

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***“ESTUDIO DE COMPLEJOS DIASTEREISOMÉRICOS
FLAVANONA/ β -CICLODEXTRINAS A TRAVÉS DE RESONANCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES”***

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado académico de Doctor en Química por:

CRISTINA LUCÍA ACUÑA ROUGIER

**Director de Tesis
Dr. Claudio Olea Azar**

**Codirector de Tesis
Dra. Carolina Jullian Matthaei**

**SANTIAGO – CHILE
2011**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

CRISTINA LUCÍA ACUÑA ROUGIER

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 28 de Junio de 2011

Director de Tesis:

Dr. Claudio Olea Azar

Codirector de Tesis:

Dra. Carolina Jullian Matthaei

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Nicolás Yutronic Sáez (Presidente)

Dr. Juan Guerrero Núñez

Dr. Claudio Saitz Barría

Dra. Claudia Yáñez Soto

*Quiero dedicar esta tesis a mi familia, por haberme
dado todas las herramientas para realizar este
trabajo, por su paciencia, por su ayuda constante, y
por todo su amor y comprensión.*

*A Daniel, por estar presente incondicionalmente en
los momentos más difíciles, haber hecho de ellos
mejores momentos, y por hacer de los buenos
momentos, momentos inolvidables.*

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta tesis doctoral, se me vienen a la mente una gran cantidad de personas, que de una u otra manera aportaron de diferentes formas al desarrollo y término de este proyecto.

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos y con especial cariño a mi director de tesis, Dr. Claudio Olea. Primero por creer en mí, aceptándome bajo su dirección, lo que me trajo un sinnúmero de enseñanzas, tanto personales como académicas. Le agradezco profundamente el gran apoyo intelectual, compartiendo conmigo generosamente cada idea que pudiera hacer de mi tesis un mejor trabajo, lo que fue un aporte invaluable no solo al desarrollo de esta tesis, sino que también a mi desarrollo como investigadora. Además le agradezco todo el tiempo invertido en lo personal, siempre apoyándome en momentos difíciles, escuchándome cada vez que fue necesario y enseñándome que las cosas son más sencillas de lo que aparentan. Profe, quiero que sepa que en todo sentido usted es un ejemplo para mí.

Quiero agradecer a la Dra. Carolina Jullian, también directora de esta tesis, y quien fue la primera en emprender entusiasmadamente, junto conmigo, este proyecto doctoral. Sin su interés y confianza en mí como alumna, esta tesis no hubiera sido posible. Igualmente quiero destacar la contribución de nuestras discusiones, si bien por momentos acaloradas, a mi formación académica y profesional. Además quiero agradecerle enormemente haber sido mi confidente en los malos momentos, y compartir alegremente los buenos, además de su paciencia, comprensión y generosidad.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por hacer más agradable el día a día, y hacer de nuestro lugar de trabajo un espacio más entretenido y distendido para investigar. Chiquillos, más que compañeros de trabajo, siempre los consideraré mis amigos.

A mis compañeros de doctorado, Benjamín, Germán, Mari, Seba y Raúl por su amistad, por aquellas tardes de amenas conversaciones, además de su aporte al desarrollo de este trabajo.

A Christian Folch, no solo quiero agradecerle sus acertadas opiniones con las que aportó significativamente al desarrollo de esta tesis, sino que también por aquellas inolvidables experiencias de vida que hicieron surgir una maravillosa amistad. Además le agradezco por todo el apoyo brindado en los momentos difíciles, por escucharme cuando lo necesité, por su ejemplo como persona y su constante alegría.

A Fernanda Pérez, le quiero agradecer por aquellas discusiones que aportaron al desarrollo de este trabajo. Además le quiero agradecer por esta gran cantidad de años de amistad, y que ha crecido en el último tiempo, y que solo seguirá creciendo con los años. Fernan, gracias por escucharme cuando más lo he necesitado, por darme tu apoyo sin necesidad de explicaciones, por tu preocupación incesante y por darme alegría en los momentos más difíciles.

Quiero agradecer además a mi comisión informante, porque siempre hicieron grandes aportes al desarrollo de esta tesis, y porque siempre vi en ellos un real interés por que este proyecto llegara a término satisfactoriamente.

Al Dr. Javier Morales, por su generosa disposición, al haberme brindado de su tiempo y desinteresada ayuda en parte importante de esta tesis.

Al Dr. Daniel Figueroa, que a pesar de que todo estaba en nuestra contra, nunca cedió para llevar a cabo nuestro cometido.

Además me gustaría agradecer a todo el personal de la secretaría de postgrado, por la preocupación y entrega.

Al Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica, en especial al Dr. Germán Gunther, por el uso y colaboración con el equipo de HPLC.

Agradezco a la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile, por haberme favorecido con la beca de estadías cortas de investigación, con la cual fue posible una estadía en Brasil.

Finalmente, agradezco a CONICYT por el aporte entregado mediante su beca nacional de doctorado, beca de apoyo a la realización de la tesis doctoral, becas para la asistencia a eventos y beca de extensión de tesis.

A todos, muchas gracias.

PUBLICACIONES

- 1.- Fernando Castañeda; Cristina Acuña; Maria Teresa Garland; Nicholas D. Gillitt; Ata Shirazi; Santiago J. Yunes; Clifford A. Bunton.
Cyano Triphenyl Phosphonium Ylides Stabilized by Ester or Keto Groups: Computed Conformations and Crystal Structures.
Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 182, 2541 – 2554, **2007**

- 2.- Fernando Castañeda; Christian Aliaga; Cristina Acuña; Paul Silva; Clifford A. Bunton.
Thermal Decomposition of Triphenylphosphonium Alkyl Ester Salts.
Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 183, 1188 – 1208, **2008**

- 3.- C. Acuña-Rougier; R. Mera-Adazme; C. Jullian; C. Olea-Azar.
NMR as a tool for simultaneous study of diastereoisomeric inclusion complexes formed by racemic mixture of 4'-hydroxyflavanone and heptakis-(2,6-O-dimethyl)- β -cyclodextrin.
Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 68, 339 – 346, **2010**

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE FIGURAS	X
TABLA DE ESPECTROS	XII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIV
ABREVIATURAS.....	XVI
RESUMEN.....	XVIII
SUMMARY	XX
CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>HIPÓTESIS</i>	22
1.2 <i>OBJETIVOS GENERALES</i>	23
1.3 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	23
CAPÍTULO II - MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1 <i>REACTIVOS</i>	25
2.2 <i>EQUIPAMIENTO</i>	25
2.2.1 <i>Equipo de Resonancia Magnética Nuclear</i>	25
2.2.2 <i>Equipo de HPLC</i>	25
2.3 <i>METODOLOGÍAS</i>	26
2.3.1 <i>Caracterización de flavanonas y ciclodextrinas mediante RMN</i>	26
2.3.2 <i>Preparación de complejos</i>	29
2.3.3 <i>Caracterización de complejos mediante RMN</i>	29
2.3.4 <i>Determinación de la estequiometría de inclusión</i>	30
2.3.5 <i>Determinación de las constantes de asociación</i>	33
2.3.6 <i>Determinación de la termodinámica de inclusión</i>	39
2.3.7 <i>Determinación de la geometría de inclusión</i>	40

2.3.8	<i>Caracterización de flavanonas en HPLC</i>	41
2.3.9	<i>Separación enantiómerica mediante HPLC</i>	41
CAPÍTULO III - RESULTADOS Y DISCUSIÓN		42
3.1	<i>RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR</i>	43
3.1.1	<i>Caracterización en RMN</i>	43
3.1.1.1	<i>Caracterización de flavanonas</i>	43
3.1.1.2	<i>Caracterización de ciclodextrinas</i>	53
3.1.1.3	<i>Caracterización de complejos</i>	57
3.1.2	<i>Estequiometría de inclusión</i>	69
3.1.3	<i>Constantes de asociación</i>	74
3.1.4	<i>Termodinámica de inclusión</i>	82
3.1.5	<i>Geometría de inclusión</i>	106
3.1.6	<i>Discusión general de termodinámica y geometría de inclusión</i>	129
3.2	<i>HPLC</i>	132
3.2.1	<i>Inyección de flavanonas sin CDs en fase móvil</i>	132
3.2.2	<i>Inyección de flavanonas con CDs en fase móvil</i>	133
CAPÍTULO IV - CONCLUSIONES		140
REFERENCIAS		144

TABLA DE FIGURAS

Figura 1.1	3
<i>Esquematzación y ejemplo de enantiómeros</i>	
Figura 1.2	4
<i>Enantiómeros de talidomida</i>	
Figura 1.3	6
<i>Unidad α-D-glucopiranosu y estructura cristalográfica de β-ciclodextrina</i>	
Figura 1.4	7
<i>Características estructurales de CDs</i>	
Figura 1.5	9
<i>Esquema de los diferentes equilibrios en RP-HPLC usando CD como aditivo en la fase móvil</i>	
Figura 1.6	11
<i>Ampliación del espectro $^1\text{H-RMN}$ de la mezcla racémica de prometazina</i>	
Figura 1.7	14
<i>Relación entre Intensidad de NOE y tiempo de correlación τ_c</i>	
Figura 1.8	15
<i>Ampliación del espectro ROESY del complejo $\text{pio}/\beta\text{CD}$</i>	
Figura 1.9	16
<i>Geometría de inclusión propuesta para complejo $\text{pio}/\beta\text{CD}$</i>	
Figura 1.10	17
<i>Estructura básica de flavonoides y flavanonas</i>	
Figura 1.11	18
<i>Estructura de las flavanonas (R)-(+)-hesperetina y naringenina</i>	
Figura 1.12	19
<i>Estructura de flavanona y de sus derivados 2' y 4' hidroxilados</i>	
Figura 1.13	20
<i>Estructura de β-ciclodextrinas</i>	
Figura 2.1	26
<i>Esquematzación de espectro COSY</i>	
Figura 2.2	28
<i>Esquematzación de espectro HSQC</i>	
Figura 2.3	31
<i>Esquema de la relación entre $\Delta\delta_{\text{obs}}^{-1}$ vs. $[\text{CD}]_0^{-1}$ para estequiometría 1:1</i>	
Figura 2.4	40
<i>Esquematzación de espectro ROESY</i>	
Figura 3.1	54
<i>Esquema simplificado de ciclodextrinas, βCD, $\text{DM}\beta\text{CD}$ y $\text{HP}\beta\text{CD}$</i>	
Figura 3.2	68
<i>Proyecciones de Newman para la representación del cambio del ángulo diedro</i>	
Figura 3.3	69
<i>Gráficos de $\Delta\delta_{\text{obs}}^{-1}$ vs. $[\beta\text{CD}]_0^{-1}$ de los complejos 4'OHFL y FL con βCD</i>	
Figura 3.4	70
<i>Gráficos de $\Delta\delta_{\text{obs}}^{-1}$ vs. $[\text{HP}\beta\text{CD}]_0^{-1}$ de los complejos FL, 4'OHFL y 2'OHFL con $\text{HP}\beta\text{CD}$</i>	

Figura 3.5.....	71
<i>Gráficos de $\Delta\delta_{\text{obs}}^{-1}$ vs. $[\text{DM}\beta\text{CD}]_0^{-1}$ de los complejos FL, 4'OHFL y 2'OHFL con DMβCD</i>	
Figura 3.6.....	72
<i>Representación esquemática de estequiometría 1:1 de flavanona y CD</i>	
Figura 3.7.....	73
<i>Gráficos $\Delta\delta_{\text{obs}}^{-1}$ vs. $[\text{HP}\beta\text{CD}]_0^{-a}$ de complejos 4'OHFL/HPβCD</i>	
Figura 3.8.....	75
<i>Método de Benesi-Hildebrand para el complejo 4'OHFL/HPβCD</i>	
Figura 3.9.....	76
<i>Gráfico de $\Delta\delta_{\text{obs}}$ vs. $[\text{CD}]_0$ a 25°C del complejo 4'OHFL/HP βCD</i>	
Figura 3.10.....	82
<i>Gráficos de $\text{Ln}(K_a)$ vs. T^{-1} de los complejos 4'OHFL/HPβCD</i>	
Figura 3.11.....	87
<i>Representación esquemática de la resonancia de las flavanonas</i>	
Figura 3.12.....	100
<i>Gráfico de $T \cdot \Delta S$ vs. ΔH</i>	
Figura 3.13.....	104
<i>Gráfico $\Delta\Delta G$ vs. T para todos los complejos</i>	
Figura 3.14.....	106
<i>Representación esquemática de βCD, HPβCD, DMβCD para la geometría de inclusión</i>	
Figura 3.15.....	109
<i>Geometría de inclusión propuesta para complejo FL/βCD</i>	
Figura 3.16.....	111
<i>Geometría de inclusión propuesta para complejo FL/HPβCD</i>	
Figura 3.17.....	113
<i>Geometría de inclusión propuesta para complejo FL/DMβCD</i>	
Figura 3.18.....	115
<i>Geometría de inclusión propuesta para complejo 4'OHFL/βCD</i>	
Figura 3.19.....	117
<i>Geometría de inclusión propuesta para complejo 4'OHFL/HPβCD</i>	
Figura 3.20.....	119
<i>Geometría de inclusión propuesta para complejo 4'OHFL/DMβCD</i>	
Figura 3.21.....	121
<i>Geometría de inclusión propuesta para complejo 2'OHFL/βCD</i>	
Figura 3.22.....	123
<i>Geometría de inclusión propuesta para complejo 2'OHFL/HPβCD</i>	
Figura 3.23.....	125
<i>Geometría de inclusión propuesta para complejo 2'OHFL/DMβCD</i>	
Figura 3.24.....	127
<i>Estructuras resonantes de la 2'OHFL</i>	
Figura 3.25.....	136
<i>Extractos de cromatogramas de flavanonas separadas en HPLC</i>	

TABLA DE ESPECTROS

Espectro 3.1	43
Espectro ¹ H-RMN de FL	
Espectro 3.2	44
Zona aromática del espectro ¹ H-RMN de FL	
Espectro 3.3	44
Zona alifática del espectro ¹ H-RMN de FL	
Espectro 3.4	45
Espectro COSY de FL	
Espectro 3.5	47
Espectro ¹ H-RMN de 4'OHFL	
Espectro 3.6	48
Zona aromática del espectro ¹ H-RMN de 4'OHFL	
Espectro 3.7	48
Zona alifática del espectro ¹ H-RMN de 4'OHFL	
Espectro 3.8	49
Espectro COSY de 4'OHFL	
Espectro 3.9	50
Espectro ¹ H-RMN de 2'OHFL	
Espectro 3.10	51
Zona aromática del espectro ¹ H-RMN de 2'OHFL	
Espectro 3.11	51
Zona alifática del espectro ¹ H-RMN de 2'OHFL	
Espectro 3.12	52
Espectro COSY de 2'OHFL	
Espectro 3.13	53
Espectros ¹ H-RMN de ciclodextrinas	
Espectro 3.14	54
Ampliación de espectros ¹ H-RMN de ciclodextrinas	
Espectro 3.15	55
Ampliación del espectro HSQC-ed de DMβCD	
Espectro 3.16	57
Espectros ¹ H-RMN de FL libre y formando complejos con las tres ciclodextrinas	
Espectro 3.17	58
Zona aromática de los espectros ¹ H-RMN de la FL libre y formando complejos	
Espectro 3.18	60
Zona alifática de espectros ¹ H-RMN de FL libre y formando complejos	
Espectro 3.19	61
Espectros ¹ H-RMN de 4'OHFL libre y formando complejos con las tres ciclodextrinas	
Espectro 3.20	62
Zona aromática de los espectros ¹ H-RMN de la 4'OHFL libre y formando complejos	
Espectro 3.21	64
Espectros ¹ H-RMN de 2'OHFL libre y formando complejos con las tres ciclodextrinas	

<i>Espectro 3.22</i>	65
<i>Zona aromática de los espectros ¹H-RMN de la 2'OHFL libre y formando complejos</i>	
<i>Espectro 3.23</i>	66
<i>Zona alifática de espectros ¹H-RMN de 2'OHFL libre y formando complejos</i>	
<i>Espectro 3.24</i>	74
<i>Espectros ¹H-RMN de complejos 4'OHFL/HPβCD, variando la concentración de HPβCD</i>	
<i>Espectro 3.25</i>	108
<i>Espectro 2D-ROESY del complejo FL/βCD</i>	
<i>Espectro 3.26</i>	110
<i>Espectro 2D-ROESY del complejo FL/HPβCD</i>	
<i>Espectro 3.27</i>	112
<i>Espectro 2D-ROESY del complejo FL/DMβCD</i>	
<i>Espectro 3.28</i>	114
<i>Espectro 2D-ROESY del complejo 4'OHFL/βCD</i>	
<i>Espectro 3.29</i>	116
<i>Espectro 2D-ROESY del complejo 4'OHFL/HPβCD</i>	
<i>Espectro 3.30</i>	118
<i>Espectro 2D-ROESY del complejo 4'OHFL/DMβCD</i>	
<i>Espectro 3.31</i>	120
<i>Espectro 2D-ROESY del complejo 2'OHFL/βCD</i>	
<i>Espectro 3.32</i>	122
<i>Espectro 2D-ROESY del complejo 2'OHFL/HPβCD</i>	
<i>Espectro 3.33</i>	124
<i>Espectro 2D-ROESY del complejo 2'OHFL/DMβCD</i>	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	32
<i>Tabla de concentraciones usadas para la formación de los complejos</i>	
Tabla 3.1	46
<i>Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de FL</i>	
Tabla 3.2	49
<i>Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de 4'OHFL</i>	
Tabla 3.3	52
<i>Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de 2'OHFL</i>	
Tabla 3.4	56
<i>Desplazamientos químicos de CDs</i>	
Tabla 3.5	67
<i>Constantes de acoplamiento de 2'OHFL libre y formando parte de los complejos</i>	
Tabla 3.6	77
<i>Ka y Ka¹/Ka² para complejos formados por FL</i>	
Tabla 3.7	78
<i>Ka y Ka¹/Ka² para complejos formados por 4'OHFL</i>	
Tabla 3.8	79
<i>Ka y Ka¹/Ka² para complejos formados por 2'OHFL</i>	
Tabla 3.9	83
<i>Valores termodinámicos de complejos formados por FL</i>	
Tabla 3.10.....	84
<i>Valores termodinámicos de complejos formados por 4'OHFL</i>	
Tabla 3.11.....	85
<i>Valores termodinámicos de complejos formados por 2'OHFL</i>	
Tabla 3.12.....	91
<i>ΔH y T·ΔS de los complejos formados por FL, 4'OHFL y 2'OHFL con CDs derivatizadas</i>	
Tabla 3.13.....	92
<i>ΔH y T·ΔS de los complejos formados por FL y 4'OHFL y las ciclodextrinas βCD y DMβCD</i>	
Tabla 3.14.....	93
<i>T·ΔS de los complejos formados por FL, 4'OHFL y 2'OHFL y las ciclodextrinas derivatizadas</i>	
Tabla 3.15.....	94
<i>T·ΔS de los complejos formados por las tres flavanonas y la βCD</i>	
Tabla 3.16.....	97
<i>T·ΔS de los complejos formados por las tres flavanonas y las ciclodextrinas derivatizadas</i>	
Tabla 3.17.....	102
<i>Valores de ΔΔG de todos los complejos estudiados</i>	
Tabla 3.18.....	103
<i>Valores de ΔΔH , T· ΔΔS , ΔΔG para todos los complejos</i>	
Tabla 3.19.....	132
<i>Tiempos de retención de flavanonas en fase móvil metanol/agua</i>	
Tabla 3.20.....	133
<i>Tiempos de retención de 4'OHFL en fase móvil metanol/agua(DMβCD), [] = 2mM</i>	

<i>Tabla 3.21.....</i>	<i>134</i>
<i>Tiempos de retención de 4'OHFL en fase móvil metanol/agua(DMβCD), [] = 4 y 16.7mM</i>	
<i>Tabla 3.22.....</i>	<i>135</i>
<i>Tiempos de retención de 2'OHFL y FL en fase móvil metanol/agua(DMβCD)</i>	
<i>Tabla 3.23.....</i>	<i>137</i>
<i>Tiempos de retención de 4'OHFL en fase móvil metanol/agua(HPβCD)</i>	
<i>Tabla 3.24.....</i>	<i>138</i>
<i>Tiempos de retención de 2'OHFL y FL en fase móvil metanol/agua(HPβCD)</i>	

ABREVIATURAS

$^1\text{H-RMN}$: Resonancia Magnética Nuclear de Protones
2'OHFL	: 2'-hidroxiflavanona, (2-(2-hidroxifenil)-2,3-dihidro-4 <i>H</i> -cromen-4-ona)
4'OHFL	: 4'-hidroxiflavanona, (2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidro-4 <i>H</i> -cromen-4-ona)
α	: Factor de separación
βCD	: β -ciclodextrina
δ	: Desplazamiento químico
δ_c	: Desplazamiento químico intrínseco
δ_L	: Desplazamiento químico del enantiómero libre
δ_{obs}	: Desplazamiento químico observado
$\Delta\delta_{\text{obs}}$: Diferencia de desplazamiento químico observado
Å	: Angstrom, 1×10^{-10} m
CD	: Ciclodextrina
CDKs	: Kinasas dependiente de ciclinas
CDs	: Ciclodextrinas
COSY	: COrrrelation SpectroscopY
D ₂ O	: Agua deuterada, óxido de deuterio
DM β CD	: Heptakis-(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina
ee	: Exceso enantiomérico
EFLC	: Enhanced-Fluidity Liquid Chromatography
E ^R	: Enantiómero R
E ^S	: Enantiómero S
E ^R -CD	: Complejo diastereoisomérico formado por enantiómero R y ciclodextrina
E ^S -CD	: Complejo diastereoisomérico formado por enantiómero S y ciclodextrina

fl	: Referido a todas las flavanonas usadas en el trabajo
FL	: Flavanona, (2-fenil-2,3-dihidro-4 <i>H</i> -cromen-4-ona)
HP β CD	: (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina
HPLC	: High-Performance Liquid Chromatography
HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Coherence
HSQC-ed	: HSQC - editado
K_0	: Asociación de analito entre fases móvil y estacionaria
K_a	: Constante de asociación del complejo
K_a^R	: Constante de asociación del complejo formado con el enantiómero R
K_a^S	: Constante de asociación del complejo formado con el enantiómero S
K_C	: Equilibrio del complejo de inclusión entre fases móvil y estacionaria
K_M	: Asociación entre ciclodextrina y modificador orgánico
M	: Modificador orgánico
MeOD	: Metanol deuterado, CD ₃ OD
Metanol- <i>d</i> 4	: Metanol deuterado, CD ₃ OD
NOE	: Nuclear Overhauser Effect
RMN	: Resonancia Magnética Nuclear
ROESY	: Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
RP-HPLC	: Reversed-Phase HPLC
S	: Sustrato
S-CD	: Complejo de inclusión
SFC	: Supercritical Fluid Chromatography
t_r	: Tiempo de retención

RESUMEN

Estudio de Complejos Diastereoisoméricos Flavanona/ β -Ciclodextrina a través de Resonancia Magnética Nuclear de Protones

El estudio de la diferenciación enantiomérica de complejos diastereoisoméricos flavanona/ciclodextrina, formados específicamente por la mezcla racémica de (\pm)-flavanona, (\pm)-4'-hidroxiflavanona y (\pm)-2'-hidroxiflavanona, y las ciclodextrinas β CD, HP β CD y DM β CD, fue realizado mediante la obtención de espectros ^1H -RMN y ROESY. Debido a la quiralidad de las flavanonas y ciclodextrinas, la mayoría de los complejos formados presentaron diferenciación enantiomérica en los espectros ^1H -RMN, lo que permitió la obtención de la estequiometría, constantes de asociación y termodinámica de los complejos. Los resultados estequiométricos mostraron que todos los complejos diastereoisoméricos se forman en proporción 1:1 flavanona:ciclodextrina, las constantes de asociación siempre disminuyeron con el aumento de la temperatura, y los valores termodinámicos mostraron que la formación de todos los complejos es espontánea, exotérmica y con pérdida de entropía, sugiriéndose además que las interacciones de Van der Waals son las que contribuyen más al proceso de inclusión. Por otra parte, y pese a la diferenciación encontrada en los espectros ^1H -RMN, en los espectros ROESY esto no fue posible, y por lo tanto solo se determinó la geometría de los complejos diastereoisoméricos en su conjunto, y no por separado. Los espectros ROESY mostraron que puede existir tanto una como dos geometrías de inclusión para cada complejo (\pm)-flavanonas/ciclodextrinas, además de sugerir la existencia de puentes de hidrógeno entre la flavanona y la ciclodextrina, y la flavanona y las moléculas de solvente que rodean al complejo. Adicionalmente, se

encontró que para la mayoría de los complejos es la zona apolar de la flavanona la que se incluye en la cavidad de la ciclodextrina.

Debido a que existe una relación entre la razón de las constantes de asociación de los complejos formados por una misma ciclodextrina y una pareja de enantiómeros determinadas por RMN, y el factor de separación en HPLC, se intentó separar las flavanonas mediante esta última técnica, utilizando a las ciclodextrinas como aditivo de separación quiral en la fase móvil, y empleando una fase estacionaria aquiral. Los resultados mostraron que no hay separación enantiomérica, sino que solo diferenciación, lo que fue logrado únicamente con la DM β CD. Adicionalmente, se encontró que no solo un valor diferente de 1 para la razón entre constantes de asociación es necesario para la diferenciación, sino que además se requiere que las magnitudes de las constantes de asociación sean de al menos $8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

SUMMARY

Study of Flavanone/ β -Cyclodextrin Diastereoisomeric Complexes through Proton Nuclear Magnetic Resonance

Enantiomeric differentiation studies of flavanone/cyclodextrin diastereoisomeric complexes, specifically formed by the racemic mixtures of (\pm)-flavanone, (\pm)-4'-hydroxyflavanone and (\pm)-2'-hydroxyflavanone, and the cyclodextrines β CD, HP β CD y DM β CD, were carried out acquiring $^1\text{H-NMR}$ and 2D-ROESY spectra. Due to the chirality of flavanones and cyclodextrins, most complexes showed enantiomeric differentiation in the $^1\text{H-NMR}$, which allowed for the determination of the stoichiometry, association constants and thermodynamics of the complexes. Stoichiometry showed a 1:1 flavanone:cyclodextrin ratio, association constants diminished with increasing temperature, and thermodynamics indicates a spontaneous and exothermic complex formation along with entropy loss. The thermodynamic analysis strongly suggests that Van der Waals interactions provide the main contribution to the inclusion process as well. On the other hand, and in spite of the $^1\text{H-NMR}$ enantiomeric differentiation, ROESYs did not exhibit this behavior, so the inclusion geometry was only able to be determined for both diastereoisomeric complexes together, and not separately. ROESY spectra indicated that it is possible to have one or two inclusion geometries, also hinting at hydrogen bonds between the flavanone and the cyclodextrin, and the flavanone and the solvent molecules. In addition, it was found that the non-polar flavanone portion is included into the cyclodextrin cavity for almost all the complexes.

Due to the relationship between the association constant ratio of both enantiomers using the same cyclodextrin, as obtained by $^1\text{H-NMR}$, and the separation

factor in HPLC, separation through the latter technique was attempted, employing cyclodextrin as a mobile phase chiral additive, and using an achiral stationary phase. Results showed no enantiomeric separation, only enantiomeric differentiation, which was achieved only with DM β CD. Additionally, it was found that not only an association constant ratio different to one is required to have enantiomeric differentiation, but the value of the association constants be at least $8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe una innumerable cantidad de fármacos de naturaleza quiral y que son administrados en forma racémica, lo que implica la ingesta de una mezcla 50:50 de un enantiómero y su contraparte. Hacia el año 2000 cerca de un tercio de las drogas vendidas alrededor del mundo eran quirales, y su demanda y desarrollo continúa creciendo debido no solo a la importancia de los fundamentos químicos y biológicos de sus efectos, sino que también debido a la preocupación de los organismos gubernamentales en que las compañías farmacéuticas hagan las elecciones apropiadas sobre si desarrollar un único enantiómero como droga o su racemato.^{1,2}

Los enantiómeros son moléculas que poseen igual fórmula química, donde los átomos se enlazan unos a otros en el mismo orden pero que se diferencian en la disposición de éstos en el espacio. Esta diferencia espacial es producto de las diferentes posiciones que cuatro sustituyentes diferentes pueden ocupar sobre un átomo de carbono, siendo este un centro asimétrico o estereogénico. Este centro origina dos estructuras llamadas enantiómeros, cuyas imágenes especulares no son superponibles (Fig. 1.1A). Separadamente, y al estar en un ambiente aquiral, los enantiómeros poseen las mismas propiedades fisicoquímicas (por ejemplo punto de fusión, ebullición y solubilidad), con la excepción de que giran el plano de la luz polarizada en igual cantidad, pero en direcciones opuestas, propiedad que es comúnmente usada para identificar y caracterizar las dos formas.³ El enantiómero que rota el plano de polarización en el sentido de las agujas del reloj se toma como positivo (+), mientras que la rotación en el sentido contrario se toma como negativa (-). En nomenclatura, se usan los signos (+) y (-) para cada enantiómero, además del sistema

de notación de Cahn-Ingold-Prelog (R y S), que designa la configuración absoluta de cada enantiómero, como es ejemplificado para el 2-butanol en la Figura 1.1B.

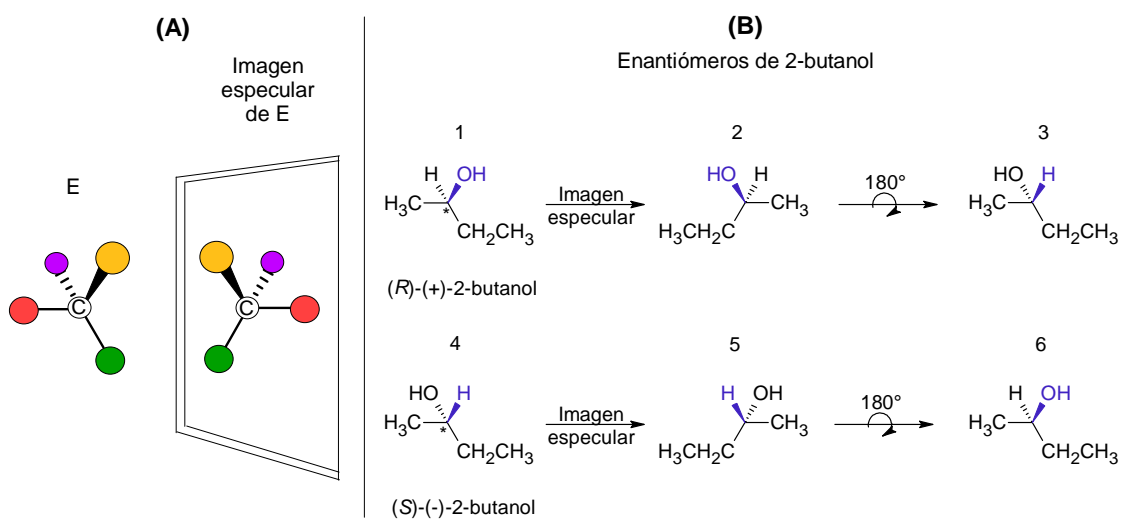


Figura 1.1
Esquemización y ejemplo de enantiómeros. (A) Esquemización de una molécula quiral, E, y su imagen especular no superponible. El carbono asimétrico se encuentra sustituido por diferentes grupos, representado con diferentes colores. (B) Enantiómeros de 2-butanol, 1 y 4, y sus imágenes especulares, 2 y 5, respectivamente. Los productos de rotación, 3 y 6 demuestran que 1 con 2 y 4 con 5, no son superponibles. El asterisco () indica el centro asimétrico.*

A diferencia de la igualdad en las características fisicoquímicas que presentan los enantiómeros, en sistemas biológicos estos pueden presentar diferencias en sus propiedades, tales como distribución, metabolismo y excreción, donde usualmente un enantiómero es favorecido sobre el otro debido a interacciones estereoespecíficas.⁴

Por lo anterior, una de las problemáticas en farmacología radica en la separación de los enantiómeros, ya que estos pueden presentar actividades diametralmente opuestas, como que uno posea efectos beneficiosos para la salud, mientras que la contraparte la perjudique.⁵⁻⁹ Un clásico ejemplo es el de la talidomida (Fig. 1.2), droga quiral que fue usada a fines de los años 50, administrada como

mezcla racémica, y prescrita como antiemético, principalmente como tratamiento para reducir las náuseas asociadas al embarazo. A fines de 1961, se publicó un estudio que señalaba que las mujeres en estado de gravidez que habían ingerido esta droga, daban a luz bebés con malformaciones severas. Posteriormente, se determinó que uno de los enantiómeros de la talidomida, (*R*)-talidomida, actuaba como antiemético, mientras que su enantiómero, (*S*)-talidomida, era teratógeno, y por tanto causaba las mencionadas malformaciones.^{10, 11}

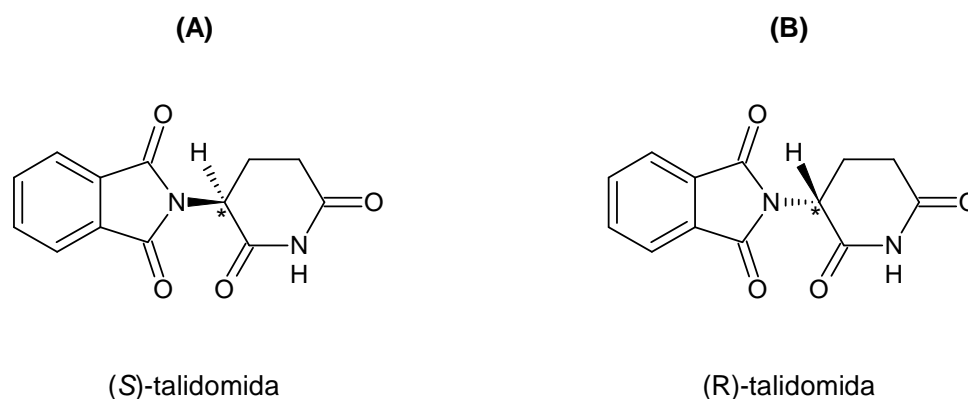


Figura 1.2
Enantiómeros de talidomida. (A) estructura de (*S*)-talidomida, teratógeno. (B) estructura de (*R*)-talidomida, antiemético. El asterisco (*) indica el centro asimétrico.

Con lo anterior, queda de manifiesto que el estudio farmacológico de drogas quirales debe ser realizado cuidadosamente. Esta idea se refuerza si se considera además que en la actualidad, y con el auge de la industria farmacéutica, ha habido un importante incremento en el uso y desarrollo de drogas de esta naturaleza.¹² De esta manera, y para evitar casos como el de la talidomida, se debe poner especial énfasis en la separación y estudio farmacológico individual de cada enantiómero.^{1, 13}

Para poner en práctica la separación de una mezcla de enantiómeros, es necesaria la determinación previa del exceso enantiomérico (ee) de esta, que indica la cantidad relativa de cada enantiómero. Esta determinación es necesaria debido a

que la mayoría de los compuestos quirales son producto de reacciones químicas que pueden originar mezclas racémicas o mezclas enriquecidas en uno de los enantiómeros. Para lograr la determinación del ee, es necesario que los enantiómeros puedan diferenciarse. Esto se logra empleando agentes discriminadores, que son compuestos ópticamente puros que pueden actuar mediante la derivatización de la mezcla de enantiómeros, formando enlaces covalentes, o mediante la formación de complejos, que involucran interacciones intermoleculares no covalentes. Estos agentes discriminadores originan diasterómeros o complejos diastereoisoméricos respectivamente que, a diferencia de los enantiómeros, poseen diferentes propiedades fisicoquímicas. Las técnicas más usadas para diferenciar estas especies incluyen la Resonancia Magnética Nuclear (RMN),^{14 - 17} electroforesis capilar^{18 - 21} y diferentes cromatografías,^{22, 23} donde la primera tiene la ventaja no solo de permitir la caracterización los enantiómeros y eventualmente asignar la configuración absoluta (R o S),²⁴ sino que también se puede estudiar la naturaleza de la diferenciación enantiomérica, tópico que ha sido sujeto de innumerables investigaciones debido a que no se comprende completamente su mecanismo.^{25 - 28} Pese a lo anterior, la técnica de RMN no permite la separación de los enantiómeros, lo que si puede ser logrado mediante las técnicas cromatográficas.^{29, 30}

Una de las técnicas más usadas para la separación enantiomérica es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Su disponibilidad y menores costos de operación, le dan a esta técnica la ventaja por sobre otros métodos cromatográficos como EFLC (Enhanced-Fluidity Liquid Chromatography) y SFC (Supercritical Fluid Chromatography).^{31, 32}

En HPLC, la separación enantiomérica tiene dos estrategias. Una de ellas consiste en el uso de columnas quirales, y la otra en el uso de columnas aquirales. La primera estrategia requiere el uso de una gran variedad de costosas columnas para resolver diferentes problemas de separación. Por otra parte, el empleo de columnas aquirales conlleva el uso de aditivos quirales (agente discriminador) en la fase móvil, lo cual hace de esta una alternativa más flexible y menos costosa. Sin embargo, la elección del aditivo quiral a usar es al azar, lo que puede aumentar de manera importante los tiempos de análisis.³²

Debido a su relativo bajo costo y toxicidad, las ciclodextrinas (CDs) han sido usadas como aditivo quiral en la fase móvil. Estas moléculas son oligosacáridos cíclicos, compuestos por n unidades α -D-glucopiranosas, donde n puede ser 6, 7 u 8, llamándose α , β o γ -ciclodextrina, respectivamente (Fig. 1.3).

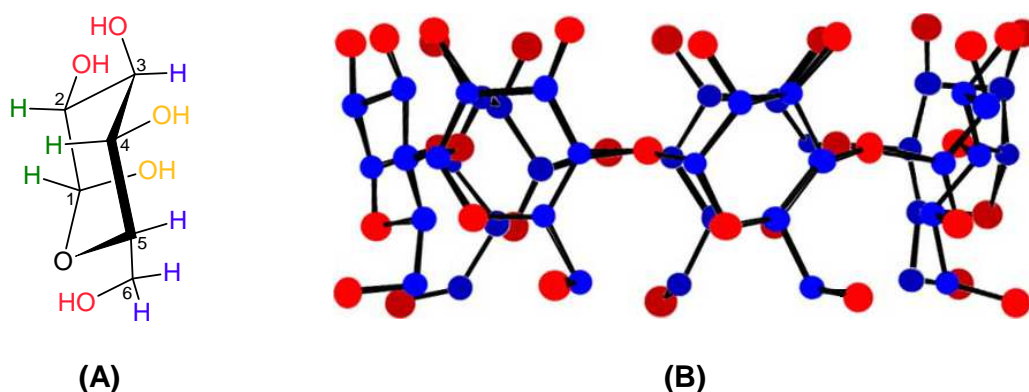


Figura 1.3
 (A) Unidad α -D-glucopiranososa. En verde se destacan los hidrógenos exteriores (posiciones 1, 2 y 4), en rojo los grupos hidroxilo primario (Posición 6) e hidroxilos secundarios (posiciones 2 y 3), en azul los hidrógenos internos (posiciones 3, 5 y 6), y en amarillo los grupos hidroxilos de las posiciones 1 y 4 que se enlazan para formar la ciclodextrina de la figura B. (B) Estructura cristalográfica de β -ciclodextrina. En rojo se muestran los átomos de oxígeno y en azul los de carbono.

En solución acuosa, las CDs tienen forma de cono truncado, y debido a la conformación 4C_1 de la unidad glucopiranososa, los hidroxilos llamados primarios se

encuentran en el borde angosto y los secundarios se encuentran en el borde ancho de la CD. Además, hacia el exterior del macrociclo se encuentran los hidrógenos H1, H2 y H4, y hacia el interior los hidrógenos H3, H5 y H6 (Fig. 1.3 y 1.4A). Con estas características estructurales, el exterior de las ciclodextrinas es hidrofílico, mientras que su interior es hidrofóbico (Fig. 1.4A), lo que le da a las CDs la capacidad de incluir moléculas,³³⁻³⁸ especialmente aromáticas,³⁹ formando complejos de inclusión.⁴⁰

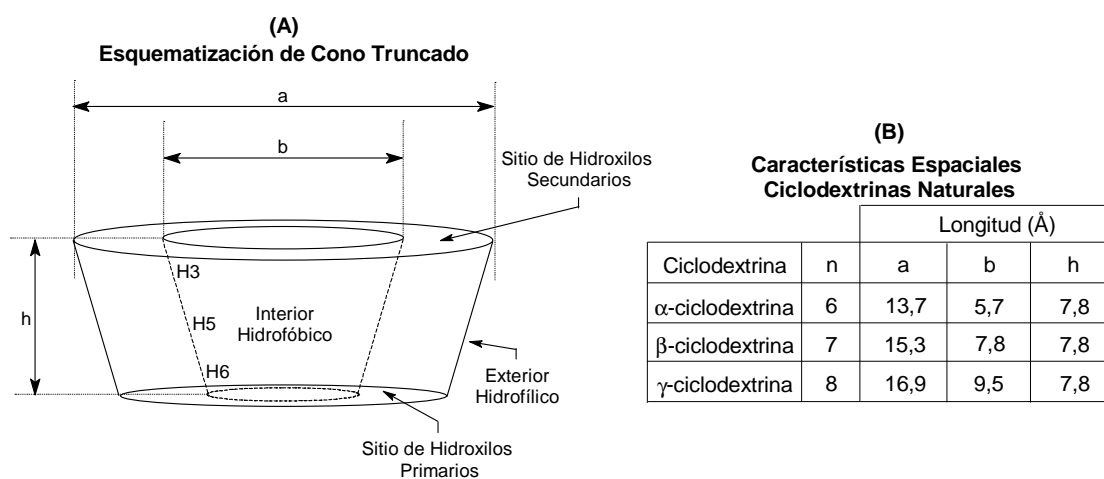


Figura 1.4 Características estructurales de CDs. (A) Esquema de cono truncado donde se muestra la posición de los hidrógenos internos H3, H5 y H6, los hidroxilos primarios y secundarios, e interior hidrofóbico y exterior hidrofílico. (B) características espaciales de α, β y γ-ciclodextrinas donde n es el número de unidades α-D-glucopiranosas y las longitudes se entregan en Å.

Debido a la conformación de silla y centros asimétricos de la unidad α-D-glucopiranososa, las ciclodextrinas son quirales (Fig. 1.3), y por lo tanto permiten el reconocimiento quiral al formar complejos de inclusión diastereoisoméricos.⁴¹

En solución, los complejos de inclusión están en equilibrio con sus partes constituyentes (Ec. 1.1), y la medida de este equilibrio está dada por la constante de asociación (Ka), (Ec. 1.2).



$$K_a = \frac{[S-CD]}{[S] \cdot [CD]} \quad (1.2)$$

Donde [S-CD], [S] y [CD] son las concentraciones de complejo, sustrato y ciclodextrina, respectivamente.

Uno de los fundamentos del reconocimiento quiral es que las constantes de asociación (K_a) de los complejos diastereoisoméricos formados por enantiómeros opuestos serían diferentes. Esto se ve reflejado, por ejemplo, en observar para cada complejo diastereoisomérico diferentes desplazamientos químicos (δ) en RMN, o tiempos de retención (t_r) en HPLC.^{32, 41, 42}

En HPLC, al emplear CDs como aditivo en la fase móvil, se utiliza agua y un segundo solvente orgánico (modificador orgánico) como eluyentes, donde este último se usa para disminuir los tiempos de retención del analito. Uno de los modificadores orgánicos más usados es el metanol, debido a su baja asociación con las CDs ($K_M = 0.32 \text{ M}^{-1}$)⁴³. Al inyectar un enantiómero R (E^R) y un enantiómero S (E^S), los equilibrios existentes en HPLC al usar CDs como aditivo en la fase móvil y un modificador orgánico (M), son K_0 correspondiente al equilibrio de los enantiómeros entre las fases móvil y estacionaria, K_M correspondiente a la asociación entre la CD y el modificador orgánico, K_C correspondiente al equilibrio del complejo S-CD entre las fases estacionaria y móvil, y K_a de los complejo de inclusión diastereoisoméricos (Fig. 1.5).⁴³

De todos los equilibrios descritos para el sistema cromatográfico, en RP-HPLC, se ha descrito que $K_C \rightarrow 0$,⁴⁴ lo que es debido a que la fase estacionaria es apolar mientras que el exterior de la CD es polar. Por lo anterior, lo mismo ocurrirá para la CD pura, y su equilibrio entre las fases estacionaria y móvil tenderá a cero.⁴⁴ Por otra

parte, y debido a que la fase estacionaria es aquiral, K_0 será igual tanto para E^R como para E^S . De esta manera, de todos los equilibrios existentes, los únicos diferentes son los que involucran la formación de los complejos de diastereoisoméricos, Ka^R y Ka^S , y por lo tanto son los responsables de los diferentes tiempos de retención que tendrá cada enantiómero (E^R y E^S).

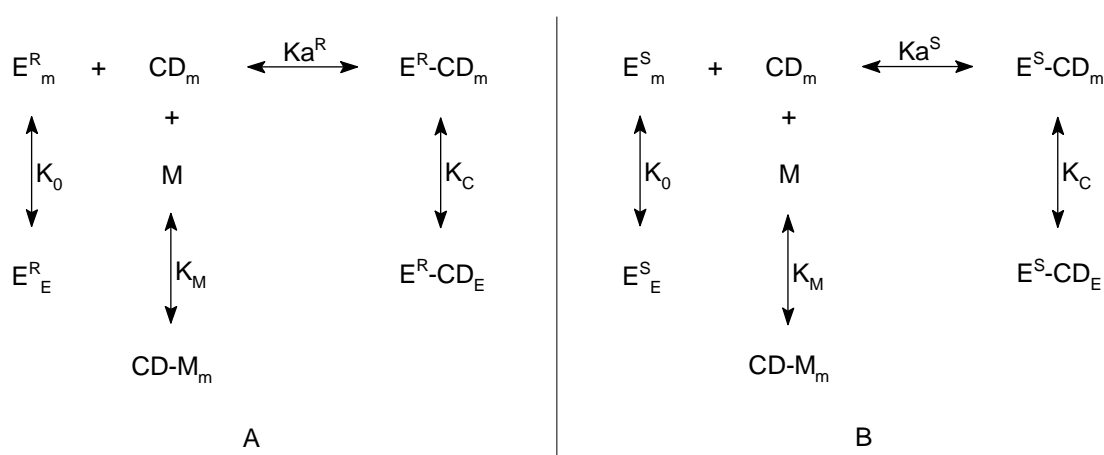


Figura 1.5

Esquema de los diferentes equilibrios en RP-HPLC usando CD como aditivo en la fase móvil. Los subíndices m y E denotan las fases móvil y estacionaria, respectivamente. E^R y E^S son los enantiómeros R y S , respectivamente. CD = ciclodextrina, M = modificador orgánico, $CD-M$ = complejo formado entre ciclodextrina y modificador orgánico, E^R-CD = complejo formado por el enantiómero R y CD , y E^S-CD = complejo formado por el enantiómero S y CD . K_0 describe el equilibrio de E^R y E^S entre las fases móvil y estacionaria, K_M es la afinidad entre M y CD , K_C es el equilibrio de los complejos E^R-CD y E^S-CD entre las fases móvil y estacionaria, y Ka es la constante de asociación de los complejos diastereoisoméricos (E^R-CD y E^S-CD).

Se ha descrito⁴⁵ que las Ka de complejos de inclusión diastereoisoméricos formados por un par de enantiómeros están relacionadas con el factor de separación (α) en HPLC, de acuerdo a la ecuación 1.3.

$$\alpha^{-1} \approx \frac{Ka^1}{Ka^2} \quad (1.3)$$

Donde α corresponde a la razón entre los tiempos de retención de cada enantiómero, y Ka^1 y Ka^2 son las constantes de asociación de un par de

complejos diastereoisoméricos, 1 y 2, respectivamente. De acuerdo a la ecuación 1.3, mientras más se aleje de 1 el valor de razón entre constantes de asociación (Ka^1/Ka^2), más se alejará de 1 el valor de α , y por lo tanto mayor será la separación en HPLC. Debido a que en esta técnica la elección del aditivo quiral a usar en la separación quiral es al azar, y que las condiciones de trabajo requieren de una mayor demanda de tiempo y reactivos, se ha sugerido la determinación de Ka^1/Ka^2 mediante una segunda técnica, como RMN. Esta técnica se ha usado debido a que tiene la ventaja de que permite el estudio de complejos diastereoisoméricos simultáneamente, sin su previa separación.⁴⁵

En RMN, la diferenciación enantiomérica usando CDs depende de las diferencias entre las constantes de asociación y de las diferencias entre los desplazamientos químicos intrínsecos (δ_c) de los complejos diastereoisoméricos, y mientras mayores sean estas diferencias, mayor será su diferenciación. δ_c es el desplazamiento químico del enantiómero cuando éste forma parte del complejo completamente, y su valor dependerá del entorno magnético alrededor de un protón dado. Para un complejo diastereoisomérico, el desplazamiento químico observado (δ_{obs}) del enantiómero dependerá de δ_c , del desplazamiento químico del enantiómero libre (δ_L) y de sus respectivas fracciones molares, de acuerdo a la ecuación 1.4.^{39, 41, 45}

$$\delta_{obs} = \chi_c \delta_c + \chi_L \delta_L \quad (1.4)$$

Debido a la importancia de la diferenciación enantiomérica y a que el mecanismo de discriminación quiral no es completamente entendido, se han realizado estudios de complejos diastereoisoméricos en los cuales se han obtenido características como las Ka , estequiometría y termodinámica de inclusión, empleando los

desplazamientos químicos observados (δ_{obs}) de cada enantiómero formando el complejo diastereoisomérico. Dentro de estos estudios se han analizado los compuestos flurbiprofeno,⁴⁶ propoxifeno, metadona, ibuprofeno,⁴⁷ 3,3-dimetil-2-fenilbutano⁴⁸ y prometazina,⁴⁹ entre otros. Como ejemplo, en la Figura 1.6 se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN) de los complejos (\pm)-prometazina/ β CD.

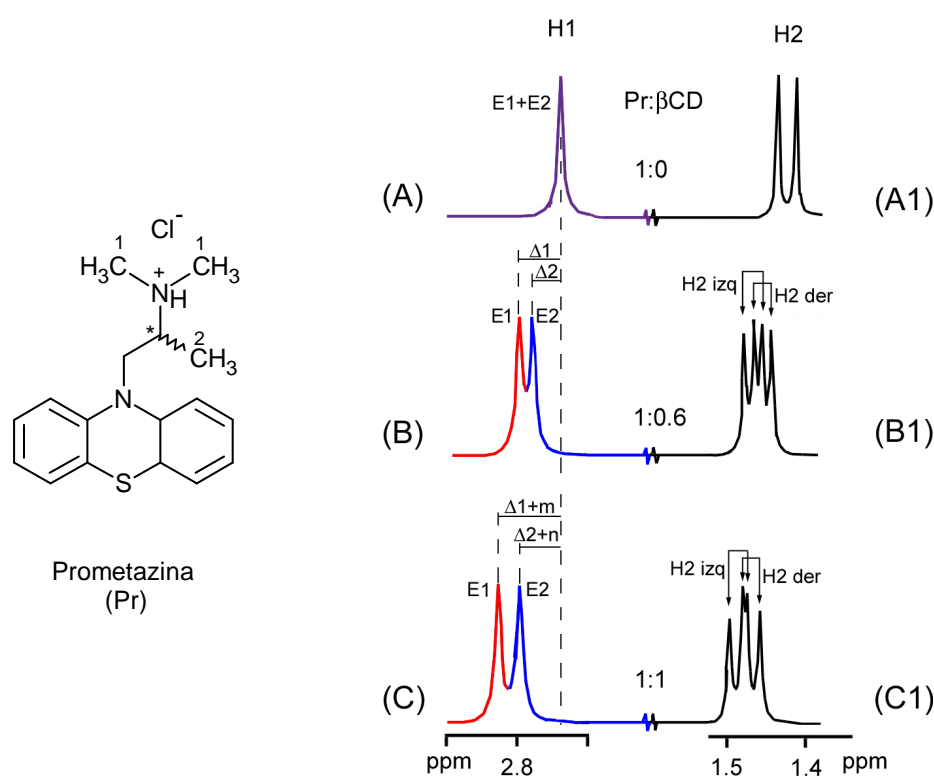


Figura 1.6

Ampliación de diferentes zonas del espectro ^1H -RMN de los enantiómeros E1 y E2 de la mezcla racémica de (\pm)-prometazina (2mM). Los espectros (A) y (A1) corresponden a la molécula pura, (B) y (B1) de su mezcla 1:0.6 con β -ciclodextrina y (C) y (C1) de su mezcla 1:1 con β -ciclodextrina. El asterisco (*) denota el centro asimétrico. La señal en morado indica la mezcla de los dos enantiómeros, E1+E2, y las señales en rojo y azul indican los enantiómeros E1 y E2 respectivamente.

En la Figura 1.6 se muestran los espectros ^1H -RMN de los complejos Pr/ β CD, donde se observa la diferenciación enantiomérica de los enantiómeros de prometazina al agregar β -ciclodextrina (Espectros B, B1, C y C1).⁴⁹ En el Espectro (A) se observa un singulete para el hidrógeno H1 con el mismo desplazamiento químico para cada enantiómero (E1+E2), y en los Espectros (B) y (C) se observa como cada enantiómero presenta diferentes desplazamientos químicos (señales en rojo y azul) por efecto de la adición de la CD. Al comparar los Espectros (A), (B) y (C), se aprecia como al variar la concentración de CD, varía progresivamente el desplazamiento químico del hidrógeno H1 de cada enantiómero y en diferente magnitud, $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 1+m$ y $\Delta 2+n$. Las diferencias de desplazamiento químico mencionadas previamente, ($\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 1+m$, $\Delta 2+n$), son en la práctica las diferencias de desplazamiento químico observadas ($\Delta\delta_{\text{obs}}$), que son las que permiten la determinación de las constantes de asociación de cada complejo diastereoisomérico, y por lo tanto el estudio de ellos.⁵⁰ De la misma manera que para el hidrógeno H1, para el hidrógeno H2 (Espectros A1, B1 y C1) también se observa diferenciación enantiomérica y variaciones progresivas de δ con la variación de la concentración de CD. Sin embargo, y debido a que el hidrógeno H2 de la prometazina corresponde a un doblete, las señales de los diastereoisómeros aparecen solapadas y cruzadas entre sí, lo que es representado como H2_{izq} y H2_{der} en los Espectros B1 y C1.

En RMN una de las ventajas que tienen las ciclodextrinas como agentes discriminadores consiste en su solubilidad en agua, lo que permite el estudio de una amplia variedad de fármacos. Una segunda ventaja reside en que el rango de desplazamientos químicos donde aparecen los hidrógenos de las CDs es bastante angosto, ubicándose estos en el área alifática entre 3 y 4 ppm aproximadamente. Por

lo anterior, lo que resta del espectro es una zona extensa que puede ser utilizada para realizar los estudios de discriminación que incluye la zona aromática, y por ende la gran mayoría de los sustratos de esta naturaleza pueden ser estudiados.⁴⁷

Por otra parte, la técnica de RMN permite no solo el estudio de mezclas racémicas, sino que además se puede estimar la geometría de inclusión de los complejos. Esto es debido a que la posición de los hidrógenos internos de las CDs (H3, H5 y H6) es conocida (Fig. 1.4A), y por lo tanto la presencia de interacciones de estos hidrógenos con hidrógenos del sustrato indicarían la orientación relativa entre ambos al formar el complejo. Para esto se emplean experimentos bidimensionales de RMN, que detectan las interacciones NOE (Nuclear Overhauser Effect). Esta es una interacción espacial dipolo-dipolo entre dos núcleos, y en RMN se manifiesta como un cambio en la intensidad de una señal como resultado de la perturbación de otra. Estas interacciones dipolares, detectables a distancias internucleares menores a 5Å, decrecen rápidamente con la distancia entre los núcleos acoplados, y su intensidad viene dada por,^{41, 51}

$$\frac{1}{\eta_A(B)} = K(r_{AB})^6 \quad (1.5)$$

Donde $\eta_A(B)$ es la intensidad del NOE del núcleo A debido a la perturbación del núcleo B, K es una constante que incluye los efectos de reorientación y movimiento molecular, y r_{AB} es la distancia entre los núcleos A y B. Por otra parte, la magnitud de la señal NOE depende del tiempo de correlación (τ_c), que indica cuán rápido se reorienta la molécula en solución.⁵² Por lo anterior, τ_c dependerá de propiedades tales como el peso molecular (PM), viscosidad (η) y temperatura (T), de acuerdo a la ecuación 1.6, donde R corresponde a la constante de los gases.^{53, 54}

$$\tau_c \approx PM \cdot \frac{\eta}{RT} \quad (1.6)$$

La magnitud de la señal NOE depende de τ_c de manera tal que, a pequeños y grandes valores, se observa la interacción. A pesar de esto, existe una zona donde la intensidad de la señal es muy baja, y por lo tanto poco probable de observar, y desafortunadamente, las CDs poseen pesos moleculares que coinciden con estos valores de τ_c (Fig. 1.7).^{41, 55}

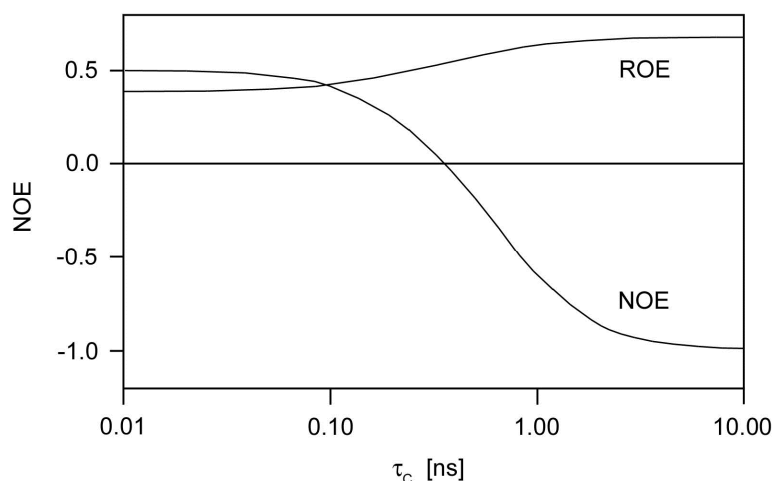


Figura 1.7
Relación entre Intensidad de NOE y tiempo de correlación τ_c .

Pese a lo anterior, los experimentos ROESY (Rotating-frame Overhauser Enhancement SpectroscopY), se han diseñado de forma que, independientemente del valor de τ_c , siempre habrá señal (Fig. 1.7), y por lo tanto es el método usado para determinar la orientación relativa entre el sustrato y la CD.^{41, 55}

Un gran número de estudios de determinaciones de geometrías de inclusión de complejos de CDs mediante experimentos 2D-ROESY (experimentos ROESY en dos dimensiones) han sido publicados. Dentro de estos se han estudiado complejos de inclusión formados por CDs y moléculas como efedrina y sus derivados,⁵⁶

ácido [1-(*p*-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metilindolacético],⁵⁷ flurbiprofeno,⁴⁶ *p*-nitrofenilfosfato de sodio,⁵⁸ midazolam,⁵⁹ paeonol,⁶⁰ clorhidrato de pioglitazona,¹⁵ surfactantes líquidos iónicos,⁶¹ cetosteroides⁶² y flavonoides.^{36, 38, 63}

Como ejemplo, el espectro 2D-ROESY del clorhidrato de pioglitazona (pio) se presenta en la Figura 1.8.¹⁵

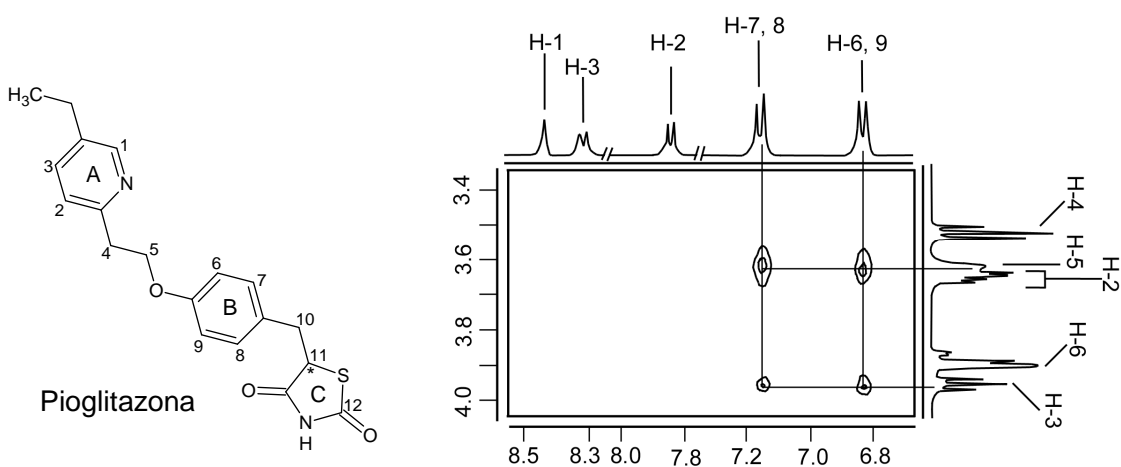


Figura 1.8

Ampliación del espectro 2D-ROESY del complejo pio/ β CD. En el eje "x" se observa la zona aromática de la pioglitazona, indicándose las señales de los protones H-1, H-3, H-2, H-7, H-8, H-6 y H-9. En el eje "y" se observan las señales de la CD. Con el asterisco (*) se indica el centro asimétrico.

En el espectro 2D-ROESY de la Figura 1.8 se observa interacción entre los protones internos H-3 y H-5 de la CD, y los protones H-7, H-8, H-6 y H-9 de la pioglitazona, indicando que el anillo B de esta molécula se encuentra inserto en la β CD. Con los resultados anteriores, los autores proponen las geometrías de inclusión que se ilustran en la Figura 1.9.

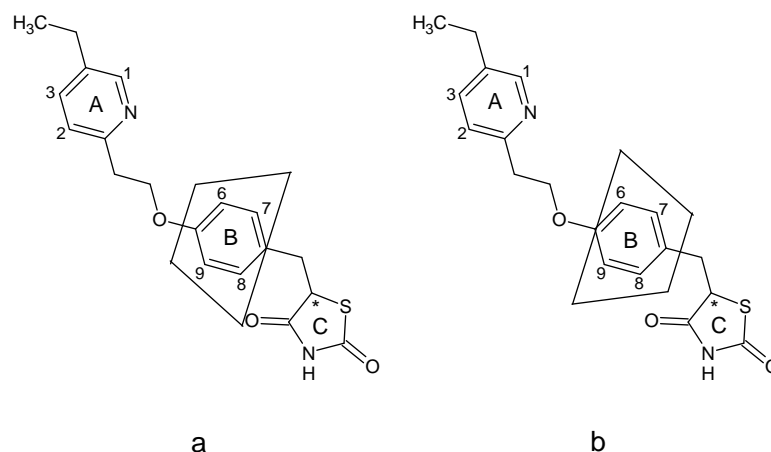


Figura 1.9
Geometría de inclusión propuesta para complejo pio/ β CD. Se observa que el anillo B de la pioglitazona se inserta dentro de la CD.

Paralelamente, y con el auge de la investigación sobre productos naturales, muchas familias tales como terpenoides,⁶⁴ quinonas,⁶⁵ fenazinas,⁶⁶ lactonas⁶⁷ y flavonoides^{68, 69} han sido descubiertas y estudiadas. Debido a los efectos benéficos que se les han atribuido, dentro de esta gran gama de compuestos de procedencia natural destacan los flavonoides, compuestos polifenólicos de bajo peso molecular cuya estructura básica consiste en una benzo- γ -pirona (Fig. 1.10A), y que pueden ser encontrados en frutas, vegetales, soya y hierbas.^{70 - 74} Dada la gran cantidad de flavonoides existentes, estos se han clasificado en varias sub-clases, incluyendo flavonas, flavonoles, catequinas, isoflavanonas y flavanonas. Éstas últimas se han definido como flavonoides cítricos, y poseen la característica distintiva dentro de todos los flavonoides, de ser las únicas que poseen un único centro asimétrico.⁷⁵ Las flavanonas (Fig. 1.10B) han sido objeto de estudio por presentar efectos favorables frente a enfermedades neurondegenerativas,^{76, 77} cáncer,^{78 - 82} afectando enzimas positivamente,^{83, 84} y actuando como antibióticos,^{85, 86} entre otros.

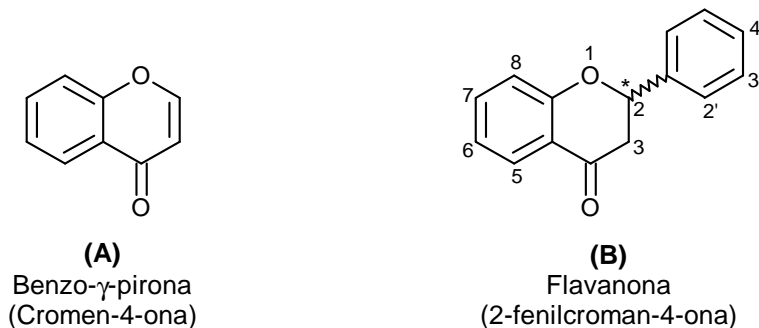


Figura 1.10
Estructura básica de flavonoides (A) y flavanona (B). El asterisco (*) indica el centro asimétrico.

A pesar de la importancia del estudio independiente de los enantiómeros,^{5 - 9, 87 - 90} la actividad biológica de las flavanonas se ha estudiado solo con la mezcla racémica de ellas.^{76 - 86, 91 - 93} Por ejemplo, Hsiao y col.^{78, 79} estudiaron una serie de flavanonas como inhibidoras de la metástasis de células cancerígenas de pulmón, cuyo crecimiento y proliferación depende de las CDKs (quinasas dependiente de ciclinas), enzimas involucradas en el ciclo celular. En dichos estudios las flavanonas fueron usadas como mezcla racémica.

Al igual que en el ejemplo anterior, Moulari y col.⁸⁵ estudiaron la actividad bactericida de la flavanona astilbina, y Toumi y col.⁹² estudiaron la flavanona hesperidina como agente protector contra embriopatías en ratas diabéticas, o teratogénesis diabética. En ambos estudios los resultados fueron favorables al usar las flavanonas mencionadas, sin embargo, nuevamente la quiralidad de las flavanonas investigadas no es considerada.

Paralelamente, se ha demostrado que en ratas las flavanonas hesperetina y naringenina (Fig. 1.11) se metabolizan estereoespecíficamente,^{94 - 98} debido a que los parámetros farmacocinéticos de cada enantiómero difieren entre sí. Por ejemplo, en el suero sanguíneo, los perfiles de concentración de cada enantiómero

en el tiempo indican su disposición estereoselectiva, ya que la R-(+)-hesperetina y la S-(-)-naringenina presentan mayores concentraciones en este medio que su contraparte, y por lo tanto residen mayor cantidad de tiempo en el cuerpo. Además, se determinó que la metabolización de estas moléculas es de fase II, lo que indicaría la actividad enzimática sobre estas flavanonas. Debido a lo anterior, podría esperarse que muchas de las flavanonas existentes que poseen efectos biológicos favorables, posean metabolismos estereoespecíficos.

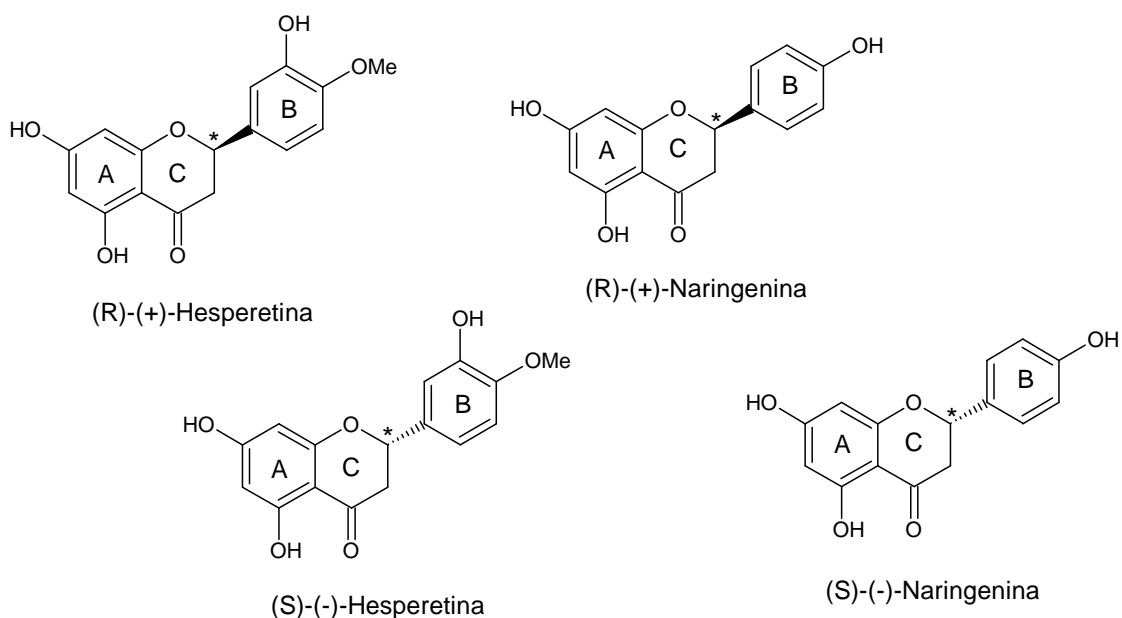
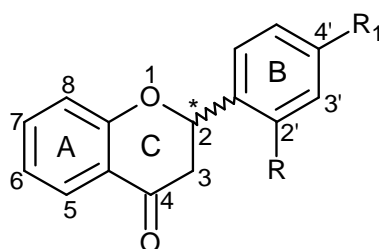


Figura 1.11
Estructura de las flavanonas (R)-(+)-hesperetina, (S)-(-)-hesperetina, (R)-(+)-naringenina y (S)-(-)-naringenina. El asterisco (*) indica el centro asimétrico.

Se ha descrito que la flavanona y sus derivados 2' y 4'-hidroxilados (Fig. 1.12) son potenciales fármacos para tratar la diabetes, enfermedad que afecta a millones de personas en el mundo, y cuyo tratamiento actual posee limitaciones como complicaciones a largo plazo y mortalidad.^{84, 99, 100} Este trastorno consiste básicamente en el exceso de azúcar en la sangre, y por lo tanto el control de su concentración es

fundamental. Las flavanonas antes señaladas se han sugerido como potenciales drogas para el tratamiento de esta enfermedad, ya que son capaces de disminuir los niveles de glicemia al inhibir la enzima 11 β -HSD1 reductasa, cuyo centro activo se ha sugerido es asimétrico.¹⁰¹ Nuevamente, y pese a la asimetría de la enzima involucrada, la quiralidad de las flavanonas estudiadas no fue considerada.

Con lo anterior, queda de manifiesto que en la gran mayoría de las evaluaciones biológicas en que se involucran las flavanonas, la asimetría de estas moléculas no es sujeto de estudio, y por lo tanto el aporte en su discriminación y eventual separación sería valorable para posteriores estudios como potenciales fármacos.



R = R₁ = H, Flavanona (2-fenilcroman-4-ona)

R = OH, R₁ = H, 2'-hidroxiflavanona

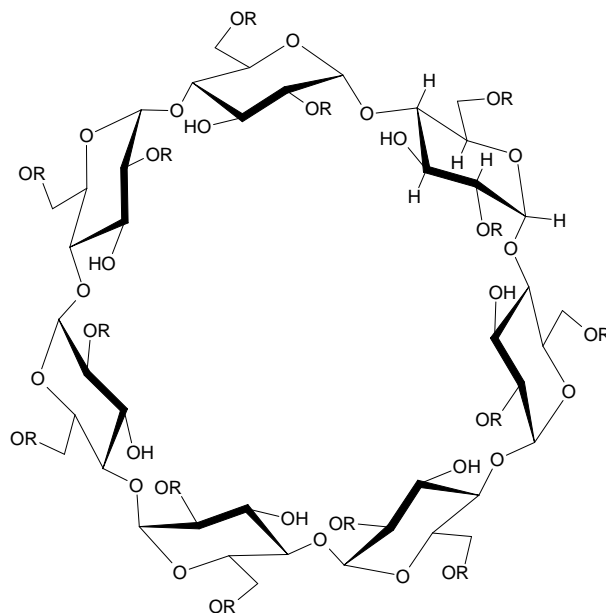
R = H, R₁ = OH, 4'-hidroxiflavanona

Figura 1.12

Estructura de flavanona y de sus derivados 2' y 4' hidroxilados. Con el asterisco (*) se indica el centro estereogénico.

Considerando que las técnicas de RMN y HPLC podrían en conjunto dar solución a los problemas de discriminación quiral y enantioseparación, con lo que además se puede aportar a la elucidación del mecanismo de discriminación quiral, en este trabajo se ha propuesto el uso de estas dos técnicas para el estudio de complejos diastereoisoméricos formados por ciclodextrinas y flavanonas, donde éstas últimas se emplean como mezcla racémica.

Se han escogido las flavanonas (\pm)-flavanona (FL), (\pm)-2'-hidroxiflavanona (2'OHFL) y (\pm)-4'-hidroxiflavanona (4'OHFL) para estudiar sus complejos diastereoisoméricos formados con las ciclodextrinas β -ciclodextrina (β CD), (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina (HP β CD) y heptakis-(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina (DM β CD), las que fueron escogidas ya que tienen la posibilidad de exhibir diferentes interacciones (Fig. 1.13).



R = H, β -ciclodextrina (β CD)
R = $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, (2-Hidroxiopropil)- β -ciclodextrina (HP β CD)[#]
R = CH_3 , Heptakis-(2,6-O-dimetil)- β -ciclodextrina (DM β CD)

Figura 1.13

Estructura de β -ciclodextrinas. El signo (#) indica que la ciclodextrina es sustituida al azar, y que el grupo sustituyente R puede encontrarse en cualquiera de los hidroxilos de las posiciones 2, 3 y/o 6.

Estos complejos son estudiados estimando su geometría de inclusión y determinando, para cada complejo diastereoisomérico, las constantes de asociación,

estequiometría y termodinámica de inclusión, usando la mezcla racémica de las flavanonas.

Debido a que los experimentos ^1H -RMN pueden diferenciar enantiómeros al estar éstos en presencia de CDs, esta es la técnica escogida para realizar todos los estudios de los complejos diastereoisoméricos, utilizando además experimentos 2D-ROESY para estimar las geometrías de inclusión de los complejos formados con la mezcla racémica de enantiómeros.

Adicionalmente se estudia la posibilidad de predecir la separación enantiomérica mediante HPLC, obteniendo las razones entre las constantes de asociación de cada complejo diastereoisomérico (Ka^1/Ka^2).

1.1 **HIPÓTESIS**

La estructura y característica apolar de las flavanonas escogidas permitirían la formación de complejos de inclusión diastereoisoméricos con las β ciclodextrinas.

Los complejos diastereoisoméricos formados podrían ser diferenciados a través de RMN lo que haría viable su estudio a través de la obtención de los parámetros característicos de éstos. La información obtenida permitiría el desarrollo de metodologías de separación de mezclas enantioméricas.

1.2 OBJETIVOS GENERALES

- 1.- Evaluar la formación de complejos diastereoisoméricos flavanona/ β ciclodextrina a través de la determinación de sus parámetros característicos mediante RMN.
- 2.- Evaluar la ciclodextrina más idónea como aditivo en la fase móvil para la enantioseparación de flavanonas mediante HPLC.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Formar complejos diastereoisoméricos entre las flavanonas y las ciclodextrinas escogidas.
- 2.- Determinar y analizar la estequiometría de inclusión de cada complejo diastereoisomérico a través de RMN.
- 3.- Determinar y analizar la constante de asociación de cada complejo diastereoisomérico a través de RMN.
- 4.- Determinar y analizar la termodinámica de inclusión de cada complejo diastereoisomérico a través de RMN.
- 5.- Determinar y analizar la geometría de inclusión de cada complejo diastereoisomérico a través de RMN.
- 6.- Discriminar los enantiómeros de las flavanonas escogidas mediante HPLC usando ciclodextrinas como aditivo en la fase móvil.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 REACTIVOS

Los compuestos usados, flavanona (FL) (2-fenil-2,3-dihidro-4*H*-cromen-4-ona), 4'-hidroxiflavanona (4'OHFL) (2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidro-4*H*-cromen-4-ona), 2'-hidroxiflavanona (2'OHFL) (2-(2-hidroxifenil)-2,3-dihidro-4*H*-cromen-4-ona), β -ciclodextrina (β CD), (2-Hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HP β CD [Peso molecular promedio = 1540, grado de sustitución = 7]) y Heptakis-(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina (DM β CD) fueron de 98% de pureza y obtenidos en Sigma-Aldrich. Los solventes usados, metanol, agua, metanol-*d*4 y D₂O fueron de calidad HPLC o para NMR y obtenidos en Merck.

2.2 EQUIPAMIENTO

2.2.1 Equipo de Resonancia Magnética Nuclear

Se usó un equipo de resonancia magnética nuclear de alta resolución Bruker Avance DRX300, de 300,13MHz para protones, con sonda multinuclear inversa y con gradiente. Se usaron tubos para RMN de marca Wilmad[®] de 5mm de diámetro y de 7 pulgadas de largo, para ser usados en equipos de 300MHz.

2.2.2 Equipo de HPLC

Se usó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución Waters 600 Controller con válvula de inyección de Reodinio 7725i equipado con loop de 20 μ L. Detector UV-Vis Waters 486, acoplado a integrador Waters 746 para procesamiento de datos. Columna para HPLC Hibar[®] 250 – 4 LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ m).

2.3 METODOLOGÍAS

2.3.1 Caracterización de flavanonas y ciclodextrinas mediante RMN

La caracterización de las flavanonas y ciclodextrinas se llevó a cabo obteniendo los espectros ^1H -RMN y COSY (COrelation SpectroscopY) para el caso de las flavanonas, y los espectros ^1H -RMN y HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) para el caso de las CDs. Los espectros COSY y HSQC fueron adquiridos con el objetivo de asignar inequívocamente todas las señales de protones.

Los espectros COSY, son espectros de dos dimensiones que presentan acoplamiento escalar cuando dos hidrógenos se encuentran a una distancia de dos y/o tres enlaces. Estos espectros muestran en la diagonal el espectro ^1H -RMN, y señales fuera de la diagonal que corresponden a los acoplamientos escalares, como es esquematizado en la Figura 2.1.

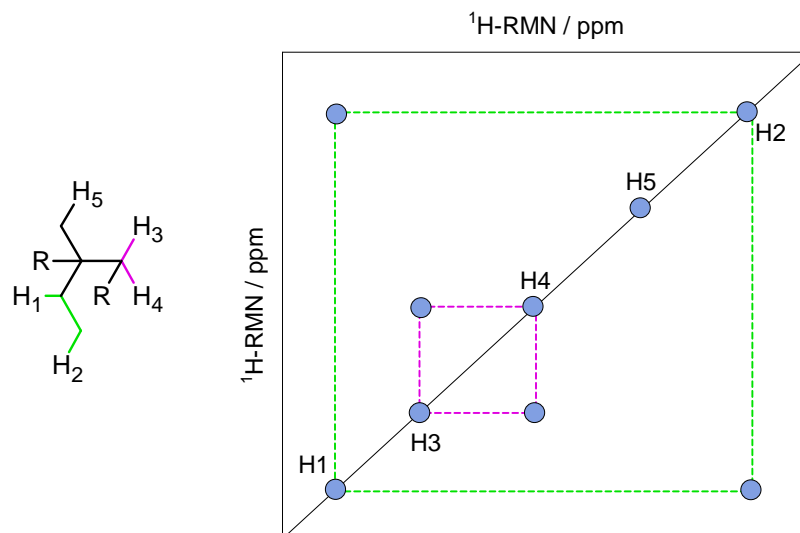


Figura 2.1
Esquematización de un espectro COSY. Los hidrógenos H1 y H2 correlacionan, y lo mismo ocurre para los hidrógenos H3 y H4.

Los acoplamientos escalares (cuadrados interiores de la Figura 2.1) que aparecen de a pares, indican los hidrógenos que se encuentran adyacentes, a tres enlaces generalmente, y que acoplan entre ellos. De acuerdo al esquema de la Figura 2.1, los hidrógenos H1 y H2 correlacionan y se encuentran a tres enlaces, y lo mismo ocurre para los hidrógenos H3 y H4 geminales, que poseen diferente desplazamiento químico. El hidrógeno H5 está a más de tres enlaces del hidrógeno más cercano, y por lo tanto no correlaciona.

Con lo anterior se asignaron los desplazamientos químicos (δ / ppm) para todos los protones de las flavanonas, además de las constantes de acoplamiento (J / Hz) y multiplicidades (Mult.). Para estas últimas se usa la siguiente nomenclatura.

s = singulete

d = doblete

t = triplete

dd = doble doblete

dt = doble triplete.

Los espectros COSY de las flavanonas se adquirieron usando los parámetros estándar del espectrómetro (programa de pulso cosygs), y haciendo 16 repeticiones.

Los espectros HSQC, son espectros de dos dimensiones, que correlacionan el desplazamiento químico de un hidrógeno con el mismo de un heteronúcleo, como ^{13}C , cuando estos están directamente unidos. En el eje "x" del diagrama 2D aparece el espectro ^1H -RMN, y en el eje "y" el espectro ^{13}C -RMN. Adicionalmente, los espectros HSQC-ed (HSQC-editado), tienen la característica de que los hidrógenos pertenecientes a grupos CH_2 , aparecen en fase opuesta a la de los

grupos CH y CH₃. Lo anterior permite identificar fácilmente los hidrógenos pertenecientes a grupos metilenos (CH₂). En la Figura 2.2 se esquematiza un espectro HSQC-ed.

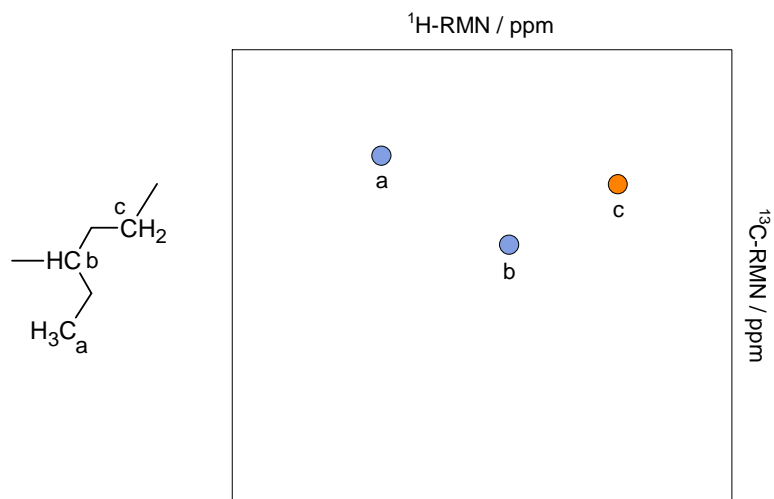


Figura 2.2

Esquemización de espectro HSQC. En el diagrama se observan señales para los grupos a, b y c, correspondientes a grupos CH₃, CH y CH₂, respectivamente. La señal de cada grupo aparece en el cruce del desplazamiento químico del hidrógeno, con el desplazamiento químico del carbono correspondiente. El grupo CH₂ (c) aparece en fase opuesta a la de los grupos a y b, lo que se representa con diferentes colores.

Los espectros HSQC-ed de las ciclodextrinas se adquirieron usando los parámetros estándar del espectrómetro (programa de pulso inviedgpff).

Todos los espectros fueron adquiridos en mezcla D₂O/Metanol-*d*4 en proporción 60/40, y referenciado los espectros a la señal residual del metanol-*d*4 en 3.2ppm.

2.3.2 Preparación de complejos

Los complejos fueron preparados disolviendo la cantidad necesaria de flavanona y ciclodextrina en mezcla D₂O:MeOD en relación 60:40 y agitando durante 24h a la temperatura deseada.³⁶

2.3.3 Caracterización de complejos mediante RMN

Se formaron complejos a 25°C usando una concentración 6mM de ciclodextrina y 1mg de flavanona. La mezcla obtenida se agitó durante 24h a 25°C y se filtró usando filtros Millex-GV con membrana Durapore de 0.45µm. La caracterización de los complejos se realizó adquiriendo los espectros ¹H-RMN, y en estos asignando los hidrógenos que poseen diferente δ para cada enantiómero.

2.3.4 Determinación de la estequiometría de inclusión

El equilibrio entre el complejo de inclusión y cada una sus partes viene dado por



Donde CD es la ciclodextrina, a es el coeficiente estequiométrico de la misma, S representa al sustrato, y S-CD_a es el complejo.

Se ha descrito^{102, 103} que la estequiometría de inclusión de un complejo puede ser determinada usando la ecuación 2.2.

$$\frac{1}{\Delta\delta_{\text{obs}}} = \frac{1}{K_a \cdot \Delta\delta_c} \cdot \frac{1}{[CD]_0^a} + \frac{1}{\Delta\delta_c} \quad (2.2)$$

Donde $\Delta\delta_{\text{obs}}$ es la diferencia de desplazamiento químico observado, $[CD]_0$ es la concentración inicial de CD, (a) es su coeficiente estequiométrico, y $\Delta\delta_c$ es la diferencia de desplazamiento químico intrínseco. En la práctica, la diferencia de desplazamiento químico observado está dada por, $\Delta\delta_{\text{obs}} = \delta_L - \delta_{\text{obs}}$, donde δ_L es el desplazamiento químico de la flavanona libre, y δ_{obs} es el desplazamiento químico observado de la misma, a una concentración dada del sustrato y la CD. Por otra parte, la diferencia de desplazamiento químico intrínseco está dada por, $\Delta\delta_c = \delta_L - \delta_c$, donde δ_c corresponde al desplazamiento químico intrínseco del complejo.

De acuerdo a la ecuación 2.2, si la estequiometría es 1:1, la variación de la diferencia de desplazamiento químico, $\Delta\delta_{\text{obs}}^{-1}$, en función del inverso de la concentración de ciclodextrina, $[CD]_0^{-1}$, será lineal. Esto es esquematizado en la Figura 2.3.

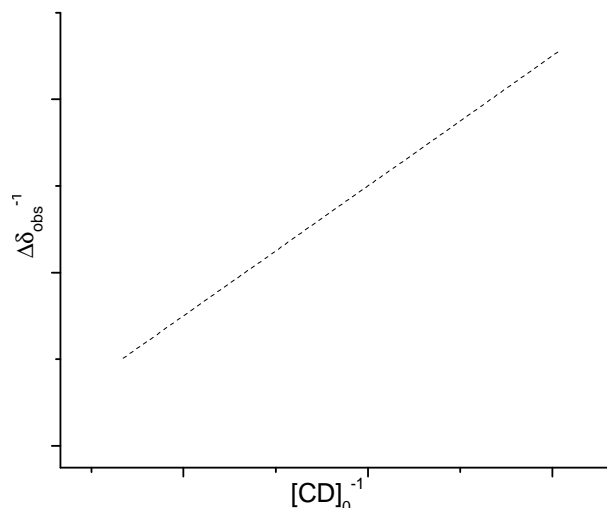


Figura 2.3

Esquema de la relación entre $\Delta\delta_{\text{obs}}^{-1}$ y $[\text{CD}]_0^{-1}$ para estequiometría 1:1.

Para la determinación de la estequiometría de inclusión se adquieren, a 25°C, espectros ^1H -RMN a una batería de soluciones de complejos formados a la misma temperatura, de donde se obtienen los valores de δ_{obs} . Estos complejos son formados manteniendo constante la concentración de flavanona y variando la concentración de CD. Además se adquiere el espectro ^1H -RMN de la flavanona libre, ya que este proporcionará el valor de δ_{L} .

Para todos los complejos se formaron 10 soluciones. En el caso de la βCD , la concentración de cada flavanona, $[\text{fl}]_0$, se mantuvo en 0.3mM, y la de ciclodextrina se varió entre 0.6 y 6.0mM, obteniendo relaciones flavanona:ciclodextrina, $[\text{fl}]_0/[\beta\text{CD}]_0$, entre 1/2 y 1/20. Para los complejos formados con la $\text{HP}\beta\text{CD}$, la concentración de cada flavanona, $[\text{fl}]_0$, se mantuvo en 1mM, y la de ciclodextrina se varió entre 2 y 20mM, obteniendo relaciones flavanona:ciclodextrina, $[\text{fl}]_0/[\text{HP}\beta\text{CD}]_0$, entre 1/2 y 1/20. Para los complejos formados con la $\text{DM}\beta\text{CD}$, la concentración de cada flavanona, $[\text{fl}]_0$, se mantuvo en 1mM, y la de ciclodextrina se varió entre 1 y 10mM,

obteniendo relaciones flavanona:ciclodextrina, $[fl]_0/[DM\beta CD]_0$, entre 1/1 y 1/10. Lo anterior se indica en la Tabla 2.1.

Muestra	$[fl]_0 = 0.3^a$		$[fl]_0 = 1.0^a$		$[fl]_0 = 1.0^a$	
	$[\beta CD]_0$	$[fl]_0/[\beta CD]_0$	$[HP\beta CD]_0$	$[fl]_0/[HP\beta CD]_0$	$[DM\beta CD]_0$	$[fl]_0/[DM\beta CD]_0$
1	0.0	1/0	0.0	1/0	0.0	1/0
2	0.6	1/2	2.0	1/2	1.0	1/1
3	1.2	1/4	4.0	1/4	2.0	1/2
4	1.8	1/6	6.0	1/6	3.0	1/3
5	2.4	1/8	8.0	1/8	4.0	1/4
6	3.0	1/10	10.0	1/10	5.0	1/5
7	3.6	1/12	12.0	1/12	6.0	1/6
8	4.2	1/14	14.0	1/14	7.0	1/7
9	4.8	1/16	16.0	1/16	8.0	1/8
10	5.4	1/18	18.0	1/18	9.0	1/9
11	6.0	1/20	20.0	1/20	10.0	1/10

Tabla 2.1

Concentración (mM) de CD en cada complejo formado para la determinación de la estequiometría de inclusión, y razón entre la concentración de las flavanonas y CDs, $[fl]_0/[CD]_0$. (a) indica la concentración (mM) usada de cada flavanona, $[fl]_0$, en los complejos formados.

2.3.5 Determinación de las constantes de asociación

El equilibrio existente entre un complejo 1:1 y sus partes, se expresa mediante la constante de asociación (K_a), que se define de la siguiente manera.



$$K_a = \frac{[C]}{[S] \cdot [CD]} \quad (2.4)$$

Donde $[C]$, $[S]$ y $[CD]$ son la concentración de complejo, sustrato y CD en el equilibrio. Para la obtención de la K_a , se debe tratar la ecuación 2.4, de manera de llevar las concentraciones de equilibrio a concentraciones conocidas y a una variable experimental, que en este caso es el desplazamiento químico observado de los complejos en los espectros $^1\text{H-RMN}$ (δ_{obs}). Para llevar a cabo esto, se tiene que

$$[S] = [S]_0 - [C] \quad (2.5)$$

$$[CD] = [CD]_0 - [C] \quad (2.6)$$

Donde $[S]_0$ es la concentración inicial de sustrato, y $[CD]_0$ es la concentración inicial de CD. Reemplazando las ecuaciones 2.5 y 2.6 en la ecuación 2.4, y reordenando, se tiene

$$K_a = \frac{[C]}{([S]_0 - [C]) \cdot ([CD]_0 - [C])} \quad (2.7)$$

$$K_a = \frac{[C]}{[C]^2 - [CD]_0[C] - [S]_0[C] + [CD]_0[S]_0} \quad (2.8)$$

$$[C]^2 - [CD]_0[C] - [S]_0[C] + [CD]_0[S]_0 = \frac{[C]}{K_a} \quad (2.9)$$

$$[C]^2 - [CD]_0[C] - [S]_0[C] - \frac{[C]}{K_a} + [CD]_0[S]_0 = 0 \quad (2.10)$$

$$[C]^2 - [C] \left([CD]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right) + [CD]_0[S]_0 = 0 \quad (2.11)$$

La ecuación 2.11 tiene la forma de una ecuación de segundo grado, que se resuelve de la siguiente forma

$$a \cdot x^2 + b \cdot x + c = 0 \quad (2.12)$$

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (2.13)$$

Si [C] es análogo a x, $a = 1$, b es la cantidad entre paréntesis y $c = [CD]_0[S]_0$, la concentración de complejo en el equilibrio viene dada por

$$[C] = \frac{\left([CD]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right) \pm \sqrt{\left([CD]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 - 4 \cdot [CD]_0[S]_0}}{2} \quad (2.14)$$

La ecuación 2.14 tiene sentido físico solo si se resta la raíz cuadrada, ya que si se sumara, la concentración de complejo [C] resultaría ser mayor que la suma de las concentraciones iniciales de CD y S. Por lo tanto

$$[C] = \frac{\left([CD]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\left([CD]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 - 4 \cdot [CD]_0[S]_0}}{2} \quad (2.15)$$

La variable experimental usada es el desplazamiento químico observado en los espectros $^1\text{H-RMN}$ de los complejos (δ_{obs}). Este desplazamiento químico viene dado por

$$\delta_{\text{obs}} = \chi_L \cdot \delta_L + \chi_c \cdot \delta_c \quad (2.16)$$

Donde χ_L y δ_L son la fracción molar y desplazamiento químico del sustrato libre, y χ_c y δ_c son la fracción molar y desplazamiento químico del complejo.

Los valores de χ_L y χ_c vienen dados por

$$\chi_L = 1 - \chi_c \quad (2.17)$$

$$\chi_c = \frac{[C]}{[C] + [S]} = \frac{[C]}{[S]_0} \quad (2.18)$$

Reemplazando las ecuaciones 2.17 y 2.18 en la ecuación 2.16, y reordenando, se tiene

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_L \left(1 - \frac{[C]}{[S]_0} \right) + \delta_c \cdot \frac{[C]}{[S]_0} \quad (2.19)$$

$$[C] = \frac{[S]_0 (\delta_L - \delta_{\text{obs}})}{\delta_L - \delta_c} \quad (2.20)$$

Si $(\delta_L - \delta_{\text{obs}}) = \Delta\delta_{\text{obs}}$ y $(\delta_L - \delta_c) = \Delta\delta_c$, entonces la ecuación 2.20 se transforma en

$$[C] = \frac{[S]_0 \Delta\delta_{\text{obs}}}{\Delta\delta_c} \quad (2.21)$$

El parámetro $\Delta\delta_c$, se conoce como diferencia de desplazamiento químico intrínseco. Reemplazando la ecuación 2.21 en la ecuación 2.15, y reordenando, se obtiene

$$\frac{\Delta\delta_{\text{obs}} [S]_0}{\Delta\delta_c} = \frac{\left([CD]_0 + [S]_0 + \frac{1}{Ka} \right) - \sqrt{\left([CD]_0 + [S]_0 + \frac{1}{Ka} \right)^2 - 4 \cdot [CD]_0 [S]_0}}{2} \quad (2.22)$$

$$\Delta\delta_{\text{obs}} = \frac{\Delta\delta_c}{2 \cdot [S]_0} \left[\left([CD]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\left([CD]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 - 4 \cdot [CD]_0 [S]_0} \right] \quad (2.23)$$

La aplicación de la ecuación 2.23 se conoce como el método no lineal para la determinación de las constantes de asociación,^{104 - 106} y su uso consta de la iteración de los datos experimentales. Debido a que este es un método iterativo, se necesita de parámetros iniciales para proceder. Los parámetros iniciales necesarios, que son $\Delta\delta_c$ y K_a , fueron obtenidos del método de Benesi-Hildebrand, que implica el uso de la ecuación 2.24

$$\frac{1}{\Delta\delta_{\text{obs}}} = \frac{1}{K_a \cdot [CD]_0 \cdot \Delta\delta_c} + \frac{1}{\Delta\delta_c} \quad (2.24)$$

La ecuación 2.24 es derivada de la ecuación 2.4, pero usando $[C] = [S]_0 - [S]$ y $[CD] = [CD]_0 - [C]$. Lo anterior produce la siguiente ecuación

$$K_a = \frac{[S]_0 - [S]}{[S] \cdot ([CD]_0 - [C])} \quad (2.25)$$

Esta ecuación es resuelta considerando que la concentración inicial de CD es mucho mayor que la concentración de complejo, $[CD]_0 \gg [C]$. Aplicando esta consideración se obtiene

$$K_a = \frac{[S]_0 - [S]}{[S] \cdot [CD]_0} \quad (2.26)$$

Luego, la ecuación 2.26 es tratada reemplazando en ella la ecuación 2.21, pero usando en esta última $[C] = [S]_0 - [S]$. De esta manera se obtiene la ecuación 2.24, correspondiente al método de Benesi-Hildebrand.⁵⁰ Este método se aplica graficando el inverso de la variación de desplazamiento químico observado,

$\Delta\delta_{\text{obs}}^{-1}$, contra el inverso de la concentración de CD, $[\text{CD}]_0^{-1}$, y ajustando linealmente los datos. Así, del intercepto de la gráfica se obtiene un valor aproximado de $\Delta\delta_c$, y de la pendiente se obtiene un valor aproximado de K_a .

Experimentalmente, se adquieren espectros ^1H -RMN a una batería de soluciones de complejos, de donde se obtienen los valores de δ_{obs} . Estos complejos son formados manteniendo constante la concentración de sustrato y variando la concentración de CD. Además se adquiere el espectro ^1H -RMN del sustrato solo, ya que este proporcionará el valor de δ_L . Cabe destacar que el método de Benesi-Hildebrand no es aplicable directamente a la determinación de las K_a por RMN, debido a que la aproximación $[\text{CD}]_0 \gg [\text{C}]$, implica el uso de concentraciones de CD de al menos 100 veces mayores que la concentración de sustrato, lo cual en RMN es, para la mayoría de los casos, impracticable.¹⁰⁷

Posteriormente, y aplicando los mismos resultados experimentales usados en la ecuación de Benesi-Hildebrand, se grafica la diferencia de desplazamiento químico observado, $\Delta\delta_{\text{obs}}$, contra la concentración de CD, $[\text{CD}]_0$. Esto da una gráfica de forma exponencial, cuya iteración usando ecuación 2.23, se comienza usando los valores aproximados de $\Delta\delta_c$ y K_a .

Los datos experimentales se obtuvieron formando 10 soluciones de cada complejo, manteniendo constante la concentración de flavanona, y variando progresivamente la concentración de ciclodextrina. Estas soluciones fueron de las mismas características que las usadas para la determinación de la estequiometría de inclusión (Tabla 2.1).

Se obtuvieron K_a adquiriendo los espectros ^1H -RMN a la misma temperatura de formación de los complejos, y a 298.15K. Como resultado se obtuvo,

que los valores de K_a son reproducibles al adquirir los espectros a la temperatura de formación de los complejos, y no son reproducibles al adquirir los espectros a temperatura ambiente. Por lo anterior, la determinación de la K_a , fue realizada adquiriendo los espectros a la temperatura de formación de los complejos.

2.3.6 *Determinación de la termodinámica de inclusión*

Los valores termodinámicos de los complejos se obtuvieron determinando las constantes de asociación a diferentes temperaturas, siendo estas, 25, 30 y 35°C. Estos valores fueron tratados de acuerdo a la ecuación de Van't Hoff (Eq. 2.27), que relaciona la variación de la constante de asociación con la variación de temperatura, de acuerdo a la siguiente relación,^{108 - 110}

$$\ln(K_a) = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2.27)$$

Graficando $\ln(K_a)$ vs. T^{-1} , y usando $R = 8.314 \text{ J/Kmol}$, de la pendiente e intercepto del ajuste lineal de los datos se obtienen los valores de ΔH y ΔS , respectivamente. Con estos resultados, y usando $T = 298.15\text{K}$, se obtiene el valor de ΔG , de acuerdo a la ecuación 2.28.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.28)$$

2.3.7 Determinación de la geometría de inclusión

La estimación de la geometría de inclusión de los complejos, es realizada adquiriendo espectros 2D-ROESY. Estos espectros dan cuenta de la interacción espacial entre átomos de hidrógeno que se encuentren a distancias de hasta 5Å. Los espectros 2D-ROESY muestran señales en la diagonal, correspondientes al espectro $^1\text{H-RMN}$, y señales fuera de la diagonal que indican la interacción espacial, como es esquematizado en la Figura 2.4.

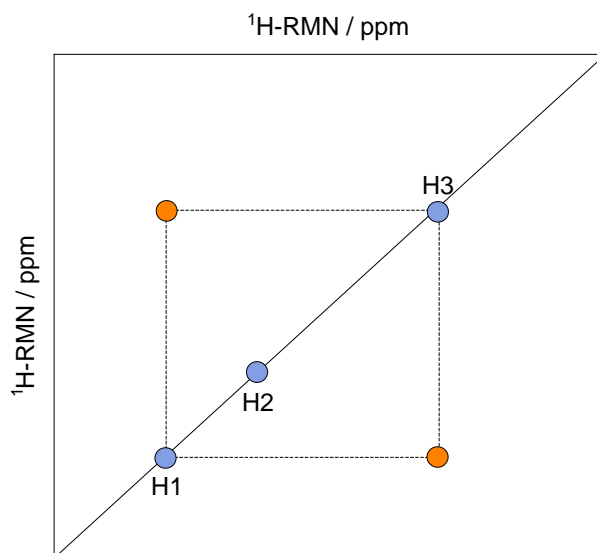


Figura 2.4
Esquematización de espectro 2D-ROESY. Los hidrógenos H1 y H3 presentan señal, mientras que no existe señal para el hidrógeno H2.

Los espectros 2D-ROESY de los complejos formados se adquirieron usando los parámetros estándar del espectrómetro (programa de pulso roesygpph19), usando un ancho espectral de 3000 Hz, y de tamaño 16K/8K. Se empleó un tiempo de relajación de 3s, tiempos de mezcla de 400ms y haciendo 32 repeticiones.

2.3.8 Caracterización de flavanonas en HPLC

A temperatura ambiente, y usando un flujo de 1mL/min, se inyectaron 20µL de la flavanona en estudio, en concentración 0.2 mg/mL, empleando en la fase móvil metanol y mezclas metanol/agua.

2.3.9 Separación enantiómerica mediante HPLC

A temperatura ambiente y haciendo variaciones en el flujo de la fase móvil, se inyectaron 20µL de la flavanona en estudio, en concentración 0.2mg/mL, y empleando como fase móvil metanol/agua 40/60, donde el agua contiene CD. Con el objetivo de saber la concentración inicial de CD a usar en la fase móvil, se empleó la ecuación 2.29,⁴⁵ a continuación.

$$[CD] = \frac{1}{\sqrt{Ka^1 \cdot Ka^2}} \quad (2.29)$$

La concentración de CD se varió con el objetivo de determinar las variaciones en la discriminación enantiomérica y tiempos de retención.

CAPÍTULO III

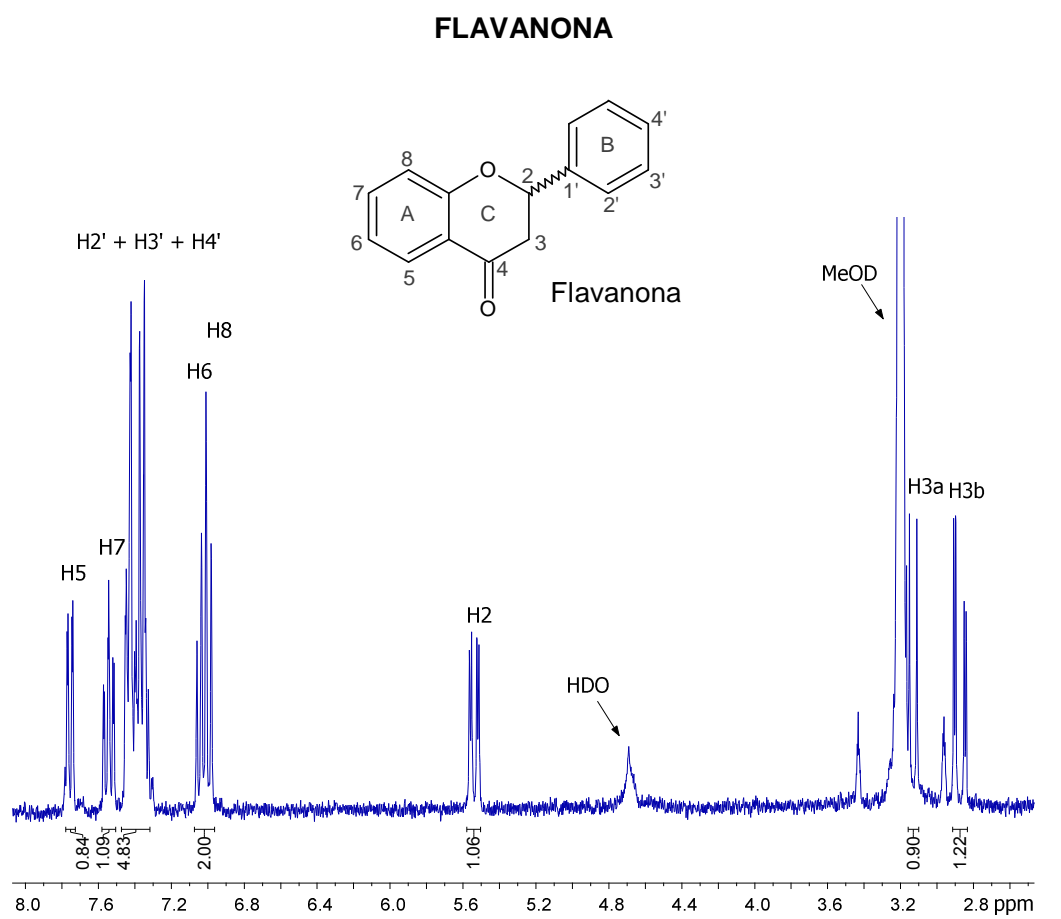
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

3.1.1 Caracterización en RMN

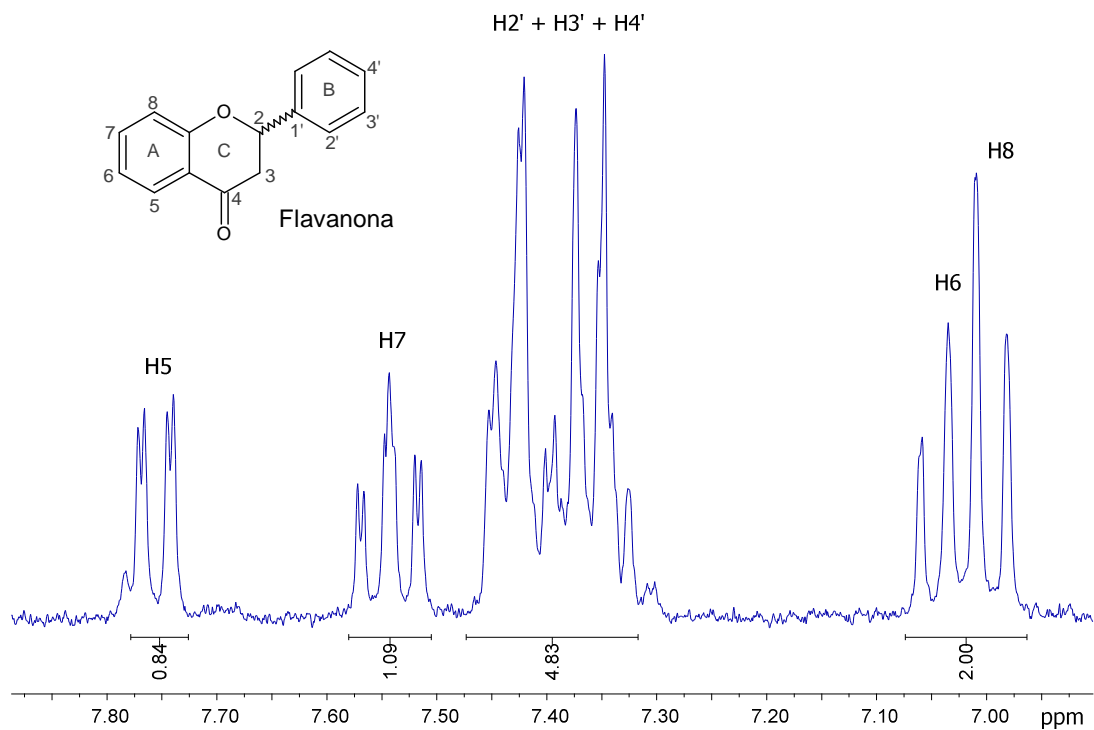
3.1.1.1 Caracterización de flavanonas

La caracterización de todas las flavanonas fue realizada adquiriendo los espectros ^1H -RMN y COSY, y asignando los desplazamientos químicos (δ), constantes de acoplamiento (J) y multiplicidad a cada protón. A continuación se muestran los resultados para todas las flavanonas.



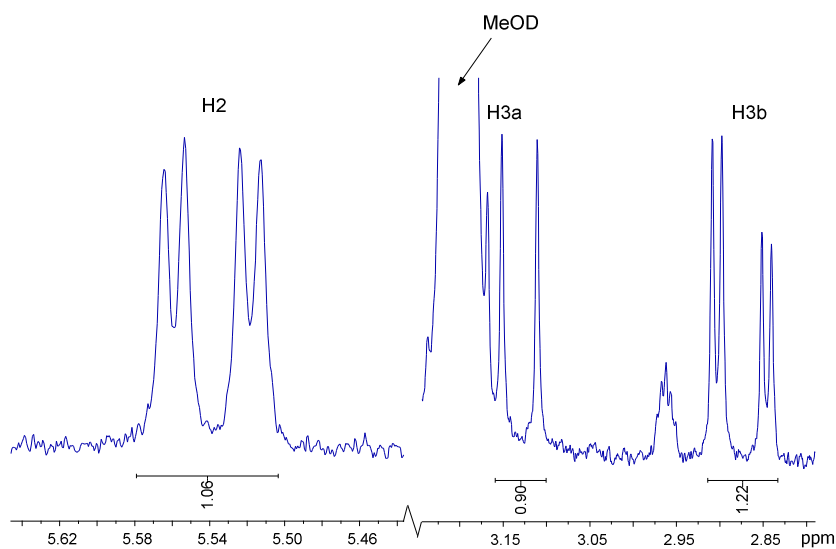
Espectro 3.1

Espectro ^1H -RMN de FL. En la parte inferior del espectro se muestra la integración de cada señal. H2'+H3'+H4' indica que el desplazamiento químico de cada hidrógeno no está asignado ya que las señales se solapan unas con otras.



Espectro 3.2

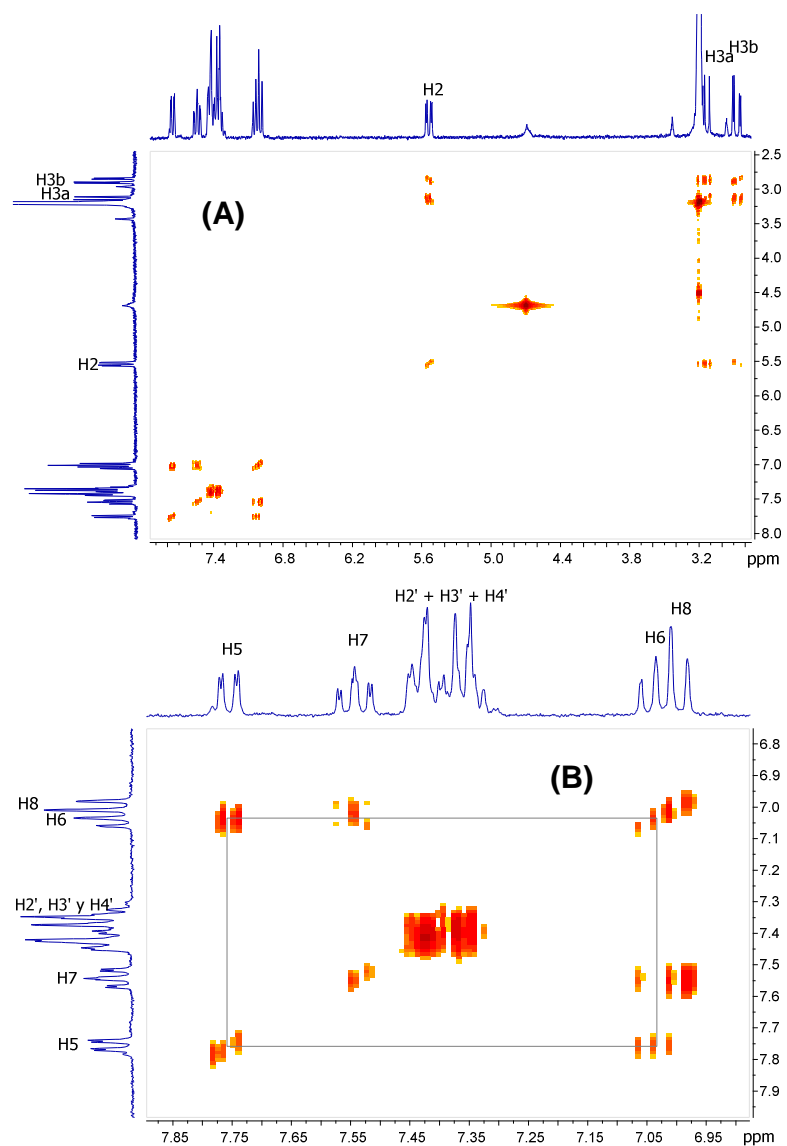
Zona aromática del espectro $^1\text{H-RMN}$ de FL. Bajo el espectro se muestra la integración de cada señal. H2'+H3'+H4' indica que el desplazamiento químico de cada hidrógeno no está asignado ya que las señales se solapan unas con otras.



Espectro 3.3

Zona alifática del espectro $^1\text{H-RMN}$ de FL. Bajo el espectro, se muestra la integración de cada señal.

Los espectros 3.1, 3.2 y 3.3 correspondientes al espectro ^1H -RMN de la FL, fueron tratados asignando los desplazamientos químicos a cada hidrógeno de la FL. Para corroborar la asignación se adquirió el espectro COSY, que muestra las correlaciones entre los diferentes hidrógenos, lo que se muestra en el Espectro 3.4.



Espectro 3.4

Espectro COSY de FL. (A) Espectro COSY completo. (B) Zona aromática del espectro COSY. En el interior de la ampliación se indica, como ejemplo, las correlaciones entre los hidrógenos H5 y H6. H2'+H3'+H4' indica que el desplazamiento químico de cada hidrogeno no está asignado ya que las señales se solapan unas con otras.

En el espectro COSY de la FL (Espectro 3.4A), se observan correlaciones del hidrógeno H2 con los hidrógenos H3a y H3b. Además, se observan correlaciones entre estos dos últimos. En la zona aromática (Espectro 3.4B), se observan correlaciones entre los hidrógenos H5 y H6, y correlaciones entre los hidrógenos H6 y H7, y también correlaciones entre los hidrógenos H7 y H8. Debido a que las señales del anillo B de la flavanona (H2', H3' y H4') se encuentran solapadas, no fue posible asignar el desplazamiento químico para cada hidrógeno.

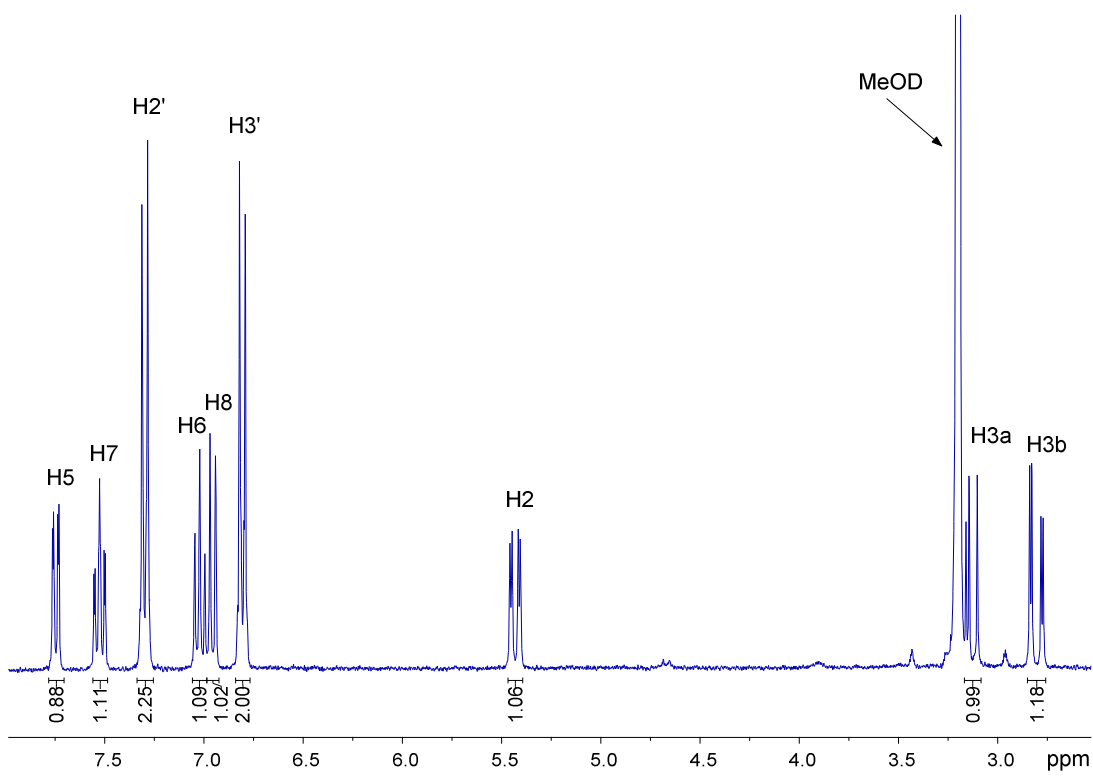
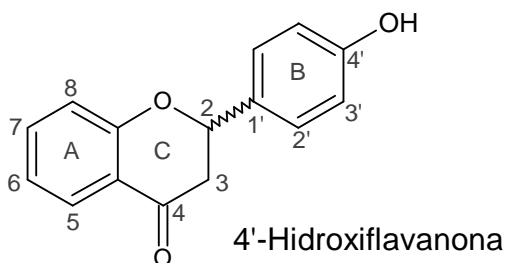
La asignación inequívoca de los desplazamientos químicos (δ / ppm), las constantes de acoplamiento (J / Hz), y multiplicidades (Mult.) de la FL se muestran en la Tabla 3.1.

Protón	H2	H3a	H3b	H5	H6	H7	H8	H2'	H3'	H4'
δ / ppm	5.54	3.16	2.88	7.76	7.03	7.54	7.00	---	---	---
Mult.	dd	dd	dd	dd	dt	dt	dd	---	---	---
J / Hz	3.3	12.2	3.3	1.7	0.6	1.7	0.6	---	---	---
	12.2	17.3	17.3	7.9	7.2	7.8	8.6	---	---	---

Tabla 3.1
Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz) de FL.

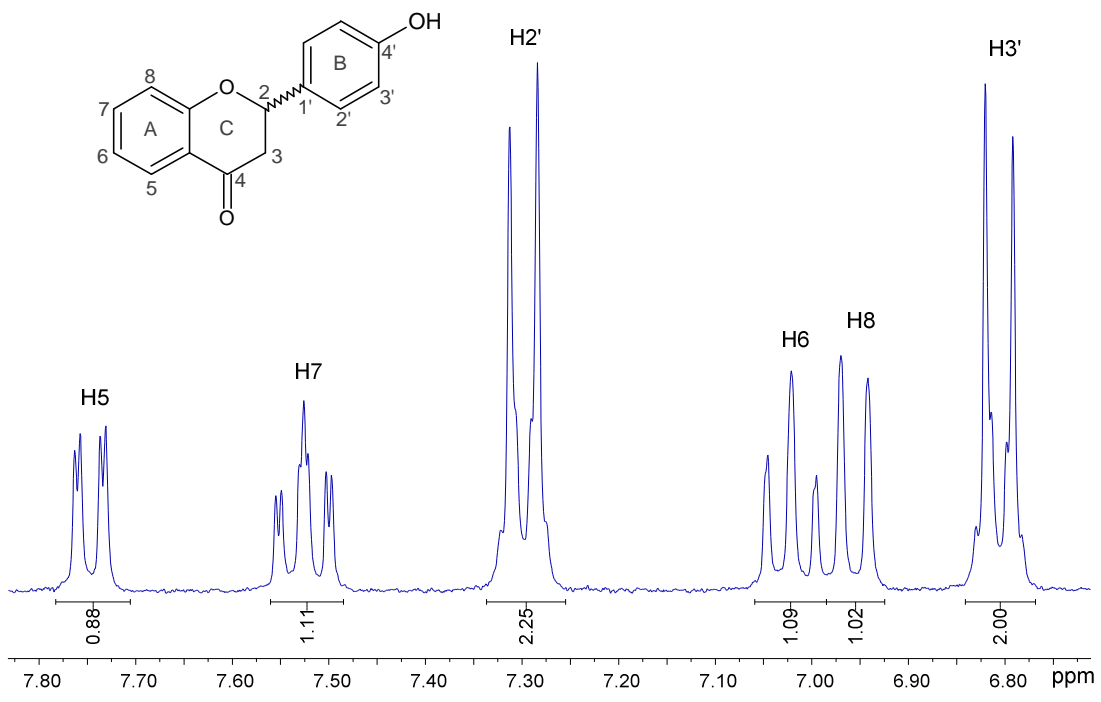
Haciendo el mismo análisis que para la FL, se obtuvieron los desplazamientos químicos (δ / ppm), constantes de acoplamiento (J / Hz), y multiplicidades (Mult.) para la 4'OHFL y 2'OHFL.

4'-HIDROXIFLAVANONA



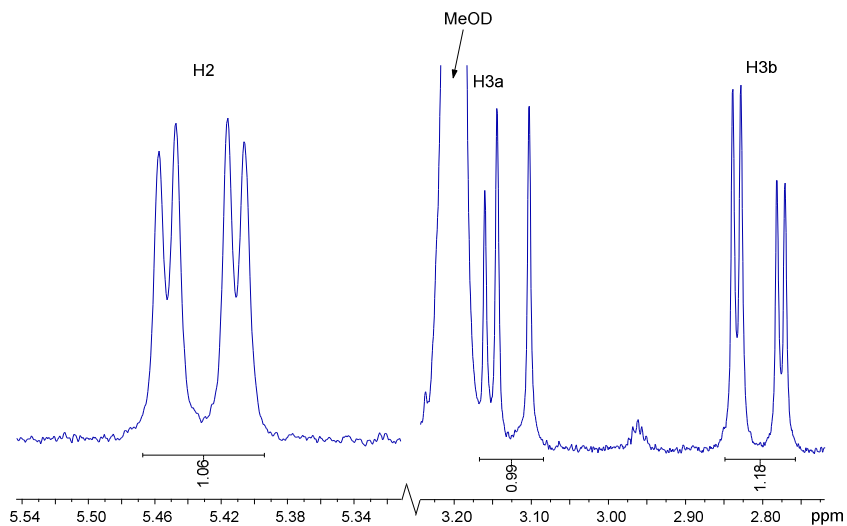
Espectro 3.5

Espectro ¹H-RMN de 4'OHFL. En la parte inferior del espectro se muestra la integración de cada señal.



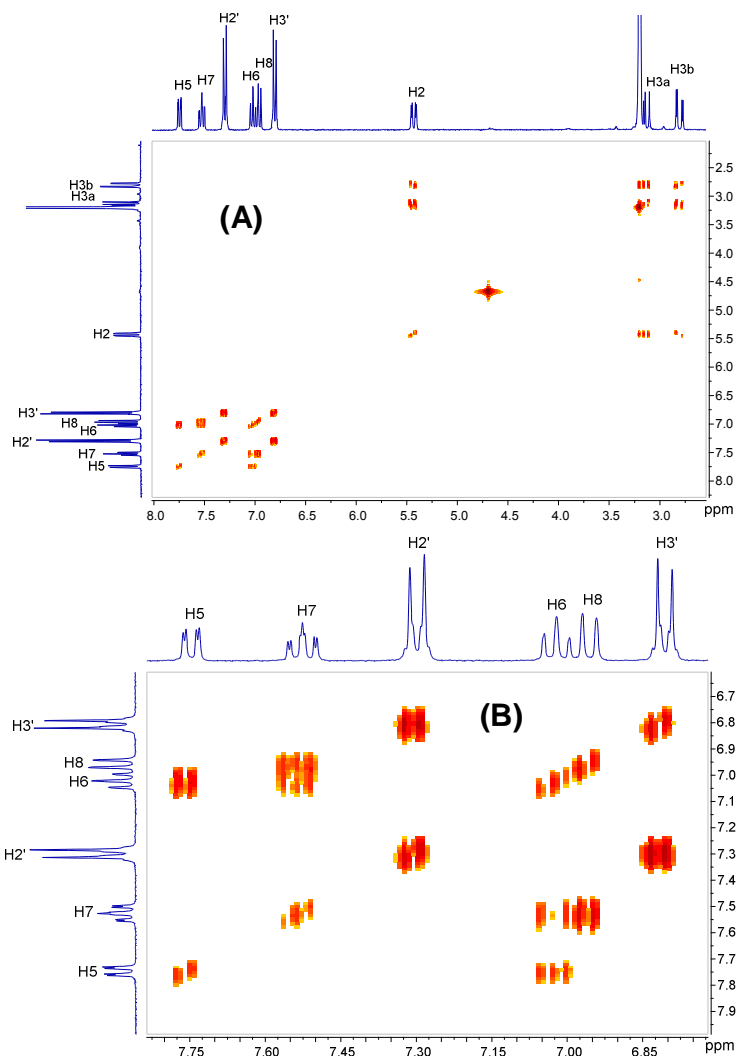
Espectro 3.6

Zona aromática del espectro $^1\text{H-RMN}$ de 4'OHFL. En la parte inferior se muestra la integración de cada señal.



Espectro 3.7

Zona alifática del espectro $^1\text{H-RMN}$ de 4'OHFL. Bajo el espectro se muestra la integración de cada señal.



Espectro 3.8

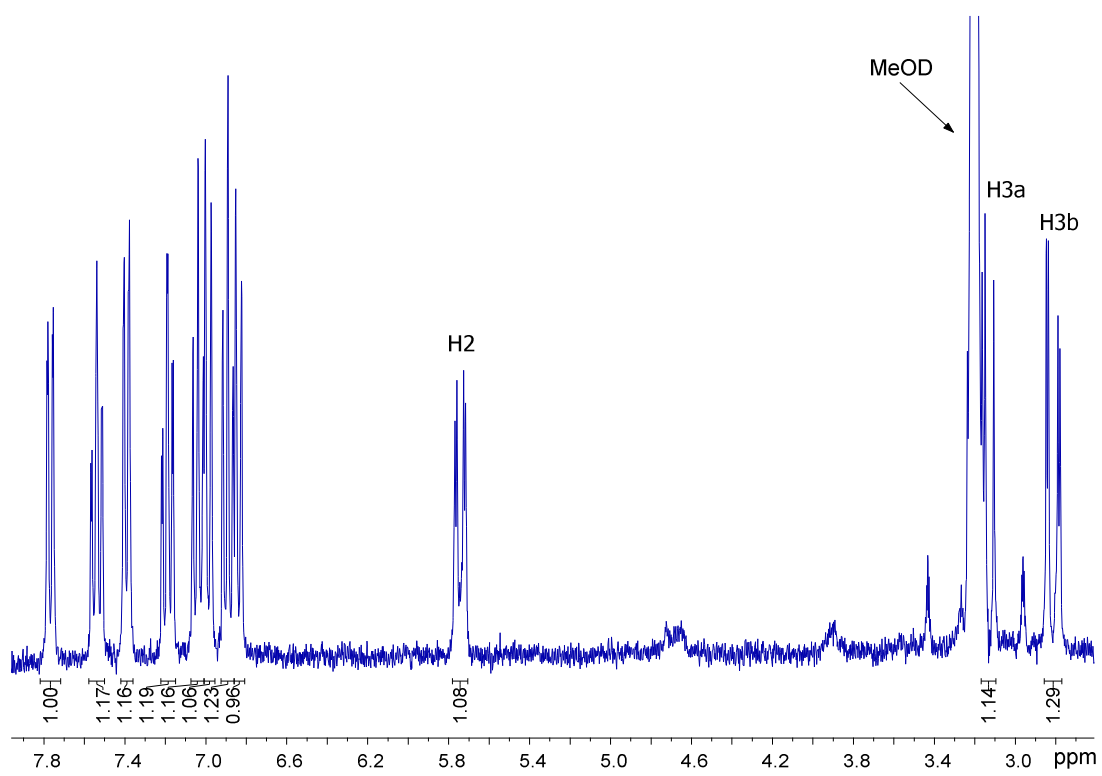
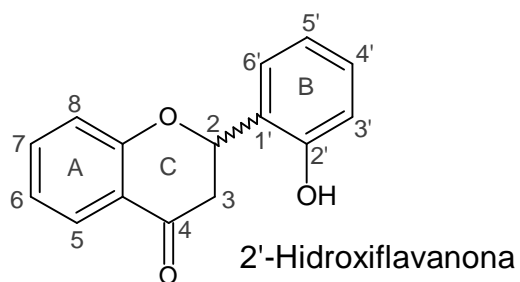
Espectro COSY de 4'OHFL. (A) espectro COSY completo. (B) Zona aromática.

Protón	H2	H3a	H3b	H5	H6	H7	H8	H2'	H3'
δ / ppm	5.44	3.15	2.80	7.75	7.02	7.53	6.96	7.30	6.81
Mult.	dd	dd	dd	dd	dt	dt	dd	d	d
J / Hz	3.1 12.5	12.5 17.2	3.1 17.2	1.7 7.9	0.9 7.6	1.7 7.8	----- 8.4	8.6	8.6

Tabla 3.2

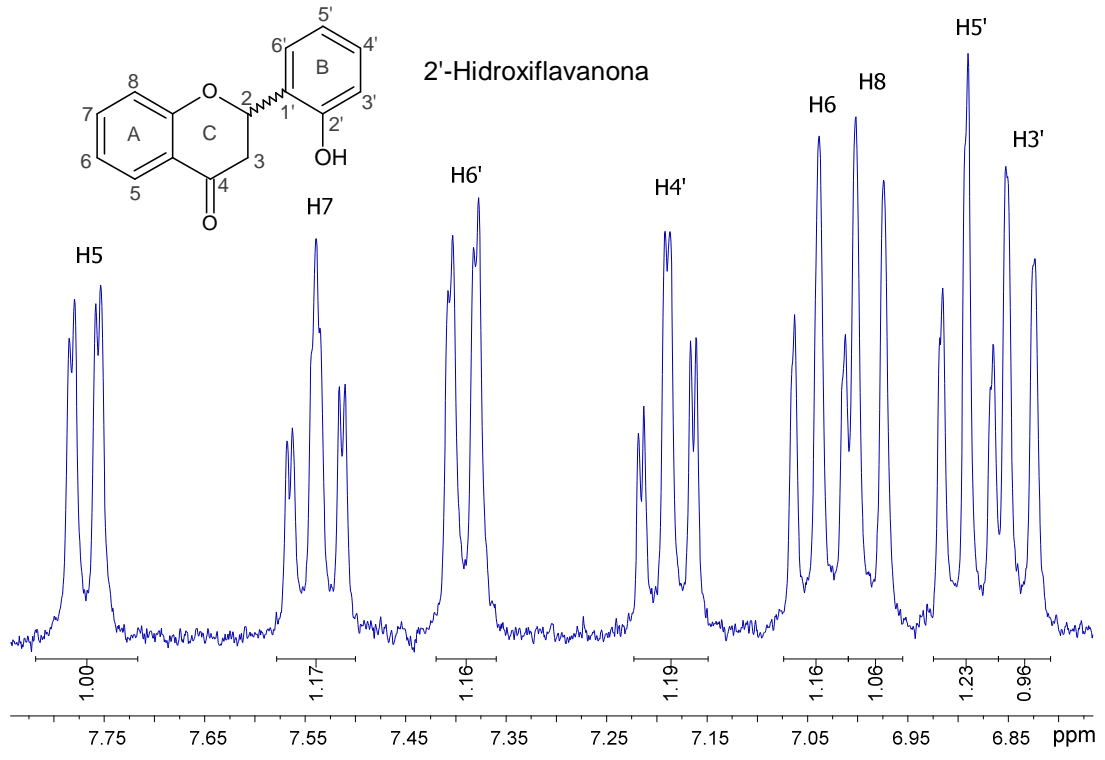
Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (J) en Hz de 4'OHFL.

2'-HIDROXIFLAVANONA



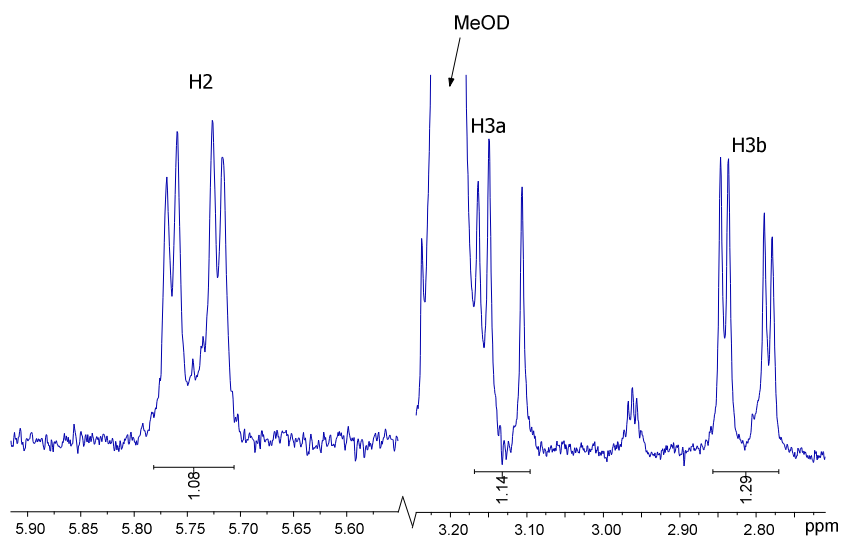
Espectro 3.9

Espectro $^1\text{H-RMN}$ de 2'-OHFL. En la parte inferior del espectro se muestra la integración de cada señal.



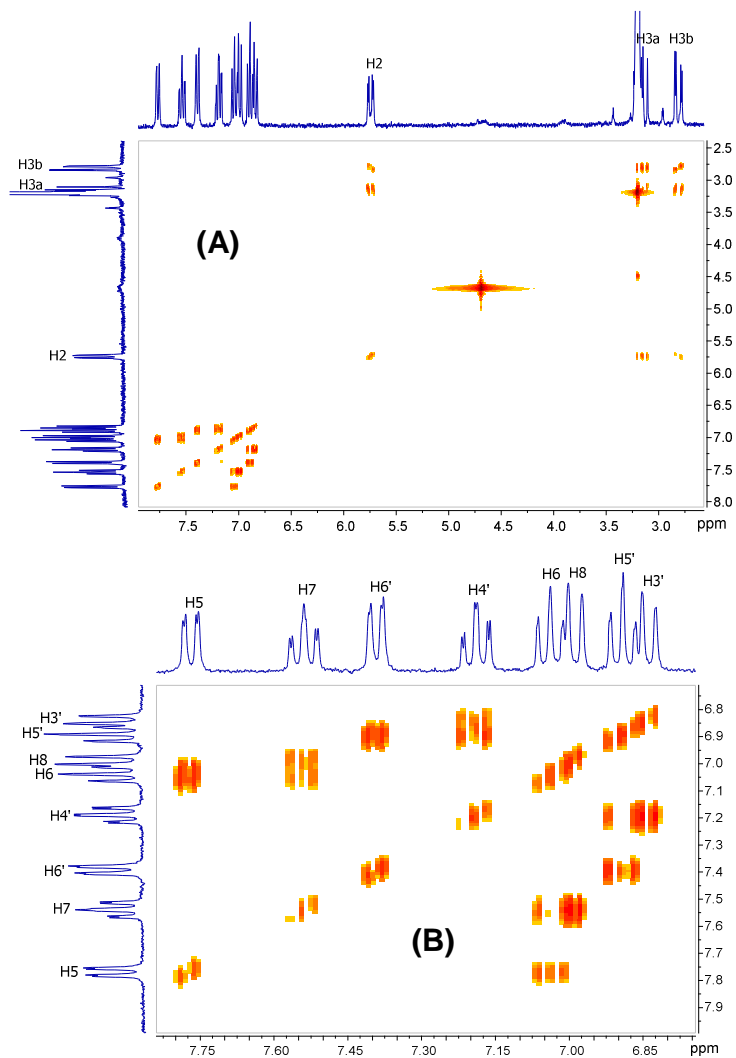
Espectro 3.10

Zona aromática del espectro $^1\text{H-RMN}$ de 2'OHFL. En la parte inferior se muestra la integración de cada señal.



Espectro 3.11

Zona alifática del espectro $^1\text{H-RMN}$ de 2'OHFL. Bajo el espectro, se muestra la integración de cada señal.



Espectro 3.12

Espectro COSY de 2'OHFL. (A) espectro COSY completo. (B) Zona aromática.

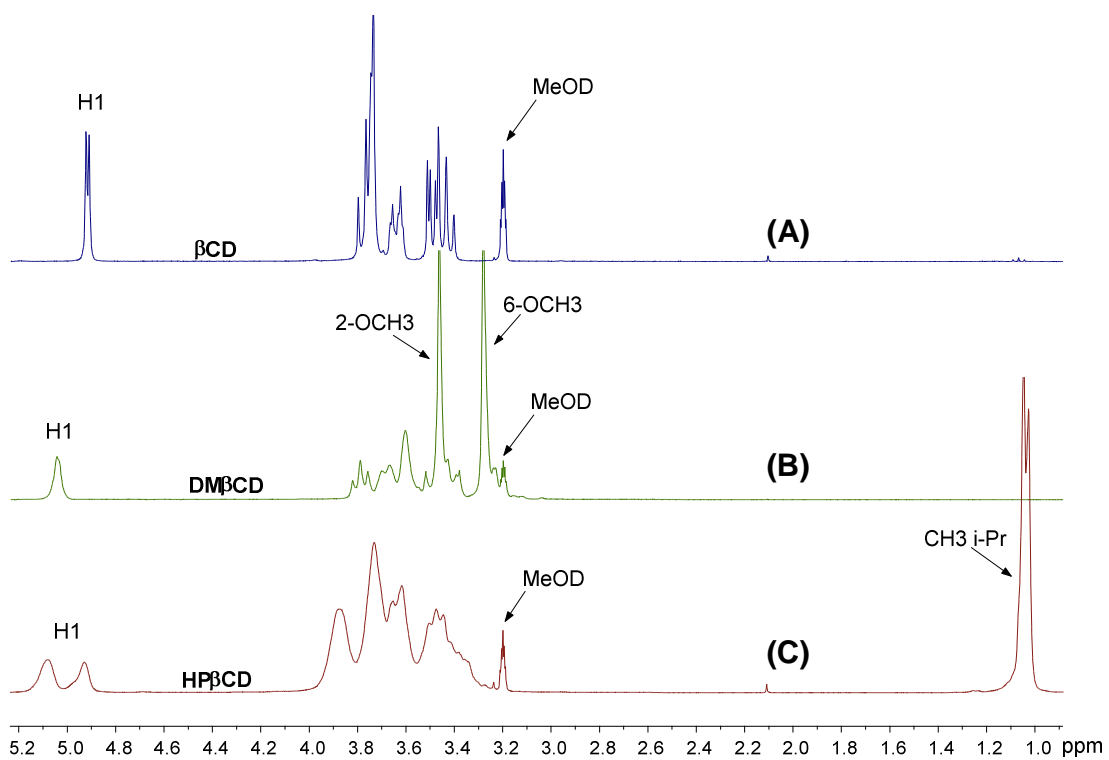
Protón	H2	H3a	H3b	H5	H6	H7	H8	H3'	H4'	H5'	H6'
δ / ppm	5.74	3.16	2.81	7.77	7.04	7.54	6.99	6.84	7.19	6.89	7.39
Mult.	dd	dd	dd	dd	dt	dt	dd	dd	dt	dt	dd
J / Hz	2.9	12.9	2.9	1.4	0.9	1.4	----	0.8	1.5	0.8	1.5
	12.9	17.3	17.3	8.0	7.6	7.7	8.4	8.0	7.8	7.6	7.7

Tabla 3.3

Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad y constantes de acoplamiento (J) en Hz de 2'OHFL.

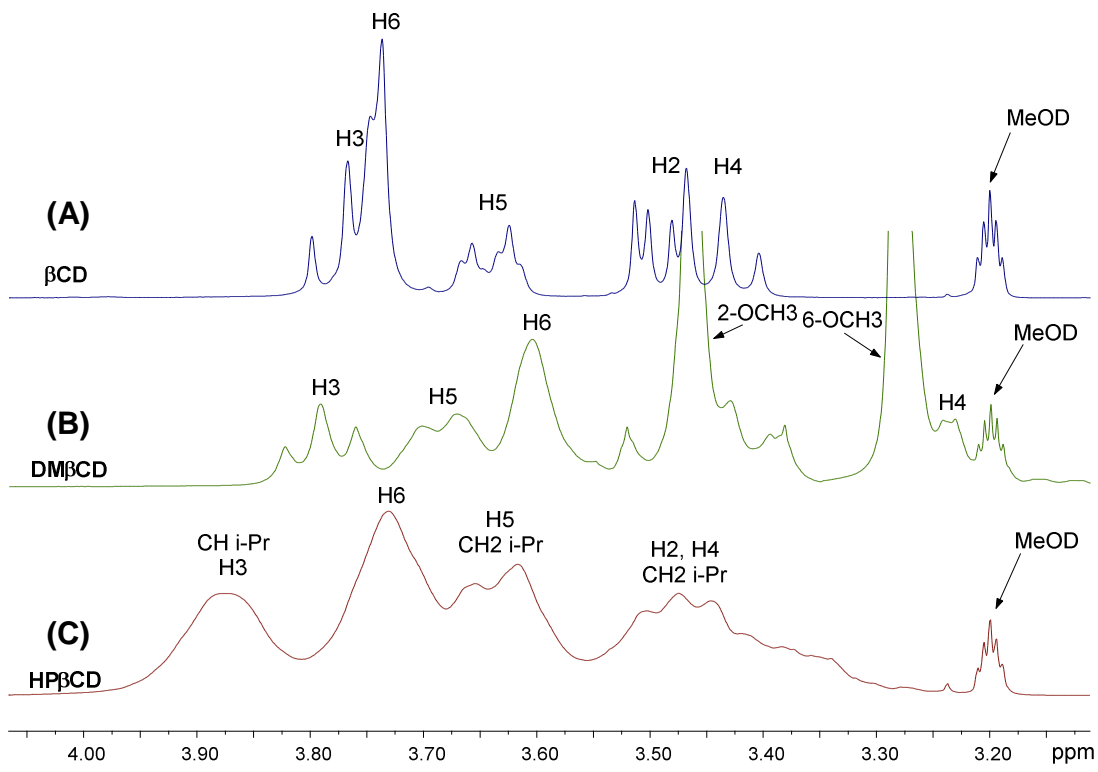
3.1.1.2 Caracterización de ciclodextrinas

La caracterización de las ciclodextrinas fue realizada adquiriendo los espectros ^1H -RMN y HSQC, y asignando los desplazamientos químicos a cada protón. A continuación muestran los espectros adquiridos (Espectros 3.13 y 3.14) donde se indican las señales a las que corresponde cada hidrógeno.



Espectro 3.13

Espectros ^1H -RMN de ciclodextrinas. (A) espectro de βCD , (B) espectro de $\text{DM}\beta\text{CD}$ y (C) espectro de $\text{HP}\beta\text{CD}$.



Espectro 3.14

Zona alifática de espectros ^1H -RMN de ciclodextrinas. (A) espectro de βCD , (B) espectro de $\text{DM}\beta\text{CD}$ y (C) espectro de $\text{HP}\beta\text{CD}$.

Para una mejor visualización de la posición de los hidrógenos en las ciclodextrinas, en la Figura 3.1 se muestra un esquema simplificado de ellas.

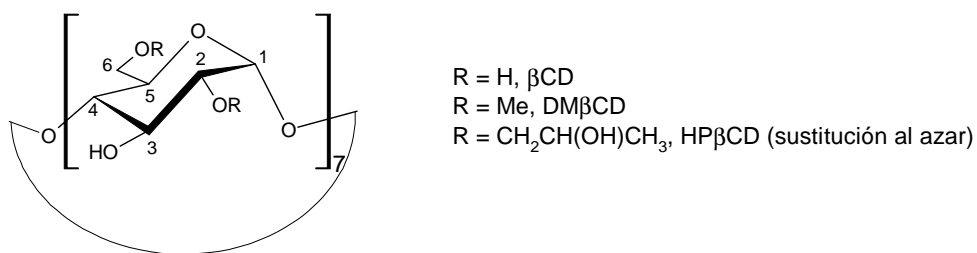


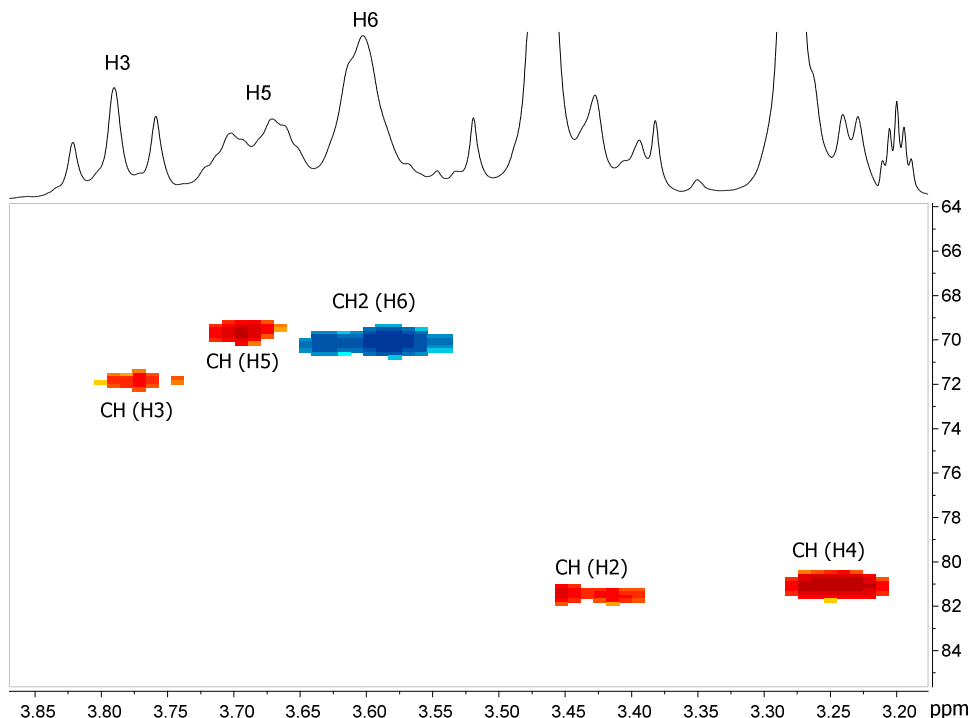
Figura 3.1

Esquema simplificado de ciclodextrinas, βCD , $\text{DM}\beta\text{CD}$ y $\text{HP}\beta\text{CD}$.

Como se menciona en la Figura 3.1, la $\text{HP}\beta\text{CD}$ está sustituida al azar. La $\text{HP}\beta\text{CD}$ usada en este trabajo corresponde a la de mayor sustitución, en la cual

existirían siete grupos hidroxipropilo por unidad de β ciclodextrina. En el Espectro 3.13C, se observan dos desplazamientos químicos para el hidrógeno H1, esto sería consecuencia de que existe sustitución en diferentes posiciones. Debido a lo anterior, las señales correspondientes al grupo hidroxipropilo no son usadas para posteriores conclusiones acerca de las geometrías de inclusión.

Para la correcta asignación de los espectros ^1H -RMN de las ciclodextrinas, se adquirieron espectros HSQC-ed. Estos espectros muestran en fase opuesta la señal de los grupos CH_2 , y por lo tanto son identificables del resto de los grupos (CH_3 y CH). Debido a que el hidrógeno H6 de las CDs pertenece a un grupo metileno, CH_2 , estos son reconocibles del resto de las señales. Como ejemplo, a continuación se muestra el espectro HSQC-ed de la $\text{DM}\beta\text{CD}$ (Espectro. 3.15)



Espectro 3.15

Zona alifática del espectro HSQC-ed de $\text{DM}\beta\text{CD}$. En tono rojo se presentan los hidrógenos pertenecientes a los grupos CH , y en tono azul el grupo CH_2 .

Junto con la adquisición de los espectros HSQC-ed, los desplazamientos químicos de la mayoría de los hidrógenos de las ciclodextrinas fueron asignados. Estos son informados en la Tabla 3.4

Protón	H1	H2	H3	H4	H5	H6	O2Me	O6Me
β CD	4.92	3.49	3.77	3.22	3.64	3.74	----	----
DM β CD	5.04	----	3.79	----	3.69	3.61	3.46	3.28
HP β CD	5.08 4.93	----	3.87	----	3.64	3.73	----	----

Tabla 3.4

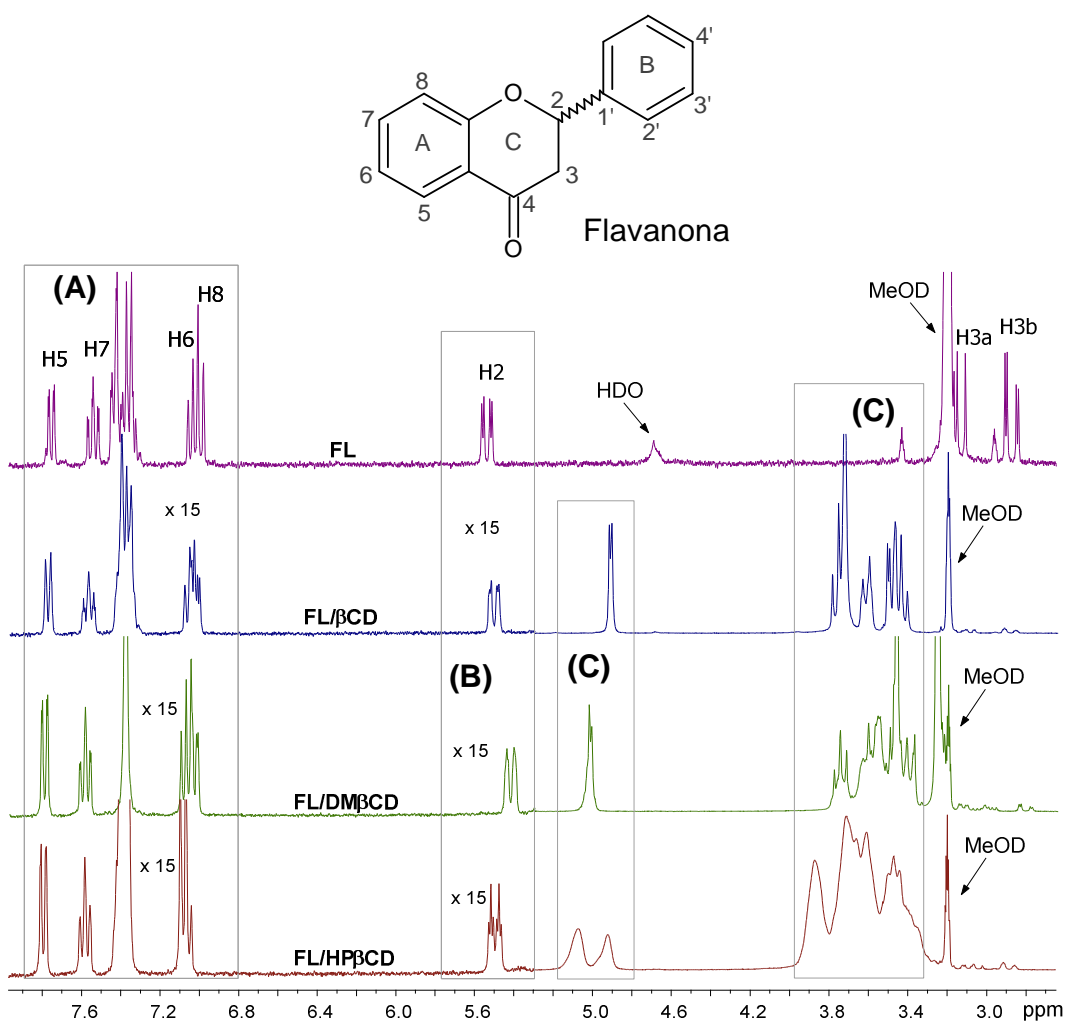
Desplazamientos químicos de CDs en ppm. Los desplazamientos químicos de los hidrógenos H2 y H4 de la DM β CD y HP β CD no se entregan, debido a que aparecen solapados con otras señales.

En la Tabla 3.4 el desplazamiento químico de los hidrógenos H2 y H4 de las ciclodextrinas DM β CD y HP β CD no aparece asignado, esto se debe a que las señales de estos hidrógenos aparecen solapadas con las señales de otros hidrógenos, lo que no permite la determinación de su desplazamiento químico.

3.1.1.3 Caracterización de complejos

La caracterización de los complejos de inclusión fue realizada adquiriendo los espectros ^1H -RMN, cuyos resultados se muestran a continuación.

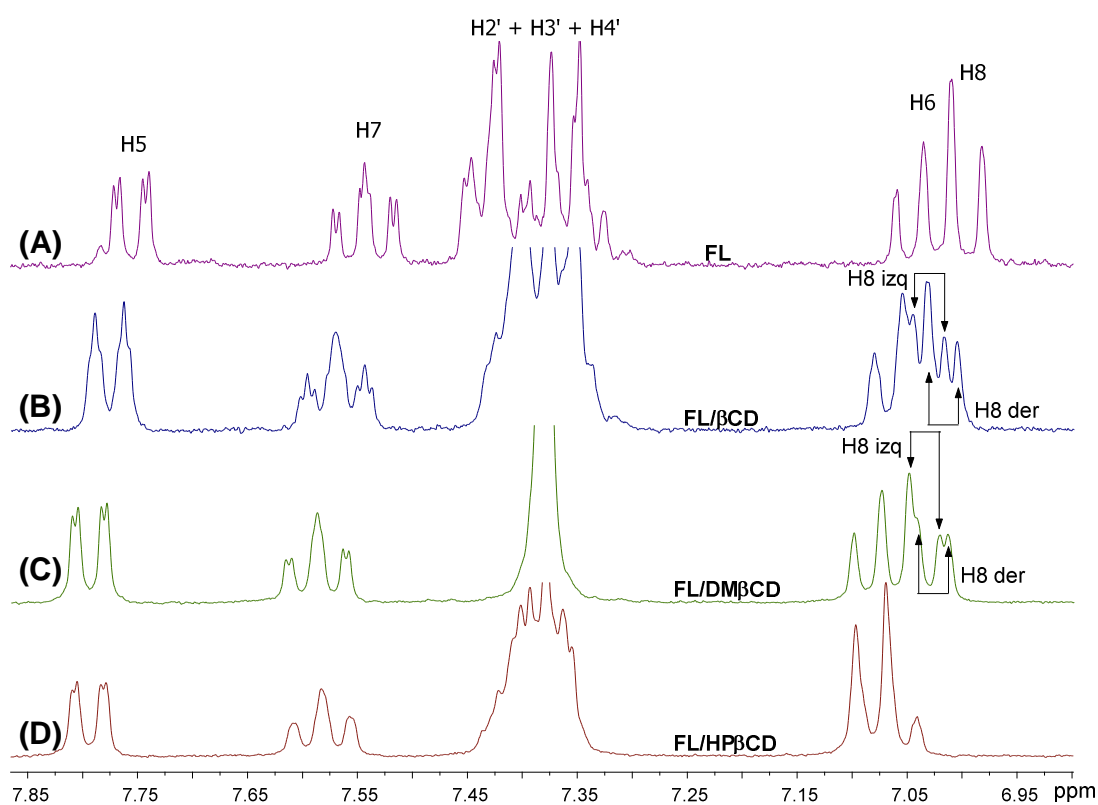
FLAVANONA/CICLODEXTRINAS



Espectro 3.16

Espectros ^1H -RMN de FL libre y formando complejos con las tres ciclodextrinas. El espectro superior corresponde al de la FL pura. Los espectros inferiores, FL/βCD, FL/DMβCD y FL/HPβCD son aquellos adquiridos a los complejos de inclusión correspondientes. (A) Zona aromática de la FL. (B) Zona del hidrógeno H2 de la FL. (C) Zonas del espectro donde se localizan los hidrógenos de las ciclodextrinas. x15 denota que la zona del espectro está intensificada 15 veces con respecto a la zona de la CD. Complejos formados con 6mM de CD y concentración máxima de FL.

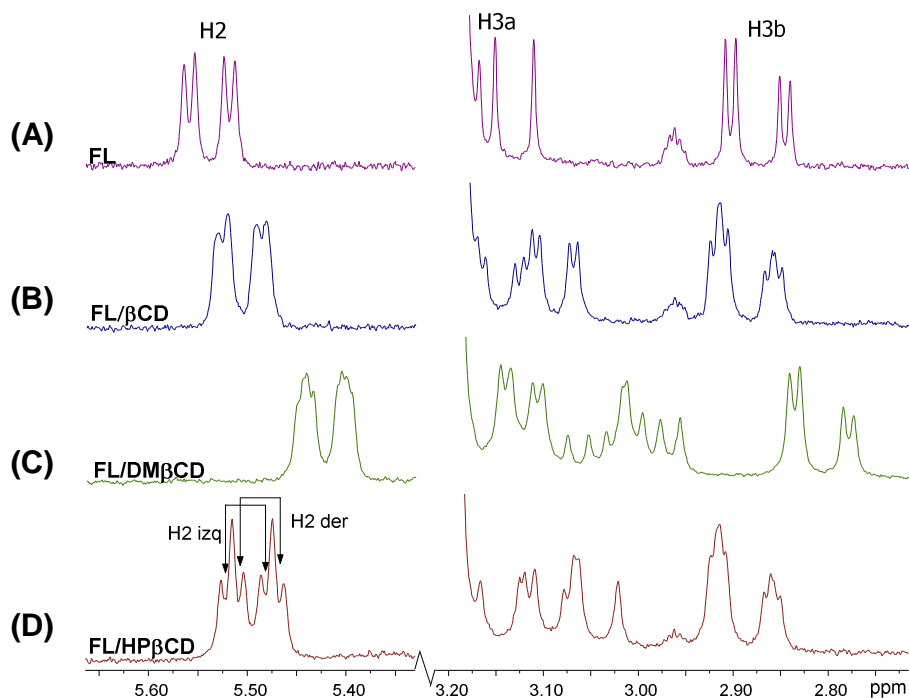
En los Espectros 3.16 se aprecia que las ciclodextrinas poseen desplazamientos químicos entre los 3.2 y 4.0ppm aproximadamente, además de una señal alrededor de 5.0ppm correspondiente a la señal del protón anomérico. Adicionalmente, y para todos los complejos formados, la FL presenta una señal alrededor de 5.5ppm, correspondiente al hidrógeno H2, además de las señales en la zona aromática (7 – 8 ppm). Por lo anterior, las señales de las CDs y FL no se solapan, lo que permite el uso de la mayoría de las señales de ésta última para la determinación de las características de los complejos, como la estequiometría y K_a . En el Espectro 3.17 se muestra la zona aromática de los espectros ^1H -RMN de los complejos FL/CDs.



Espectro 3.17

Zona aromática de los espectros ^1H -RMN de la FL libre y formando complejos con las CDs. (A) FL libre. (B) Complejo FL/ β CD. (C) Complejo FL/DM β CD. (D) Complejo FL/HP β CD. $\text{H2}' + \text{H3}' + \text{H4}'$ indica que el desplazamiento químico de cada hidrogeno no está asignado ya que las señales se solapan unas con otras.

En la zona aromática de los espectros ^1H -RMN de los complejos FL/CDs (Espectros 3.17B, 3.17C, 3.17D), se observa que hay variaciones en los desplazamientos químicos de todas las señales de la FL con respecto a la misma pura (Espectro 3.19A), indicando la inclusión de la FL en las ciclodextrinas. Por otra parte, para los complejos FL/ β CD y FL/DM β CD (Espectros 3.17B y 3.17C), el hidrógeno H8 de la FL presenta diferenciación enantiomérica, esto es, diferentes desplazamientos químicos para cada enantiómero cuando este forma parte del complejo (diastereoisómero). En el espectro ^1H -RMN de la FL pura (Espectro 3.17A) este hidrógeno se observa como un doblete, que al incluirse en la β CD y DM β CD presenta diferentes desplazamientos químicos para cada diastereoisómero, pero que aparecen solapados y entrecruzados como se ilustra dentro de los mismos espectros. Como nomenclatura para este protón, las señales que aparecen a la izquierda del espectro ($\text{H}_{8_{\text{izq}}}$) pertenecerán al enantiómero de la izquierda, y las que aparecen a la derecha ($\text{H}_{8_{\text{der}}}$) pertenecerán al enantiómero de la derecha. Con lo anterior, serán los hidrógenos H8 los usados para la determinación de la estequiometría y K_a al usar las ciclodextrinas β CD y DM β CD. Para los complejos FL/HP β CD, es el hidrógeno H2 de la FL el que presenta diferenciación enantiomérica. Esto se observa a continuación en el Espectro 3.18D.

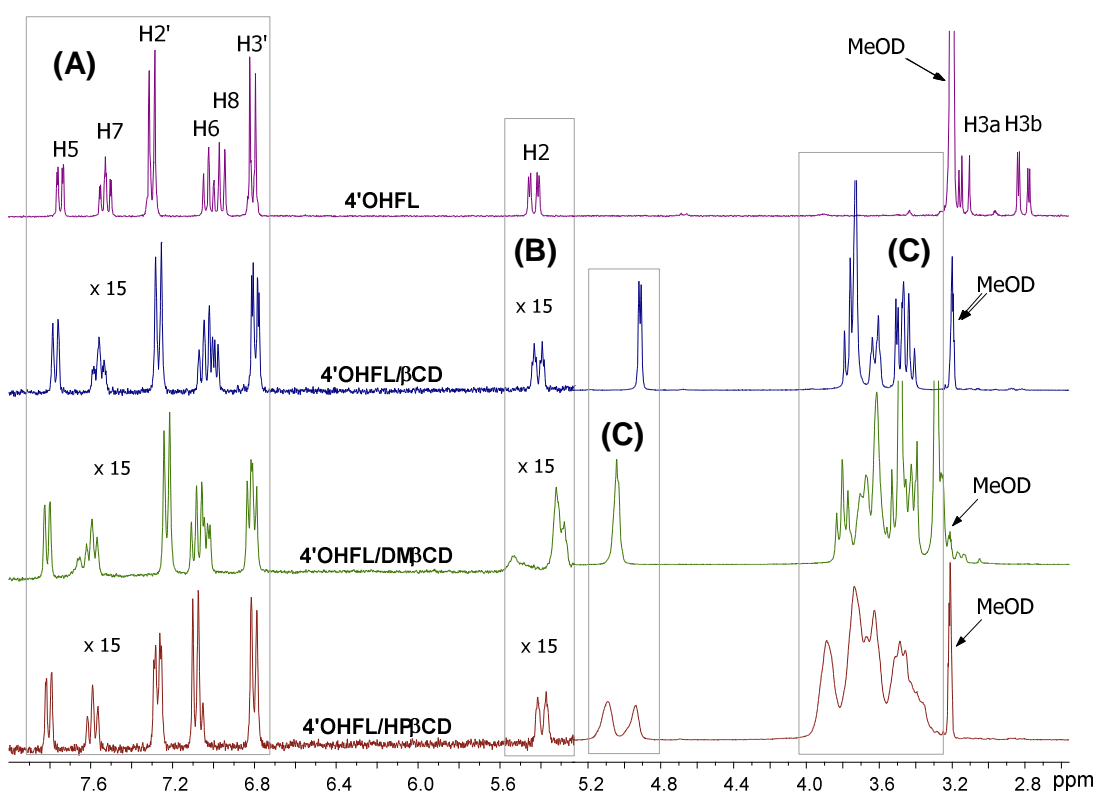
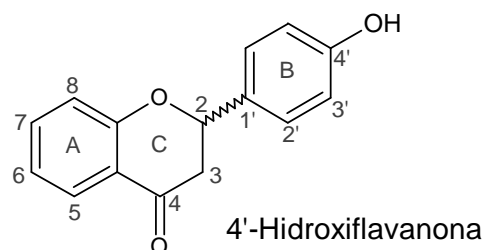


Espectro 3.18

Espectros ¹H-RMN de FL libre y formando complejos con CDs en la zona de los hidrógenos H2, H3a y H3b. (A) FL libre. (B) Complejo FL/βCD. (C) Complejo FL/DMβCD. (D) Complejo FL/HPβCD.

En el espectro ¹H-RMN de la FL pura el hidrógeno H2 es un doblete (Espectro 3.18A), y su diferenciación al formar los complejos con la HPβCD surge como se muestra en el Espectro 3.18D, donde se observa que las señales de cada diastereoisómero se solapan y entrecruzan. De igual manera que para los complejos anteriores, para el complejo FL/HPβCD, las señales que aparecen a la izquierda del espectro (H2_{izq}) pertenecerán al enantiómero de la izquierda, y las que aparecen a la derecha (H2_{der}) pertenecerán al enantiómero de la derecha. De esta manera, para el complejo FL/HPβCD serán los hidrógenos H2 los usados para la determinación de la estequiometría y *K_a*.

4'-HIDROXIFLAVANONA/CICLODEXTRINAS

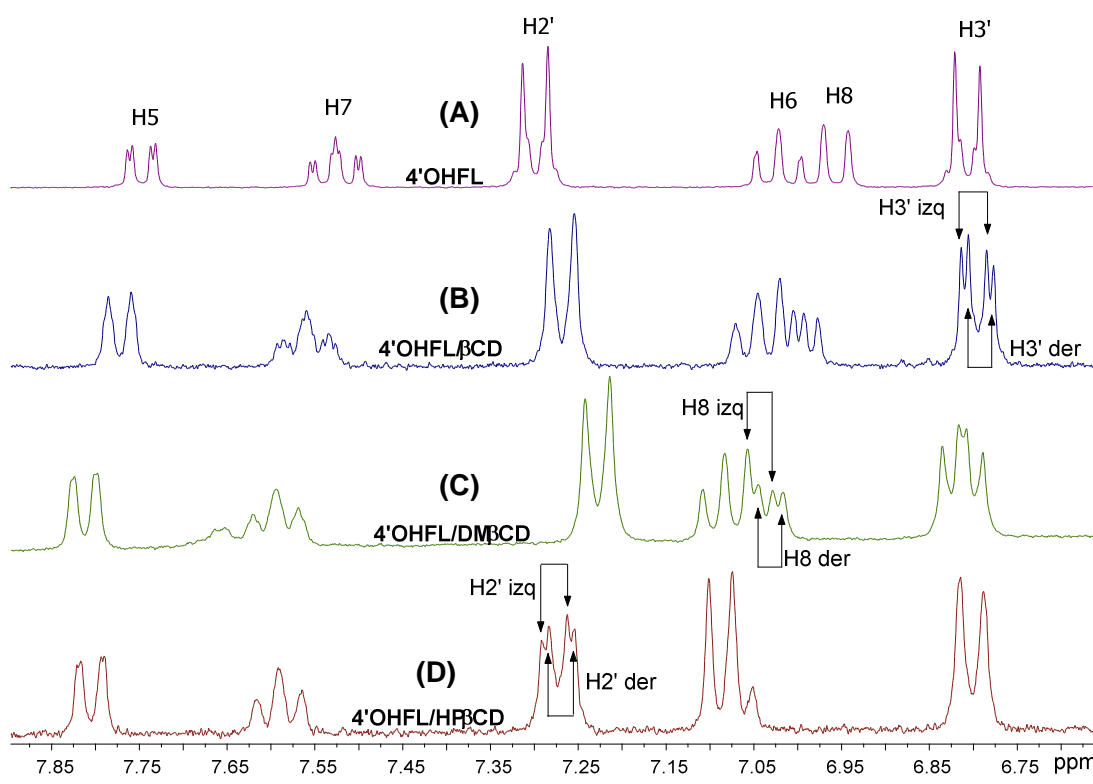


Espectro 3.19

Espectros ^1H -RMN de 4'-OHFL libre y formando complejos con las tres ciclodextrinas. El espectro superior corresponde al de la 4'-OHFL pura. Los espectros inferiores, 4'-OHFL/ β CD, 4'-OHFL/DM β CD y 4'-OHFL/HP β CD son aquellos adquiridos a los complejos de inclusión correspondientes. (A) Zona aromática de la 4'-OHFL. (B) Zona del hidrógeno H2 de la 4'-OHFL. (C) Zonas del espectro donde se localizan las ciclodextrinas. x15 denota que la zona del espectro está intensificada 15 veces con respecto a la zona de la CD. Complejos formados con 6mM de CD y concentración máxima de 4'-OHFL.

De manera similar al análisis realizado para los complejos formados con la FL, en los espectros ^1H -RMN de los complejos 4'-OHFL/CDs (Espectro 3.19B,

3.19C y 3.19D) se puede observar que las señales de las ciclodextrinas se encuentran en una zona del espectro que permite el uso de los hidrógenos aromáticos de la 4'OHFL para la determinación de la estequiometría y K_a . En el Espectro 3.20 se muestra la zona aromática de los espectros ^1H -RMN de los complejos 4'OHFL/CDs.



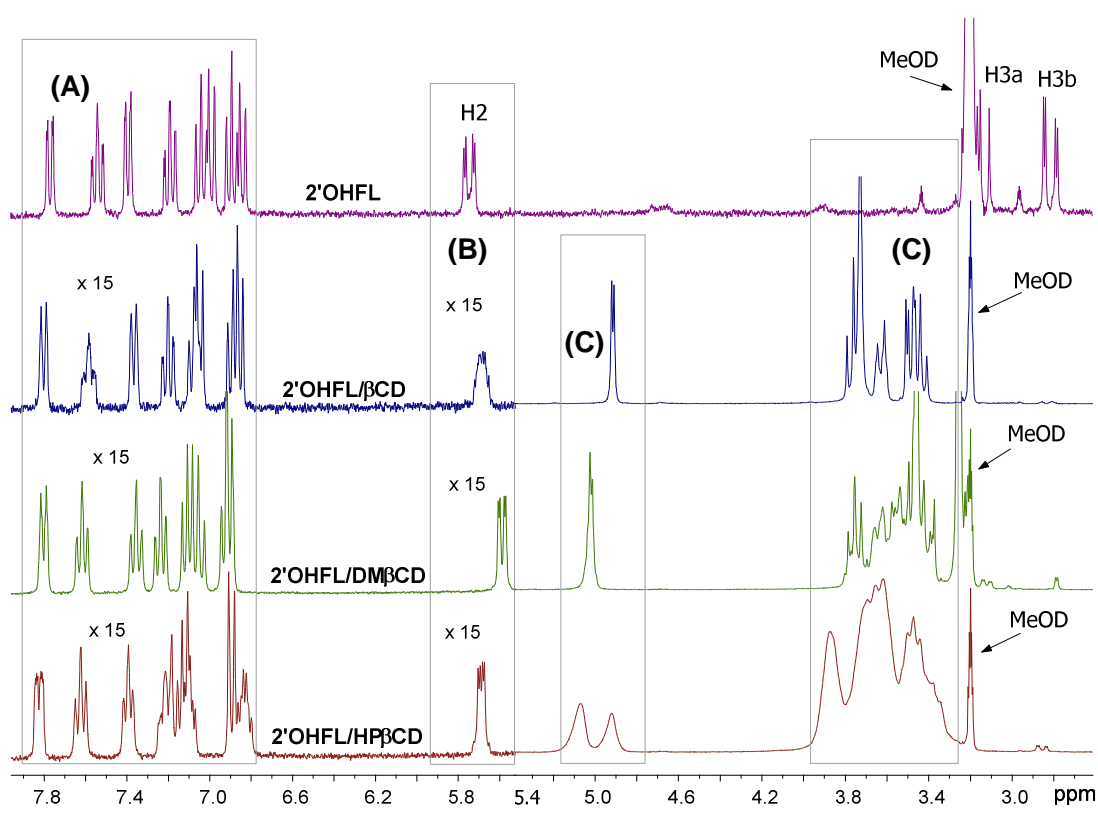
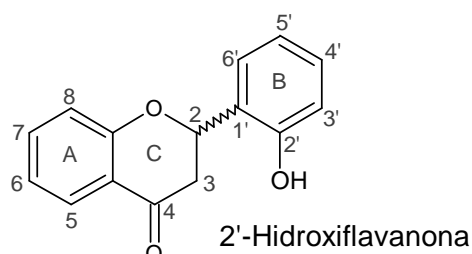
Espectro 3.20

Zona aromática de los espectros ^1H -RMN de la 4'OHFL libre y formando complejos con las CDs. (A) 4'OHFL libre. (B) Complejo 4'OHFL/ β CD. (C) Complejo 4'OHFL/DM β CD. (D) Complejo 4'OHFL/HP β CD.

En los Espectros 3.20B, 3.20C y 3.20D se observa que las señales aromáticas de la 4'OHFL presentan variaciones en sus desplazamientos químicos, respecto a la misma pura (Espectro 3.20A), indicando la inclusión de la 4'OHFL en las ciclodextrinas. En los complejos 4'OHFL/ β CD y 4'OHFL/DM β CD (Espectro 3.20B y 3.20C), se observa que tanto el hidrógeno H3' como el H8 de la 4'OHFL presentan

diferenciación enantiomérica. Por otra parte, en los complejos 4'OHFL/HP β CD es solo el hidrógeno H2' de la 4'OHFL (Espectro 3.20D) el que presenta diferenciación, y por lo tanto la señal usada para determinar la estequiometría y K_a de cada complejo diastereoisomérico. Debido a sus mayores diferencias de desplazamiento químico, en los complejos 4'OHFL/ β CD y 4'OHFL/DM β CD se usaron los hidrógenos H3' y H8 de la 4'OHFL, respectivamente, para determinar la estequiometría y K_a de cada complejo.

2'-HIDROXIFLAVANONA/CICLODEXTRINAS

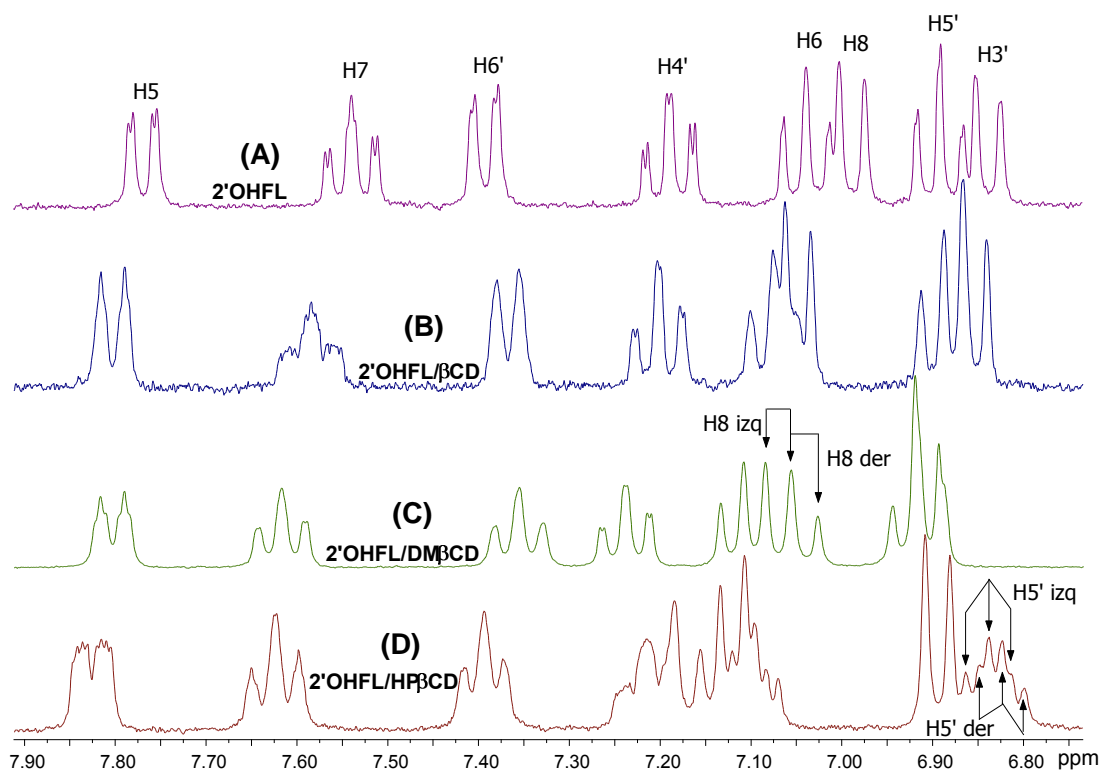


Espectro 3.21

Espectros ^1H -RMN de 2'-OHFL libre y formando complejos con las tres ciclodextrinas. El espectro superior corresponde al de la 2'-OHFL pura. Los espectros inferiores, 2'-OHFL/ β CD, 2'-OHFL/DM β CD y 2'-OHFL/HP β CD son aquellos adquiridos a los complejos de inclusión correspondientes. (A) Zona aromática de la 2'-OHFL. (B) Zona del hidrógeno H2 de la 2'-OHFL. (C) Zonas del espectro donde se localizan las ciclodextrinas. x15 significa que la zona del espectro está intensificada 15 veces con respecto a la zona de la CD. Complejos formados con 6mM de CD y concentración máxima de 2'-OHFL.

Haciendo el mismo análisis que para los complejos anteriores, en el Espectro 3.21 se observa que los hidrógenos aromáticos de la 2'-OHFL pueden ser

usados para la determinación de la estequiometría y K_a , debido a que no se solapan con las señales de las CDs. A continuación (Espectro 3.22) se muestra la zona aromática de los espectros ^1H -RMN de los complejos.



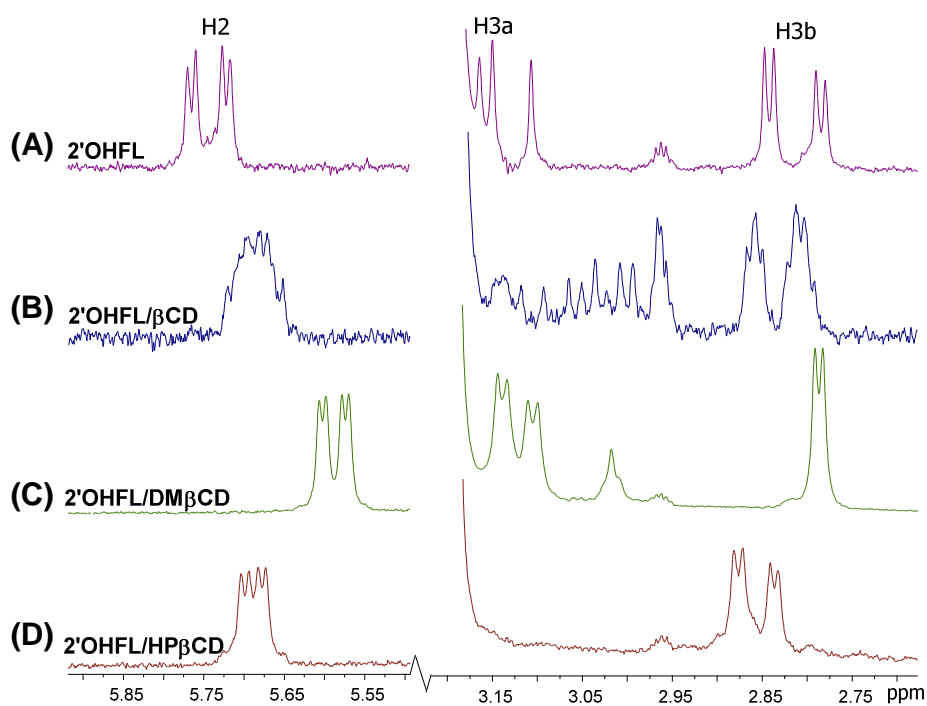
Espectro 3.22

Zona aromática de los espectros ^1H -RMN de la 2'OHFL libre y formando complejos con las CDs. (A) 2'OHFL libre. (B) Complejo 2'OHFL/ β CD. (C) Complejo 2'OHFL/DM β CD. (D) Complejo 2'OHFL/HP β CD.

En los Espectros 3.22B, 3.22C y 3.22D las señales aromáticas de los complejos formados por la 2'OHFL se desplazan al compararse con las señales de la misma pura (Espectro 3.22A), confirmando la formación de los complejos. Por otra parte, en el Espectro 3.22B se aprecia que el complejo 2'OHFL/ β CD no posee hidrógenos con diferenciación enantiomérica, sin embargo, en los complejos restantes, 2'OHFL/DM β CD y 2'OHFL/HP β CD (Espectros 3.22C y 3.22D), si la hay. Para el

complejo 2'OHFL/DM β CD son dos los hidrógenos que se diferencian, el H6 y H8 de la 2'OHFL, mientras que en el complejo 2'OHFL/HP β CD son los hidrógenos H6 y H5' de la 2'OHFL. Debido a sus mayores diferencias de desplazamiento químico, en los complejos 2'OHFL/DM β CD y 2'OHFL/HP β CD se usaron los hidrógenos H8 y H5' de la 2'OHFL, respectivamente, para determinar la estequiometría y K_a de cada complejo diastereoisomérico.

En el Espectro 3.23 se muestra la zona alifática de los espectros ^1H -RMN de la 2'OHFL y de los complejos 2'OHFL/CDs.



Espectro 3.23

Espectros ^1H -RMN de 2'OHFL libre y formando complejos con CDs, en la zona de los hidrógenos H2, H3a y H3b. (A) FL libre. (B) Complejo 2'OHFL/ β CD. (C) Complejo 2'OHFL/DM β CD. (D) Complejo 2'OHFL/HP β CD.

En los Espectros 3.23C y 3.23D se destaca que los protones H2 y H3 de la 2'OHFL formando complejos con las ciclodextrinas derivatizadas presentan

cambios en las constantes de acoplamiento con respecto a la flavanona libre (Espectro 3.23A). Estas variaciones son tabuladas en la Tabla 3.5

Protón	H2	H3a	H3b
2'OHFL	2.7; 12.8	12.9; 17.3	3.0; 17.2
2'OHFL/DM β CD	2.5; 8.5	3.2; 10.2	2.6
2'OHFL/HP β CD	2.9; 6.3	-----	2.8; 11.9

Tabla 3.5

Constantes de acoplamiento (J / Hz) de hidrógenos H2, H3a y H3b de 2'OHFL libre y formando parte de los complejos. Nótese que se entregan dos constantes de acoplamiento por cada hidrógeno, esto se debe a que las señales corresponden a dobles-dobletes.

Se ha descrito que la magnitud de las constantes de acoplamiento está directamente relacionada con la magnitud del ángulo diedro de acuerdo a la ecuación de Karplus (Ec. 3.1),¹¹¹

$${}^3J = A \cdot \cos^2\theta + B \cdot \cos\theta + C \quad 3.1$$

Donde 3J corresponde a la constante de acoplamiento a tres enlaces, θ corresponde al ángulo diedro y los coeficientes A, B y C están tabulados para diferentes sistemas. Por ejemplo, la ecuación de Karplus para el ciclohexano es (Ec. 3.2),¹¹²

$${}^3J = 7.76 \cdot \cos^2\theta - 1.1 \cdot \cos\theta + 1.4 \quad 3.2$$

Al emplear la ecuación 3.2 considerando que los ángulos diedros en el ciclohexano pueden variar entre 180° y 120°, ¹¹³ se tendrá que las mayores 3J serán para el ángulo de 180° y las menores 3J estarán dadas para el ángulo de 120°. Si se asume que los coeficientes de la ecuación de Karplus para el ángulo diedro entre los hidrógenos H2 y H3 de las flavanonas podrían ser similares a los de la ecuación 3.2, entonces en estos sistemas las mayores 3J estarán dadas para ángulos cercanos a

180° y las menores para ángulos cercanos a 120°. Es to es ilustrado como proyecciones de Newman en la Figura 3.2

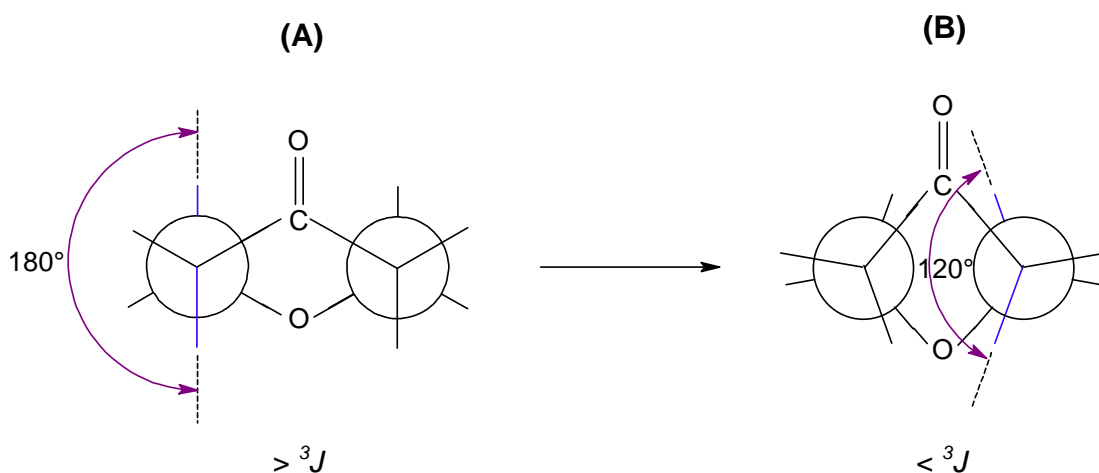


Figura 3.2

Proyecciones de Newman para la representación del cambio del ángulo diedro. (A) representa un ángulo de 180° entre los hidrógenos H2 y H3, don de $>^3J$ indica mayores constantes de acoplamiento. (B) representa un ángulo de 120° entre los hidrógenos H2 y H3, donde $<^3J$ indica menores constantes de acoplamiento.

Debido a que en la Tabla 3.5 las constantes de acoplamiento tienden a disminuir con la inclusión en la 2'OHFL en las CDs derivatizadas, entonces se podría inferir que las variaciones en sus 3J son producto de una disminución en el valor del ángulo diedro, lo que implicaría el acercamiento de los hidrógenos H2 y H3 entre sí.

3.1.2 Estequiometría de inclusión

La determinación de la estequiometría fue realizada graficando el inverso de la variación del desplazamiento químico observado, ($\Delta\delta_{\text{obs}}^{-1}$) vs. el inverso de la concentración de CD, $[\text{CD}]_0^{-1}$, de acuerdo a la ecuación 2.2. Los gráficos obtenidos se ilustran en las Figuras 3.3, 3.4 y 3.5.

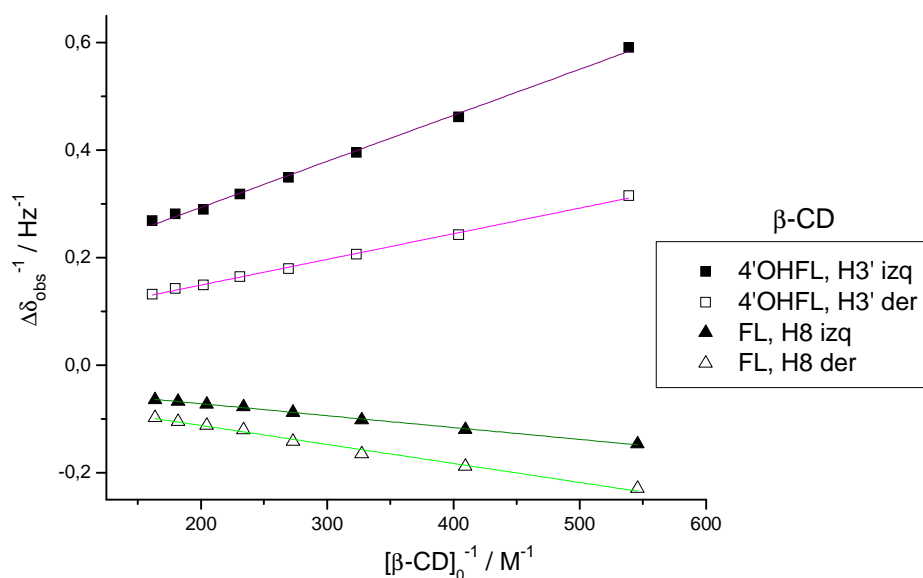


Figura 3.3

Gráficos de $\Delta\delta_{\text{obs}}^{-1}$ vs. $[\beta\text{CD}]_0^{-1}$ de las flavanonas 4'OHFL y FL. ■ y □ corresponden a los hidrógenos $\text{H3}'_{\text{izq}}$ y $\text{H3}'_{\text{der}}$ de la 4'OHFL, respectivamente, y ▲ y △ corresponden a los hidrógenos H8_{izq} y H8_{der} de la FL, respectivamente. Las líneas en color corresponden a las regresiones lineales realizadas.

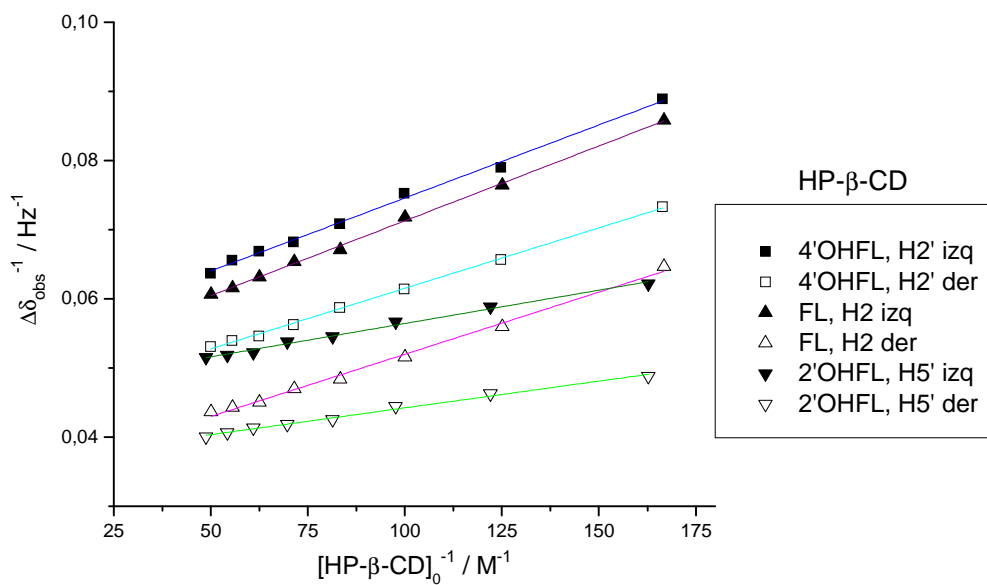


Figura 3.4

Gráficos de $\Delta\delta_{obs}^{-1}$ vs. $[HP\beta CD]_0^{-1}$ de las flavanonas 4'OHFL, FL y 2'OHFL. ■ y □ corresponden a los hidrógenos H2' izq y H2' der de la 4'OHFL, respectivamente, ▲ y △ corresponden a los hidrógenos H2 izq y H2 der de la FL, respectivamente y ▼ y ▽ corresponden a los hidrógenos H5' izq y H5' der de la 2'OHFL, respectivamente. Las líneas en color corresponden a las regresiones lineales realizadas.

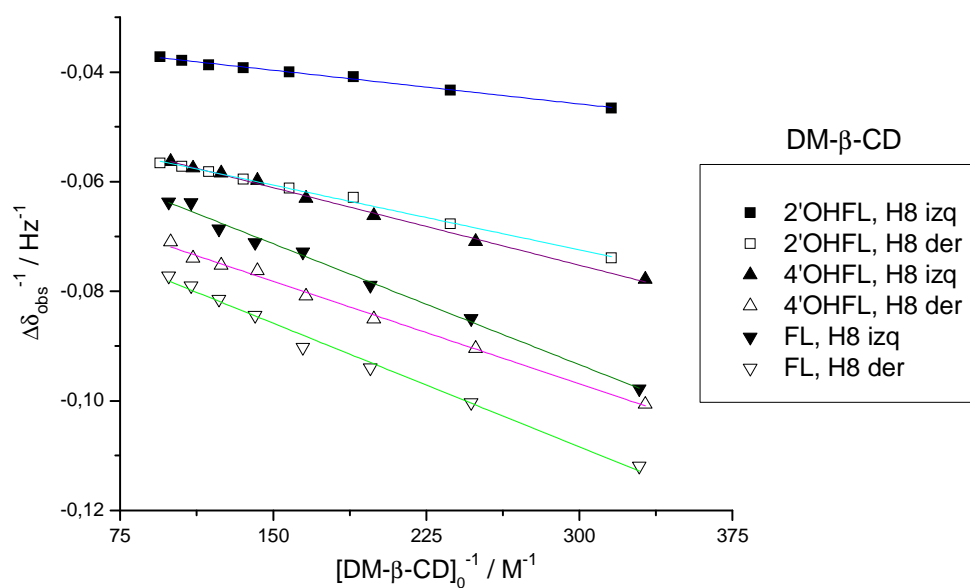


Figura 3.5

Gráficos de $\Delta\delta_{\text{obs}}^{-1}$ vs. $[\text{DM}\beta\text{CD}]_0^{-1}$ de las flavanonas 2'OHFL, 4'OHFL y FL. ■ y □ corresponden a los hidrógenos $\text{H}\delta_{\text{izq}}$ y $\text{H}\delta_{\text{der}}$ de la 2'OHFL, respectivamente, ▲ y △ corresponden a los hidrógenos $\text{H}\delta_{\text{izq}}$ y $\text{H}\delta_{\text{der}}$ de la 4'OHFL, respectivamente y ▼ y ▽ corresponden a los hidrógenos $\text{H}\delta_{\text{izq}}$ y $\text{H}\delta_{\text{der}}$ de la FL, respectivamente. Las líneas en color corresponden a las regresiones lineales realizadas.

Debido a la tendencia lineal encontrada en los gráficos de las Figuras 3.3, 3.4 y 3.5, se determinó que la estequiometría de inclusión de cada complejo diastereoisomérico es 1:1, lo que significa que estos complejos están formados por una molécula de flavanona y una molécula de ciclodextrina (Fig. 3.6). Lo anterior se deriva de la ecuación 2.2, que da cuenta del coeficiente estequiométrico de estas especies.

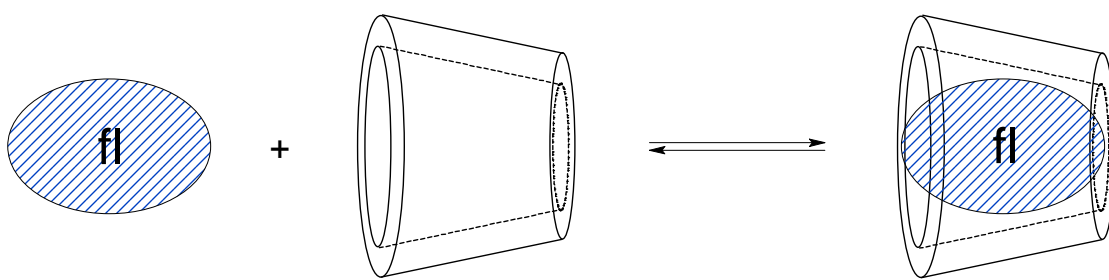


Figura 3.6
Representación esquemática de estequiometría 1:1 de flavanona y CD.

Cabe destacar que además se graficó $\Delta\delta_{\text{obs}}^{-1}$ en función de los inversos de las concentraciones de CDs elevados a -2, -3 y -4, ($[\text{CD}]_0^{-2}$, $[\text{CD}]_0^{-3}$, $[\text{CD}]_0^{-4}$) con el objetivo de descartar errores en los coeficientes estequiométricos ya determinados. Como resultado se encontró, para todos los casos, gráficos de tendencia exponencial, lo que corrobora la estequiometría 1:1 de cada complejo. Esto es ejemplificado con los resultados obtenidos para el enantiómero de la izquierda del complejo 4'OHFL/HP β CD (Fig. 3.7).

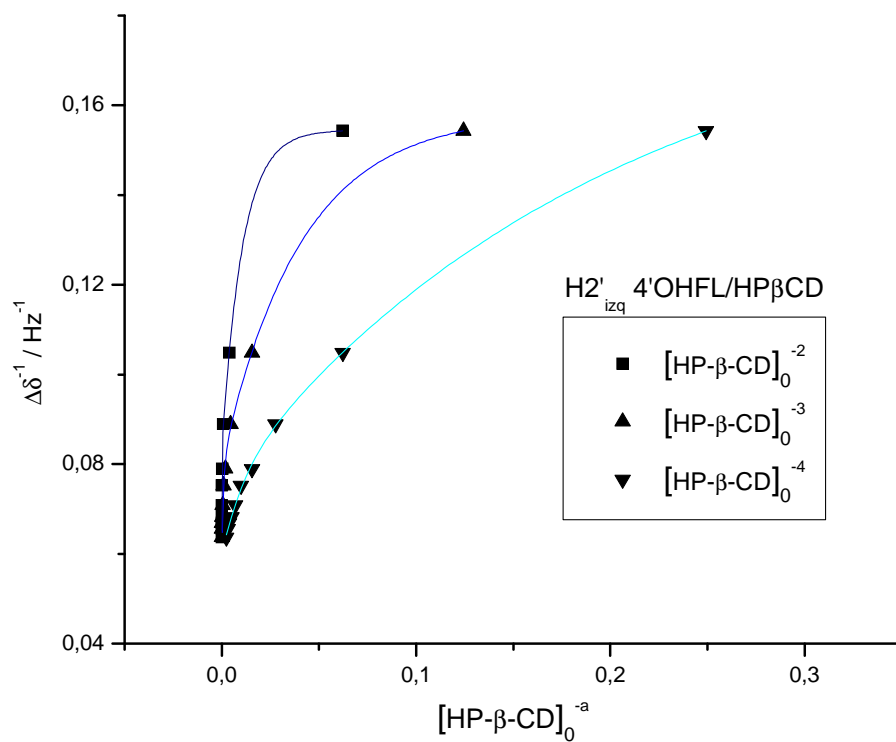
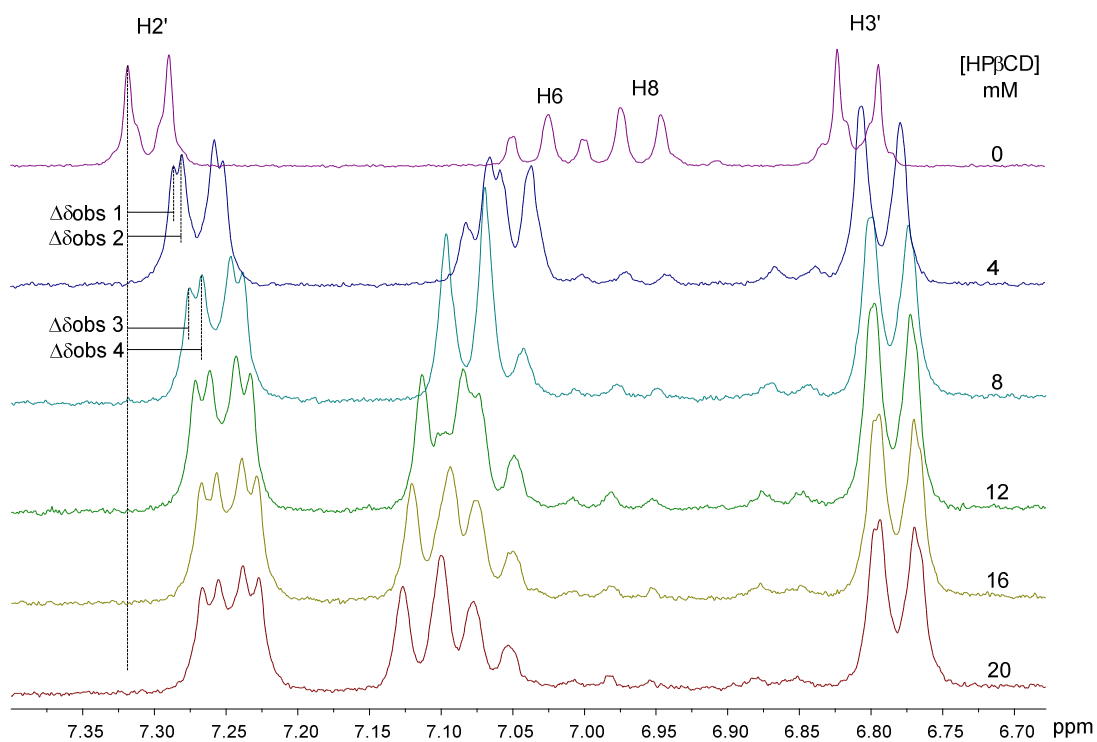


Figura 3.7
 Esquema de las tendencias exponenciales encontradas al graficar $\Delta\delta_{obs}^{-1}$ en función de $[\text{CD}]_0^{-2}$, $[\text{CD}]_0^{-3}$, $[\text{CD}]_0^{-4}$.

3.1.3 Constantes de asociación

Las constantes de asociación a 25, 30 y 35°C fueron determinadas graficando la variación de desplazamiento químico observado, $\Delta\delta_{\text{obs}}$, vs. la concentración de CD, $[\text{CD}]_0$, donde $\Delta\delta_{\text{obs}}$ fue obtenida de los espectros ^1H -RMN adquiridos a complejos formados con igual concentración de flavanona y variando progresivamente la concentración de CD, como se ejemplifica para el complejo 4'OHFL/HP β CD en el Espectro 3.24



Espectro 3.24

Zona aromática de espectros ^1H -RMN de 4'OHFL libre (espectro superior) y formando complejos con diferentes concentraciones de HP β CD (mM). $\Delta\delta_{\text{obs1}}$ y $\Delta\delta_{\text{obs3}}$ son las diferencias de desplazamiento químico observado para el enantiómero de la izquierda, y $\Delta\delta_{\text{obs2}}$ y $\Delta\delta_{\text{obs4}}$ son las diferencias de desplazamiento químico observado para el enantiómero de la derecha.

De igual manera que en el Espectro 3.24 se obtuvieron los datos para todos los complejos, los que fueron iterados a la ecuación 2.23 cuyos parámetros

iniciales fueron obtenidos por el método de Benesi-Hildebrand, de donde se obtuvieron los valores aproximados de K_a y $\Delta\delta_c$, como se ejemplifica en el gráfico de la Figura 3.8.

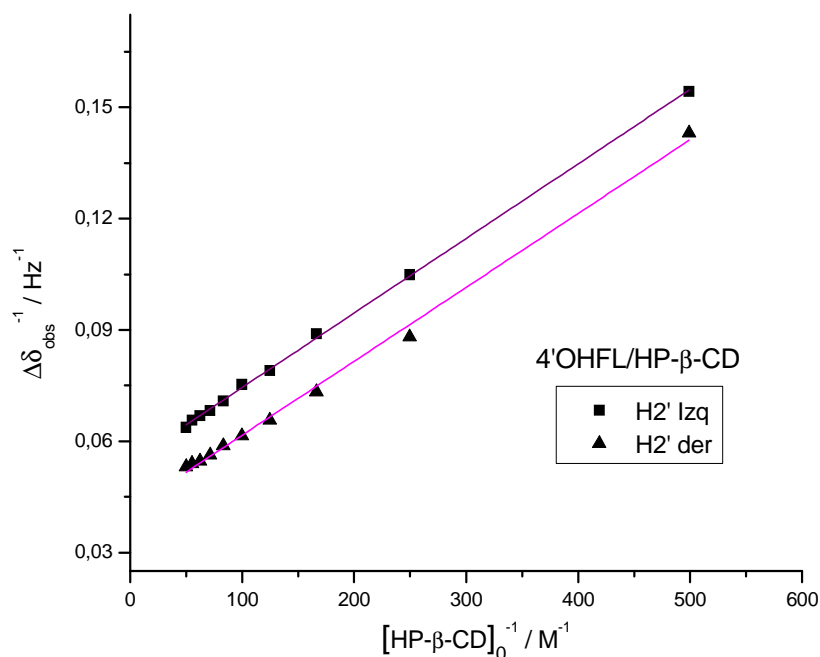


Figura 3.8
Ejemplo de método de Benesi-Hildebrand para la determinación de K_a y $\Delta\delta_c$ aproximados para complejos formados por 4'OHFL/HPβCD.

Para todos los complejos formados, los gráficos de Benesi-Hildebrand son similares a los ilustrados en la Figura 3.8, cuyos valores de R fueron en todos los casos iguales o mayores a 0.99. De la pendiente e intercepto de las regresiones lineales se obtuvieron valores aproximados de K_a y $\Delta\delta_c$, respectivamente, los que resultaron tener valores de alrededor de 500M^{-1} para K_a y 20Hz para $\Delta\delta_c$. Estos valores fueron utilizados para iniciar las iteraciones de la ecuación 2.23.

En los gráficos de la Figura 3.9 se muestran, de manera representativa, los ajustes no lineales de la variación de $\Delta\delta_{\text{obs}}$ con la variación de la

concentración de HP β CD para los complejos formados con ambos enantiómeros de la 4'OHFL a 25°C, a partir de los cuales se determinan las K_a finales para cada complejo.

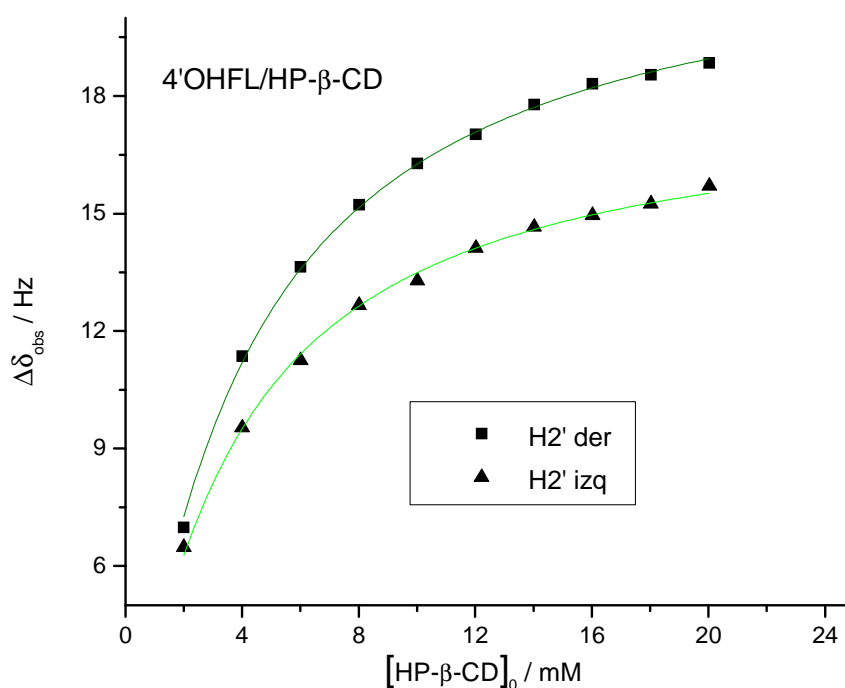


Figura 3.9

Gráfico de $\Delta\delta_{obs}$ vs. $[\text{HP}\beta\text{CD}]_0$ a 25°C de 4'OHFL/HP β CD para la determinación de constantes de asociación. Las líneas corresponden a los ajustes no lineales.

A todas las temperaturas usadas, los gráficos para todos los complejos son similares a los ilustrados anteriormente (Fig. 3.9). En las Tablas 3.6, 3.7 y 3.8 se presentan los valores de K_a y razón entre constantes de asociación (K_a^1/K_a^2), para todos los complejos.

FLAVANONA/CICLODEXTRINAS

Complejo		Flavanona/ β -ciclodextrina		
Protón	H8 _{Izq}	H8 _{Der}	Ka ^{H8der} /Ka ^{H8izq}	
T / °C	Ka x10 ² / M ⁻¹	Ka x10 ² / M ⁻¹		
25	1.84 ± 0.20	2.22 ± 0.30	1.204	
30	0.96 ± 0.10	1.44 ± 0.20	1.504	
35	0.49 ± 0.10	0.99 ± 0.10	2.021	
Complejo		Flavanona/HP- β -ciclodextrina		
Protón	H2 _{Izq}	H2 _{Der}	Ka ^{H2der} /Ka ^{H2izq}	
T / °C	Ka x10 ² / M ⁻¹	Ka x10 ² / M ⁻¹		
25	2.51 ± 0.08	2.40 ± 0.08	0.956	
30	1.72 ± 0.10	1.94 ± 0.10	1.128	
35	1.31 ± 0.10	1.63 ± 0.10	1.244	
Complejo		Flavanona/DM- β -ciclodextrina		
Protón	H8 _{Izq}	H8 _{Der}	Ka ^{H8der} /Ka ^{H8izq}	
T / °C	Ka x10 ² / M ⁻¹	Ka x10 ² / M ⁻¹		
25	4.96 ± 0.20	5.64 ± 0.30	1.137	
30	3.70 ± 0.20	4.50 ± 0.30	1.216	
35	2.65 ± 0.20	3.72 ± 0.30	1.404	

Tabla 3.6

Ka y Ka¹/Ka² para complejos formados por FL. La temperatura está dada en °C, las Ka en M⁻¹. Los coeficientes de correlación (R) para todos los ajustes son mayores a 0.98.

4'-HIDROXIFLAVANONA/CICLODEXTRINAS

Complejo		4'-hidroxiflavanona/ β -ciclodextrina		
Protón	H3' _{Izq}	H3' _{Der}	Ka ^{H3'izq} / Ka ^{H3'der}	
T / °C	Ka x10 ² / M ⁻¹	Ka x10 ² / M ⁻¹		
25	2.54 ± 0.30	1.45 ± 0.20	1.737	
30	1.12 ± 0.20	0.79 ± 0.20	1.427	
35	0.32 ± 0.10	0.30 ± 0.10	1.053	
Complejo		4'-hidroxiflavanona/HP- β -ciclodextrina		
Protón	H2' _{Izq}	H2' _{Der}	Ka ^{H2'izq} / Ka ^{H2'der}	
T / °C	Ka x10 ² / M ⁻¹	Ka x10 ² / M ⁻¹		
25	3.17 ± 0.10	2.57 ± 0.07	1.233	
30	2.57 ± 0.20	1.94 ± 0.20	1.325	
35	2.23 ± 0.10	1.67 ± 0.10	1.335	
Complejo		4'-hidroxiflavanona/DM- β -ciclodextrina		
Protón	H8 _{Izq}	H8 _{Der}	Ka ^{H8der} / Ka ^{H8izq}	
T / °C	Ka x10 ² / M ⁻¹	Ka x10 ² / M ⁻¹		
25	8.02 ± 0.30	8.53 ± 0.40	1.062	
30	5.98 ± 0.20	6.04 ± 0.30	1.010	
35	4.17 ± 0.20	4.55 ± 0.30	1.090	

Tabla 3.7

Ka y Ka¹/ Ka² para complejos formados por 4'OHFL. La temperatura está dada en °C, las Ka en M⁻¹. Los coeficientes de correlación (R) para todos los ajustes son mayores a 0.98.

2'-HIDROXIFLAVANONA/CICLODEXTRINAS

2'-hidroxiflavanona/HP-β-ciclodextrina			
Complejo	H5' _{Izq}	H5' _{Der}	Ka ^{H5'der} / Ka ^{H5'izq}
Protón	Ka x10 ² / M ⁻¹	Ka x10 ² / M ⁻¹	
T / °C			
25	4.99 ± 0.30	5.08 ± 0.20	1.018
30	3.29 ± 0.20	3.39 ± 0.10	1.030
35	2.30 ± 0.10	2.43 ± 0.10	1.056

2'-hidroxiflavanona/DM-β-ciclodextrina			
Complejo	H8 _{Izq}	H8 _{Der}	Ka ^{H8der} / Ka ^{H8izq}
Protón	Ka x10 ² / M ⁻¹	Ka x10 ² / M ⁻¹	
T / °C			
25	13.0 ± 0.60	10.9 ± 0.70	0.836
30	7.55 ± 0.30	8.02 ± 0.60	1.062
35	4.53 ± 0.20	5.84 ± 0.30	1.291

Tabla 3.8

Ka y Ka¹ / Ka² para complejos formados por 2'OHFL. La temperatura está dada en °C, las Ka en M⁻¹. Los coeficientes de correlación (R) para todos los ajustes son mayores a 0.98.

Para todos los complejos estudiados las K_a disminuyen al aumentar la temperatura, lo que indica que la formación de estos se ve desfavorecida con el aumento de la temperatura y lo que correspondería a un proceso exotérmico.

Al comparar todos los valores de K_a a una misma temperatura, se aprecia que las menores constantes de asociación son para los complejos formados con la β CD, y luego, la HP β CD presenta menores valores que la DM β CD, es decir, para todos los complejos a la misma temperatura la tendencia de las K_a es como sigue a continuación,

$$\beta\text{CD} < \text{HP}\beta\text{CD} < \text{DM}\beta\text{CD} \quad 3.3$$

Por otra parte, al comparar entre flavanonas a una misma temperatura, se observa que la 2'OHFL posee mayores valores de K_a que la 4'OHFL, y a su vez ésta que la FL. Esta tendencia se da cuando estas flavanonas forman complejos con las ciclodextrinas derivatizadas, es decir,

$$\text{FL} < 4'\text{OHFL} < 2'\text{OHFL} \Leftrightarrow \text{HP}\beta\text{CD} \text{ y } \text{DM}\beta\text{CD} \quad 3.4$$

Por otra parte, al analizar el comportamiento de las flavanonas formando complejos con la β CD, se ve que no hay una tendencia definida para los valores de sus K_a , presentándose éstas de manera aleatoria. Por ejemplo, para el complejo 4'OHFL/ β CD el valor de la K_a a 25°C para el complejo formado por el enantiómero de la izquierda ($H3'_{izq}$) es mayor que el de su análogo ($H8_{izq}$) en el complejo FL/ β CD, mientras que lo contrario ocurre comparando los mismos complejos y enantiómeros a 35°C ($H3'_{izq}$ y $H8_{izq}$). Esta aleatoriedad podría ser atribuida a que los valores de K_a son muy cercanos entre sí.

Las razones de constantes de asociación entre complejos diastereoisoméricos, K_a^1/K_a^2 , muestran la relación existente entre las K_a de los

complejos formados por un par de enantiómeros y una misma ciclodextrina. De esta manera, mientras más se aleje de 1 el valor de razón entre las constantes, más diferentes son las K_a . Los valores de K_a^1/K_a^2 muestran que, para la mayoría de los casos, su tendencia es al aumento con el aumento de temperatura. Esto indica que a medida que aumenta la temperatura, las constantes de asociación entre complejos diastereoisoméricos son más diferentes entre sí, y por lo tanto la separación en HPLC debiera ser mejor. Comparando entre ciclodextrinas, se observa que los mayores valores de K_a^1/K_a^2 son para los complejos formados por la β CD. Por otra parte, comparando las ciclodextrinas derivatizadas, se ve que las razones K_a^1/K_a^2 no tienen una tendencia definida. Lo anterior sería atribuido a que, probablemente, las interacciones que dan lugar a la formación de los complejos son más similares en magnitud entre los complejos formados con las CDs derivatizadas que con β CD, ya que esto promovería K_a más similares.

3.1.4 Termodinámica de inclusión

Los parámetros termodinámicos de los complejos, ΔH y ΔS , se determinaron obteniendo las constantes de asociación a tres temperaturas diferentes, 25, 30 y 35°C, y empleando la ecuación 2.27 que relaciona el $\ln(K_a)$ con el inverso de la temperatura, T^{-1} , como se ejemplifica en el gráfico de la Figura 3.10. Adicionalmente, el valor de ΔG se obtuvo utilizando la ecuación 2.28.

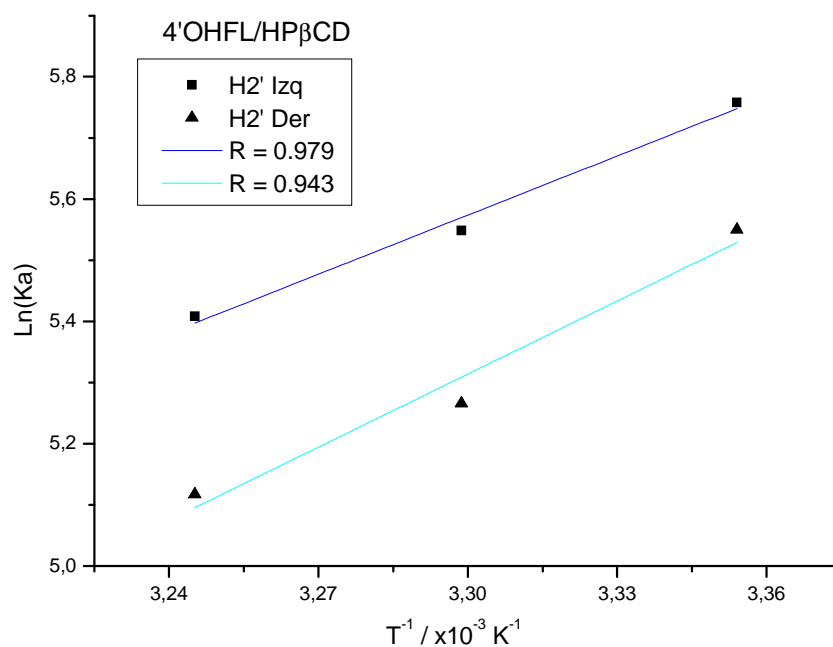


Figura 3.10
Gráficos de $\ln(K_a)$ vs. T^{-1} para los complejos 4'OHFL/HP β CD para la determinación de los parámetros ΔH y ΔS .

Los resultados termodinámicos de todos los complejos se tabulan en las tablas 3.9, 3.10 y 3.11 a continuación

FLAVANONA/CICLODEXTRINAS

Flavanona/ β -ciclodextrina			
	Protón		
	H8 _{Izq}	H8 _{Der}	$ \Delta\Delta G $
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-101.31 ± 2.13	-61.75 ± 1.48	
$\Delta S / \text{kJ (Kmol)}^{-1}$	-0.296 ± 0.007	-0.162 ± 0.005	
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-88.36 ± 2.10	-48.37 ± 1.45	0.43
$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	-12.95 ± 2.13	-13.38 ± 1.45	
Flavanona/HP- β -ciclodextrina			
	Protón		
	H2 _{Izq}	H2 _{Der}	$ \Delta\Delta G $
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-49.77 ± 4.02	-29.72 ± 1.26	
$\Delta S / \text{kJ (Kmol)}^{-1}$	-0.121 ± 0.013	-0.054 ± 0.004	
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-36.11 ± 3.95	-16.14 ± 1.24	0.08
$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	-13.66 ± 4.02	-13.58 ± 1.26	
Flavanona/DM- β -ciclodextrina			
	Protón		
	H8 _{Izq}	H8 _{Der}	$ \Delta\Delta G $
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-47.99 ± 2.33	-31.85 ± 1.35	
$\Delta S / \text{kJ (Kmol)}^{-1}$	-0.109 ± 0.008	-0.054 ± 0.004	
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-32.59 ± 2.29	-16.15 ± 1.33	0.30
$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	-15.40 ± 2.33	-15.70 ± 1.35	

Tabla 3.9

Valores termodinámicos de complejos formados por FL. Los valores de $T \cdot \Delta S$ y ΔG fueron obtenidos a 298.15K. $|\Delta\Delta G|$ es el módulo de la diferencia de los ΔG entre los complejos formados por los enantiómeros de la izquierda y derecha.

4'-HIDROXIFLAVANONA/CICLODEXTRINAS

4'-Hidroxi flavanona/ β -ciclodextrina			
	Protón		
	H3' _{lqz}	H3' _{der}	\Delta\Delta G
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-158.59 ± 2.144	-120.39 ± 1.634	
$\Delta S / \text{kJ (Kmol)}^{-1}$	-0.485 ± 0.071	-0.362 ± 0.054	1.42
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-144.67 ± 2.109	-107.89 ± 2.73	
$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	-13.92 ± 2.144	-12.5 ± 2.78	
4'-Hidroxi flavanona/HP- β -ciclodextrina			
	Protón		
	H2' _{lqz}	H2' _{Der}	\Delta\Delta G
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-26.78 ± 2.78	-33.10 ± 5.65	
$\Delta S / \text{kJ (Kmol)}^{-1}$	-0.042 ± 0.01	-0.065 ± 0.02	0.54
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-12.54 ± 2.73	-19.40 ± 5.56	
$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	-14.24 ± 2.78	-13.70 ± 5.56	
4'-Hidroxi flavanona/DM- β -ciclodextrina			
	Protón		
	H8 _{lqz}	H8 _{Der}	\Delta\Delta G
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-49.95 ± 3.37	-48.04 ± 2.22	
$\Delta S / \text{kJ (Kmol)}^{-1}$	-0.112 ± 0.01	-0.105 ± 0.01	0.10
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-33.34 ± 3.32	-31.33 ± 2.19	
$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	-16.61 ± 3.37	-16.71 ± 2.22	

Tabla 3.10

Valores termodinámicos de complejos formados por 4'OHFL. Los valores de $T \cdot \Delta S$ y ΔG fueron obtenidos a 298.15K. $|\Delta\Delta G|$ es el módulo de la diferencia de los ΔG entre los complejos formados por los enantiómeros de la izquierda y derecha.

2'-HIDROXIFLAVANONA/CICLODEXTRINAS

2'-Hidroxi flavanona/ β -ciclodextrina			
	Protón H8		$ \Delta\Delta G $
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-58.61 ± 6.56		
$\Delta S / \text{kJ (Kmol)}^{-1}$	-0.152 ± 0.02		
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-45.37 ± 6.46		-----
$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	-13.24 ± 6.56		
2'-Hidroxi flavanona/HP- β -ciclodextrina			
	H5' _{Izq}	Protón H5' _{Der}	$ \Delta\Delta G $
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-58.96 ± 2.13	-56.28 ± 2.78	
$\Delta S / \text{kJ (Kmol)}^{-1}$	-0.146 ± 0.01	-0.137 ± 0.01	0.04
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-43.58 ± 2.10	-40.86 ± 2.74	
$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	-15.38 ± 2.13	-15.42 ± 2.78	
2'-Hidroxi flavanona/DM- β -ciclodextrina			
	H8 _{Izq}	Protón H8 _{Der}	$ \Delta\Delta G $
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-80.74 ± 0.70	-47.50 ± 1.00	
$\Delta S / \text{kJ (Kmol)}^{-1}$	-0.211 ± 0.002	-0.101 ± 0.003	0.43
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-62.97 ± 0.68	-30.16 ± 0.97	
$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	-17.77 ± 0.70	-17.34 ± 1.00	

Tabla 3.11

Valores termodinámicos de complejos formados por 2'-OHFL. Los valores de $T \cdot \Delta S$ y ΔG fueron obtenidos a 298.15K. $|\Delta\Delta G|$ es el módulo de la diferencia de los ΔG entre los complejos formados por los enantiómeros de la izquierda y derecha. Debido a que el complejo 2'-OHFL/ β CD no presenta diferenciación enantiomérica, para este complejo se determinaron los valores de ΔH , $T \cdot \Delta S$ y ΔG usando la señal del protón H8 que es el que tiene mayor variación en los δ .

Los valores obtenidos de ΔG de todos los complejos estudiados resultaron ser negativos, lo que indica la formación espontánea de todos éstos. De manera similar, todos los valores de ΔH y ΔS fueron negativos, indicando no solo que la formación de todos los complejos es exotérmica, sino también que todas las interacciones que promueven la formación de éstos son similares en naturaleza.

Para comprender de manera global los valores termodinámicos obtenidos, hay que proponer las interacciones que estarían jugando un rol importante en la formación de los complejos, elucidar cuales serían las más probables de ocurrir, y analizar los resultados experimentales en base a los valores teóricos que se obtendrían para cada parámetro termodinámico. Algunos de los fenómenos que dan lugar a la formación de los complejos y a los valores de los parámetros termodinámicos son:

- Fuerzas de Van der Waals
- Interacciones hidrofóbicas
- Enlaces de hidrógeno
- Cambios conformacionales
- Salida de las moléculas de agua desde el interior de la cavidad de la CD

a) Fuerzas de Van der Waals

Las fuerzas de Van der Waals son interacciones que aportan con valores negativos a la entalpía, y que están constituidas por interacciones i) dipolo-dipolo, consistentes en las interacciones entre dipolos permanentes, ii) dipolo-dipolo inducido, consistentes en un dipolo permanente que induce un dipolo en otra molécula, y iii) de dispersión, que son causadas por la sincronización del movimiento electrónico entre dos moléculas, lo que resulta en dipolos momentáneos que se orientan para provocar su atracción.¹¹⁴

Si se considera que tanto las ciclodextrinas como las flavanonas de este trabajo poseen dipolos, y que éstas últimas son altamente polarizables debido a la resonancia que presentan (Fig. 3.11), es muy probable que en los valores negativos de ΔH obtenidos para los complejos de este trabajo, hayan aportes de las interacciones de Van de Waals.

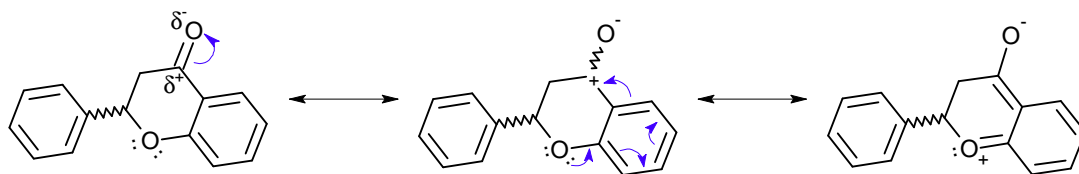


Figura 3.11

Representación esquemática de la resonancia que presentan las flavanonas. Por diferencia de electronegatividad, los electrones π del grupo carbonilo se deslocalizan hacia el átomo de oxígeno, favoreciendo la deslocalización de todos los electrones π del sistema.

b) Interacciones hidrofóbicas

La contribución de las interacciones hidrofóbicas a la formación de los complejos de inclusión es un tema de debate, debido a que la naturaleza de estas interacciones es en sí misma complejo. Las interacciones hidrofóbicas son aquellas que reestructuran las moléculas de agua alrededor de solutos apolares, donde estos últimos se agregan con el objetivo de exponer la menor área posible hacia las moléculas de agua, por ejemplo hidrocarburos en agua. Experimentalmente, este fenómeno es asociado con cambios positivos tanto de entalpía como de entropía, lo que se ha tomado como evidencia empírica de la existencia de interacciones hidrofóbicas.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Sin embargo, la mayoría de los resultados experimentales al formar complejos de inclusión con CDs revelan cambios negativos de entalpía y entropía, lo que indicaría que las interacciones hidrofóbicas no aportarían significativamente al proceso de inclusión.^{109, 115} Esta es una conclusión que no es del todo aceptada debido a que al ser el interior de la CD apolar, un sustrato de la misma naturaleza se incluye en su cavidad con tal de reducir su área de contacto con las moléculas de agua. Por lo anterior, es difícil entender que las interacciones hidrofóbicas no contribuyan significativamente al proceso de inclusión. Esta incongruencia ha sido explicada considerando i) la existencia de otros fenómenos que enmascaren las interacciones hidrofóbicas,^{117, 118} y ii) que el interior de las ciclodextrinas es en realidad semi-polar.^{114,115} Ambos argumentos se pueden fundamentar con el hecho de que la parte apolar del sustrato al incluirse en la cavidad de la CD, se estabilizaría por interacciones de dispersión, como ha sido señalado por Mietrus y col.¹¹⁹ y Al-Omari y col.¹²⁰ Como se ha descrito previamente, las interacciones de dispersión son parte de las fuerzas de Van der Waals, y por tanto aportan con valores negativos de entalpía. En cuanto a la

entropía, su disminución puede ser explicada con los fenómenos que se describirán posteriormente.

Los razonamientos anteriores han sido comúnmente usados para justificar la inexistencia de evidencia termodinámica sobre la ocurrencia de interacciones hidrofóbicas en la formación de los complejos de inclusión con CDs. Sin embargo, y pese a la tendencia de que la porción apolar de un sustrato normalmente se orienta hacia el interior de la CD, en este trabajo se propone que las interacciones hidrofóbicas, de existir, no aportan significativamente al proceso de inclusión. Esta propuesta es basada en el cuestionamiento de si realmente las interacciones hidrofóbicas son relevantes para la formación de los complejos de inclusión. Como ya se describió, *las interacciones hidrofóbicas son aquellas que reestructuran las moléculas de agua alrededor de solutos apolares, donde estos últimos se agregan con el objetivo de exponer la menor área posible hacia las moléculas de agua.* La analogía que existe entre esta descripción y la formación de un complejo de inclusión es que la parte apolar del sustrato se orienta hacia el interior de la CD, sin embargo, cabe preguntarse si la reestructuración de las moléculas de agua alrededor del complejo de inclusión es tan organizada y ordenada como ocurre cuando existen solo interacciones hidrofóbicas. En este trabajo proponemos que dicha reestructuración no es tan organizada ni ordenada por el hecho de que el exterior de la CD es hidrofílico. Si a esto le sumamos la propuesta de Liu y col.¹¹⁴ y Connors,¹¹⁵ que sugiere que el interior de las CDs es en realidad semi-polar, entonces la contribución de las interacciones hidrofóbicas a la formación de un complejo de inclusión es aún menor.

Todos los valores de entropía de los complejos estudiados en este trabajo resultaron ser negativos, por ejemplo, los complejos formados con los enantiómeros de la izquierda en los complejos FL/ β CD, 4'OHFL/HP β CD y 2'OHFL/DM β CD poseen valores de $T \cdot \Delta S$ de -88.36, -12.54 y -62.97 kJ·mol⁻¹, respectivamente. Considerando los resultados obtenidos y el razonamiento empleado previamente, se puede concluir que de existir las interacciones hidrofóbicas en el proceso de inclusión, estas no aportarían significativamente a la formación de los complejos estudiados.

c) Enlaces de hidrógeno

Esta es una interacción que tiene la característica de ser direccional, y que involucra la atracción entre un átomo electronegativo como el oxígeno, y un átomo de hidrógeno enlazado a otro átomo electronegativo. Esta interacción es asociada a la pérdida tanto de entalpía como de entropía, y en los complejos de inclusión se ha descrito que puede existir i) entre el sustrato y las moléculas de solvente que rodean al complejo, ii) entre el sustrato y los grupos hidroxilos de la ciclodextrina, y iii) entre el sustrato y los grupos sustituyentes de una ciclodextrina derivatizada.^{114, 115}

Si bien es más común encontrar enlaces de hidrógeno formados entre el sustrato y las moléculas de solvente que rodean al complejo, es posible que existan enlaces de hidrógenos entre la 2'OHFL y los grupos sustituyentes de las ciclodextrinas derivatizadas de este trabajo. Esto se sugiere en vista de las geometrías de inclusión encontradas, que indican que el grupo OH de la 2'OHFL se orienta hacia los grupos sustituyentes de las CDs (sección 3.1.5), y de que estos complejos poseen valores de ΔH y $T \cdot \Delta S$ menores que los del resto de los complejos formados con las mismas CDs. Esto es ejemplificado en la Tabla 3.12, donde se indican los resultados obtenidos para los complejos formados con los enantiómeros de la izquierda y las ciclodextrinas derivatizadas.

	FL/DM β CD	4'OHFL/DM β CD	2'OHFL/DM β CD
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-47.99	-49.95	-80.74
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-32.59	-33.34	-62.97
	FL/HP β CD	4'OHFL/HP β CD	2'OHFL/HP β CD
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-49.77	-26.78	-58.96
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-36.11	-12.54	-43.58

Tabla 3.12

Valores de ΔH y $T \cdot \Delta S$ de los complejos formados por las tres flavanonas y las ciclodextrinas derivatizadas, para los enantiómeros de la izquierda.

Empleando un razonamiento similar al anterior, es probable que la 4'OHFL en sus complejos formados con la β CD y la DM β CD posean enlaces de hidrógeno con las moléculas de solvente. Esta propuesta se debe tanto a las geometrías de inclusión encontradas, que indican que el grupo OH de la 4'OHFL se orienta hacia el exterior de las CDs (sección 3.1.5), como a que los valores de ΔH y de $T \cdot \Delta S$ son en general menores que los de los complejos FL/ β CD y FL/DM β CD, donde la FL carece del sustituyente hidroxilo. Esto es ejemplificado en la Tabla 3.13, donde se indican los resultados obtenidos para los complejos formados con los enantiómeros de la derecha y la β CD y la DM β CD.

	FL/ β CD	4'OHFL/ β CD
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-61.75	-120.39
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-48.37	-107.89
	FL/DM β CD	4'OHFL/DM β CD
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-31.85	-48.04
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-16.15	-31.33

Tabla 3.13

Valores de ΔH y $T \cdot \Delta S$ de los complejos formados por la FL y la 4'OHFL y las ciclodextrinas β CD y DM β CD, para los enantiómeros de la derecha.

d) Cambios conformacionales

Si bien los cambios conformacionales de la CD y el sustrato no son fuerzas impulsoras del proceso de inclusión, si pueden facilitar o desfavorecer la ocurrencia de una interacción. De esta manera, tanto la CD como el sustrato pueden sufrir variaciones conformacionales, donde lo más común es que se pierdan grados de libertad, lo que resulta en la pérdida de entropía.^{114, 115}

Observando todos los valores termodinámicos de este trabajo, Tablas 3.9, 3.10 y 3.11, se puede observar que en general los complejos formados entre la 2'OHFL y las ciclodextrinas derivatizadas poseen valores de entropía menores que los del resto de los complejos formados con las mismas CDs. Esto es ejemplificado en la Tabla 3.14, donde se indican los resultados obtenidos para los complejos formados con los enantiómeros de la izquierda y las ciclodextrinas derivatizadas.

	FL/DM β CD	4'OHFL/DM β CD	2'OHFL/DM β CD
T· Δ S / kJ mol ⁻¹	-32.59	-33.34	-62.97
	FL/HP β CD	4'OHFL/HP β CD	2'OHFL/HP β CD
T· Δ S / kJ mol ⁻¹	-36.11	-12.54	-43.58

Tabla 3.14

Valores de T· Δ S de los complejos formados por las tres flavanonas y las ciclodextrinas derivatizadas, para los enantiómeros de la izquierda.

Estos menores valores de entropía serían un reflejo de la disminución de los grados de libertad de la 2'OHFL, idea que es reforzada al observar la Tabla 3.5, donde se da cuenta de los cambios en las constantes de acoplamiento, y por lo tanto cambios conformacionales de la 2'OHFL al formar complejos con las ciclodextrinas derivatizadas. Este resultado además contribuiría a la idea de la existencia de enlaces de hidrógenos entre la 2'OHFL y los grupos sustituyentes de las CDs derivatizadas.

El comportamiento opuesto es encontrado para los complejos formados con la β CD, donde la inclusión de las flavanonas FL y 4'OHFL resultan en valores de $T \cdot \Delta S$ menores que los complejos 2'OHFL/ β CD. Esto es ejemplificado en la Tabla 3.15, donde se indican los resultados obtenidos para los complejos formados con las tres flavanonas y la β CD.

	FL/ β CD	4'OHFL/ β CD	2'OHFL/ β CD
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-88.36	-144.67	-41.34

Tabla 3.15

Valores de $T \cdot \Delta S$ de los complejos formados por las tres flavanonas y la β CD.

Este comportamiento sería explicado con las geometrías de inclusión encontradas (sección 3.1.5), que indicarían que formando complejos con la β CD, la 2'OHFL presentaría más grados de libertad que las flavanonas restantes, ya que la 2'OHFL orienta el grupo B hacia el exterior de la cavidad de la β CD, permitiendo la libre rotación de este grupo, lo que no ocurre con la FL y la 4'OHFL.

e) Salida de las moléculas de agua desde el interior de la cavidad de la CD

Se ha descrito que uno de los principales fenómenos que afecta a la elucidación de las interacciones responsables de la formación de los complejos, es la salida de las moléculas de agua desde el interior de la cavidad de la ciclodextrina. Esta afirmación se fundamenta en que si bien este fenómeno no es una fuerza impulsora del proceso de inclusión, su efecto se ve reflejado en los valores termodinámicos de la formación de los complejos, ΔH y ΔS .^{114, 115}

Debido a que la cavidad de las ciclodextrinas es semi-polar, y que las moléculas de agua en su interior carecen de la posibilidad de formar puentes de hidrógeno, estas moléculas de agua que se encuentran en el interior son altamente energéticas. Por lo tanto, y debido a la falta de puentes de hidrógeno internos, estas moléculas de agua tendrían más grados de libertad en el interior de la CD que en solución. Por lo anterior, la salida de estas moléculas de agua, promovida por la inclusión de un sustrato, aportaría con valores negativos tanto a ΔH como a ΔS .¹¹⁴

La mayor implicancia de que la salida de las moléculas de agua desde el interior de la CD se vea reflejada en el parámetro entálpico, es el hecho de que encontrar valores experimentales negativos de ΔH no estarían indicando necesariamente la dominancia de las interacciones de Van der Waals en el proceso de inclusión.^{114, 121}

Esta afirmación estaría indicando que, a pesar de tener valores negativos de entalpía en todos los complejos de este trabajo, Tablas 3.9, 3.10 y 3.11, estas podrían ser en gran medida consecuencia de la salida de las moléculas de agua. Sin embargo, en la práctica no solo hay que enfocarse en los valores termodinámicos obtenidos, sino que también en la estructura del sustrato, que en este caso al ser

altamente polarizables (Fig. 3.11) originarían interacciones de Van der Waals. De esta manera, si bien en los valores de ΔH podrían haber contribuciones de la salida de las moléculas de agua, también proponemos en este trabajo que las interacciones de Van der Waals juegan un rol importante en el proceso de inclusión.

Es importante destacar que ninguna de las fuerzas atractivas mencionadas previamente es suficiente por si sola para provocar la formación de un complejo de inclusión, y que en realidad las asociaciones moleculares son posibles por la cooperación simultánea de varias interacciones.¹⁰⁹ Con esto, y complementando los fenómenos descritos previamente, se puede concluir que el proceso de inclusión es un fenómeno complejo que involucra simultáneamente interacciones de distinta naturaleza.

Para los complejos de este trabajo, donde en todos los casos se obtuvieron valores negativos para ΔH y ΔS , se puede sugerir que su formación derivaría preponderantemente de interacciones de Van der Waals, jugando un rol importante en el proceso de inclusión. Cabe mencionar que esta propuesta es fundamentada no solo en los valores termodinámicos de los complejos, sino que también de su complemento con las observaciones generales de las geometrías de inclusión (Sección 3.1.5). Es destacable que algunos complejos podrían formar enlaces de hidrógeno, lo que también es una propuesta derivada de la termodinámica y de las geometrías encontradas.

De lo anterior, se puede concluir que los valores termodinámicos por si solos no son suficientes para sugerir las interacciones que promueven la formación de

los complejos, sino que además se requiere de información adicional para proponer de manera más asertiva las interacciones de mayor preponderancia.

Haciendo una observación general de todos los valores termodinámicos obtenidos, destacan los ΔH y $T \cdot \Delta S$ de los complejos formados por la β CD y las flavanonas FL y 4'OHFL, debido a que poseen valores notablemente menores que los del resto de los complejos. Esto es ejemplificado en la Tabla 3.16, donde se indican los resultados obtenidos para los complejos formados por los enantiómeros de la izquierda de las flavanonas FL y 4'OHFL y las tres ciclodextrinas utilizadas.

	FL/ β CD	FL/HP β CD	FL/DM β CD
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-101.31	-49.77	-47.99
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-88.36	-36.11	-32.59
	4'OHFL/ β CD	4'OHFL/HP β CD	4'OHFL/DM β CD
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-158.59	-26.78	-49.95
$T \cdot \Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	-144.67	-12.54	-33.34

Tabla 3.16

Valores de $T \cdot \Delta S$ de los complejos formados por las tres flavanonas y las ciclodextrinas derivatizadas, para los enantiómeros de la izquierda.

En la Tabla 3.16 se puede observar como los complejos formados con la β CD poseen menores valores de ΔH y $T \cdot \Delta S$ que los formados con las CDs derivatizadas, donde las grandes disminuciones en entalpía y entropía podrían estar dadas por la salida de las moléculas de solvente de la cavidad de la CD. Debido a la carencia de grupos sustituyentes y a su volumen, la β CD sería más propensa a retirar las moléculas de solvente de su interior que las CDs derivatizadas, y por lo tanto a disminuir tanto la entalpía como la entropía en relación a los complejos formados por la HP β CD y la DM β CD. Adicionalmente, y también debido a la carencia de grupos

sustituyentes, estos complejos formados por la β CD podrían estar rodeados por una esfera de solvatación más rígida que los complejos formados por las CDs derivatizadas, lo que también podría contribuir a una menor entropía relativa. En contraste con lo anterior, existe un complejo formado por la β CD, específicamente el complejo 2'OHFL/ β CD, que no presenta el mismo comportamiento que sus análogos, (FL y 4'OHFL)/ β CD, es decir que no presenta valores de ΔH y $T \cdot \Delta S$ notablemente menores. La explicación a esta excepción estaría dada en conjunto con la geometría de inclusión de este complejo (2'OHFL/ β CD), que indica que solo una porción de la 2'OHFL está incluida en la cavidad de la β CD, mientras que la FL y la 4'OHFL se incluyen completamente en la misma CD (Sección 3.1.5). Esta inclusión parcial daría lugar no solo a una menor cantidad de moléculas de solvente saliendo de la cavidad de la β CD, sino que también a la formación de un complejo menos estructurado, y que por ende daría lugar a una esfera de solvatación menos rígida. En consecuencia, si bien los fenómenos descritos aportarían a disminuciones en entalpía y entropía, no lo hacen tan pronunciadamente como en sus análogos, (FL y 4'OHFL/ β CD).

De lo anterior se puede concluir que la carencia de grupos sustituyentes en la β CD es lo que hace que los complejos formados por esta CD posean en general parámetros termodinámicos distinguibles del resto de los complejos formados por las CDs derivatizadas.

f) Compensación entálpica-entrópica

Un fenómeno que hasta ahora no ha sido mencionado es la compensación entálpica-entrópica, que consta de la cancelación parcial del término entálpico por el término entrópico, o viceversa. En principio, no existe una relación entre los cambios de entalpía y entropía que pueda ser derivada a partir de los principios fundamentales de la termodinámica, sin embargo, la compensación entálpica-entrópica es un fenómeno empírico que ha sido reportado reiteradamente.¹⁰⁹

En los complejos de inclusión, las constantes de asociación pueden ser en gran medida modificadas haciendo variaciones estructurales en el sustrato, en la ciclodextrina y en el solvente, donde el objetivo de hacer estos cambios es potenciar la disminución de entalpía y por lo tanto favorecer la formación del complejo. Sin embargo, los cambios en las K_a son usualmente menores que los esperados, ya que si bien las variaciones estructurales originarían disminuciones en entalpía, de alguna manera también generan cambios entrópicos que cancelan sustancialmente al término entálpico. Cualitativamente, este es el origen de la compensación entálpica-entrópica.¹⁰⁹

Inoue y col.^{122 - 127} han realizado un estudio sistemático de la compensación entálpica-entrópica, y han sugerido que de la pendiente e intercepto de la gráfica de $T \cdot \Delta S$ vs. ΔH se podría obtener información cuantitativa sobre el fenómeno de compensación. Esta relación entre ΔH y $T \cdot \Delta S$ proviene de la siguiente ecuación¹²²

$$T \cdot \Delta S = \alpha \Delta H + T \cdot \Delta S_0 \quad 3.5$$

De esta manera la pendiente, α , indicaría en que magnitud la ganancia en entalpía inducida por alteraciones estructurales del sustrato, CD o solvente, se ve cancelada con la pérdida de entropía. Es decir, mientras más cercano a 1 sea el valor

de α , menor será la contribución de las alteraciones estructurales a la disminución de la entalpía efectiva, y por lo tanto al aumento de las K_a de los complejos. Por otra parte el intercepto, $T \cdot \Delta S_0$, representa la estabilidad inherente del complejo.

Para los complejos de este trabajo se observa compensación entálpica-entrópica debido a que los valores de entalpía, que contribuyen a la formación de los complejos, se ven en gran medida cancelados por los términos entrópicos. Esto se ve corroborado con el gráfico de la Figura 3.12 de $T \cdot \Delta S$ vs. ΔH obtenido con los resultados termodinámicos de este trabajo.

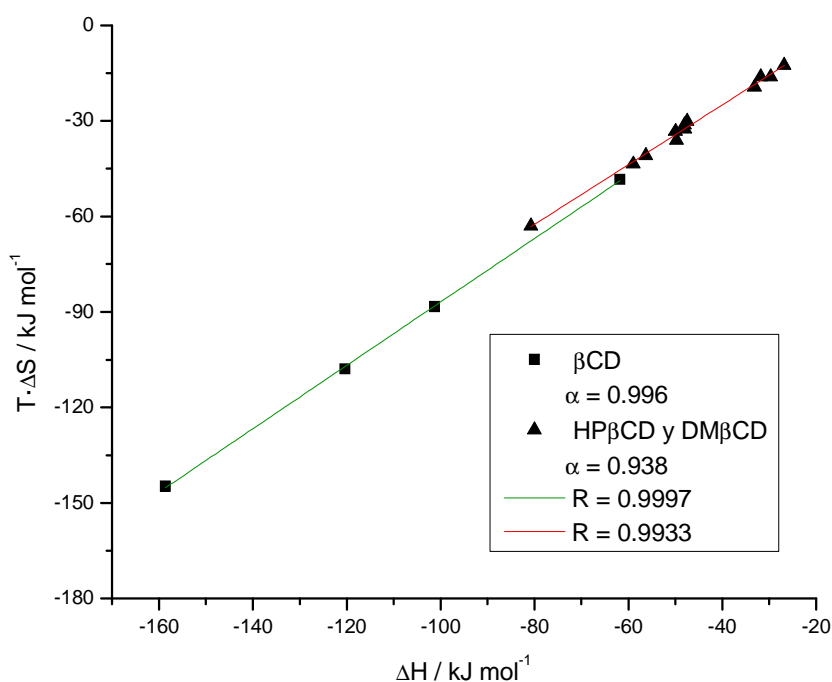


Figura 3.12
Gráfico de $T \cdot \Delta S$ vs. ΔH . ■ Complejos formados con βCD . ▲ Complejos formados con CDs derivatizadas.

Los resultados de las gráficas de $T \cdot \Delta S$ vs. ΔH , dan para α valores de 0.996 y 0.938 para la βCD y las CDs derivatizadas, respectivamente. Estas magnitudes indicarían que el 0.4% de las disminuciones en entalpía provocadas por las variaciones

estructurales en las flavanonas aportan al aumento en las K_a de los complejos formados con la β CD. Por otra parte, el 6.2% de las disminuciones en entalpía provocadas por las variaciones estructurales tanto en las flavanonas como en las CDs derivatizadas aportarían al aumento en las K_a de los complejos formados con estas mismas CDs. Estos resultados son concordantes con las K_a encontradas, ya que las variaciones de las K_a entre los complejos formados con la β CD, a una misma temperatura, son pequeños y menores que las variaciones de las K_a entre los complejos formados con las CDs derivatizadas.

g) Termodinámica de enantiómeros

A partir de las Tablas 3.9, 3.10 y 3.11, se puede ver que las diferencias de ΔG son pequeñas entre los complejos formados por ambos enantiómeros, variando sus magnitudes entre 0.04 y 1.42, como es indicado en la Tabla 3.17.

	β CD	HP β CD	DM β CD
FL	0.43	0.08	0.30
4'OHFL	1.42	0.54	0.10
2'OHFL	-----	0.04	0.43

Tabla 3.17
Valores de $|\Delta\Delta G|$ de todos los complejos estudiados.

Para comprender cual parámetro, entálpico o entrópico, es el que más aporta a que un complejo diastereoisomérico posea un menor ΔG en relación a su contraparte, y por lo tanto esté más favorecido teniendo mayores constantes de asociación a una temperatura dada, se relacionaron las variaciones de entalpía y entropía entre los complejos formados por ambos enantiómeros, con sus variaciones de energía libre, a 298.15K. Por ejemplo, para los complejos FL/ β CD, se puede ver que la entalpía del complejo formado con el enantiómero de la derecha es mayor que la del complejo formado con el enantiómero de la izquierda, lo que favorece a la formación de este último, mientras que la entropía favorece al complejo formado por el enantiómero de la derecha, debido a que su valor es mayor con respecto a su contraparte. Debido a que es el complejo formado con el enantiómero de la derecha el que posee el menor ΔG , es entonces la contribución entrópica la que hace que este complejo se vea favorecido por sobre su contraparte. El caso inverso ocurre para el complejo FL/HP β CD, donde el factor entrópico contribuye al complejo formado por enantiómero

de la derecha mientras que el entálpico al complejo formado por el enantiómero de la izquierda, y debido a que el ΔG es menor para este último complejo, es que la contribución entálpica hace del complejo formado por el enantiómero de la izquierda el más favorecido en relación a su contraparte. Para observar el efecto en todos los complejos, se obtuvieron los módulos de las diferencias de ΔH , $T \cdot \Delta S$ y ΔG entre los complejos formados por los enantiómeros de la izquierda y derecha. De esta manera, el parámetro termodinámico que posea el mayor valor, ya sea $|\Delta\Delta H|$ o $T \cdot |\Delta\Delta S|$, será el que contribuya más a un menor ΔG . Los resultados obtenidos indican que para cinco complejos es el factor entrópico el que aporta más a la disminución del ΔG , y para los tres complejos restantes es el factor entálpico. Esto es resumido en la Tabla 3.18.

Complejo \ $ \Delta_{(izq-der)} $	$ \Delta\Delta H $ kJ mol ⁻¹	$T \cdot \Delta\Delta S $ kJ mol ⁻¹	$ \Delta\Delta G $ kJ mol ⁻¹	Favorecido por
FL/ β CD	39.56	39.99	0.43	Entropía
FL/HP β CD	20.05	19.97	0.08	Entalpía
FL/DM β CD	16.14	16.44	0.30	Entropía
4'OHFL/ β CD	38.20	36.78	1.42	Entalpía
4'OHFL/HP β CD	6.32	6.86	0.54	Entropía
4'OHFL/DM β CD	1.91	2.01	0.10	Entropía
2'OHFL/HP β CD	2.68	2.72	0.04	Entropía
2'OHFL/DM β CD	33.24	32.81	0.43	Entalpía

Tabla 3.18

Valores de $|\Delta\Delta H|$, $T \cdot |\Delta\Delta S|$, $|\Delta\Delta G|$ para todos los complejos. Los valores destacados en negro corresponden al mayor de los valores entre $|\Delta\Delta H|$ y $T \cdot |\Delta\Delta S|$. Las celdas en gris oscuro destacan los complejos que presentan diferenciación enantiomérica debido a factores entálpicos y en gris claro, entrópicos.

Para explicar la aleatoriedad de los resultados de la Tabla 3.18, se obtuvo para cada complejo la variación de $\Delta\Delta G$ con la temperatura, ya que el signo de

$\Delta\Delta G$ indicaría a que temperatura los aportes a los ΔG de cada complejo son entálpicos o entrópicos. Esto se infiere de la siguiente ecuación

$$\Delta\Delta G = |\Delta\Delta H| - T \cdot |\Delta\Delta S| \quad 3.6$$

A partir de la ecuación 3.6 se deriva que si $|\Delta\Delta H| > T \cdot |\Delta\Delta S|$, el valor de $\Delta\Delta G$ será positivo y por lo tanto los complejos estarán favorecidos por entalpía, mientras que si $|\Delta\Delta H| < T \cdot |\Delta\Delta S|$, el valor de $\Delta\Delta G$ será negativo y por lo tanto los complejos estarán favorecidos por entropía. Los gráficos de $\Delta\Delta G$ vs. T para todos los complejos se muestran en la Figura 3.13.

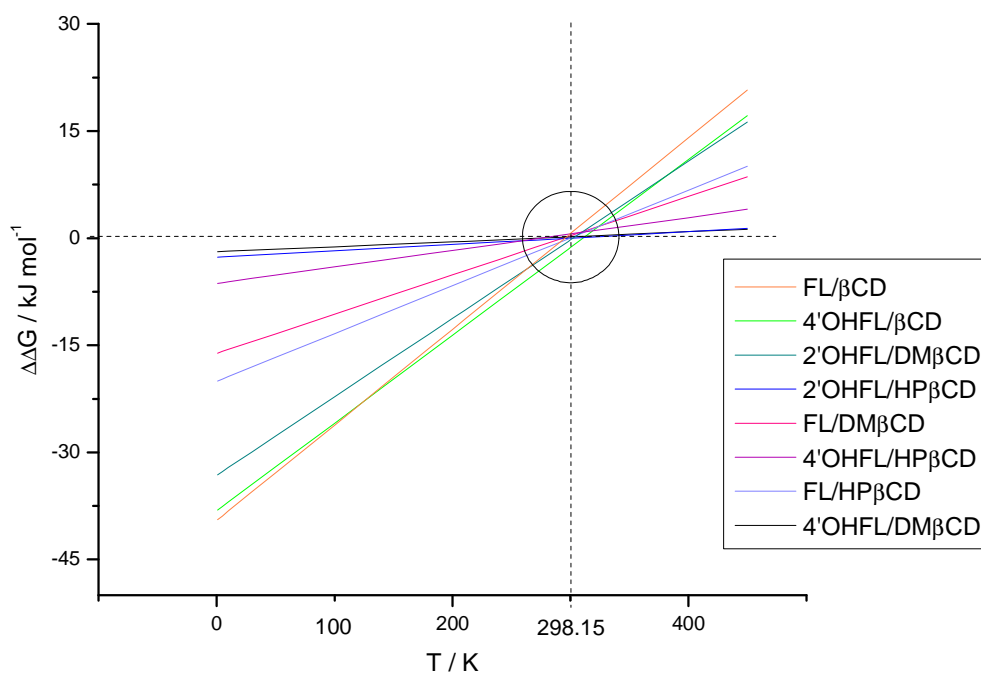


Figura 3.13
Gráfico $\Delta\Delta G$ vs. T para todos los complejos. La circunferencia destaca que alrededor de 298,15K los valores de $\Delta\Delta G$ son cercanos a cero.

En el gráfico de la Figura 3.13, se puede observar que a temperaturas menores de alrededor de 298.15K, los $\Delta\Delta G$ son menores a cero, y por lo tanto los ΔG de un complejo formado por un enantiómero dado estarían favorecidos en relación a su

contraparte debido a factores entrópicos. Por otra parte, a temperaturas superiores a 298.15K, son los factores entálpicos lo que favorecerían la formación de un complejo por sobre el otro, debido a que poseen valores de $\Delta\Delta G$ mayores a cero. Este gráfico también explicaría la aleatoriedad de los resultados de la Tabla 3.18, ya que en ella se presentan los resultados a 298.15K, que es una temperatura cercana a la temperatura a la cual se está cerca del punto de transición, es decir donde $\Delta\Delta G = 0$. Cabe mencionar que el punto de transición, $\Delta\Delta G = 0$, es el punto en el cual las variaciones entálpicas y entrópicas aportan de igual manera a la formación de los complejos diastereoisoméricos.

En conclusión, para los complejos de este trabajo, a las temperaturas usadas, tanto las contribuciones entálpicas como entrópicas son importantes para la discriminación enantiomérica.

3.1.5 Geometría de inclusión

Para una adecuada representación de las geometrías de inclusión, las ciclodextrinas serán esquematizadas de acuerdo con la Figura 3.14.

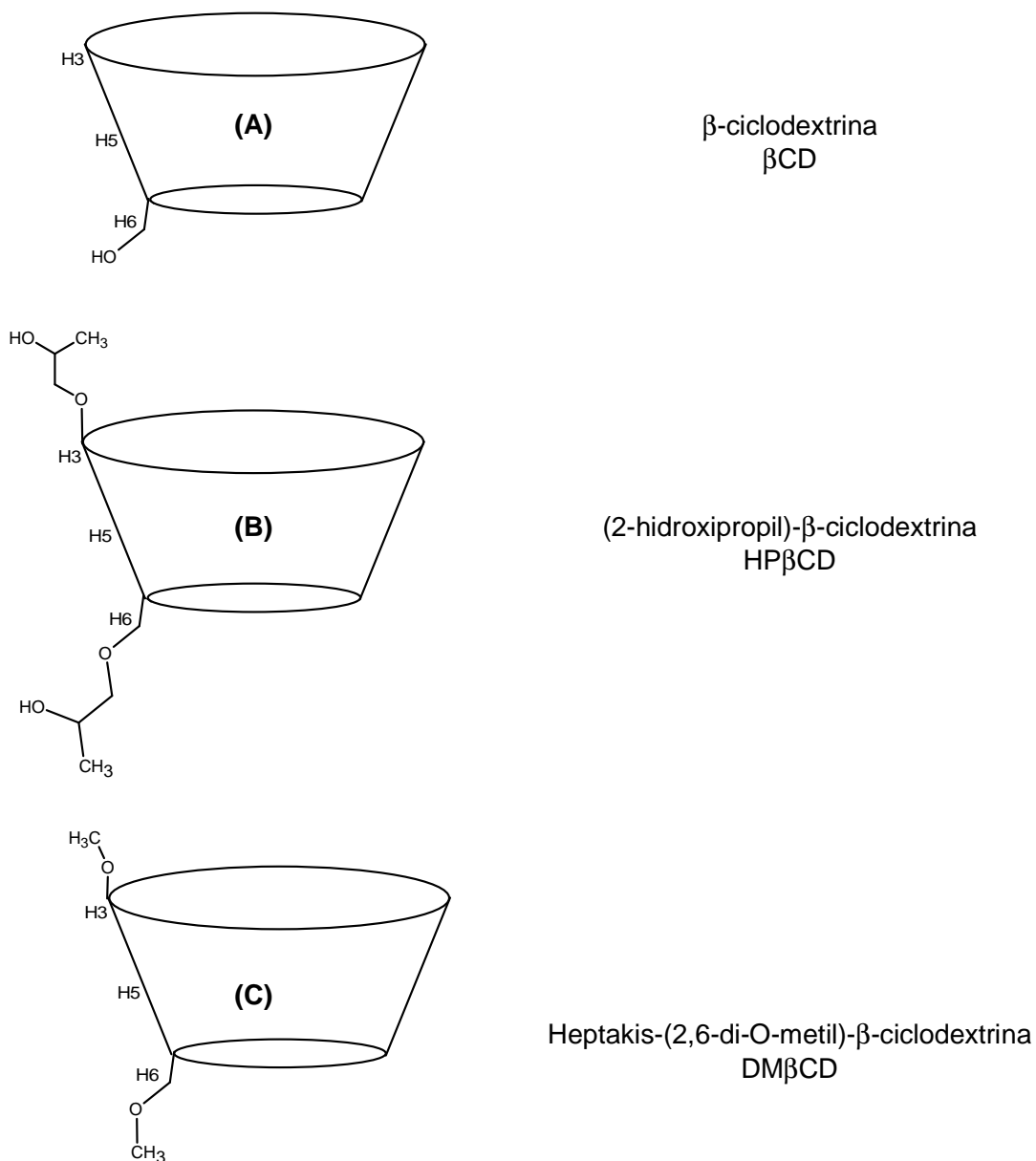
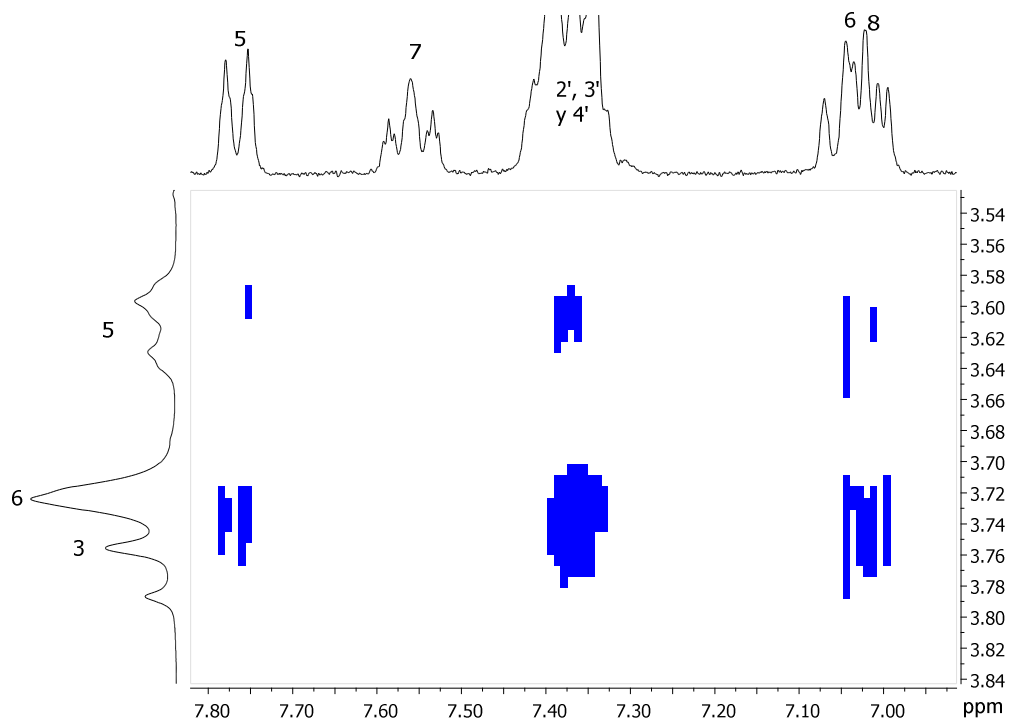
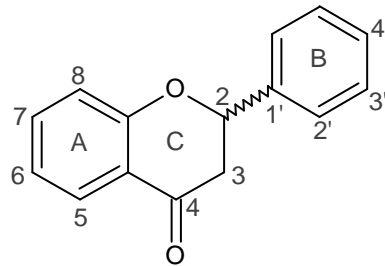


Figura 3.14
Representación esquemática de (A) β CD, (B) $HP\beta$ CD y (C) $DM\beta$ CD. La $HP\beta$ CD está sustituida al azar.

De acuerdo a la Figura 3.14, la β CD corresponde a la estructura básica de todas las CDs usadas en este trabajo, y las CDs derivatizadas, HP β CD y DM β CD, poseen los grupos sustituyentes 2-hidroxiopropilo y metilo, respectivamente. En las CDs, los hidrógenos H3 y H6 se encuentran en los extremos opuestos de la estructura básica, bordes ancho y angosto respectivamente, y el hidrógeno H5 se localiza en el centro interior de las CDs, entre los hidrógenos H3 y H6. En la DM β CD, las sustituciones son en todos los grupos hidroxilos de las posiciones 2 y 6, mientras que las sustituciones de la HP β CD son al azar, donde los grupos 2-hidroxiopropilo podrían encontrarse en los grupos hidroxilos de las posiciones 2, 3 y/o 6 de la β CD. Se ha escogido la HP β CD de mayor grado de sustitución, que consta de siete grupos 2-hidroxiopropilo por unidad β CD. Se ha descrito que en la β CD,¹²⁸ los hidroxilos de la posición 6 son los más fáciles de sustituir; luego la posición 2 y luego la posición 3, donde esta última posición es bastante más inaccesible que las otras dos. A continuación se muestran los espectros 2D-ROESY y las geometrías propuestas para cada complejo.

Flavanona/ β -ciclodextrina

FLAVANONA



Espectro 3.25
Espectro 2D-ROESY del complejo FL/ β CD.

El espectro 2D-ROESY del complejo FL/ β CD (Espectro 3.25) presenta interacciones de prácticamente todos los protones de la FL, H5, H6, H8, H2', H3' y H4', con los protones H3 y H6 de la β CD, cuya posición es opuesta en las CDs. Lo anterior indica que ambos extremos de la FL están interactuando con ambos extremos de la β CD. Debido al tamaño y forma de las moléculas de FL y β CD, es altamente improbable que una única geometría de inclusión de lugar a las interacciones que el complejo presenta, y por lo tanto se proponen dos geometrías, opuestas la una con la otra. Debido a que tanto los hidrógenos del anillo A como del B presentan interacciones con los protones H5 de la β CD, es probable que la molécula de FL se incluya completamente a la ciclodextrina, ya que este protón está ubicado en el centro de la CD. Con lo anterior se han propuesto las siguientes geometrías de inclusión ilustradas en la Figura 3.15.

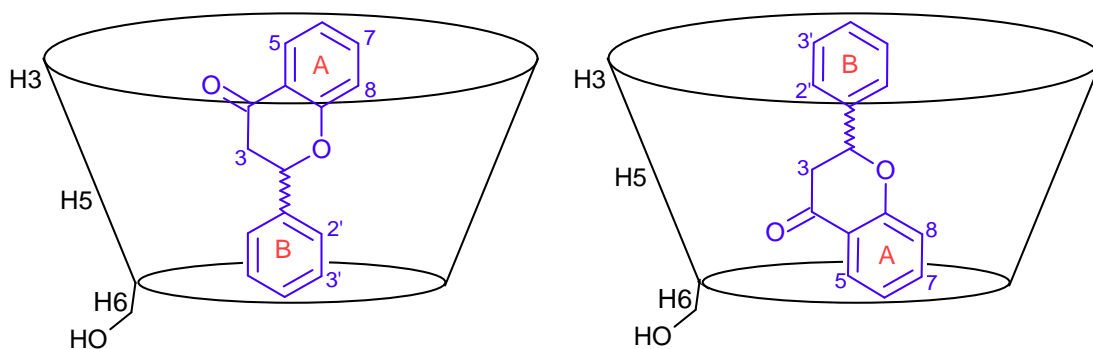
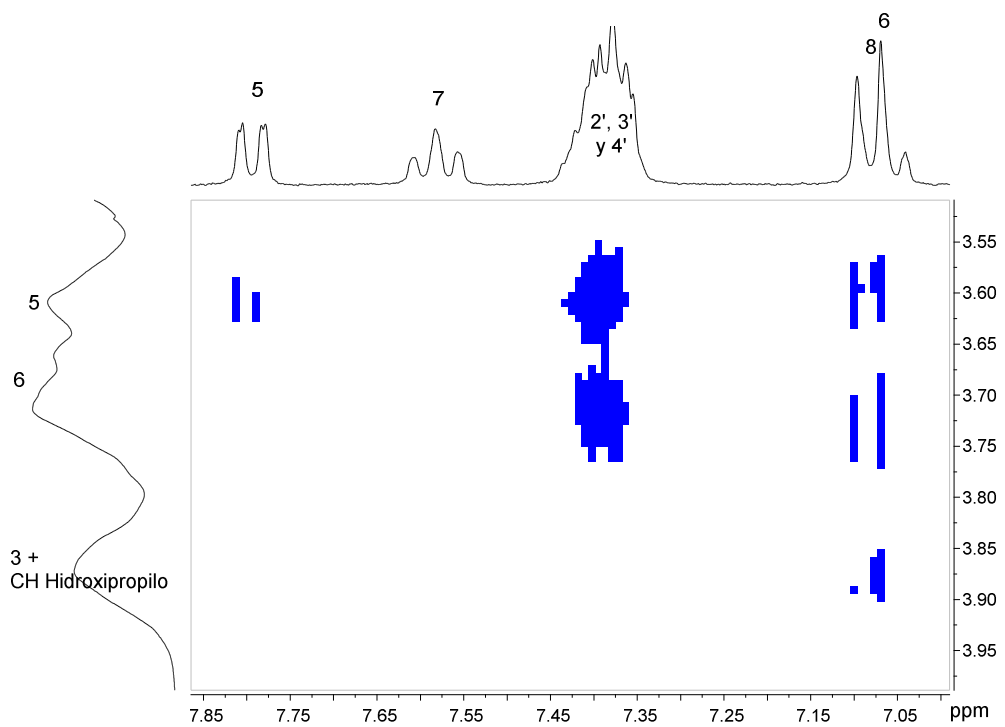
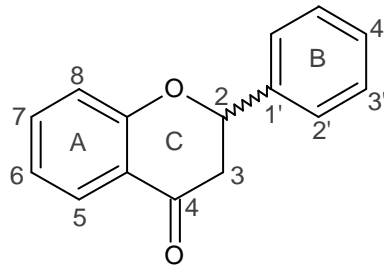


Figura 3.15
Geometría de inclusión propuesta para complejo FL/ β CD.

Flavanona/HP- β -CD

FLAVANONA



Espectro 3.26
Espectro 2D-ROESY del complejo FL/HP β CD.

De acuerdo al espectro 2D-ROESY del complejo FL/HP β CD (Espectro 3.26) los protones H8 y H6 del anillo A y los protones H2', H3', y H4' del anillo B de la FL, presentan interacción con los protones H5 y H6 de la HP β CD. Con lo anterior se sugiere que esta flavanona está incluida por el lado angosto de la ciclodextrina. Debido a que el protón H5 de la FL presenta interacción solo con el H5 de la CD, el anillo A se propone que está hacia el interior de la HP β CD como se muestra en la Figura 3.16. Cabe destacar que el grupo CH del sustituyente 2-hidroxipropilo de la CD también presenta interacciones, pero éste puede estar en cualquier posición de la CD, y por lo tanto no se considera para la estimación de la geometría.

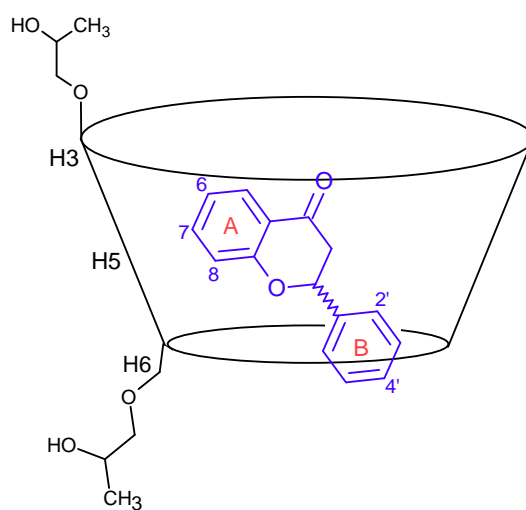
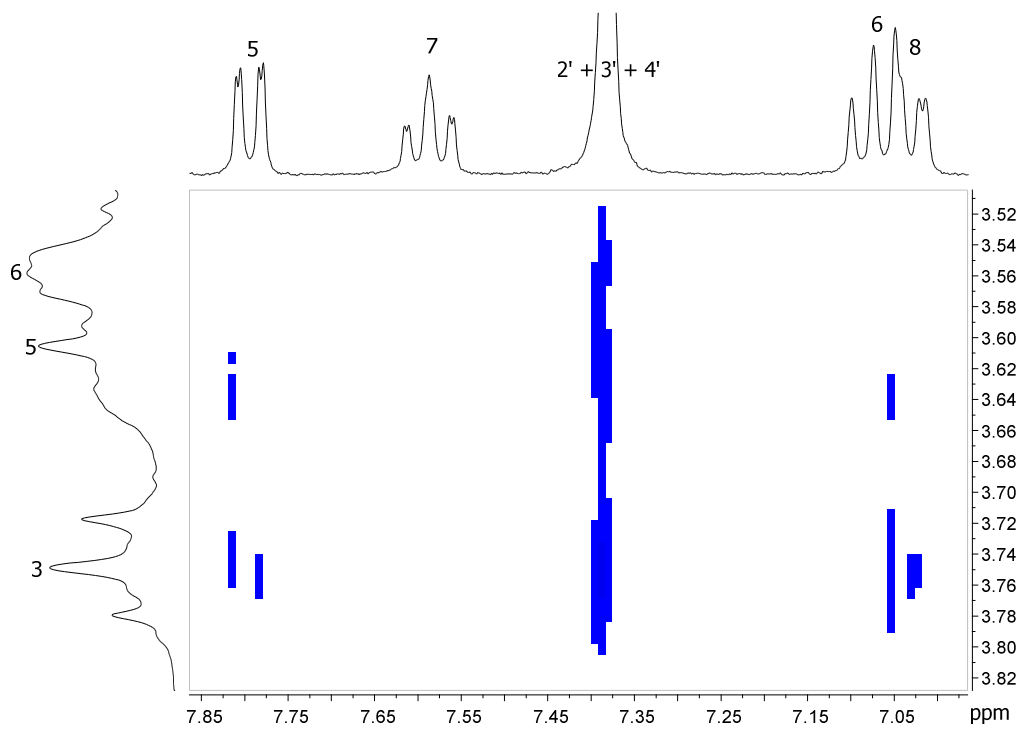
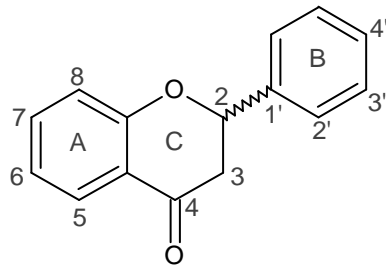


Figura 3.16
Geometría de inclusión propuesta para complejo FL/HP β CD.

Flavanona/DM-β-CD

FLAVANONA



Espectro 3.27

Espectro 2D-ROESY del complejo FL/DMβCD.

El espectro 2D-ROESY del complejo FL/DM β CD (Espectro 3.27) presenta interacciones de prácticamente todos los protones de la FL, H5, H6, H8, H2', H3' y H4', con los protones H3 y H5 de la ciclodextrina. Esto indica que gran parte de la molécula se encuentra inserta en la cavidad de la CD. Como los protones del anillo B de la FL presentan además interacciones con los H6 de la CD, aquella parte de la FL se encontraría orientada hacia el lado angosto de la CD como se muestra en la geometría propuesta en la Figura 3.17.

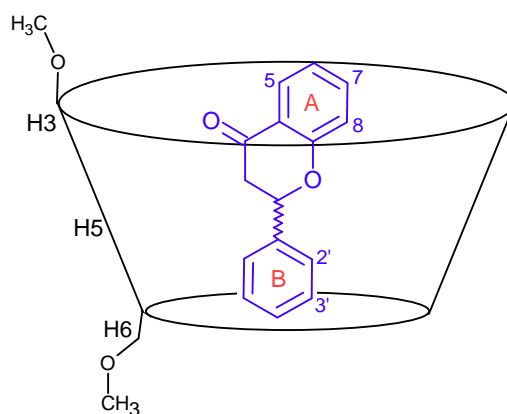
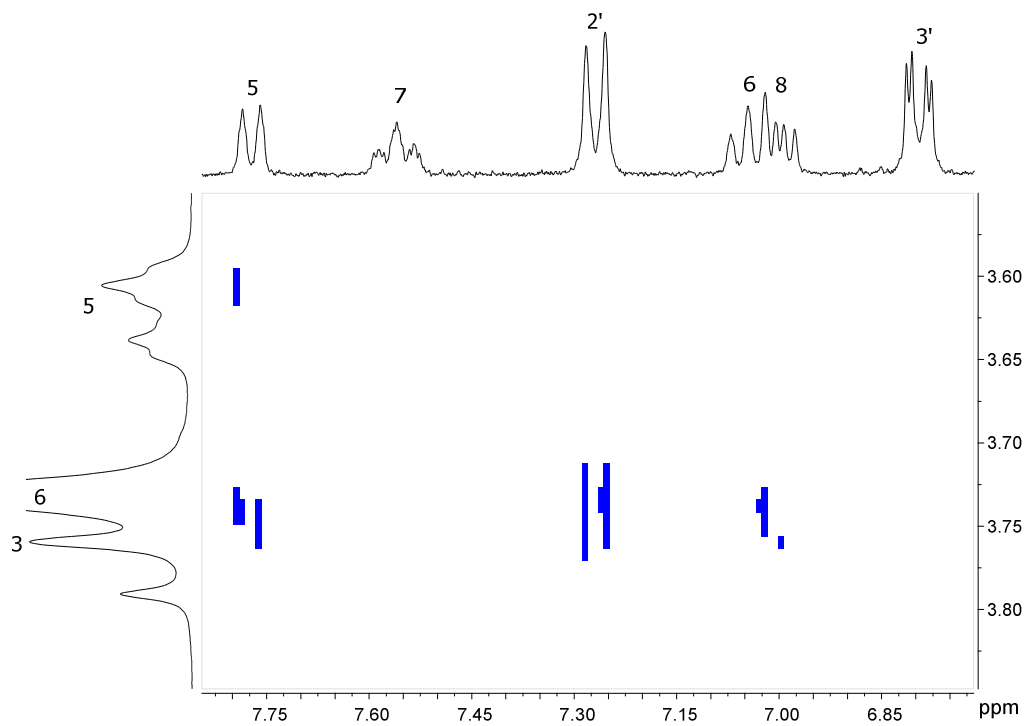
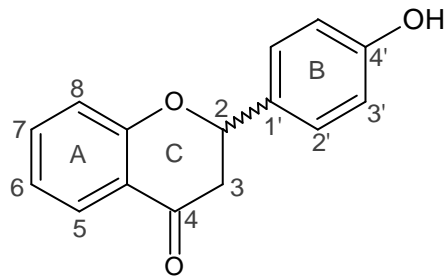


Figura 3.17
Geometría de inclusión propuesta para complejo FL/DM β CD.

4'-hidroxiflavanona/ β -ciclodextrina

4'-HIDROXIFLAVANONA



Espectro 3.28

Espectro 2D-ROESY del complejo 4'OHFL/ β CD.

El espectro 2D-ROESY del complejo 4'OHFL/ β CD (Espectro 3.28) muestra interacciones entre los protones H5, H6 y H8 del anillo A y del protón H2' del anillo B con los protones H3 y/o H6 de la β CD. Debido al tamaño y forma de las moléculas 4'OHFL y β CD, es altamente improbable que una única geometría de inclusión de lugar a las interacciones que este complejo presenta, ya que los protones H3 y H6 de la CD se encuentran en posiciones opuestas. Por lo tanto se han propuesto dos geometrías de inclusión, donde se ha sugerido que la flavanona se incluye completamente, debido a las interacciones que presentan los protones H5 y H3' de esta, con los H5 de la CD. Las geometrías se muestran en la Figura 3.18.

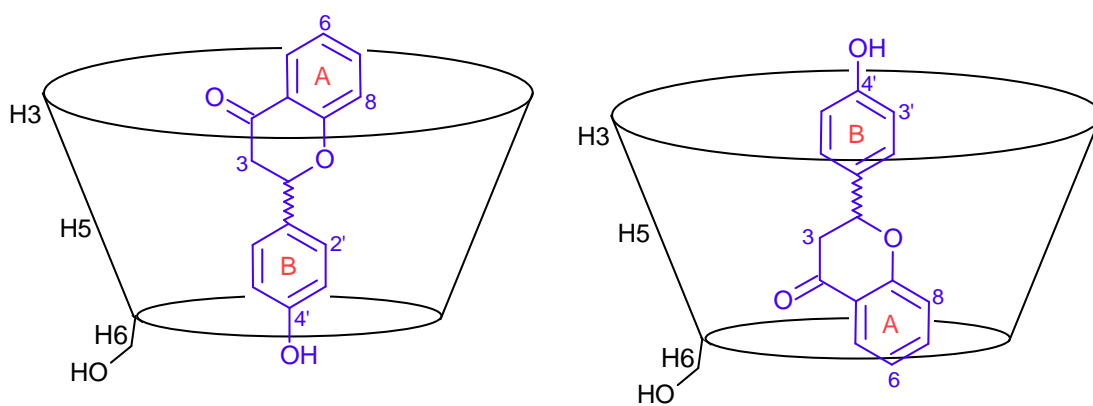
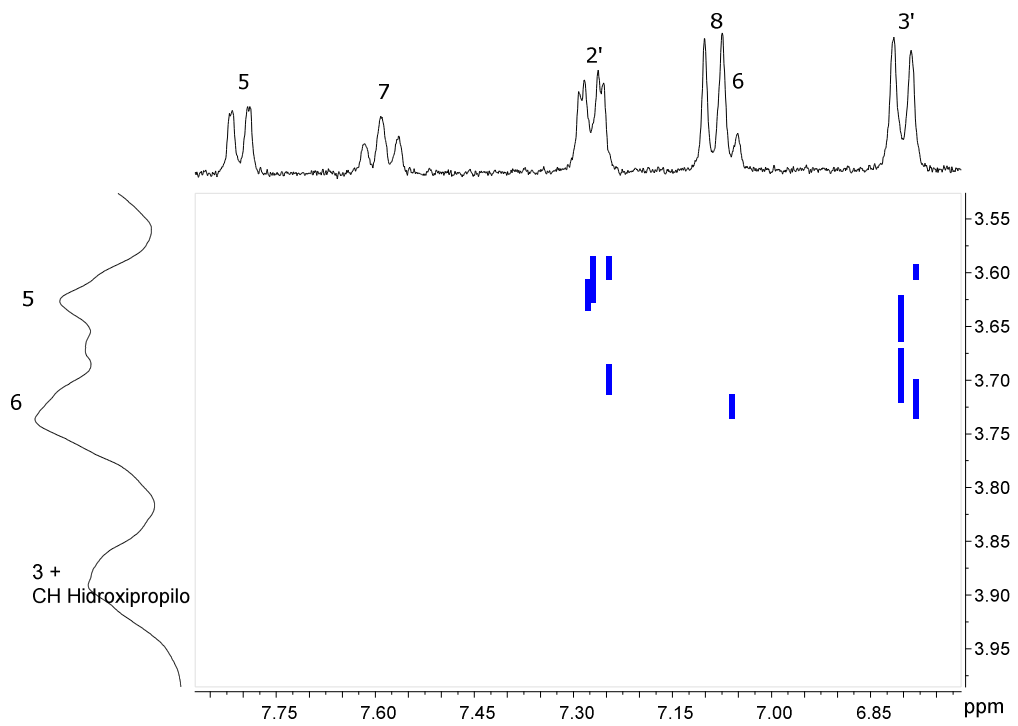
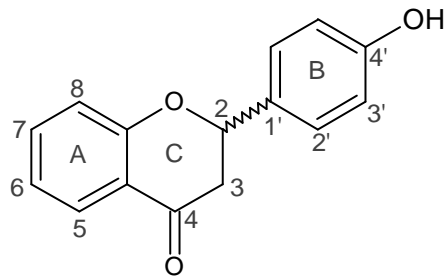


Figura 3.18
Geometría de inclusión propuesta para complejo 4'OHFL/ β CD.

4'-hidroxiflavanona/HP-β-ciclodextrina

4'-HIDROXIFLAVANONA



Espectro 3.29

Espectro 2D-ROESY del complejo 4'OHFL/HPβCD.

De acuerdo con el espectro 2D-ROESY (Espectro 3.29) el anillo B de la flavanona se encuentra hacia el lado angosto de la HP β CD, ya que sus protones, H2' y H3', interactúan con los H5 y H6 de la CD. Además, el protón H6 de la 4'OHFL presenta interacción con los protones H6 de la CD, y por lo tanto el anillo A de esta flavanona, estaría orientado hacia el lado angosto más exterior de la CD, como se ilustra en la Figura 3.19.

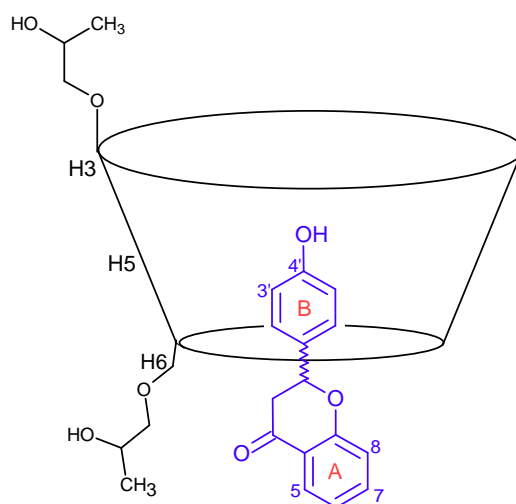
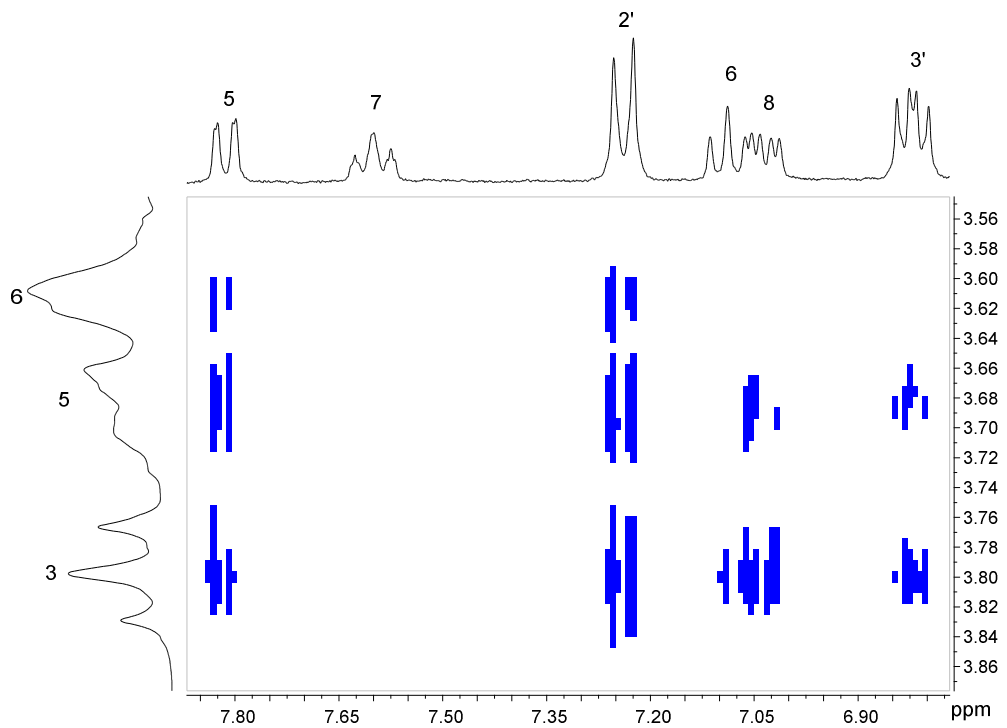
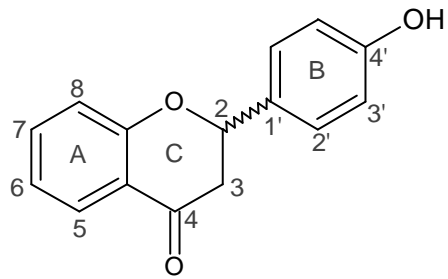


Figura 3.19
Geometría de inclusión propuesta para complejo 4'OHFL/HP β CD.

4'-hidroxiflavanona/DM- β -ciclodextrina

4'-HIDROXIFLAVANONA



Espectro 3.30

Espectro 2D-ROESY del complejo 4'OHFL/DM β CD.

El espectro 2D-ROESY del complejo 4'OHFL/DM β CD (Espectro 3.30) muestra que a excepción del protón H7, hay interacciones de todos los protones del anillo A y del anillo B de la FL, con los protones H3 y H5 de la CD, indicando que gran parte de la molécula se encuentra hacia el lado ancho de la CD. Sin embargo, los protones H5 y H2' de la 4'OHFL muestran además interacciones con el protón H6 de la CD. Por lo tanto, considerando el tamaño y forma de la flavanona y la CD, es altamente improbable que una única geometría de inclusión de lugar a las interacciones que el complejo presenta. Debido a esto, se han propuesto dos geometrías que se muestran en la Figura 3.20.

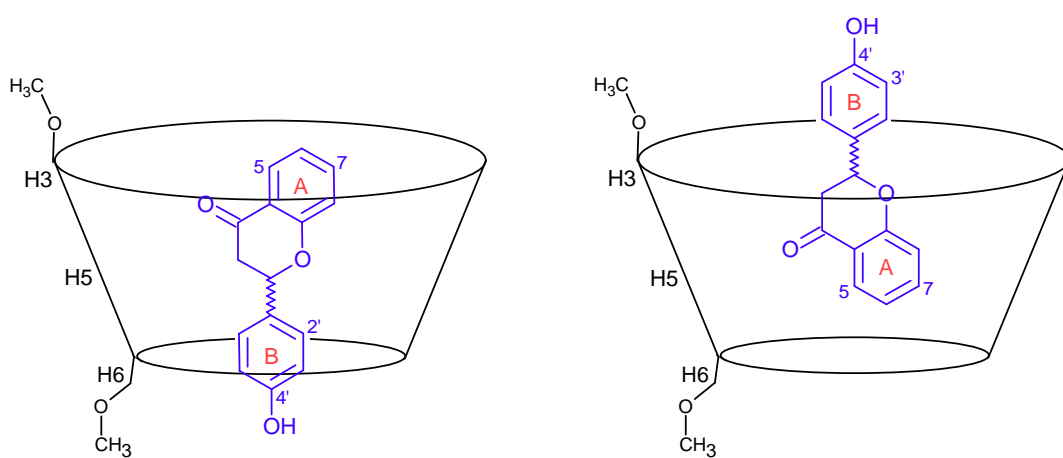
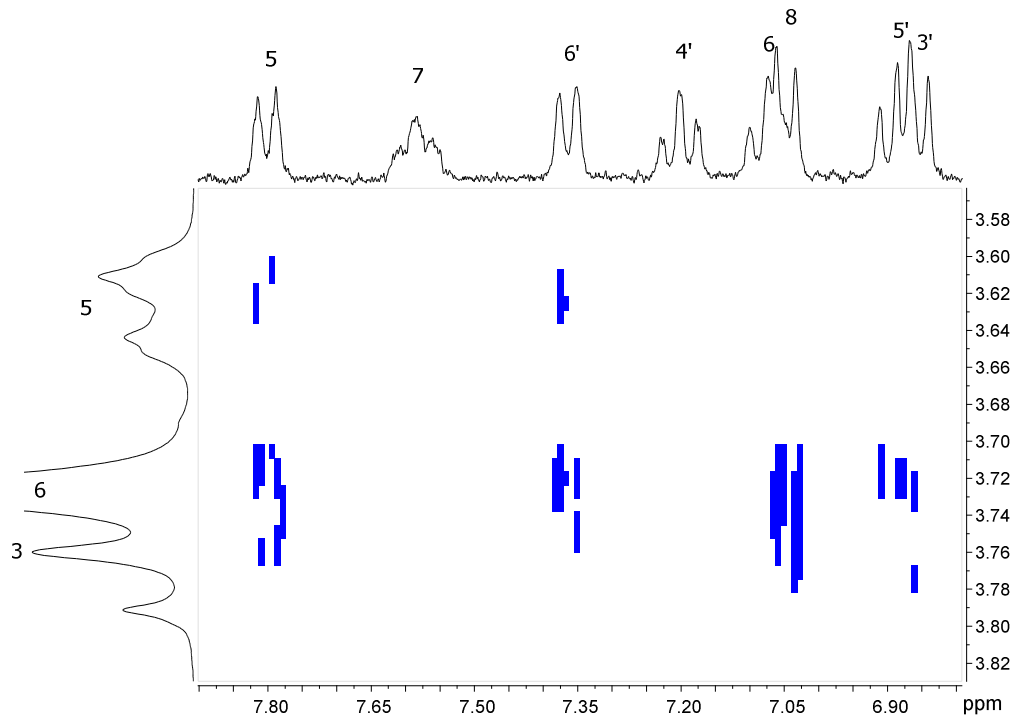
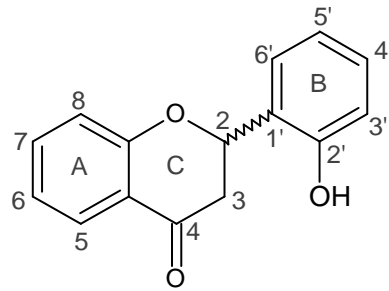


Figura 3.20
Geometría de inclusión propuesta para complejo 4'OHFL/DM β CD.

2'-hidroxiflavanona/ β -ciclodextrina

2'-HIDROXIFLAVANONA



Espectro 3.31
Espectro 2D-ROESY del complejo 2'OHFL/ β CD.

El espectro 2D-ROESY del complejo 2'OHFL/ β CD (Espectro 3.31) muestra interacciones de los protones H5, H6 y H8 del anillo A y protones H6', H5' y H3' del anillo B con ambos protones H3 y H6 de la CD. Al igual que para los complejos anteriores, es poco probable que una única geometría de inclusión de lugar a estas interacciones, donde protones opuestos de la CD posean interacción con un único protón de la flavanona. Debido a que solo los protones H5 y H6' de la 2'OHFL tienen interacción con los protones H5 de la β CD, la flavanona estaría en el borde de la CD, con el anillo A orientado hacia el interior. Las geometrías son ilustradas en la Figura 3.21.

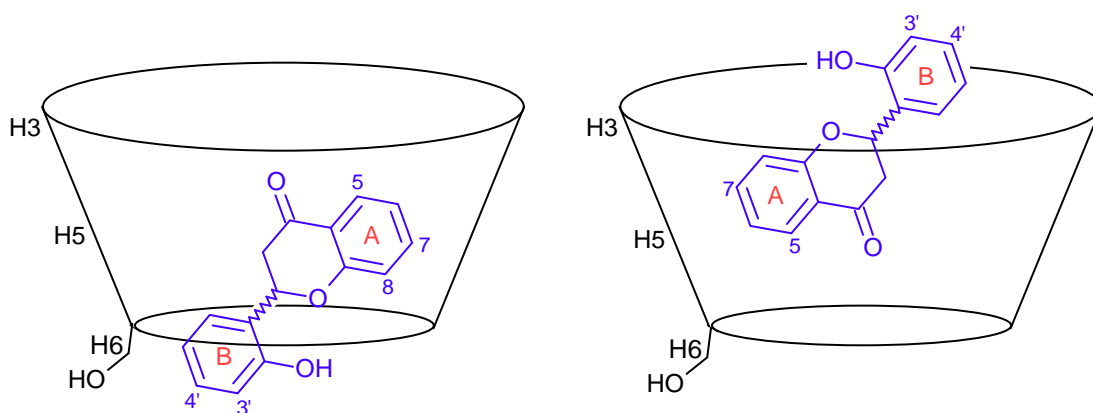
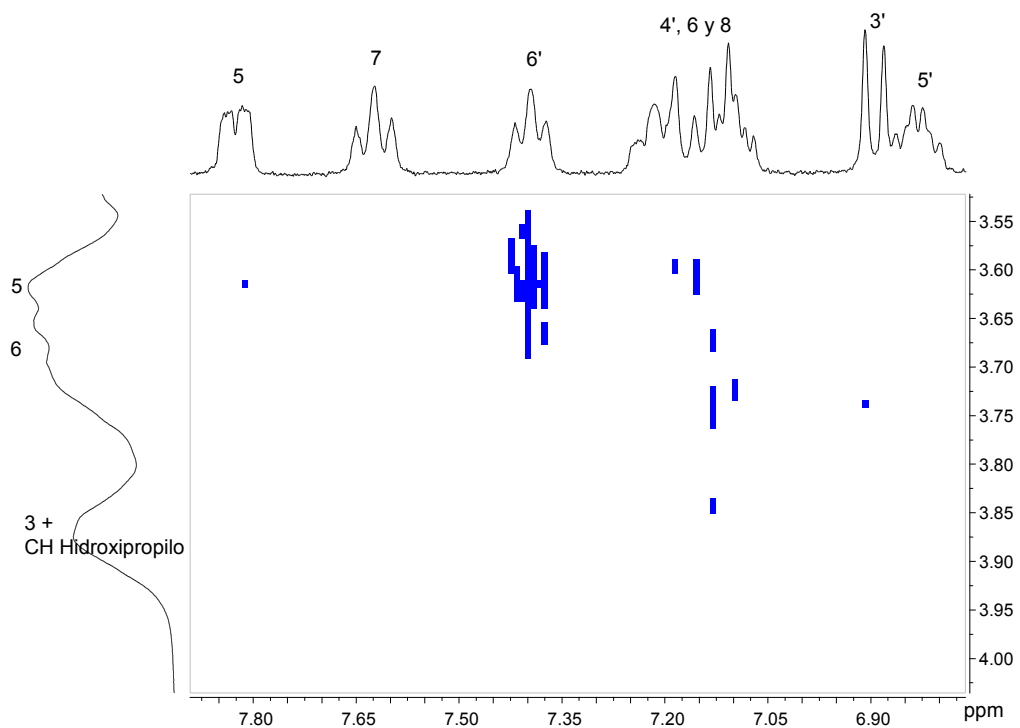
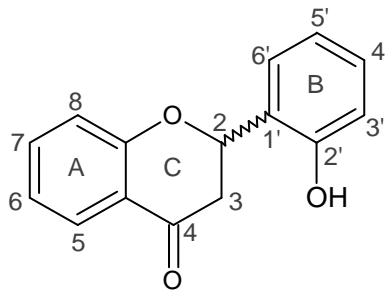


Figura 3.21
Geometría de inclusión propuesta para complejo 2'OHFL/ β CD.

2'-hidroxiflavanona/HP- β -ciclodextrina

2'-HIDROXIFLAVANONA



Espectro 3.32
Espectro 2D-ROESY del complejo 2'OHFL/HP β CD.

En el espectro 2D-ROESY del complejo 2'OHFL/HP β CD (Espectro 3.32) se observa principalmente la interacción del protón H6' del anillo B de la flavanona, con los protones H6 y H5 de la CD. Además se observan interacciones de, presumiblemente, los protones H6 y H8 de la flavanona con los protones H5 y H6 de la CD, pero estas de menor intensidad que las del protón H6' de la flavanona. Esto indicaría que el anillo B de la flavanona se encontraría inserto en la CD por el lado angosto de esta, y con el anillo A de la molécula orientado hacia el exterior. La geometría propuesta se ilustra en la Figura 3.22.

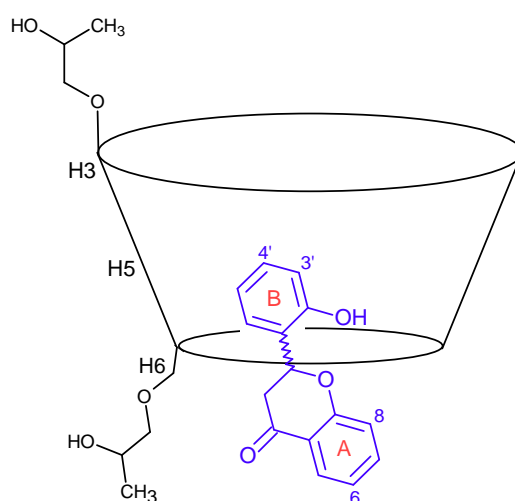
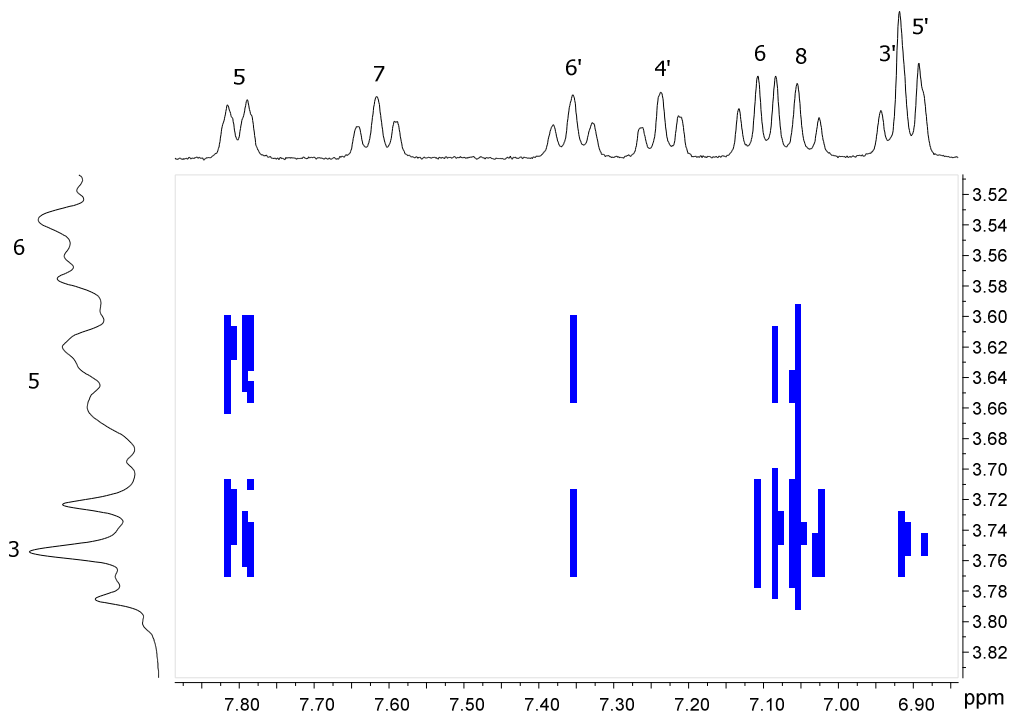
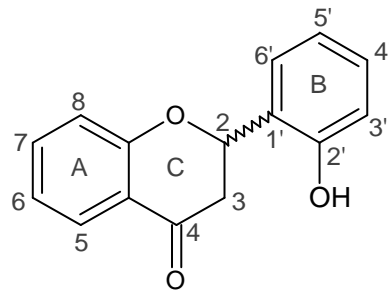


Figura 3.22
Geometría de inclusión propuesta para complejo 2'OHFL/HP β CD.

2'-hidroxiflavanona/DM- β -ciclodextrina

2'-HIDROXIFLAVANONA



Espectro 3.33
Espectro 2D-ROESY del complejo 2'OHFL/DM β CD.

El espectro 2D-ROESY del complejo 2'OHFL/DM β CD (Espectro 3.33) muestra interacciones de los protones H5, H6 y H8 del anillo A con los protones H5 de la DM β CD, indicando que esta porción de la 2'OHFL se encontraría inserta en la cavidad de la DM β CD. Adicionalmente, los mismo protones H5, H6 y H8 del anillo A, más los protones H3' y H5' del anillo B poseen interacciones con el hidrógeno H3 de la DM β CD, indicando que el anillo B de la flavanona se encontraría orientado hacia el borde ancho de la CD. La geometría se muestra en la Figura 3.23.

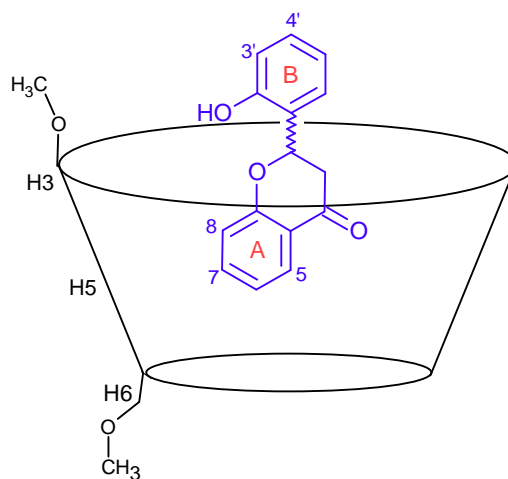


Figura 3.23
Geometría de inclusión propuesta para complejo 2'OHFL/DM β CD.

Comparando las inclusiones de todos los complejos, se observan variaciones en cuanto al número de geometrías propuestas para cada uno, donde para algunos complejos se encuentra solo una geometría de inclusión, y para otros dos. Al comparar los complejos formados con la HP β CD, se puede observar que todos estos presentan una única geometría de inclusión, mientras que los complejos formados con la DM β CD pueden presentar tanto una como dos geometrías. Adicionalmente se puede ver que todos los complejos formados con la β CD poseen dos geometrías de inclusión.

Destaca que en todos los complejos formados con la FL, esta flavanona se incluye por completo en la cavidad de la CD independientemente de cual CD sea usada. Por otra parte, en los complejos formados por las flavanonas hidroxiladas y las ciclodextrinas β CD y DM β CD, (2'OHFL y 4'OHFL)/(β CD y DM β CD), es la zona apolar de las flavanonas la que queda inserta en la cavidad de estas CDs. Este comportamiento muestra una tendencia a incorporar la zona más apolar de las flavanonas al interior de las ciclodextrinas, lo que es razonable si el interior de las CDs es menos polar que el solvente exterior, hacia donde es orientada la zona polar de las flavanonas, que poseen grupos hidroxilos capaces de deslocalizarse (Fig. 3.24).

En contraste con los complejos analizados previamente, aquellos que están formados por las flavanonas hidroxiladas, 2'OHFL y 4'OHFL, y la HP β CD, (2'OHFL y 4'OHFL)/HP β CD, poseen al grupo hidroxilo orientado hacia el interior de esta CD. Esto se podría explicar considerando que la HP β CD posee grupos sustituyentes de mayor tamaño y capaces de interactuar con la zona más apolar de estas flavanonas de manera tal que permitirían las geometrías de inclusión propuestas. Por otra parte, la existencia de estas geometrías avalaría la naturaleza semi-polar del interior de las ciclodextrinas, ya que algún tipo de interacción del tipo Van der Waals

tendría que estar presente para ubicar la zona más polar de las flavanonas hacia el interior de la cavidad de la CD, como fue discutido en la sección 3.1.4b.

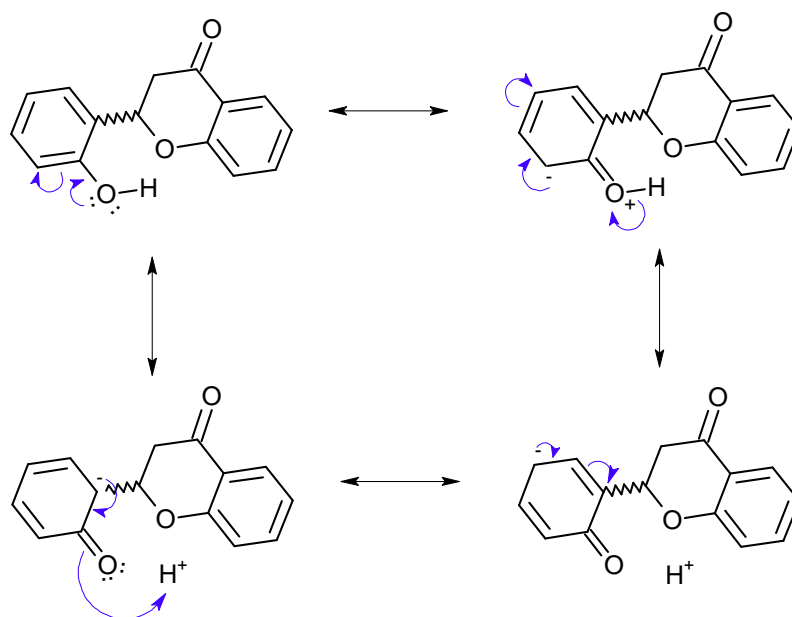


Figura 3.24

Estructuras resonantes de la 2'OHFL. Los electrones desapareados del grupo hidroxilo se deslocalizan hacia el anillo aromático, aumentando la polaridad del sistema.

En las geometrías de los complejos formados por la 2'OHFL y las CDs derivatizadas, se puede ver que la zona alifática de esta flavanona quedaría en el borde de la CD y con el grupo hidroxilo orientado hacia los grupos sustituyentes de las mismas. Si además recordamos que las constantes de acoplamiento de los hidrógenos alifáticos cambian al formarse los complejos (Tabla 3.5), y que tanto los valores de entalpía como de entropía son menores que los de sus complejos análogos, 4'OHFL y FL con CDs derivatizadas (Sección 3.1.4c), se podría inferir que al formarse los complejos entre la 2'OHFL y las CDs derivatizadas ocurre una mayor disminución en los grados de libertad conformacionales que para sus complejos análogos, con lo que además se podría sugerir la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo –OH de

la 2'OHFL y los grupos sustituyentes de las CDs derivatizadas. Por otra parte, si se observa la geometría de inclusión del complejo 2'OHFL/ β CD, se puede ver que nuevamente la zona alifática de esta flavanona quedaría en el borde de la CD. Sin embargo, este complejo no posee valores termodinámicos destacablemente menores, ni presenta variaciones en las constantes de acoplamiento como es para el caso de los complejos mencionados anteriormente, 2'OHFL/(HP β CD y DM β CD). Es por lo anterior que se propone que la fuente de las variaciones conformacionales y la formación del enlace de hidrógeno reside en la presencia de los grupos sustituyentes de las CDs derivatizadas.

En las geometrías de los complejos formados por la 4'OHFL y las ciclodextrinas β CD y DM β CD, se puede observar que el grupo hidroxilo quedaría orientado hacia el exterior de la ciclodextrina, lo que permitiría la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo -OH de esta flavanona y las moléculas de solvente que rodean al complejo. Esto se complementa y ratifica con los resultados termodinámicos discutidos previamente (Sección 3.1.4c).

Al comparar las geometrías de los complejos formados por la β CD, se puede observar que en aquellos en los que se incluyen la FL y la 4'OHFL, estas flavanonas se insertan en la cavidad de la CD casi completamente, mientras que cuando se incluye la 2'OHFL, el anillo B queda casi en su totalidad expuesto al exterior de la CD. Esta mayor exposición del anillo B permitiría un mayor número de grados de libertad conformacionales en relación a sus análogos, (FL y 4'OHFL)/ β CD, lo que se ve reflejado en los resultados termodinámicos anteriormente discutidos (Sección 3.1.4d).

3.1.6 *Discusión general de termodinámica y geometría de inclusión*

De acuerdo con lo discutido en las secciones 3.1.4 y 3.1.5, no existe una tendencia única ni general que pueda ser derivada de los resultados obtenidos, sino que dependerá de las flavanonas o ciclodextrinas analizadas. Sin embargo, hay que recalcar que los resultados termodinámicos concuerdan con las geometrías de inclusión determinadas.

Es importante destacar que los desplazamientos químicos de los hidrógenos de las flavanonas en los complejos de inclusión son concordantes con las geometrías de inclusión estimadas, ya que en $^1\text{H-RMN}$ las señales que presentan las mayores diferencias de desplazamiento químico con respecto a la fl pura, son las señales correspondientes a los hidrógenos insertos dentro de la cavidad de las CDs. De igual manera, para la mayoría de los complejos, las señales que poseen diferenciación enantiomérica se orientan hacia el borde de la estructura básica de las CDs.

El análisis inicial de las tendencias indica que en prácticamente todos los complejos estudiados de este trabajo, la zona apolar de las flavanonas se orienta hacia el interior de las CDs. Sin embargo, los complejos (2'OHFL y 4'OHFL)/HP β CD poseen geometrías opuestas. Esto ha sido explicado considerando dos fenómenos, i) que el interior de las ciclodextrinas es semi-polar, y ii) que los grupos sustituyentes hidroxipropilo presentan interacciones con la zona apolar de estas flavanonas, permitiendo así que estos complejos puedan presentar este tipo de geometría.

Por otra parte, al observar el conjunto de resultados para los complejos formados por las CDs derivatizadas, se ha sugerido que tanto los grados de

libertad como las entalpías de los complejos aumentan dependiendo de la flavanona incluida, en el siguiente orden,



Donde cabe destacar que esta tendencia no solo se propone en base a los resultados termodinámicos, sino que también en las geometrías de inclusión, y en el hecho de que al incluir la 2'OHFL esta presenta cambios en las constantes de acoplamiento, J , entre su estado libre y formando parte de los complejos, lo que no ocurre para el resto de los complejos. Adicionalmente se ha encontrado que la zona alifática de la 2'OHFL se encuentra en el borde de la estructura básica de las CDs derivatizadas, es decir orientada hacia la posición 6 de las CDs. Con lo anterior se ha sugerido que los complejos 2'OHFL/(DM β CD y HP β CD) podrían presentar puentes de hidrógeno entre la flavanona y la CD, y que los complejos 4'OHFL/(DM β CD y HP β CD) también presentarían puentes de hidrógeno, pero en este caso con las moléculas de solvente que rodean al complejo.

Finalmente, comparando los complejos formados con la β CD, se ha encontrado que las entalpías y grados de libertad aumentan dependiendo de la flavanona incluida, en el siguiente orden,



En este caso la 2'OHFL tendría más grados de libertad debido a que su geometría indica que el anillo B de esta flavanona quedaría totalmente expuesto al exterior de la β CD, pudiendo este rotar libremente. Por otra parte, la 4'OHFL sería la que posee la menor cantidad de grados de libertad y entalpía, debido no solo a que tiene la posibilidad de formar puentes de hidrógeno con el solvente que rodea al complejo, sino que también a que solo el grupo hidroxilo queda orientado hacia el

exterior de la CD, a diferencia de la 2'OHFL que orientaría el grupo B por completo hacia el exterior. Debido a que la FL no tiene grupos hidroxilo y a que se incluye completamente, esta flavanona no tiene la posibilidad de formar puentes de hidrógeno como la 4'OHFL, ni tiene una zona que pueda rotar tan libremente como la 2'OHFL, por lo tanto la FL tendría mayor entalpía y grados de libertad que la 4'OHFL, pero menos que la 2'OHFL, quedando de esta manera en el centro de la tendencia.

Como se puede observar, a grandes rasgos, las tendencias generales se han podido agrupar en los complejos formados por la β CD y las CDs derivatizadas. Esta clasificación sugeriría que la mayoría de las diferencias encontradas entre estos grupos serían consecuencia de las sustituciones que presentan las ciclodextrinas.

3.2 HPLC

3.2.1 Inyección de flavanonas sin CDs en fase móvil

20 μ L de solución 0.2 mg/mL de cada flavanona en metanol fueron inyectados independientemente en fase móvil metanol y mezclas metanol/agua a flujo constante de 1mL/min. Esto fue realizado con el objetivo de obtener los tiempos de retención de las flavanonas y su variación con el incremento de agua a la fase móvil. Debido a que en RMN las constantes de asociación fueron determinadas con un 40% de metanol, esta fue la proporción final con la que se trabajó en la fase móvil. Los resultados se muestran en la Tabla 3.19.

% H ₂ O	% MeOH	tr / min.		
		FL	2'OHFL	4'OHFL
0	100	2.85	2.63	2.47
20	80	5.67	4.38	3.37
40	60	25.71	16.82	8.69
60	40	245.8	140.2	59.3

Tabla 3.19
Tiempos de retención, tr, de flavanonas en fase móvil metanol/agua.

Los resultados de la Tabla 3.19 muestran que los tiempos de retención (tr) varían considerablemente al hacer cambios en la proporción de la fase móvil. Para todas las flavanonas, se observa un aumento en sus tiempos de retención, con el aumento de la proporción de agua. Lo anterior se atribuye a una disminución de la solubilidad de la flavanona en la fase móvil y por lo tanto un aumento de su retención en la columna.

3.2.2 Inyección de flavanonas con CDs en fase móvil

20 μ L de solución 0.2 mg/mL de cada flavanona en metanol fueron inyectados independientemente, en fase móvil metanol/agua, donde el agua contiene CD. Usando el promedio de las constantes de asociación se aplicó la ecuación 2.29 con la que se determinó la concentración mínima de CD a usar en la fase móvil. Debido a que en RMN la obtención de las K_a se realizó empleando un 40% de metanol-*d*4, en HPLC se empleó la misma cantidad de este solvente para iniciar las experiencias.

Los experimentos se iniciaron utilizando 1.2 mM de DM β CD en la fase móvil e inyectando la 4'OHFL, donde la proporción metanol/agua y el flujo fueron variados con el objetivo de observar si existían cambios tanto en los tiempos de retención, t_r , como en la separación enantiomérica. Los resultados son entregados en la Tabla 3.20 a continuación.

DM β CD						
[CD] _{agua} mM	[CD] _{f. móvil} mM	Flujo mL/min	% H ₂ O	% MeOH	t_r / min. 4'OHFL	α
2.0	1.0	0.7	50	50	22.3	-----
2.0	1.2	0.7	60	40	61.5	-----
2.0	1.0	1.0	50	50	18.8	-----
2.0	1.2	1.0	60	40	57.7	-----
2.0	1.4	1.0	70	30	-----	-----
2.0	1.0	1.2	50	50	17.0	-----

Tabla 3.20

Tiempos de retención de 4'OHFL en fase móvil metanol/agua(DM β CD). [DM β CD]_{agua} = 2.0mM. α = factor de separación.

A partir de la Tabla 3.20 se puede ver que a flujo y concentración constante de CD en agua, los tiempos de retención aumentan al aumentar la proporción de agua en la fase móvil. Además se observa que el uso de la ecuación 2.29 no es realmente representativo de la concentración ideal de CD en la fase móvil, ya que no hay separación enantiomérica. Por lo anterior la concentración de DM β CD se cambió, utilizando el doble de la concentración entregada por la ecuación 2.29 y utilizando además la concentración máxima empleada para la determinación de las K_a . Los resultados son entregados en la Tabla 3.21 a continuación.

DM β CD							
[CD] _{agua} mM	[CD] _{f. móvil} mM	Flujo mL/min	% H ₂ O	% MeOH	tr / min.		α
					4'OHFL		
4.0	2.2	0.8	55	45	31.8		-----
4.0	2.0	1.0	50	50	21.6		-----
4.0	2.2	1.0	55	45	32.8	33.4	1.02
4.0	2.4	1.0	60	40	-----		-----
4.0	2.2	1.1	55	45	28.3	28.9	1.02
16.7	10	1.0	60	40	19.4	20.2	1.04

Tabla 3.21

Tiempos de retención de 4'OHFL en fase móvil metanol/agua(DM β CD). [DM β CD]_{agua} = 4.0mM y 16.7mM. α = factor de separación.

De acuerdo con la Tabla 3.21, al usar 2.2mM de DM β CD en la fase móvil se logró obtener separación enantiomérica, sin embargo, esta fue lograda utilizando una relación agua/metanol de 55/45. Por otra parte, al usar la concentración máxima de DM β CD, [DM β CD]_{f.móvil} = 10mM, se obtuvo separación enantiomérica y una disminución importante en los tiempos de retención en comparación a usar [DM β CD]_{f.móvil} = 2.2mM.

Debido a que utilizando la DM β CD la mejor separación se obtuvo utilizando el máximo de su concentración, la inyección de las flavanonas 2'OHFL y FL fue realizada empleando esta misma, [DM β CD]_{f.móvil} = 10mM. Los resultados se muestran en la Tabla 3.22 a continuación.

DM β CD							
[CD] _{agua}	[CD] _{f. móvil}	Flujo	% H ₂ O	% MeOH	tr / min		α
mM	mM	mL/min			2'OHFL		
16.7	10	1.0	60	40	29.4	31.4	1.07
FL							
16.7	10	1.0	60	40	51.6		-----

Tabla 3.22

Tiempos de retención de 2'OHFL y FL en fase móvil metanol/agua(DM β CD). [DM β CD]_{agua} = 16.7mM. α = factor de separación.

De acuerdo a la Tabla 3.22, la 2'OHFL presenta separación enantiomérica, mientras que la FL no lo hace.

A partir de las Tablas 3.21 y 3.22, se puede observar que al utilizar [DM β CD]_{f.móvil} = 10mM, los valores de los factores de separación, α , corresponden a 1.04 y 1.07 para la 4'OHFL y la 2'OHFL, respectivamente. Estos valores son congruentes con los valores de Ka¹/Ka² obtenidos a través RMN, donde mediante esta última técnica se obtuvieron valores promedio de Ka¹/Ka² de alrededor de 1.05 y 1.06 para la 4'OHFL y 2'OHFL, respectivamente. A diferencia de los resultados con las flavanonas hidroxiladas, la FL no presenta separación, lo que ocurre a pesar de que posee los mayores valores de Ka¹/Ka². Lo anterior podría ser consecuencia de las pequeñas constantes de asociación que poseen los complejos FL/DM β CD, ya que esto implicaría que una gran cantidad de FL estaría más tiempo en solución que formando

parte del complejo. Los cromatogramas de las tres flavanonas usando $[DM\beta CD]_{f.m\acute{o}vil} = 10mM$ se muestran en la Figura 3.25.

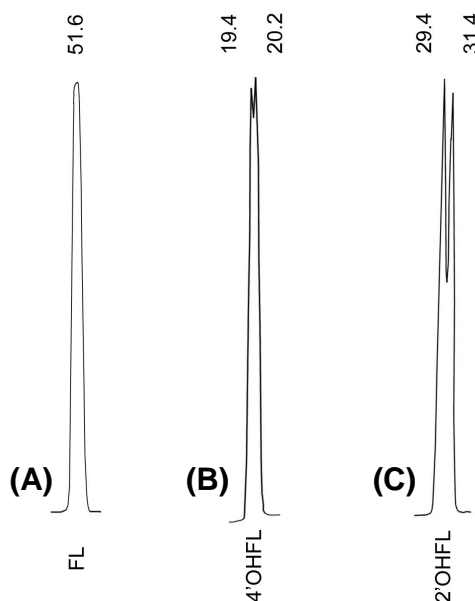


Figura 3.25

Extractos de cromatogramas de flavanonas diferenciadas en HPLC usando $DM\beta CD$ en la fase móvil. En la parte superior se entregan los tiempos de retención (min.) registrados. $[DM\beta CD]_{f.m\acute{o}vil} = 10mM$. Metanol:agua, 40:60. Flujo = 1mL/min. (A) Pico para FL, (B) Picos para 4'OHFL y (C) Picos para 2'OHFL.

En la Figura 3.25, se observa que a pesar de que los enantiómeros de las flavanonas hidroxiladas poseen diferentes tiempos de retención usando $DM\beta CD$ en la fase móvil, esta separación no es suficiente como para ver los picos completamente separados, y por lo tanto solo se diferencian.

Al iniciar los experimentos utilizando la $HP\beta CD$, el procedimiento fue similar al empleado con la $DM\beta CD$. Primero se inyectó la 4'OHFL usando la $HP\beta CD$ en la concentración entregada por la ecuación 2.29. Además se variaron tanto el flujo como la proporción de solventes con el objetivo de observar si existían cambios en los tiempos de retención, t_r , y en la separación enantiomérica. Los resultados mostraron

que no hay separación enantiomérica bajo estas condiciones, por lo que la concentración de HP β CD se aumentó al máximo, [HP β CD]_{f.móvil} = 20mM. Nuevamente los resultados demostraron que no hay separación enantiomérica. Pese a los resultados negativos, de igual manera las flavanonas 2'OHFL y FL fueron inyectadas, pero usando únicamente la concentración máxima de HP β CD. Como resultado se obtuvo que no hay separación enantiomérica. Los resultados usando HP β CD se muestran en las Tablas 3.23 y 3.24.

HP β CD						
[CD] _{agua} mM	[CD] _{f. móvil} mM	Flujo mL/min	% H ₂ O	% MeOH	tr / min. 4'OHFL	α
14.0	7.7	1.0	55	45	18.1	-----
14.0	8.4	1.0	60	40	25.0	-----
14.0	9.1	1.0	65	35	32.2	-----
14.0	9.8	1.0	70	30	42.2	-----
33.4	20.0	1.0	60	40	18.5	-----
33.4	20.0	0.8	60	40	20.9	-----
33.4	20.0	0.6	60	40	26.8	-----
33.4	21.7	0.8	65	35	26.0	-----
33.4	21.7	0.6	65	35	32.8	-----
33.4	23.4	0.6	70	30	35.2	-----
33.4	25.0	0.6	75	25	47.2	-----
33.4	26.7	0.7	80	20	47.1	-----
33.4	26.7	0.6	80	20	52.3	-----
33.4	28.4	0.6	85	15	58.2	-----

Tabla 3.23

Tiempos de retención de 4'OHFL en fase móvil metanol/agua(HP β CD). [HP β CD]_{agua} = 14.0mM y 33.4mM. α = factor de separación.

HP β CD						
[CD] _{agua}	[CD] _{f. móvil}	Flujo	% H ₂ O	% MeOH	tr / min	α
mM	mM	mL/min			2'OHFL	
33.4	20.0	1.0	60	40	22.9	-----
					FL	
33.4	20.0	1.0	60	40	64.3	-----

Tabla 3.24

Tiempos de retención de 2'OHFL y FL en fase móvil metanol/agua(HP β CD). [HP β CD]_{agua} = 33.4mM. α = factor de separación.

A partir de la Tabla 3.23 se puede observar que nuevamente a flujo y concentración constante de HP β CD, los tiempos de retención aumentan al aumentar la proporción de agua en la fase móvil.

Por otra parte, las razones entre constantes de asociación, K_a^1/K_a^2 , obtenidas por RMN indican que la separación enantiomérica usando HP β CD debiera haber ocurrido, ya que por ejemplo, el complejo 4'OHFL/HP β CD presenta valores de razón de alrededor de 1.3. Sin embargo, la separación no ocurre. Esto es evidencia de que la separación mediante HPLC no solo depende de esta razón, sino que también de los valores de las K_a . Esto se plantea debido a que la 4'OHFL si presenta separación al inyectarse en presencia de la DM β CD, ciclodextrina con la que posee una razón de alrededor de 1.05, valor que es bastante inferior al 1.3 obtenido para los complejos 4'OHFL/HP β CD. En contraste, los complejos 4'OHFL/DM β CD poseen K_a de alrededor de $8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ a 25°C, mientras que los complejos 4'OHFL/HP β CD poseen valores de K_a de alrededor de $2.7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ a 25°C.

Otra evidencia de que los valores de las K_a son importantes al momento de intentar separar mediante HPLC la muestra el comportamiento de la FL.

Esta flavanona no se separa mediante HPLC y presenta valores de K_a^1/K_a^2 de alrededor de 1.2 al formar complejos con la DM β CD, donde sus valores de K_a son de alrededor de $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. Por otra parte, cuando se inyecta la 4'OHFL si hay separación enantiomérica al usar la DM β CD en la fase móvil, donde este complejo, 4'OHFL/DM β CD, presenta valores de razón de alrededor de 1.05 y valores de K_a de alrededor de $8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

Por lo tanto, de los resultados obtenidos se puede concluir que para predecir una efectiva diferenciación mediante HPLC no solo se requiere de razones entre constantes de asociación de al menos 1.05, sino que también de valores de K_a de al menos $8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha demostrado que las moléculas (\pm)-flavanona, (\pm)-4'-hidroxiflavanona y (\pm)-2'-hidroxiflavanona se incluyen en las ciclodextrinas nativa, DM β CD y HP β CD.

Debido a que la mayoría de los complejos presentaron diferenciación enantiomérica a través de RMN, fue posible el estudio independiente de los complejos diastereoisoméricos formados, obteniéndose su estequiometría, constantes de asociación y termodinámica, donde la estequiometría para todos los complejos es de 1:1.

En cuanto a las constantes de asociación, su tendencia fue a la disminución con la temperatura. Destaca que los complejos formados por la β CD son los que presentan menores constantes de asociación y por el contrario, los formados por la DM β CD, son los que presentan las mayores.

A partir de la termodinámica de los complejos, se puede concluir que el proceso de inclusión es un fenómeno complejo y que involucra varios tipos de interacciones que cooperan mutuamente para que el complejo pueda formarse, donde ninguna fuerza es por sí sola suficiente como para dar lugar a la formación de dichos complejos. Sin embargo, y en base a los resultados termodinámicos, se ha propuesto que las interacciones de Van der Waals son las que más contribuyen al proceso de inclusión.

Adicionalmente, se determinó que la formación de todos los complejos es espontánea, donde todos ellos se forman mediante procesos exotérmicos y con pérdida de entropía.

Para los complejos de este trabajo, se ha determinado que tanto las contribuciones entálpicas como entrópicas aportan al fenómeno de discriminación

enantiomérica, esto cuando se trabaja a temperaturas cercanas a la ambiente. Adicionalmente, se ha determinado que a temperaturas por debajo de la ambiente, son las contribuciones entrópicas las que más aportarían más a la diferenciación enantiomérica, mientras que las contribuciones entálpicas son las que aportarían mayoritariamente a temperaturas superiores a la ambiente.

A pesar de que los espectros ^1H -RMN muestran diferenciación enantiomérica, en los espectros ROESY esto no es posible, y por lo tanto solo se puede determinar la geometría de los complejos diastereoisoméricos en su conjunto, y no por separado.

Las geometrías de inclusión de los complejos indican que no existe una única forma de inclusión, ya que más de un complejo presentó dos geometrías diferentes. Es destacable que en la mayoría de los complejos la zona más apolar de las flavanonas queda orientada hacia el interior de la cavidad de las CDs.

Además de las geometrías de inclusión, es destacable el cambio en las constantes de acoplamiento de los protones alifáticos de la 2'OHFL al incluirse en las ciclodextrinas derivatizadas. Esto indica cambios conformacionales que, en conjunto con las variaciones geométricas que presentan los complejos, podrían dar lugar a la diferenciación enantiomérica.

A partir de las geometrías y termodinámica de los complejos de inclusión, se ha propuesto la presencia de puentes de hidrógeno, donde en algunos casos estos se darían entre la flavanona y la ciclodextrina, y en otros casos entre la flavanona y las moléculas de solvente que rodean al complejo.

A partir de los resultados obtenidos en HPLC, se puede observar que la única ciclodextrina que permite la diferenciación enantiomérica es la DM β CD.

Además se ha podido concluir que la predicción de la separación enantiomérica mediante esta técnica no solo requiere de obtener valores de razón entre constantes de asociación diferentes de 1 para un complejo dado, sino que además requiere de valores de constantes de asociación lo suficientemente grandes como para que una cantidad adecuada de flavanona se incluya y por lo tanto la separación sea efectiva. Con estos resultados, se puede concluir que para al menos tener diferenciación enantiomérica en esta técnica, los valores de Ka^1/Ka^2 y Ka deben ser de al menos 1.05 y $8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, respectivamente.

REFERENCIAS

- 1.- S. C. Stinson, *Chem. Eng. News.*, **78**, (2000), 55 – 78.
- 2.- R. Sancho, C. Minguillón, *Chem. Soc. Rev.*, **38**, (2009), 797 – 805.
- 3.- D. R. Brocks, *Biopharm. Drug Dispos.*, **27**, (2006), 387 – 406.
- 4.- B. Kasprzyk-Hordern, *Chem. Soc. Rev.*, **39**, (2010), 4466 – 4503.
- 5.- F. Jamali, R. Mehvar, F. M. Pasutto, *J. Pharm. Sci.*, **78**, (1989), 695 – 715.
- 6.- D. R. Brocks, F. Jamali, *Pharmacotherapy*, **15**, (1995), 551 – 564.
- 7.- I. W. Wainer, *Ann. Oncol.*, **4**, (1993), 7 – 13.
- 8.- R. T. Coutts, G. B. Baker, *Prog. Neuro-Psychoph.*, **13**, (1989), 405 – 417.
- 9.- R. T. Coutts, G. B. Baker, *Chirality*, **1**, (1989), 99 – 120.
- 10.- G. L. Anderson, S. T. Page, *J. Chem. Educ.*, **81**, (2004), 971 – 974.
- 11.- M. Rouhi, *Chem. Eng. News.*, **83**, (2005), 122 – 123.
- 12.- S. C. Stinson, *Chem. Eng. News*, **77**, (1999), 101 – 120.
- 13.- S. C. Stinson, *Chem. Eng. News.*, **73**, (1995), 44 – 74.
- 14.- W. Anczewski, H. Dodziuk, A. Ejchart, *Chirality*, **15**, (2003), 654 – 659.
- 15.- S. M. Ali, S. K. Upadhyay, *J. Incl. Phenom, Macro.*, **62**, (2008), 161 – 165.
- 16.- S. M. Ali, S. K. Upadhyay, *Magn. Reson. Chem.*, **46**, (2008), 676 – 679.
- 17.- H. Duddeck, E. Díaz Gómez, *Chirality*, **21**, (2009), 51 – 68.
- 18.- R. Vespalec, P. Boček, *Chem. Rev.*, **100**, (2000), 3715 – 3753.
- 19.- B. Chankvetadze, *Electrophoresis*, **23**, (2002), 4022 – 4035.
- 20.- B. Chankvetadze, W. Lindner, G. K. E. Scriba, *Anal. Chem.*, **76**, (2004), 4256 – 4260.
- 21.- K. Michalska, G. Pajchel, S. Tyski, *J. Chromatogr. A*, **1180**, (2008), 179 – 186.
- 22.- M. Lämmerhofer, *J. Chromatogr. A*, **1217**, (2010), 814 – 856.

- 23.- R. Cirilli, R. Ferretti, B. Gallinella, F. La Torre, A. Mai, D. Rotili, *J. Sep. Sci.*, **29**, (2006), 1399 – 1406.
- 24.- P. Vodička, L. Streinz, J. Vávra, B. Koutek, M. Buděšínský, J. Ondráček, I. Císařová, *Chirality*, **17**, (2005), 378 – 387.
- 25.- M. Shizuma, Y. Kadoya, Y. Takai, H. Imamura, H. Yamada, T. Takeda, R. Arakawa, S. Takahashi, M. Sawada, *J. Org. Chem.*, **67**, (2002), 4795 – 4807.
- 26.- M. Wedig, S. Laug, T. Christians, M. Thunhorst, U. Holzgrabe, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **27**, (2002), 531 – 540.
- 27.- S. D. Banik, N. Nandi, *Colloid. Surface. B*, **74**, (2009), 468 – 476.
- 28.- Z. Guo, Y. Du, Y. Chen, Siu-Choon Ng, Y. Yang, *J. Phys. Chem. C*, **114**, (2010), 14353 – 14361.
- 29.- T. J. Wenzel, J. D. Wilcox, *Chirality*, **15**, (2003), 256 – 270.
- 30.- G. A. Hembury, V. V. Borovkov, Y. Inoue, *Chem. Rev.*, **108**, (2008), 1 – 73.
- 31.- Q. Sun, S. V. Olesik, *Anal. Chem.*, **71**, (1999), 2139 – 2145.
- 32.- G. Gübitz and M. G. Schmid, *Biopharm. Drug Dispos.*, **22**, (2001), 291 – 336.
- 33.- G. Borodi, I. Bratu, F. Dragan, R. Peschar, R. B. Helmholtz, A. Hernanz, *Spectrochim. Acta A*, **70**, (2007), 1041 – 1048.
- 34.- Y. He, X. Shen, H. Gao, Y. He, *J. Photoch. Photobio. A*, **193**, (2008), 178 – 186.
- 35.- S. Tommasini, M. L. Calabrò, R. Stancanelli, P. Donato, C. Costa, S. Catania, V. Villari, P. Ficarra, R. Ficarra, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **39**, (2005), 572 – 580.
- 36.- C. Jullian, S. Miranda, G. Zapata-Torres, F. Mendizábal, C. Olea-Azar, *Bioorgan. Med. Chem.*, **15**, (2007), 3217 – 3224.
- 37.- C. Jullian, L. Moyano, C. Yañez, C. Olea-Azar, *Spectrochim. Acta A*, **67**, (2007), 230 – 234.
- 38.- C. Jullian, T. Orosteguis, F. Pérez-Cruz, P. Sánchez, F. Mendizábal, C. Olea-Azar, *Spectrochim. Acta A*, **71**, (2008), 269 – 275.
- 39.- A. F. Casy, *Trac-Trend. Anal. Chem.*, **12**, (1993), 185 – 189.
- 40.- J. Szejtli, *Chem. Rev.*, **98**, (1998), 1743 – 1753.
- 41.- H. Dodziuk, W. Koźmiński, and A. Ejchart, *Chirality*, **16**, (2004), 90 – 105.

- 42.- F. Bressolle, M. Audran, T. N. Pham, J. J. Vallon, *J. Chromatogr. B*, **687**, (1996), 303 – 336.
- 43.- P. Rodríguez-Bonilla, J. M. López-Nicolás, F. García-Carmona, *J. Chromatogr. B*, **878**, (2010), 1569 – 1575.
- 44.- K. Fujimura, T. Ueda, M. Kitagawa, H. Takayanagi, T. Ando, *Anal. Chem.*, **58**, (1986), 2668 – 2674.
- 45.- G. Tárkányi, *J. Chromatogr. A.*, **961**, (2002), 257 – 276.
- 46.- P. Salvadori, G. Uccello-Barreta, F. Balzano, C. Bertucci, C. Chiavacci, *Chirality*, **8**, (1996), 423 – 429.
- 47.- A. F. Casy, A. D. Mercer, *Magn. Reson Chem.*, **26**, (1988), 765 – 774.
- 48.- G. Uccello-Barreta, F. Balzano, R. Menicagli, P. Salvadori, *J. Org. Chem.*, **61**, (1996), 363 – 365.
- 49.- A. Guerrero-Martínez, T. Montoro, M. H. Viñas, G. Tardajos, *J. Pharm. Sci.*, **97**, (2008), 1484 – 1498.
- 50.- L. Fielding, *Tetrahedron*, **56**, (2000), 6151 – 6170.
- 51.- R. A. Mantz, P. C. Trulove, R. T. Carlin, R. A. Osteryoung, *Inorg. Chem.*, **34**, (1995), 3846 – 3847.
- 52.- Jürgen Schleucher and Sybren S. Wijmenga, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, (2002), 5881 – 5889.
- 53.- V.V. Krishnan and Monique Cosman, *J. Biomol. NMR*, **12**, (1998), 177 – 182.
- 54.- J. H. Antony, A. Dölle, D. Mertens, P. Wasserscheid, W. R. Carper, P. G. Wahlbeck, *J. Phys. Chem. A*, **109**, (2005), 6676 – 6682.
- 55.- C. M. Fernandes, R. A. Carvalho, S. Pereira da Costa, F. J. B. Veiga, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **18**, (2003), 285 – 296.
- 56.- C. Hellriegel, H. Händel, M. Wedig, S. Steinhauer, F. Sörgel, K. Albert, U. Holzgrabe, *J. Chromatogr. A*, **914**, (2001), 315 – 324.
- 57.- G. Fronza, A. Mele, E. Redenti, P. Ventura, *J. Org. Chem.*, **61**, (1996), 909 – 914.
- 58.- M. Ghosh, T. C. Sanders, R. Zhang, and C. T. Seto, *Org. Lett.*, **1**, (1999), 1945 – 1948.
- 59.- S. M. Ali, S. K. Upadhyay, *Magn. Reson. Chem.*, **46**, (2008), 676 – 679.

- 60.- Y. Tsai, H. Tsai, C. Wu, F. Tsai, *Food Chem.*, **120**, (2010), 837 – 841.
- 61.- Y. Gao, X. Zhao, B. Dong, L. Zheng, N. Li, S. Zhang, *J. Phys. Chem. B*, **110**, (2006), 8576 – 8581.
- 62.- P. Forgo, I. Vincze, K. E. Kövér, *Steroids*, **68**, (2003), 321 – 327.
- 63.- M. C. Bergonzi, A. R. Bilia, L. Di Bari, G. Mazzi, F. F. Vincieri, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, (2007), 5744 – 5748.
- 64.- G. Mehta, *Chem. Rev.*, **97**, (1997), 671 – 719.
- 65.- K. Miyashita, T. Imanishi, *Chem. Rev.*, **105**, (2005), 4515 – 4536.
- 66.- J. B. Laursen, J. Nielsen, *Chem. Rev.*, **104**, (2004), 1663 – 1685.
- 67.- A. Parenty, X. Moreau, J. M. Campagne, *Chem. Rev.*, **106**, (2006), 911 – 939.
- 68.- P. G. Pietta, *J. Nat. Prod.*, **63**, (2000), 1035 – 1042.
- 69.- S. Das, J. P. N. Rosazza, *J. Nat. Prod.*, **69**, (2006), 499 – 508.
- 70.- A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, *Crit. Rev. Food Sci.*, **45**, (2005), 287 – 306.
- 71.- Y. Jin Moon, X. Wang, M. E. Morris, *Toxicol. in vitro*, **20**, (2006), 187 – 210.
- 72.- R. Bugianesi, G. Catasta, P. Spigno, A. D'Uva, G. Maiani, *J. Nutr.*, **132**, (2002), 3349 – 3352.
- 73.- G. Le Gall, M.S. DuPont, F. A. Mellon, A. L. Davis, G. J. Collins, M. E. Verhoeyen, I. J. Colquhoun, *J. Agr. Food Chem.*, **51**, (2003), 2438 – 2446.
- 74.- C. Manach, C. Morand, A. Gil-Izquierdo, C. Bouteloup-Demange, C. Remesy, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **57**, (2003) 235 – 242.
- 75.- J. A. Yáñez, P. K. Andrews, N. M. Davies, *J. Chromatogr. B*, **848**, (2007), 159 – 181.
- 76.- S. Hwang, G. Yen, *J. Agr. Food Chem.*, **56**, (2008), 859 – 864.
- 77.- H. J. Heo, D. Kim, S. C. Shin, M. J. Kim, B. G. Kim and Dong-Hoon Shin, *J. Agr. Food Chem.*, **52**, (2004), 1520 – 1525.
- 78.- Y. Hsiao, Y. Hsieh, W. Kuo, H. Chiou, S. Yang, W. Chiang & S. Chu, *J. Biomed. Sci.*, **14**, (2007), 107 – 119.

- 79.- Y. Hsiao, W. Kuo, P. Chen, H. Chang, T. Lin, W. Yang, Y. Hsieh, S. Chu, *Chem.-Biol. Interact.*, **167**, (2007), 193 – 206.
- 80.- C. H. Park, E. R. Hahm, J. H. Lee, K. C. Jung, C. H. Yang, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **331**, (2005), 1222 – 1228.
- 81.- C. Ko, S. Shen and Y. Chen, *Free Radical Bio. Med.*, **36**, (2004), 897 – 910.
- 82.- S. Shen, C. Ko, S. Tseng, S. Tsai, and Y. Chen, *Toxicol. Appl. Pharm.*, **197**, (2004), 84 – 95.
- 83.- Y. Steffen, C. Gruber, T. Schewe, H. Sies, *Arch. Biochem. Biophys.*, **469**, (2008), 209 – 219.
- 84.- R. A. S. Schweizer, A. G. Atanasov, B. M. Frey, A. Odermantt, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **212**, (2003), 41 – 49.
- 85.- B. Moulari, Y. Pellequer, H. Lboutounne, C. Girard, J.-P. Chaumont, J. Millet, F. Muyard, *J. Ethnopharmacol.*, **106**, (2006), 272 – 278.
- 86.- N. S. H. N. Moorthy, R. J. Singh, H. P. Singh, S. D. Gupta, *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, (2006), 1384 – 1390.
- 87.- D. R. Brocks, R. Mehvar, *Clin. Pharmacokinet.*, **42**, (2003), 1359 – 1382.
- 88.- R. Mehvar, D. R. Brocks, *J. Pharm. Sci.*, **4**, (2001), 185 – 200.
- 89.- R. Mehvar, D. R. Brocks, M. Vakily, *Clin. Pharmacokinet.*, **41**, (2002), 533 – 558.
- 90.- M. Vakily, R. Mehvar, D. R. Brocks, *Ann. Pharmacother.*, **36**, (2002), 693 – 701.
- 91.- L. Cui, H. S. Lee, D. T. Ndinteh, J. T. Mbafor, Y. H. Kim, T. V. Le, P. H. Nguyen, W. K. Oh, *Planta Med.*, **76**, (2010), 713 – 718.
- 92.- M. L. Toumi, S. Merzoug, A. Boutefnouchet, A. Tahraoui, K. Ouali, M. A. Guellati, *J. Med. Plants. Res.*, **3**, (2009), 862 – 869.
- 93.- A. Crozier, I. B. Jaganath, M. N. Clifford, *Nat. Prod. Rep.*, **26**, (2009), 1001 – 1043.
- 94.- J. A. Yáñez, N. M. Davies, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **39**, (2005), 164 – 169.
- 95.- J. A. Yáñez, C. M. Remsberg, N. D. Miranda, K. R. Vega-Villa, P. K. Andrews, N. M. Davies, *Biopharm. Drug. Dispos.*, **29**, (2008), 63 – 82.
- 96.- J. K. Takemoto, C. M. Remsberg, J. A. Yáñez, K. R. Vega-Villa, N. M. Davies, *J. Chromatogr. B*, **875**, (2008), 136 – 141.

- 97.- K. R. Vega-Villa, C. M. Remsberg, K. L. Podelnyk, N. M. Davies, *J. Chromatogr. B*, **875**, (2008), 142 – 147.
- 98.- W. Brand, J. Shao, E. F. Hoek-van den Hil, K. N. van Elk, B. Spengelink, I. H. J. de Haan, M. J. Rein, F. Dionisi, G. Williamson, P. J. van Bladeren, I. M. C. M. Rietjens, *J. Agr. Food Chem.*, **58**, (2010), 6119 – 6125.
- 99.- Organización Mundial de la salud.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>
- 100.- P. Alberts, L. Engblom, N. Edling, M. Forsgren, G. Klingström, C. Larsson, Y. Rönquist-Nii, B. Öhman, L. Abrahmsén; *Diabetologia*; **45**, (2002), 1528 – 1532.
- 101.- J. Zhang, T. D. Osslund, M. H. Plant, C. L. Clogston, R. E. Nybo, F. Xiong, J. M. Delaney, S. R. Jordan, *Biochemistry*, **44**, (2005), 6948 – 6957.
- 102.- I. V. M. V. Enoch, M. Swaminathan, *J. Lumin.* **127**, (2007), 713 – 720.
- 103.- D. K. Balta, N. Arsu, *J. Photoch. Photobio. A*, **200**, (2008), 377 – 380.
- 104.- Salvatierra D., Díez C., Jaime C., *J. Inclus. Phenom. Mol.*, **27**, (1997), 215 – 231.
- 105.- J. L. Mieusset, D. Krois, M. Pacar, L. Brecker, G. Giester, U. H. Brinker, *Org. Lett.*, **6**, (2004), 1967 – 1970.
- 106.- K. Hirose, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **39**, (2001), 193 – 209.
- 107.- R. Wang, Z. Yu, *Acta Phys. –Chim. Sin.*, **23**, (2007), 1353 – 1359.
- 108.- J. T. MacQueen, *J. Chem. Ed.*, **44**, (1967), 755 – 756.
- 109.- M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.*, **98**, (1998), 1875 – 1917.
- 110.- R. E. Brewster, B. F. Teresa, M. D. Schuh, *J. Phys Chem. A*, **107**, (2003), 10521 – 10526.
- 111.- M. Karplus, *J. Chem. Phys.*, **30**, (1959), 11 – 15.
- 112.- A. G. Kutateladze, J. M. Hornback, *J. Chem. Ed.*, **78**, (2001), 81 – 82.
- 113.- G. A. Bottomley, P. R. Jefferies, *Aust. J. Chem.*, **14**, (1961), 657 – 659.
- 114.- Lei Liu and Qing-Xiang Guo, *J. Incl. Phenom.*, **42**, (2002), 1 – 14.
- 115.- K. A. Connors, *Chem. Rev.*, **97**, (1997), 1325 – 1357.

- 116.- G. Hummer, S. Garde, A. E. García, L. R. Pratt, *Chem. Phys.*, **258**, (2000), 349 – 370.
- 117.- D. L. VanderJagt, F. L. Killian, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, (1970), 1016 – 1022.
- 118.- S. Hamai, A. Takahashi, *J. Incl. Phenom.*, **37**, (2000), 197 – 207.
- 119.- S. Miertus, V. Frecer, E. Chiellini, F. Chiellini, R. Solaro, J. Tomasi, *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn.*, **32**, (1998), 23 – 46.
- 120.- M. M. Al-Omari, M. I. El-Barghouthi, M. B. Zughul, J. E. D. Davies, A. A. Badwan, *J. Mol. Liq.*, **155**, (2010), 103 – 108.
- 121.- I. Tabushi, Y. Kiyosuke, T. Sugimoto, K. Yamamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, (1978), 916 – 919.
- 122.- Y. Inoue, T. Hakushi, Y. Liu, L. Tong, B. Shen, D. Jin, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, (1993), 475 – 481.
- 123.- Y. Inoue, Y. Liu, L.-H. Tong, B.-J. Shen, D.-S. Jin, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, (1993), 10637 – 10644.
- 124.- M. V. Rekharsky, R. N. Goldberg, F. P. Schwarz, Y. B. Tewari, P. D. Ross, Y. Yamashoji, Y. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, (1995), 8830 – 8840.
- 125.- M. V. Rekharsky, M. P. Mayhew, R. N. Goldberg, P. D. Ross, Y. Yamashoji, Y. Inoue, *J. Phys. Chem. B*, **101**, (1997), 87 – 100.
- 126.- Y. Liu, B. Li, T. Wada, Y. Inoue, *J. Incl. Phenom.*, **36**, (2000), 311 – 325.
- 127.- M. Rekharsky, Y. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, (2000), 4418 – 4435.
- 128.- A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine, V. T. D'Souza, *Chem. Rev.*, **98**, (1998), 1977 – 1996.