7,48 (1H, d, $J = 8,2$ Hz); 7,56 (1H, s); 7,62 (1H, d, $J = 2,4$ Hz); 8,06 (1H, s); 8,11 (1H, s), 9,51 (1H, s).

MS (ESI): 470,0 (M - H) $^-$; calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_6$: 570,1.

6-cloro-8-(3-(4-clorofenil)ureido)-N-(3-(hidroximetil)fenil)-N,4,4-trimetilcroman-2,2-dicarboxamida (7)



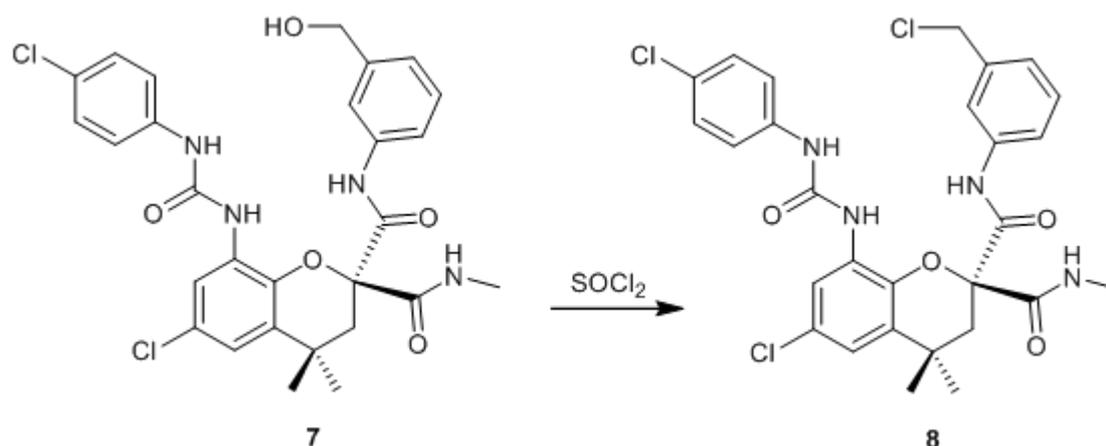
Sobre una mezcla de 2,0 mL de metilamina acuosa al 60% y 5,0 mL de metanol, se añaden 3,9 g del compuesto **6** (6,8 mmol). La mezcla de reacción se mantiene en agitación hasta que se observa por RMN ^1H que la reacción ha finalizado. Se elimina entonces el disolvente por destilación a presión reducida, obteniéndose 3,6 g del compuesto **7** (6,3 mmol, 93%) como un sólido vidrioso.

IR (CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 1223, 1541, 1606, 1684, 3312.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,30 (3H, s); 1,34 (3H, s); 2,50 (2H, dd, $J = 13,9$ Hz); 2,89 (3H, d, $J = 4,7$ Hz); 4,62 (2H, s); 6,49 (1H, d, $J = 2,2$ Hz); 7,03 (1H, d, $J = 2,5$ Hz); 7,03 (1H, d, $J = 7,5$ Hz); 7,11 (2H, d, $J = 8,8$ Hz); 7,29 (1H, t, $J = 7,4$ Hz); 7,34 (2H, d, $J = 8,9$ Hz); 7,60 (1H, d, $J = 12,4$ Hz); 7,71 (1H, s); 8,30 (1H, s); 8,57 (1H, s), 10,7 (1H, s).

MS (ESI): 569,1 (M - H); calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_5$: 569,1.

6-cloro-N-(3-(clorometil)fenil)-8-(3-(4-clorofenil)ureido)-N,4,4-trimetilcroman-2,2-dicarboxamida (8)



Se disuelven 3,6 g del compuesto **7** (6,3 mmol) en cloruro de tionilo (3,0 mL) y, a continuación, se elimina este compuesto por destilación a presión reducida y el bruto de reacción se cristaliza en DCM. Se aislaron de esta forma 2,8 g del compuesto **8** (4,7 mmol, 75%).

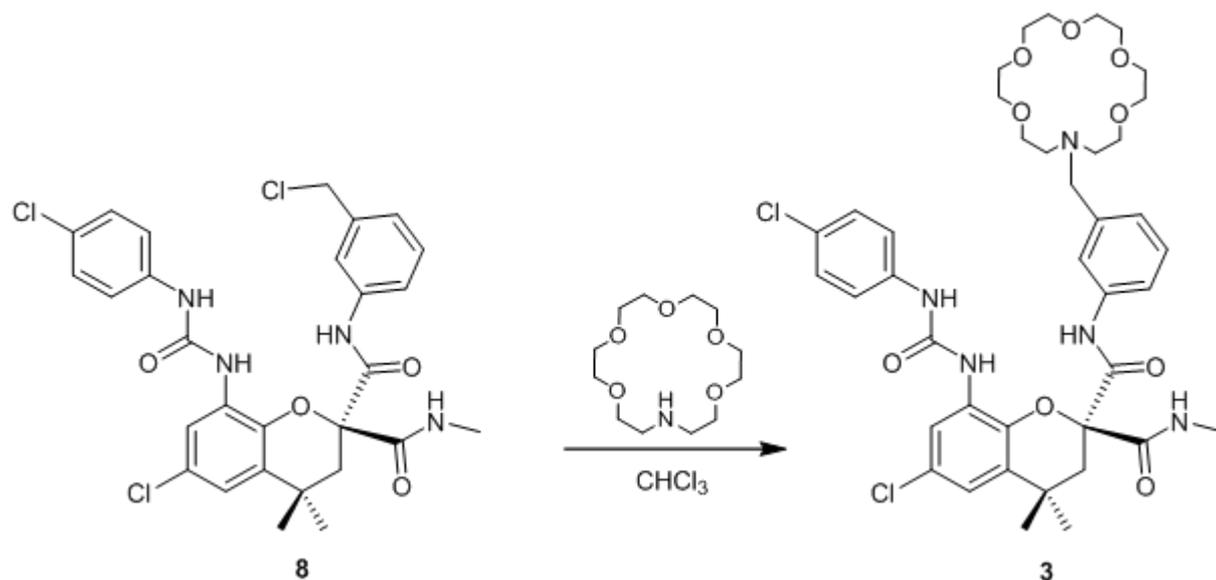
P.f.: 184-185°C.

IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 1236, 1554, 1586, 1670, 3182, 3331.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,34 (3H, s); 1,40 (3H, s); 2,50 (2H, dd, *J* = 13,0 Hz); 2,92 (3H, d, *J* = 4,6 Hz); 4,50 (2H, s); 6,35 (1H, d, *J* = 2,1 Hz); 7,04 (1H, d, *J* = 2,4 Hz); 7,16 (2H, d, *J* = 8,7 Hz); 7,24 (1H, d, *J* = 9,1 Hz); 7,32 (1H, t, *J* = 8,0 Hz); 7,36 (2H, d, *J* = 8,8 Hz); 7,74 (1H, d, *J* = 12,9 Hz); 7,78 (1H, s); 8,32 (1H, s); 8,55 (1H, s), 11,95 (1H, s).

MS (ESI): 589,0 (M + H)⁺; calculado para C₂₈H₂₈Cl₃N₄O₄: 589,1.

N-3-((1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azaciclooctadecan-16-il)metil)fenil)-6-cloro-8-(3-(4-clorofenil)ureido)-*N*,4,4-trimetilcromano-2,2-dicarboxamida (**3**)



Se disuelven 2,1 g del compuesto **8** (3,6 mmol) en cloroformo (20,0 mL) y se añaden 1,2 g de aza-éter corona (4,6 mmol). La mezcla de reacción resultante se deja evolucionar durante 3 horas a 60 °C. Una vez completada la reacción, se lava la mezcla con agua para eliminar el exceso del aza-éter corona, se decanta, se seca la fase orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, lo que permitió aislar 1,9 g del receptor **3** (2,3 mmol, 64%) en forma de sólido vidrioso.

IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 1125, 1236, 1313, 1495, 1541, 1599, 1697, 3306.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,33 (3H, s); 1,35 (3H, s); 2,51 (2H, s); 2,74 (4H, t, J = 5,6 Hz); 2,87 (3H, d, J = 4,6 Hz); 3,61 (20H, m); 3,65 (2H, s); 6,66 (1H, s); 7,02 (1H, d, J = 2,3 Hz); 7,13 (2H, d, J = 8,7 Hz); 7,14 (1H, d, J=8,0 Hz); 7,23 (1H, t, J = 7,7 Hz); 7,36 (2H, d, J = 8,7 Hz); 7,50 (1H, s); 7,62 (1H, d, J = 7,9 Hz); 8,37 (1H, s); 8,60 (1H, s); 8,76 (1H, s), 10,32 (1H, s).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26,8 (CH₃); 30,3 (CH₃); 30,4 (CH₃); 31,1 (C); 42,7 (CH₂); 53,9 (2CH₂); 59,8 (CH₂); 70,3 (10CH₂); 81,3 (C); 119,6 (CH); 120,0 (2CH); 121,2 (CH); 123,1 (CH); 124,0 (CH); 125,9 (CH); 126,1 (C); 126,8 (C); 127,2 (C); 128,6 (2CH); 128,8 (CH); 132,1 (C); 136,9 (C); 138,0 (C); 143,4 (C); 154,4 (2C); 167,8 (C); 169,9 (C).

MS (ESI): 816,2 (M + H)⁺; calculado para C₄₀H₅₂Cl₂N₅O₉: 816,3.