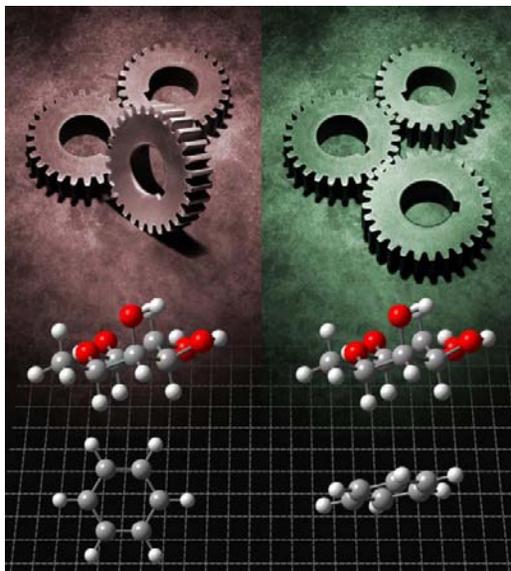




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Origen y Consecuencias de las Interacciones que Determinan el Reconocimiento Molecular
entre Carbohidratos y Compuestos Aromáticos (CH/π), la Reactividad en Cicloadiciones de
Diels-Alder ($\pi-\pi$) y la Conformación ($CH\cdots OP$).**



TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Karla Elizabeth Ramírez Gualito

TUTOR: Dr. Gabriel E. Cuevas González-Bravo
AÑO: 2010



Portada:

El *Reconocimiento Molecular* por Mario Edgar Cruz Márquez.

El reconocimiento molecular es un proceso fundamental y determinante en los seres vivos, es el inicio de muchos eventos moleculares y celulares y la especificidad es la que desencadena que el engranaje biológico inicie sus funciones. El engranaje es capaz de reconocer a dos carbohidratos isoméricos y es así como la interacción proteína carbohidrato inicia muchas funciones biológicas como nuestro principio: la fecundación.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 1-1 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Gabriel Eduardo Cuevas González-Bravo, con una beca de doctorado otorgada por el CONACyT (No. de registro 202521) y con recursos del proyecto 49921-Q. Así mismo se contó con recursos de los proyecto IN-209606 e IN-203510-3 de DGAPA-UNAM.

Parte de los resultados de Resonancia Magnética Nuclear se obtuvieron en el laboratorio 001 del Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC en Madrid, España en el grupo del Prof. Jesús Jiménez Barbero a través den una beca Mixta otorgada por CONACyT.

Parte de los resultados que aquí se reportan fueron presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas y han generado dos publicaciones.

Reuniones Científicas:

- **1a. Jornada de Ciencias Químicas 2101**, modalidad: ponencia. *Demostración experimental de que la interacción que media el reconocimiento entre carbohidratos y benceno es de naturaleza entálpica..* Universidad La Salle, 18 de Marzo de 2010. México, D. F.
- **QuimiUNAM 2009**, modalidad: ponencia. *Enthalpic Nature of the CH/ π Interaction Involved in the Recognition of Carbohydrates by Aromatic Compounds.* Universidad Nacional Autónoma de México, 18-20 de Noviembre de 2009. México, D. F.
- **Seminarios Junior CIB**, modalidad: ponencia. *Interacciones débiles que controlan el reconocimiento molecular en Química y Biología* Centro de Investigaciones Científicas-CSIC, 23 de Abril de 2009. Madrid, España.
- **4ª. Reunión de la Academia de Química Orgánica**, modalidad: cartel. *Estudio de la Formación Del Complejo Carbohidrato-Residuo Aromático a través de RMN*, 9-11 de Abril de 2008. Pátzcuaro, Michoacán.
- **Simposio Interno 2008 del Instituto de Química**, modalidad: cartel. *Estudio de la Formación Del Complejo Carbohidrato-Residuo Aromático a través de RMN*, 4 de Abril de 2008. México, D. F.

Publicaciones:

- Karla Ramírez-Gualito, Rosa Alonso-Ríos, Beatriz Quiroz-García, Aarón Rojas-Aguilar, Dolores Díaz, Jesús Jiménez-Barbero, Gabriel Cuevas. **The Enthalpic Nature of the CH/ π Interaction Involved in the Recognition of Carbohydrates by Aromatic Compounds is confirmed by a Novel Interplay of NMR, Calorimetry and Theoretical Calculations.** *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 18129-18136.
- Lorena Bautista-Ibáñez, Karla Ramírez-Gualito, Beatriz-Quiroz-Garcia, Aarón Rojas-Aguilar, Gabriel Cuevas. **Calorimetric Measurement of the CH/ π Interaction Involved in the Molecular Recognition of Saccharides by Aromatic Compounds.** *Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 849-857.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Gabriel Cuevas por todo su apoyo y la confianza depositada en mí, agradezco sus mejores consejos para enseñarme que no debemos claudicar al perseguir un sueño. Gracias por ser un excelente maestro, pero sobre todo un gran amigo.

Al Prof. Jesús Jiménez Barbero por su gran ayuda y confianza para permitirme usar sus equipos de RMN en esa fructífera estancia de seis meses increíbles en Madrid.

A la Dra. Dolores Díaz por todos esos días de paciencia y arduo trabajo para enseñarme desde lo más básico hasta lo novedoso en RMN, todo ello ha sido fundamental para confirmar mis intereses sobre RMN.

Al Dr. Gerardo Zepeda, por su ayuda siempre incondicional y desinteresada, por todo su esfuerzo para permitirme lograr la determinación de los T1 de los compuestos presentados en el capítulo final de este trabajo y por esos cursos maravillosos de RMN así como por su contribución a que la RMN sea fascinante.

A la Dra. Beatriz Quiroz, por todo su esfuerzo y horas de dedicación para la obtención de los espectros de RMN en el Instituto de Química a pesar de las adversidades de la vida.

Al Dr. Aarón Rojas por su esmerada labor en la obtención de las determinaciones calorimétricas así como por su total disposición a colaborar para volver un proyecto, una realidad.

A la M. en C. Carmen Márquez y Q. Eréndira García por su ayuda para la obtención de los espectros de gases-masas para determinar la pureza de los carbohidratos.

A la Q.F.B. Rocío Patiño por la obtención de los espectros de IR.

Al I.Q. Luis Velasco y al Dr. Javier Pérez por la realización de los espectros de masas.

A los miembros del comité tutor: Dr. Joaquín Tamariz Mascarúa y Dr. José Alfredo Vázquez por todas sus aportaciones para el desarrollo de este trabajo.

INDICE

1. Introducción	
1 Interacciones de largo alcance	5
Interacción electrostática	6
Interacciones Inductivas	8
Interacciones dispersivas	9
2. Interacciones de corto alcance	11
Interacción de intercambio de naturaleza repulsiva	11
Transferencia de carga	12
Penetración de carga	12
3. Interacciones de van de Waals	13
4. Interacción solvofóbica	14
5. Enlace de hidrógeno	15
Objetivos Generales	17
2. Interacción CH/ π :	19
Desarrollo de una nueva metodología para determinar el reconocimiento entre carbohidratos y proteínas. La interacción carbohidrato-benceno.	
2.1 Introducción	19
2.2 Objetivos	32
2.3 Metas	32
2.4 Originalidad	32
2.5 Resultados y discusión	33
2.5.1 Síntesis y Purificación del los compuestos	33
2.5.2 Estudios de RMN	34
Identificación de la región molecular en la que presenta la interacción CH/ π .	34
Efecto del agua durante la solvatación del complejo carbohidrato-benceno.	54
Efecto del hexafluorobenceno durante la solvatación del complejo carbohidrato-benceno.	59
Efecto del ciclohexano durante la solvatación del complejo carbohidrato-benceno.	65

Evaluación de la interacción CH/ π empleando efecto nuclear de Overhauser (NOE)	69
2.6 Determinación de la energía de interacción.	81
2.7 Conclusiones	85
2.8 Parte Experimental	87
Síntesis de los compuestos de interés	87
Estudios de RMN	89
2.9 Aplicaciones de la metodología desarrollada en el presente trabajo.	91
2.9.1 Estudio teórico de la conformación de un producto natural estabilizada por interacción CH/ π .	91
Metodología	96
2.9.2 Evaluación de la metodología con un sistema carbohidrato-proteína.	96
2.9.3 Estudio de la interacción CH/ π en dos carbohidratos por medio del análisis de la diferencia de desplazamientos químicos ($\Delta\delta$)	99
3. Interacción π - π : Estudio de los complejos estacionarios en la reacción de Diels-Alder.	103
3.1 Introducción	103
3.1.1 Reacción de Diels-Alder	
107 Mecanismo de reacción	
108	
3.1.2 Reactividad Diels-Alder	109
3.1.3 Estereoselectividad	110
3.2 Objetivos	120
3.3. Parte Computacional	120
3.4 Resultados y discusión	121
3.5 Conclusiones	126
4. “Interacción CH/ n (CH \cdots OP)”.	
Estudio a través de la determinación de las barreras rotacionales.	127
4.1 Introducción	127
4.1.1 Relajación del espín nuclear	130
4.2 Objetivos	130
4.3 Resultados y discusión	131
4.4 Conclusiones	139
4.5 Parte Experimental	139
4.5.1 Síntesis de los compuestos de interés	140

4.5.2 Estudios de RMN	140
5. Apéndice	144
6. Datos espectroscópicos de los compuestos sintetizados	148
7. Espectros de los compuestos sintetizados	150
8. Referencias	158
9. Publicaciones	164

INDICE DE ABREVIATURAS

B3LYP	Becke Lee Yang Parr con 3 parámetro
BSSE	Basis Set Superposition Error (Error por Superposición de Bases)
C ₆ D ₁₂	Ciclohexano deuterado
C ₆ D ₆	Benceno deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
COSY	Correlation Spectroscopy (Espectroscopía de Correlación)
δ	Desplazamiento químico
D ₂ O	Agua deuterada
DEI	Demanda Electrónica Inversa
DEN	Demanda Electrónica Normal
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Incremento por Tranferencia de Polarización sin Distorsión)
DMF	Dimetil formamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDA	Electron Donor-Acceptor (donador-acceptor electrónico)
FID	Free Induction Decay (decaimiento libre de inducción)
FMO	Frontier Molecular Orbital (Orbitales Moleculares Frontera)
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
Glc	Glucosa
His	Histidina
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence (Coherencia Heteronuclear de Enlaces Múltiples)
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital (Orbital Molecular Ocupado más Alto)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence (Coherencia Heteronuclear de Cuanto Simple)
Ido	Idosa
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital (Orbital Molecular No Ocupado más Bajo)
Man	Manosa
MP2	MØller-Plesset 2
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement (incremento nuclear de Overhauser)
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (espectroscopía del incremento nuclear de Overhauser)
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Ser	Serina
SOI	Secondary Orbital Interactions (Interacciones de Orbitales Secundarios)
Str	Estreptosa
T _m	Melting temperature (temperatura de fusión)
TR-NOE	NOE transitorio
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina

RESUMEN

¿Existe la posibilidad de que los fenómenos de la Química se interpreten con base a modelos propios de la Física? Si un principio fundamental es la indistinguibilidad de los electrones, ¿por qué existen procedimientos para determinar la carga de un átomo en una molécula?

En Física existen varios conceptos definidos en términos de cantidades fundamentales como la fuerza, la entalpía, el momento dipolar, etc. Sin embargo, en Química existen conceptos como la electronegatividad, la aromaticidad y el enlace químico que carecen de definición, por lo que cada modelo que los aborda genera más que una definición, una opinión. Todas son ciertas en su contexto y erróneas fuera del mismo. Lo extraño es que las discusiones alrededor de estos conceptos indefinibles físicamente generan numerosos artículos a nivel de inundar la literatura.

El objeto de estudio de la Química es la reactividad que no es otra cosa que el cambio de conectividad que experimentan las moléculas cuando se les aplica energía. Esto es, los átomos que están conectados de una manera en un reactivo, aparecen conectados de otra manera en los productos. La energía está asociada al proceso y por eso hay algunos arreglos que se privilegian sobre otros. En los arreglos estables es posible encontrar que los átomos tienen patrones geométricos bien definidos y el cambio de conectividad obedece a la aplicación de energía bien medida que corresponde con la del estado de transición. Por esto, la formación y ruptura de enlace es fundamental y de ahí la necesidad de definir enlace químico.

Pero ¿sólo deben considerarse los enlaces fuertes en la definición? Además de los llamados enlaces covalentes, existen enlaces entre átomos a larga distancia, que son estables y que se producen por la acumulación de densidad electrónica entre núcleos. Éstos constituyen un mínimo en la dirección de aproximación de los átomos enlazados, al igual que los enlaces fuertes, cualquier cambio en la distancia núcleo-núcleo implica un aumento en la energía. Para no llamarlos enlaces, porque con excepción de la definición del Prof. Richard Bader de enlace, éstos no entran en las definiciones convencionales, algunos autores las llaman interacciones o contactos, pero todas obedecen a un mismo fenómeno, la acumulación de densidad electrónica entre dos núcleos.

Así, esta tesis presenta el trabajo relacionado con el estudio de tres tipos de enlace débil, que son el corazón de la química supramolecular. La interacción CH/ π , que ilustrada con la interacción de un carbohidrato y benceno en una primera etapa y el reconocimiento entre carbohidratos y proteínas a nivel biológico. Esta interacción se estudia en el **Capítulo 2** y comprende el desarrollo una metodología que permite establecer la magnitud de la interacción y la región molecular donde se produce. Una segunda interacción, es la interacción π - π que se estudió en complejos de transferencia de carga que aparecen en la reacción de Diels-Alder y se presenta en el **Capítulo 3**. El impacto de los resultados es tal, que permite establecer que todas las explicaciones sustentadas en el estudio de los orbitales HOMO-LUMO, interacciones secundarias, etc. son cuestionables y que los complejos se originan por fuerzas de dispersión. Finalmente en el **Capítulo 4**, se aborda la interacción CH/ n , un tipo de puente de hidrógeno no convencional, donde un par de electrones no compartidos interactúan con un átomo de hidrógeno polarizado. Nuestros resultados permiten establecer que el llamado efecto anomérico generalizado en el segmento SCP(O) no existe. Esta conclusión proviene de la aplicación de una nueva metodología para medir barreras rotacionales distorsionadas por la aparición de la interacción CH/ n .

ABSTRACT

Is there any possibility to get an interpretation of the chemical phenomena based on physical principles? If one fundamental principle is the un-distinguishability of the electrons, why is it that there exist procedures to determine the charge of an atom in a molecule?

In Physics there exist several concepts defined in terms of fundamental quantities like force, enthalpy, dipolar moment, etc. However, in chemistry there are concepts like electronegativity, aromaticity, and the chemical bond with lack of definition, reason why every model that makes an attempt to generate a definition, becomes an opinion. They all are correct within the scope of their context, but all are wrong out of that scope. What is odd is that among the discussions about such indefinable concepts from the physical perspective are generated many publications that flood the literature.

The key object of study of chemistry is the reactivity, which is nothing else but the change in the connectivity that the molecules experiment when energy is applied. It's that the atoms that are connected in some way in a reactant appear connected in some other form as products. There is the energy associated to the process and that's why some arrangements are privileged among others. In the stable arrangements it's possible to find that the atoms show some very well defined geometric patterns, and the change in connectivity obeys to the application of accurate amount of energy which corresponds to the transition state. This is why the formation or breakage of bonds is fundamental and it raises the need to define the chemical bond.

But, only strong bonds should be considered in this definition? Besides of the called covalent bonds, there some long distance bonds between the atoms, which are stable and they are produced by the accumulation of electronic density between the nucleus. They constitute a minimum in the direction of approximation of the tied atoms, the same as the strong bonds, any change in the distance nucleus to nucleus imply an increase in energy. In order for not to call the bonds, because with exception of the definition of bond of Prof. Richard Bader, they don't meet the conventional definitions, some authors call them interactions or contacts, nevertheless they all follow the same phenomenon, the accumulation of electronic density among the nucleus.

Thus, this thesis shows the work related with the study of three types of weak bonds, which are the hearth of the supramolecular chemistry. The CH/ π interaction is illustrated with the interaction of one carbohydrate and a benzene molecule in a first stage and the recognition between carbohydrates and proteins at biological level. This interaction is studied on **Chapter 2** and includes the development of a methodology which allows the determination of the magnitude of the interaction and the molecular region where it is produced. A second interaction is the π - π , which was studied in charge transference complexes that appear in Diels Alder reactions and it is shown on **Chapter 3**. The impact of the results is such that it allows to establish that all the explanations supported in the study of the HOMO-LUMO orbitals, secondary interactions, etc. are questionable and that the complexes are originated by dispersion forces. Finally on **Chapter 4**, it is made an approach to the CH/ n interaction, a kind of non conventional hydrogen bond, where a pair of non shared electrons interacts with a polarized hydrogen atom. Our results enable to set up that the called generalized anomeric effect of the segment SCP(O) does not exist. This conclusion comes from the application of a new methodology to measure distortionated rotational barriers by the appearance of the CH/ n interaction.

1. INTRODUCCION

La primera definición de Química que aprendemos establece que es la ciencia que se encarga del estudio de la composición de las sustancias y las transformaciones que éstas sufren.¹

Entendemos por *composición química* el tipo y el número de átomos que componen una molécula y por *conectividad* la forma en la cual dichos átomos están enlazados,¹ pero ¿a qué nos referimos con transformaciones? El primer fenómeno químico con el cual podemos definir transformación es la interacción de los átomos, los cuales forman moléculas, que serán especies nuevas con propiedades totalmente diferentes de aquellas de donde se originaron. De la misma forma dentro de estas transformaciones se encuentran los cambios de estado físico de las sustancias así como las reacciones que se puedan presentar entre ellas. Muchas de las reacciones químicas requieren la ruptura de los enlaces que unen los átomos para dar origen a otros nuevos, pero para que una reacción pueda comenzar, las entidades reaccionantes, comúnmente llamadas reactivos, deben aproximarse una a la otra hasta una distancia definida. La aproximación entre los átomos está controlada por las fuerzas entre ellos y son conocidas como interacciones intermoleculares; éstas permitirán la distribución y deslocalización de los electrones entre las moléculas reaccionantes para dar origen a los nuevos enlaces a distancias mayores a las que corresponden a un enlace químico.

Los átomos y las moléculas pueden interactuar por dos vías: la primera conduce el paso de reactivos, a través de un estado de transición a productos, por medio de interacciones covalentes; la segunda vía, donde pueden existir o no interacciones covalentes, conduce a la formación de los complejos moleculares y está determinada por interacciones intermoleculares.

El estudio de estas interacciones ha generado gran expectativa pues el objetivo se centra en la identificación de éstas, así como la cuantificación de su energía. Desde el punto de vista experimental, el desarrollo de nuevas técnicas espectroscópicas ha permitido tener una mejor comprensión de estas interacciones; sin embargo, el estudio teórico es el que tiene mayor potencial para analizar la naturaleza de las interacciones intermoleculares. Los cálculos computacionales desde una perspectiva muy general, han buscado separar la energía de

interacción en las fuerzas que la constituyen para llevar a cabo un análisis por separado de cada una de sus componentes. De esta forma el desarrollo de las computadoras también permite incrementar los recursos de cómputo que pueden mejorar las condiciones de cálculo, es decir, el método, la base y el ambiente en el que se simula la molécula, para lograr una descripción más precisa de las interacciones intermoleculares.

Las interacciones intermoleculares son también llamadas interacciones de van der Waals, ya que J. D. van der Waals² (*vide supra*) fue quien las identificó como las causantes del comportamiento no ideal de los gases reales. Fue hasta 1930, cuando London³ realizó un estudio de estas interacciones con lo cual se describieron e interpretaron de mejor forma.

Este tipo de interacciones juegan un papel muy importante dentro de la química, la física y todas las biodisciplinas. Ejemplos de estas áreas de estudio son la determinación de la estructura de líquidos, los fenómenos de solvatación, el empaquetamiento cristalino o el reconocimiento molecular así como la estructura de biomoléculas como el ADN o las proteínas entre otras. La síntesis de muchas supramoléculas está determinada por el reconocimiento de diferentes especies el cual se genera como resultado de diversas interacciones como puentes de hidrógeno, interacciones de apilamiento, electrostáticas, hidrofóbicas, de transferencia de carga o de coordinación.

A partir de este momento utilizaremos como nomenclatura los términos interacciones covalente y no covalentes (para las interacciones de van der Waals) a lo largo de este trabajo.

Generalmente asociamos la Química con el enlace covalente, sin embargo la descripción del enlace covalente es realmente útil si se consideran moléculas aisladas, pero cuando una molécula se encuentra en fase condensada o bien en disolución, la molécula de interés se encuentra rodeada por más moléculas. Este entorno afecta tanto a los enlaces covalentes como al sistema electrónico de la misma a través de una perturbación, dicha perturbación depende de la fuerza así como de la cantidad de interacciones no covalentes que la rodean.

Las interacciones covalentes y las no covalentes tienen diferente naturaleza, como ya mencionamos. Las interacciones covalentes comprenden la distribución de los electrones de los

átomos para dar origen a nuevos enlaces, por lo cual consisten en pares de electrones compartidos por los átomos, y las convierte en interacciones de corto alcance, generalmente menores a 2 Å. Por el contrario, las interacciones no covalentes se consideran de largo alcance ya que pueden presentarse a varios angstroms de distancia, razón por la cual se genera la atracción entre los sistemas interactuantes, controlada por las propiedades electrónicas de los mismos, como son:

- La interacción entre dos multipolos permanentes.
- La interacción entre un multipolo permanente y un multipolo inducido.
- La interacción entre dos multipolos inducidos.

La energía de las interacciones también es diferente, mientras que las interacciones no covalentes comprenden interacciones no mayores a 20 kcal/mol, las interacciones covalentes tienen energías de enlace cercanas a 100 kcal/mol de acuerdo a la ecuación de energía Libre de Gibbs:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

La entropía juega un papel importante para la formación de las interacciones no covalentes, el cambio es negativo cuando se forma un complejo molecular, y el término $T\Delta S^\circ$ es comparable (a temperatura ambiente) con el término entálpico ΔH° , de tal forma que el cambio en la energía libre de Gibbs que conlleva a la formación de un complejo molecular es cercano a cero.

La existencia de una fase condensada es el ejemplo más tangible de las interacciones no covalentes, sin embargo es una realidad que la descripción de los sistemas solvatados no resulta fácil, por ejemplo la solvatación que efectúa el agua aún sigue representando un reto para los químicos. De la misma forma, las interacciones no covalentes son las responsables de las estructuras biomoleculares como el ADN, ARN o proteínas, la estructura de la doble hélice se debe principalmente a interacciones tipo enlace de hidrógeno, interacciones π - π que se presentan del tipo en T, cara - cara o cara - borde^{4,5} (Figura 1).

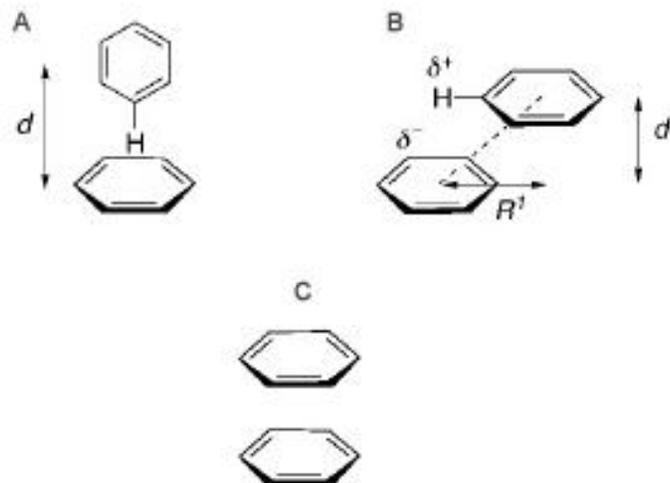


Figura 1. Interacciones π - π del tipo: **A**, arreglo en T. **B**, cara-borde. **C**, cara-cara.⁶

Las interacciones no covalentes juegan un papel determinante en los procesos de reconocimiento molecular y este fenómeno es indispensable para los sistemas vivos ya que asegura la selectividad en la formación de los complejos proteínicos y en todos las reacciones que suceden en los organismos vivos. Un ejemplo más de la importancia de las fuerzas no covalentes se puede observar en la habilidad que tienen los gecónicos o también llamados con la designación en inglés geckos (*Gekko gekko*), reptiles que tienen la capacidad de subir en superficies completamente lisas como puede ser el vidrio. Dicha capacidad de soportar su propio peso se debe a la interacción de los filamentos de queratina que se encuentran en sus *setae* con la superficie de soporte a través de interacciones no covalentes⁷ (Figura 2).



Figura 2. **A**. Gecko colgando de una superficie de vidrio. **B**. Ampliación de la pata de un gecko.⁸

Las interacciones no covalentes también determinan la solubilidad de las sustancias, por ejemplo en los alcoholes de cadena corta el grupo hidroxilo domina sobre las interacciones no covalentes. Sin embargo, conforme la cadena alifática crece las propiedades del grupo no polar van siendo más importantes y estas se producen a través de interacciones no covalentes.

Una de las primeras clasificaciones de los componentes de la energía de interacción fue llevada a cabo por C. A. Coulson.⁹ En ella se distinguen las contribuciones electrostática, de deslocalización y de repulsión. Posteriormente se añadió una cuarta contribución debida a la dispersión.

Otra clasificación muy usada¹⁰⁻¹³ es aquella que divide las interacciones en dos grandes grupos: las interacciones de largo alcance y las de corto alcance. La energía de las interacciones es función de r^{-n} , donde n es la distancia interatómica.

1. Interacciones de largo alcance.

La energía asociada a estas interacciones es función de la potencia inversa de la distancia (r) que separa las moléculas interactuantes. La componente atractiva es significativa cuando la superposición de las densidades electrónicas es pequeña. Son interacciones específicas, direccionales y pueden ser saturadas de tal forma que conducen a complejos moleculares estequiométricos. Existen cinco contribuciones dentro de esta primera categoría: electrostática, de inducción, de dispersión, de resonancia y magnética. Las interacciones Coulómbicas entre iones y moléculas eléctricamente neutras (con momentos dipolares permanentes) pueden llegar a considerarse dentro de esta categoría, aún cuando éstas no pertenecen a interacciones intermoleculares en sentido estricto.

1. 1 Interacción Electrostática.

Surgen de la interacción clásica de cargas puntuales (monopolos) o distribuciones de carga estáticas de dos moléculas (multipolos), pero sólo debe limitarse a la distribución de carga en las moléculas libres.

Este tipo de interacciones son dominantes cuando se hacen interaccionar cuadrupolos como el benceno, donde los dos anillos que interaccionan pueden hacerlo con tres arreglos diferentes, como se describirá más adelante en este trabajo. Lo importante es señalar que este tipo de interacciones juegan un papel muy importante en el reconocimiento intermolecular de biomoléculas. Los dos tipos de interacciones electrostáticas, i.e. más relevantes en las estructuras de las macromoléculas biológicas son:

- a) **Interacciones iónicas:** formación de pares iónicos o sistemas iónicos de mas complejidad (iones triples, etc.)
- b) **Interacciones dipolares:** las cuales se describirán a continuación.

Interacción Ion-Dipolo.

Consideremos una molécula eléctricamente neutra con una distribución asimétrica de la carga, dicha molécula presenta un dipolo permanente m . Si las cargas opuestas de este dipolo se denotan como q y la distancia de separación l , el momento dipolar se expresa como:

$$\mu = q \cdot l \qquad \text{Ecuación 1}$$

Sólo las moléculas con un momento dipolar permanente deben ser llamadas moléculas dipolares, además de hidrocarburos como el n -hexano, ciclohexano y benceno, moléculas simétricas como el disulfuro de carbono o tetracloruro de carbono carecen de μ , pero la mayoría de los disolventes orgánicos poseen un momento dipolar permanente.

Cuando el dipolo se coloca en un campo eléctrico, resultado de la interacción con un ión, el dipolo se orientará de tal manera que exista atracción entre el dipolo y la carga del ión. La energía potencial entre un ion y un dipolo está dada por la siguiente expresión:

$$U_{ion-dipolo} = -\frac{1}{4\pi \cdot \epsilon_0} \cdot \frac{z \cdot e \cdot \mu \cdot \cos\theta}{r^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde ϵ_0 es permisividad en el vacío, $z \cdot e$ es la carga del ión, r la distancia desde el ión hasta el centro del dipolo y θ el ángulo del dipolo respecto a la línea r que une el ión con el centro del dipolo.

Interacción Dipolo-Dipolo.

Las fuerzas direccionales dependen de la interacción electrostática de moléculas que poseen momentos dipolares permanentes debido a la distribución asimétrica de la carga en éstas; así cuando se hacen interaccionar dos moléculas dipolares éstas se colocan de tal forma que los dipolos interactúan a una distancia r , siendo así la fuerza de atracción proporcional a $1/r^3$. Existen dos formas de orientación que pueden adoptar los dipolos, el primero es cabeza-cola y el segundo es el arreglo antiparalelo; siendo este último arreglo el más estable. Ambos arreglos se presentan si la energía de atracción es mayor que la energía térmica (Figura 3). En caso de que ambas orientaciones sean posibles, es decir, que los dipolos son moléculas que rotan libremente, entonces la atracción y la repulsión deben compensarse entre sí y la orientación de los dipolos que conlleva a una atracción entre sí es dependiente de la temperatura tal que.

$$U_{dipolo-dipolo} = -\frac{1}{(4\pi \cdot \epsilon_0)^2} \cdot \frac{2\mu^1 \cdot \mu^2}{3k_B \cdot T \cdot r^6} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta. Así a muy altas temperaturas, todas las orientaciones de los dipolos son iguales y por lo tanto la energía potencial es cero.

Las interacciones dipolo-dipolo son las responsables de la asociación entre disolventes orgánicos como el DMSO y DMF.

Es importante mencionar que los dipolos representan una de las posibilidades de la distribución de la carga en los multipolos (n-polos), así un monopolo (n=1) es una carga puntual (ej. Na^+), un dipolo es una arreglo de cargas parciales (n=2 ej. H_2O), un cuadrupolo no tiene ni carga puntual ni momento dipolar (n=4 ej. benceno) y una molécula octupolar (n=8 CH_4) no tiene ni momento dipolar ni cuadrupolar. En la Figura 3 se presentan algunas de las posibles orientaciones de los momentos eléctricos.

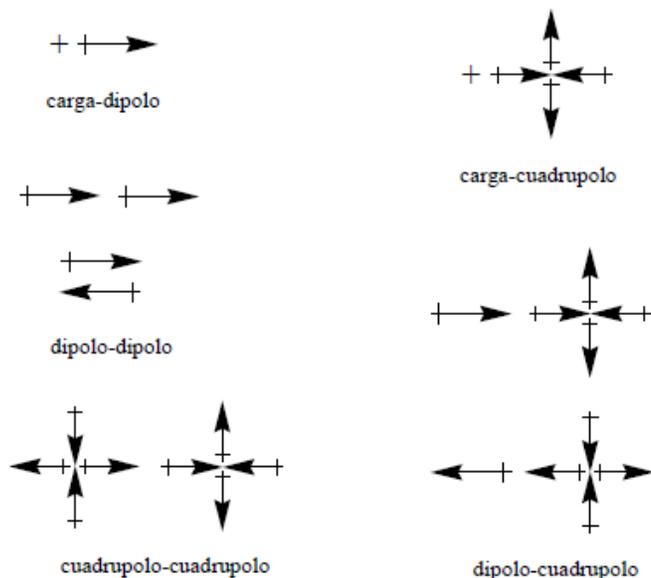


Figura 3. Orientaciones preferidas entre los diversos momentos eléctricos.

1.2 Interacciones Inductivas.

Estos efectos se generan de la distorsión de una molécula provocada por el campo eléctrico generado por las moléculas vecinas. Son interacciones atractivas y debido a que es generada por la distorsión de la distribución de carga como respuesta a un campo externo, es siempre negativa para las moléculas en sus estados electrónicos fundamentales y no es aditiva, debido a que la interacción de dos moléculas se ve afectada por la presencia de terceras (Figura 4).

Interacción Dipolo – Dipolo Inducido.

El dipolo eléctrico de una molécula posee un momento dipolar μ el cual puede inducir un dipolo en una molécula vecina. Esta inducción siempre conlleva a una atracción entre ambas moléculas y es independiente de la temperatura. El momento dipolar será tan grande como grande sea la polarizabilidad (α) de la molécula que está experimentando la inducción del dipolo permanente. La energía de interacción en este caso también es conocida como *inducción* o *Interacción de Debye*^{14,15} y está dada por la siguiente expresión:

$$U_{\text{dipolo-dipolo_inducido}} = -\frac{1}{(4\pi \cdot \epsilon_0)^2} \cdot \frac{2 \cdot \alpha \cdot \mu^2}{r^6} \quad \text{Ecuación 4}$$

De la misma forma una carga puntual (monopolo) también puede generar un cambio en la densidad electrónica de las moléculas vecinas, siendo así la energía de interacción dependiente de la polarizabilidad (α) así como de la polarización que genere el ión de carga $z \cdot e$.

$$U_{\text{ion-dipolo_inducido}} = -\frac{1}{(4\pi \cdot \epsilon_0)^2} \cdot \frac{z^2 \cdot e^2 \cdot \alpha}{2 \cdot r^4} \quad \text{Ecuación 5}$$

1.3 Interacciones Dispersivas.

Estas interacciones fueron descritas por London^{3,16} y permitieron identificar la relación entre este tipo de interacciones y la dispersión óptica de gases. Son interacciones que representan la contribución más importante a las Interacciones de van der Waals. Su origen está determinado por la continua fluctuación de las distribuciones de carga de las moléculas a causa del movimiento de sus electrones. Estos movimientos están correlacionados entre sí y tienen como resultado la disminución en la energía, por lo que estas interacciones son atractivas y prácticamente aditivas (Figura 4).

Interacción Dipolo instantáneo – Dipolo Inducido.

Aún cuando los átomos o las moléculas no posean un momento dipolar permanente, el movimiento continuo de los electrones genera pequeños momentos dipolares μ , los cuales puede polarizar el sistema electrónico de la molécula vecina. Este acoplamiento genera movimientos electrónicos, los cuales se deben presentar de tal forma que exista una atracción. La energía resultante también es llamada *dispersión de London* y se puede expresar de la siguiente forma:

$$U_{dispersión} = -\frac{1}{(4\pi \cdot \epsilon_0)^2} \cdot \frac{3\alpha_1 \cdot \alpha_2}{2r^6} \cdot \left(\frac{I_1 \cdot I_2}{I_1 + I_2} \right) \quad \text{Ecuación 6}$$

donde α_1 y α_2 son las polarizabilidades, I_1 e I_2 son los potenciales de ionización de las dos especies que interaccionan. Cuando interactúan dos moléculas idénticas la expresión de la energía se reduce a:

$$U_{dispersión} = -\frac{1}{(4\pi \cdot \epsilon_0)^2} \cdot \frac{3\alpha^2 \cdot I}{4r^6} \quad \text{Ecuación 7}$$

Las fuerzas de dispersión son de corto alcance, ya que dependen de $1/r^6$, son universales para todos los átomos y moléculas, y son las responsables de la agregación de las moléculas que no poseen carga ni momento dipolar. Debido a que los electrones π son muy polarizables, se encuentran en el sistema fuerzas de dispersión muy fuertes que contienen sistemas π conjugados, como los hidrocarburos aromáticos.

Las fuerzas de dispersión aumentan conforme se incrementa el volumen molecular, así como el número de electrones polarizables. La polarizabilidad α está relacionada con la refracción molar así como el índice de refracción, de esta forma las sustancias más polarizables son las que presentan mayor cantidad de fuerzas de dispersión.

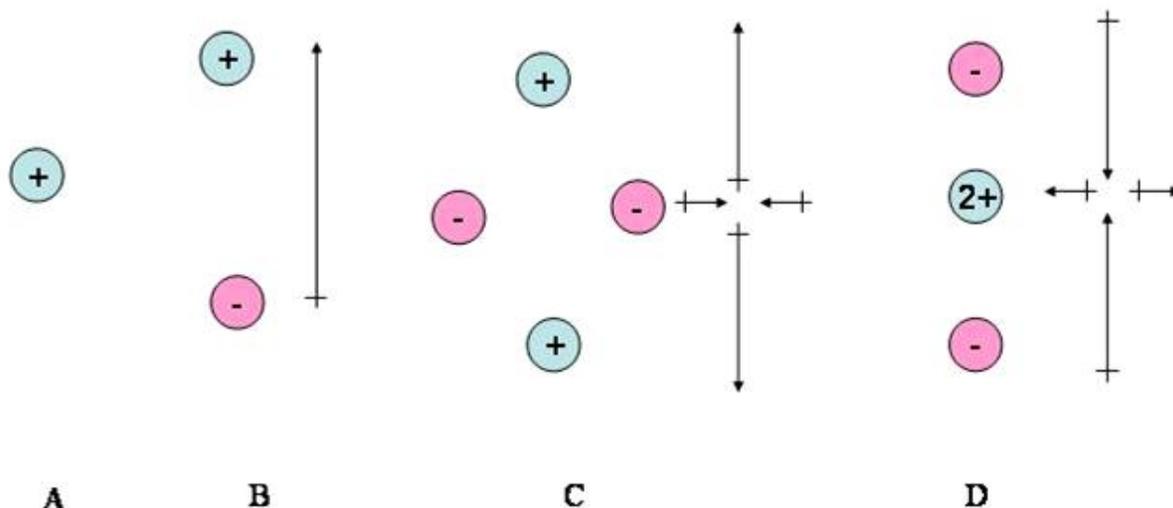


Figura 4. Descripción de **A** carga puntual, **B** momento dipolar, **C** y **D** momentos cuadrupolares generados por las cargas puntuales en el espacio.

Las interacciones de **resonancia** y **magnéticas** sólo se presentan cuando la molécula se encuentra en un estado degenerado, generalmente excitado o cuando ambas moléculas poseen espines desapareados. La interacción por resonancia no es aditiva, pero sí la interacción magnética. Ambos efectos también operan a larga distancia.¹³

2. Interacciones de corto alcance.

Son interacciones que resultan del traslape de orbitales y por ello sólo son importantes a corta distancia, las contribuciones más importantes son la interacción de intercambio de repulsión, transferencia de carga, penetración de carga y el enlace de hidrógeno.

2.1 Interacción de Intercambio de naturaleza repulsiva.

Es la mayor contribución a las interacciones de corto alcance y es efecto de la combinación de dos fenómenos: la energía de *intercambio* es consecuencia del principio de Pauli, que debido a la prohibición de colocar dos electrones en un sistema con los mismos números cuánticos, reduce la repulsión electrostática entre pares electrónicos, de manera que es un término atractivo. La

energía de *repulsión* entre dos moléculas proviene, en parte, de la repulsión electrostática de los electrones de las moléculas y, en parte, de los núcleos que no están totalmente apantallados. Cuando las nubes electrónicas de dos moléculas se acercan la una a la otra lo suficiente para que se traslapen, el principio de exclusión de Pauli prohíbe a algunos electrones ocupar la misma región del espacio, reduciendo así la densidad electrónica en dicha región; lo que genera que los núcleos atómicos queden parcialmente desapantallados unos respecto a otros, provocando una repulsión entre sí.

2.2 Interacción de Transferencia de Carga.

Es un efecto que puede considerarse parte de las fuerzas de inducción que actúan a corto alcance aunque su contribución es muy pequeña dentro de este grupo de interacciones. Este modelo fue introducido por Mulliken^{17,18} en complejos que poseen un componente rico en electrones (dador, D) y uno deficiente (aceptor, A), por lo cual también se les conoce como complejos electrónicos donador-aceptor (*electron donor-acceptor EDA*, por sus siglas en inglés). Se pueden representar como el siguiente híbrido de resonancia:



En la primera parte del Esquema 1 se representan las especies neutras, mientras que en la segunda ya se llevó a cabo la transferencia de carga, es decir se ha transferido un electrón. Los donadores y aceptores se clasifican de acuerdo al orbital interaccionante: donadores σ , π , n (par electrónico libre) y los aceptores como σ^* , π^* , ν (orbital vacío): la interacción más fuerte es la $n \rightarrow \nu$ y la más débil $\pi \rightarrow \pi^*$.

2.3 Penetración de Carga.

Es un efecto atractivo que se origina a distancias tales en las que densidades electrónicas de las moléculas se traslapan y se puede entender como la atracción que experimentan los núcleos parcialmente desapantallados hacia la densidad electrónica asociada a otra molécula.

3. Interacciones de van der Waals.

Al conjunto de interacciones restantes respecto a todas las descritas, se les conoce como fuerzas de van der Waals. Son las responsables del comportamiento no ideal de los gases, no son interacciones aditivas ya que la interacción entre dos moléculas se ve afectada por la presencia de otras moléculas, de manera que no se pueden sumar todos los pares potenciales de una molécula para obtener la energía neta de interacción con el resto de las moléculas. Pueden ser atractivas o repulsivas y la expresión que mejor las describe es el potencial de Lennard-Jones¹⁹ (Figura 5) donde se establece que las interacciones de van der Waals se dividen en dos contribuciones, la componente atractiva proviene de los efectos dispersivos y tiene su base en el término dominante del modelo de Drude (r^{-6}). En cambio la repulsiva (r^{-12}), surge del cumplimiento del principio de exclusión de Pauli cuando las densidades electrónicas de dos átomos interpenetran una en la otra. La ecuación del potencial de Lennard-Jones se representa de la siguiente forma:

$$V(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r}\right)^6 \right] \quad \text{Ecuación 8}$$

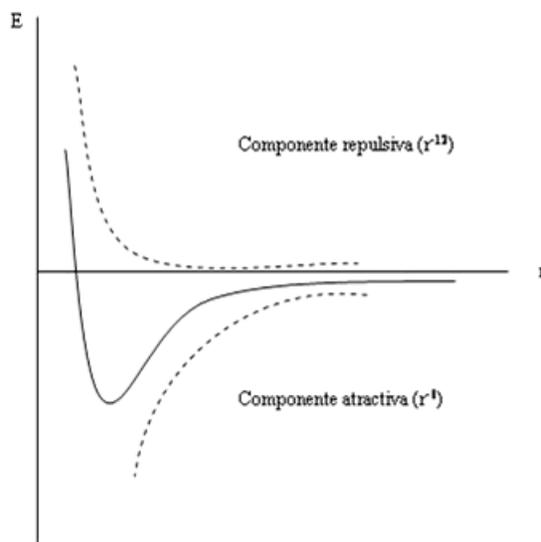


Figura 5. Energía potencial de Lennard-Jones.

Como se mostró, todas las interacciones anteriores son descritas en base a la partición de las contribuciones energéticas que sustentan el análisis de interacciones débiles como las

interacciones π/π , CH/ π o bien el propio enlace de hidrógeno. Estas interacciones débiles se abordarán con mayor detalle en los próximos capítulos por lo que ahora sólo se mencionará de forma general el enlace de hidrógeno y las interacciones solvofóbicas como parte de lo que se ha clasificado como interacciones no covalentes.

Si bien desde un punto de vista riguroso, las interacciones débiles en química se describen adecuadamente considerando interacciones electrostáticas (por ejemplo el Hamiltoniano de Hartree-Fock y la de Kohn-Sham sólo incluye la electrostática como el término de energía potencial), éstas no han pasado a la nomenclatura. Las interacciones débiles en química corresponden a un puente de hidrógeno, las interacciones CH/ π , π - π ó CH/ n . Es por lo tanto posible que la energía de cualquier interacción, fuerte o débil esté dada por:

$$U = A \frac{q_1+q_2}{r} + B \frac{q_1+q_2}{r^2} + C \frac{q_1+q_2}{r^3} + \dots D \frac{q_1+q_2}{r^6} + \dots E \frac{q_1+q_2}{r^{12}} \quad \text{Ecuación 9}$$

Cuando los coeficientes A y B son dominantes se puede hablar de un enlace covalente direccional y cuando D ó E dominan, de un enlace débil.

4. Interacción Solvofóbica.

Este tipo de interacciones hacen alusión al fenómeno de disolver un hidrocarburo en agua, la cual se puede llevar a cabo a través de un incremento en la energía de Gibbs G del sistema ($\Delta G > 0$). Experimentalmente se sabe que la disolución de hidrocarburos en agua es exotérmica ($\Delta H < 0$) y de acuerdo con la expresión $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ la entropía del sistema debe disminuir. Como consecuencia cada molécula de hidrocarburo requiere que las moléculas de agua se ordenen a su alrededor, con lo cual el sistema adopta una forma definida. El orden se incrementa cuando las moléculas orgánicas expulsan algunas de las moléculas que las rodean para interactuar entre sí a través de lo que se denomina interacción hidrofóbica.

5. Enlace de Hidrógeno.

Los líquidos que poseen grupos hidroxilo o grupos amino, es decir, grupos funcionales con un átomo de hidrógeno enlazado a un átomo electronegativo X generalmente tienen puntos de ebullición elevados. Esta observación llevó a pensar que existían intensas fuerzas intermoleculares que operaban en el sistema. Estas interacciones fueron designadas como enlace de hidrógeno y se caracterizan por la interacción divalente del hidrógeno con el átomo electronegativo.

El enlace de hidrógeno puede definirse como la interacción entre un donador y un aceptor, donde se ven involucrados átomos de hidrógeno. Es aceptado que cuando el hidrógeno se encuentra unido en un enlace covalente A-H y A tiene un electronegatividad tal que deja al átomo de hidrógeno desprotegido parcialmente, dicho átomo es capaz de interactuar con otro átomo B, el cual debe poseer pares de electrones no compartidos o electrones π polarizables. Los enlaces de hidrógeno pueden ser de tres tipos: fuertes, moderados o débiles. Los primeros son más parecidos a un enlace covalente pero los más débiles se pueden clasificar como producto de la participación de las fuerzas de van de Waals. Algunas de las características de los enlaces de hidrógeno se encuentran descritas en la Tabla 1.²⁰

Se genera un enlace de hidrógeno fuerte cuando el grupo donador es deficiente en electrones o cuando el grupo aceptor es rico en ellos. La diferencia de electronegatividades favorece la interacción con el átomo de hidrógeno desprotegido. Generalmente se les considera enlaces iónicos.

Se producen enlaces de hidrógeno moderados, cuando el grupo donador es electronegativo y el grupo aceptor tiene pares electrónicos libres. Son los enlaces de hidrógeno más comunes en la naturaleza, son predominantes y esenciales para la estructura y función de las moléculas biológicas.

Los enlaces de hidrógeno débiles, son aquellos que se presentan cuando los átomos A, son menos electronegativos respecto a los anteriores. Ejemplos como los enlaces C-H, Si-H (Tabla 1) o bien

cuando el grupo aceptor B no tiene pares de electrones libres, pero sí tiene electrones π polarizables como $C\equiv C$ o un anillo como el benceno. A pesar de que el flúor es un átomo muy electronegativo, los enlaces F-C o F-S son aceptores débiles y tienen energías y geometrías similares a los complejos de van der Waals.

Tabla 1. Propiedades de los enlaces de hidrógeno fuerte, moderado y débil.²⁰

Propiedad	Enlace Fuerte	Enlace moderado	Enlace débil
A-H...B	Fuertemente covalente	Fuertemente electrostática	Electrostática
Longitud de enlace H...B (Å)	A-H = H...B ~1.2 - 1.5	A-H < H...B ~1.5 - 2.2	A-H << H...B 2.2 - 3.2
A...B (Å)	2.2 - 2.5	2.5 - 3.2	3.2 - 4.0
Angulo de enlace (°)	175 - 180	130 - 180	90 - 150
Energía de enlace (kcal/mol)	14 - 40	4 - 15	<4
Intensidad de la vibración IR (cm ⁻¹)	25%	10-25%	<10%
Desplazamiento químico de RMN ¹ H (ppm)	14 - 22	<14	a
Ejemplos	Sales ácidas, complejos de HF, pseudohidratos, dímeros de ácidos o bases fuertes	Ácidos, alcoholes, fenoles, moléculas biológicas	Dímeros de ácidos o bases débiles, enlaces CH...O/N, enlaces O/N-H... π

a. No reportada.

Todas las interacciones hasta ahora descritas se manifiestan en los sistemas reactivos, sin embargo como se mencionó, la energía de ellas es baja, por lo cual su estudio a nivel experimental resulta complicado. En los siguientes capítulos de este trabajo se abordará el estudio de dos enlaces de hidrógeno débiles, uno de ellos determinado por la interacción CH/ π , el segundo por la interacción CH/*n* (CH...OP) y por último la interacción π/π .

OBJETIVOS GENERALES.

Estudiar las interacciones débiles que controlan la dinámica conformacional y la reactividad en los siguientes sistemas modelo:

1.- *Interacción CH/ π* : desarrollar una metodología que permita determinar la energía de interacción entre un carbohidrato y una molécula de benceno e identificar la región molecular en la que se produce, aislando esta contribución de otras.

2.- Probar la aplicación de la metodología desarrollada en el primer objetivo a otros sistemas moleculares donde sea necesario identificar la región molecular de interacción.

3.- *Interacción π/π* : determinar los estados estacionarios que hacen posible la existencia de un estado de transición en la reacción de Diels-Alder.

4.- *Interacción CH/ n ($CH\cdots OP$)*: desarrollar una metodología que permita establecer inequívocamente la existencia de una interacción $CH\cdots OP$ en una serie de moléculas en las que se module la acidez del átomo de hidrógeno interactuante.

CAPITULO 2

“Interacción CH/ π ”

Desarrollo de una nueva metodología para determinar el reconocimiento entre carbohidratos y proteínas. La interacción carbohidrato-benceno.

2.1 INTRODUCCION

En 1894 Emil Fischer estableció: “...para que la reacción química pueda tener lugar, la enzima y el glucósido tienen que amoldarse como una llave a una cerradura”²¹ y con ello abrió la puerta para el estudio de la selectividad de las reacciones enzimáticas. Años más tarde, en 1958, Donald Koshland²² propuso el Modelo del Ajuste Inducido que establece que la proteína tiene una estructura flexible que puede adaptarse al sustrato durante el proceso de reconocimiento. De esta forma, se introducen dos conceptos que han sido considerados como determinantes para que el reconocimiento molecular se lleve a cabo; el primero de ellos es la preorganización y el segundo es la complementariedad.

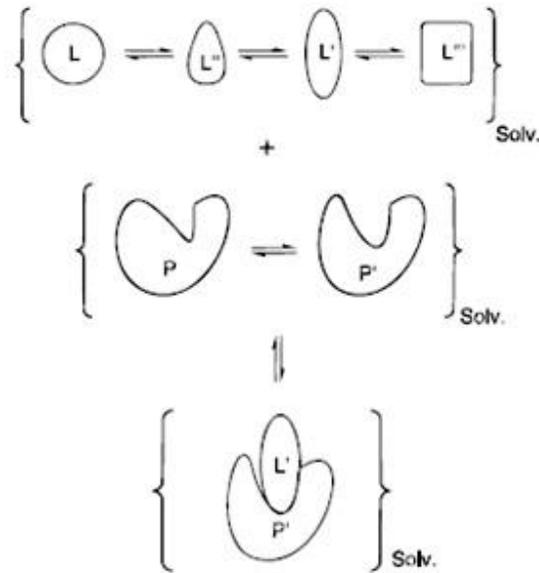
El término reconocimiento molecular comenzó a tener popularidad al comienzo de la década de 1980. El reconocimiento molecular es determinante en procesos biológicos así como en el desarrollo de la química supramolecular (del latín *supra*, en que significa *por encima*), la cual se ha descrito como la química del “huésped-anfitrión” o “del autoensamblaje”, que están limitados a procesos intermoleculares. El reconocimiento molecular puede tener importancia también de forma intramolecular, lo cual permite llegar a la conclusión de que los sistemas moleculares pueden responder a estímulos físicos o químicos, de allí que también se le llame la “Química más allá de la molécula.”²³

Y así fue como J. M. Lehn definió el término *supramolecular*²⁴ con el cual hizo referencia a los arreglos ordenados de moléculas a través de interacciones no covalentes. De esta forma el reconocimiento molecular permite que una molécula se una a otra generando un ensamblaje de dos o más moléculas con lo que se forma una supramolécula. La química supramolecular tiene su

fase de uso práctico en la construcción de receptores, agentes de transporte, modelos enzimáticos, etc.²⁵

En el proceso de formación de una supramolécula toman parte una molécula que actúa como anfitriona (*host*) y otra como huésped (*guest*), que se une a la primera para formar un complejo anfitrión-huésped.^{26,27} Comúnmente, el anfitrión es una molécula grande o un agregado, como un enzima o un compuesto cíclico con una cavidad central de tamaño adecuado para recibir un huésped. El huésped puede ser un ión inorgánico sencillo o bien una molécula más compleja, como una hormona o un neurotransmisor. Las asociaciones entre las moléculas anfitrión y huésped se basan en interacciones intermoleculares complementarias que son, en general, más débiles que los enlaces covalentes. Por ello, suelen establecerse varias interacciones, pues son aditivas.

Retomando un poco los conceptos de preorganización y complementariedad, es bien sabido que el reconocimiento molecular es determinante en sistemas biológicos y a nivel estratégico, representa una vía para sintetizar fármacos efectivos que generen la menor cantidad de efectos adversos. Actualmente,²⁸ se considera que la interacción de la proteína con un ligante en solución es un equilibrio, donde coexisten diversos conformeros de ambos. Para que se forme la supramolécula, el disolvente es desplazado del sitio de unión para que las interacciones entre la proteína y el ligante superen energéticamente las interacciones del ligante y las de la proteína con el mismo disolvente, generándose así el aumento de la entropía y una ganancia neta de entalpía del sistema (Esquema 2).



Esquema 2. Proceso de reconocimiento molecular entre una proteína y un ligante.

Este tipo de interacciones son el origen del reconocimiento celular a través del cual participan proteínas que reconocen carbohidratos. La interacción proteína-carbohidrato desencadena funciones biológicas relevantes como la embriogénesis, la respuesta alérgica, procesos de metástasis, crecimiento tisular, etc.²⁹⁻³⁵

Otro ejemplo de interacciones proteína-carbohidrato son las lectinas,³⁶ las cuales son proteínas que interaccionan con carbohidratos de forma muy específica a través de interacciones no covalentes. Dado que carecen de actividad catalítica, no se les puede considerar enzimas y no son producto del sistema inmune, por lo cual, tampoco se les considera anticuerpos. Son capaces de generar la aglutinación celular, por lo que se les emplea para identificar eritrocitos a través de la hemoaglutinación. Las lectinas pueden encontrarse desde bacterias y virus hasta plantas y animales.

Las interacciones proteína-carbohidrato se caracterizan por ser polivalentes³⁷ lo que asegura su eficiencia. Además, los carbohidratos tienen como característica especial el tener un carácter hidrofílico debido a los grupos hidroxilo que pueden interaccionar con los aminoácidos polares de la proteínas.³⁸ En contraste, los átomos de hidrógeno del anillo de pirano, tienen carácter lipofílico lo que les permite interaccionar con los aminoácidos aromáticos de la misma.³⁹⁻⁴¹

Los complejos intermoleculares que contienen puentes de hidrógeno son quizá los más numerosos. Dichos complejos están estabilizados por interacciones electrostáticas, de inducción y de dispersión. Sin embargo, también hay una serie de interacciones más débiles, que tienen importancia tanto en la estructura de las proteínas como en su estabilidad. Ejemplos de esto son las interacciones O-H/ π , N-H/ π , y C-H/ π ,⁴² las cuales decrecen energéticamente en el orden anterior.

La interacción C-H/ π puede definirse como la interacción atractiva entre un enlace C-H y un sistema π ⁴³ donde el grupo alquilo resulta ser un grupo donador y la densidad electrónica π el atractor. Esta interacción a pesar de ser el enlace de hidrógeno más débil que se haya identificado⁴⁴⁻⁴⁶ ha llamado la atención pues es el origen de diversos fenómenos moleculares como son las propiedades físicas, químicas y biológicas de algunas sustancias.

Las interacciones CH/ π tienen como característica presentarse en medios polares y no polares. La energía de la interacción es de aproximadamente 1 kcal mol⁻¹ y pueden existir debido a que varias interacciones CH/ π pueden coexistir simultáneamente sin una pérdida considerable de entropía, es decir, la energía de interacción aumenta conforme se tenga una estructura química organizada y con ello la energía libre puede favorecer la formación de la supramolécula.

La existencia de una interacción atractiva entre los grupos alquilo y las bases π fue sugerida como resultado de un estudio conformacional en una serie de sistemas R-X-Y- π ,^{47,48} donde se observó que los grupos alquilo (Figura 6) se colocan cerca del donador π (benceno). De forma comparativa con los resultados experimentales, unos cálculos de mecánica molecular⁴⁹ llevaron a los autores a proponer que una interacción débil de naturaleza atractiva estaba presente entre el grupo alquilo y el sistema π .



Figura 6. Conformación preferida de los compuestos R-X-Y- π .

Los cálculos de estructura molecular determinaron que la geometría lineal es la más estable para que la interacción CH/ π se genere. (Figura 7). En esos arreglos, uno de los enlaces C-H se orienta sobre el carbono sp^2 para llevar a cabo un máximo traslape entre los orbitales interaccionantes.

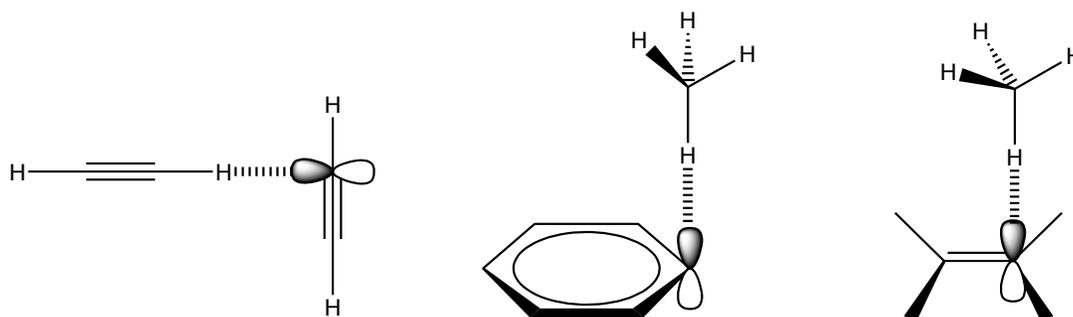


Figura 7. Geometría favorecida en la interacción CH/ π

La disposición geométrica del grupo C-H y del sistema π que interaccionan es importante, ya que debe producirse un traslape adecuado entre los orbitales involucrados. El orbital C-H de antienlace vacío (σ^*_{C-H}) se extiende desde el átomo de hidrógeno a lo largo del eje C-H. La parte π -orbital (esencialmente, el orbital 2pz del carbono) se dispone perpendicular al plano π . La magnitud del traslape es función de la distancia y la orientación de estos dos orbitales.

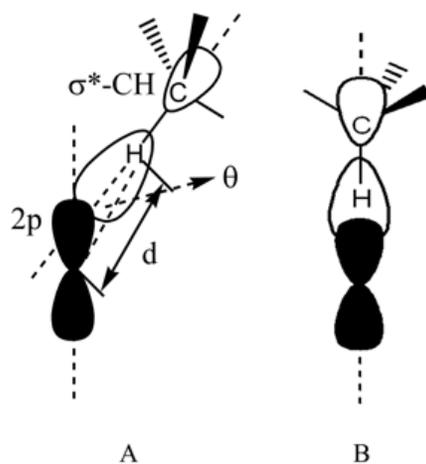


Figura 8 Disposición geométrica de la interacción entre el enlace C-H y el orbital 2p. A) Aproximación no-coaxial general. B) Aproximación coaxial. Los lóbulos negros corresponden a los orbitales ocupados y los blancos a los vacíos.⁴³

En la Tabla 2 se muestra la comparación de la participación que tiene cada uno de los términos energéticos de acuerdo al tipo de enlace de hidrógeno.

Tabla 2. Contribuciones energéticas de los enlaces de hidrógeno.

Enlace de Hidrógeno	Energía de interacción			
	Deslocalización	Coulómbica	Dispersión	Repulsiva v. d. W
CH/ π	Importante	No importante	Importante	Constante
XH/ π^a	Importante	Débil	Importante	Constante
CH/ n	No importante	Importante	No importante	Constante
XH/ n^a	Variable	Fuerte	No importante	Constante

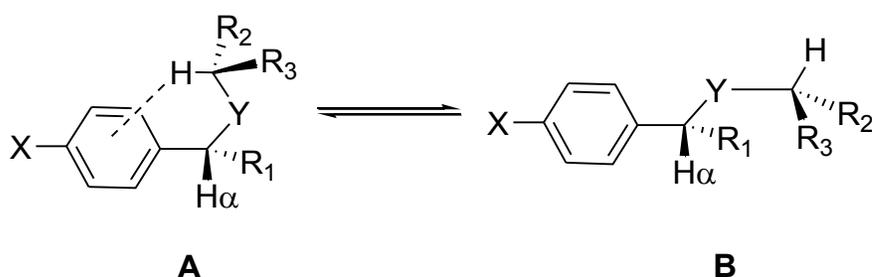
a. Donde X = O ó N; n : par electrónico no compartido.

La interacción CH/ π tiene una mayor contribución de la deslocalización generada por la transferencia de carga $\pi \rightarrow \sigma^*$ así como por las fuerzas de dispersión comparada con el enlace de hidrógeno tradicional. Los grupos que generalmente suelen participar en interacciones CH/ π incluyen al grupo metilo, isopropilo, grupos alquilo de cadena larga o grupos CH en anillos aromáticos como donadores del átomo de hidrógeno. Como aceptores π se cuenta con los enlaces conjugados⁵⁰ y los grupos aromáticos como los que se encuentran en los aminoácidos fenilalanila, tirosina, triptófano e histidina.

El primero en identificar este tipo de interacción fue Tamres,⁵¹ quien propuso que el benceno y sus análogos se comportan como donadores al interaccionar con cloroformo. Reeves⁵² postuló, mediante RMN, que la interacción de cloroformo con benceno y olefinas era del tipo enlace de hidrógeno.

La caracterización de la interacción es un tema de interés general, por lo que ha sido bien abordada haciendo uso de diversas técnicas analíticas como calorimetría,⁴¹ análisis de difracción de rayos X,^{47,48,53} IR,⁵⁴ dicroísmo circular,⁴⁸ y medición del momento dipolar.^{55,56}

Muchos de los estudios de la interacción CH/ π se han hecho en sistemas alifáticos, como por ejemplo Nishio⁵⁷ *et al.* estudiaron el efecto del sustituyente en el anillo aromático a través de RMN con la medición del Incremento del Efecto Nuclear de Overhauser (*nuclear Overhauser enhancement*, NOE por sus siglas en inglés). Los autores concluyeron que la presencia de un sustituyente electronegativo incrementa la interacción CH/ π y que el NOEe es una herramienta útil para poder medir la proximidad de los átomos de hidrógeno de la cadena alifática y los átomos de hidrógeno *orto* en el anillo aromático en la conformación plegada (*gauche*), (Esquema 3).



Esquema 3. Confórmeros que propician (A) o no (B) la interacción CH/ π intramolecular.

Se ha identificado, mediante estudios por difracción de rayos X que los enlaces C-H de los azúcares interaccionan con los aminoácidos aromáticos de las proteínas a través de interacciones CH/ π . Un ejemplo lo constituyen la interacción que se presenta en la proteína que enlaza D-glucosa / D-galactosa, en la cual el anillo de la β -D-glucosa interacciona por la cara α con los aminoácidos Phe16 y por la cara β con el residuo Trp183⁵⁸ (Figura 9).

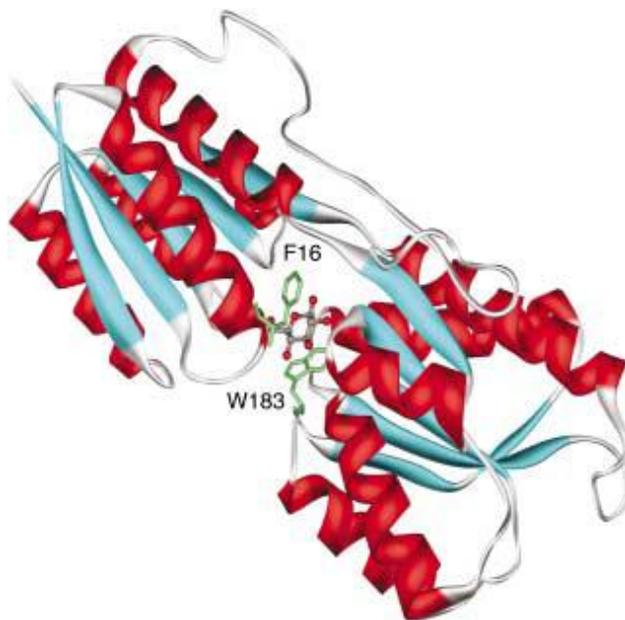


Figura 9. Complejo de β -D-glucosa con la proteína de enlace D-galactosa/D-glucosa (PDB código: 2GBP).⁵⁸

Otro ejemplo se observa en la distancia (3.3 – 4.1 Å) existente entre el grupo isopropilo del agente inhibidor de la trombina y los residuos aromáticos Tyr60A y Trp60D de la enzima. Las interacciones CH/ π se muestran en líneas punteadas en la Figura 10.⁵⁹

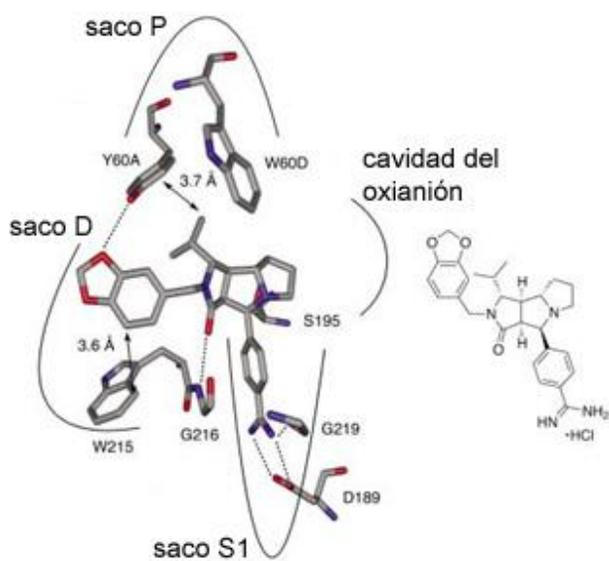
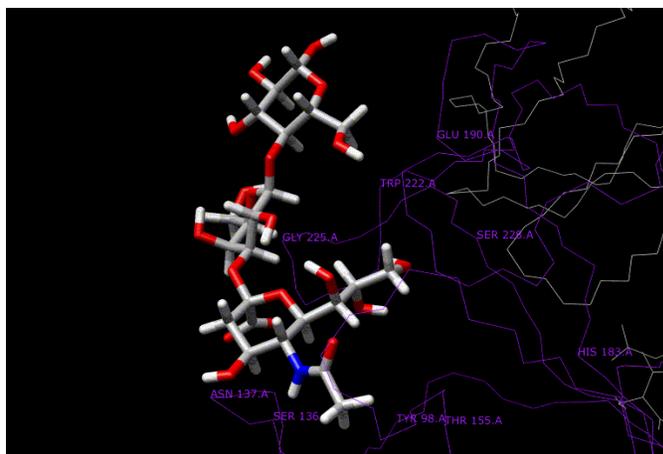
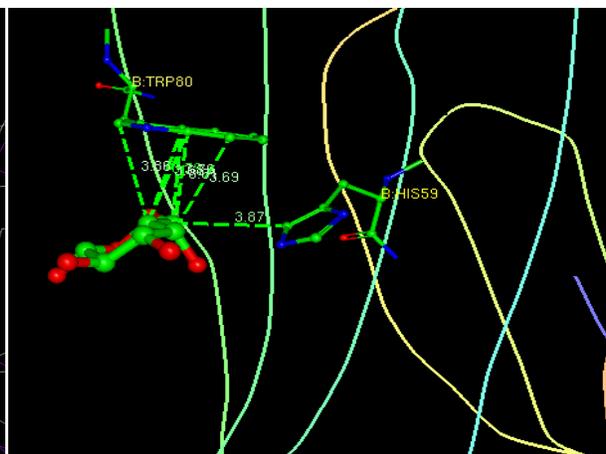


Figura 10. Difracción de rayos X del sitio activo del complejo formado entre la trombina y un inhibidor de la misma.⁵⁹

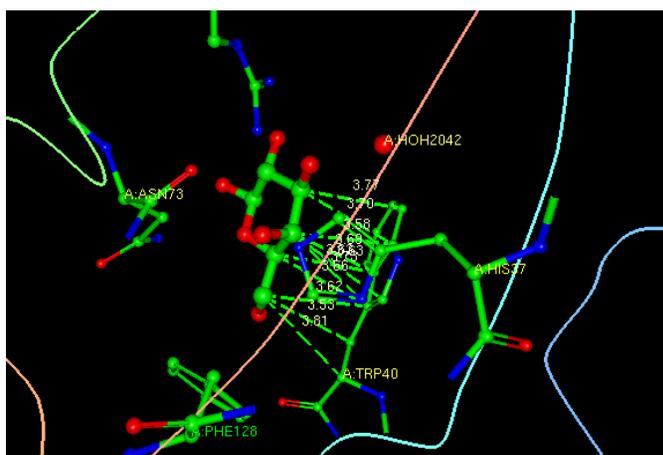
En la actualidad se han descrito numerosos complejos proteína-carbohidrato⁶⁰ donde se puede observar que en los sitios de reconocimiento de las proteínas predominan los aminoácidos aromáticos como fenilalanina, triptófano, histidina y tirosina. Algunos de los complejos se describen a continuación: en **A**, Figura 11, se puede observar la interacción de la galactosa presente en la silillactosa la cual interacciona con un anillo de tirosina de la hemaglutinina del virus de la gripe a través de una interacción 1, 3, 5 de los átomos de hidrógeno del carbohidrato.³⁹ Otro complejo reportado es el formado por la galactosa la cual es reconocida por la lectina AAL del hongo *Agrocybe aegerita* (**B**). Dicha lectina tiene actividad antitumoral y el reconocimiento molecular es a través de los átomos de hidrógeno de las posiciones 4, 5, 6 del anillo de galactosa con un anillo de triptófano.⁶¹ En **C** se reporta la interacción de la galactosa con una sialidasa que está involucrada en la virulencia de *Clostridium perfringens*. La interacción es de los átomos de hidrógeno de la posición 6 del carbohidrato con un anillo de histidina y de 3, 4, 5 con un anillo de triptófano.⁶² En **D** se puede observar el complejo de una lectina hemolítica de *Laetiporus sulphureus* con el disacárido β Gal14Glc. Las interacciones presentes son del anillo de galactosa con un residuo de fenilalanina, mientras que la glucosa interactúa con un anillo de histidina.⁶³ En **E** se muestra la lectina de la especie *Erythrina corallodendron*, la cual es capaz de unirse a N-acetilgalactosamina, N-acetilactosamina y lactosa a través de la interacción, 3, 4, 5 de los átomos de hidrógeno del anillo de la galactosa.⁶⁴ Otro ejemplo **F**, es la fucosillactosa (α Fuc1,2 β Gal1,4Glc) la cual interactúa con un anillo de tirosina de la lectina de *Ulex europaeus*.⁶⁵



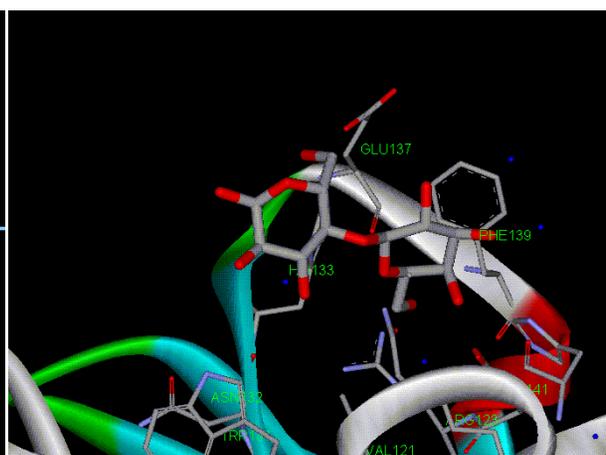
A



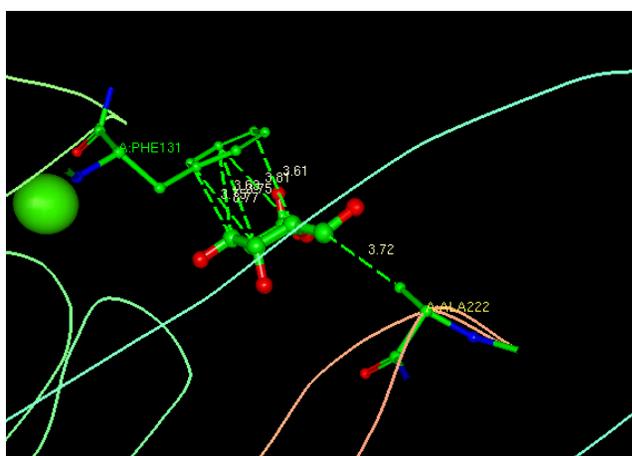
B



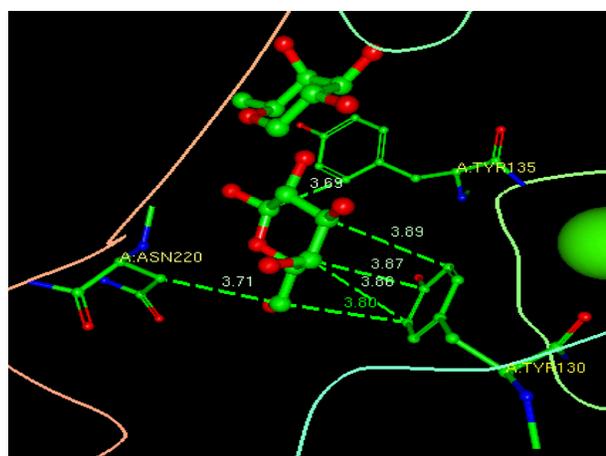
C



D



E



F

Figura 11. Estructuras de los complejos carbohidrato-aminoácido de distintas especies.

La naturaleza y el origen de la interacción CH/ π también fue estudiada por métodos computacionales.⁶⁶ En este caso los aminoácidos aromáticos fueron representados con el anillo de benceno y el azúcar con el que se estudió esta interacción fue la fucosa, la cual es un análogo de la galactosa, carbohidrato que ya se había identificado por presentar la interacción CH/ π con las galectinas. La idea de utilizar la fucosa fue eliminar grados de libertad, al sustituir el hidroximetilo de la posición 6 por un grupo metilo. Para llevar a cabo los cálculos se utilizaron diferentes métodos; se usó el método *ab initio* MP2/6-31G(d,p) y el funcional de la densidad B3LYP/6-31G(d,p); con estos métodos se pudo optimizar el complejo carbohidrato-benceno. También se hicieron los cálculos en los que se incluyó la corrección por superposición de bases (BSSE) y de esta forma se obtuvieron los estados estacionarios que se muestran en la Figura 12.

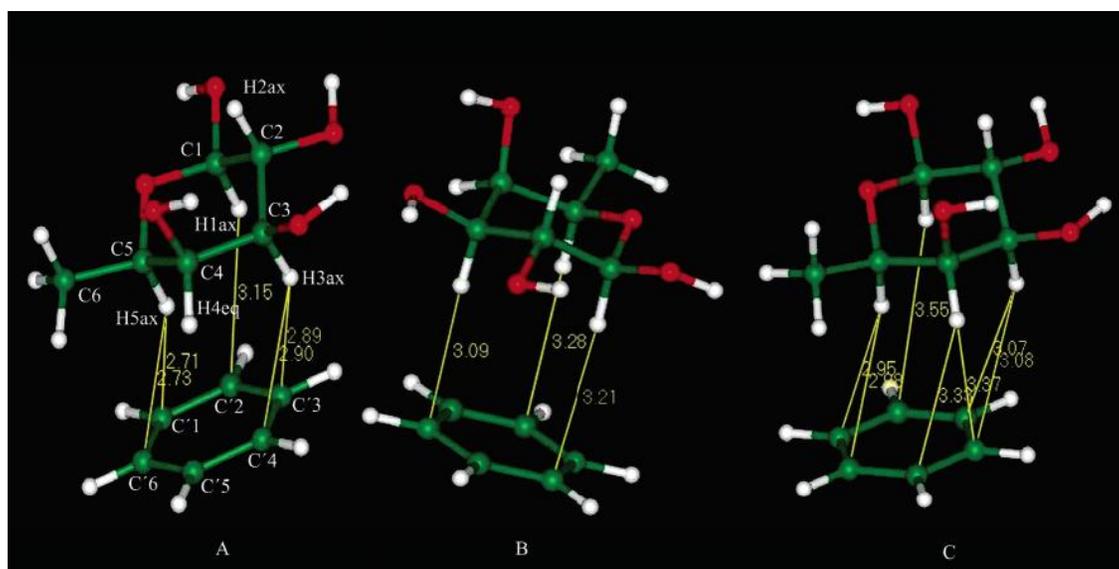


Figura 12. Estados estacionarios del complejo fucosa-benceno. (A) MP2/6-31G(d,p); (B) B3LYP/6-31G(d,p); (C) MP2/6-31G(d,p).⁶⁶

En **A** (Figura 12) se observa la interacción de los átomos de hidrógeno H₁, H₃ y H₅ del carbohidrato con el anillo de benceno a nivel MP2/6-31G(d,p). Cuando se incluye la corrección por superposición de bases se puede apreciar que el anillo de benceno está más cerca del anillo de pirano y se ha desplazado en forma lateral, lo cual permite identificar la interacción con el átomo de hidrógeno H₄ del carbohidrato (**C**) y por último, en **B** se observa que con el método B3LYP las distancias de interacción son mayores, por lo cual no se aprecia la interacción con el átomo de

hidrógeno H₄ del anillo de pirano y prevalece la interacción con el átomo de hidrógeno anomérico del carbohidrato.

Así se confirmó que los métodos *ab initio* como el MP2, son los adecuados para estudiar interacciones a larga distancia ya que permite evaluar de mejor forma la energía de dispersión. El método B3LYP, no es útil ya que no describe adecuadamente las interacciones a larga distancia ya que carece de términos que incluyan las fuerzas de dispersión. También se establece que es importante incluir la corrección por superposición de bases (counterpoise) en la optimización de la geometría. El mejor cálculo de este nivel permite establecer que la energía de interacción para el complejo fucosa-benceno es de 3 kcal mol⁻¹. Llama poderosamente la atención el que aún cuando el funcional B3LYP es inadecuado para estudiar este problema existan tantas publicaciones arbitradas en donde se acepta su uso.

Este tipo de interacción también fue estudiada en el mismo trabajo a través de RMN por medio del cambio del desplazamiento químico de las señales de los átomos de hidrógeno del anillo de pirano. El estudio se llevó a cabo utilizando β-metil galactopiranosido como control positivo y α-metil manopiranosido como control negativo. Cada uno de los compuestos se disolvió en agua deuterada (D₂O) y se obtuvo el espectro de RMN de ¹H. Posteriormente se hizo una adición de benceno hasta saturación y posteriormente se agregó fenol (200 mM), adquiriendo para cada adición el espectro de RMN de ¹H observando el cambio de desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno de las posiciones 3, 4 y 5, los cuales presentaban un efecto de protección debido a la interacción con el anillo aromático. En el caso del α-metil manopiranosido no hay cambios en el desplazamiento químico, (Figura 13).⁶⁶

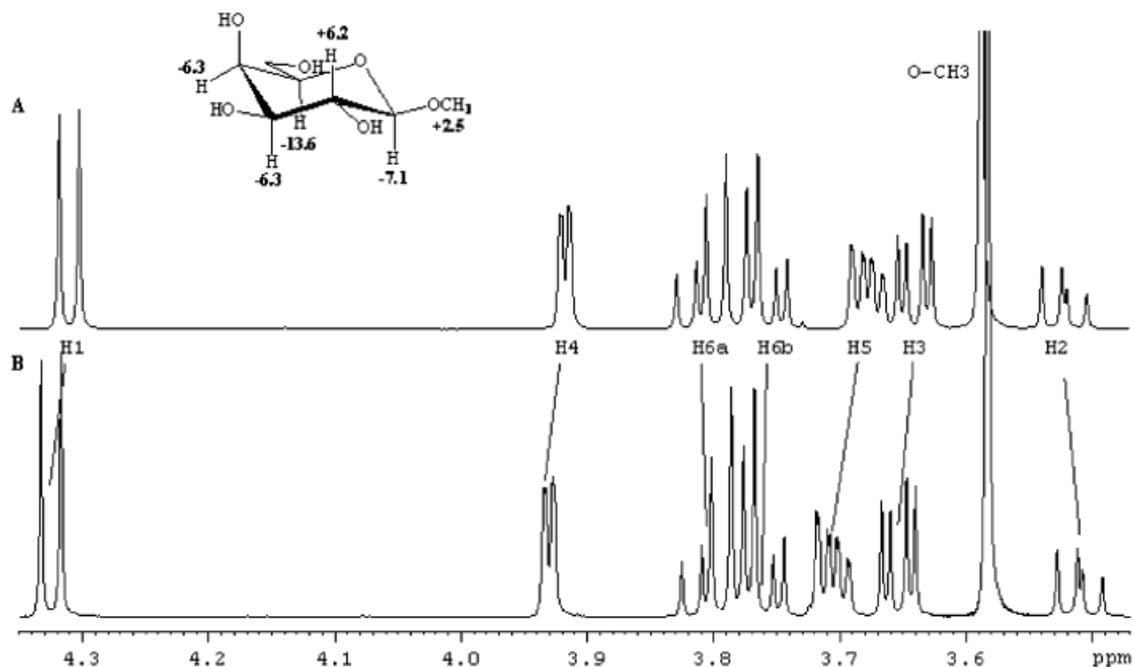


Figura 13. Espectros de RMN de ^1H de β -metil galactopiranosido en D_2O en presencia de benceno/fenol (A) y en ausencia de benceno/fenol (B).⁶⁶

Recientemente esta misma metodología fue usada para los epímeros α y β del metil galactopiranosido. Una de las conclusiones que obtuvieron los autores es que la presencia del grupo metoxilo como sustituyente en la posición 1 del anillo de pirano, hace que en el epímero β , en donde el sustituyente se encuentra en posición ecuatorial, el átomo de hidrógeno H_1 del anillo de pirano presente mayor efecto de protección respecto al epímero α , (Figura 14).⁶⁷

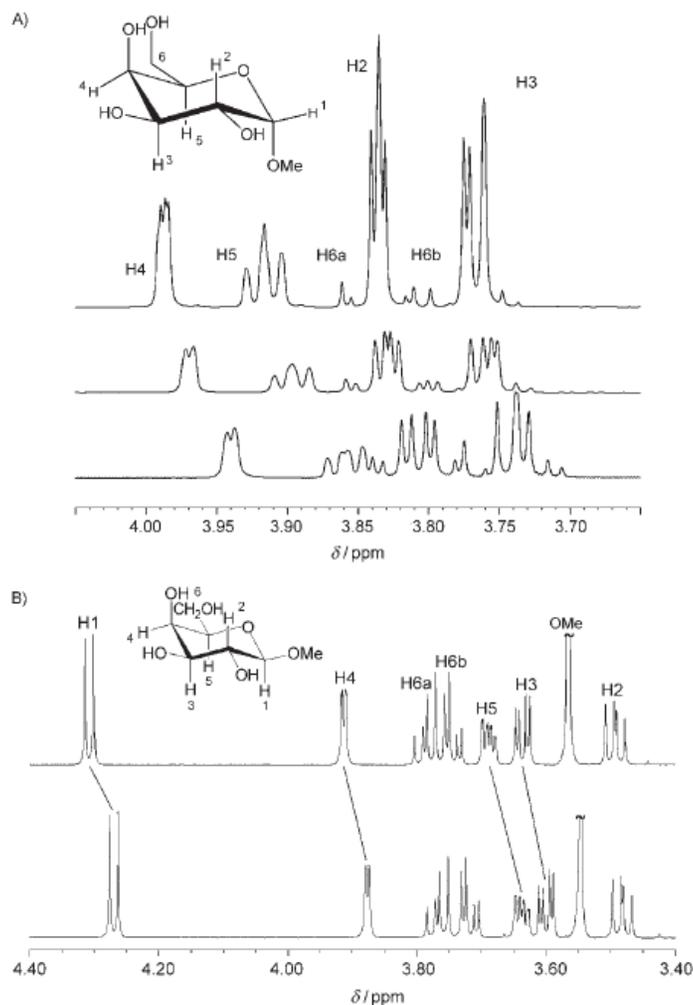


Figura 14. Espectros de RMN de ¹H de α-metil galactopiranosido (A) y β-metil galactopiranosido (B) en ausencia de fenol (parte superior) y en presencia de fenol (parte inferior).⁶⁷

Hasta el momento, existe una incógnita respecto al proceso que regula el reconocimiento de los carbohidratos por las proteínas. La presencia de los residuos aromáticos en los sitios en donde las proteínas reconocen carbohidratos, ¿tienen como propósito estabilizar al carbohidrato a través de una interacción que se produce en una región específica del mismo? o bien ¿su presencia tiene la finalidad de estructurar la cavidad y el fenómeno se produce por la liberación de moléculas de agua del espacio que ocupará el carbohidrato, lo que controla la estabilidad del complejo? En el primer caso, la entalpía debe tener un papel preponderante mientras que en el segundo lo es la entropía. Para el primero de ellos debe existir una energía de interacción asociada a una región molecular. En este caso la preorganización es irrelevante pues sólo la complementariedad es necesaria.

2.2 OBJETIVOS

1. Desarrollar una metodología que permita determinar tanto la energía como la región molecular de interacción entre benceno (un modelo de proteína) y un carbohidrato cualquiera.
2. Desarrollar modificaciones en el carbohidrato que permita una aproximación a la evaluación de la energía CH/ π y evaluarlas.

2.3 METAS

1. Sintetizar piranosas permetiladas como la galactosa, la glucosa y la manosa a partir de los α y β -metil glicopiranosidos.
2. Medir el calor de solvatación los carbohidratos permetilados en compuestos aromáticos y determinar la energía de interacción.
3. Realizar las titulaciones anisotrópicas de los carbohidratos permetilados en benceno y hexafluorobenceno para identificar por RMN dichas interacciones por el efecto de protección y desprotección que produce el benceno.

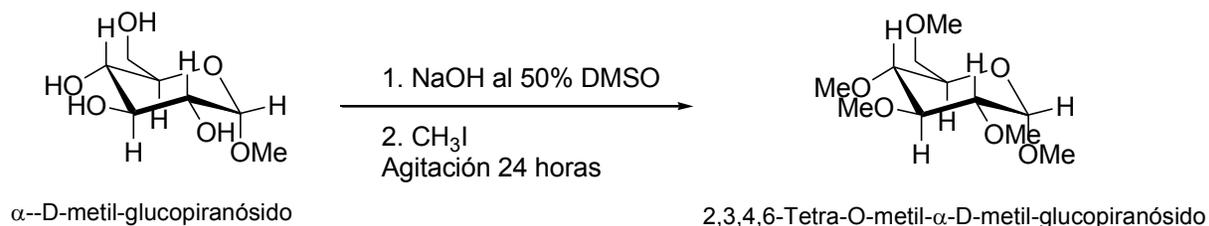
2.4 ORIGINALIDAD

Hasta el día de hoy no existe una metodología que permita determinar directamente la energía de la interacción carbohidrato-compuesto aromático, por lo que es relevante desarrollarla. El desarrollo de esta metodología permitirá en una primera instancia estudiar sistemas sencillos pero podrá ser utilizada para el estudio de la interacción CH/ π en sistemas biológicos.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSION

2.5.1 Síntesis y purificación de los compuestos.

La síntesis descrita en la parte experimental se llevó a cabo con cinco diferentes piranosas: α -metil galactopiranosido, β -metil galactopiranosido, α -metil glucopiranosido, β -metil glucopiranosido, y α -metil manopiranosido (Figura 15). La reacción química se llevó a cabo de acuerdo al Esquema 4. Los rendimientos químicos oscilaron entre el 65 y el 75% (Ver Parte Experimental).



Esquema 4. Síntesis de los carbohidratos permetilados.

De esta forma se logró la obtención de los compuestos permetilados Figura 15: A partir de este momento, los compuestos sintetizados serán denotados de la siguiente forma: *anómero-carbohidrato permetilado*, ej. *α -manosa permetilada (5)*.

Los compuestos permetilados fueron utilizados para estudios de RMN y de calorimetría, ésta última técnica requiere compuestos con una pureza mayor al 99.9%, por lo que la purificación de los compuestos requirió de un proceso especial que está descrito en la parte experimental.

El objeto de tener los compuestos permetilados fue que a través de la sustitución de los grupos hidroxilo por grupos metoxilo, se lograría su solubilidad en benceno, además de evitar interacciones de tipo puente de hidrógeno o interacciones OH/ π de los azúcares con el anillo bencénico. Como ya se mencionó en la introducción de este capítulo, este tipo de interacciones son más energéticas que la interacción CH/ π y por lo tanto podían enmascararla.

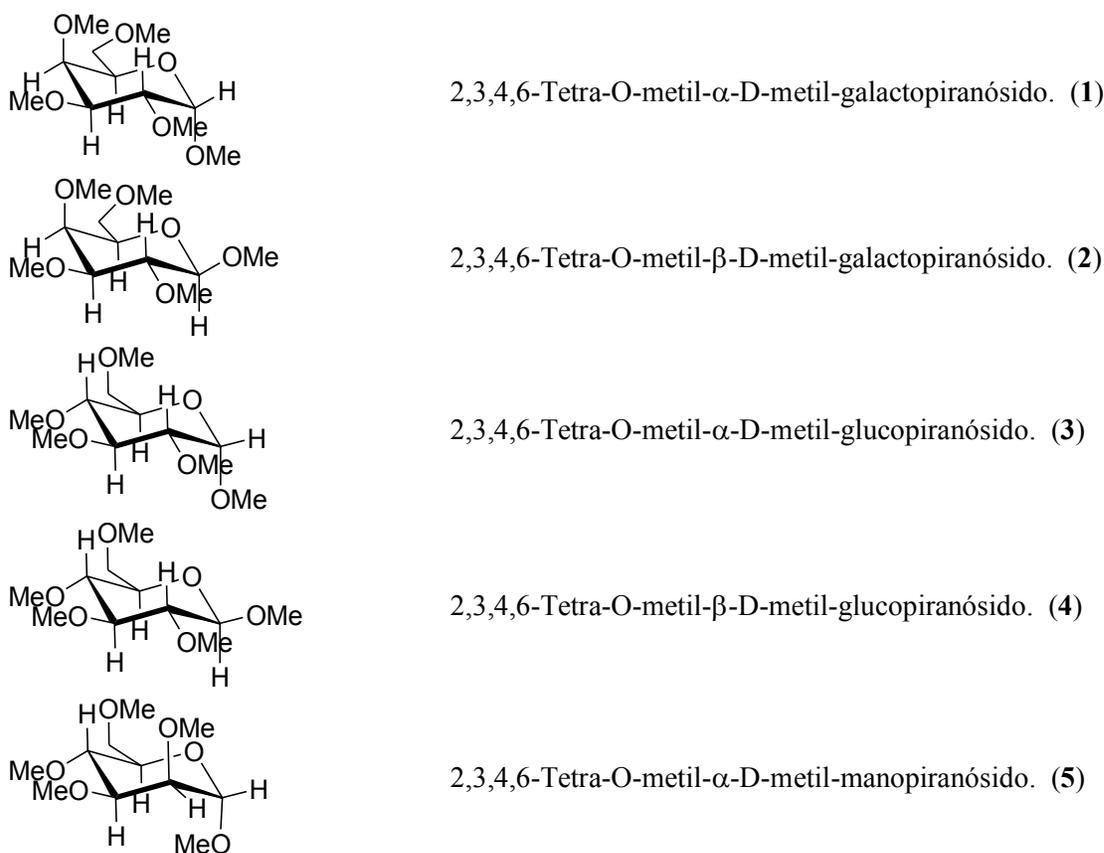


Figura 15. Carbohidratos permetilados utilizados en el presente estudio.

2.5.2 Estudios de RMN.

2.5.2.1 Identificación de la región molecular en la que presenta la interacción CH/π

La Resonancia Magnética Nuclear es una técnica espectroscópica que se basa en el siguiente principio: una sustancia es introducida en un campo magnético homogéneo externo (B_0), posteriormente la muestra es irradiada con una radiofrecuencia. Dicha radiación genera transiciones en el equilibrio de los diferentes estados poblacionales de los espines nucleares, que se traducen como núcleos excitados. La energía de dichos núcleos se libera en pequeñas emisiones magnéticas a través de la descomposición sin inducción (FID por sus siglas en inglés).

La señal es digitalizada y traducida a lo que se conoce como espectro de RMN, que generalmente se representa como señales en una escala de partes por millón (ppm).

Los estudios de RMN ya descritos sirvieron como antecedente⁶⁶ y permitirían resolver el primer problema que comprende la identificación de la región de la molécula en la cual se lleva a cabo la interacción. Uno de los parámetros de la RMN que se usó fue el cambio en el desplazamiento químico de las señales ($\Delta\delta$), el otro fue la medición del incremento del efecto nuclear de Overhauser (NOE por sus siglas en inglés *nuclear Overhauser enhancement*) y el tercero es el cambio del efecto NOE por variación del tiempo de mezclado. Estas determinaciones se han empleado para el estudio de las interacciones en complejos como ciclodextrinas-trifluoroetanol⁶⁸ o ciclodextrinas-compuestos aromáticos.⁶⁹ Por otro lado, el uso del procedimiento de titulación anisotrópica ha permitido establecer que la β -galactosa y el benceno⁴¹ o fenol⁶⁶ interactúan en la región del segmento C3-C6 de la galactosa, tal y como describen los cálculos teóricos, como ya se mencionó en la introducción del presente capítulo.

Un tipo de estudios de RMN que se basan en los cambios de desplazamiento químicos son las llamadas titulaciones anisotrópicas, las cuales tienen el siguiente fundamento: Cuando una molécula es introducida en un campo magnético externo (B_0), los electrones de dicha molécula circulan en ella generando pequeños campos magnéticos. Dichos campos magnéticos pueden estar orientados a favor o en contra del campo magnético externo (B_0). Estas fluctuaciones electrónicas generan zonas diamagnéticas también llamadas zonas de protección, donde el campo magnético de la molécula está alineado con el campo magnético externo (B_0). También se producen zonas paramagnéticas llamadas zonas de desprotección, en las cuales el campo magnético de la molécula se opone al campo magnético externo (B_0). En la Figura 16 se muestra la ubicación de estas regiones en la molécula de benceno.

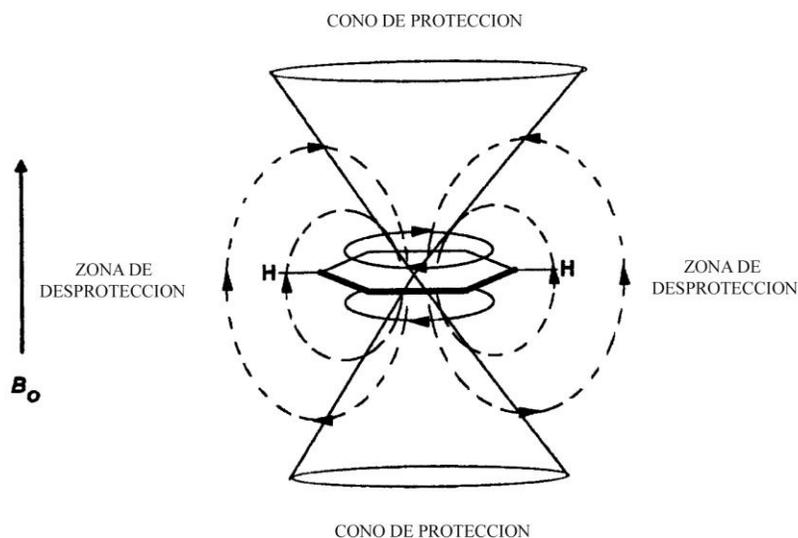


Figura 16. Campos magnéticos anisotrópicos inducidos en la proximidad del anillo de benceno.⁷⁰

El benceno es una molécula aromática en la cual los electrones π se encuentran distribuidos por arriba y por debajo del esqueleto σ . Una distribución análoga de regiones de protección y desprotección se representa para el grupo carbonilo (Figura 17). Estas características fueron esenciales para el presente estudio, ya que cualquier átomo que por razones conformacionales o por solvatación se ubique en la zona de protección tiende a desplazarse a campo alto en el espectro de RMN, mientras que los átomos que se ubican en la zona de desprotección aparecerán a campo bajo (Figura 18).



Figura 17. Zonas de protección y de desprotección para el anillo de benceno y el grupo carbonilo.

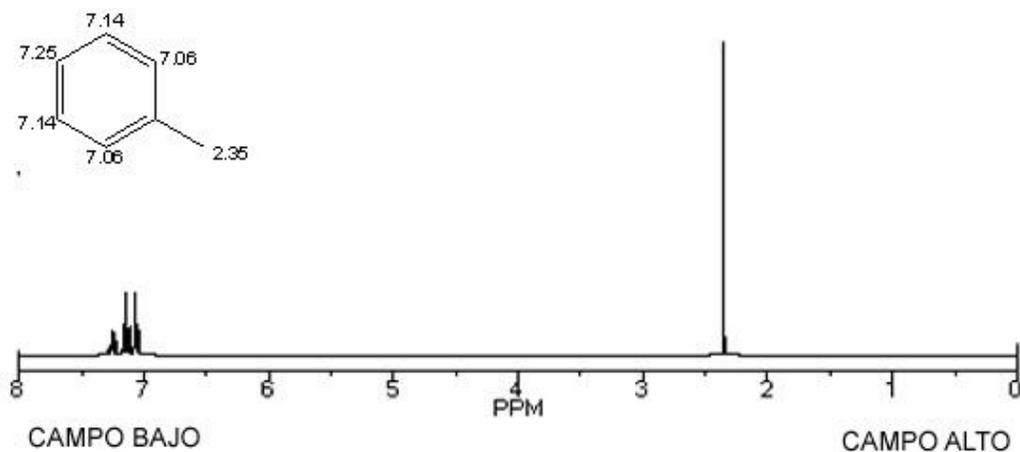


Figura 18. Espectro simulado de RMN de ^1H de tolueno.

Como ya se mencionó en la introducción del presente capítulo, en muchos sitios de reconocimiento de los carbohidratos principalmente para la galactosa y la glucosa, las interacciones CH/π se generan de la forma consecutiva 3, 4, 5 para la α -galactosa (Figura 19. **a**) o de forma alternada 1, 3, 5 como en el caso de la β -glucosa (Figura 19. **b**).

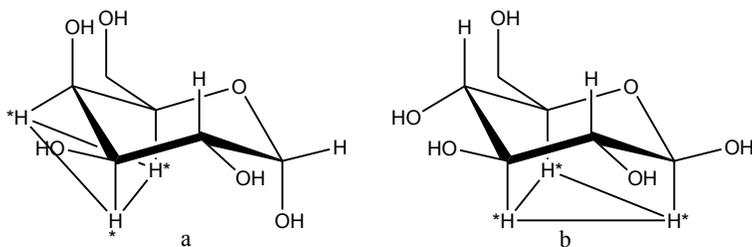


Figura 19. Interacciones CH/π en arreglo consecutivo (**a**) y alternado (**b**).

De esta forma, a lo largo de este estudio, los epímeros de la galactosa permetilada (**1** y **2**) son considerados control positivo, dado que se puede presentar 3 interacciones CH/π : mediadas por los átomos de hidrógeno de las posiciones 3, 4 y 5, mientras que el control negativo es la α -manosa permetilada (**5**) ya que en la posición 4 se encuentra un grupo metoxilo en posición ecuatorial que genera un ambiente repulsivo que evita la aproximación del benceno (Figura 20).

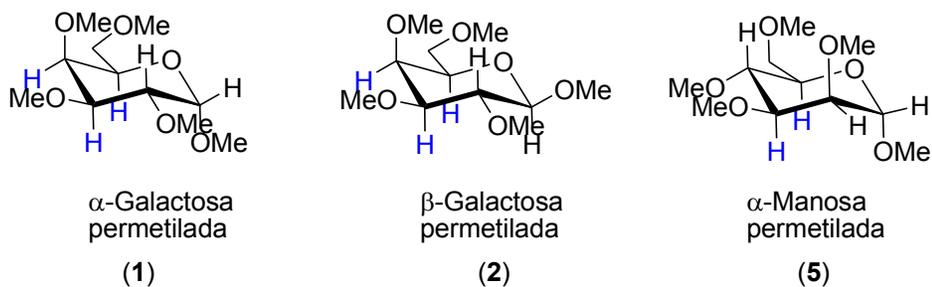


Figura 20. Átomos de hidrógeno involucrados en la interacción CH/ π .

La forma como se numeran las posiciones de los carbohidratos a lo largo de este trabajo se muestra en la Figura 21.

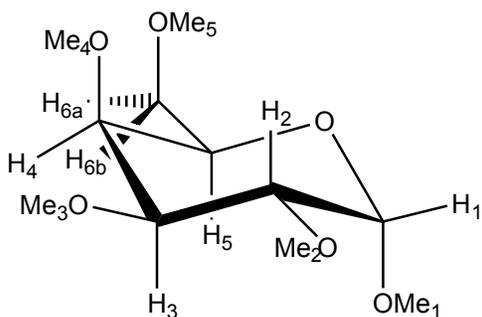


Figura 21. Numeración de las posiciones de los carbohidratos permetilados.

La metodología para llevar a cabo las titulaciones anisotrópicas se describe en la parte experimental. Los resultados para α -galactosa permetilada (1) se muestran en la Tabla 3.

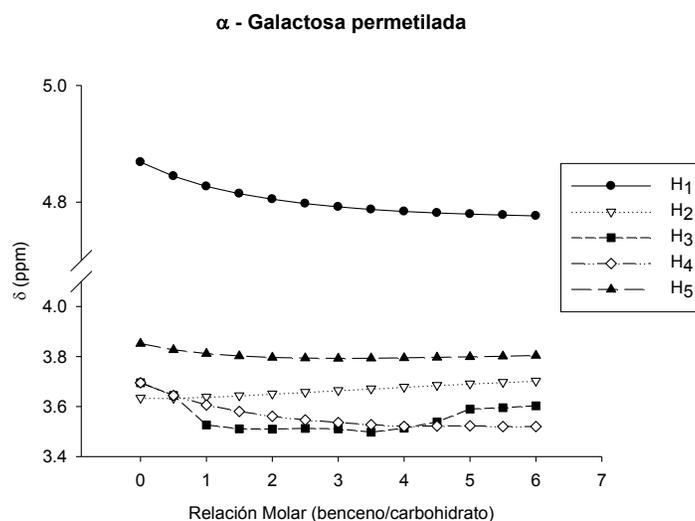
Tabla 3. Desplazamientos químicos de las señales de RMN de ^1H de la α -galactosa permetilada (**1**) durante la titulación anisotrópica.

α-Galactosa Permetilada														
Ensayo	CDCl_3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C_6D_6
a	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	1.00
H₁	4.87	4.84	4.83	4.81	4.81	4.80	4.79	4.79	4.78	4.78	4.78	4.78	4.78	4.77
H₂	3.63	3.63	3.64	3.64	3.65	3.66	3.67	3.67	3.68	3.69	3.69	3.70	3.70	3.82
H₃	3.70	3.64	3.53	3.51	3.51	3.51	3.51	3.50	3.51	3.54	3.59	3.60	3.60	3.62
H₄	3.70	3.64	3.61	3.58	3.56	3.55	3.54	3.53	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52
H₅	3.85	3.83	3.81	3.80	3.80	3.79	3.79	3.79	3.79	3.80	3.80	3.80	3.80	3.90
H_{6a}	3.58													3.52
H_{6b}	3.58													3.60
Me₁	3.42	3.38	3.36	3.34	3.32	3.31	3.30	3.29	3.28	3.28	3.27	3.27	3.26	3.20
Me₂	3.51	3.48	3.45	3.42	3.40	3.39	3.37	3.36	3.35	3.35	3.34	3.34	3.33	3.26
Me₃	3.52	3.48	3.46	3.44	3.42	3.40	3.39	3.38	3.38	3.37	3.36	3.36	3.35	3.27
Me₄	3.57	3.54	3.52	3.50	3.49	3.48	3.48	3.48	3.47	3.47	3.47	3.47	3.47	3.47
Me₅	3.41	3.36	3.33	3.30	3.28	3.26	3.25	3.24	3.23	3.22	3.22	3.21	3.21	3.14

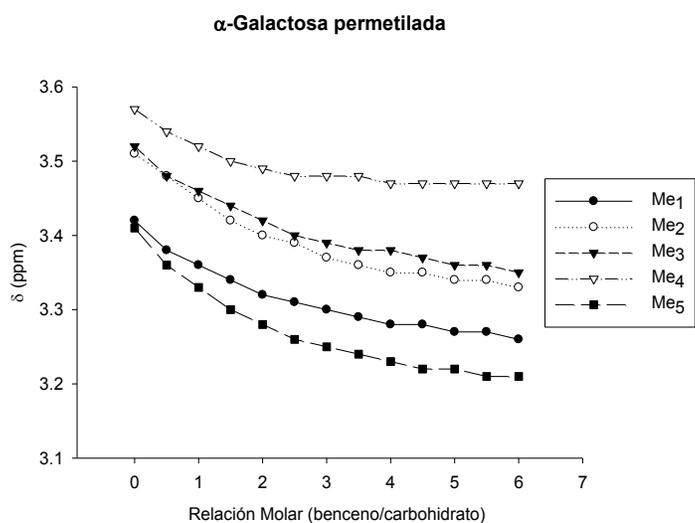
a. Fracción molar carbohidrato:benceno.

Los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de la α -galactosa permetilada (**1**) se resumen para las señales de los átomos de hidrógeno H₁, H₃, H₄ y H₅ que se desplazan a campo alto, con lo cual se puede asumir que dichos átomos de hidrógeno se encuentran frente a la cara del benceno. Todos los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo también presentan un efecto de protección, lo cual es de esperarse dado que durante la solvatación es muy factible que dichos grupos interactúen con una molécula de benceno, como se puede observar para la molécula de benceno del lado derecho (Figura 22), la cual interactúa con los grupos Me₁, Me₂ así como el H₁ de la posición anomérica. Los resultados anteriores se pueden apreciar mejor en las Gráficas 1 y 2. El átomo de hidrógeno H₁ tiene una pendiente pronunciada, que representa una protección de 0.9 ppm, los átomos de hidrógeno H₃, H₄ y H₅ muestran un efecto de protección, en el caso del átomo de hidrógeno H₃ la curva no es regular a lo largo de toda la titulación anisotrópica, ya que cuando la relación carbohidrato:benceno es 1:4 se muestra un cambio en sentido contrario de la pendiente de la curva. Sin embargo aún cuando se puede pensar que este átomo de hidrógeno

interactuó con la zona de desprotección del benceno, la diferencia respecto al desplazamiento químico inicial es de 1.0 ppm lo cual lo sigue manteniendo protegido respecto al inicio del experimento. Como ya se mencionó, todos los grupos metoxilo presentan un efecto de protección, ya que presentan una pendiente negativa (ver Grafica 2).



Grafica 1. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto **1**.



Grafica 2. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo del compuesto **1**.

Los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de las posiciones H_{6a} y H_{6b} no se pudieron seguir a lo largo de la titulación anisotrópica ya que presentan una superposición con otras señales del espectro.

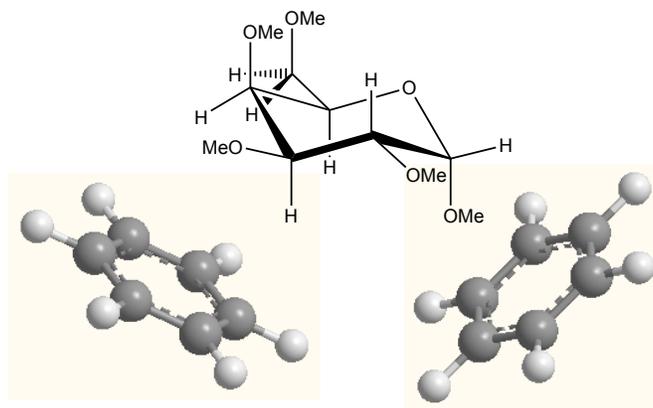


Figura 22. Interacción de los átomos de hidrógeno del anillo de pirano y de los grupos metoxilo con la cara del benceno.

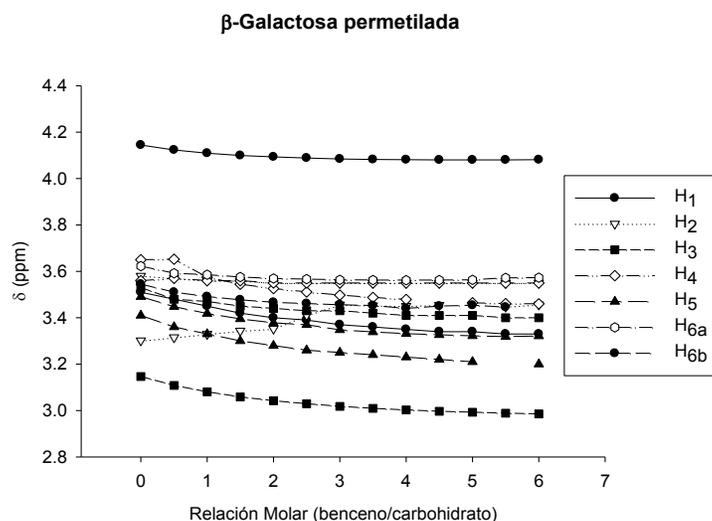
Para el caso de la β -galactosa permetilada (**2**) los cambios en los desplazamientos químicos a lo largo de la titulación anisotrópica se pueden apreciar en la Tabla 4. Debido a que las señales se resuelven completamente, todas ellas se pueden seguir a lo largo de la titulación anisotrópica siguiendo dos criterios, la multiplicidad o la constante de acoplamiento (J)

Tabla 4. Desplazamientos químicos de las señales de RMN de ^1H de la β -galactosa permetilada (2) durante la titulación anisotrópica.

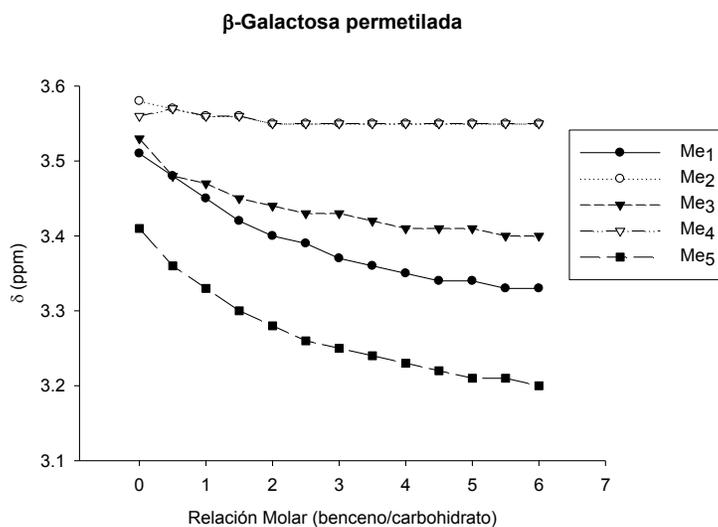
β-Galactosa Permetilada														
Ensayo	CDCl_3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C_6D_6
a	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	1.00
H₁	4.14	4.12	4.11	4.10	4.09	4.09	4.08	4.08	4.08	4.08	4.08	4.08	4.08	4.14
H₂	3.30	3.32	3.33	3.34	3.35	3.41	3.46	3.45	3.45	3.45		3.45	3.46	3.68
H₃	3.15	3.11	3.08	3.06	3.04	3.03	3.02	3.01	3.00	3.00	2.99	2.99	2.99	2.97
H₄	3.65	3.65	3.57	3.54	3.53	3.51	3.50	3.49	3.48		3.46	3.46	3.46	3.45
H₅	3.49	3.45	3.42	3.40	3.38	3.37	3.35	3.34	3.33	3.33	3.32	3.32	3.32	3.33
H_{6a}	3.62	3.59	3.59	3.58	3.57	3.57	3.56	3.56	3.56	3.56	3.56	3.57	3.57	3.64
H_{6b}	3.55	3.51	3.49	3.48	3.47	3.46	3.46	3.45	3.44	3.45	3.45	3.45		3.50
Me₁	3.51	3.48	3.45	3.42	3.40	3.39	3.37	3.36	3.35	3.34	3.34	3.33	3.33	3.37
Me₂	3.58	3.57	3.56	3.56	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.56
Me₃	3.53	3.48	3.47	3.45	3.44	3.43	3.43	3.42	3.41	3.41	3.41	3.40	3.40	3.27
Me₄	3.56	3.57	3.56	3.56	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.46
Me₅	3.41	3.36	3.33	3.30	3.28	3.26	3.25	3.24	3.23	3.22	3.21	3.24	3.20	3.11

a. Fracción molar carbohidrato:benceno.

Los desplazamientos de interés son los que corresponden a los átomos de hidrógeno H₁, H₃, H₄ y H₅. El átomo de hidrógeno de la posición 1 presenta una protección de 0.9 ppm, mientras que para los átomos de hidrógeno 3, 4 y 5, los cambios en el desplazamiento químico van de 0.6 a 0.2 ppm, lo cual hace referencia a que nuevamente éstos son los átomos de hidrógeno que interaccionan con la cara del benceno, ya que experimentan un cambio en el desplazamiento químico a campo alto. Estos cambios en los desplazamientos químicos concuerdan con los del epímero α .



Grafica 3. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto **2**.



Grafica 4. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo del compuesto **2**.

Como se puede apreciar en la Gráfica 3, son los átomos de hidrógeno de las posiciones H₃, H₄ y H₅ los que presentan un efecto de protección. El átomo de hidrógeno H₂ presenta el efecto opuesto y como se puede apreciar en la Gráfica 3, es el único que tiene una pendiente positiva. Los grupos metilo de las posiciones 2 y 4 son los que presentan menos cambios en el desplazamiento químico, apenas de 0.03 y 0.01 ppm, respectivamente. Para el resto de los grupos metilo el cambio es de aproximadamente 0.2 ppm. Nuevamente para todos los casos, los cambios más significativos se presentan cuando se alcanza una relación 1:3 de carbohidrato:benceno en

solución. Así se puede afirmar que nuevamente los átomos de hidrógeno del anillo de pirano están interaccionando con las caras del benceno.

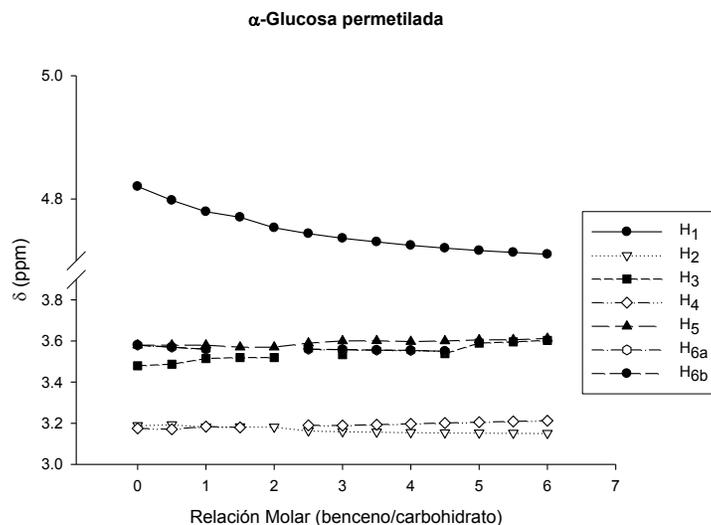
Tabla 5. Desplazamientos químicos de las señales de RMN de ^1H de la α -glucosa permetilada (**3**) durante la titulación anisotrópica.

α -Glucosa permetilada														
Ensayo	CDCl_3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C_6D_6
a	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	1.00
H_1	4.82	4.80	4.78	4.77	4.75	4.74	4.74	4.73	4.73	4.72	4.72	4.71	4.71	4.64
H_2	3.19	3.19	3.18	3.18	3.18	3.16	3.16	3.16	3.16	3.15	3.15	3.15	3.15	3.12
H_3	3.48	3.49	3.51	3.52	3.52		3.53			3.54	3.59	3.60	3.60	3.70
H_4	3.18	3.17	3.18	3.18		3.19	3.19	3.19	3.20	3.20	3.21	3.21	3.21	3.26
H_5	3.58	3.58	3.58	3.57	3.57	3.59	3.60	3.60	3.60	3.60	3.61	3.61	3.61	3.71
H_{6a}	3.58	3.57	3.56			3.56	3.56	3.56	3.55	3.55				3.47
H_{6b}	3.58	3.57	3.56			3.56	3.56	3.56	3.55	3.55				3.55
Me_1	3.42	3.38	3.35	3.33	3.31	3.29	3.28	3.27	3.26	3.25	3.25	3.24	3.24	3.14
Me_2	3.51	3.47	3.44	3.42	3.40	3.38	3.36	3.35	3.34	3.33	3.32	3.32	3.31	3.18
Me_3	3.62	3.62	3.61	3.59	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.57	3.57	3.57	3.57	3.54
Me_4	3.54	3.52	3.50	3.49	3.48	3.47	3.47	3.46	3.46	3.46	3.46	3.46	3.46	3.45
Me_5	3.42	3.39	3.35	3.33	3.31	3.30	3.29	3.27	3.26	3.26	3.25	3.24	3.24	3.18

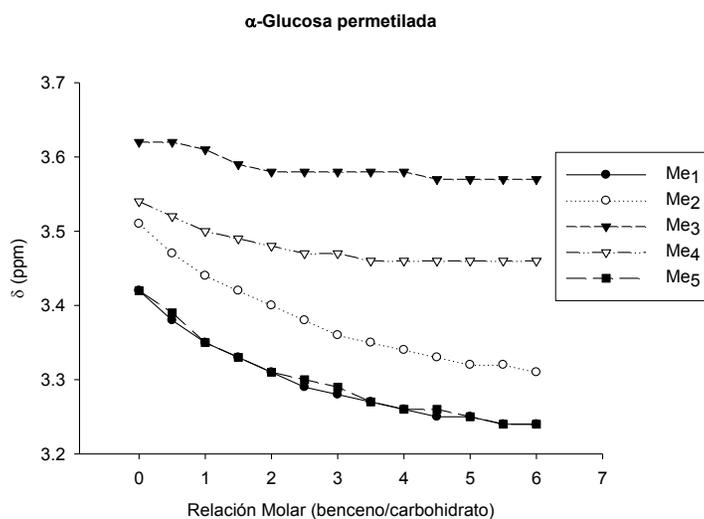
a. Relación molar carbohidrato:benceno.

En el caso de la α -glucosa permetilada (**3** Tabla 5), con excepción del átomo de hidrógeno de la posición anomérica, los sustituyentes se encuentran en posición ecuatorial. Los átomos de hidrógeno de las posiciones H_1 y H_2 son los que presentan mayor efecto de protección, mientras que el resto de los átomos de hidrógeno del anillo presentan un efecto de desprotección, lo que indica que se encuentran interaccionando con el fragmento σ del anillo de benceno y por lo tanto en la gráfica se observa una pendiente positiva de estas líneas (Gráfica 5). Los átomos de hidrógeno del grupo metilo de la posición 6 no pueden seguirse hacia el final de la titulación debido al translapo de las señales en el espectro de RMN de ^1H . Nuevamente todos los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo presentan un efecto de protección, lo cual se puede confirmar

en la Gráfica 6. Los cambios más notables en las pendientes de las líneas se observan cuando hay tres moléculas de benceno por cada una de carbohidrato.



Gráfica 5. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto **3**.



Gráfica 6. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo del compuesto **3**.

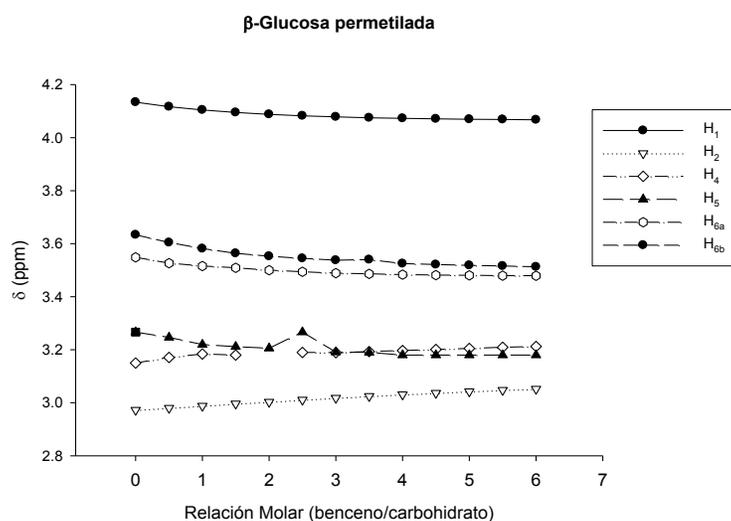
En el caso de la β -glucosa permetilada (**4** Tabla 6), los efectos de protección se observan para los átomos de hidrógeno de las posiciones H₁, H₅ H_{6a} y H_{6b}. Por el contrario, los átomos de hidrógeno H₂ y H₄ presentan un efecto de desprotección. Los efectos observados no son similares a los del epímero α . Nuevamente los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo interaccionan

con la cara del benceno, por lo que todos ellos se desplazan a campo alto. Sin embargo los que presentan mayor efecto de protección son los grupos metilo de las posiciones 1 y 5 (Gráfica 8).

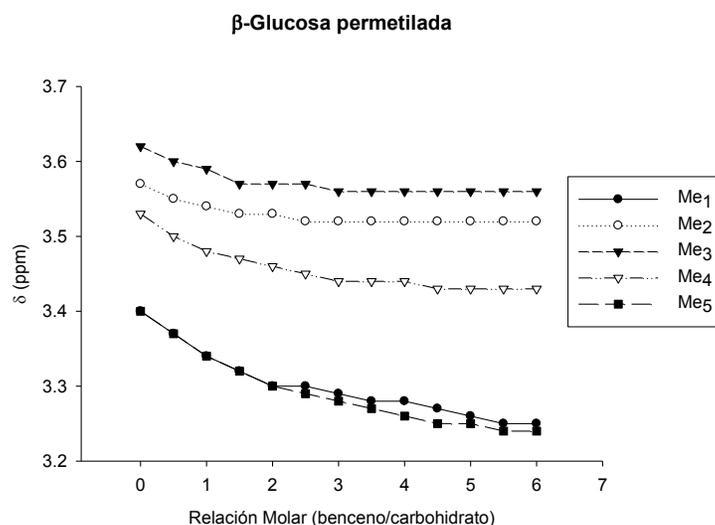
Tabla 6. Desplazamientos químicos de las señales de RMN de ^1H de la β -glucosa permetilada (**4**) durante la titulación anisotrópica.

β -Glucosa permetilada														
Ensayo	CDCl_3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C_6D_6
a	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	1.00
H_1	4.13	4.12	4.10	4.10	4.09	4.08	4.08	4.08	4.07	4.07	4.07	4.07	4.07	4.07
H_2	2.97	2.98	2.99	3.00	3.00	3.01	3.02	3.02	3.03	3.04	3.04	3.05	3.05	3.14
H_3	3.27													3.24
H_4	3.15	3.17	3.18	3.18		3.19	3.19	3.19	3.20	3.20	3.21	3.21	3.21	3.24
H_5	3.27	3.25	3.22	3.21	3.21	3.27	3.19	3.19	3.18	3.18	3.18	3.18	3.18	3.24
H_{6a}	3.55	3.53	3.52	3.51	3.50	3.49	3.49	3.49	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.51
H_{6b}	3.63	3.60	3.58	3.56	3.55	3.54	3.54	3.54	3.53	3.52	3.52	3.52	3.51	3.51
Me_1	3.40	3.37	3.34	3.32	3.30	3.30	3.29	3.28	3.28	3.27	3.26	3.25	3.25	3.30
Me_2	3.57	3.55	3.54	3.53	3.53	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52
Me_3	3.62	3.60	3.59	3.57	3.57	3.57	3.56	3.56	3.56	3.56	3.56	3.56	3.56	3.57
Me_4	3.53	3.50	3.48	3.47	3.46	3.45	3.44	3.44	3.44	3.43	3.43	3.43	3.43	3.42
Me_5	3.40	3.37	3.34	3.32	3.30	3.29	3.28	3.27	3.26	3.25	3.25	3.24	3.24	3.18

a. Fracción molar carbohidrato:benceno.



Gráfica 7. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto **4**.



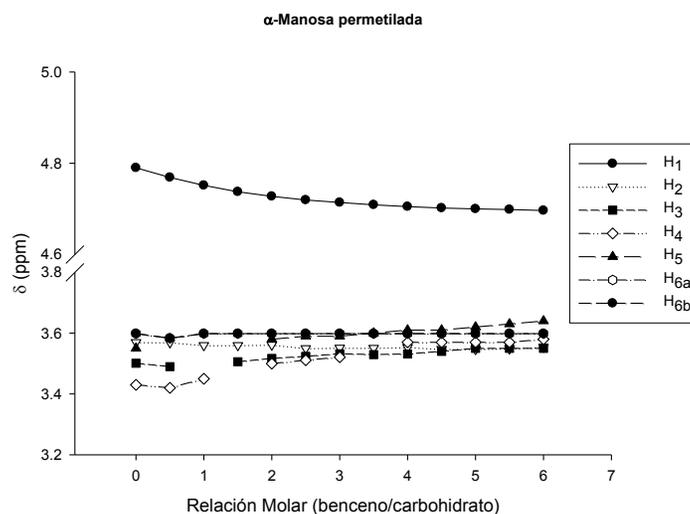
Grafica 8. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo del compuesto **4**.

En el caso de la α -manosa permetilada (**5** Tabla 7), los átomos de hidrógeno de las posiciones H₃, H₄ y H₅ presentan un efecto de desprotección. Dicha región de la molécula es aquella en la que podría presentarse la interacción CH/ π , sin embargo es claro que la presencia de un grupo metoxilo en la posición 4 impide la aproximación de la molécula de benceno al anillo de pirano, por lo cual estos átomos de hidrógeno interaccionan con el fragmento σ de la molécula de benceno. Los átomos de hidrógeno del grupo hidroximetilo no presentan cambios en el desplazamiento químico a lo largo de la titulación anisotrópica.

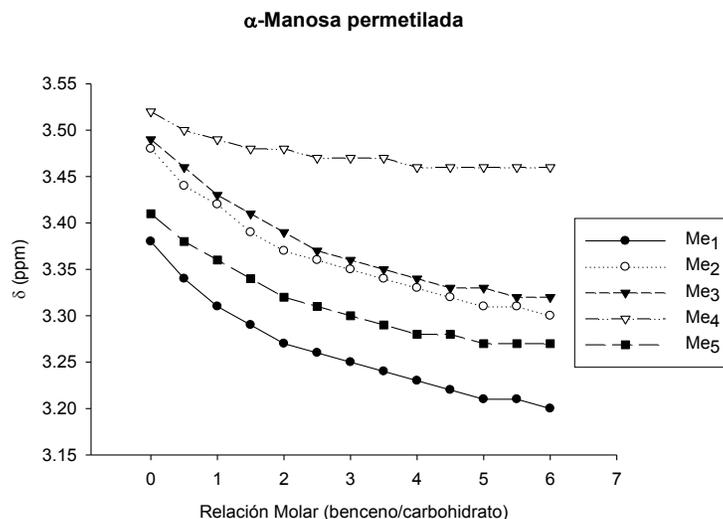
Tabla 7. Desplazamientos químicos de las señales de RMN de ^1H de la α -manosa permetilada (**5**) durante la titulación anisotrópica.

α -Manosa permetilada														
Ensayo	CDCl_3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C_6D_6
a	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	1.00
H_1	4.79	4.77	4.75	4.74	4.73	4.72	4.71	4.71	4.71	4.70	4.70	4.70	4.70	4.64
H_2	3.57	3.57	3.56	3.56	3.56	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.43
H_3	3.50	3.49		3.51	3.52	3.52	3.53	3.53	3.53	3.54	3.55	3.55	3.55	3.59
H_4	3.43	3.42	3.45		3.50	3.51	3.52		3.57	3.57	3.57	3.57	3.58	3.62
H_5	3.55				3.58	3.59	3.59	3.60	3.61	3.61	3.62	3.63	3.64	3.70
H_{6a}	3.60	3.58	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.58
H_{6b}	3.60	3.58	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.53
Me_1	3.38	3.34	3.31	3.29	3.27	3.26	3.25	3.24	3.23	3.22	3.21	3.21	3.20	3.13
Me_2	3.48	3.44	3.42	3.39	3.37	3.36	3.35	3.34	3.33	3.32	3.31	3.31	3.30	3.23
Me_3	3.49	3.46	3.43	3.41	3.39	3.37	3.36	3.35	3.34	3.33	3.33	3.32	3.32	3.22
Me_4	3.52	3.50	3.49	3.48	3.48	3.47	3.47	3.47	3.46	3.46	3.46	3.46	3.46	3.41
Me_5	3.41	3.38	3.36	3.34	3.32	3.31	3.30	3.29	3.28	3.28	3.27	3.27	3.27	3.21

a. Fracción molar carbohidrato:benceno.



Gráfica 9. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto **5**.



Grafica 10. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo del compuesto 5.

Como se puede apreciar en la Gráfica 9, sólo el átomo de hidrógeno de la posición H₁ es el que se desplaza a campo alto. En la Gráfica 10 se observa que todos los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo se protegen, siendo el que menos lo hace el del Me₁. Nuevamente los cambios más importantes en las pendientes se observan cuando la relación benceno:carbohidrato es 1:3.

Todos los resultados mostrados hasta este punto dan una clara perspectiva de la región en la cual una molécula de benceno es capaz de ubicarse para interactuar con el carbohidrato, ya que es capaz de desplazar las moléculas de cloroformo que rodean al carbohidrato para ubicarse en la proximidad del anillo de pirano. Sin embargo el procedimiento de la titulación anisotrópica resulta complejo por el tiempo de equipo de RMN que requiere, por lo que se ha considerado que otra opción es determinar la diferencia de los desplazamientos químicos considerando los disolventes puros como extremos, con lo cual se pueden apreciar las mismas tendencias con la diferencia de que la titulación anisotrópica da una idea más clara del proceso de solvatación que por supuesto es valioso. A continuación se presentan las diferencias de desplazamientos químicos de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta\delta = \delta_{\text{CDCl}_3} - \delta_{\text{C}_6\text{D}_6} \quad \text{Ecuación 10}$$

Las diferencias en los desplazamientos químicos ($\Delta\delta$) se obtuvieron al adquirir los espectros de RMN de ^1H de los diferentes compuestos en el correspondiente disolvente deuterado. Como se puede apreciar en la Tabla 8, las diferencias de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) que presentan signo positivo son aquellas señales que se desplazan a campo alto, debido a que interaccionan con la cara del benceno. Es notorio que para el compuesto α -galactosa permetilada (**1**) las señales de los átomos de hidrógeno H_4 y los $\text{Me}_1 - \text{Me}_5$ son los que presentan el mayor efecto de protección. Los valores van de 0.17 a 0.27 ppm. El hidrógeno H_1 prácticamente no presenta cambio y lo mismo ocurre con los átomos de hidrógeno de las posiciones H_3 y H_5 . Este último efecto contrasta con el de la β -galactosa permetilada (**2**), donde los átomos de hidrógeno H_3 y H_5 presentan un efecto de protección o apantallamiento de 0.18 y 0.24 ppm, respectivamente. El átomo de hidrógeno H_4 presenta una protección de 0.20 ppm y nuevamente todos los grupos Me presentan un cambio en el desplazamiento químico que va de 0.02 a 0.30 ppm, lo que indica que el efecto de protección es más claro en el epímero β que en el α .

Tabla 8. Diferencias de desplazamientos químicos (en ppm) para los compuestos **1** y **2**.

	α -galactosa permetilada (1)			β -galactosa permetilada (2)		
	CDCl_3	C_6D_6	$\Delta\delta = \delta\text{CDCl}_3 - \delta\text{C}_6\text{D}_6$	CDCl_3	C_6D_6	$\Delta\delta = \delta\text{CDCl}_3 - \delta\text{C}_6\text{D}_6$
H₁	4.78	4.77	0.01	4.15	4.14	0.01
H₂	3.64	3.82	-0.18	3.31	3.68	-0.37
H₃	3.54	3.62	-0.08	3.15	2.97	0.18
H₄	3.69	3.52	0.17	3.65	3.45	0.20
H₅	3.85	3.90	-0.05	3.57	3.33	0.24
H_{6a}	3.51	3.52	-0.01	3.54	3.50	0.04
H_{6b}	3.56	3.60	-0.04	3.62	3.64	-0.02
Me₁	3.42	3.20	0.22	3.50	3.37	0.13
Me₂	3.51	3.26	0.25	3.58	3.56	0.02
Me₃	3.52	3.27	0.25	3.52	3.27	0.25
Me₄	3.57	3.47	0.10	3.56	3.46	0.10
Me₅	3.41	3.14	0.27	3.40	3.10	0.30

En el caso de los epímeros de la glucosa (Tabla 9), los efectos de protección se presentan para el átomo de hidrógeno de las posiciones H₁, H_{6a} y H_{6b}, así como para todos los grupos Me. La diferencia radica en que el epímero α presenta protección en el átomo de hidrógeno H₂ y el epímero β presenta protección en el átomo de hidrógeno H₅.

Tabla 9. Diferencias de desplazamientos químicos (en ppm) para los compuestos **3** y **4**.

	α-glucosa permetilada (3)			β-glucosa permetilada (4)		
	CDCl ₃	C ₆ D ₆	Δδ = δCDCl ₃ -δC ₆ D ₆	CDCl ₃	C ₆ D ₆	Δδ = δCDCl ₃ -δC ₆ D ₆
H₁	4.81	4.64	0.17	4.14	4.07	0.07
H₂	3.19	3.12	0.07	2.98	3.14	-0.16
H₃	3.47	3.70	-0.23	3.16	3.24	-0.08
H₄	3.15	3.26	-0.11	3.15	3.24	-0.09
H₅	3.58	3.71	-0.13	3.27	3.24	0.03
H_{6a}	3.57	3.47	0.10	3.56	3.51	0.05
H_{6b}	3.57	3.55	0.02	3.64	3.51	0.13
Me₁	3.40	3.14	0.26	3.52	3.30	0.22
Me₂	3.50	3.18	0.32	3.57	3.52	0.05
Me₃	3.60	3.54	0.06	3.62	3.57	0.05
Me₄	3.53	3.45	0.08	3.53	3.42	0.11
Me₅	3.41	3.18	0.23	3.41	3.18	0.23

La α-manosa permetilada (**5** Tabla 10), presenta el mismo efecto observado en la titulación anisotrópica en la cual, sólo los átomos de hidrógeno de las posiciones H₃, H₄ y H₅ presentan un efecto de desprotección, es decir que interactúan con la región σ del anillo de benceno, a diferencia del resto de los átomos de hidrógeno anulares así como de todos los grupos metoxilo, los cuales se desplazan a campo alto por el efecto de protección que genera la nube de densidad electrónica π del anillo de benceno, (Figuras 23-27).

Tabla 10. Diferencias de desplazamientos químicos (en ppm) para el compuesto 5.

	α -manosa permetilada (5)		
	CDCl_3	C_6D_6	$\Delta\delta = \delta_{\text{CDCl}_3} - \delta_{\text{C}_6\text{D}_6}$
H_1	4.79	4.64	0.15
H_2	3.56	3.43	0.13
H_3	3.49	3.59	-0.10
H_4	3.42	3.62	-0.20
H_5	3.55	3.70	-0.15
H_{6a}	3.59	3.58	0.01
H_{6b}	3.59	3.53	0.06
Me_1	3.37	3.13	0.24
Me_2	3.47	3.23	0.24
Me_3	3.48	3.22	0.26
Me_4	3.51	3.41	0.10
Me_5	3.40	3.21	0.19

Los resultados de los procesos de titulación anisotrópica, permiten la identificación de las regiones de protección del carbohidrato y hace posible apreciar que los cambios más significativos en los desplazamientos químicos se producen cuando la relación molar carbohidrato:benceno es 1:3. Esto permite establecer que la primera esfera de solvatación de los carbohidratos está constituida por tres moléculas de benceno. En este caso el uso de las diferencias de desplazamientos químicos permite proponer la distribución de moléculas de benceno alrededor del carbohidrato, haciendo corresponder las zonas protegidas con la cara del benceno.

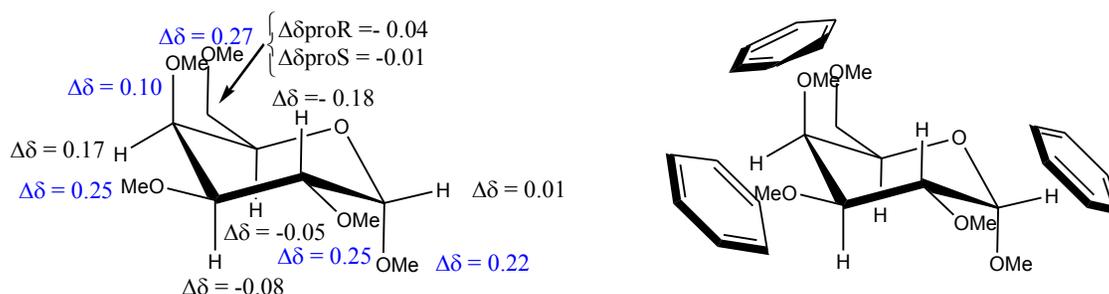


Figura 23. Aproximación a la primera esfera de solvatación de la α -galactosa permetilada (1).

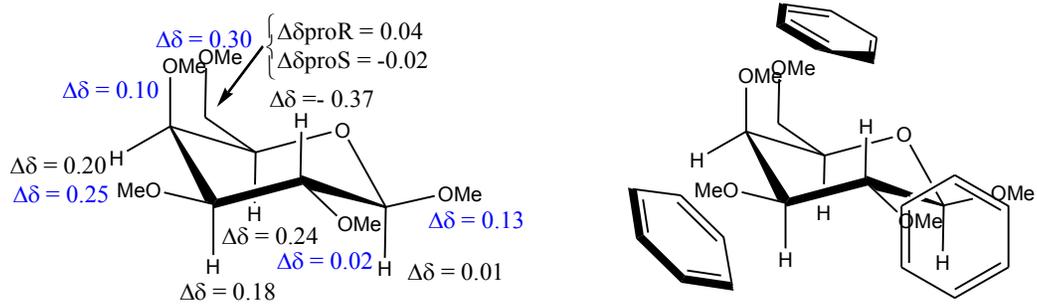


Figura 24. Aproximación a la primera esfera de solvatación de la β -galactosa permetilada (2).

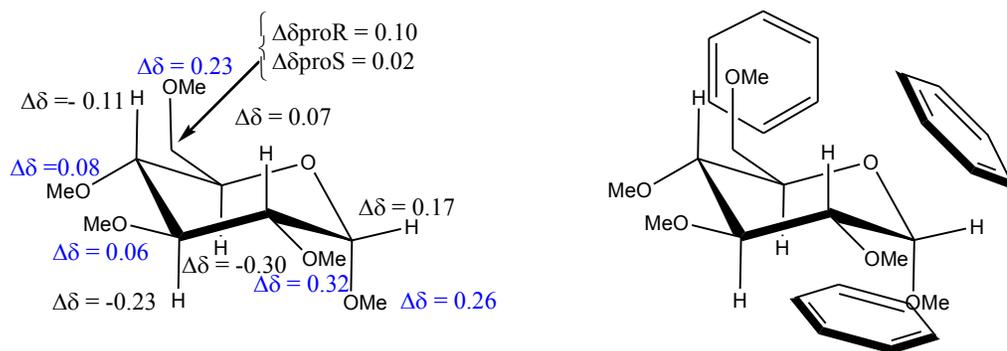


Figura 25. Aproximación a la primera esfera de solvatación de la α -glucosa permetilada (3).

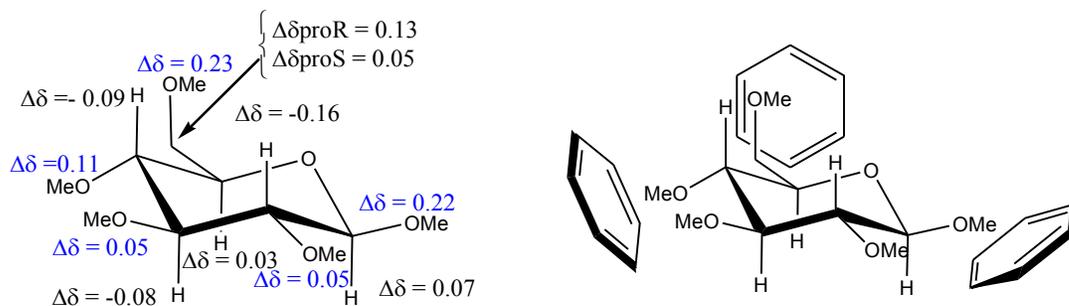


Figura 26. Aproximación a la primera esfera de solvatación de la β -glucosa permetilada (4).

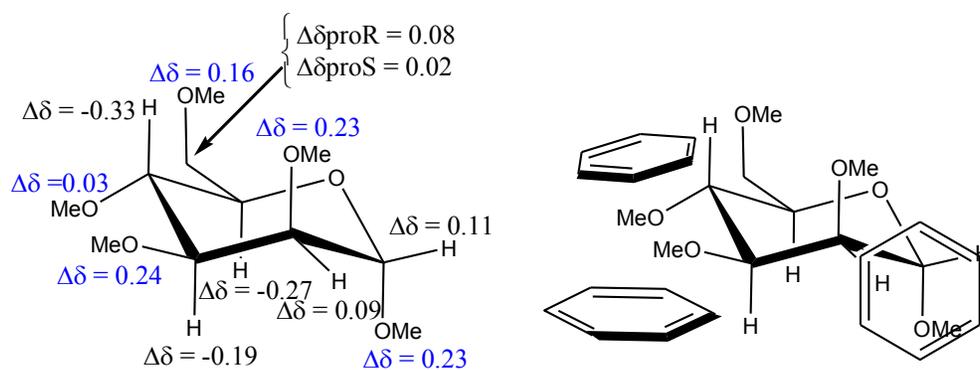


Figura 27. Aproximación a la primera esfera de solvatación de la α -manosa permetilada (5).

Así, es posible tener una aproximación cualitativa a la primera esfera de solvatación del carbohidrato.

2.5.2.1 Efecto del agua durante la solvatación del complejo carbohidrato-benceno.

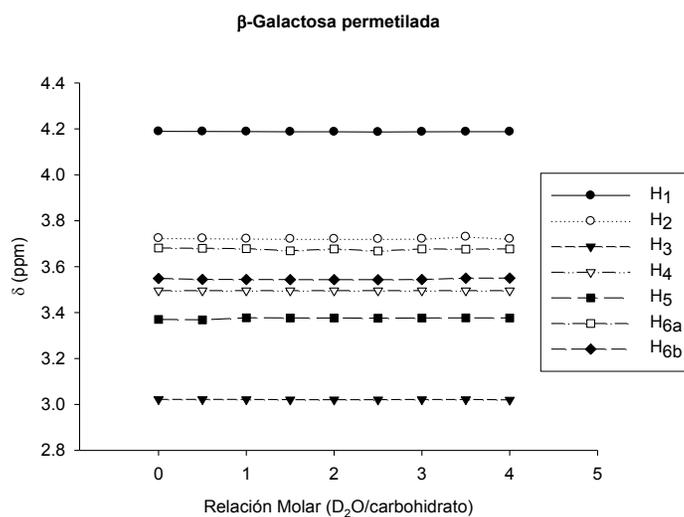
Para complementar el estudio, se decidió introducir un puente de hidrógeno en competencia con la interacción CH/ π . Se llevó a cabo el estudio de la solvatación del carbohidrato en D₂O. Estos estudios consistieron en efectuar el proceso de titulación anisotrópica y determinar las diferencias de los desplazamientos químicos observados. En el diseño de estos experimentos se tiene a favor la solubilidad de los compuestos en disolventes no polares como el benceno y en disolventes polares como el agua deuterada. Sin embargo, para este caso uno de los inconvenientes es la poca miscibilidad de benceno y el agua deuterada.

La metodología para llevar a cabo las titulaciones anisotrópicas se describe en la parte experimental. Llama la atención el hecho de que los resultados observados para todos los carbohidratos fueron similares. La adición de las moléculas de agua deuterada a los complejos carbohidrato-benceno que se han discutido hasta ahora, debe en principio disociar el benceno dado que la única posición para la incorporación de las moléculas de agua deuterada son los átomos de oxígeno de los grupos éter. Sin embargo la adición de agua deuterada no modifica el

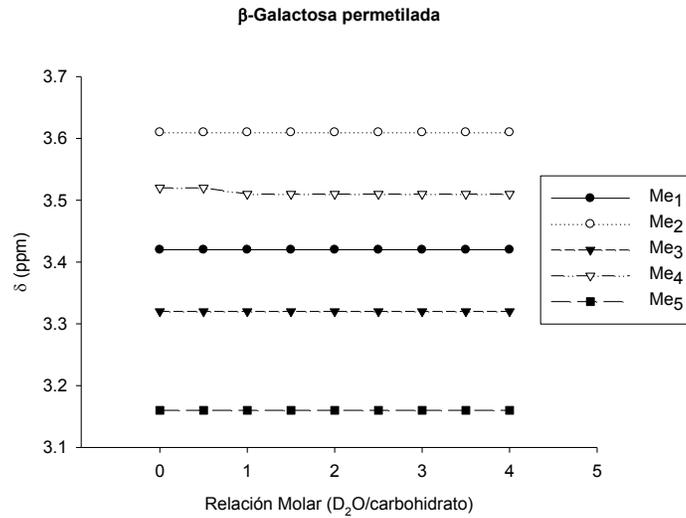
desplazamiento químico. Esto se puede deber a dos factores: o bien la interacción que introduce el agua no sustituye al benceno de la proximidad del carbohidrato o el agua se distribuye sobre el carbohidrato sin afectar la distribución del benceno.

Lamentablemente sólo es posible llegar a una relación 1:4 carbohidrato:agua deuterada dado que se producen emulsiones que impiden el ajuste del equipo de RMN.

Debido a que los resultados fueron similares para todos los carbohidratos, sólo se presentan aquí los resultados de la β -galactosa permetilada (2 Gráficas 11 y 12) y α -manosa permetilada (5 Gráficas 13 y 14), los resultados correspondientes a los demás carbohidratos se presentan en el apéndice.

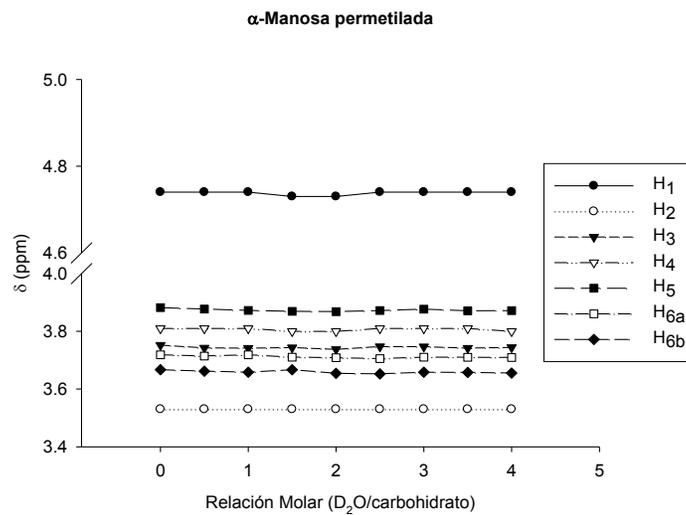


Grafica 11. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto 2.

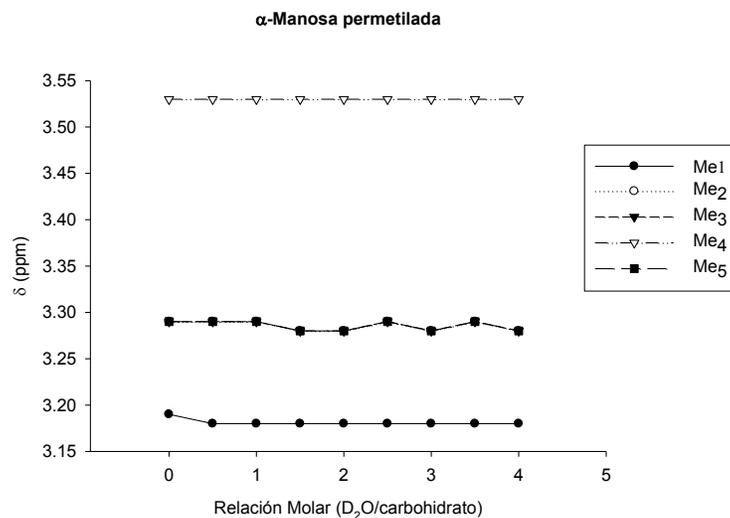


Grafica 12. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo del compuesto

2.



Grafica 13. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto 5.



Grafica 14. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo del compuesto

5.

Tabla 11. Diferencias de desplazamientos químicos (en ppm) para los compuestos 1 y 2.

	α -galactosa permetilada (1)			β -galactosa permetilada (2)		
	D ₂ O	C ₆ D ₆	$\Delta\delta = \delta_{D_2O} - \delta_{C_6D_6}$	D ₂ O	C ₆ D ₆	$\Delta\delta = \delta_{D_2O} - \delta_{C_6D_6}$
H₁	5.04	4.77	0.27	4.34	4.14	0.20
H₂	3.52	3.82	-0.30	3.36	3.68	-0.32
H₃	3.59	3.62	-0.03	3.40	2.97	0.43
H₄	3.95	3.52	0.43	3.89	3.45	0.44
H₅	3.99	3.90	0.09	3.77	3.33	0.44
H_{6a}	3.68	3.52	0.16	3.70	3.50	0.20
H_{6b}	3.68	3.60	0.08	3.70	3.64	0.06
Me₁	3.40	3.20	0.20	3.56	3.37	0.19
Me₂	3.43	3.26	0.17	3.55	3.56	-0.01
Me₃	3.50	3.27	0.23	3.51	3.27	0.24
Me₄	3.52	3.47	0.05	3.51	3.46	0.05
Me₅	3.41	3.14	0.27	3.42	3.10	0.32

Tabla 12. Diferencias de desplazamientos químicos (en ppm) para el compuesto **5**.

	α -manosa permetilada (5)		
	D_2O	C_6D_6	$\Delta\delta = \delta_{D_2O} - \delta_{C_6D_6}$
H₁	4.91	4.64	0.27
H₂	3.80	3.43	0.37
H₃	3.57	3.59	-0.02
H₄	3.35	3.62	-0.27
H₅	3.71	3.70	0.01
H_{6a}	3.67	3.58	0.09
H_{6b}	3.67	3.53	0.14
Me₁	3.33	3.13	0.20
Me₂	3.45	3.23	0.22
Me₃	3.46	3.22	0.24
Me₄	3.49	3.41	0.08
Me₅	3.41	3.21	0.20

Como puede observarse, en el caso de los procedimientos de las titulaciones anisotrópicas, los desplazamientos químicos no se ven modificados, sin embargo considerando los disolventes puros, es posible apreciar que las diferencias de los desplazamientos químicos muestran un efecto de protección similar al observado para el benceno, ya que los átomos de hidrógeno H_4 y H_5 presentan un $\Delta\delta$ positivo, en el caso del epímero β de la galactosa también se observa este mismo efecto, lo que concuerda con los resultados observados con el benceno, es decir existe mayor aproximación con el anillo de benceno del epímero β que con el epímero α . Nuevamente todos los grupos metilo presentan un valor positivo (Tabla 11). En el caso de la α -manosa permetilada (**5**) son los átomos de hidrógeno H_3 y H_4 los que se desplazan a campo bajo por lo cual el valor de $\Delta\delta$ es negativo (Tabla 12).

2.5.2.2 Efecto del hexafluorobenceno en la solvatación del complejo carbohidrato-benceno.

El proceso de solvatación del complejo carbohidrato-benceno también fue estudiado usando como disolvente hexafluorobenceno. La idea de comparar el benceno y el hexafluorobenceno, es que en ambas moléculas la densidad electrónica está invertida, es decir mientras que en el benceno (**A**) el fragmento del anillo es el rico en densidad electrónica π y puede ejercer efectos de protección diamagnética, como ya se explicó con anterioridad, la periferia, donde se ubican los átomos de hidrógeno, es deficiente en densidad electrónica. Para el hexafluorobenceno (**B**) la densidad electrónica se ubica en la periferia, es decir, ésta se concentra en los átomos de flúor y deja deficiente al esqueleto de carbonos (Figura 28).

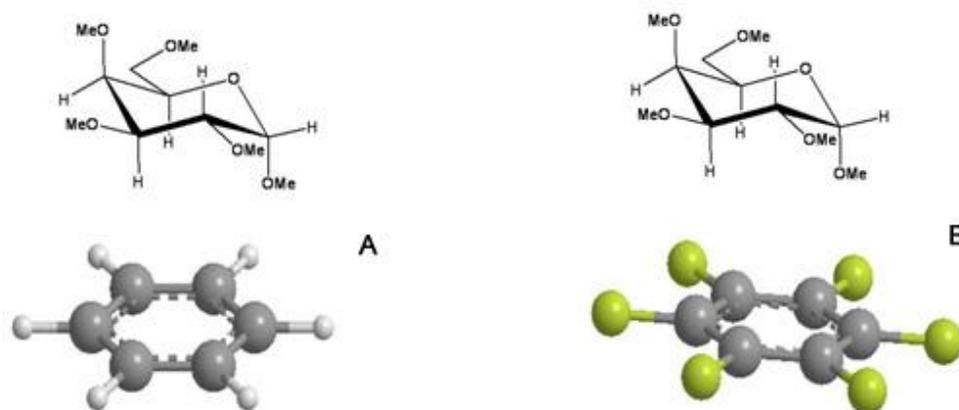


Figura 28. Interacción del benceno (**A**) y hexafluorobenceno (**B**) con la β -galactosa permetilada (**2**).

Por lo anterior, como se muestra en la Figura 28, si durante el proceso de reconocimiento, el carbohidrato se ubica por encima del anillo de hexafluorobenceno, los átomos de hidrógeno del anillo de pirano, presentarán un efecto de desprotección y se desplazarán a campo bajo, por el contrario si éstos interactúan con los átomos de flúor presentarán un efecto de protección y se desplazarán a campo alto.

Para estudiar el proceso de solvatación se llevaron a cabo titulaciones anisotrópicas, la metodología de las mismas, se encuentra descrita en la parte experimental. Al llevar a cabo el estudio de solvatación, es posible comprobar que para los carbohidratos β -galactosa permetilada

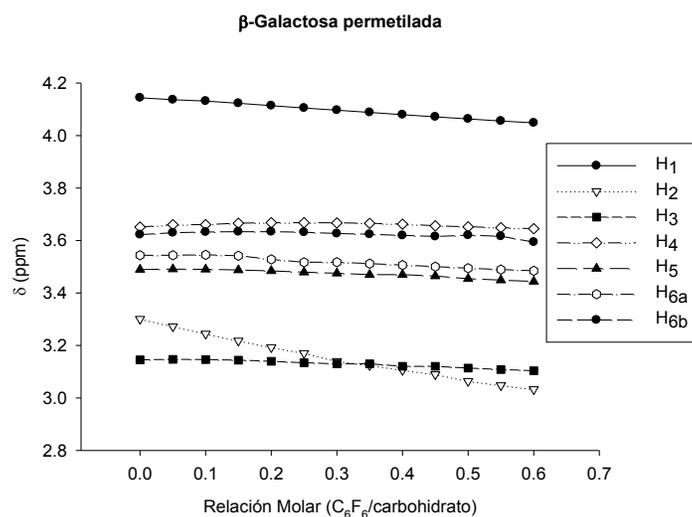
(2 Tabla 13) y α -manosa permetilada (5 Tabla 14), los resultados son similares, en todos los casos todas las señales de RMN de ^1H se desplazan a campo alto, lo que permite afirmar que los átomos de hidrógeno están interaccionando con los átomos de flúor, nuevamente se puede identificar que en todos los casos, la interacción que predomina es la CH/n .

Tabla 13. Desplazamientos químicos de las señales RMN de ^1H de la β -galactosa permetilada (2) durante la titulación anisotrópica.

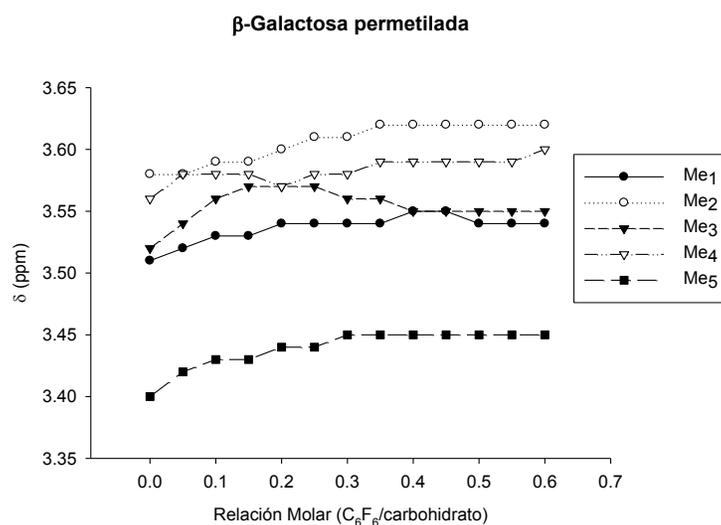
β-Galactosa Permetilada														
Ensayo	CDCl_3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C_6F_6
a	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	1.00
H₁	4.14	4.14	4.13	4.12	4.11	4.11	4.10	4.09	4.08	4.07	4.06	4.06	4.05	3.49
H₂	3.30	3.27	3.24	3.22	3.19	3.17	3.14	3.12	3.11	3.09	3.06	3.05	3.03	2.25
H₃	3.15	3.15	3.15	3.14	3.14	3.13	3.13	3.13	3.12	3.12	3.11	3.11	3.10	2.59
H₄	3.65	3.66	3.66	3.67	3.67	3.67	3.67	3.67	3.66	3.66	3.65	3.65	3.65	3.15
H₅	3.49	3.49	3.49	3.49	3.48	3.48	3.48	3.47	3.47	3.46	3.45	3.45	3.44	2.96
H_{6a}	3.54	3.54	3.55	3.54	3.53	3.52	3.52	3.51	3.51	3.50	3.49	3.49	3.48	2.98
H_{6b}	3.62	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.62	3.62	3.62	3.62	3.62	3.59	3.15
Me₁	3.51	3.52	3.53	3.53	3.54	3.54	3.54	3.54	3.55	3.55	3.54	3.54	3.54	3.21
Me₂	3.58	3.58	3.59	3.69	3.60	3.61	3.61	3.62	3.62	3.62	3.62	3.62	3.62	3.07
Me₃	3.52	3.54	3.56	3.57	3.57	3.57	3.56	3.56	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.25
Me₄	3.56	3.58	3.58	3.58	3.57	3.58	3.58	3.59	3.59	3.59	3.59	3.59	3.60	3.26
Me₅	3.40	3.42	3.43	3.43	3.44	3.44	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.11

a. Relación molar carbohidrato:hexafluorobenceno.

Como se puede apreciar, el proceso de solvatación muestra que en el caso del hexafluorobenceno, los cambios más importantes se encuentran cuando la relación carbohidrato:hexafluorobenceno es 1:3, lo cual contribuye a la estimación de la primera esfera de solvatación. En las Gráficas 15 y 16 se puede observar que las curvas que corresponden a los átomos de hidrógeno H_1 y H_2 presentan una pendiente negativa, el resto de curvas presenta una pendiente positiva lo que confirma que las señales se están desplazando a campo alto. Esta misma tendencia se puede apreciar en los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo (Grafica 16).



Gráfica 15. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto **2**



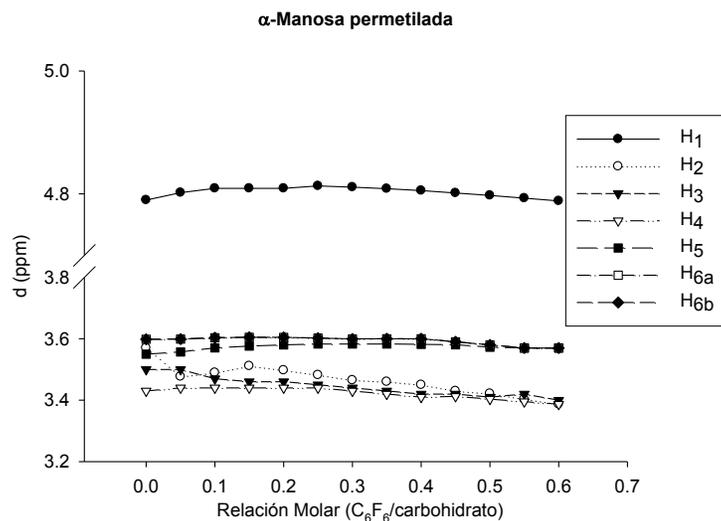
Gráfica 16. Desplazamientos químicos de los átomos de los grupos metoxilo del compuesto **2**.

Para el caso del la α -manosa permetilada (**5**) también se observa esta misma tendencia, todos los átomos de hidrógeno interaccionan con los átomos de flúor. Estos resultados se pueden observar en las Gráficas 17 y 18.

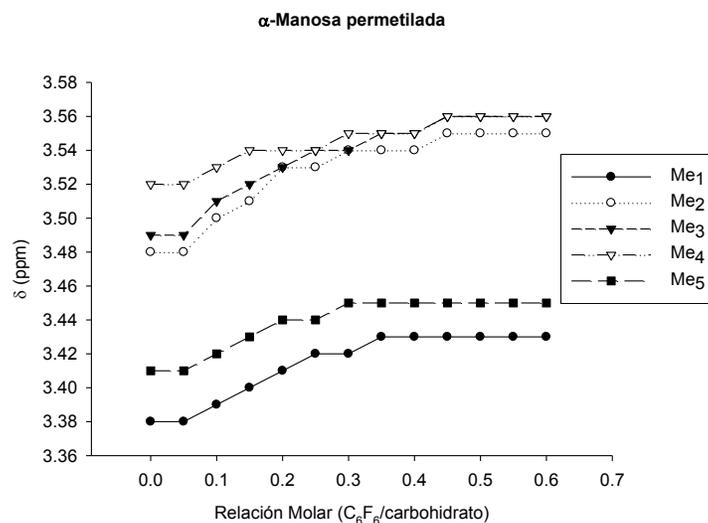
Tabla 14. Desplazamientos químicos de las señales RMN de ^1H de la α -manosa permetilada (**5**) durante la titulación anisotrópica.

α -Manosa permetilada														
Ensayo	CDCl ₃	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C ₆ F ₆
a	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	1.00
H ₁	4.79	4.80	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.80	4.80	4.79	4.79	4.12
H ₂	3.57	3.48	3.49	3.51	3.50	3.48	3.47	3.46	3.45	3.43	3.42	3.40	3.39	3.06
H ₃	3.50	3.50	3.47	3.46	3.46	3.45	3.44	3.43	3.42	3.42	3.41	3.42	3.40	2.76
H ₄	3.43	3.66	3.66	3.67	3.67	3.67	3.67	3.67	3.42	3.41	3.40	3.40	3.39	2.61
H ₅	3.55	3.56	3.57	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.57	3.57	3.57	2.65
H _{6a}	3.60	3.60	3.60	3.61	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.59	3.58	3.57	3.57	2.97
H _{6b}	3.60	3.60	3.60	3.61	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.59	3.58	3.57	3.57	2.97
Me ₁	3.38	3.38	3.39	3.40	3.41	3.42	3.42	3.43	3.43	3.43	3.43	3.43	3.43	3.06
Me ₂	3.48	3.48	3.50	3.51	3.53	3.53	3.54	3.54	3.54	3.55	3.55	3.55	3.55	3.21
Me ₃	3.49	3.49	3.51	3.52	3.53	3.54	3.54	3.55	3.55	3.56	3.56	3.56	3.56	3.18
Me ₄	3.52	3.52	3.53	3.54	3.54	3.54	3.55	3.55	3.55	3.56	3.56	3.56	3.56	3.11
Me ₅	3.41	3.41	3.42	3.43	3.44	3.44	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.08

a. Relación molar carbohidrato:hexafluorobenceno.



Grafica 17. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto 5.



Grafica 18. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo del compuesto

5.

Para confirmar que la metodología desarrollada es útil variando el tipo de disolvente, también se llevó a cabo la comparación de la diferencia de desplazamientos, es decir considerando los límites de las titulaciones anisotrópicas, nuevamente se confirmó que el uso de los desplazamientos químicos resulta igualmente efectivo y permite ahorrar tiempo del equipo de RMN, si es que el proceso de solvatación no es de interés.

Tabla 15. Diferencias de desplazamientos químicos (en ppm) para los compuestos **1** y **2**.

	α -galactosa permetilada (1)			β -galactosa permetilada (2)		
	CDCl_3	C_6F_6	$\Delta\delta = \delta\text{CDCl}_3 - \delta\text{C}_6\text{F}_6$	CDCl_3	C_6F_6	$\Delta\delta = \delta\text{CDCl}_3 - \delta\text{C}_6\text{F}_6$
H₁	4.15	3.49	0.66	4.78	4.20	0.58
H₂	3.31	2.25	1.06	3.64	2.84	0.80
H₃	3.15	2.59	0.56	3.54	2.87	0.67
H₄	3.65	3.15	0.50	3.69	3.18	0.51
H₅	3.57	2.96	0.61	3.85	3.22	0.63
H_{6a}	3.54	2.98	0.56	3.51	2.82	0.69
H_{6b}	3.62	3.15	0.47	3.56	2.92	0.64
Me₁	3.50	3.21	0.29	3.42	3.10	0.32
Me₂	3.58	3.07	0.51	3.51	3.08	0.43
Me₃	3.52	3.25	0.27	3.52	3.19	0.33
Me₄	3.56	3.26	0.30	3.57	3.20	0.37
Me₅	3.40	3.11	0.29	3.41	3.08	0.33

Tabla 16. Diferencias de desplazamientos químicos (en ppm) para el compuesto **5**.

	α -manosa permetilada (5)		
	CDCl_3	C_6F_6	$\Delta\delta = \delta\text{CDCl}_3 - \delta\text{C}_6\text{F}_6$
H₁	4.79	4.12	0.67
H₂	3.56	3.06	0.50
H₃	3.49	2.76	0.73
H₄	3.42	2.61	0.81
H₅	3.55	2.65	0.90
H_{6a}	3.59	2.97	0.62
H_{6b}	3.59	3.03	0.56
Me₁	3.37	3.06	0.31
Me₂	3.47	3.21	0.26
Me₃	3.48	3.18	0.30
Me₄	3.51	3.11	0.40
Me₅	3.40	3.08	0.32

Los resultados anteriores pueden proporcionar una aproximación a la primera esfera de solvatación la cual está constituida por tres moléculas de hexafluorobenceno por una de carbohidrato, sin embargo no existe una distribución específica ya que todos los átomos de hidrógeno interaccionan con los átomos de flúor, pues la interacción que predomina es la CH/ n , (Figura 29).

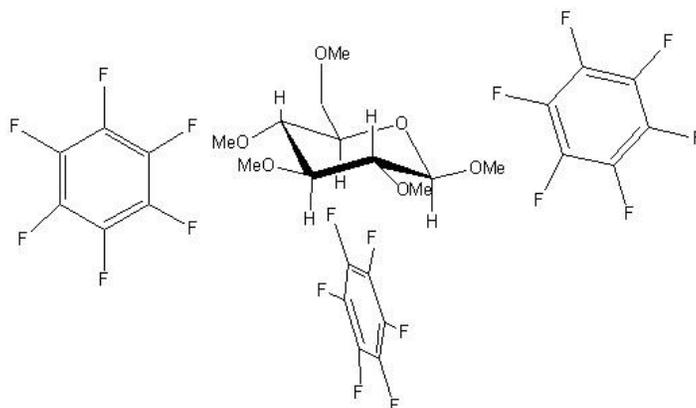


Figura 29. Aproximación de la primera esfera de solvatación de los carbohidratos en hexafluorobenceno.

2.5.2.3 Efecto del ciclohexano en la solvatación del complejo carbohidrato-benceno.

El proceso de solvatación del complejo carbohidrato-benceno también fue estudiado usando como disolvente ciclohexano deuterado, la idea de usar este disolvente, es que esta molécula al ser un alcano, tiene como característica que los doce átomos de hidrógeno de la molécula tienen la misma acidez, dicha acidez es menor que en el caso de cloroformo, lo cual permite controlar la competencia por la interacción CH/ π entre los disolventes, es decir, mientras más ácido es el átomo de hidrógeno del cloroformo, éste tiene preferencia por interaccionar con las moléculas de benceno, así al ser menos ácidos los átomos de hidrógeno en el ciclohexano, éstos favorecerían la interacción de los átomos de hidrógeno del anillo de pirano con las moléculas de benceno.

Para estudiar el proceso de solvatación se llevaron a cabo titulaciones anisotrópicas, la metodología de las mismas, se encuentra descrita en la parte experimental. Este estudio sólo se

llevó a cabo para la β -galactosa permetilada (2 Tabla 17) que experimenta interacción con el benceno, los resultados se describen a continuación para el átomo de hidrógeno de la posición anomérica H_1 , este átomo sufre un cambio en el desplazamiento químico de apenas 0.05 ppm a campo alto, lo que podría considerarse como un interacción apenas perceptible con la cara del benceno. Los átomos de hidrógeno de las posiciones H_3 y H_4 presentan un cambio a campos altos de 0.04 y 0.03 ppm respectivamente, en este caso el átomo de hidrógeno de la posición H_5 no presenta cambio en el desplazamiento químico, lo que puede indicar que la molécula de benceno está un poco alejada de éste. Por el contrario los átomos de hidrógeno H_{6a} y H_{6b} se encuentran interaccionando con la zona de desprotección del anillo de benceno (fragmento σ) por lo cual se desplazan a campo bajo. En este caso sólo los Me_1 y Me_3 interaccionan con la zona de protección del benceno, mientras que los Me_2 , Me_4 y Me_5 lo hacen con el fragmento σ .

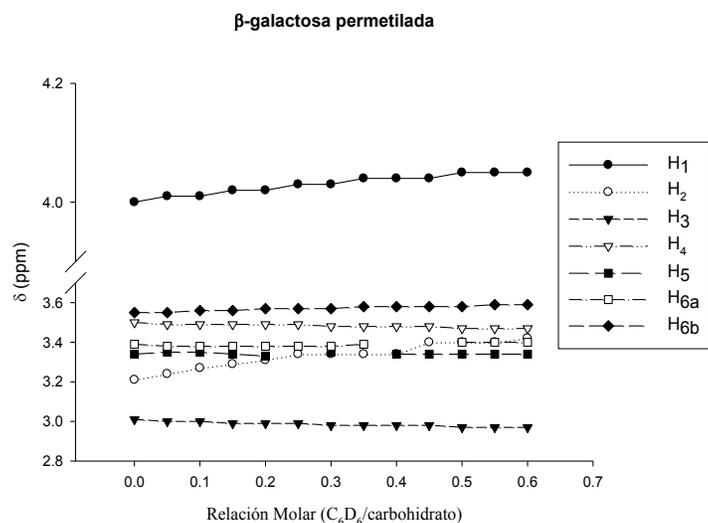
Para poder apreciar mejor los resultados, se graficaron los datos que se presentan en la Gráfica 19. En ésta se puede observar que los protones H_3 y H_4 presentan un cambio apenas perceptible con una pendiente negativa, por el contrario es muy apreciable que los átomos de hidrógeno H_1 y H_2 son los que interactúan con la zona de desprotección del anillo de benceno, por lo cual dichas curvas presentan una pendiente positiva.

Tabla 17. Desplazamientos químicos de las señales RMN de ^1H de la β -galactosa permetilada (2) durante la titulación anisotrópica.

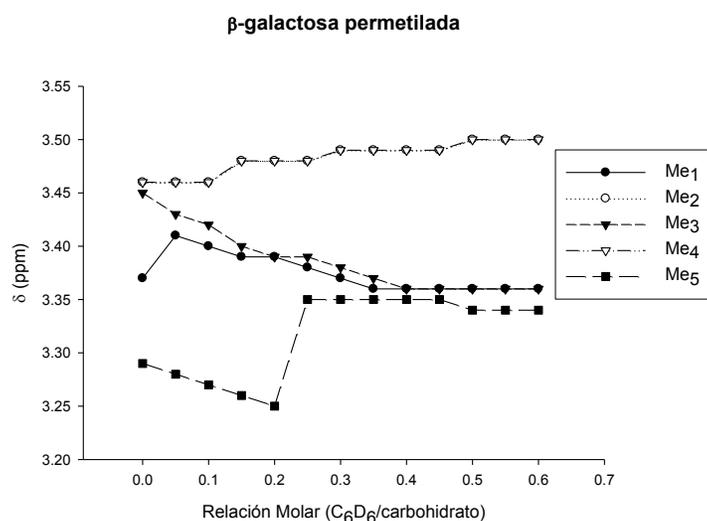
β-Galactosa Permetilada														
Ensayo	C_6D_{12}	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C_6D_6
a	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	1.00
H₁	4.00	4.01	4.01	4.02	4.02	4.03	4.03	4.04	4.04	4.04	4.05	4.05	4.05	3.97
H₂	3.21	3.24	3.27	3.29	3.31	3.34	3.34	3.34	3.34	3.40	3.40	3.40	3.42	3.22
H₃	3.01	3.00	3.00	2.99	2.99	2.99	2.98	2.98	2.98	2.98	2.97	2.97	2.97	2.97
H₄	3.50	3.49	3.49	3.49	3.49	3.49	3.48	3.48	3.48	3.48	3.47	3.47	3.47	3.48
H₅	3.34	3.35	3.35	3.34	3.33		3.35		3.34	3.34	3.34	3.34	3.34	3.34
H_{6a}	3.39	3.38	3.38	3.38	3.38	3.38	3.38	3.39			3.40	3.40	3.40	3.32
H_{6b}	3.55	3.55	3.56	3.56	3.57	3.57	3.57	3.58	3.58	3.58	3.58	3.59	3.59	3.54
Me₁	3.37	3.41	3.40	3.39	3.39	3.38	3.37	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36
Me₂	3.46	3.46	3.46	3.48	3.48	3.48	3.49	3.49	3.49	3.49	3.50	3.50	3.50	3.45
Me₃	3.45	3.43	3.42	3.4	3.39	3.39	3.38	3.37	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36	3.44
Me₄	3.46	3.46	3.46	3.48	3.48	3.48	3.49	3.49	3.49	3.49	3.50	3.50	3.50	3.45
Me₅	3.28	3.27	3.26	3.25	3.36	3.35	3.36	3.35	3.35	3.35	3.34	3.34	3.34	3.29

a. Relación molar carbohidrato:benceno.

Como se puede apreciar, el proceso de solvatación muestra que en el caso del ciclohexano, los cambios más importantes en las pendientes nuevamente se encuentran cuando la relación carbohidrato:benceno es 1:3, lo cual contribuye a la estimación de la primera esfera de solvatación. En la Gráfica 20 se puede observar que la solvatación de los grupos metoxilo es muy diferente, los grupos metoxilo Me_1 y Me_3 se desplazan a campo alto, por el contrario los metoxilos Me_2 y Me_4 cuyas señales están muy cercanas en el espectro de RMN de ^1H se desplazan a campo bajo observándose un singulete ancho que integra para seis átomos de hidrógeno. La señal del Me_5 presenta un cambio 0.06 ppm hacia campo bajo, lo que significa que interacciona con el fragmento σ del anillo bencénico.



Grafica 19. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto 2.



Grafica 20. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo del compuesto 2.

Con el objeto de corroborar la metodología, se llevó a cabo el estudio por diferencia de desplazamientos químicos ($\Delta\delta$), con lo cual se puede observar que los átomos de hidrógeno de las posiciones 3, 4 y 5 son los que prácticamente no presentan cambio en el desplazamiento químico, por el contrario en el resto de las señales a excepción del Me₃ se desplazan a campo bajo, estos datos concuerdan con los de la titulación anisotrópica y se puede proponer la premisa de que la molécula de benceno se ubica en la zona de los átomos de hidrógeno H₃, H₄ y H₅, sin embargo el anillo está más alejado que cuando se utiliza cloroformo como disolvente, por otro lado, también

puede aceptarse que el anillo de benceno prefiere interactuar con el ciclohexano que con el anillo de pirano, dada su capacidad de incorporar en forma aditiva los grupos C-H.

Tabla 18. Diferencias de desplazamientos químicos (en ppm) para el compuesto 2.

	α -galactosa permetilada (2)		
	C_6D_{12}	C_6D_6	$\Delta\delta = \delta C_6D_{12} - \delta C_6D_6$
H_1	3.97	4.14	-0.17
H_2	3.22	3.68	-0.46
H_3	2.97	2.97	0.00
H_4	3.48	3.45	0.03
H_5	3.34	3.33	0.01
H_{6a}	3.32	3.50	-0.18
H_{6b}	3.54	3.64	-0.10
Me_1	3.36	3.37	-0.01
Me_2	3.45	3.56	-0.11
Me_3	3.44	3.27	0.17
Me_4	3.45	3.46	-0.01
Me_5	3.29	3.10	0.19

2.5.3. Evaluación de la interacción CH/ π empleando efecto nuclear de Overhauser (NOE).

Como se puede observar el estudio del proceso de solvatación se puede seguir con los procedimientos de las titulaciones anisotrópicas, sin embargo otra forma de medir las interacciones intermoleculares es a través de la medición del incremento del Efecto Nuclear de Overhauser (NOE), el cual es definido como el cambio en la intensidad de la frecuencia de resonancia del espín A cuando se perturban los estados de equilibrio del espín próximo B. Este fenómeno se genera a través de la interacción dipolo-dipolo denominada relajación cruzada (*cross relaxation*) con el cual se transfiere magnetización de un espín a otro a través del espacio.

En la Figura 30 se muestran los cuatro niveles energéticos existentes cuando se considera un sistema ideal de dos espines. En **A** se observan los cuatro niveles energéticos de acuerdo a cada uno de los estados de dichos espines, las líneas discontinúas muestran las transiciones permitidas para el espín A y las líneas sólidas las transiciones permitidas para el espín B. En **B** se muestran los diferentes mecanismos de relajación permitidos para dicho sistema de espines: transiciones de cero, uno y doble cuanto denominadas W_{0AB} , W_{1A} y W_{2AB} , respectivamente.

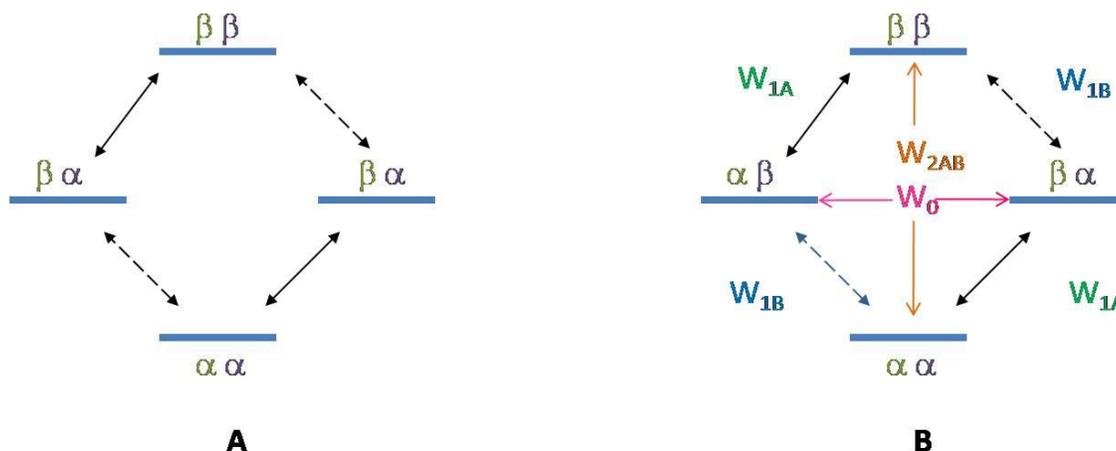


Figura 30. Niveles energéticos y mecanismos de relajación para un sistema ideal de dos espines.

El cambio en la intensidad del espín A está determinado por las transiciones de cero, uno y doble cuanto y son aplicables a un sistema ideal de dos espines. El cambio en la intensidad del espín A respecto al tiempo se define por la ecuación de Solomon:

$$\frac{dA_z}{dt} = -(A_z - A_z^0) - (W_{0AB} + 2W_{1A} + W_{2AB}) - (B_z - B_z^0)(W_{2AB} - W_{0AB})$$

Ecuación 11

donde A_z y B_z son las componentes de la magnetización longitudinal para el espín A y B, A_z^0 y B_z^0 son las componentes a tiempo cero. La ecuación de Solomon es aplicable a un sistema ideal de espines (aislados, sin acoplamiento escalar, dentro de una molécula rígida que presenta movimiento isotrópico). El efecto NOE puede ser positivo o negativo y su signo depende de la transición de relajación que predomine, dicha transición está asociada al movimiento de la molécula. Las transiciones de cero cuanto (movimientos lentos) generan NOEs negativos mientras que las de doble cuanto (movimientos rápidos) generan efectos NOE positivos.

Existen dos formas de llevar a cabo la medición del efecto NOE, la primera de ellas es a través de la saturación de una frecuencia de resonancia (steady state NOE), es decir se lleva a cabo la irradiación del espín A con una radiofrecuencia lo suficientemente débil de tal forma que el espín B no se ve afectado. La irradiación es aplicada por un tiempo tal que se llega a la saturación $A_z = 0$, lo que significa que se alcanzó el estado estacionario y con ello las magnetizaciones no cambian a lo largo del tiempo. De esta forma se adquiere un primer espectro llevando a cabo la generación del estado estacionario saturando una señal blanco (*on-resonance*, incremento) y posteriormente se adquiere un espectro de donde se satura una zona donde no hay señal (*off-resonance*, referencia), ambos espectros se restan y entonces se puede observar la diferencia en las intensidades de las señales debido a la transferencia de magnetización de un espín a otro a través del espacio, Figura 31.

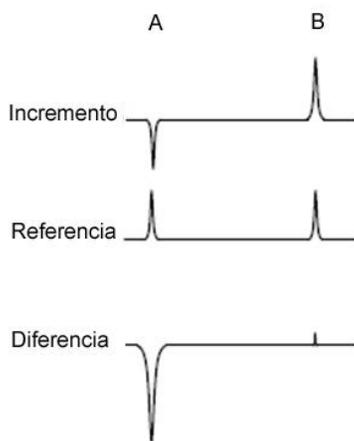


Figura 31. Procedimiento para adquirir un espectro de NOE diferencial.

Con la idea de establecer la proximidad del benceno al carbohidrato y con ello demostrar contundentemente la formación del complejo de van der Waals se decidió emplear esta técnica. Así se estudiaron la α -galactosa permetilada (**1**), β -galactosa permetilada (**2**), α -manosa permetilada (**5**) y la β -galactosa peracetilada (**6**). Este último carbohidrato se utilizó para llevar a cabo una comparación de las propiedades de los grupos metilos y acetilo como sustituyentes, ya que han sido descritos como grupos similares, lo que es extraño porque su naturaleza química es muy diferente.

Los espectros de los cuatro carbohidratos se presentan en la Figura 32, todos ellos se encuentran graficados con la misma escala en el eje de las ordenadas, lo cual confirma la mayor o menor proximidad de la molécula de benceno con el carbohidrato. A mayor proximidad mayor efecto NOE. Como puede observarse para los epímeros α y β de la galactosa permetilada, las señales que corresponden a los átomos de hidrógeno H₃, H₄ y H₅ presentan una señal positiva, es decir, para ambos casos, existe una molécula de benceno próxima a estos átomos de hidrógeno. Es destacable que la intensidad de las señales es menor para el epímero α esto puede atribuirse al hecho de que el benceno debe ubicarse más distante por el efecto repulsivo del sustituyente en la posición anomérica. También puede apreciarse en todos los casos, que las señales de los grupos metilo presentan efecto NOE, dado que como se había discutido con las titulaciones anisotrópicas es muy probable que estos grupos interactúen con una molécula de benceno durante el proceso de solvatación dada su exposición al medio.

En el caso de la β -galactosa peracetilada (**6**), son destacables dos aspectos. Las señales que corresponden a los átomos de hidrógeno del anillo de pirano presentan efecto NOE, sin embargo éstas apenas puede apreciarse por encima de la línea base y es destacable que dichas señales están muy desplazadas a campo bajo, respecto a la de los derivados permetilados. Este fenómeno es común en los carbohidratos peracetilados. Por otro lado, las señales que corresponden a los metilos del grupo acetilo están muy desplazados a campo alto respecto a un grupo acetilo libre, fenómeno contrastante respecto a los derivados permetilados.

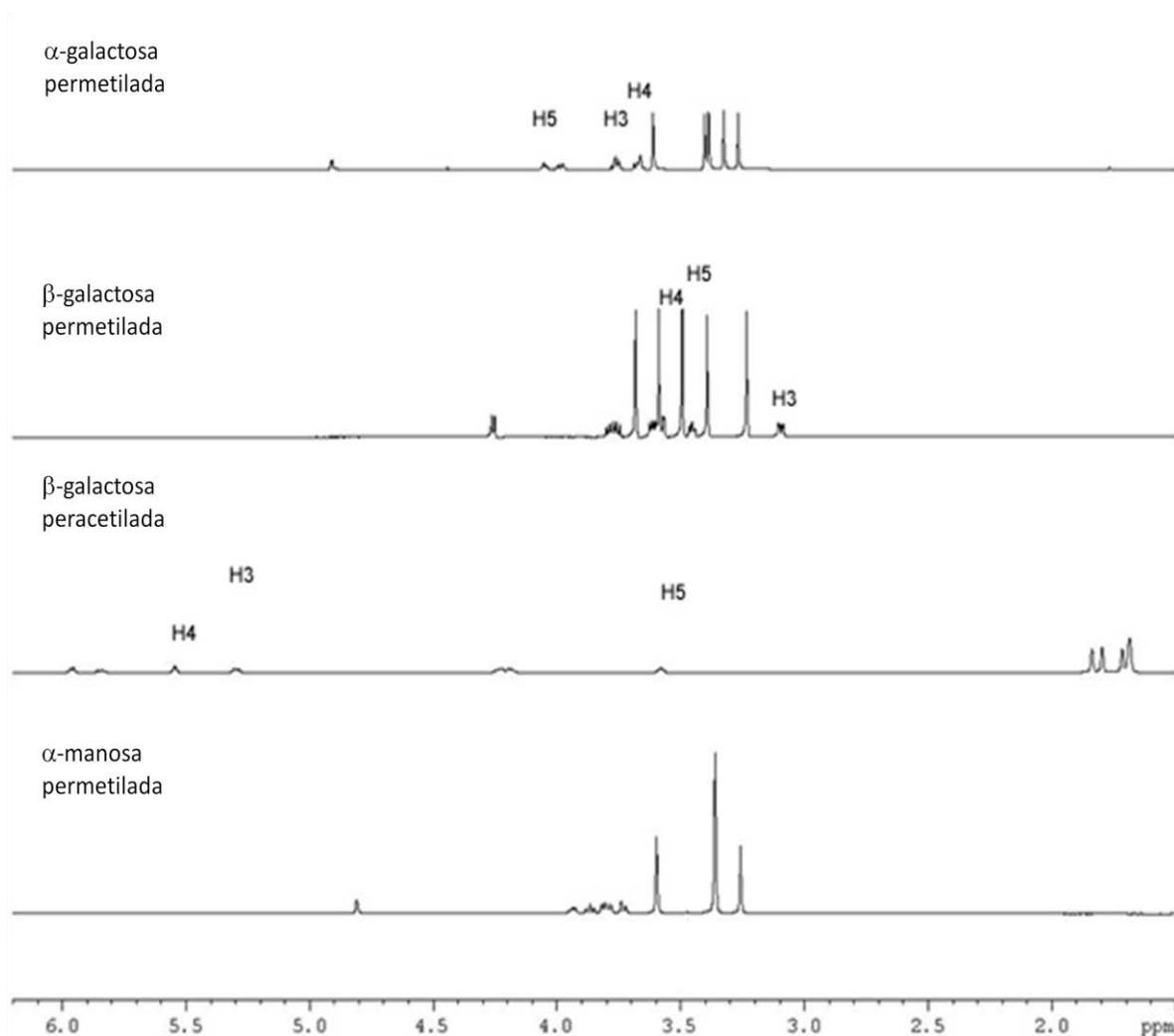


Figura 32. Espectros Steady-NOE de los carbohidratos permetilados **1**, **2** y **5** y acetilado **6**.

En el caso de la α -manosa permetilada (**5**), se observó un fenómeno que contrasta con el de los otros carbohidratos. Como puede observarse en la Figura 32, las señales que corresponden a los átomos de hidrógeno anulares presentan una señal positiva apenas por encima de la línea base. Este fenómeno está asociado a la concentración de la muestra, lo que contrasta con el resto de los carbohidratos. En la Figura 33 se muestran los espectros Steady-NOE para diferentes concentraciones de la manosa. Es importante señalar que nuevamente todos los espectros están graficados con la misma escala en el eje de las ordenadas para poder comparar la interacción con las moléculas de benceno. La concentración bajo la cual se llevaron a cabo las adquisiciones de los espectros de la Figura 32 es 0.12 M.

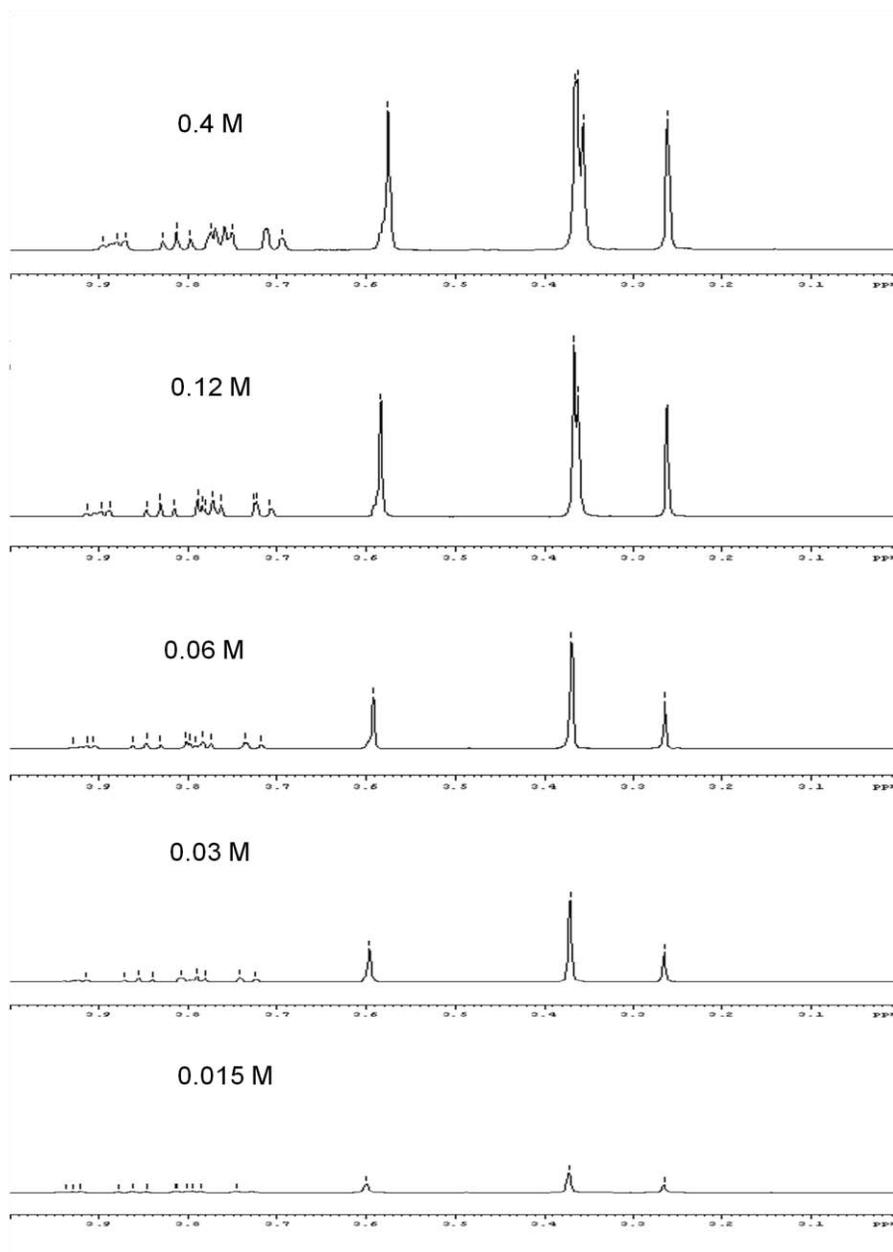


Figura 33. Espectros Steady-NOE de la α -manosa permetilada (**5**) a diferentes concentraciones.

Como puede apreciarse en la Figura 33 conforme disminuye la concentración de la muestra, el incremento del NOE se reduce aunque no de forma proporcional. De la misma forma es destacable que a la concentración 0.4 M, se puede identificar las señales de los cinco grupos metilo. Cuando se adquirió el espectro en concentración 0.24 M, ya sólo se identifican cuatro señales, hasta que en concentración 0.06 M, las señales de los grupos Me₁, Me₃ y Me₅ aparecen como un singulete ancho, que integra para nueve átomos de hidrógeno.

El efecto de la concentración, es un fenómeno que aún se encuentra en estudio, por lo cual todavía no se pueden dar conclusiones al respecto. La Figura 33 muestra las gráficas de la región de señales que comprende a los átomos de hidrógeno del anillo de pirano y los grupos metilo. El átomo de hidrógeno anomérico H₁, se excluyó con el objeto de hacer más apreciable el fenómeno descrito con anterioridad.

La β-galactosa permetilada (**2**) es un compuesto sólido y la estructura obtenida por difracción de rayos X se presenta en la Figura 34. En esta se puede observar que todos los grupos metilo se encuentran en una conformación extendida tal, que existe una cavidad en la cara α del carbohidrato, que hace posible disponer del espacio adecuado para que una molécula de benceno se aproxime e interaccione con los átomos de hidrógeno H₃, H₄ y H₅.

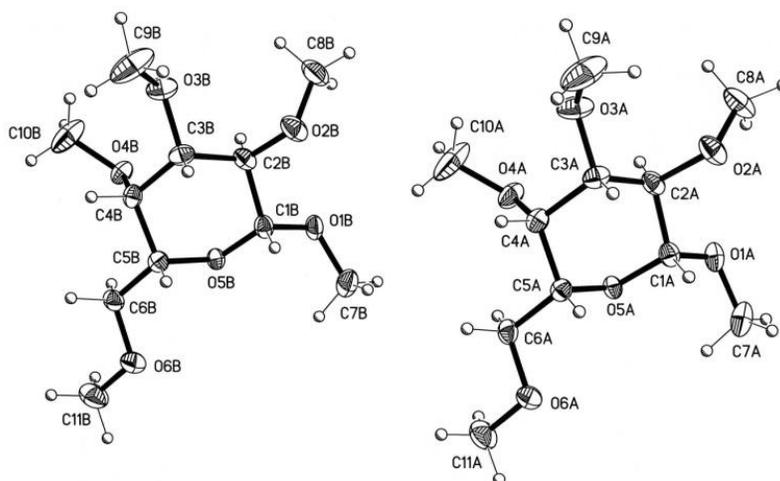


Figura 34. Conformación en el estado sólido de β-galactosa permetilada (**2**).

Para corroborar que los sustituyentes acetilo y metilo presentaban una conformación similar se recurrió a la sobreposición de las estructuras del derivado permetilado (**2**) con aquellas estructuras obtenidas por estudios de difracción de rayos X de los epímeros α-galactosa peracetilada (**7**)⁷¹ y β-galactosa peracetilada (**6**)⁷² las cuales se encuentran descritas en la literatura. Con dicha sobreposición se pudieron obtener algunas conclusiones.

En la Figura 35, puede apreciarse en el modelo de “pelotas y palos” a la β-galactosa permetilada, y en el modelo de “alambres” a la galactosa peracetilada en la parte superior al epímero α y en la inferior al epímero β. Como se puede ver, los grupos metilo del derivado permetilado presentan como ya se mencionó una conformación extendida, aspecto que se contrapone a los derivados

acetilados, donde los grupos acetilo presentan una conformación tal que no existe una cavidad que permita que la molécula de benceno pueda aproximarse, ya que los grupos carbonilo generan un ambiente repulsivo para permitir dicha aproximación. De la misma forma, puede observarse que todos los grupos carbonilo se encuentran eclipsando a los átomos de hidrógeno del anillo de pirano, de tal forma que estos átomos de hidrógeno se encuentran en la zona de desprotección o paramagnética del carbonilo. Esto explica el porqué dichos átomos de hidrógeno son identificados en el espectro de ^1H de RMN a campo más bajo respecto a los compuestos permetilados. También puede hacerse la consideración de que durante el proceso de solvatación, los grupos metilo del grupo acetilo, (cuyos átomos de hidrógeno son donados de mejor manera, dada su acidez) interaccionan fuertemente con las moléculas de benceno, lo que ocasiona que dichas señales se encuentren desplazadas a campo alto.

Otro aspecto que se debe resaltar es que la presencia del sustituyente en la posición anomérica puede afectar de cierta forma la aproximación de la molécula de benceno a los átomos de hidrógeno H_3 , H_4 y H_5 , manteniéndola un poco más alejada para el caso del epímero α respecto al β , donde el sustituyente en posición ecuatorial deja un átomo de hidrógeno (H_1) que facilitaría dicha aproximación, lo que concuerda con los resultados del cambio del desplazamiento químico.

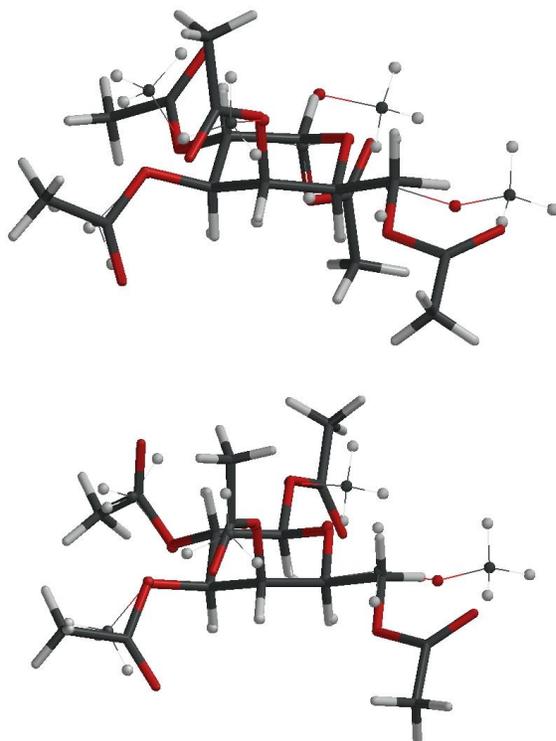


Figura 35. Superposición de β -galactosa permetilada (2) con α -galactosa peracetilada (7) y β -galactosa peracetilada (6).

Es claro que en un sistema la relajación dipolar no es el único mecanismo de relajación y es sabido que el efecto NOE es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia existente entre los núcleos involucrados.

$$\eta = \frac{\tau_c}{r^6} \quad \text{Ecuación 12}$$

Dada esta dependencia del NOE con la distancia, existe un límite finito en el cual dos núcleos pueden interactuar a través del espacio por transferencia de magnetización. En el caso de las macromoléculas la distancia es de hasta 6 Å, pero para moléculas medianas (como péptidos) la distancia es de hasta 4 Å.

De acuerdo a la ecuación de Solomon (Ecuación 11) la diferencia entre las probabilidades ($W_{2AB} - W_{0AB}$) se denomina constante de relajación cruzada (σ_{AB}) y representa la velocidad de las transiciones dipolo-dipolo que tienen como consecuencia el dar origen al NOE. También

permite la determinación de cuán rápido crece el NOE entre los espines A y B. El otro término ($W_{0AB} + 2W_{1A} + W_{2AB}$) se llama constante de relajación dipolar longitudinal (ρ_{AB}) y define la parte que corresponde al mecanismo de relajación que se encarga de restablecer el equilibrio A. Cuando se incorporan dichas definiciones y si se considera la saturación del spin B, en el estado estacionario se debe cumplir la condición $dA_Z/dt = B_Z = 0$, con lo que:

$$\frac{\sigma_{AB}}{\rho_{AB}} = \frac{A_Z - A_Z^0}{B_Z^0} \quad \text{Ecuación 13}$$

Al inicio de los experimentos las componentes longitudinales de los spines A y B son idénticas, ($A_Z^0 = B_Z^0$), B_Z^0 puede sustituirse y de esta forma calcular el NOE máximo para el espín A en el estado estacionario tras la saturación del espín B:

$$\eta = \frac{A_Z - A_Z^0}{A_Z^0} = \frac{\sigma_{AB}}{\rho_{AB}} = \frac{\gamma_B}{\gamma_A} \quad \text{Ecuación 14}$$

Para determinar si una molécula está cerca de otra, es importante determinar la constante de relajación cruzada, la cual se obtiene cuando se construyen las curvas del crecimiento del NOE a diferentes tiempos de mezcla (τ_m). En dichas curvas, las pendientes son directamente proporcionales a σ_{AB} ; ejemplos de estas curvas se muestran en la Figura 36, en donde se describe el comportamiento de diferentes átomos de hidrógeno de la glucosa, ribosa, idosa y streptosa, dichos residuos forman parte de un tetrasacárido.⁷³

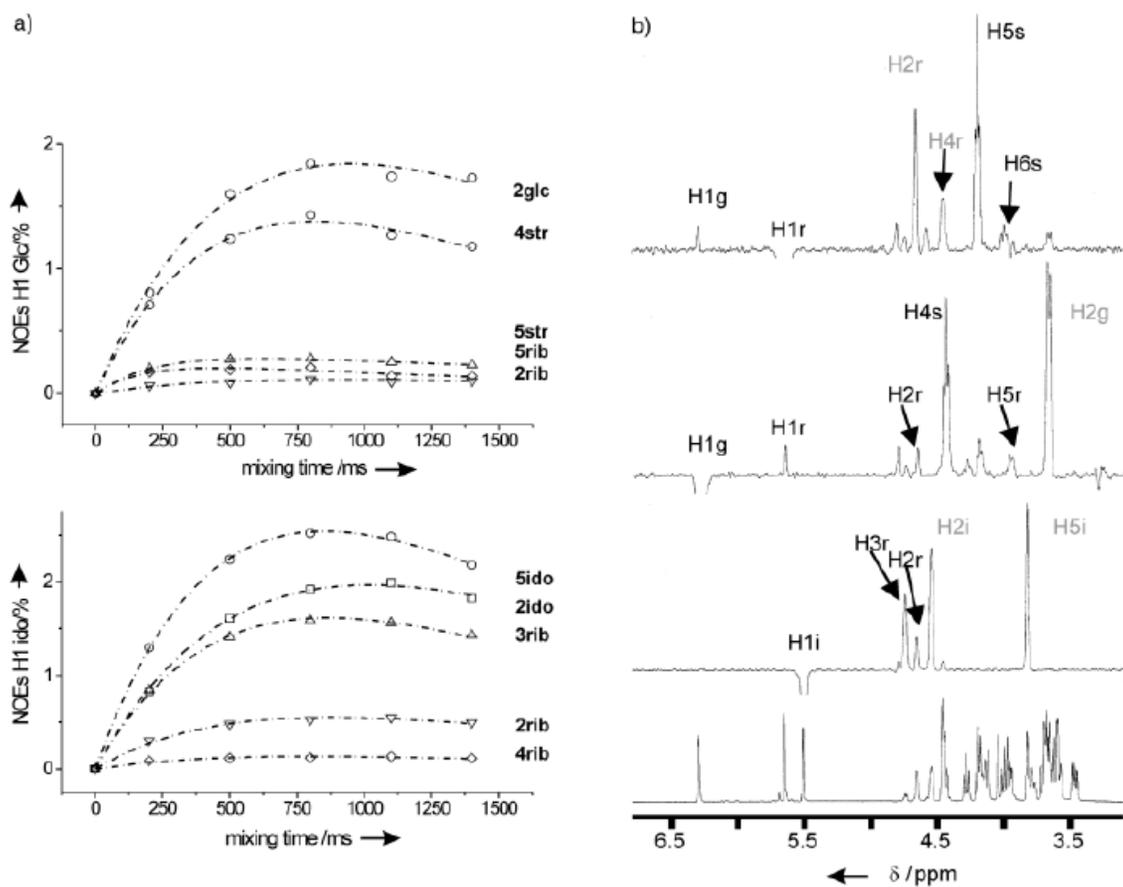
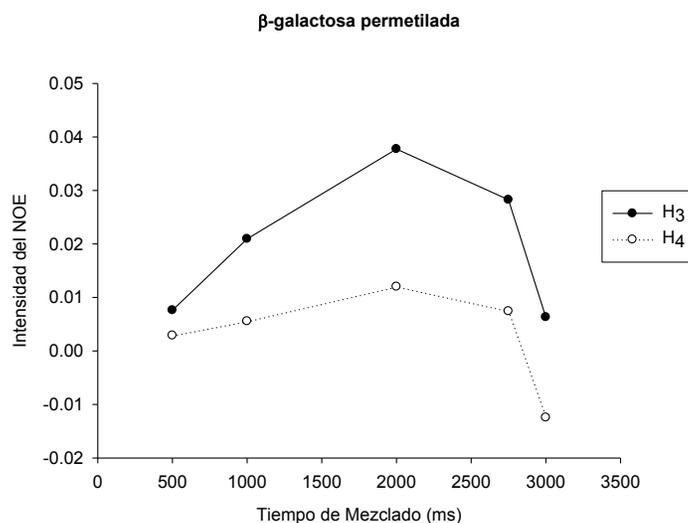


Figura 36. Curvas del crecimiento del NOE variando el tiempo de mezcla, por inversión de un átomo de hidrógeno del tetrasacárido.⁷³

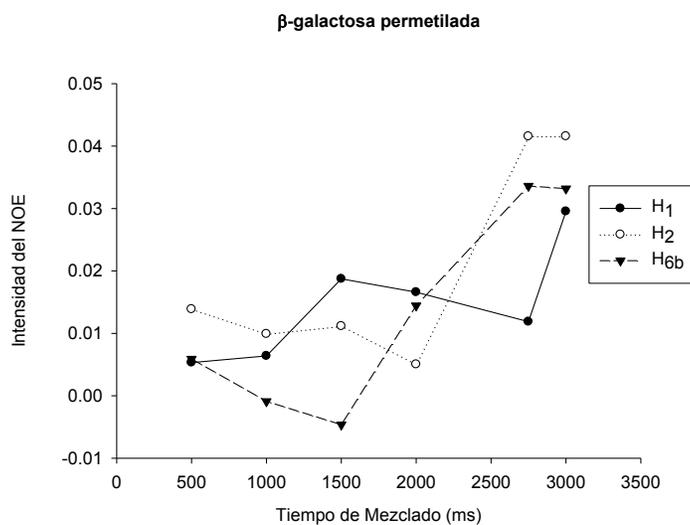
Con esta metodología se llevó a cabo la construcción de las curvas del efecto NOE para la β -galactosa permetilada (**2**) y se adquirió el espectro TR-NOE (NOE transitorio) en una dimensión en el cual el espín escogido (señal del benceno) se invirtió mediante un pulso selectivo de radiofrecuencia y se siguió el crecimiento del NOE a diferentes tiempos de mezcla.

La Gráfica 21 muestra el crecimiento del NOE para los átomos de hidrógeno H₃ y H₅ de la galactosa. Como se puede apreciar son las curvas características que presentan una pendiente positiva a tiempo de mezcla cortos y negativa a tiempos de mezcla largos. Estas curvas son típicas para sistemas que presentan interacción, es decir, con esto se puede afirmar que el benceno se encuentra próximo a estos átomos de hidrógeno. De la misma forma se pueden apreciar en la Gráfica 22 las curvas para los átomos de hidrógeno H₁, H₂ y H_{6b}. En los tres casos se espera que dichos átomos de hidrógeno se encuentren distantes respecto al benceno y como se

puede identificar, las curvas son aleatorias a lo largo de todas las determinaciones, es decir, dichos átomos de hidrógeno no interactúan con el benceno.



Grafica 21. Curvas de crecimiento del NOE para los átomos de hidrógeno con interacción CH/ π de la β -galactosa permetilada (2).



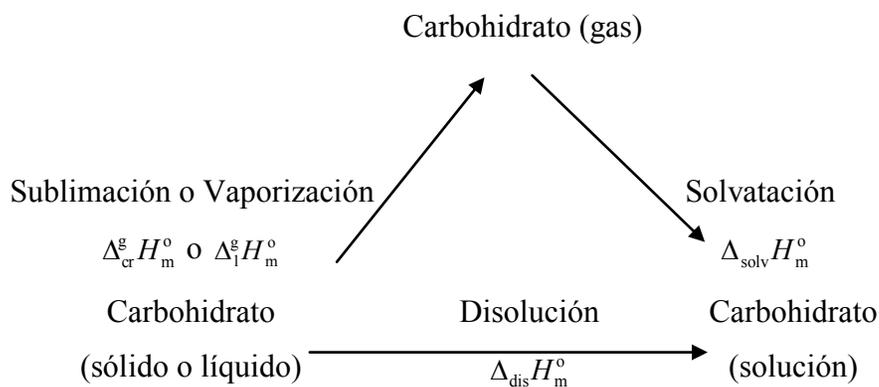
Grafica 22. Curvas de crecimiento del NOE para los átomos de hidrógeno sin interacción CH/ π de la β -galactosa permetilada (2).

2.6 Determinación de la energía de interacción.

Como se indicó en la introducción de esta tesis, se puede considerar la existencia de reconocimiento molecular cuando existe una región específica de una molécula que origina la complementariedad acompañada de una interacción estabilizante.

Con los resultados mostrados hasta el momento se pudo determinar la región molecular en la cual se presenta la interacción CH/ π . Sin embargo el análisis riguroso de la interacción debe considerar la energía de solvatación. El término de solvatación involucra los cambios energéticos y estructurales que ocurren en el sistema al transferir moléculas de soluto en el disolvente. Estos cambios incluyen la ruptura de las interacciones intramoleculares del disolvente y del soluto, así como la formación de nuevas interacciones intermoleculares que se originan entre el soluto y el disolvente.⁷⁴ En este caso, las diferencias en la entalpía de solvatación, reflejan la magnitud de la interacción de cada uno de los isómeros de los carbohidratos con las moléculas de disolvente. El Esquema 5 muestra los términos necesarios a considerar para determinar esta propiedad termodinámica. La entalpía asociada al cambio de fase así como la entalpía de disolución pueden determinarse directamente en el calorímetro.⁴¹ La entalpía de disolución ($\Delta_{\text{dis}}H_{\text{m}}^{\circ}$) en benceno fue determinada para los siguientes carbohidratos: α -galactosa permetilada (**1**), β -galactosa permetilada (**2**), β -galactosa peracetilada (**6**) y α -manosa permetilada (**5**).

Los valores de $\Delta_{\text{dis}}H_{\text{m}}^{\circ}$ pueden ser utilizados si se tienen las siguientes consideraciones: es necesario determinar el calor liberado como consecuencia del rompimiento de las interacciones intramoleculares así como el calor liberado cuando cada una de las moléculas es rodeado por una esfera de moléculas de disolvente.⁷⁵ De esta forma, se puede asumir que para los compuestos sólidos **2** y **6** se obtuvo un valor positivo de entalpía de disolución, lo que indica que estos compuestos son más estables en estado sólido que en la solución. Estos valores son fáciles de explicar ya que la ruptura de la red cristalina requiere energía. Por el contrario para los compuestos líquidos **1** y **5** se obtiene un valor negativo (exotérmico) de la entalpía de disolución. Todos estos resultados se encuentran descritos en la Tabla 19.



Esquema 5. Determinación termodinámica del calor de solvatación.

El derivado de la manosa (**5**) se usó como referencia, ya que de acuerdo con resultados previos, el anillo de piranosa no tiene el patrón de sustitución requerido (al menos tres enlaces C-H expuestos en la misma región molecular)⁶⁶ para presentar la interacción CH/ π ,⁴¹ por lo cual se puede considerar que el compuesto **5** no puede interactuar con el benceno a través de un complejo de van der Waals, pero sí es solvatado por él. Por otro lado el compuesto **6** (β -galactosa peracetilada) fue usado para evaluar el efecto del grupo acetilo en la interacción. En este compuesto la acidez de los átomos de hidrógeno del grupo *O*-acetilo es mayor que en el grupo *O*-metilo (como en los compuestos **1**, **2** y **5**).

La entalpía asociada al cambio de fase refleja la energía cohesiva de la red cristalina en el caso de los compuestos sólidos. Por otro lado, las fuerzas dipolares intermoleculares deben ser predominantes en el compuesto **6** debido a la presencia del grupo *O*-acetilo. Los resultados obtenidos confirman lo anterior, ya que el calor de sublimación de este compuesto tiene el valor más grande respecto a los cuatro compuestos estudiados. Para los compuestos **1**, **2** y **5**, las fuerzas intermoleculares entre los grupos *O*-metilo deben ser originadas por las fuerzas de dispersión, lo cual tiene consecuencias en el valor del calor de sublimación de β -galactosa permetilada (**2**) respecto al del compuesto β -galactosa peracetilada (**6**) y ocasionando que los compuestos **1** y **5** sean líquidos.

Se debe hacer énfasis que para los compuestos sólidos **2** y **5** se reporta el calor de sublimación $\Delta_{cr}^g H_m^o$, mientras que para los compuestos líquidos **1** y **5** se reporta el calor de vaporización $\Delta_l^g H_m^o$.

Tabla 19. Entalpía de solvatación (en kJ mol^{-1}) de: α -galactosa permetilada (**1**), β -galactosa permetilada (**2**), β -galactosa peracetilada (**6**), α -manosa permetilada (**5**) en benceno (1:10, mol:mol. La entalpía de disolución fue determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K, y las entalpías de cambio de fase determinadas por calorimetría de barrido.

	$\Delta_{dis} H_m^\circ$	$\Delta_{cr} H_m^\circ$ or $\Delta_1 H_m^\circ$ ^a	$\Delta_{solv} H_m^\circ$	σ_{tot} , (\pm) ^b
1	-0.67	88.37	-89.04	2.00
2	16.54	105.25	-88.71	5.54
5	-3.65	75.18	-78.83	3.91
6	12.10	144.64	-132.54	6.19

^a Para los compuestos sólidos **2** y **6** se reporta el calor de sublimación $\Delta_{cr} H_m^\circ$ y para los compuestos líquidos **1** y **5** se reporta el calor de vaporización $\Delta_1 H_m^\circ$. ^b σ_{tot} es la incertidumbre final de la entalpía de solvatación, calculada a partir de las incertidumbres en las entalpías de disolución y de cambio de fase.

La energía de solvatación $\Delta_{solv} H_m^\circ$ del derivado de la manosa **5**, ($-78.8 \pm 3.9 \text{ kJ mol}^{-1}$) demuestra que este compuesto es el menos estable en solución. Como se esperaba, debido a la estereoquímica del anillo de piranosa, los valores de $\Delta_{solv} H_m^\circ$ son más grandes para los compuestos **1** ($-89.0 \pm 2.0 \text{ kJ mol}^{-1}$) y **2** ($-88.7 \pm 5.5 \text{ kJ mol}^{-1}$). En principio, es posible inferir que la diferencia energética entre los derivados **1** y **2** de la galactosa y su análogo de la manosa **5** se debe a la energía de interacción CH/ π pues se puede considerar que la solvatación de los tres compuestos es similar respecto a los sustituyentes, la cual puede ser estimada a través de la siguiente ecuación:⁴¹

$$\text{Energía CH}/\pi = \Delta_{solv} H_m^\circ (1 \text{ ó } 2) - \Delta_{solv} H_m^\circ (5) \quad \text{Ecuación 15}$$

En la Ecuación 15 se muestra la definición formal de la energía de interacción CH/ π .

En este momento, es posible asumir que el término $\Delta_{\text{solv}}H_m^\circ$ del compuesto **5** sólo incluye las interacciones de los grupos *O*-metilo y el disolvente, mientras que este mismo término para los compuestos **1** y **2** también incluye la interacción CH/ π . De acuerdo a esta aproximación, la interacción CH/ π de los epímeros de la galactosa con benceno corresponde a 10.2 y 9.9 kJ mol⁻¹ para los compuestos **1** y **2** respectivamente. Estos valores están de acuerdo con los valores teóricos calculados a nivel MP2/6-31G(d,p) cuando se incluye la corrección por superposición de bases (BSSE) durante el proceso de optimización que es de 12.5 kJ mol⁻¹ para el complejo **1**⁶⁶ y 11.3 kJ mol⁻¹ para el complejo **2**. (Figura 37).

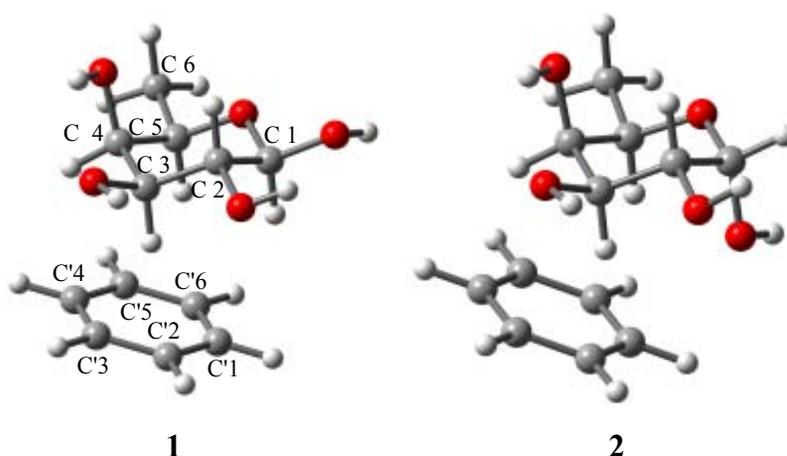


Figura 37. Estructura del complejo benceno/ β -fucosa (**1**)⁶⁶ y benceno/ α -fucosa (**2**) al nivel de teoría MP2/6-31G(d,p) incorporando la corrección BSSE durante la optimización de la geometría.

Las interacciones carbohidrato/residuo aromático han sido estudiadas empleando métodos computacionales. Los resultados obtenidos oscilan entre 10.5 y 20.9 kJ mol⁻¹ cuando se utiliza el método MP2, ya que los diferentes métodos teóricos incluyen diferentes niveles de aproximación⁷⁶⁻⁷⁸ propiciados por las diferentes consideraciones que se asumen al elegir el nivel de teoría. Es por ello que la obtención experimental de 10.0 kJ mol⁻¹ brinda un parámetro experimental para la evaluación del método teórico utilizado.

Para el compuesto peracetilado **6**, la entalpía de sublimación es de $144.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ lo cual concuerda con la presión de vapor medida experimentalmente. De forma interesante, la interacción de esta molécula con benceno corresponde a una energía de interacción de $-132.5 \text{ kJ mol}^{-1}$, lo cual la convierte en la molécula más estabilizada del presente estudio. Si la energía de estabilización no correspondiera a la generada por una interacción CH/ π con los átomos de hidrógeno del anillo de piranosa, entonces dicha estabilización corresponde a la interacción de los grupos acetilo con las moléculas de benceno; esto es razonable ya que, si al valor de la entalpía de solvatación del compuesto **6** se le resta el valor de solvatación del compuesto **5** existe una diferencia de $-53.7 \text{ kJ mol}^{-1}$, lo que permite asumir que en promedio cada grupo acetilo contribuye con $-10.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ a la interacción total, que es un valor adecuado para una interacción CH/ π . Esto confirma una vez más que son los grupos metilo del grupo acetilo los que interaccionan con las moléculas de benceno y se corrobora con los desplazamientos químicos observados a campo alto.

2.7 CONCLUSIONES

La interacción entre α -galactosa permetilada (**1**), β -galactosa permetilada (**2**), β -galactosa peracetilada (**6**) y α -manosa permetilada (**5**) con benceno determinada por microcalorimetría fue de $-89.04 \pm 2.00 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-88.71 \text{ 04} \pm 5.54 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-132.54 \pm 6.19 \text{ kJ mol}^{-1}$, y $-78.83 \text{ 04} \pm 3.91 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectivamente. Dichos valores confirman que la naturaleza de esta interacción estabilizante es entálpica.

Desde el punto de vista estructural, se identificaron las regiones interactuantes empleando experimentos de RMN. Mientras que para la β -galactosa permetilada (**2**), la interacción se genera en la cara (R-) α - del carbohidrato donde se presentan interacciones CH/ π con el benceno, para la α -manosa permetilada (**5**) no se observaron interacciones de este tipo. Para el compuesto β -galactosa peracetilada (**6**), los desplazamientos químicos y los datos de NOE demuestran que los grupos metilo de los grupos *O*-acetilo son los que interactúan de forma eficaz con el anillo de benceno. Los carbonilos generan un ambiente repulsivo alrededor del anillo de piranosa, lo cual

impide la formación eficiente de interacciones CH/ π con la cara R del azúcar. Las determinaciones calorimétricas indican que cada uno de los grupos metilo contribuyen a la estabilidad del sistema con aproximadamente $-10.7 \text{ kJ mol}^{-1}$, sin embargo los grupos metilo de los grupos *O*-acetilo tienen diferente comportamiento químico respecto a los sustituyentes *O*-metilo cuando interactúan con el benceno, hecho que posiblemente tiene su origen en la polarización de los átomos de hidrógeno del grupo acetilo, lo que contribuye a su bien conocida acidez. El benceno puede reconocer y por tanto diferenciar a los anómeros α y β de la galactosa permetilada (**1** y **2**), a la manosa permetilada (**5**) y a la galactosa peracetilada (**6**).⁷⁹

A diferencia de lo descrito en la literatura, el estudio directo de los carbohidratos sustituidos con grupos metilo o acetilo permiten establecer que estos grupos son muy diferentes cuando sustituyen a la galactosa; mientras que el metoxilo no interactúa de forma importante con el benceno, el acetilo sí lo hace de forma intensa y bloquea el acceso a la cara α del carbohidrato, por lo tanto el efecto reportado puede ser una consecuencia de las interacciones entre el grupo metilo del grupo acetilo con el residuo aromático, en lugar de carbohidrato/residuo aromático.

La metodología presentada como resultado de la combinación de RMN, calorimetría y cálculos computacionales permite la obtención de argumentos experimentales para explicar la interacción del modelo de carbohidratos/residuo aromático y la convierte en una metodología aplicable en estudios más complejos.

En el caso de las esferas de solvatación, los cambios del desplazamiento químico observados durante las titulaciones anisotrópicas dan un indicio de que la primera esfera de solvatación está constituida por tres moléculas de benceno por cada una de carbohidrato. En el caso de las titulaciones con hexaflurobenceno nuevamente la primera esfera de solvatación está constituida por tres moléculas de disolvente por cada una de carbohidrato, sin embargo dada la electronegatividad de los átomos de flúor, la interacción que predomina es la CH/*n*.

2.8 PARTE EXPERIMENTAL

Todos los reactivos se obtuvieron comercialmente y se utilizaron directamente del envase que los contenía, sin previa purificación. La cromatografía en capa fina se desarrolló sobre cromatoplasmas de gel de sílice 60 de 0.20 mm de espesor (ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄) Macherey-Nagel utilizando luz ultravioleta (UV) para identificar y revelar los productos.

Los espectros de infrarrojo se determinaron en CHCl₃ o bien en pastilla de KBr y con un equipo Perkin Elmer Spectrum One (FT-IR), las frecuencias de absorción se reportan en cm⁻¹.

Los espectros de masas se determinaron a 70 eV en un espectrómetro Jeol JAS-Ax505

En los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se describen más adelante, los desplazamientos químicos se reportan en la escala δ (ppm), utilizando TMS como referencia interna. Para indicar la multiplicidad de las señales de los espectros de RMN de protón se utilizaron las siguientes abreviaturas: señal (s) simple, (d) doble, (t) triple, (c) cuádruple, (m) múltiple y (sa) señal ancha. Las señales complejas reportadas corresponden al centro de la señal.

Los puntos de fusión se determinaron empleando un aparato Fisher-Johns usando laminillas de vidrio abierto y no están corregidos.

La purificación de los compuestos sintetizados se llevó a cabo mediante cromatografía en columna tipo flash, utilizando sílica gel Merck 230-400 mallas (0.040 – 0.063 mm).

2.8.1 Síntesis de los compuestos de interés.

Para llevar a cabo la síntesis de los compuestos permetilados se siguió la metodología descrita por Wang *et al.*⁸⁰ A 1 g (5.15 mmol) de metil-D-piranósido se disolvió en 7 mL de sulfóxido de dimetilo, se adicionaron lentamente 10 mL (50 mmol) de una solución al 50% de NaOH, de tal forma que al terminar la adición se formara una suspensión de aspecto gelatinoso.

Posteriormente, se adicionaron 3 mL (48.2 mmol) de CH_3I . La reacción se mantuvo en agitación durante 24 h, al término de las mismas la mezcla de reacción adquiere un color blanco. Entonces se adicionan 100 mL de agua y se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). Los extractos orgánicos se combinan, se secan con Na_2SO_4 , se filtran y se concentran al vacío.

La purificación de los compuestos para las determinaciones de calorimetría requirió un proceso diferente para los compuestos sólidos y líquidos, dado que esta técnica requiere de un grado de pureza de al menos 99.9%.

Los compuestos β -galactosa permetilada (**2**) y β -glucosa permetilada (**4**) son compuestos sólidos; para la purificación de éstos fue necesario llevar a cabo dos separaciones cromatográficas en columnas consecutivas usando como soporte sílica gel y como eluyente mezclas hexano:acetato de etilo en proporciones 95:5, 90:10, 80:20. El compuesto puro que se recuperó de las fracciones de la columna, se concentró y posteriormente fue tratado dos veces consecutivas con el 10% en peso de carbón activado; para ello, el compuesto se disolvió en acetato de etilo, se adicionó el carbón activado y se dejó 3 minutos en agitación bajo calentamiento. La mezcla se filtró, se concentró al vacío. De esta forma se obtuvieron dos compuestos sólidos de color blanco, la pureza de los mismos fue determinada por cromatografía de gases-masas y ésta fue del 100% para ambos casos.

Para el caso de los anómeros α de la galactosa (**1**), glucosa (**3**) y manosa (**5**), los compuestos son líquidos. Para su purificación se utilizó cromatografía en columna. Se efectuaron dos columnas consecutivas usando como soporte sílica gel y como eluyente mezclas hexano:acetato de etilo en proporciones 95:5, 90:10, 80:20. El producto puro recuperado en las fracciones de la columna se concentró al vacío y después se pasó por una microcolumna que tenía como soporte carbón activado, el eluyente fue hexano. El compuesto se concentró y se determinó su pureza a través de cromatografía de gases-masas. La pureza de la α -galactosa permetilada (**1**) obtenida fue de 99.89%, de la α -manosa permetilada (**5**) 99.91% y de la α -glucosa permetilada (**3**) 99.23% por lo cual este último compuesto sólo fue utilizado para los estudios de RMN y no para los de calorimetría.

2.8.2 Estudios de RMN.

En los estudios de RMN de cambio del desplazamiento químico ($\Delta\delta$) se pesaron 30 mg (0.12 mmol) del carbohidrato los cuales se disolvieron en aproximadamente 0.5 mL del disolvente deuterado. Se adquirieron los espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, NOESY, HSQC y HMBC para confirmar la asignación completa del carbohidrato. Los espectros se adquirieron en un equipo Varian-Inova 500 MHz.

La metodología para llevar a cabo las titulaciones anisotrópicas fue la siguiente: se disolvieron 110 mg (0.44 mmol) de carbohidrato en 0.5 mL de CDCl_3 , posteriormente se fueron adicionando cantidades medidas (19.4 μL / 0.22 mmol) de C_6D_6 , de tal forma que para la segunda adición ya se tuviera en el tubo de RMN una relación 1:1 de carbohidrato: C_6D_6 . Se efectuaron 12 adiciones de C_6D_6 , con lo cual se llegó a una relación 1:6 carbohidrato:benceno. Al realizar cada una de las adiciones se adquirió el espectro de ^1H de RMN. Se empleó trimetil silano (TMS) como referencia interna. El procedimiento fue idéntico para la titulación anisotrópica usando ciclohexano- d_{12} , salvo que el carbohidrato se disuelve en 0.5 mL de C_6D_{12} y se efectuaron 12 adiciones de C_6D_6 , también se empleó trimetil silano (TMS) como referencia interna.

Para la titulación anisotrópica en la que el agente titulante es D_2O , la metodología fue similar. Se disolvieron 110 mg (0.44 mmol) de carbohidrato en 0.5 mL de C_6D_6 , posteriormente se fueron adicionando cantidades medidas (0.7 μL / 0.22 mmol) de D_2O , de tal forma que para la segunda adición ya se tuviera en el tubo de RMN una relación 1:1 de carbohidrato: D_2O . En esta ocasión sólo se efectuaron 8 adiciones de D_2O , con lo cual llegó a una relación 1:4 carbohidrato: D_2O , ya que con las adiciones consecutivas de agua deuterada, se propicia la formación de una emulsión que complica el ajuste en la homogeneidad del campo magnético (shimming). Al realizar cada una de las adiciones se adquirió el espectro de ^1H de RMN. Se usó como referencia interna un capilar con una solución de 3-(trimetilsilil) propionato de sodio (TSP) en D_2O para el espectro de ^1H .

Para los estudios del incremento NOE, el carbohidrato permetilado (15 mg, 0.06 mmol) se disolvió en una mezcla de disolventes C_6D_6 - C_6H_6 (0.25 mL-0.25 mL) y la determinación se llevó

a cabo usando un espectrómetro de Bruker 500 MHz. Los espectros 1D NOE diferenciales fueron obtenidos tras la irradiación de la molécula de benceno posterior a la diferencia de espectros *on-resonance* y *off-resonance* con irradiaciones selectivas en barridos alternados.

2.9 APLICACIONES DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA EN EL PRESENTE TRABAJO

2.9.1 Estudio teórico de la conformación de un producto natural estabilizada por interacción CH/ π

A menudo las interacciones débiles son subestimadas en procesos conformacionales, pero es indudable que es importante considerarlas en la conformación final de los compuestos. Por ejemplo, es sabido, que la preferencia por la posición axial del grupo hidroxilo en el 5-hidroxi-1,3-dioxano es atribuida a un enlace de hidrógeno intramolecular que como ya se mencionó, es una de las interacciones más fuertes e incluye interacciones como la CH- π , π - π , etc.^{81,82} También es aceptado que los grupos hidroxilo en los carbohidratos adoptan una disposición espacial tal, que existe un arreglo cooperativo entre ellos.²⁹ También han sido identificadas interacciones estereoelectrónicas como la $n_O \rightarrow \sigma^*_{C-O}$ como un posible origen del efecto anomérico en el segmento O-C-O de los carbohidratos.⁸³⁻⁸⁵ Es sabido que las interacciones CH/ π tienen un papel importante en el reconocimiento de los carbohidratos por las proteínas^{31,41,66} como el caso de la galactosa por las galectinas.³⁶ El compuesto que se muestra en la Figura 38, es denominado acetina 8-C-neohesperidósida y/o C-glicosilflavona (7) que se aísla de la rutácea *Fortunella margarita*,⁸⁶ *F. japonica*,⁸⁷ así como de la Amaranthaceae *Alternanthera maritima*⁸⁸ y *A. tenella*.⁸⁹ y se sintetiza a partir de la acetina.⁸⁶ Los datos espectroscópicos de dicho compuesto no se han publicado completamente.^{86,87} También se ha aislado de la especie *Piper ossanum* Trel. a la que se le conoce como “Platanillo de Cuba”. Las hojas son usadas en la medicina tradicional de Cuba como hemostático, antiséptico, cicatrizante o diurético.⁹⁰

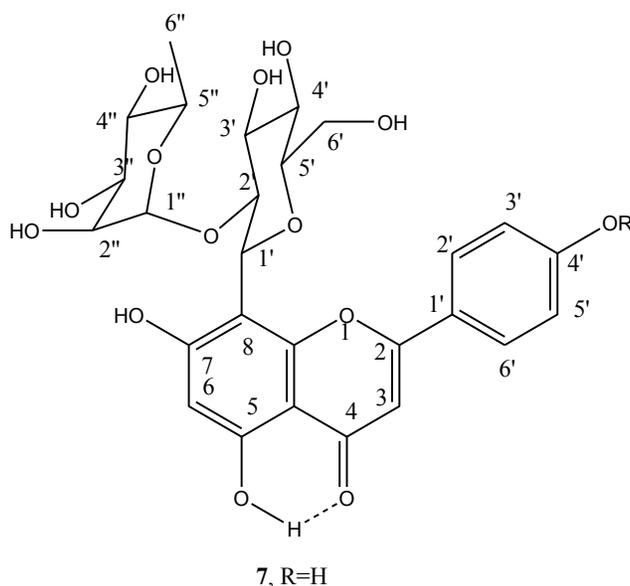


Figura 38. Estructura de la C-glicosilflavona (7) aislada de las hojas de *Piper ossanum* Trel.

En un estudio reciente⁹¹ se dieron a la tarea de completar la asignación de RMN de ^1H y ^{13}C de dicho compuesto. Al analizar los espectros de RMN de ^1H , se observó un comportamiento anómalo en los átomos de hidrógeno del grupo metino de la posición C-5 así como de los átomos de hidrógeno del grupo metilo de la posición C-6 del residuo de la ramnosa (H-5''' y H-6'''). El fenómeno observado es que estos átomos de hidrógeno presentaban un efecto de protección diamagnética. Los desplazamientos químicos que presentan son de $\delta=2.11$ y 0.46 , respectivamente. Este efecto se atribuyó al efecto de anisotropía que presenta el anillo aromático del residuo de aglicona. Este mismo fenómeno puede ser observado en algunos productos naturales como los derivados *O*-acetilados de la vitexina²⁶ y C-8 y C-6 glicosilflavonoides; sin embargo no ha sido explicado hasta el momento.⁹²⁻⁹⁴

De acuerdo al tamaño de la molécula y considerando las interacciones estéricas, este tipo de compuestos deberían adoptar una conformación extendida, sin embargo es posible que algunas de las interacciones débiles como las estudiadas en esta tesis jueguen un papel relevante propiciando así una conformación plegada, en la que pueden ser afectados el residuo del azúcar (principalmente H-5''' y H-6'''). Con el objetivo de corroborar y dar una explicación al

fenómeno ya descrito, se llevó a cabo un estudio teórico de los dos rotámeros del compuesto **7** los cuales se generan por la rotación alrededor del enlace C1''(Glu)-C8(Ar) (**A** y **B**, Figura 39).

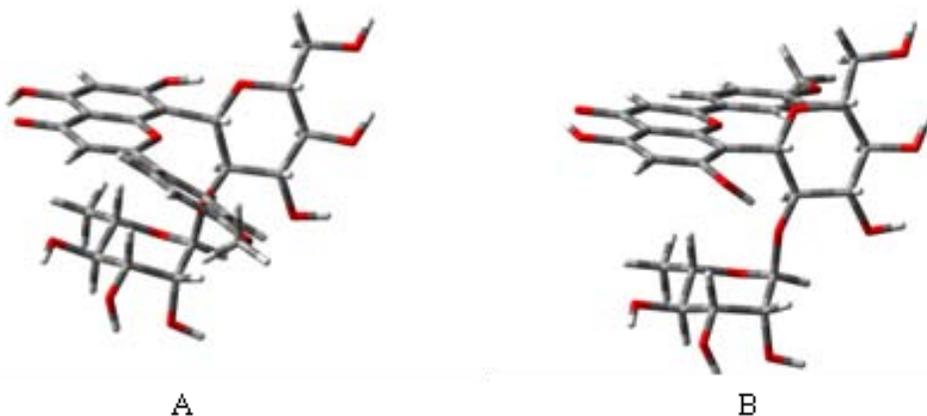


Figura 39. Confórmeros del compuesto **7** generados con el giro del enlace C1''-C8

El estudio consistió en llevar a cabo cálculos teóricos a nivel mPWB95/6-31+G(d,p) (desarrollado recientemente por Truhlar).^{95,96} Los resultados obtenidos, permiten afirmar que el compuesto **7** está conformacionalmente restringido debido a la suma de muchas interacciones débiles. En esta conformación la α -L-ramnosa con su sustituyente de glucosa en posición axial muestra un efecto *endo*-anomérico, que produce que la distancia C1-O_{endo} sea de 1.388 Å y de 1.410 Å para la distancia C1-O_{exo}. En el confórmero A la distancia C1-O_{endo} es de 1.385 Å mientras que para el confórmero B es de 1.420 Å para en enlace C1-O_{exo}. Estas distancias concuerdan y pueden ser atribuidas a la interacción estabilizante $n_O \rightarrow \sigma^*_{C-O}$

En ambos confórmeros, el residuo de glucosa está orientado de tal forma que un par electrónico no compartido se mantiene de forma antiperiplanar respecto al enlace C-O endocíclico, lo que significa que presenta un efecto *exo*-anomérico.⁸³⁻⁸⁵ El grupo hidroxilo de la posición 2 (C-2'') del residuo de ramnosa da origen al efecto $\Delta 2$, lo que incrementa el efecto anomérico en ca. 1 kcal/mol.^{97,98}

Como se esperaba, el anillo aromático tiene una orientación ecuatorial y los grupos hidroxilo se orientan de tal forma que presentan interacciones aditivas. Existe una diferencia en estabilidad entre los dos conformeros de 4.25 kcal/mol. Esta diferencia se atribuye a un enlace de hidrógeno adicional entre el grupo hidroxilo de la posición C-7 y el átomo de oxígeno endocíclico del glucopiranosido en el conformero A, lo que restringe la rotación libre del atropoisómero. En comparación, la energía del rotámero B se incrementa por la proximidad de dos átomos de oxígeno y la pérdida de un enlace de hidrógeno.

La existencia de la interacción CH/ π , de la cual ya se ha hablado con anterioridad, que se sabe que tiene una energía de 1 a 3 kcal/mol y que en los espectros de RMN de ^1H puede asociarse a efectos diamagnéticos por el efecto de protección del anillo aromático^{41,66} se presenta en la molécula estudiada. Los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno asociados con el glicósido fueron calculados usando el método GIAO (*Gauge-Independent Atomic Orbitals* por sus siglas en inglés) a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p)//mPWB95/6-31+G(d,p), Figura 40. Los resultados teóricos indican que los átomos de hidrógeno del grupo metilo (H-6''') y el átomo de hidrógeno del grupo metino (H-5''') presentan efecto de protección diamagnética, lo que tiene su origen en la interacción CH/ π con el anillo aromático A de la flavona. Las distancias de interacción son de 2.60, 2.82, 2.64, 3.00, 3.02 y 2.83 Å, similares a las obtenidas para el complejo fucosa-benceno.⁶⁶ De forma interesante, las distancias son mayores para el conformero B: 3.03, 2.67, 2.73, 3.25 y 3.31 Å.

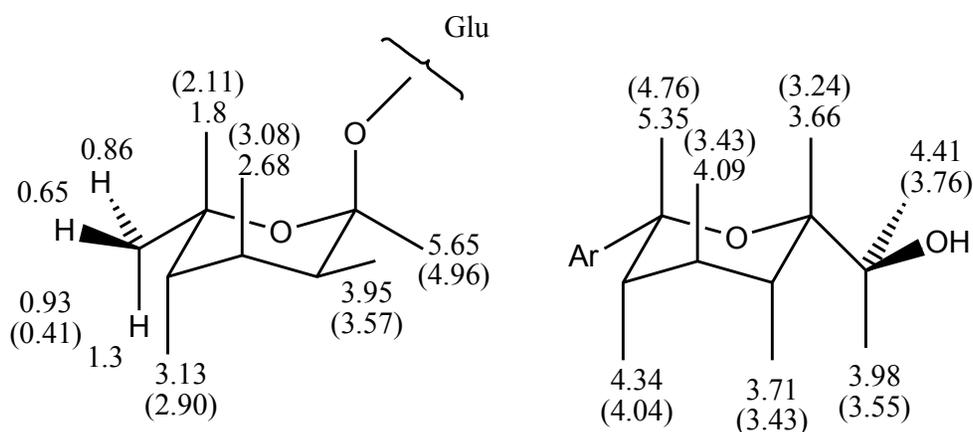


Figura 40. Desplazamientos químicos del residuo de glucosa para el compuesto 7. Calculados a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p)//mPWB95/6-31+G(d,p) y reportados experimentalmente (en paréntesis).

Los resultados teóricos confirman que el compuesto **7** presenta una conformación plegada, estabilizada por interacciones como el efecto anomérico, el efecto $\Delta 2$ y la interacción CH/π , lo que propicia que el grupo metilo y metino se mantengan cerca de los residuos aromáticos de la flavona, la cual ejerce un efecto de protección diamagnética sobre los átomos de hidrógeno del grupo metino de la posición C-5 (H-5'') y del grupo metilo en la posición C-6 (H-6'') de la ramnosa. Esta diferencia en desplazamientos químicos puede observarse en el espectro de RMN de ^1H de la Figura 41.

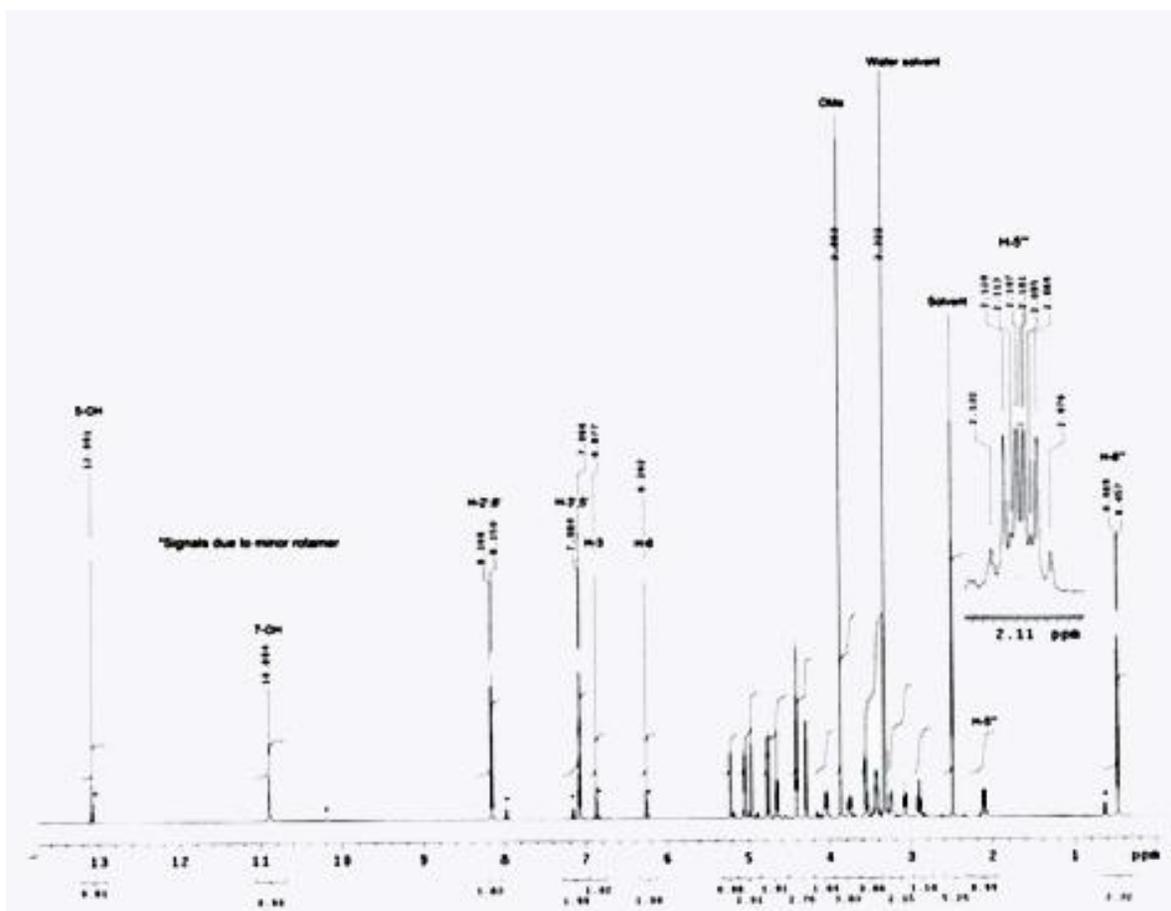


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H 500 MHz de la C-glicosilflavona.

2.9.1.1 Metodología.

Todos los cálculos se llevaron a cabo utilizando el programa Gaussian 03. Las geometrías fueron optimizadas a nivel mPWB95/6-31+G(d,p). El tensor de protección de RMN fue calculado usando el método Gauge-independent atomic orbitals (GIAO) a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p)//mPWB95/6-31+G(d,p). El valor para los átomos de hidrógeno del TMS es 8.81.

2.9.2 Evaluación de la metodología con un sistema carbohidrato-proteína.

A manera de resumen, la interacción CH/ π estudiada en la presente tesis, permite establecer que para los epímeros α y β de la galactosa, existen tres interacciones CH/ π , en el caso del epímero α (1) la interacción es menor respecto al epímero β (2) ya que la presencia del grupo metoxilo en la posición 1 genera un ambiente repulsivo para la aproximación de la molécula de benceno. En el caso de la α -manosa permetilada (5), la presencia del grupo metoxilo en la posición 4 no permite la aproximación de la molécula de benceno para interaccionar con los átomos de hidrógeno de las posiciones H₃, H₄ y H₅. En el caso del compuesto peracetilado (6), son los grupos acetilo los que interaccionan con el benceno y no los átomos de hidrógeno del anillo de pirano. Figura 42.

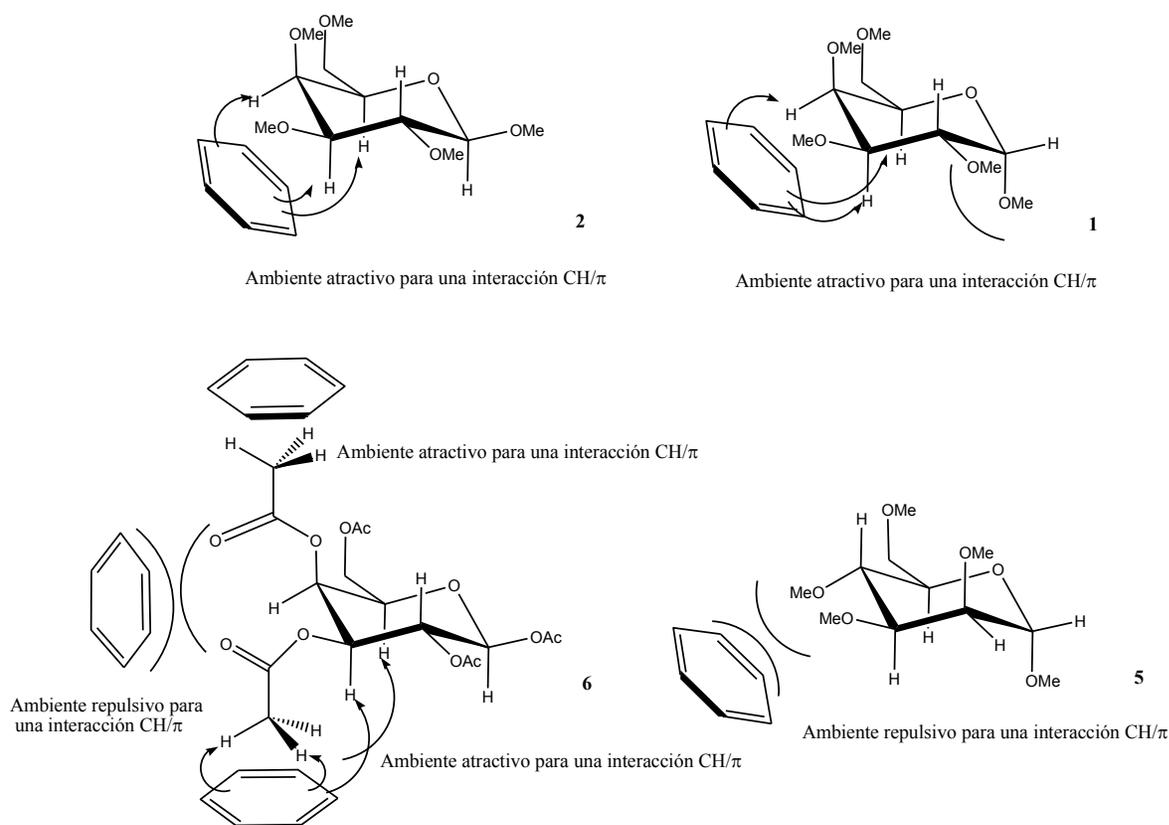


Figura 42. Origen de los NOEs observado para los compuestos **1** y **2** (arriba), **6** y **5** (abajo).

Hasta el día de hoy, han sido pocas las observaciones experimentales de las interacciones carbohidrato-residuo aromático. Recientemente Waters *et al.*^{79,99,100} estudiaron la interacción entre el triptófano y el residuo tetra-O-acetil-Glc-Ser, el cual es fundamental para la formación de una horquilla β de la proteína.⁷⁹ Los resultados de RMN demostraron la existencia de la interacción entre la cara α del carbohidrato y el residuo de triptófano. Los autores afirman que cuando se eliminan los grupos acetilo se pierde la interacción con el triptófano. Este resultado contrasta con lo presentado en esta tesis, ya que se ha demostrado que la interacción CH/ π se mantiene en carbohidratos libres de sustituyentes en la región polar y en solución acuosa,⁶⁶ por lo que la ausencia de grupos acetilo debería mantener la interacción CH/ π si ésta existiera. Es posible que en lugar de un incremento en el costo de solvatación de la glucosa no sustituida, como sugieren los autores, lo que sucede es que la interacción dominante suceda entre el metilo de uno de los grupos acetilo y el triptófano. Como se puede observar en la Figura 43, los grupos acetilo presentan una mayor interacción con las moléculas de benceno que los átomos de hidrógeno del anillo de pirano, lo cual se aprecia en la intensidad de los picos de cruce de los

grupos acetilo con el anillo de benceno. La energía asociada al fenómeno apunta en esta dirección y concuerda con los resultados presentados en este estudio.

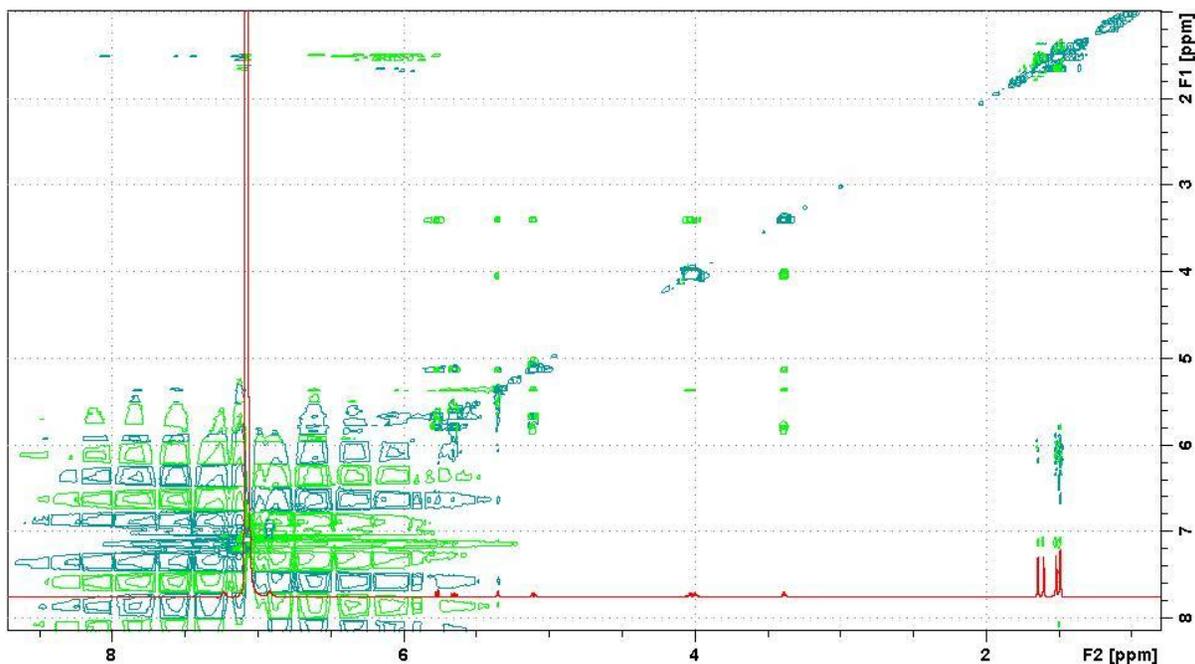


Figura 43. Espectro NOESY del compuesto peracetilado **6**, donde se observan picos de cruce de los grupos metilo con el benceno.

Es claro que se necesita profundizar en el estudio de la interacción carbohidrato/aromático en sistemas libres de otras interacciones para identificar bien su energética y dinámica; ya que en moléculas complejas como los glicopéptidos mencionados anteriormente, el fenómeno de interacción puede ser consecuencia de diferentes procesos como el proceso de solvatación/desolvatación. Sin embargo también se demuestra que los carbohidratos sin sustituyentes pueden interactuar de forma específica con los residuos aromáticos,⁶⁶ por lo tanto para cada caso particular se debe tomar en cuenta la interacción carbohidrato/residuo aromático, metilo/residuo aromático y el fenómeno de solvatación que es característico para moléculas complejas como las biomoléculas.

De cualquier forma, es claro que la metodología desarrollada en este trabajo permite aportar conclusiones relevantes en sistemas más complejos como las proteínas, remarca la importancia de estudiar las interacciones entre carbohidratos/residuos aromáticos en sistemas donde no existan

interacciones adicionales, las cuales pueden en principio modificar las observaciones estructurales, por lo que los carbohidratos permetilados introducidos en este estudio, así como la metodología desarrollada tienen indudable utilidad.

2.9.3 Estudio de la interacción CH/ π en dos carbohidratos por medio del análisis de la diferencia de desplazamientos químicos ($\Delta\delta$).

Los compuestos estudiados en esta sección fueron adquiridos a la empresa SynphaBase, el objetivo de la adquisición de estos productos, fue la de llevar a cabo la aplicación de la metodología de la diferencia de desplazamientos químicos ($\Delta\delta$) en derivados de la galactosa con sustituyentes químicos diferentes de los compuestos sintetizados en el presente trabajo. Los compuestos adquiridos son tert-Butildimetilsilil 3,4,6-tri-O-acetil-2-deoxi-2-azido- β -D-galactopiranosido (**8**) y tert-Butildimetilsilil 4,6-di-O-benciliden-2-deoxi-2-(ftalimido)- β -D-glucopiranosido. Las estructuras así como la numeración de los compuestos se muestran en la Figura 44.

Como puede observarse en la Tabla 19, los átomos de hidrógeno H₃ y H₄ presentan un cambio en el desplazamiento químico a campo bajo, lo que podría oponerse a lo esperado, es decir, dichos átomos de hidrógeno están interaccionando con el fragmento σ del anillo de benceno. Sin embargo, estas observaciones concuerdan perfectamente con los resultados del compuesto β -galactosa peracetilada (**6**), donde ya se ha concluido que los grupos acetilo generan un ambiente repulsivo que impide que el anillo de benceno se aproxime al anillo de pirano. También se puede observar que los grupos metilo de los grupos acetilo son los que interaccionan con la cara del anillo de benceno y por lo tanto son los que se desplazan a campo alto.

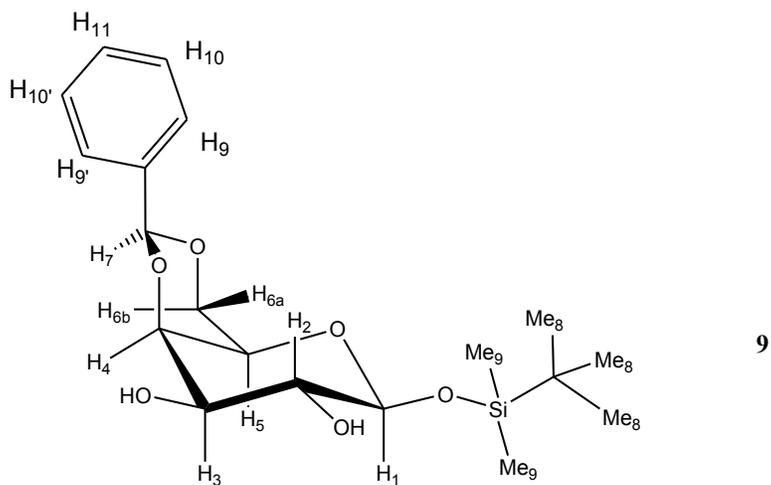
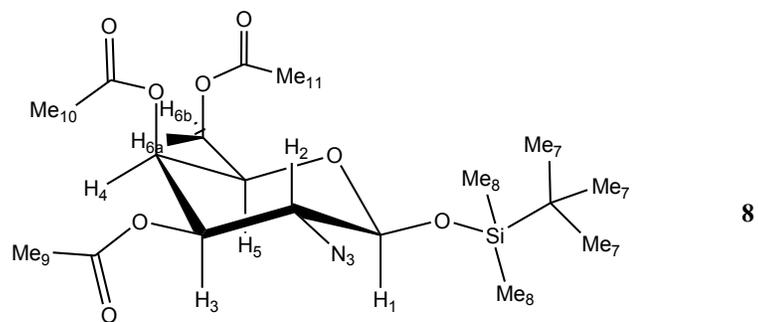


Figura 44. Derivados comerciales de la galactosa utilizados para su estudio por diferencia de desplazamientos químicos ($\Delta\delta$).

Tabla 19. Diferencias de desplazamientos químicos (en ppm) para el compuesto **8**.

	Compuesto (8)		
	C_6D_{12}	C_6D_6	$\Delta\delta = \delta C_6D_{12} - \delta C_6D_6$
H₁	4.58	4.32	0.26
H₂	3.60	3.70	-0.10
H₃	4.75	4.82	-0.06
H₄	5.31	5.32	-0.01
H₅	3.84	3.13	0.71
H_{6a}	4.08	4.01	0.07
H_{6b}	4.15	4.06	0.08
Me₇	0.95	0.98	-0.03
Me₈	0.17	0.15	0.02
Me₉	2.05	1.70	0.35
Me₁₀	2.16	1.59	0.57
Me₁₁	2.04	1.66	0.38

Tabla 20. Diferencias de desplazamientos químicos (en ppm) para el compuesto **9**.

	α -galactosa permetilada (9)		
	C_6D_{12}	C_6D_6	$\Delta\delta = \delta C_6D_{12} - \delta C_6D_6$
H₁	4.53	4.45	0.08
H₂	3.65	3.69	-0.04
H₃	3.65	3.38	0.27
H₄	4.16	3.53	0.63
H₅	3.42	2.51	0.91
H_{6a}	4.04	3.32	0.72
H_{6b}	4.26	3.94	0.32
H₉	5.52	5.20	0.32
H₁₀, H_{10'}	7.50	7.57	-0.07
H₁₁, H_{11'}	7.37	7.16	0.22
H₁₂, H_{12'}	7.35	7.10	0.25
Me₇	0.94	1.03	-0.09
Me₈	0.17	0.24	-0.07

En la Tabla 20 se muestran los cambios de desplazamientos químicos para el compuesto **9**, que en este caso es un derivado de la glucosa, puede apreciarse que los cambios de desplazamiento químico para los átomos de hidrógeno H₁, H₃ y H₅ concuerdan con lo observado anteriormente, es decir, dichos átomos de hidrógeno presentan un cambio en el desplazamiento químico a campo alto, lo que significa que dichos átomos están interaccionando con la cara del anillo bencénico, siendo el que menos cambio tiene el átomo H₃ con un cambio de 0.27 ppm y el que mayor efecto tiene el átomo H₅ con un cambio de 0.91 ppm.

Estos resultados confirman que la metodología desarrollada para los compuestos permetilados, es aplicable a otros carbohidratos, con lo cual se pueden considerar sistemas más complejos como los biológicos.

CAPITULO 3

“Interacción π - π ”

Estudio de los complejos estacionarios en la reacción de Diels-Alder.

3.1 INTRODUCCION

La interacción π/π ha sido definida como la interacción que se genera entre dos sistemas olefínicos sin otro requerimiento específico. Existen varias combinaciones dependiendo del tipo de olefina involucrada, por ejemplo, la que posiblemente es la más común, es aquella en la que una de las olefinas es rica en electrones y la otra es pobre y ha sido considerado como un par de transferencia de carga, ya que la molécula rica en electrones transfiere carga al sistema deficiente en electrones. Esto ha sido observado experimentalmente a través de la obtención de espectros característicos. Es importante señalar que la planaridad de los anillos favorece las interacciones de dispersión e inducción entre ellos.¹⁰¹

En 1990, Hunter y Sanders propusieron¹⁰² un modelo para describir las interacciones llamadas hasta ese momento “interacciones aromáticas”. Estudiaron los dímeros que forman las porfirinas y observaron que cuando se colocaban dos anillos de porfirina uno por encima de otro, los anillos se encontraban ligeramente desplazados. (Figura 45)

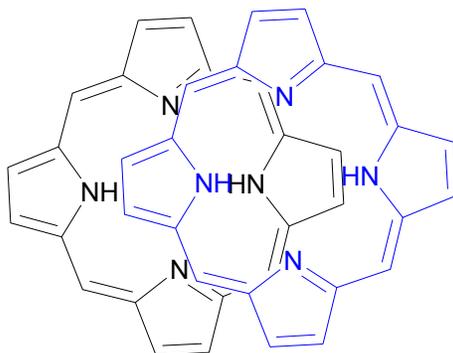


Figura 45. Apilamiento (stacking) de los anillos de porfirina.

De esta forma se estableció que la hibridación de los átomos de carbono en un sistema π está formado por un fragmento σ con carga positiva el cual se encuentra entre dos regiones negativas, las cuales corresponden a la densidad electrónica π , (Figura 46).

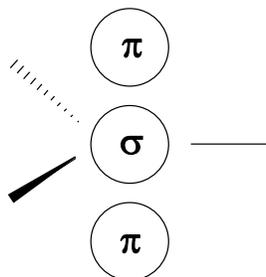


Figura 46. Hibridación de un carbono sp^2 en un sistema aromático.

Así cuando se consideran dos sistemas π , pueden presentarse diferentes interacciones electrostáticas dependiendo de la orientación que ambos sistemas adquieran, (Figura 47).

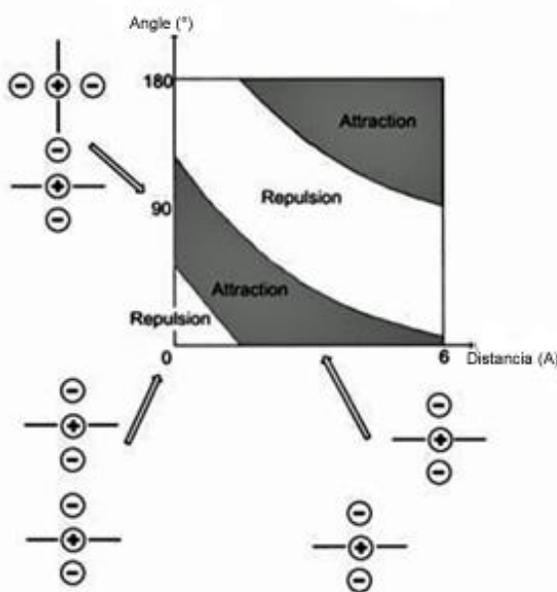


Figura 47. Interacciones electrostáticas generadas por la interacción π /carga en diferentes orientaciones.

Como puede observarse, existen tres orientaciones posibles, la primera de ellas *cara-cara* la cual se emplea para describir un sistema apilado. Esta orientación, de acuerdo a la Figura 47, puede apreciarse que es la orientación menos favorecida ya que la densidad electrónica π de los dos sistemas aromáticos se encuentra una encima de otra y predomina la repulsión (A). La segunda es

arista-cara la cual es usada para describir el arreglo en T y es una de las orientaciones favorecidas (**B**). Y por último la orientación *centro-arista* o paralela desplazada, donde la densidad electrónica de uno de los anillos interacciona con el fragmento σ del otro. Esta interacción es considerada una interacción CH/π , **C**. El efecto de los sustituyentes también ha sido estudiado experimental y teóricamente, principalmente en el dímero del benceno,^{103,104} (Figura 48).

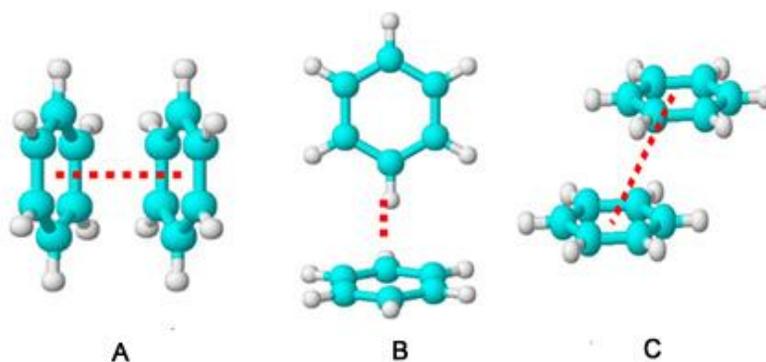


Figura 48. Orientaciones de anillos aromáticos: apilada (**A**), en T (**B**) y paralela desplazada (**C**).

Las interacciones π/π han sido estudiadas en fase gaseosa, donde Kemplerer¹⁰⁵ y col. establecieron que el momento cuadrupolar del benceno favorece el arreglo paralelo desplazado que se observa en estado sólido. El dímero benceno-hexafluorobenceno^{106,107} ha sido difractado y se ha podido observar que dicho dímero también presenta el mismo arreglo; sin embargo, debido a la naturaleza de estas dos moléculas, el arreglo ha sido atribuido a los momentos cuadrupolares de las mismas (Figura 49). Un estudio computacional de este mismo dímero determinó que la orientación desplazada y el arreglo en T son los preferidos cuando se lleva a cabo el cálculo con el método MP2 el cual incluye la correlación electrónica.¹⁰⁸

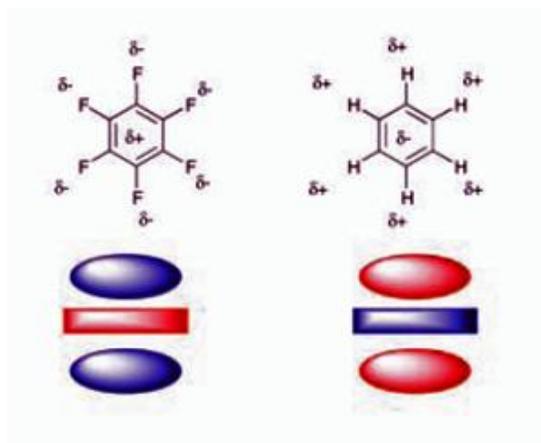


Figura 49. Representación de los cuadrupolos del benceno y del hexafluorobenceno.¹⁰¹

Las interacciones π/π están presentes en los sistemas biológicos. Uno de los ejemplos más importantes es el de la estabilización que presenta la doble hélice del DNA generada por el apilamiento de las bases nucleicas. La energía asociada a la estabilización con la que contribuye cada una de las bases a través de la energía libre de apilamiento, fue determinada a través de la temperatura de fusión (melting temperature T_m), es decir temperatura a la cual el 50% de la cadena de DNA se disocia en dos cadenas. La energía asociada al apilamiento es de 7 kcal/mol.^{109,110}

Los ácidos nucleicos juegan un papel muy importante en el metabolismo celular, por lo que son el objetivo del diseño de las terapias que pretenden evitar la replicación celular y por lo tanto las interacciones π/π han sido utilizadas para el diseño de fármacos. En el complejo DNA-acridina,¹¹¹ por ejemplo, la acridina se puede ubicar entre los pares de bases sin modificar los puentes de hidrógeno. La presencia de este intercalador de DNA cambia las propiedades de la doble hélice impidiendo la replicación de la cadena. Este principio de intercaladores ha sido considerado como una herramienta en el diseño de los medicamentos anticancerígenos (Figura 50).

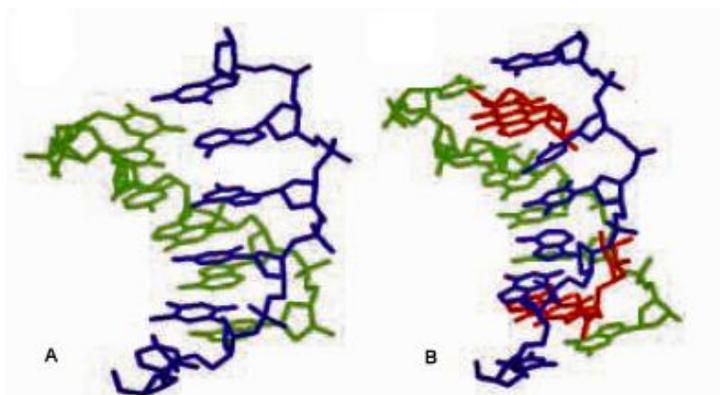


Figura 50. DNA en ausencia (A) y en presencia (B) de un intercalador.¹⁰¹

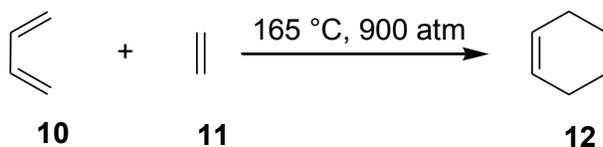
El reconocimiento de muchas moléculas es favorecido por interacciones π/π , por ejemplo la interacción de naftalenos 2,6-disustituidos que son reconocidos por ciclofanos.¹¹² Así mismo las propiedades físicas y químicas de algunos catenanos, éteres corona y rotaxanos son modificadas a través de interacciones π/π .^{113,114}

3.1.1 Reacción de Diels-Alder.

Esta transformación debe su nombre a los científicos alemanes Otto Diels y Kurt Alder, quienes obtuvieron el premio Nobel de Química en 1950 por sus contribuciones en el desarrollo de esta reacción. La reacción de Diels-Alder constituye uno de los métodos sintéticos más importantes empleados en la formación de anillos de seis miembros. Entre sus principales características están que proceden con buenos rendimientos químicos y elevada regio- y estereoselectividad.^{115,116.}

En las reacciones Diels-Alder se lleva a cabo una cicloadición [4+2] donde se hace reaccionar un **dieno** 1,3-conjugado con el doble enlace del **dienófilo**, con lo cual se genera un anillo de ciclohexeno, donde los enlaces σ del aducto se forman a partir de los enlaces π de los reactivos. El ejemplo más sencillo se puede observar cuando se hace reaccionar el butadieno **10 (dieno)** y el etileno **11 (dienófilo)**. Se obtiene como producto el ciclohexeno (**12**). La reacción llevada a cabo implica la conversión de tres enlaces π a dos enlaces σ y un enlace π . Se le denomina

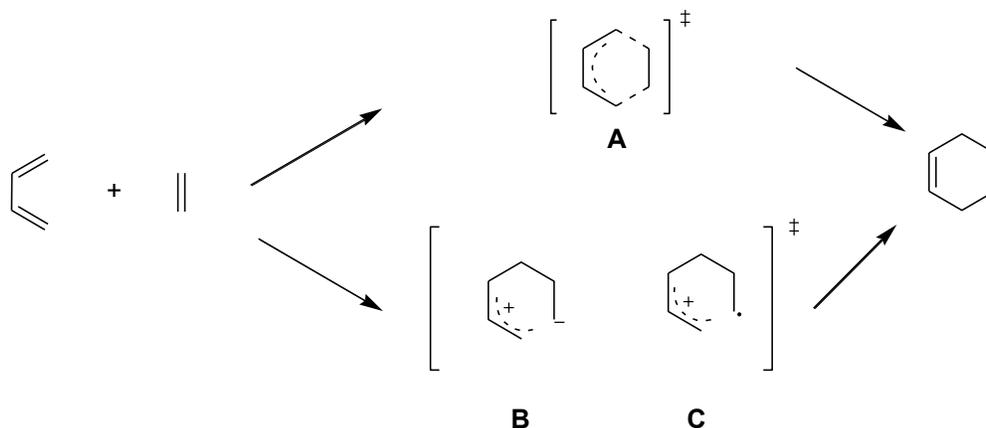
cicloadición $[4\pi + 2\pi]$ ya que participan cuatro electrones del **diene** y dos electrones del **dienófilo**.¹¹⁷ (Esquema 6)



Esquema 6. Reactivos y producto de una cicloadición $[4\pi + 2\pi]$.

3.1.1.1 Mecanismo de Reacción.

Se han propuesto dos mecanismos de reacción para este proceso,^{118,119} El primero consiste en un proceso concertado, en el cual los enlaces σ se forman simultáneamente, aunque no necesariamente de forma sincrónica, a través del estado de un transición **A**. El segundo, se refiere a un mecanismo por etapas, en el cual dos enlaces σ se generan en dos etapas consecutivas con dos posibles intermediarios: un zwitterion **B** o un biradical **C**¹²⁰ (Esquema 7).



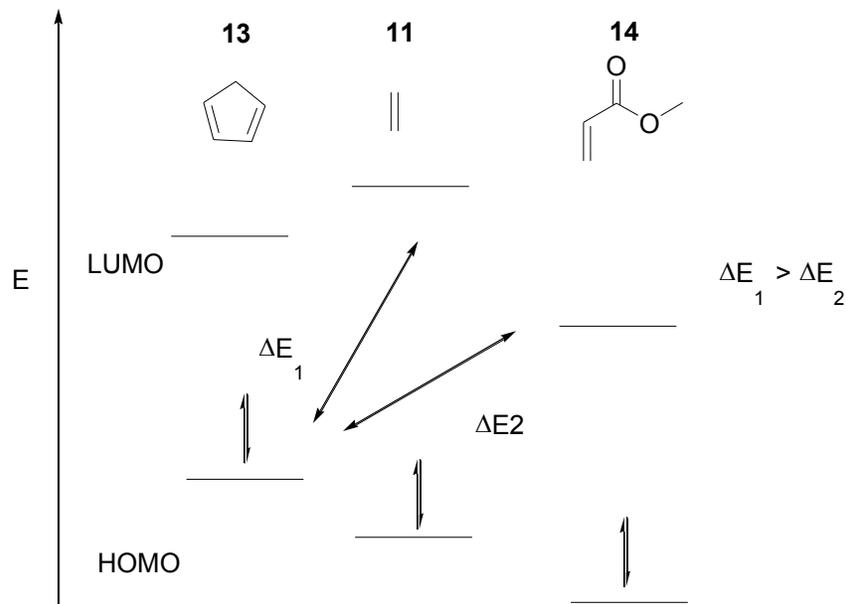
Esquema 7. Mecanismo propuesto para la reacción de Diels-Alder.

3.1.2 Reactividad Diels-Alder.

Una de las herramientas más utilizadas para explicar la reactividad en las reacciones Diels-Alder es la Teoría de Orbitales Moleculares Frontera (FMO),¹²¹⁻¹²⁴ la cual establece que para que una reacción de Diels-Alder pueda llevarse a cabo es necesario que exista una interacción de los orbitales moleculares frontera HOMO (orbital molecular ocupado de mayor energía) y LUMO (orbital molecular desocupado de menor energía) de los reactivos. Cuando interacciona el orbital HOMO_{dieno} con el LUMO_{dienófilo}, se dice que la reacción procede por **demanda electrónica normal** (DEN); por el contrario si la interacción ocurre entre el HOMO_{dienófilo} con el LUMO_{dieno}, entonces se dice que procede por **demanda electrónica inversa** (DEI).¹²¹

La diferencia energética, ΔE , entre el orbital HOMO_{dieno} y el LUMO_{dienófilo} en reacciones por DEN determina la rapidez del proceso. Entre menor sea el valor de ΔE , la energía de interacción (perturbación) entre HOMO y LUMO será mayor y la rapidez de reacción aumentará.

Los dienos con grupos electroattractores son también reactivos, ya que dichos grupos disminuyen la energía del LUMO y por lo tanto pueden reaccionar por DEI con dienófilos ricos en electrones.¹²² Por el contrario los dienos sustituidos con grupos electrodonadores incrementan la energía del HOMO y con ello la reacción procede por DEN de manera más rápida.¹²² Por ejemplo, si el alqueno está sustituido con grupos de carácter electroattractor, como en el caso de la acroleína o acrilato de metilo (**14**), existe una disminución en la energía del HOMO y del LUMO, dicha estabilización hace que la energía de interacción entre el HOMO_{dieno} y el LUMO_{dienófilo} sea mayor y por eso la rapidez de reacción se incrementa¹²¹ (Esquema 8).



Esquema 8. Interacciones entre los orbitales HOMO y LUMO del ciclopentadieno (**13**), etileno (**11**), y acrilato de metilo (**14**).

3.1.3 Estereoselectividad.

Se ha intentado explicar la estereoselectividad considerando varios aspectos como son:

3.1.3.1 Geometría de Aproximación.

Esta considera los lóbulos de los orbitales reaccionantes. Para ello se establece que las reacciones en las cuales los nuevos enlaces se forman en la misma superficie se describen como *suprafacial* respecto a ese componente. Lo opuesto a la interacción suprafacial se denomina *antarafacial* en la que un enlace se forma en una de las superficies y el otro enlace se forma en la cara opuesta (Figura 48).

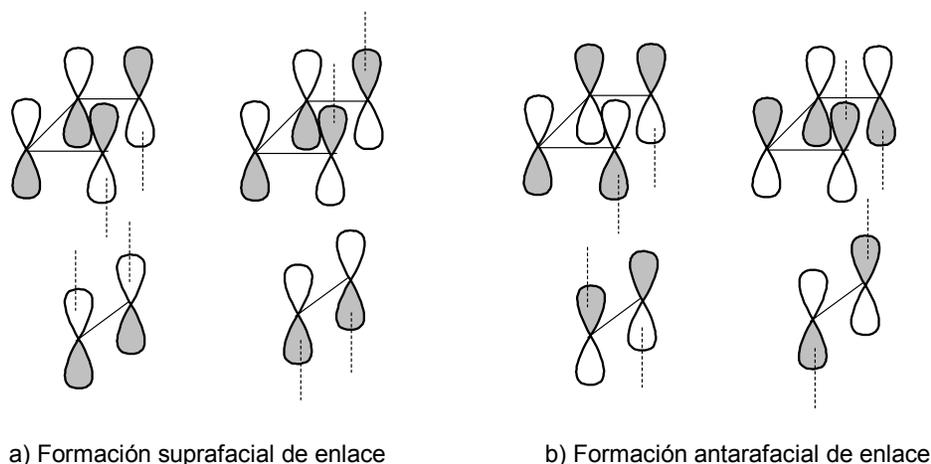
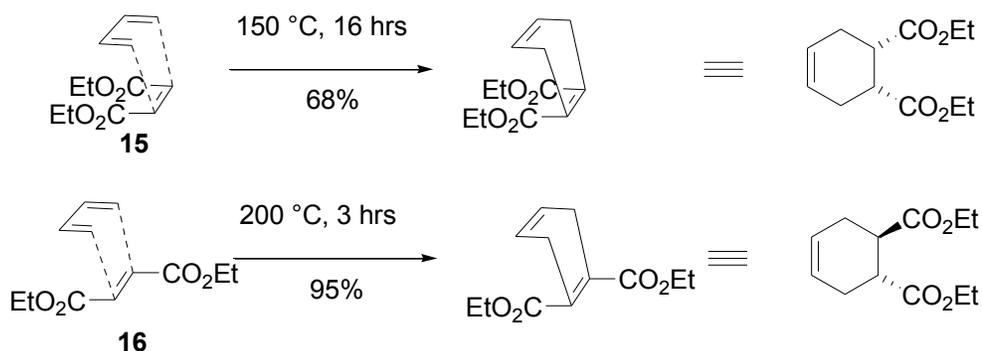


Figura 51. Formación de enlaces de forma suprafacial y antarafacial.

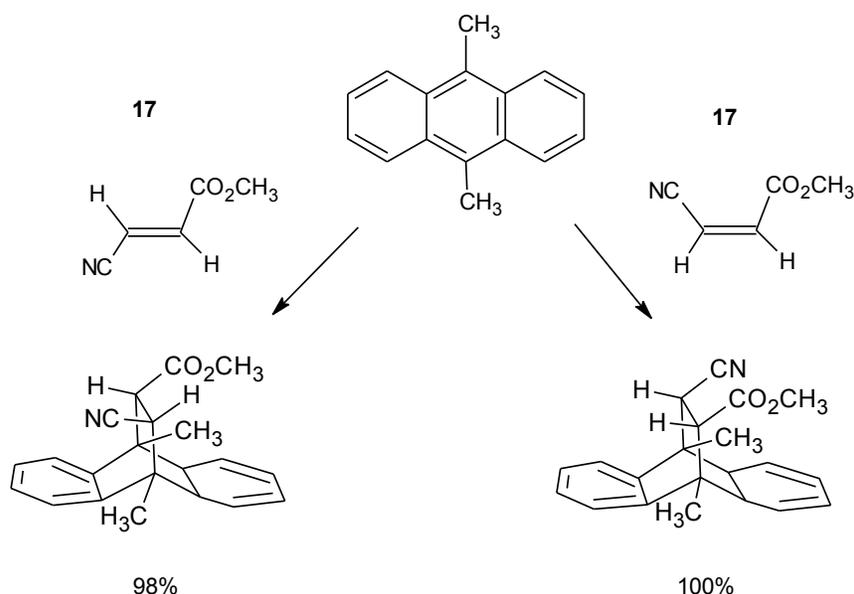
La mayoría de las cicloadiciones se llevan a cabo de forma suprafacial debido a la tensión que deberá presentarse en el giro de uno de los reactivos para poder alcanzar la otra cara del orbital. De esta forma el dieno y el dienófilo en las reacciones Diels-Alder reaccionan de forma suprafacial, lo cual conlleva a consecuencias sintéticas muy útiles, pues ocasiona que la estereoquímica de aproximación se mantenga a lo largo de toda la reacción.¹²⁵ De esta forma un dieno con sustituyentes dará un aducto en el cual las relaciones estereoquímicas se mantengan a lo largo de toda la reacción. Por ejemplo al reaccionar los ésteres del ácido maléico (**15**) y del ácido fumárico (**16**), con 1,3-butadieno (**10**), originan los aductos en los cuales los sustituyentes retienen, como una consecuencia del traslape suprafacial, las configuraciones *cis* y *trans* que tienen los dienófilos originales, (Esquema 9), por lo que, la reacción es estereoespecífica.



Esquema 9. Retención de la estereoquímica de los reactivos.

3.1.3.2 Principio cis.

Dicho principio considera que la estereoquímica de los sustituyentes en el dieno y dienófilo se mantiene en el aducto y es aplicable a todos los sustituyentes de ambos reactivos. Por ejemplo, si se hace reaccionar los dos β -cianoacrilatos de metilo (**17**) se obtendrán los dos aductos posibles¹²⁶ (Esquema 10). La adición cis, puede ser explicada por la formación sincrónica de los enlaces entre los dos reactivos en un solo paso de reacción y explica de forma aceptable el porqué los dienos cíclicos reaccionan más fácilmente que los dienos de cadena abierta, pues en los primeros se mantiene siempre la conformación cisoide.¹²⁷

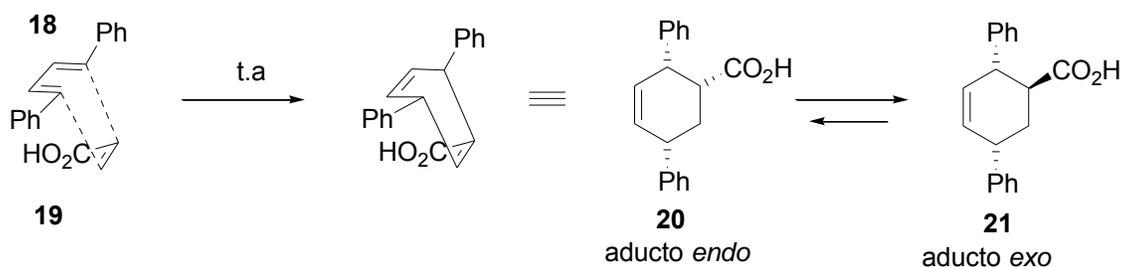


Esquema 10. Obtención de los dos diastereoisómeros.

3.1.3.3 Regla endo de Alder.

La regla *endo* de Alder aplica no sólo para dienos cíclicos sino también para dienos de cadena abierta y para dienófilos mono sustituidos. Inicialmente se considera que una vez que se ha llegado a un acercamiento total de los reactivos que simula un “sándwich”,¹²⁷ el dienófilo se adiciona de tal forma que se produce la máxima acumulación de dobles enlaces en el estado de transición, lo cual no sólo incluye los sistemas π directamente involucrados, sino también el de

los sustituyentes. La regla considera que cuando un dienófilo tiene un enlace π en su grupo electroattractor, los orbitales p de éste se aproximan a los átomos que mantienen la instauración del dieno, originando una interacción de tipo secundario entre los orbitales π del grupo electroattractor con los orbitales p de los carbonos centrales del dieno. Se ha afirmado que esto origina un estado de transición estabilizado con energía menor a la del estado de transición que produce el aducto *exo*.¹²⁸ Por ejemplo, el 1,4-difenilbutadieno **18** y el ácido acrílico **19** reaccionan para generar una proporción de aductos *endo* : *exo* de 9:1, donde el isómero favorecido mantiene los sustituyentes en el ciclohexeno de forma *cis* (**20**). Después de permitir el equilibrio se llega a la obtención del aducto con el grupo carboxilo en forma *trans* respecto a los fenilos (**21**, aducto *exo*). (Esquema 11). La regla *endo* de Alder también se aplica en reacciones de cicloadición de tipo DEI.



Esquema 11. Equilibrio de aductos *endo:exo*

Un ejemplo muy estudiado, es la adición del anhídrido maléico (**22**) al ciclopentadieno (**13**). En este caso existen dos orientaciones posibles de los reactivos, una de ellas da origen al aducto *exo* y otra origina el aducto *endo*; en esta cicloadición el aducto *endo* es el aducto mayoritario en condiciones cinéticas. Éste puede isomerizarse a 220 °C para obtener en el equilibrio una relación 45:55 de aductos *endo/exo*.¹²⁹⁻¹³¹ De esta forma se ha concluido que el aducto *endo* es el producto cinético aún cuando no es el más favorecido desde el punto de vista termodinámico (Figura 52).

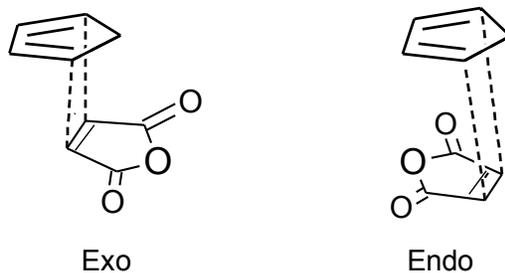


Figura 52. Posibles aproximaciones dieno-dienófilo.

La regla *endo* es solamente violada por las reacciones de furano con dienos cíclicos como el anhídrido maleíco y maleimida. En ambos casos el aducto se transforma por arriba de la temperatura ambiente pasando del producto cinético (*endo*) al producto más estable (*exo*).^{132,133}

3.1.4.4. Teoría de Conservación de la Simetría Orbital.

La preferencia por el aducto *endo* también fue explicada por Woodward y Hoffman¹³⁴ a través de la denominada Teoría de Conservación de la Simetría Orbital, que establece que los orbitales moleculares de los reactivos, deben conducir a los orbitales moleculares de los productos sin cambios drásticos en la simetría. De esta forma habrá interacciones enlazantes que ayuden a estabilizar el estado de transición. Sin dichas interacciones enlazantes en el estado de transición, la reacción pericíclica no se lleva a cabo.¹²⁸ Sin embargo, para dienófilos con enlaces π adicionales u otros orbitales disponibles se observan las interacciones de orbitales secundarios (SOI) con las cuales se favorece el estado de transición *endo*, Figura 53.

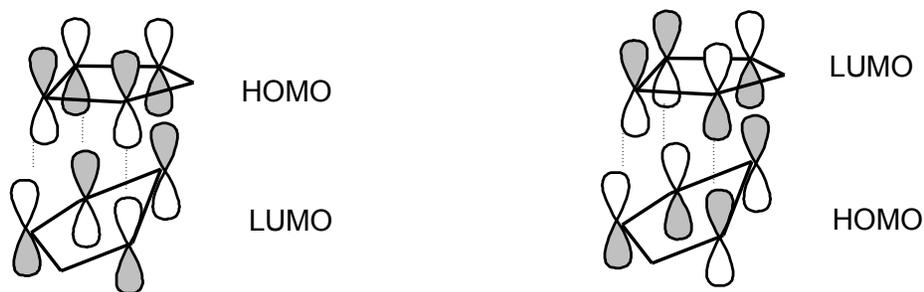
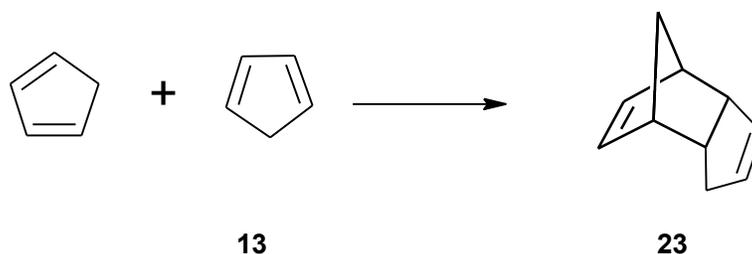


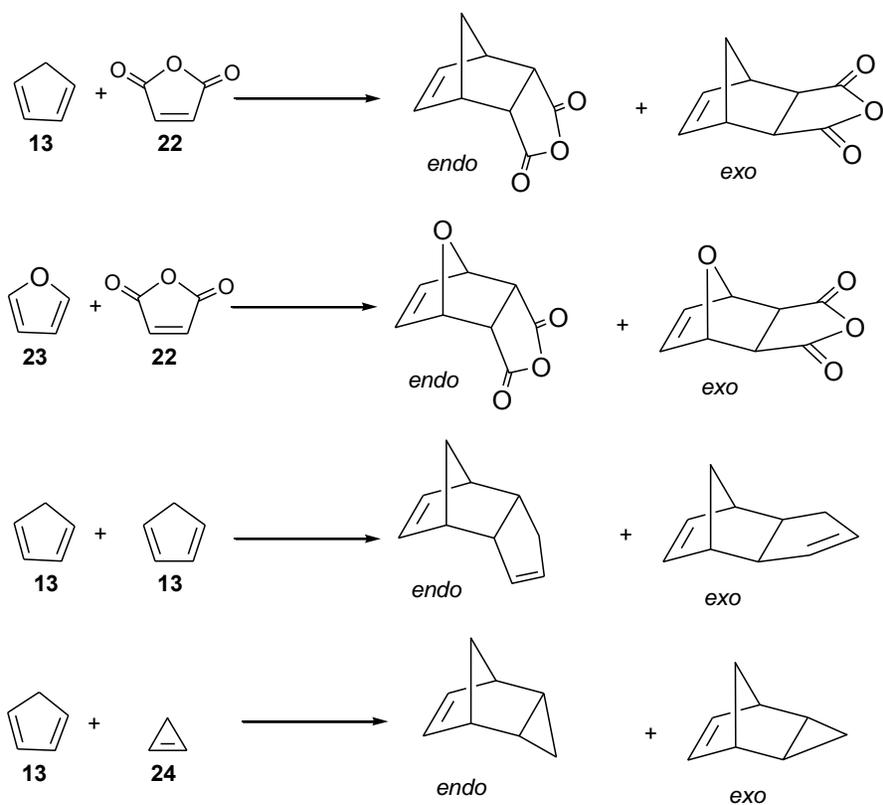
Figura 53. Interacciones de Orbitales Secundarios.

Las interacciones en la Figura 53, se dedujeron cuando se estudiaron reacciones que utilizaban al ciclopentadieno como dieno y como dienófilo para dar lugar a sistemas bicíclicos como el dicitlopentadieno **23** (Esquema 12).¹¹⁸ Esta misma observación la hicieron Caramella y col. quienes identificaron un estado de transición bispericíclico.¹³⁵



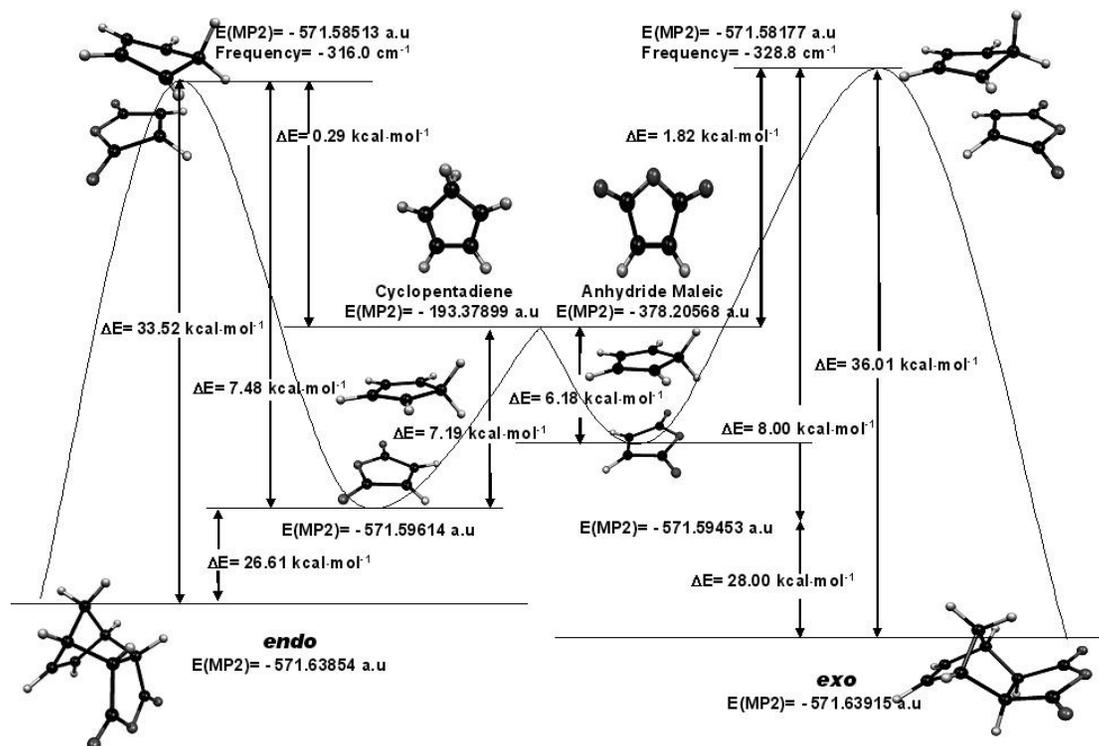
Esquema 12. Reacción de dimerización del ciclopentadieno.

Recientemente,¹³⁶ se estudió la superficie de energía potencial de las siguientes cicloadiciones a) la reacción entre ciclopentadieno (**13**) y anhídrido maléico (**22**), donde es sabido que el aducto *endo* es el aducto mayoritario en condiciones cinéticas.¹²⁹⁻¹³¹ (b) la reacción entre furano (**23**) y anhídrido maléico (**22**) que inicialmente produce el aducto cinético *endo*, el cual puede ser transformado en el aducto termodinámico *exo* al modificar las condiciones de reacción.^{132,137,138} (c) la dimerización del ciclopentadieno. (**13**) Estas tres reacciones fueron estudiadas por Woodward y Hoffmann.^{117,139,140} Además se estudió la cicloadición de ciclopentadieno (**13**) y ciclopropeno (**24**). En las últimas dos reacciones el aducto *endo* es el único que se forma¹⁴¹ (Esquema 13).



Esquema 13. Reacciones cuya superficie de energía potencial fue estudiada.

Los resultados que fueron obtenidos pueden resumirse de forma adecuada con los Esquemas 14 y 15. En todas las cicloadiciones fueron identificados estados estacionarios entre los reactivos y los estados de transición que corresponden a lo que se denomina complejo de van de Waals. Para las tres primeras reacciones fueron identificados un estado estacionario que conduce al ET *endo* y uno al *exo*; para la última reacción sólo fue identificado un solo estado estacionario y esto puede confirmarse ya que experimentalmente el aducto *exo* no ha sido observado.

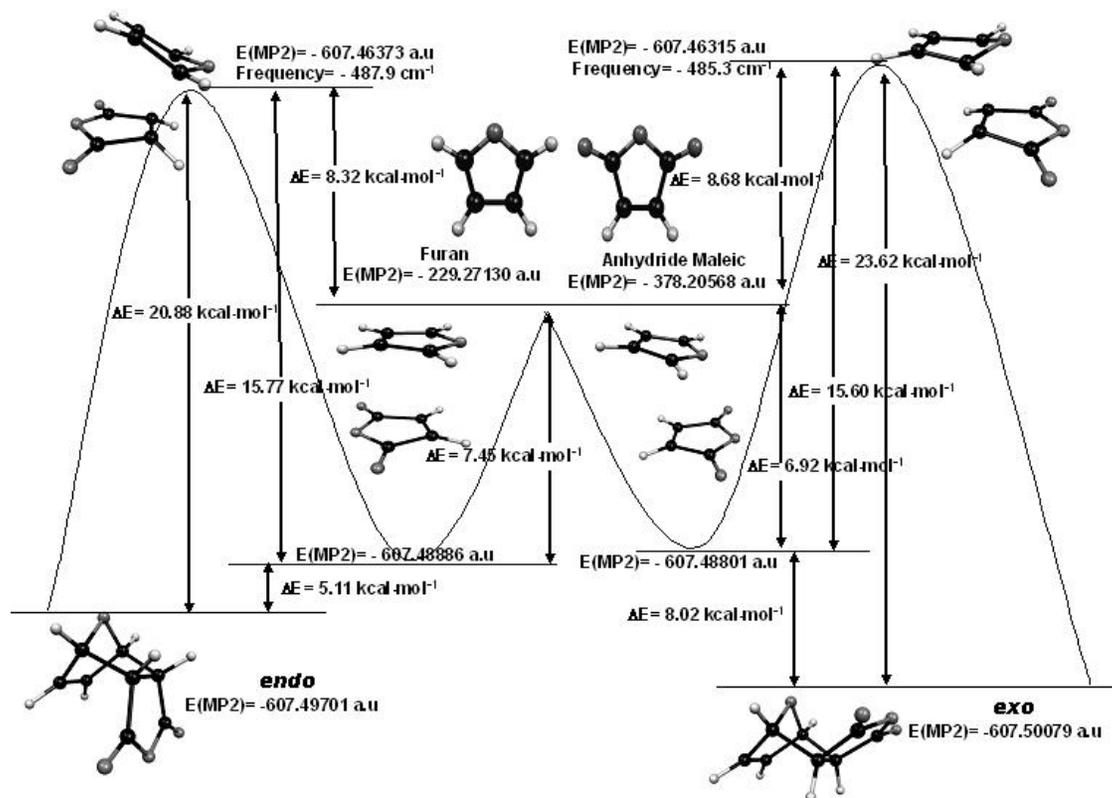


Esquema 14. Superficie de energía potencial de la reacción de ciclopentadieno (**13**) con anhídrido maléico (**22**).

En el Esquema 14, puede observarse la presencia de los dos complejos de van der Waals, dichos complejos conducen al estado de transición y la estabilidad de los complejos está de acuerdo a la estabilidad de los estados de transición, es decir, el complejo que conduce al estado de transición *endo* es más estable que el *exo*. Dicha estabilidad se mantiene hasta la formación de los aductos.

Para el caso de la cicloadición del furano (**23**) al anhídrido maléico (**22**) también se identificaron dos estados estacionarios análogos a los anteriores. Como puede observarse en el Esquema 15, el estado estacionario *endo* es más estable que el *exo* y dicha estabilidad se mantiene en el ET y en el aducto.

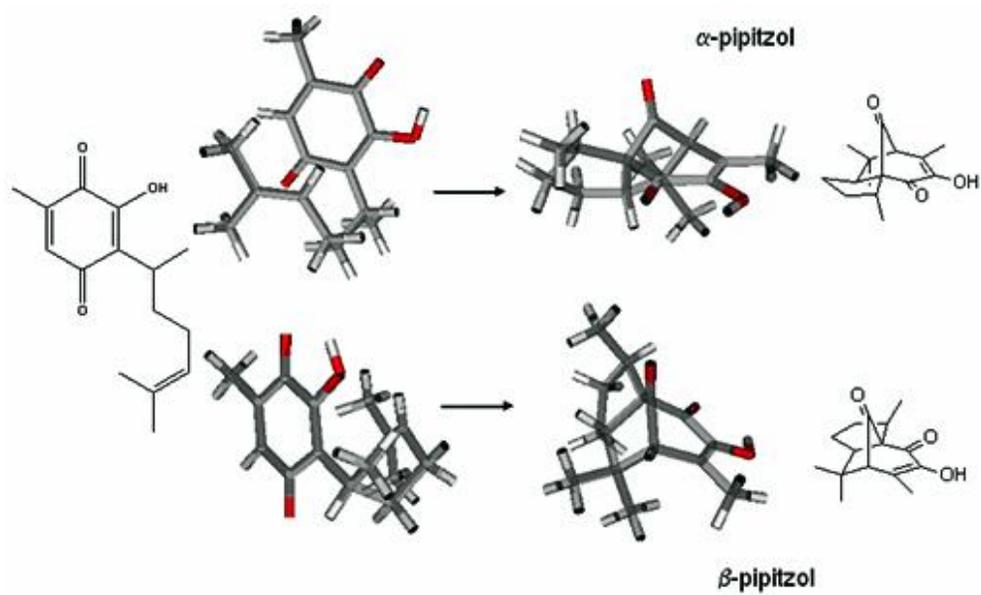
Estos mínimos en la superficie de energía potencial son fundamentales pues garantizan la existencia del estado de transición que debe ser un punto de máxima energía en la trayectoria de reacción.



Esquema 15. Superficie de energía potencial de la reacción de furano (23) con anhídrido maléico (22).

Los Esquemas que representan la superficie de energía potencial para la cicloadiciones de la dimerización del ciclopentadieno (13) y del ciclopentadieno (13) - ciclopropeno (24) se muestran en el apéndice del presente trabajo.

Este tipo de complejos previos al estado de transición, ya habían sido identificados con anterioridad, en un estudio teórico de la cicloadición de etileno y del iluro de azometino.¹⁴² Las pruebas experimentales de este tipo de complejos son aquellas que corresponden a la cicloadición [5+2] que se presenta entre el etileno y el anillo de la 2-(1,5-dimetil-4-hexenil)-3-hidroxi-5-metil-1,4-benzoquinona (perezona) para dar origen a los α y β -pipitzoles¹⁴³⁻¹⁴⁵ (Esquema 16).



Esquema 16. Estructuras de los dos conformeros de la perezona estabilizados por interacciones π/π deducidas a través de datos de RMN.¹⁴⁵

3.2. OBJETIVOS

1. Determinar el origen de la estabilización de los estados estacionarios presentes en la reacción de Diels-Alder.
2. Realizar un estudio comparativo del efecto de la distancia interanular sobre la energía calculada por el método HF y por el método MP2.
3. Establecer la importancia de la existencia de estos complejos en los modelos que pretenden explicar la selectividad de la reacción.

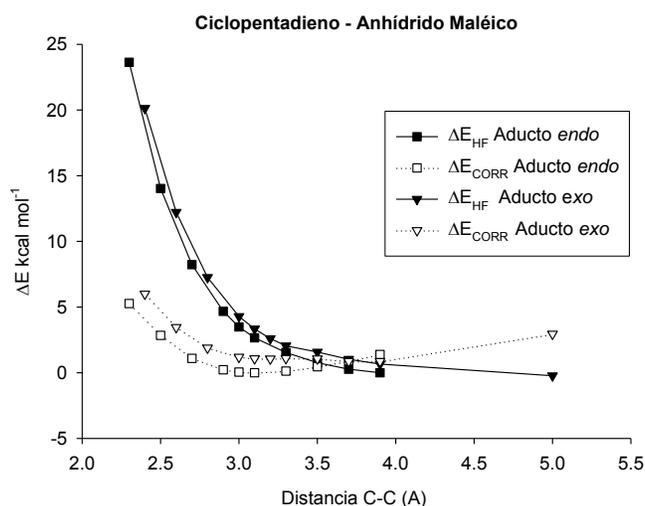
3.3. PARTE COMPUTACIONAL

El estudio de los estados estacionarios asociados a las reacciones fueron estudiados con el nivel de teoría MP2/6-31G(d,p). Todos los valores energéticos fueron corregidos con la energía de punto cero (ZPE) usando factores de escalamiento vibracional calculados a través del procedimiento descrito por Alcolea-Palafox.¹⁴⁶ El valor obtenido fue de 0.9365 para el método MP2/6-31G(d,p). Los cálculos se llevaron a cabo usando el programa Gaussian 03.¹⁴⁷

Las geometrías utilizadas de los estados estacionarios fueron optimizadas incorporando la corrección por superposición de bases (BSSE) descrita por Boys y Bernardi.¹⁴⁸ Para obtener las energías de interacción, se modificó la distancia interanular a través del aumento o disminución de la distancia de los carbonos donde se presentan las interacciones primarias. Posteriormente se graficó por separado la contribución energética de la correlación electrónica y la contribución electrostática de la energía Hartree-Fock.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSION

Como ya se mencionó con anterioridad, para un cálculo MP2, la energía electrónica total tiene dos componentes, la componente de energía Hartree-Fock y la corrección MP2, que corresponde a la energía de correlación. La Gráfica 23 muestra las curvas obtenidas para cada uno de los términos (ΔE_{HF} y ΔE_{CORR}) en función de la distancia intermolecular de los complejos *endo* y *exo*. Los valores de energía correspondientes se presentan en el apéndice del presente trabajo.

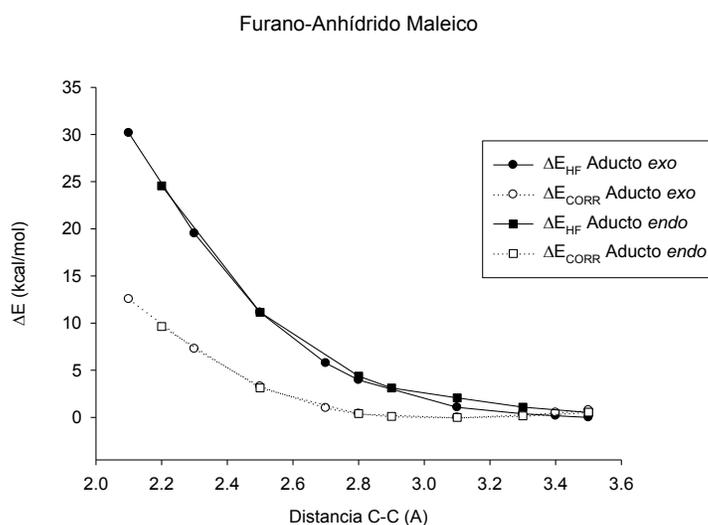


Gráfica 23. Energías de interacción para la cicloadición de ciclopentadieno (13) y anhídrido maléico (22)

En las curvas que se muestran en la Gráfica 23 se encuentran graficadas las energías de interacción a diferentes distancias C-C (para los carbonos involucrados en la formación de los enlaces). En dichas curvas puede observarse que para la aproximación *endo*, el mínimo en la superficie de energía potencial para la curva que corresponde a la energía ΔE_{CORR} se localiza a una distancia de 3.04 Å entre los átomos de carbono responsables de los nuevos enlaces C-C. Para la aproximación *exo* el mínimo se encuentra a una distancia de 3.17 Å. En el caso de la component HF, el mínimo no fue localizado sino hasta 5.0 Å para el complejo *exo* y a 4.0 Å para el *endo*. Si la interacción tuviera únicamente un origen electrostático, los resultados HF deberían de tener una descripción correcta del complejo, es decir, deberían ser capaces de reproducir la profundidad del mínimo a la distancia a la cual ese mínimo existe.

Como puede apreciarse en la Gráfica 23, la incorporación de la energía de correlación, la cual incluye la dispersión, sí reproduce adecuadamente los mínimos en las curvas de la energía de interacción. Sin embargo es destacable que la contribución energética mayoritaria proviene del término HF.

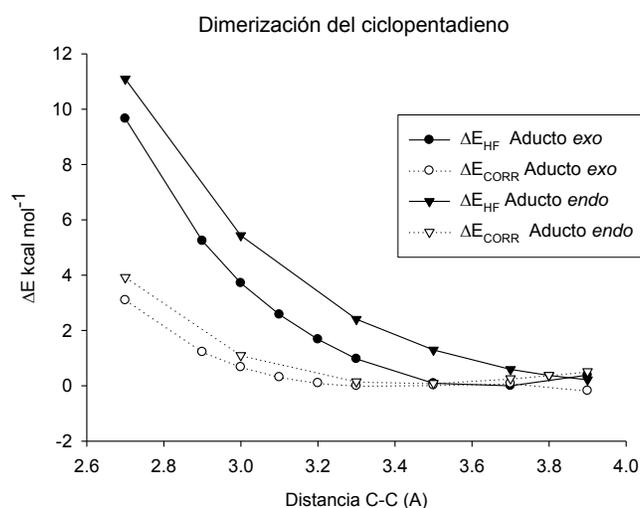
Para el caso de la cicloadición de furano (**23**) y anhídrido maléico (**22**, Gráfica 24) la descomposición de la energía total en la componente HF y el término de correlación permite la evaluación de las contribuciones a mediano y largo alcance. Para la aproximación *endo* el mínimo correspondiente a la curva de energía potencial ΔE_{CORR} se localiza en 3.13 Å, para la aproximación *exo* la distancia es de 3.15 Å. En el caso del componente ΔE_{HF} , el mínimo no se localiza antes de 5.0 Å para la aproximación *endo* y *exo*. Nuevamente se puede concluir que la interacción no tiene solamente un origen electrostático pues no describe correctamente las curvas.



Gráfica 24. Energías de interacción para la cicloadición de furano (**23**) y anhídrido maléico (**22**).

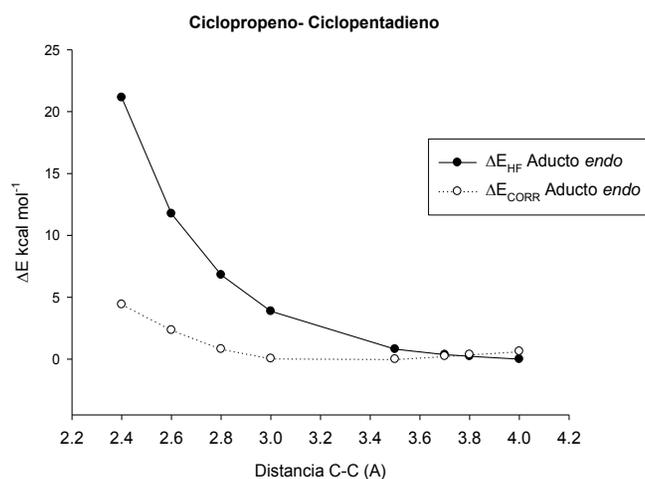
La dimerización del ciclopentadieno (**13**) se presenta en la Gráfica 25. Allí se muestra la energía Hartree-Fock (ΔE_{HF}) y la energía de correlación electrónica (ΔE_{CORR}) como función de la distancia intermolecular. Nuevamente se puede apreciar que es el término MP2 el responsable de la existencia del mínimo, el cual se presenta cuando la distancia C-C es de 3.30 Å para el complejo *exo* y 3.50 Å para el aducto *endo*. Sin embargo, debe ser señalado que el término HF es el que proporciona la mayor contribución a la estabilidad del complejo *exo*, que presenta su mínimo a 3.70 Å. Para el complejo *endo* no se encontró un mínimo antes de 3.90 Å. Un aspecto

destacable y contrastante respecto a los anteriores, es que para este sistema la diferencia energética $\Delta E_{\text{HF}(\text{endo})} \approx \Delta E_{\text{HF}(\text{exo})}$ mientras que para este caso $\Delta E_{\text{HF}(\text{endo})} > \Delta E_{\text{HF}(\text{exo})}$. (Gráfica 25).



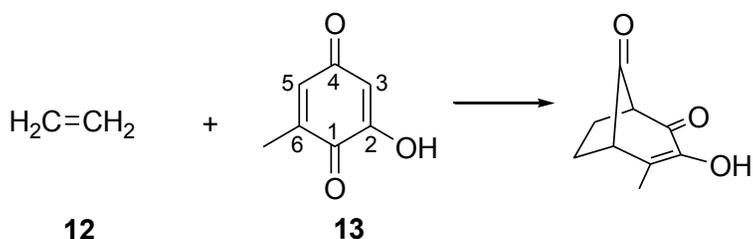
Gráfica 25. Energías de interacción para la dimerización del ciclopentadieno (13).

Como ya se había mencionado, para la reacción entre ciclopentadieno (13) y ciclopropeno (24), sólo se identificó uno de los mínimos, el correspondiente a la aproximación *endo*, dicho mínimo también se encuentra estabilizado por interacciones π/π y la formación de dicho aducto puede ser atribuida a la diferencia energética en los estados de transición la cual es de 4.7 kcal/mol en favor de la geometría *endo*. En lo concerniente a los mínimos localizados, nuevamente la curva de ΔE_{CORR} describe correctamente el mínimo a una distancia de 3.00 Å mientras que para ΔE_{HF} el mínimo no se observa antes de 4.00 Å (Gráfica 26).



Gráfica 26. Energías de interacción para la cicloadición de ciclopentadieno (13) y ciclopropeno (24).

Las observaciones hechas a los complejos Diels-Alder mencionados anteriormente se puede comparar con lo que ya se había observado experimentalmente, para ello, se decidió estudiar la cicloadición [5+2] entre el etileno (**11**) y la 2-hidroxi-6-metil-1,4-benzoquinona (**25**) (Esquema 17), el cual se escogió como sistema análogo a la cicloadición intramolecular de la perezona.¹⁴³ En la superficie de energía potencial se puede apreciar la formación de la supramolécula (**27**) que se muestra en la Figura 54. La distancia C3-C_{etileno} es de 3.54 Å, y C5-C_{etileno} de 3.41 Å. La diferencia en las distancias puede ser atribuida a que C5 es más electrofílico debido a la presencia del puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo hidroxilo en C2 y el grupo carbonilo de la posición C1. La energía de interacción de dicho complejo a nivel MP2/6-31G(d,p) es de -2.56 kcal/mol.



Esquema 17. Cicloadición [$5\pi + 2\pi$] entre etileno (**11**) y 2-hidroxi-6-metil-1,4-benzoquinona (**25**).

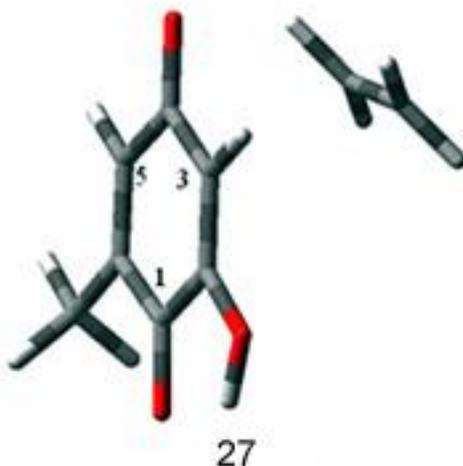
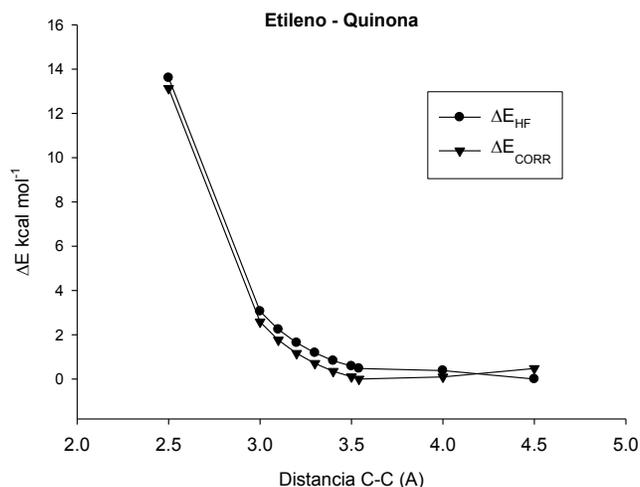


Figura 54. Supramolécula, **27**, formada previa al ET de la cicloadición [5+2].

Nuevamente se graficaron los valores ΔE_{HF} y ΔE_{CORR} y como en los casos anteriores la energía de correlación es nuevamente la responsable del mínimo observado con una distancia de 3.54 Å

entre C3 y C_{etileno}. Por el contrario la componente HF no permite encontrar un mínimo antes de 4.5 Å, por lo que nuevamente puede confirmarse que la energía de correlación es la que describe correctamente el mínimo observado, Gráfica 27.



Gráfica 27. Energía de interacción en la cicloadición de etileno (**11**) y 2-hidroxi-6-metil-1,4-benzoquinona (**25**) variando la distancia C3-C_{etileno}.

3.5. CONCLUSIONES

Es importante considerar la existencia de las supramoléculas observadas en la superficie de energía potencial de las cicloadiciones aquí estudiadas, ya que éstas permiten una mejor comprensión de la evolución de la reacción. También explica el hecho de que los estados de transición tengan en algunos casos menor energía que la suma de la energía de dieno y dienófilo. El estado de transición debe ser un máximo en la trayectoria de reacción, por lo que la existencia del complejo garantiza su existencia.

La existencia de dichas supramoléculas hace que la propuesta de las SOI sea cuestionable, ya que al existir dichas moléculas la idea original de que los reactivos mantienen sus propiedades individuales hasta llegar al ET es imposible, pues al momento de existir una supramolécula existe

un solo conjunto de orbitales moleculares, es decir un solo HOMO y un solo LUMO, y no un HOMO y un LUMO individuales.

La energía de dispersión debe ser considerada en la evaluación de la estabilidad de los complejos, ya que como se observó el método MP2 describe correctamente los mínimos observados y éste incluye la energía de dispersión. En todas las cicloadiciones observadas se confirmó que el aducto *endo* es más estable que el *exo*, lo que de acuerdo a la presencia de las interacciones π/π concuerda con la regla endo de Alder.¹²⁷

Finalmente los funcionales de la densidad que carecen del término de dispersión, que son entre otros los funcionales puros, no pueden ser empleados en estos estudios. Los funcionales útiles deben ser parametrizados para incluir la interacción *exprofeso*.

CAPITULO 4

“Interacción CH/*n* (CH \cdots OP)”

4.1 INTRODUCCION

Como ya se ha hecho énfasis a lo largo del presente trabajo, el estudio de las interacciones débiles resulta complejo debido a la poca energía involucrada en las mismas. Actualmente se llevan a cabo muchos esfuerzos para poder caracterizarlas completamente. Sin embargo, es claro, que el que no exista un enlace covalente formal no implica que dichas interacciones no estén presentes. Una manera de confirmar esto, es la diversidad de formas que existen para definir las gráficamente, por ejemplo es bien aceptado que el producto de la dimerización del helio (He), puede ser representada de las siguientes formas: He—He (guión largo), He \cdots He (tres puntos), He₂ o bien (He)₂. Cada manera de escribirlas invoca un fenómeno físico diferente, lo que lleva a cuestionar el hecho de que si existen tantas formas de representarlas es claro que existen muchas formas de estudiarlas y por lo tanto cada autor apoya su metodología como la que mejor explica el fenómeno. Sin embargo en muchas ocasiones es evidente que los criterios para la publicación de los resultados exigen criterios rigurosos al momento de la evaluación de la metodología utilizada para estudiar las interacciones débiles.

Por ejemplo, la teoría de Átomos en Moléculas (AIM)¹⁴⁹ desarrollada por el profesor Richard Bader basada en el análisis de la topología de la densidad electrónica, establece como condiciones para que una interacción exista, la presencia de una trayectoria de enlace (bond path) y un punto crítico de enlace (bond critical point) (Figura 55), dado que esta teoría realiza un análisis de la densidad electrónica, la existencia de los dos criterios anteriores se refiere a la acumulación de densidad electrónica entre esos átomos; esto debería ser suficiente para considerar la interacción. Sin embargo, los autores que no concuerdan con los fundamentos de dicha teoría, simplemente asumen que son artefactos generados por la simetría.

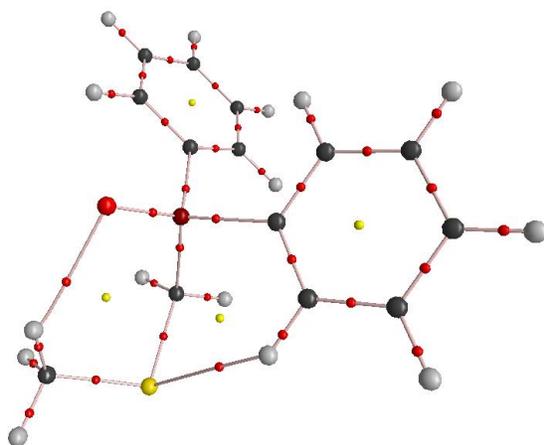


Figura 55. Puntos Críticos en la topología de la densidad electrónica de acuerdo a la Teoría de Átomos en Moléculas.

Otro criterio que ha sido usado y que actualmente se cuestiona es la distancia interatómica. Se considera que si ésta es menor que la suma de los radios de van der Waals de los átomos en cuestión, existe una interacción entre los mismos. Este fue uno de los modelos propuestos para considerar que los átomos de hidrógeno de las posiciones 4 y 6 *syn* diaxiales interactuaban con el átomo de oxígeno del grupo difenilfosfinoilo en el 1,3-ditiano¹⁵⁰⁻¹⁵² **28** y originaban la preferencia conformacional por la posición axial (Figura 56).

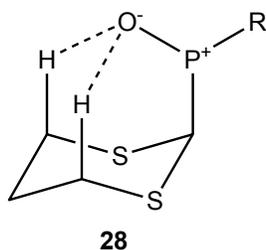


Figura 56. Interacción de los átomos de hidrógeno con el átomo de oxígeno en el 2-difenilfosfinoil-1,3-ditiano (**28**).

Dado que estos criterios que confirman la existencia de una interacción débil del tipo $\text{CH}\cdots\text{OP}$ son cuestionables, recientemente se sintetizó una serie de compuestos:¹⁵³ difenilfosfinoil(metilsulfanil)metano (**29**), difenilfosfinoil(metilsulfinil)metano (**30**), difenilfosfinoil(metilsulfonil)metano (**31**) con el objeto de establecer si existe o no interacción entre los átomos de hidrógeno adyacentes al átomo de azufre y el oxígeno del grupo difenilfosfinoilo (Figura 57). En este trabajo se llevó a cabo también un estudio teórico de los

mismos compuestos. El estudio teórico consistió en el uso del análisis de orbitales naturales (NBO) y el uso de AIM, ambos resultados confirmaron la existencia de la interacción entre los átomos de hidrógeno y el átomo de oxígeno. El objetivo de usar esta serie de compuestos, radicó en la posibilidad de oxidar el átomo de azufre. Esto modifica la acidez de los átomos de hidrógeno involucrados en la interacción y con ello se favorecería la interacción CH/ n (CH \cdots OP).

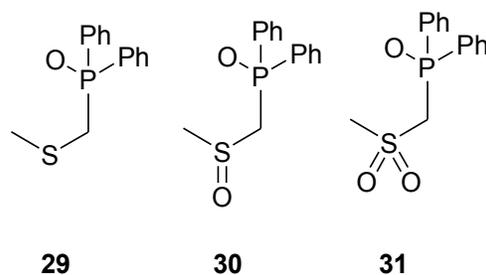


Figura 57. Serie de compuestos sintetizados donde se modifica la acidez de los átomos de hidrógeno del grupo metilo.

Por otro lado, la barrera rotacional ha sido definida como la energía potencial entre dos mínimos conformacionales, tras la rotación de algún grupo sobre un enlace en función de un ángulo de torsión.¹⁵⁴

Las barreras rotacionales se han estudiado empleando RMN,^{155,156} ya que a través de esta técnica espectroscópica se pueden determinar los tiempos de relajación de una molécula. Dichos tiempo de relajación dependen en gran parte del movimiento que tenga la molécula en solución, por lo que son una herramienta útil para obtener información cinética de las propias moléculas. En un principio, las barreras rotacionales se determinaron en función del tiempo de relajación (T1) de los átomos de ^1H . Posteriormente se ha preferido la determinación del tiempo de relajación de los átomos de ^{13}C , ya que éste permite obtener información del movimiento global de la molécula en solución así como de movimientos internos.¹⁵⁷

La idea se fundamenta en el hecho de que la existencia de la interacción produce un aumento en la magnitud de la barrera rotacional. Esto permite establecer una metodología adecuada para medir y establecer la existencia de interacciones débiles.

4.1.1 Relajación del espín nuclear

Cuando se aplica un pulso de radiofrecuencia a un sistema de espines, el equilibrio en el que se encuentran éstos se perturba. Transcurrido un tiempo, la energía adquirida por los espines tras el pulso debe disiparse. El tiempo que requiere este proceso es de algunos segundos o incluso algunos minutos. La existencia de tiempos de relajación tan grandes, permiten convertirlos en una herramienta analítica útil.

Uno de los métodos de *relajación* es *longitudinal*, esto es, una vez que se ha perturbado el estado de equilibrio, la recuperación del vector de magnetización macroscópica a lo largo del eje z (de allí su nombre longitudinal) permite la emisión de energía por parte de los espines. La pérdida de energía se manifiesta como calor transferido al medio, sin embargo los cambios de temperatura son indetectables. Este proceso ha sido llamada tiempo de relajación T1 o *spin-lattice*.¹⁵⁸

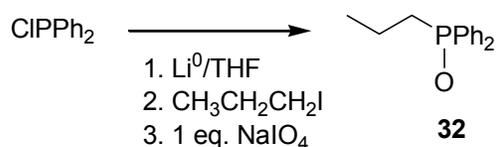
Otra forma de recuperación del equilibrio es la *relajación transversal*, ésta consiste en que una vez que se ha aplicado el pulso de radiofrecuencia, habrá espines que presenten la misma frecuencia que el pulso aplicado, otros que presentarán una frecuencia mayor y otros menor, respecto al campo externo (B_0); esto produce que los vectores individuales que componen el vector de magnetización macroscópica se disipe en múltiples vectores que eliminan la existencia de magnetización neta en el plano transversal. A este tipo de relajación se le conoce como T2.¹⁵⁸

4.2. OBJETIVOS

1. Sintetizar el difenilfosfinoil-*n*-propano, compuesto que el carecer del átomo de azufre puede considerarse como referencia para evaluar los cambios conformacionales.
2. Determinar la barrera rotacional del grupo metilo para la serie: sulfuro, sulfóxido, sulfona, *n*-propano como prueba de la existencia de la interacción CH \cdots OP

4.3 RESULTADOS Y DISCUSION.

El compuesto difenilfosfinoil-*n*-propano (**32**), fue sintetizado de forma análoga a los compuestos azufrados,¹⁵³ con lo cual se obtuvo un sólido cristalino de color amarillo con un rendimiento del 86%, (Esquema 18).



Esquema 18. Síntesis del compuesto difenilfosfinoil-*n*-propano.

Del estudio obtenido por difracción de rayos X del compuesto **32** (Figura 58) puede observarse que la conformación del propilo es *gauche, gauche* en los segmentos CCCP y CCP(O) lo cual confirma que la conformación en el estado sólido es *gauche*, es decir sí existe la interacción $\text{CH}\cdots\text{OP}$.

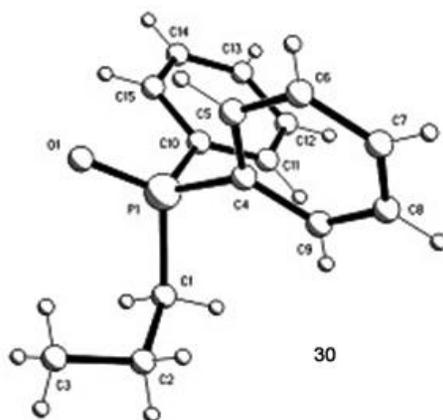


Figura 58. Conformación en el estado sólido de **32**.

Con el grupo alquilo sintetizado se completó la serie de compuestos sulfuro (**29**), sulfóxido (**30**), sulfona (**31**) e hidrocarburo (**32**), de los compuestos **30** y **31** también se pudo obtener la estructura por difracción de rayos X.¹⁵³ En la Figura 59 se muestra la conformación de los tres compuestos en estado sólido; como puede apreciarse, el compuesto **30** tiene dos conformeros en la celda unitaria, sin embargo al igual que **32**, los tres compuestos presentan una conformación *gauche*,

gauche en los segmentos CCCP y CCP(O) por lo cual es importante establecer la conformación en solución para compararla con la del estado sólido.

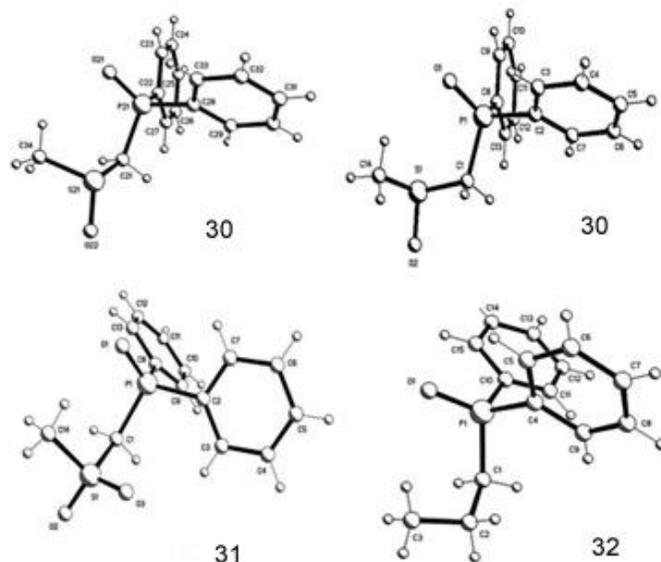


Figura 59. Conformación en el estado sólido de **30**, **31** y **32**.

Para confirmar la existencia o ausencia de la interacción CH/*n* (CH \cdots OP) y de esta forma corroborar que la conformación en solución es la misma que en el estado sólido, se decidió determinar la barrera rotacional del grupo metilo, de esta forma, se sabe que en ausencia de interacción el grupo metilo giraría libremente, por el contrario, si los átomos de hidrógeno del metilo están interaccionando con el átomo de oxígeno el giro se vería restringido y podría obtenerse un valor de la energía involucrada en el giro del grupo metilo. En los compuestos azufrados sintetizados, la acidez de los átomos de hidrógeno aumenta conforme aumenta el grado de oxidación del átomo de azufre, por lo cual si sólo opera este factor se espera tener un valor de barrera rotacional: metileno < sulfuro < sulfóxido < sulfona.

Como primera consideración, se obtuvo el TI de los carbonos de la molécula con el objetivo de determinar cuál era el carbono más rígido y con menos posibilidades de giro, los valores obtenidos de T1 para el metilo y el metileno se encuentran en la Tabla 21. De esta forma se asignó el metileno como el carbono perteneciente al segmento más rígido. Un ejemplo de la determinación de los T1 para los átomos de carbono del compuesto **32** se muestra en la Figura 60.

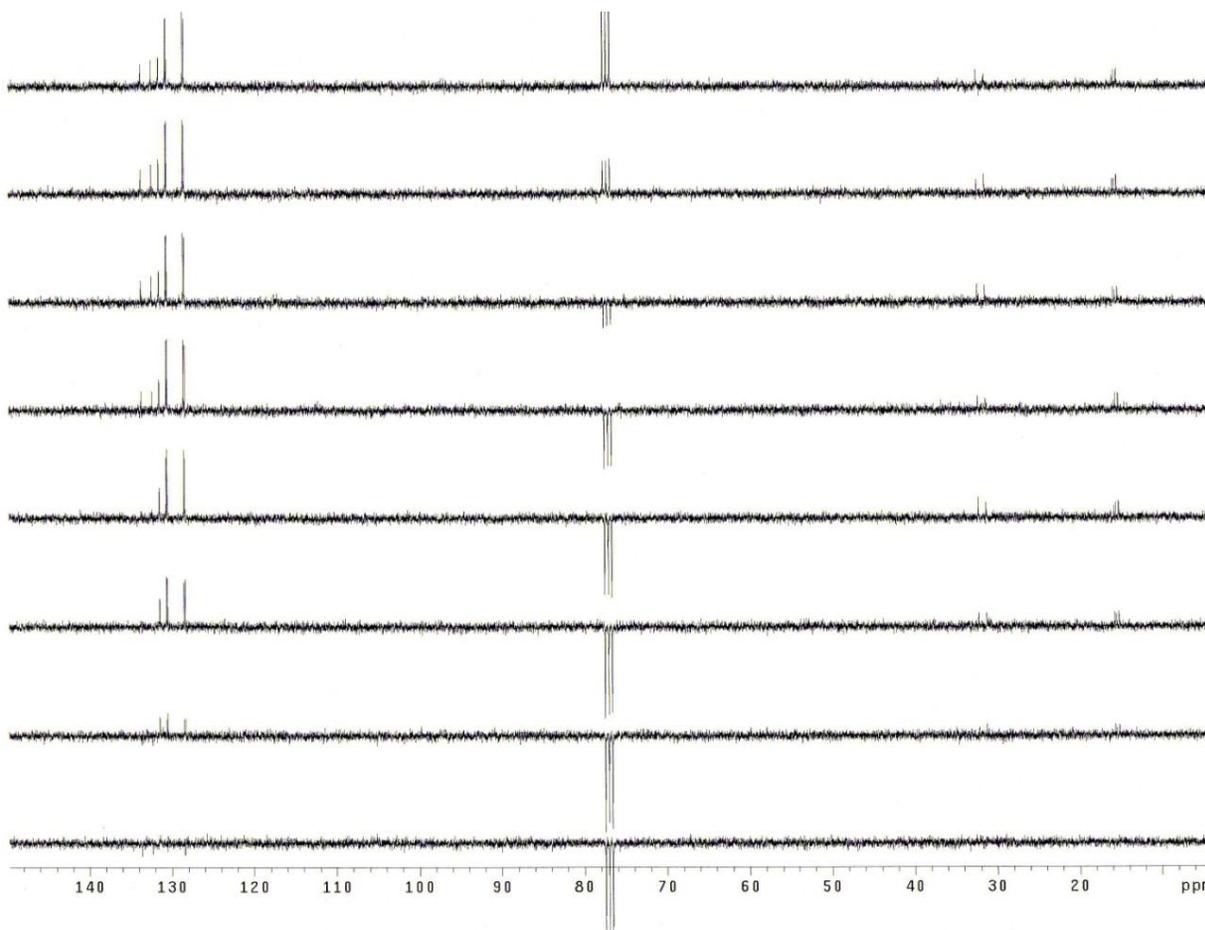


Figura 60. Determinación de los espectros de T1 para el compuesto **32**.

Tabla 21. Valores de T1 para los carbonos representativos de los compuestos **29**, **30**, **31** y **32**.

	29	30	31	32
CH ₃	4.68	1.00	1.6	2.48
CH ₂	1.25	0.49	0.79	1.10
C _{ortho}	3.70	1.45	2.63	2.74
C _{meta}	3.68	1.55	2.66	2.65
C _{para}	1.94	0.77	1.36	1.48

La contribución dipolar-dipolar (T_{1DDCH_2}) al tiempo de relajación *spin-lattice* del carbono del metileno, fue calculada a partir de las determinaciones de NOE considerando sólo la interacción

^1H y ^{13}C . El efecto del acoplamiento $^{31}\text{P} - ^{13}\text{C}$ se consideró igual para los tres compuestos y se empleó la Ecuación 16 para calcular el tiempo de relajación dipolar:

$$T_{1DDCH_2} = \frac{\gamma_H T_{1CH_2}}{2\gamma_C \eta_{CH_2}} \quad \text{Ecuación 16}$$

Se consideró que las moléculas **29-32** se comportaban como elipsoides con un movimiento isotrópico. Grant *et. al*¹⁵⁹ ampliaron la expresión clásica de Woessner¹⁵⁶ para el cálculo del coeficiente global de difusión de moléculas usando el tiempo de relajación de un carbono unido a un núcleo diferente de ^1H . En este caso, el grupo metileno se encuentra unido a un átomo de fósforo y a dos hidrógenos, por lo que el coeficiente global de difusión (D) se calculó a través de la Ecuación 17.

$$\frac{1}{T_{1DDCH_2}} = \left((2\gamma_C^2 \gamma_H^2 \hbar^2 r_{CH}^{-6}) + (\gamma_C^2 \gamma_P^2 \hbar^2 r_{CP}^{-6}) \right) \left[\frac{1}{6D} \right] \quad \text{Ecuación 17}$$

Se calculó el coeficiente de difusión interna del grupo metilo (D1) usando los modelos estocástico y por saltos, a través de la Ecuación 18. Las constantes de esta ecuación fueron tomadas de Keepers *et al.*¹⁶⁰ y se considera $n = 3$.

$$\frac{1}{T_{1CH_3}} = n\gamma_C^2 \gamma_H^2 \hbar^2 r_{CH}^{-6} \left[\frac{1}{2} \left(\frac{A_1}{6D} + \frac{A_2}{6D + aDi} + \frac{A_3}{6D + amDi} + \frac{B_1}{6D} + \frac{B_2}{6D + aDi} + \frac{B_3}{6D + amDi} + \frac{C_1}{6D} + \frac{C_2}{6D + aDi} + \frac{C_3}{6D + amDi} \right) \right]$$

Ecuación 18

$$\begin{aligned} A_1 &= 1/8(1 - 3\cos^2\alpha)^2(3\cos^2\Delta - 1)^2 \\ A_2 &= 9/16\text{sen}^2 2\alpha \text{sen}^2 2\Delta \\ A_3 &= 9/16\text{sen}^4 \Delta \text{sen}^4 \alpha \\ B_1 &= 3/8\text{sen}^2 2\alpha(3\cos^2\Delta - 1)^2 \\ B_2 &= 3/4(\cos^2 2\alpha + \cos^2 \alpha)\text{sen}^2 2\Delta \\ B_3 &= 3/4(\text{sen}^2 \alpha + 1/4\text{sen}^2 2\alpha)\text{sen}^4 \Delta \\ C_1 &= 3/8\text{sen}^4 \alpha(3\cos^2\Delta - 1)^2 \\ C_2 &= 3/4(\text{sen}^2 \alpha + 1/4\text{sen}^2 2\alpha)\text{sen}^2 2\Delta \\ C_3 &= 3/16[(1 + \cos^2\alpha)^2 + 4\cos^2\alpha]\text{sen}^4 \Delta \end{aligned}$$

Otra consideración fue que se asumió que las moléculas aquí estudiadas se comportan como elipsoides con un movimiento isotrópico, ya que eso permite hacer menos consideraciones en los valores de la barrera rotacional. Los elipsoides moleculares fueron considerados con un eje principal de rotación que coincide el enlace C-P; presentan en promedio un ángulo α de 60° entre el eje principal de rotación y el vector C-H.¹⁶¹ Se observó que los valores de la barrera rotacional eran poco sensible a cambios en el valor del ángulo α . El ángulo Δ entre el eje principal de rotación del grupo metilo y el vector C-H se consideró con un valor de 109.5° . Para el sulfuro (**29**) el ángulo Δ es de 110° y se obtuvo con un cálculo a nivel MP2/6-31G(d,p). A este nivel de teoría, el enlace C-H (r_{CH}) para los grupos metilo tiene un valor entre 1.085 y 1.089 Å, por lo que el valor usado fue 1.09 Å para todos los compuestos, dado que se ha observado que la barrera rotacional no se ve muy alterada con el valor r_{CH} .

Por último la barrera rotacional V_0 se calculó a partir de una ecuación tipo Arrhenius (Ecuación 19):

$$D_i = D_{i_0} \exp(-V_0 / RT) \quad \text{Ecuación 19}$$

Donde D_{i_0} es $(kT/I)^{1/2}$, I es el momento de inercia del grupo metilo. De esta forma se obtuvieron los siguientes valores de barrera rotacional expresados en kcal/mol, Tabla 22.

Tabla 22. Valores de las barreras rotacionales para el grupo metilo de los compuestos **29-32** (kcal/mol).

Compuesto.	Barrera Rotacional ^[a]	Barrera Rotacional ^[b]
29	1.76	1.60
30	3.10	2.91
31	3.03	2.84
32	2.90	2.71

[a] Cuando se considera un modelo estocástico. [b] Considerando una rotación por saltos.¹⁶²

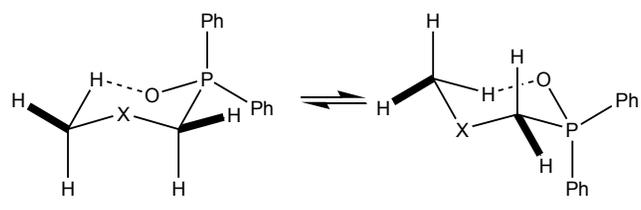
Como puede observarse el compuesto **29** tiene el menor valor de las barreras, esto puede atribuirse a que los átomos de hidrógeno no están muy polarizados; la distancia C-S es la más grande de todas sobre todo por encima de la distancia C-C del compuesto **32** que es de 1.5 Å,

además de que el volumen estérico aumenta conforme se incrementa el nivel de oxidación del átomo de azufre. Además de la acidez, la geometría es importante.

Por otro lado, la barrera más grande de los compuestos azufrados es el sulfóxido **30**, seguida de la sulfona **31**. El compuesto **32** tiene un valor de barrera que se encuentra entre los dos primeros valores, sin embargo no es el mayor de todos, este resultado no es muy claro, sin embargo un factor importante es el volumen del átomo de azufre y las distancias de enlace, como ya se había mencionado.

Estas barreras prueban la existencia de la interacción, pero además la existencia de la interacción CH/*n* (CH \cdots OP) es sustentada por las observaciones en los espectros ^1H de RMN de estos compuestos. Al adquirir dichos espectros utilizando como disolvente CDCl_3 , el compuesto **29** presenta una señal simple en 2.22 ppm y una señal doble con una $^2\text{J}_{\text{H-P}} = 13$ Hz. (Figura 61). El giro libre del grupo metilo permite observar en el espectro un promedio de las constantes de acoplamiento. Esto concuerda con la barrera baja.

Por el contrario, el compuesto **30** tiene tres señales, una señal doble para el grupo metilo (2.97 ppm, $^4\text{J}_{\text{H-H}} = 0.5$ Hz), y dos señales diferentes para cada uno de los átomos de hidrógeno diasterotópicos del grupo metileno, un doble de dobles (dd) en 3.78 ppm, $^2\text{J}_{\text{H-H}} = 14$ Hz, $^2\text{J}_{\text{H-P}} = 11$ Hz y un ddd en 3.88 ppm, $^2\text{J}_{\text{H-H}} = 14$ Hz, $^2\text{J}_{\text{H-P}} = 8$ Hz, $^4\text{J}_{\text{H-H}} = 0.5$ Hz. Este último acoplamiento no es usual en este tipo de átomos de hidrógeno. Entonces es importante señalar que si la barrera rotacional existe, el giro del grupo metilo se ve restringido por la interacción CH/*n* (CH \cdots OP) y entonces puede generarse un anillo de seis miembros. De esta forma el grupo metilo y el metileno separados por el átomo de azufre tiene un acoplamiento adicional, un acoplamiento $^4\text{J}_{\text{H-H}}$ o en W. (Esquema 19). La sulfona (**31**) presenta dos señales con acoplamientos extras que pueden ser interpretados como un doble de cuartetos para el metileno ($^2\text{J}_{\text{H-P}} = 9$ Hz, $^4\text{J}_{\text{H-H}} = 0.75$ Hz) y una señal triple para el metilo ($^4\text{J}_{\text{H-H}} = 0.75$ Hz). Finalmente, estos acoplamientos adicionales pueden ser también observados para el compuesto (**32**), donde el grupo metilo presenta una señal con dos acoplamientos, una $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 12$ Hz y otra $^4\text{J}_{\text{H-H}} = 1.5$ Hz.



Esquema 19. Origen de los acoplamiento extras observados en el espectro de RMN de ^1H de los compuestos **29-32**.

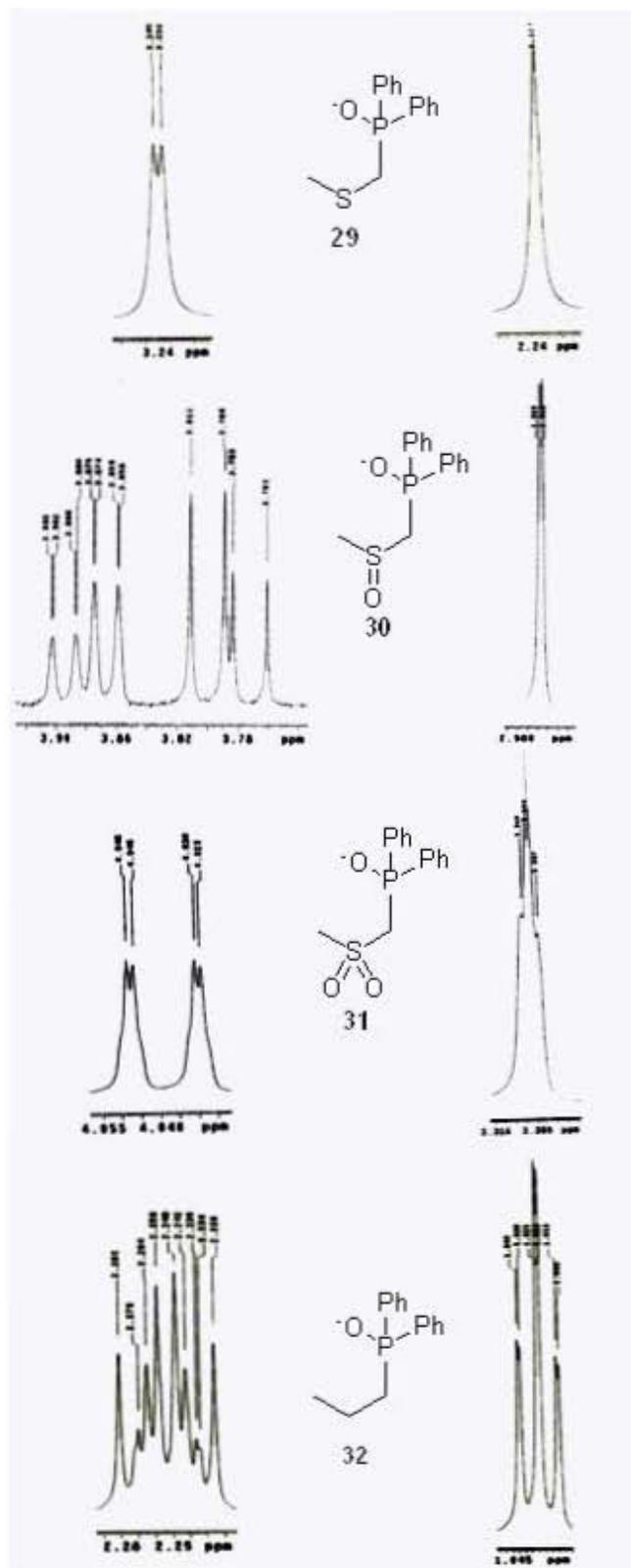


Figura 61. Señales de ^1H NMR para el grupo metilo y metileno de los compuestos 26-32.

4.4 CONCLUSIONES

Se demuestra la existencia de la interacción CH/*n* en solución a través de la determinación experimental de la rotación de los grupos metilo en el segmento H₃CSC para la serie sulfuro (**29**), sulfóxido (**30**), y sulfona (**31**) con valores de 1.60, 2.91 y 2.84 kcal/mol respectivamente. La existencia de dicha interacción genera un anillo de seis miembros que en una conformación de silla mantiene la disposición correcta para observar acoplamientos ⁴J_{H-H} entre el grupo metilo y el grupo metileno en la posición α del átomo de azufre a través de un arreglo en W. En el estado sólido se observa la misma conformación que en solución.

Los resultados de estas barreras rotacionales, muestran la importancia de las interacciones intramoleculares en la preferencia conformacional. La interacción CH/*n* (CH...OP) confirmada a través de la barrera rotacional es mayor conforme se incrementa el estado de oxidación del átomo de azufre, pues se incrementa la acidez de los átomos de hidrógeno del grupo metilo y con ello su polarización.

También puede concluirse que el efecto anomérico generalizado en el segmento S-C-P(O) no existe, debido a que el alcano muestra la misma preferencia conformacional que los análogos heterosustituidos, además de presentar una barrera rotacional del grupo metilo de 2.71 kcal/mol.

4.5 PARTE EXPERIMENTAL

Los aspectos generales se describen en el Capítulo 2.

El tetrahidrofurano (THF) se secó utilizando sodio metálico (Na) y benzofenona como indicador, manteniéndose en agitación y reflujo en atmósfera inerte hasta obtener un color azul intenso y destilándose previo uso.

El litio fue cortado y limpiado con hexano para eliminar los restos de aceite mineral y rápidamente se introdujo en el matraz de reacción.

4.5.1 Síntesis de los compuestos de interés.

La síntesis del difenilfosfuro de litio se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Luther III y col.,¹⁶³ En un matraz de dos bocas provisto de agitación magnética, se colocaron 10 mL de THF seco vía cánula mediante presión positiva, utilizando nitrógeno gas. A dicho matraz se adicionó con rapidez aproximadamente 80 mg de litio metálico, utilizando una corriente continua de nitrógeno seco. Se adicionaron 2.28 mL (10.36 mmol, 1 eq.) de cloruro de difenilfosfina con una jeringa. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación en un baño de hielo. Después de 10 minutos de haber realizado la adición, la mezcla de reacción adquiere un color rojo; una vez que se adquiere este color, se deja en agitación 1 h más.

Para llevar a cabo la síntesis del difenilfosfinoíl-*n*-propano (**32**), el difenilfosfuro de litio descrito en el paso anterior se transfirió vía cánula usando presión positiva con nitrógeno, a una solución de 1 g (10.36 mmol, 1 eq.) de yodopropano en 10 mL de THF. Después de haber realizado la adición, la mezcla de reacción se agita durante 1 h. Transcurrido el tiempo de reacción se adiciona gota a gota 2.21 g. (10.36 mmol, 1 eq.) de una solución acuosa de NaIO₄. Una vez que la adición concluye, la solución se filtra y se elimina el disolvente en un rotavapor casi hasta sequedad. El residuo se extrae con CH₂Cl₂. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y se elimina el disolvente al vacío. El producto se purificó usando cromatografía flash en columna, empleando como soporte sílica gel y como eluyente acetato de etilo. El producto fue cristalizado empleando una mezcla de disolventes hexano-acetato de etilo.

4.5.2 Estudios de RMN.

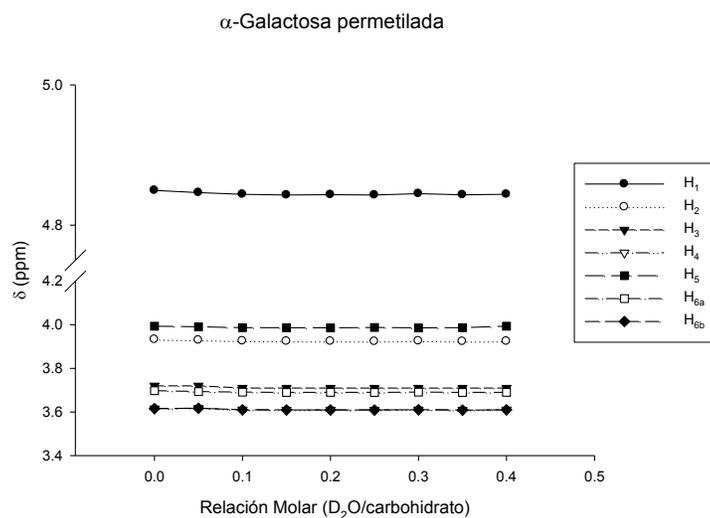
Los experimentos de RMN para la determinación de las barreras rotacionales se llevaron a cabo en un espectrómetro Varian Unity de 300 MHz, manteniendo la temperatura controlada 298 K (\pm 1K). Las muestras se prepararon de la siguiente forma, se colocaron en el tubo de RMN 0.5 mL de una solución 0.1 M del compuesto problema, la muestra se degasificó en todos los casos durante 10 minutos burbujeando nitrógeno.

El primer estudio que se llevó a cabo fue la determinación del tiempo de relajación spin-lattice (T1) y el incremento debido al efecto nuclear de Overhauser de acuerdo a la técnica descrita por Klünery col.¹⁶⁴

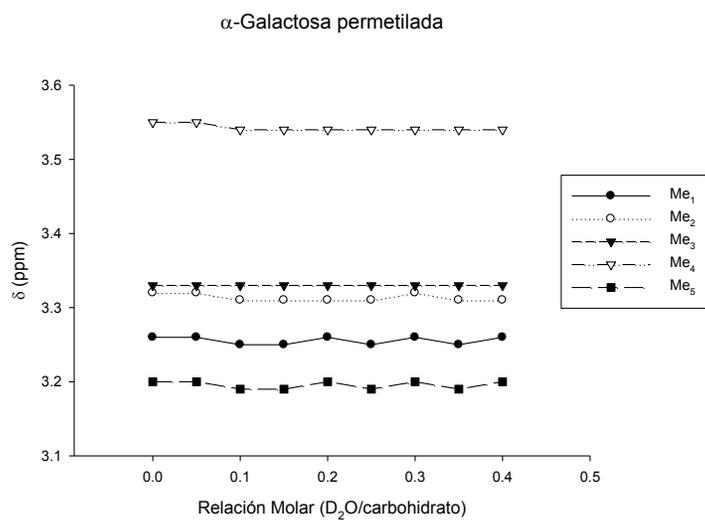
La determinación del coeficiente de difusión se llevó a cabo por la técnica que utiliza los datos de relajación (T1) del carbono más rígido.^{159,165,166}

5. APENDICE

Capítulo 2. Interacción CH/ π

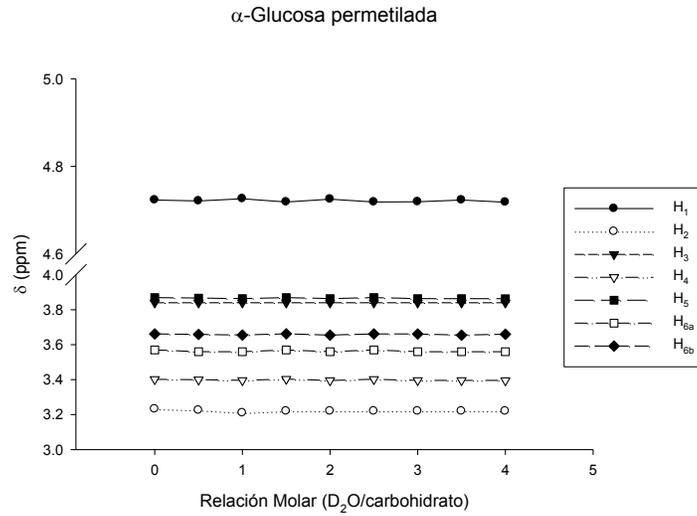


Grafica 28. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto 1.

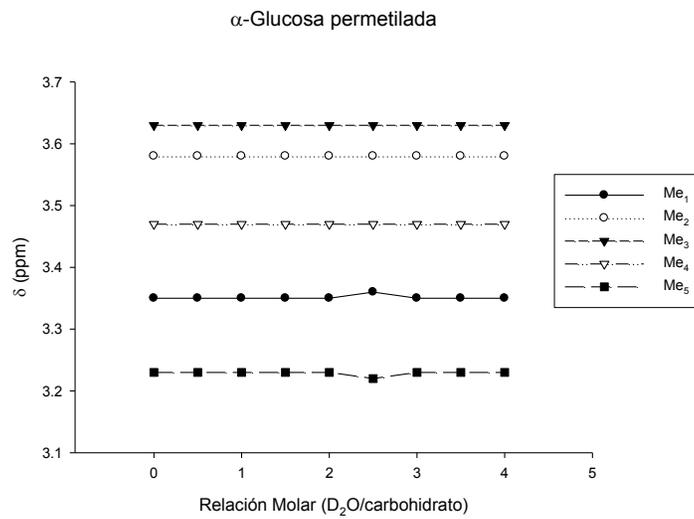


Grafica 29. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo del compuesto

1.

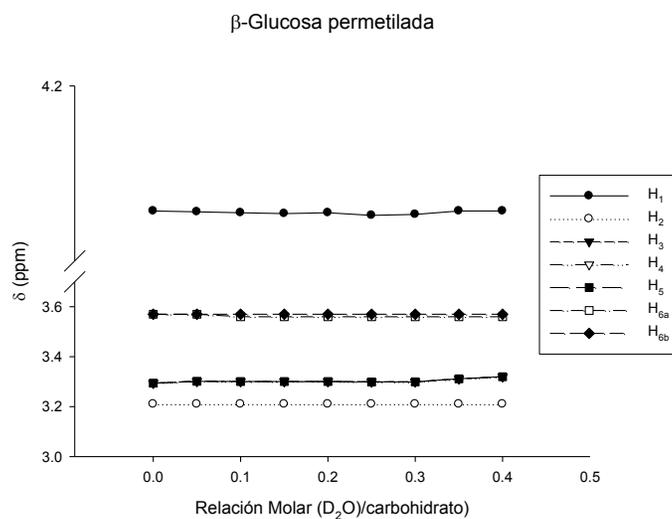


Grafica 30. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto 3.

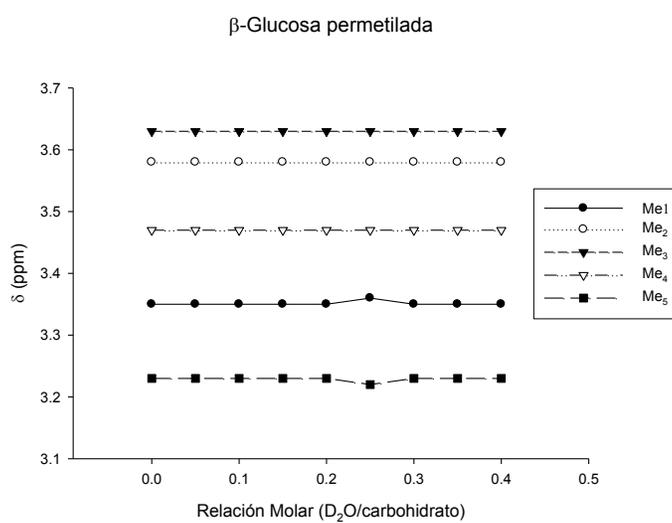


Grafica 31. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo del compuesto

3.



Grafica 32. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno anulares del compuesto 4.



Grafica 33. Desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los grupos metoxilo del compuesto

4.

Tabla 23. Diferencias de desplazamientos químicos (ppm) para los compuestos **3** y **4**.

	α -glucosa permetilada (3)			β -glucosa permetilada (4)		
	D ₂ O	C ₆ D ₆	$\Delta\delta = \delta_{D_2O} - \delta_{C_6D_6}$	D ₂ O	C ₆ D ₆	$\Delta\delta = \delta_{D_2O} - \delta_{C_6D_6}$
H ₁	4.98	4.64	0.34	4.38	4.07	0.31
H ₂	3.34	3.12	0.22	3.07	3.14	-0.07
H ₃	3.26	3.70	-0.44	3.39	3.24	0.15
H ₄	3.5	3.26	0.24	3.25	3.24	0.01
H ₅	3.68	3.71	-0.03	3.52	3.24	0.28
H _{6a}	3.66	3.47	0.19	3.74	3.51	0.23
H _{6b}	3.66	3.55	0.11	3.65	3.51	0.14
Me ₁	3.41	3.14	0.27	3.56	3.30	0.26
Me ₂	3.49	3.18	0.31	3.58	3.52	0.06
Me ₃	3.54	3.54	0.00	3.63	3.57	0.06
Me ₄	3.6	3.45	0.15	3.54	3.42	0.12
Me ₅	4.4	3.18	1.22	3.42	3.18	0.24

Tabla 24. Desplazamientos químicos de las señales de RMN de ¹H de la β -glucosa permetilada (**4**).

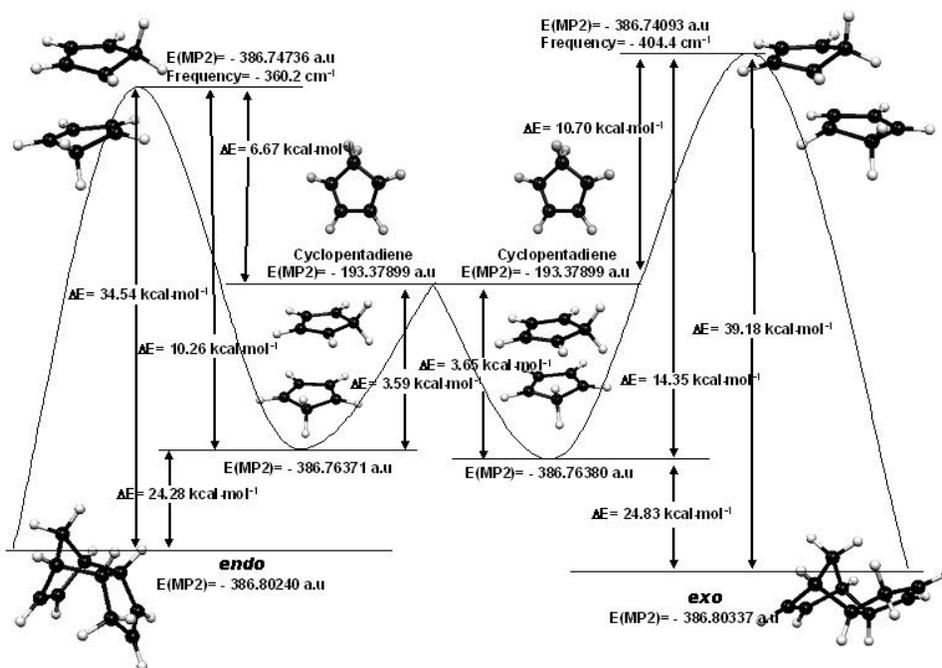
β-Glucosa permetilada														
	Ensayo	CDCl ₃	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	1.00
H ₁	4.13	4.13	4.13	4.13	4.13	4.12	4.11	4.11	4.10	4.10	4.09	4.09	4.08	3.56
H ₂	2.97	2.96	2.94	2.93	2.90	2.89	2.88	2.86	2.85	2.84	2.83	2.82	2.80	2.18
H ₃	3.15	3.14	3.13	3.12	3.11	3.10	3.09	3.09	3.08	3.07	3.06	3.05	3.04	2.50
H ₄	3.15	3.14	3.13	3.12	3.11	3.10	3.09	3.09	3.08	3.07	3.06	3.05	3.04	2.42
H ₅	3.26	3.27	3.27	3.26	3.26	3.25	3.25	3.24	3.24	3.23	3.22	3.22	3.21	2.67
H _{6a}	3.54	3.57	3.56	3.56	3.59	3.59	3.59	3.59	3.58	3.58	3.58	3.58	3.57	3.10
H _{6b}	3.64	3.66	3.62	3.66	3.66	3.67	3.67	3.67	3.66	3.67	3.67	3.67	3.67	3.22
Me ₁	3.52	3.53	3.54	3.54	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.18
Me ₂	3.56	3.57	3.57	3.57	3.57	3.57	3.57	3.57	3.56	3.56	3.56	3.55	3.55	3.14
Me ₃	3.62	3.62	3.62	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.62	3.23
Me ₄	3.53	3.54	3.55	3.55	3.55	3.56	3.56	3.56	3.56	3.56	3.56	3.55	3.55	3.17
Me ₅	3.41	3.42	3.43	3.44	3.45	3.45	3.46	3.46	3.46	3.47	3.47	3.47	3.47	3.12

a. Relación molar carohidrato:hexafluorobenceno.

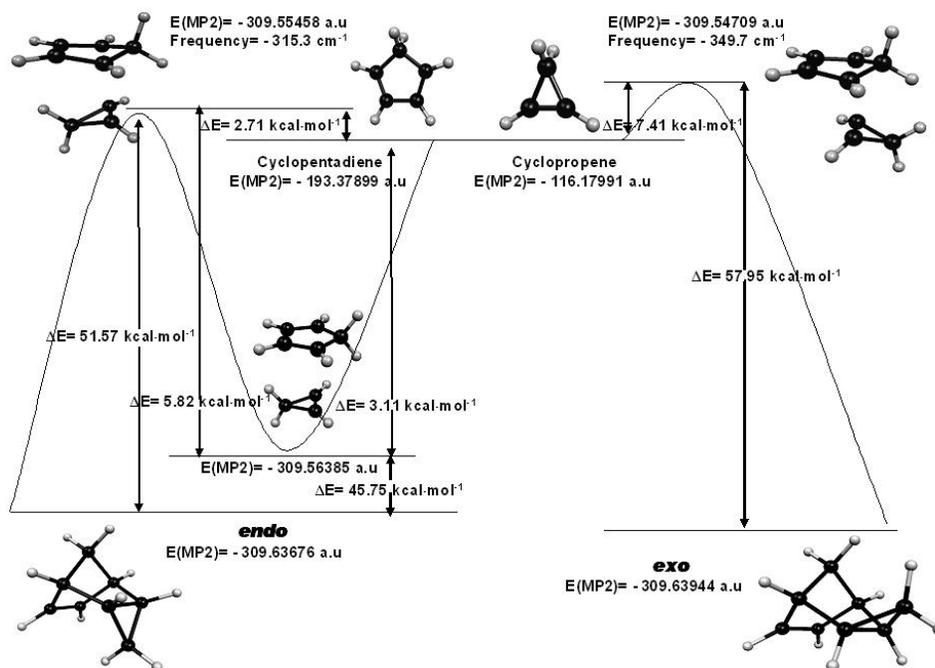
Tabla 25. Diferencias de desplazamientos químicos (ppm) para los compuestos **3** y **4**.

	α -glucosa permetilada (3)			β -glucosa permetilada (4)		
	CDCl_3	C_6F_6	$\Delta\delta = \delta_{\text{CDCl}_3} - \delta_{\text{C}_6\text{F}_6}$	CDCl_3	C_6F_6	$\Delta\delta = \delta_{\text{CDCl}_3} - \delta_{\text{C}_6\text{F}_6}$
H₁	4.81	4.26	0.55	4.14	3.56	0.58
H₂	3.19	2.48	0.71	2.98	2.18	0.80
H₃	3.47	2.62	0.85	3.16	2.50	0.66
H₄	3.15	2.34	0.81	3.14	2.42	0.72
H₅	3.58	2.79	0.79	3.27	2.67	0.60
H_{6a}	3.57	3.01	0.56	3.56	3.10	0.46
H_{6b}	3.57	3.01	0.56	3.64	3.22	0.42
Me₁	3.40	3.11	0.29	3.52	3.18	0.34
Me₂	3.50	3.16	0.34	3.57	3.14	0.43
Me₃	3.60	3.17	0.43	3.62	3.23	0.39
Me₄	3.53	3.13	0.40	3.53	3.17	0.36
Me₅	3.41	3.09	0.32	3.41	3.12	0.29

Capítulo 3. Interacción π - π



Esquema 20. Superficie de energía potencial de la reacción de dimerización del ciclopentadieno (13).



Esquema 21. Superficie de energía potencial de la reacción de ciclopentadieno (13) con ciclopropeno (24).

6. DATOS ESPECTROSCOPICOS DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS

2,3,4,6-Tetra-O-metil- α -D-metil-galactopiranosido (**1**). Rendimiento químico: 759 mg (59 %). Líquido amarillo. IR (película): 2979, 2910, 2829, 1450, 1359, 1252, 1199, 1098, 1053, 986, 954, 883, 764, 665. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, C_6D_6): 3.14 (*s*, 3H, Me_5); 3.20 (*s*, 3H, Me_1); 3.26 (*s*, 3H, Me_2); 3.27 (*s*, 3H, Me_3); 3.52 (*m*, 1H_{6a}); 3.53 (*m*, 1H₄); 3.60 (*dd*, $J = 2.5, 9.0$, 1H_{6b}); 3.62 (*m*, 1H₃); 3.82 (*dd*, $J = 4.0, 10.5$, 1H_{6b}); 3.90 (*m*, 1H₅); 4.77 (*d*, $J = 3.0$, 1H₁). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, C_6D_6): 55.0 (Me_1); 58.2 (Me_3); 58.4 (Me_2); 58.8 (Me_5); 61.0 (Me_4); 70.0 (C_5); 71.8 (C_6); 77.0 (C_4); 78.8 (C_2); 81.0 (C_3); 98.8 (C_1). CI-MS: 251 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; $[\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_6]^{\text{H}^+}$).

2,3,4,6-Tetra-O-metil- β -D-metil-galactopiranosido (**2**). Rendimiento químico: 875 mg (68 %). Sólido blanco. p. f. 45-47 °C. IR (KBr): 2979, 2921, 2836, 1448, 1373, 1334, 1305, 1183, 1073, 1106, 957, 997, 957, 908, 876, 740, 660. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, C_6D_6): 2.97 (*dd*, $J = 9.5, 3.0$, 1H₃); 3.11 (*s*, 3H, Me_5); 3.27 (*s*, 3H, Me_3); 3.33 (*ddd*, $J = 1.5, 5.5, 7.5$, 1H₅); 3.37 (*s*, H, Me_1); 3.45 (*dd*, $J = 1.0, 3.0$, 1H₄); 3.46 (*s*, H, Me_4); 3.50 (*dd*, $J = 5.5, 9.0$, 1H_{6a}); 3.57 (*s*, 3H, Me_2); 3.64 (*dd*, $J = 8.0, 9.5$, 1H_{6b}); 3.68 (*dd*, $J = 7.5, 10.0$, 1H₂); 4.15 (*d*, $J = 7.5$, 1H₁). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, C_6D_6): 56.3 (Me_1); 58.3 (Me_3); 58.8 (Me_5); 60.7 (Me_2); 60.9 (Me_4); 71.4 (C_6); 73.4 (C_5); 75.6 (C_4); 81.3 (C_2); 84.9 (C_3); 105.3 (C_1). CI-MS: 251 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; $[\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_6]^{\text{H}^+}$).

2,3,4,6-Tetra-O-metil- α -D-metil-glucopiranosido (**3**). Rendimiento químico: 862 mg (67 %). Líquido amarillo. IR (película): 2969, 2914, 2840, 1450, 1385, 1262, 1184, 1132, 1073, 994, 908, 632, 602. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, C_6D_6): 3.12 (*dd*, $J = 4.5, 10.0$, 1H₂); 3.14 (*s*, 3H, Me_1); 3.18 (*s*, 3H, Me_2); 3.18 (*s*, 3H, Me_5); 3.26 (*dd*, $J = 4.5, 10.0$, 1H₂); 3.45 (*s*, 3H, Me_4); 3.47 (*m*, 1H_{6a}); 3.54 (*s*, 3H, Me_3); 3.55 (*m*, 1H_{6b}); 3.70 (*m*, 1H₃); 3.71 (*m*, 1H₅); 4.64 (*d*, $J = 3.5$, 1H₁). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, C_6D_6): 54.7 (Me_1); 57.9 (Me_2); 58.9 (Me_5); 60.2 (Me_4); 60.6 (Me_3); 70.8 (C_5); 71.9 (C_6); 80.0 (C_3); 80.1 (C_3); 82.5 (C_2); 97.8 (C_1). CI-MS: 251 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; $[\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_6]^{\text{H}^+}$).

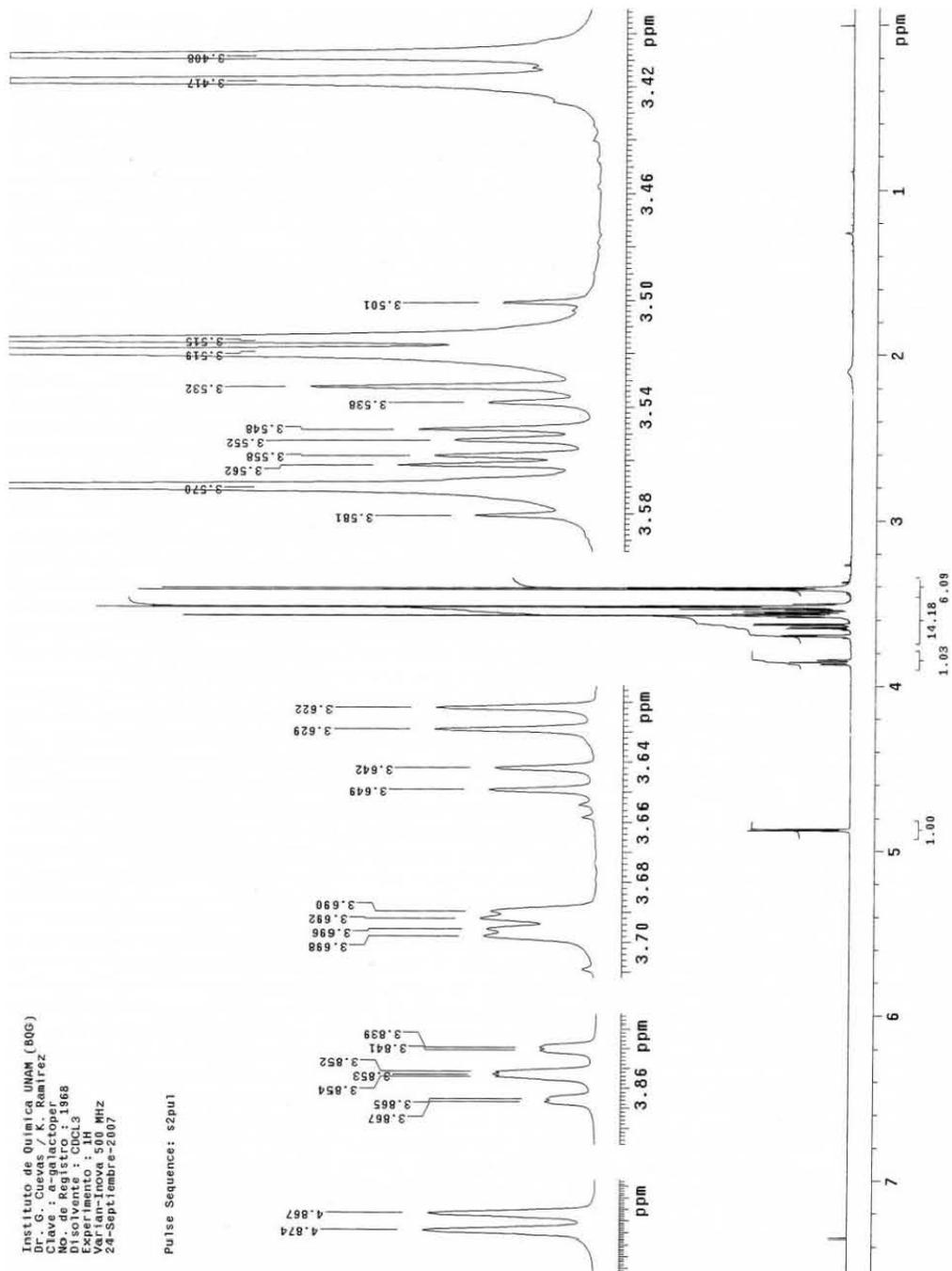
2,3,4,6-Tetra-O-metil- β -D-metil-glucopiranosido (**4**). Rendimiento químico: 759 mg (59 %). Sólido blanco. p. f. 34-36 °C. IR (KBr): 2980, 2928, 2832, 1450, 1375, 1320, 1190, 1102, 1049, 995, 967, 897, 749, 672. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, C_6D_6): 3.14 (*m*, 1H₂); 3.18 (*s*, 3H, Me₅); 3.24 (*m*, 1H₃); 3.24 (*m*, 1H₄); 3.24 (*m*, 1H₅); 3.30 (*s*, 3H, Me₁); 3.42 (*s*, 3H, Me₄); 3.51 (*m*, 1H_{6a}); 3.51 (*m*, 1H_{6b}); 3.52 (*s*, 3H, Me₂); 3.57 (*s*, 3H, Me₃); 4.07 (*d*, $J = 3.5$, 1H₁). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, C_6D_6): 56.3 (Me₁); 59.0 (Me₅); 60.1 (Me₄); 60.2 (Me₂); 60.6 (Me₃); 71.8 (C₆); 75.3 (C₅); 79.9 (C₄); 84.5 (C₂); 87.1 (C₃); 104.8 (C₁). CI-MS: 251 ($[M+H]^+$; $[\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_6]^{\text{H}^+}$).

2,3,4,6-Tetra-O-metil- α -D-metil-manopiranosido (**5**). Rendimiento químico: 797 mg (62 %). Líquido amarillo. IR (película): 2980, 2909, 2829, 1451, 1377, 1291, 1191, 1114, 1065, 997, 971, 871, 795, 662. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, C_6D_6): 3.13 (*s*, 3H, Me₁); 3.12 (*s*, 3H, Me₅); 3.22 (*s*, 3H, Me₃); 3.23 (*s*, 3H, Me₄); 3.42 (*s*, H₄); 3.43 (*dd*, $J = 2.0, 3.0$, 1H₂); 3.53 (*dd*, $J = 2.0, 11.0$, 1H_{6a}); 3.58 (*m*, 1H_{6b}); 3.60 (*m*, 1H₃); 3.62 (*m*, 1H₄); 3.70 (*m*, 1H₅); 3.68 (*dd*, $J = 7.5, 10.0$, 1H₂); 4.64 (*d*, $J = 2.0$, 1H₁). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, C_6D_6): 54.4 (Me₁); 57.2 (Me₃); 58.9 (Me₂); 59.0 (Me₅); 60.4 (Me₄); 72.4 (C₆); 72.5 (C₅); 77.0 (C₄); 77.4 (C₂); 82.6 (C₃); 99.0 (C₁). CI-MS: 251 ($[M+H]^+$; $[\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_6]^{\text{H}^+}$).

Difenilfosfinoíl-*n*-propano (**32**). Rendimiento químico: 2.21 g (86 %). Sólido cristalino amarillo. p. f. 99°C. IR: 1176 cm^{-1} ν (P=O). $^1\text{H NMR}$: (500 MHz- CDCl_3) δ (ppm) 1.02 (td, 3H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 1$ Hz $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 1.66 (*m*, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2(\text{P})$), 2.25 (*m*, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2(\text{P})$) 7.45-7.53 (*m*, 6H, aromáticos), 7.72-7.76 (*m*, 4H, aromáticos). $^{13}\text{C NMR}$: (125MHz- CDCl_3) δ (ppm) 15.23 (*d*, $^3J_{\text{C-P}} = 3.63$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2(\text{P})$), 15.63 (*d*, $^2J_{\text{C-P}} = 15.63$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2(\text{P})$), 31.82 (*d*, $^1J_{\text{C-P}} = 71.37$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2(\text{P})$), 128.56 (*d*, $^1J_{\text{C-P}} = 11.38$ Hz, C_{orto}), 130.74 (*d*, $^3J_{\text{C-P}} = 8.75$ Hz, C_{meta}), 131.59 (*d*, $^4J_{\text{C-P}} = 2.25$ Hz, C_{para}), 133.15 (*d*, $^4J_{\text{C-P}} = 97.5$ Hz, C_{ipso}). $^{31}\text{P NMR}$: (121.38 MHz- CDCl_3) δ (ppm) 32.88. LRMS: (*m/z*) 244 (35%) $[\text{M}]^+$, 243 (45%), 243 (45%), 215 (100%), 201 (90%), 183 (10%). HRMS: (FAB+) *mz* calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{OPS}$ 245.2752 y el encontrado fue de 245.1093

7. ESPECTROS DE LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS

1. Espectro de RMN de ^1H 500 MHz de α -galactosa permetilada (1).



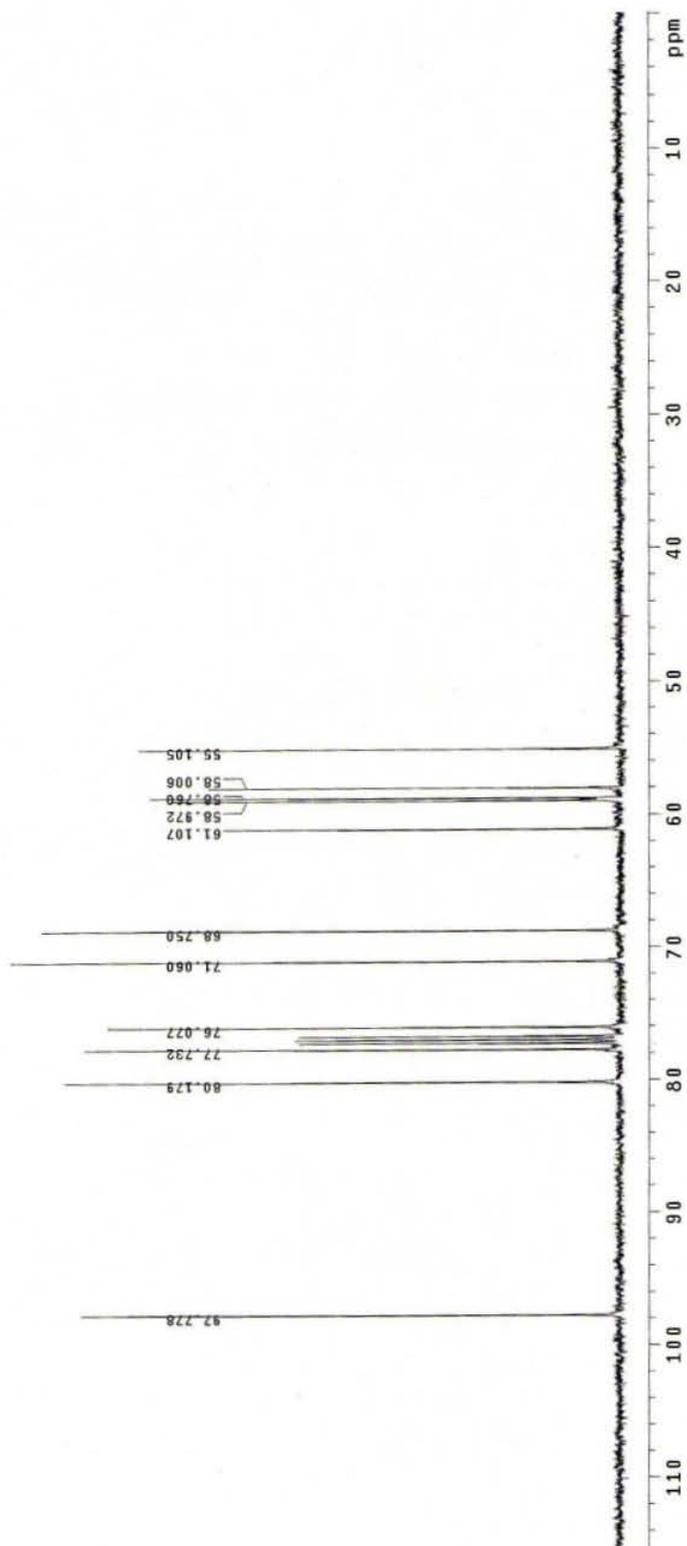
Instituto de Quimica UNAM (806)
Dr. G. Cuevas / K. Ramirez
Clave : α -galactopir
No. de Registro : 1968
Solvente : CDCl₃
Experimento :
Variante-Innova 500 MHz
24-Septiembre-2007

2. Espectro de RMN de ^{13}C 125 MHz de α -galactosa permetilada (1).

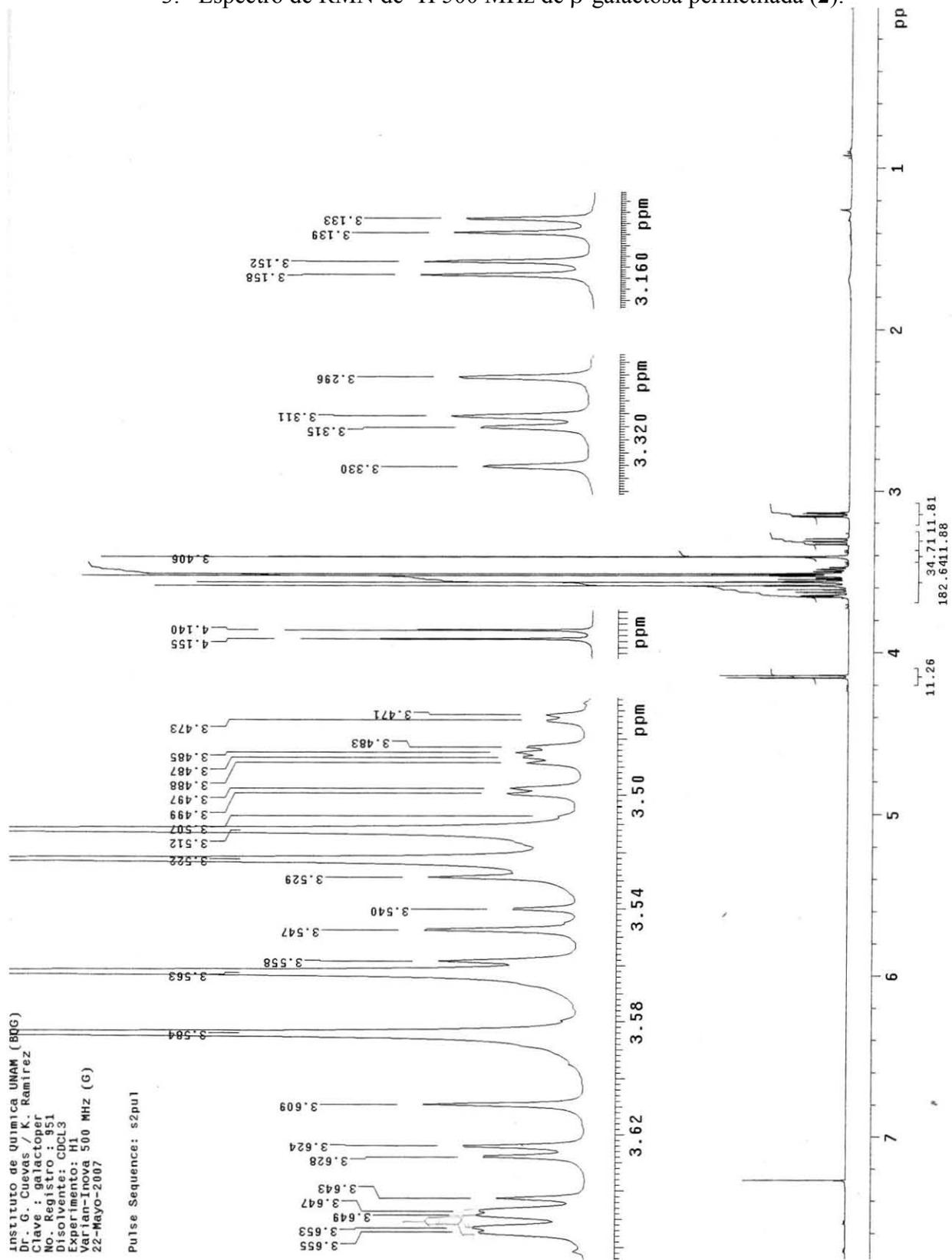
Instituto de Quimica UNAM (806)
Dr. G. Casas, W. Ramirez
Clave: α -galactopir
No. de Registro: 1968
Disolvente: CDCl₃
Experimento: 13C
Varian-Inova 125 MHz
24-Septiembre-2007

File: Carbon

Pulse Sequence: s2pu1



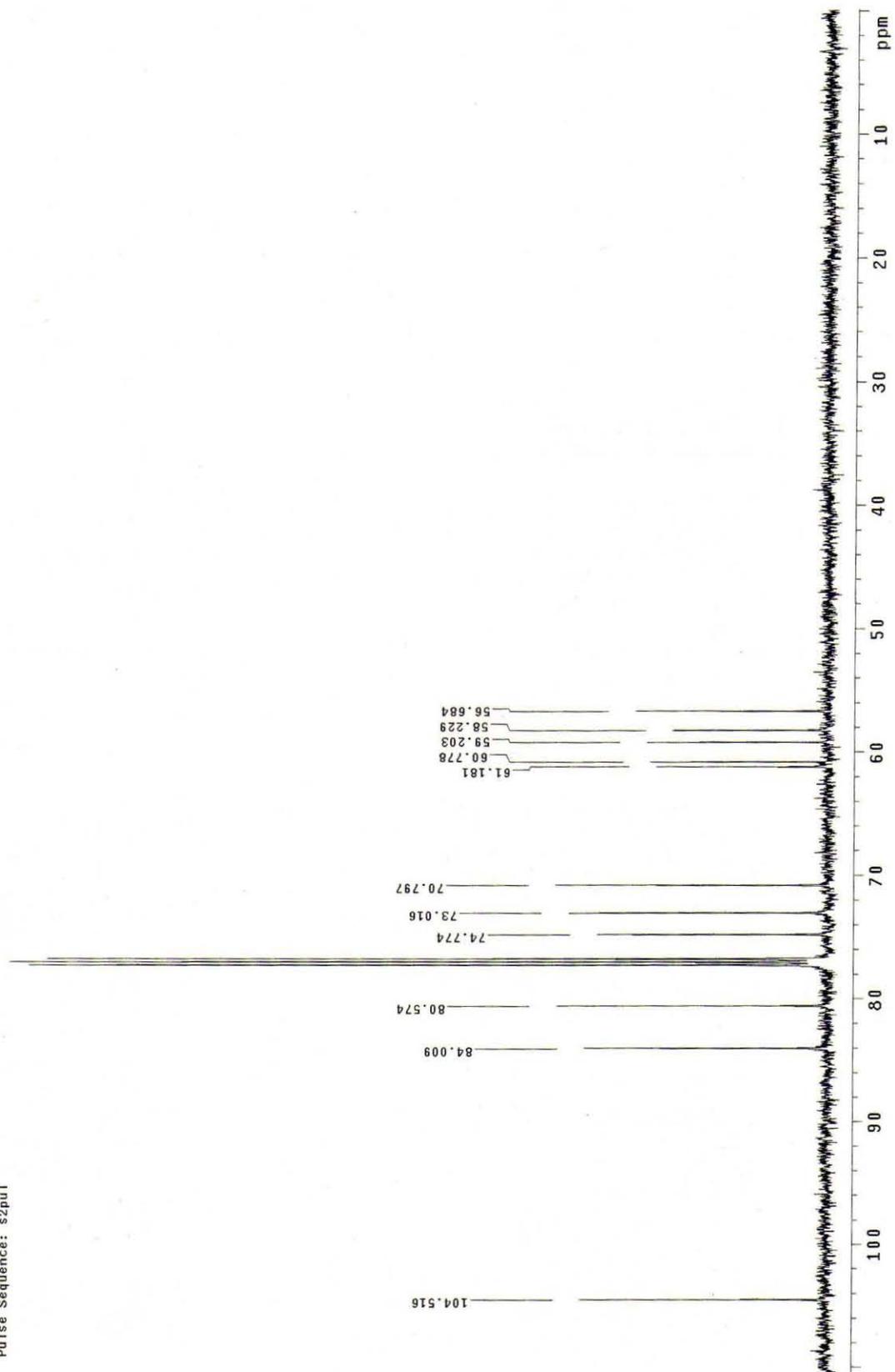
3. Espectro de RMN de ^1H 500 MHz de β -galactosa permitilada (2).



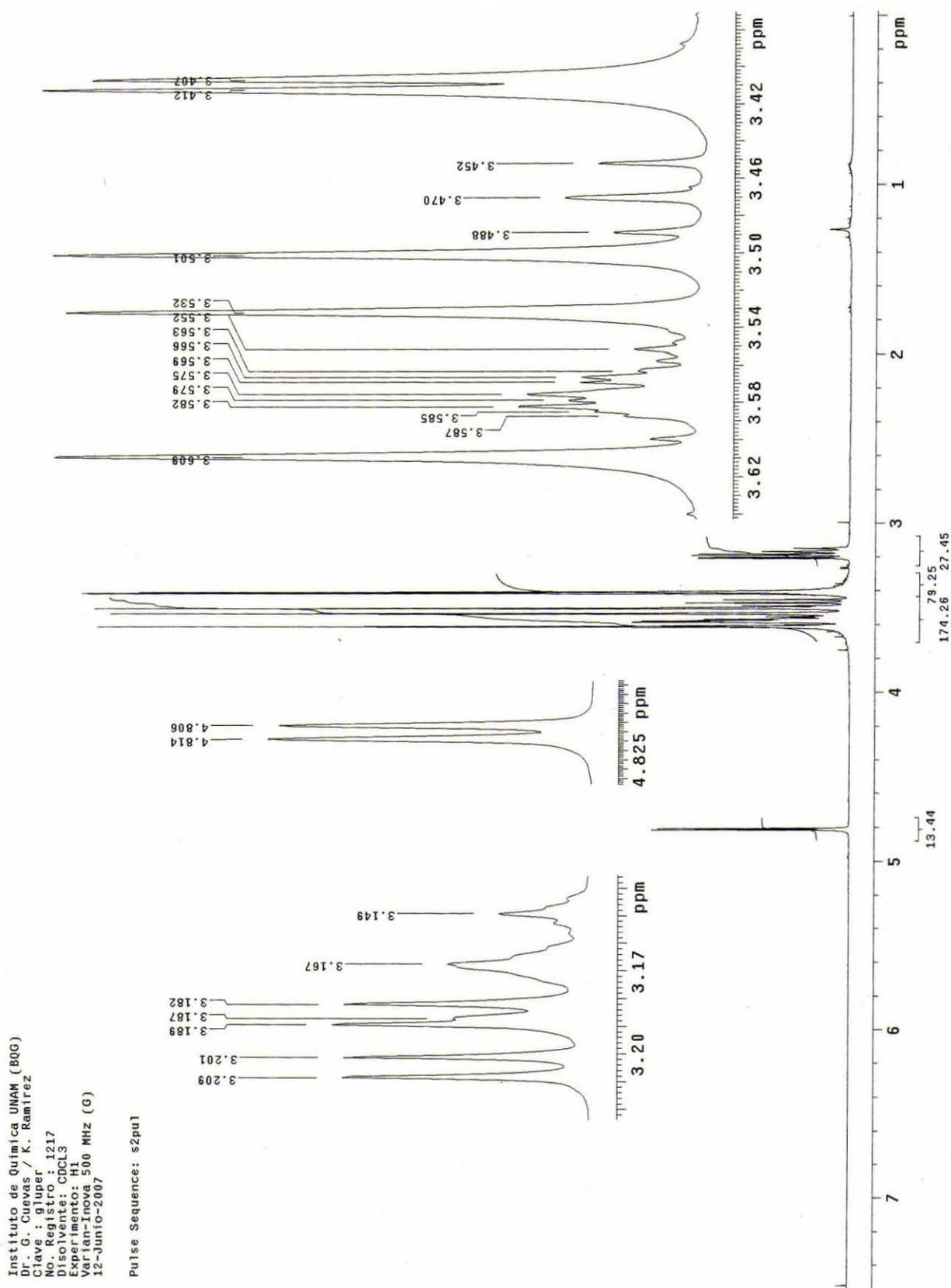
4. Espectro de RMN de ^{13}C 125 MHz de β -galactosa permetilada (2).

Instituto de Quimica UNAM (BQG)
Dr. G. Cuevas / K. Ramirez
Clave : galactoper
No. Registro : 951
Disolvente: CDCl_3
Experimento: C13
Varian-Inova 125 MHz (G)
22-Mayo-2007

Pulse Sequence: s2pul1



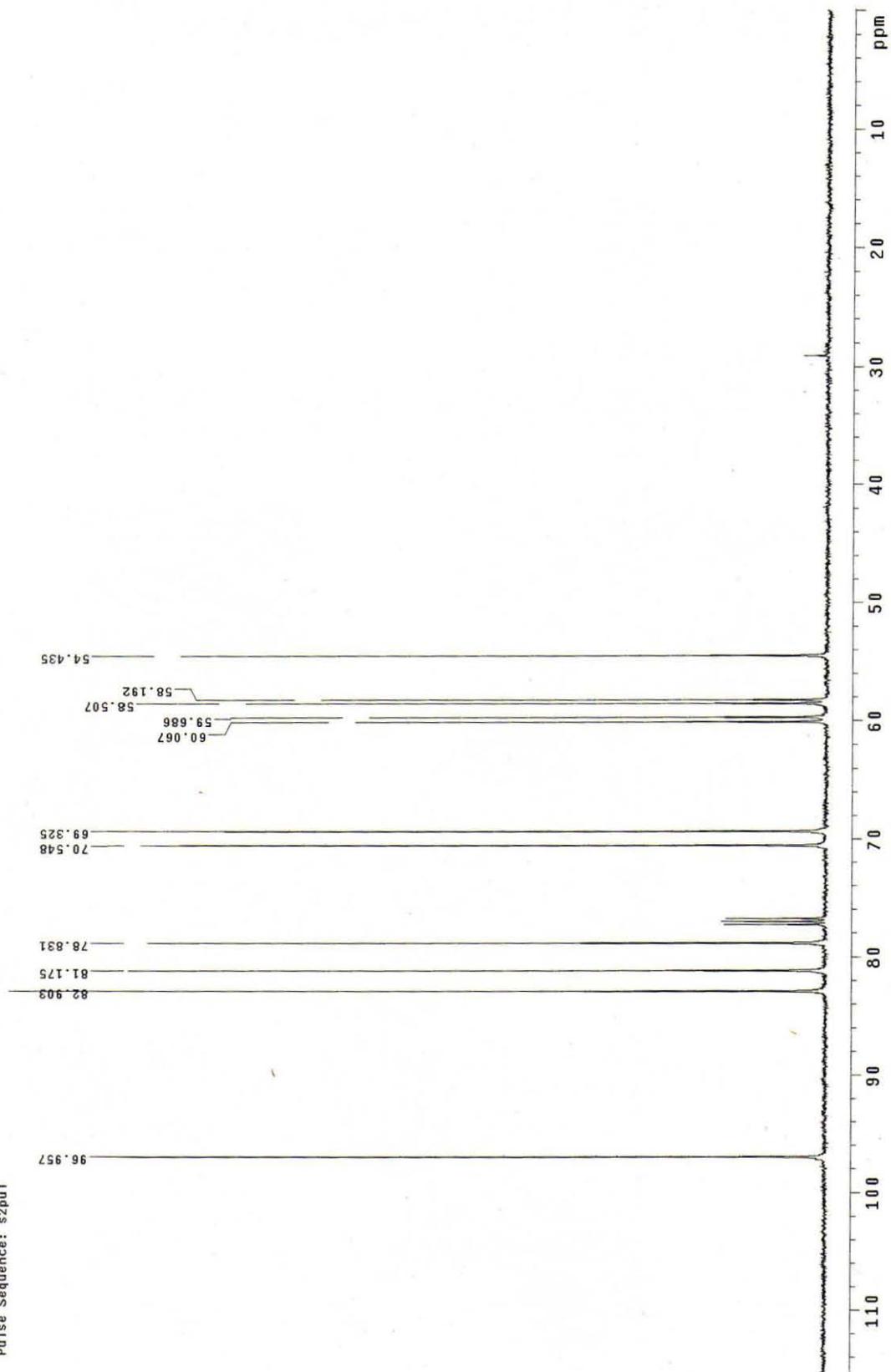
5. Espectro de RMN de ^1H 500 MHz de α -glucosa permetilada (3).



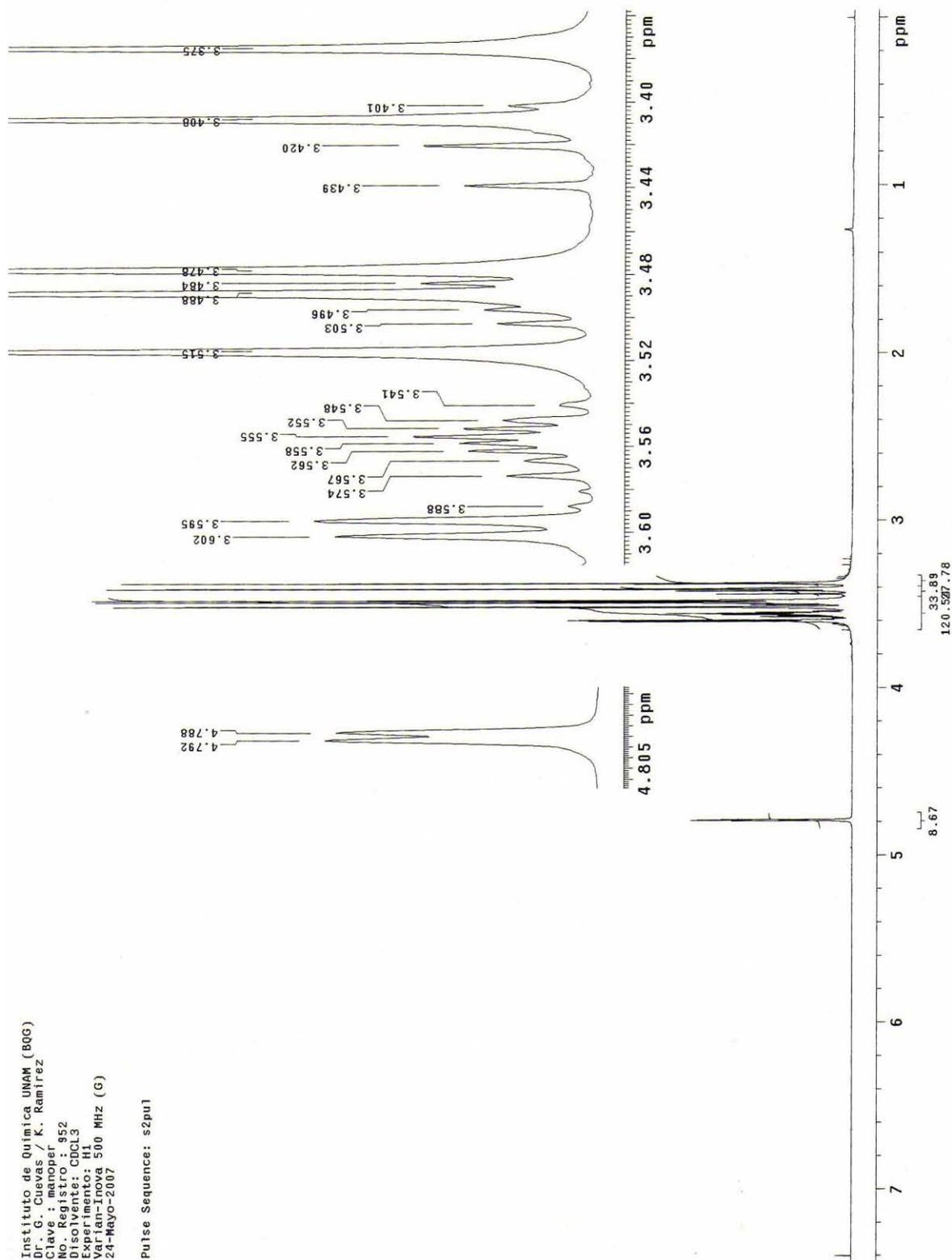
6. Espectro de RMN de ^{13}C 125 MHz de α -glucosa permetilada (3).

Instituto de Química UNAM (BQG)
Dr. G. Cuevas / K. Ramirez
Clave : gluper
No. Registro : 1217
Disolvente: CDCl₃
Experimento: C13
Varian-Inova 125 MHz (G)
12-Junio-2007

Pulse Sequence: s2pu1



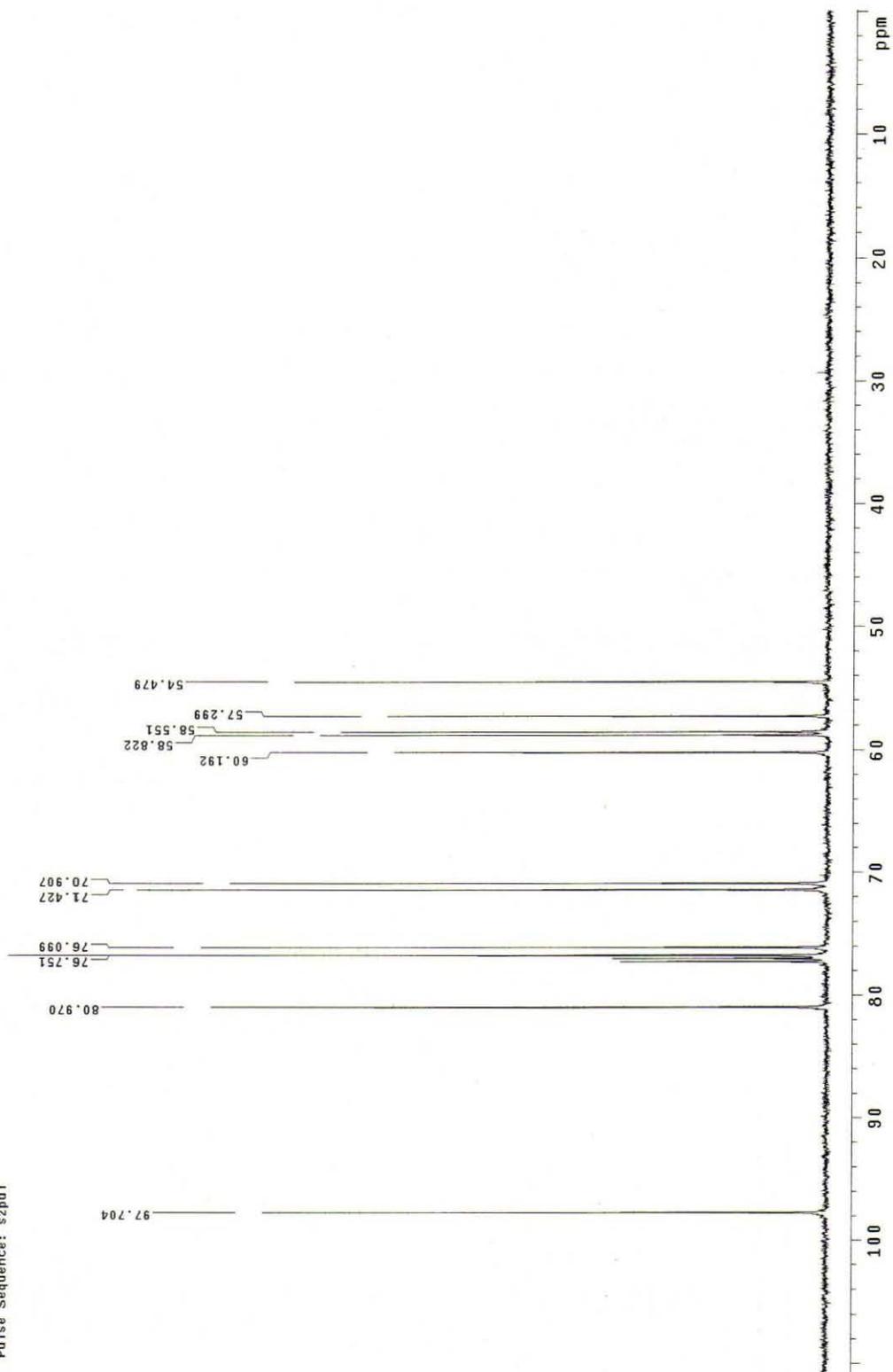
7. Espectro de RMN de ^1H 500 MHz de α -manosa permetilada (5).



8. Espectro de RMN de ^{13}C 125 MHz de α -manosa permetilada (5).

Instituto de Química UNAM (BQG)
Dr. G. Cuevas / K. Ramírez
Clave : manoper
No. Registro : 952
Disolvente : CDCl₃
Experimento : C13
Varian-Inova 125 MHz (G)
24-Mayo-2007

Pulse Sequence: s2pu1



8. REFERENCIAS.

- (1) Juaristi, E. *Introducción a la Estereoquímica y al Análisis Conformacional*; Minal: México, 1989.
- (2) Van der Waals, J. D. Doctoral Dissertation, Leiden 1873.
- (3) London, F., Sauer, J., *Z. Physik.* **1930**, *63*, 245-279.
- (4) Hobza, P.; Šponer, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11802-11808.
- (5) Jurečka, P.; Hobza, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15608-15613.
- (6) Meyer, E. A.; Castellano, K. R.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 1210-1250.
- (7) Autumn, K.; Liang, Y. A.; Hsieh, S. T.; Zesch, W.; Chan, W. P.; Kenny, T. W.; Fearing, R.; Full, R. J. *Nature* **2000**, *405*, 681-685.
- (8) <http://en.wikipedia.org/wiki/Gecko>.
- (9) Coulson, C. A. *Research* **1957**, *10*, 140.
- (10) Buckingham, A. D.; Claverie, P.; Rein, R.; Schuster, P. *Intermolecular Interactions. From Diatomics to Biopolymers*; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 1978.
- (11) Maitland, G. C.; Rigby, M.; Smith, E. B.; Wakeham, W. A. *Intermolecular Forces: Their Origin and Determination*; Clarendon Press: Oxford, UK, 1987.
- (12) Reichardt, C. *Solvent and Solvent Effects in Organic Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2003.
- (13) Stone, A. J. *The Theory of Intermolecular Forces*; Clarendon Press: Oxford, UK, 2000.
- (14) Debye, P. *Polar Molecules*; Chemical Catalog Company: New York, USA, 1929.
- (15) Valenzuela, C. *Química General: Introducción a la Química Teórica*; Universidad de Salamanca: Salamanca, España, 1995.
- (16) London, F., Sauer, J., *Z. Physik. Chem., B.* **1930**, *11*, 222-251.
- (17) Mulliken, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 600-608.
- (18) Mulliken, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 811-824.
- (19) Lennard-Jones, J. E. *Proc. Roy. Soc. London Ser. A* **1925**, *109*, 584-597.
- (20) Jeffrey, G. A. *An Introduction to Hydrogen Bonding*; Oxford University Press: New York, USA, 1997.
- (21) Fischer, E. *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985-2993.
- (22) Koshland, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 98-105.
- (23) Babine, R. E.; Steven, S. L. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1359-1472
- (24) Lehn, J.-M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 89-112.
- (25) Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry*; VCH: Weinheim, Germany, 1995.
- (26) Cram, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1009-1020.
- (27) Cram, D. J. *Science* **1988**, *240*, 760-767.
- (28) Morgan Conn, M.; Rebek, J. J. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1647-1668.
- (29) Gabius, H.-J.; Siebert, H.-C.; André, S.; Jiménez-Barbero, J.; Rüdiger, H. *ChemBioChem.* **2004**, *5*, 740-764
- (30) Laughrey, Z. R.; Kiehna, S. E.; Riemen, A. J.; Waters, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14625-14633

- (31) Jiménez-Barbero, J.; Cañada, F.; Cuevas, G.; Asensio, J. L.; Aboitiz, N.; Canales, A.; Chávez, M. I.; Fernández-Alonso, M. C.; García-Herrero, A.; Mari, S.; Vidal, P. In *Protein-Carbohydrate Interactions: A Combined Theoretical and NMR Experimental Approach on Carbohydrate-Aromatic Interactions and on Pyranose Ring Distortion*; in Vliegthart, J.F.G.; Woods, R.J., (Eds.) ACS Symposium series 2006; Vol. 930, p 60-80.
- (32) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science* **2001**, *291*, 2357-2364
- (33) Simanek, E. E.; McGarvey, G. J.; Jablonowski, J. A.; Wong, C. H. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 833-862.
- (34) Vyas, N. K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, *1*, 732-740.
- (35) Wies, W. L.; Drickamer, K. *Ann. Rev.* **1996**, *65*, 441-473
- (36) Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674.
- (37) S. Thobhani, B.; Ember, A.; Siriwardena, G.-J.; Boons *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7154-7155.
- (38) Sharon, N.; Lis, H. *Adv. Exp. Med. Bul.* **2001**, *491*, 1-16.
- (39) Sauter, N. K.; Hanson, J. E.; Glick, G. D.; Brown, J. H.; Crowther, R. L.; Park, S. J.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9609-9621.
- (40) Emsley, P.; Fotinov, C.; Black, I.; Fairweather, N. F.; Charles, I. G.; Watts, C.; Hewitt, E.; Isaacs, N. W. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8889-8894.
- (41) Bautista-Ibañez, L.; Ramírez-Gualito, K.; Quiróz-García, B.; Rojas-Aguilar, A.; Cuevas, G. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 849-857.
- (42) Scheiner, S. *Hydrogen Bonding. A Theoretical Perspective*; Oxford University Press: New York, 1997.
- (43) Nishio, M.; Hirota, M.; Umezawa, Y. *The C-H/ π Interaction: Evidence, Nature, and Consequences*; Wiley-VCH, Inc: New York, 1998.
- (44) Quijcho, F. A.; Vyas, N. K. *Nature* **1984**, *310*, 381-386.
- (45) Vyas, N. K.; Vyas, M. N.; Quijcho, F. A. *Nature* **1987**, *327*, 635-638.
- (46) Umezawa, Y.; Tsuboyama, S.; Takahashi, H.; Uzawa, J.; Nishio, M. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 10047-10056.
- (47) Iitaka, Y.; Kodama, Y.; Nishihata, K.; Nishio, M. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1974**, 389-390.
- (48) Kodama, K.; Nishihata, K.; Nishio, M.; Iitaka, Y. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1976** 1490-1495.
- (49) Hirota, M.; Sekiya, K.; Abe, H.; Karatsu, M.; Nishio, M.; Osawa, E. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 3091-3099.
- (50) Nishio, M.; Umezawa, Y.; Hirota, M.; Takeuchi, Y. *Tetrahedron* **1995**, *32*, 8665-8701.
- (51) Tamres, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3375-3378.
- (52) Reeves, L. W.; Schneider, W. G. *Can. J. Chem.* **1957**, *35*, 251-261.
- (53) Nishihata, K.; Nishio, M. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 1041-1044.
- (54) Stanca-Kaposta, E. C.; Gamblin, D. P.; Screen, J.; Liu, B.; Snoek, L. C.; Davis, B. G.; Simons, J. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *8*, 4444-4451.
- (55) Hirota, M.; Takahashi, Y.; Nishio, M.; Nishihata, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1978**, *51*, 2358-2360.
- (56) Breen, P. J.; Warren, J. A.; Bernstein, E. R.; Seeman, J. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3453-3455.
- (57) Suezawa, H.; Hashimoto, T.; Tsuchinaga, K.; Yoshida, T.; Yuziri, T.; Sakakibara, K.; Hirota, M.; Nishio, M. *J. Chem. Perkin Trans 2* **2000**, 1243-1249.
- (58) Vyas, N. K.; Vyas, M. N.; Quijcho, F. A. *Science* **1988**, *242*, 1290-1295.

- (59) Obst, U.; Banner, B. W.; Weber, L.; Diederich, F. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 287-295.
- (60) <http://www.cermav.cnrs.fr/lectines/>.
- (61) Yang, N.; Li, D. F.; Feng, L.; Xiang, Y.; Liu, W.; Sun, H.; Wang, D. C. *J. Mol. Biol.* **2009**, *387*, 694-705.
- (62) Boraston, A. B.; Ficko-Blean, E.; Healey, M. *Biochemistry* **2007**, *46*, 11352 -11360.
- (63) Mancheno, J. M.; Tateno, H.; Goldstein, I. J.; Martinez-Ripoll, M.; Hermoso, J. A. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 17251-17259.
- (64) Elgavish, S.; Shaanan, B. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 917-932
- (65) Loris, R. D. G. H.; Dao-Thi, M.-H.; Messens, J.; Imberty, A.; Wyns, L. *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 987-1002.
- (66) Fernández-Alonso, M. C.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7379-7386.
- (67) Vandebussche, S.; Díaz, D.; Fernández-Alonso, M. C.; Pan, W.; Vincent, S. P.; Cuevas, G.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Kristin Bartik, K. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7570-7578.
- (68) Guerrero-Martínez, A.; Berger, S.; Tardajos, G. *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 2074-2076.
- (69) Ribeiro, J. P.; Bacchi, S.; Dell'Anna, G.; Morando, M.; Canada, F. J.; Cozzi, F.; Jimenez-Barbero, J. *Eur. J. Org. Chem* **2008**, 5891-5898.
- (70) Macomber, R. S. *A Complete Introduction to NMR Spectroscopy* John Wiley & Sons: USA, 1998.
- (71) Thibodeaux, D. P.; Johnson, G. P.; Stevens, E. D.; French, A. D. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2301-2310.
- (72) Kumar, R.; Tiwari, P.; Maulik, P. R.; Misra, A. K. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2335-2339.
- (73) Jiménez-Barbero, J.; Peters, T. *NMR Spectroscopy of Glycoconjugates*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: Weinheim, 2002.
- (74) Krestov, G. A. *Thermodynamics of Solvation*; Ellis Horwood: New York, 1991.
- (75) Berry, R. S.; Rice, S. A.; Ross, J. *Physical Chemistry*; John Wiley and Sons: New York, 1980.
- (76) Spiwok, V.; Lipovová, P.; Skálová, T.; Vondráčková, E.; Dohnálek, J.; Hašek, J.; Králová, B. *J. Comput-Aided Mol. Des.* **2005**, *19*, 887-901.
- (77) Sujatha, M. S.; Sasidhar, Y. U.; Balaji, P. V. *Biochemistry* **2005**, *44*, 8554-8562.
- (78) Sujatha, M. S.; Sasidhar, Y. U.; Balaji, P. V. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 2502-2514.
- (79) Laughrey, Z. R.; Kiehna, S. E.; Riemen, A. J.; Waters, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14625-14633.
- (80) Wang, H.; Sun, L.; Glazebnik, S.; Zhao, K. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2953-2956.
- (81) Alonso, J. L.; Wilson, E. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1248-1251.
- (82) Baggett, N.; Bukhari, M. A.; Foster, A. B.; Lehmann, J.; Webber, J. M. *J. Chem. Soc.* **1963**, 4157-4160.
- (83) Juaristi, E.; Cuevas, G. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 5019-5087.
- (84) Juaristi, E.; Cuevas, G. *The Anomeric Effect*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1994.
- (85) Martínez-Mayorga, K.; Cortés, F.; Leal, I.; Reyna, V.; Quintana, D.; Antúnez, S.; Cuevas, G. *Arkivoc* **2003**, 132-148.
- (86) Chopin, J.; Besset, A.; Bouillant, M. L. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sér. C* **1977**, *284*, 1007.
- (87) Kumamoto, H.; Matsubara, Y.; Iisuka, Y.; Okamoto, K.; Yokoi, K. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 2613.
- (88) Souza, J. G.; Tomei, R. R.; Kanashiro, A.; Kabeya, L. M.; Azzolini, A. E. C. S.; Dias, D. A.; Salvador, M. J.; Lucisano-Valim, Y. M. *Z. Naturforsch* **2007**, *62c*, 339-347.

- (89) Salvador, M. J.; Ferreira, E. O.; Mertens-Talcott, S. U.; De Castro, W. V.; Butterweck, V.; Derendorf, H.; Dias, D. A. *Z. Naturforsch.* **2006**, *61c*, 19.
- (90) Roig, J. T. *Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba*; Ciencia y Técnica: La Habana, 1974.
- (91) Larionovaa, M.; Spenglerb, I.; Nogueirasb, C.; Quijano, L.; Ramírez-Gualito, K.; Cuevas, G.; Calderón, J. S. *en preparación*.
- (92) Scharbert, S.; Holzmann, N.; Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* 3498-3508.
- (93) Harborne, J. B. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*; Ed. Chapman and Hall: New York, 1993.
- (94) Zou, J.-H.; Yang, J.-S.; Dong, Y.-S.; Zhou, L.; Lin, G. **2005**, *66*, 1121-1125.
- (95) Zhao, Y.; Pu, J.; Lynch, B. J.; Truhlar, D. G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 673-676.
- (96) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5656-5667.
- (97) Perron, F.; Albizati, K. F. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1617-1661.
- (98) Reeves, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 1499-1506.
- (99) Asres, D. D.; Perreault, H. *Can. J. Chem.* **1999**, *77*, 319-325.
- (100) Tatko, C. D.; Waters, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2028-2034.
- (101) Hunter, C. A.; Lawson, K. R.; Perkins, J.; Urch, C. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 651-669.
- (102) Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5525-5534.
- (103) Sinnokrot, M. O.; Sherrill, C. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7690-7697.
- (104) Ringer, A. L.; Sinnokrot, M. O.; Lively, R. P.; Sherrill, C. D. *Chem Eur. J.* **2006**, *12*, 3821-3828.
- (105) Janda, K. C.; Hemminger, J. C.; Novick, S. E.; Harra, S. E.; Klemperer, W. *J. Chem. Phys.* **1975**, *63*, 1419-1421.
- (106) Patrick, C. R.; Prosser, G. S. *Nature* **1960**, 1021.
- (107) Dahl, T. *Acta Chem. Scand. Ser. A*, **1975**, *29*, 170-174.
- (108) Hernández-Trujillo, J.; Colmenares, F.; Cuevas, G.; Costas, M. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *265*, 503-507.
- (109) Zimm, B. H. *J. Chem. Phys.* **1960**, *33*, 1349-1356.
- (110) Crothers, D. M.; Zimm, B. H. *J. Mol. Biol.* **1967**, *9* 1-9.
- (111) Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 18-30.
- (112) Ferguson, S. B.; Diederich, F. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 1127-1129.
- (113) Ashton, P.; Odell, B.; Reddington, M. V.; Slawin, A. M. Z.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1550-1553.
- (114) Ashton, P. R.; Goodnow, T. T.; Kaifer, A. E.; Reddington, M. V.; Slawin, A. M. Z.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Vicent, C.; Williams, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1396-1399.
- (115) Fringuelli, F.; Taichi, A. *Dienes in the Diels-Alder Reaction*; Wiley: New York, 1990.
- (116) Carruthers, W. *Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis*; Pergamon: Oxford, 1990.
- (117) Woodward, R. B.; Hoffmann, R. *Conservation of Orbital Symmetry*; VCH: New York, 1970.
- (118) Sauer, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1967**, *6*, 6-33.
- (119) Sauer, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 779-807.
- (120) Berson, J. A.; Malherbe, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97* 5910-5912.
- (121) Fleming, I. *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*; Wiley Interscience: New York, 1976.
- (122) Houk, K. N. *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 361-369.

- (123) Fukui, K. *Acc. Chem. Res.* **1971**, *4*, 57-64.
- (124) Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4092-4094.
- (125) Fleming, I. *Pericyclic Reactions*; Oxford University Press: New York, 1999.
- (126) Sauer, J.; Wiest, H.; Mielert, A. *Chem. Ber.* **1964**, *97*, 3183-3207.
- (127) Alder, K.; Stein, G. *Angew. Chem.* **1937**, *50*, 510-519.
- (128) Wade, L. G. *Química Orgánica*; Pearson Educación: Prentice Hall: Madrid, 2004.
- (129) Craig, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 4889-4892.
- (130) Castner, K. F.; Calderon, N. *J. Mol. Catal.* **1982**, *15*, 47-59.
- (131) Tlenkopatchev, M.; Vargas, J.; Almaraz-Girón, M. A.; López-González, M.; Riande, E. *Macromolecules* **2005**, *38*, 2696-2703.
- (132) Woodward, R. B.; Baer, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 1161-1166.
- (133) Kwart, H.; Burchuk, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3094-3097.
- (134) Woodward, R. B.; Hoffman, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1969**, *8*, 781-853.
- (135) Toma, L.; Romano, S.; Quadrelli, P.; Caramella, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5077-5080.
- (136) López-Mora, N., Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
- (137) Anet, F. A. L. *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 1219-1222.
- (138) Lee, M. W.; Herndon, W. C. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 518-518.
- (139) Hoffmann, R.; Woodward, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4388-4389.
- (140) Hoffmann, R.; Woodward, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2046-2048.
- (141) Binger, P.; Wedemann, P.; Goddard, R.; Brinker, U. H. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6462-6464.
- (142) Rivas-Islas, R., Tesis de Licenciatura, Universidad La Salle, 1999.
- (143) Roura-Pérez, G.; Quiroz, B.; Aguilar-Martinez, M.; Frontana, C.; Solano, A.; Gonzalez, I.; Bautista-Martínez, J. A.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1883-1894.
- (144) Tovar-Velasco, E., Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, 1998.
- (145) Joseph-Nathan, P.; Mendoza, P.; García, E. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1573-1576.
- (146) Alcolea-Palafox, M. *Int. J. Quantum Chem.* **2000**, *77*, 661-684.
- (147) Frisch, M. J. *et al. Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT 2004.*
- (148) Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **1970**, *19*, 553-566.
- (149) Bader, R. F. W.; Tal, Y.; Anderson, S. G.; Nguyen-Dang. *Isr. J. Chem.* **1980**, *19*, 8-29.
- (150) Mikolajczyk, M.; Gracyk, P. *Heteroatom Chem.* **1992**, *3*, 625-630.
- (151) Glasstone, S. *Trans. Faraday Soc.* **1937**, *33*, 200-206.
- (152) Bondi, A. *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 441-452.
- (153) Rivera-Fuentes, P., Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
- (154) Nic, M.; Jirat, J.; Kosata, B. *Compendium of Chemical Terminology*; 2nd ed.; International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 1996; Vol. 68.
- (155) Platzner, N.; Basselier, J.-J.; Demerseman, P. *Bull. Soc. Chem. Fr* **1974**, *5-6*, 905-912.
- (156) Woessner, D. E. *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 647-654.
- (157) Ng, S.; Sathasivam, R. V.; Lo, K.-M.; Xie, Y.; Schaeffer III, H. F. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 12059-12063.
- (158) Claridge, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*; Elsevier: Oxford, UK, 2009.
- (159) Ladner, K. H.; Dalling, D. K.; Grant, D. M. *J. Phys. Chem.* **1976**, *80*, 1783-1786.
- (160) Lambert, J. B.; Nienhuis, R. J.; Keepers, J. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1981**, *20*, 487-500 and references therein.

- (161) Woessner, D. E.; Snowden, B. S.; Meyer, G. H. *J. Chem. Phys.* **1969**, *50*, 719-721.
- (162) Graczyk, P.; Mikolajczyk, M. *The Anomeric Effect: Origin and Consequences. Topics Stereochem.* **1994**, *21*, 159.
- (163) Luther III, G. W.; Beyerle, G. *Inorganic Synthesis* **1977**, *17*, 186-188.
- (164) Klüner, R. P.; Dölle, A. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 1657-1661.
- (165) Lambert, J. B.; Nienhuis, R. J.; Finzel, R. B. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 1170-1172.
- (166) Martino Beierbeck, R.; Saunders, J. K. *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 102-109.

9. PUBLICACIONES

- Karla Ramírez-Gualito, Rosa Alonso-Ríos, Beatriz Quiroz-García, Aarón Rojas-Aguilar, Dolores Díaz, Jesús Jiménez-Barbero, Gabriel Cuevas. **The Enthalpic Nature of the CH/ π Interaction Involved in the Recognition of Carbohydrates by Aromatic Compounds is confirmed by a Novel Interplay of NMR, Calorimetry and Theoretical Calculations.** *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 18129-18136.
- Lorena Bautista-Ibáñez, Karla Ramírez-Gualito, Beatriz-Quiroz-Garcia, Aarón Rojas-Aguilar, Gabriel Cuevas. **Calorimetric Measurement of the CH/ π Interaction Involved in the Molecular Recognition of Saccharides by Aromatic Compounds.** *Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 849-857.

Enthalpic Nature of the CH/ π Interaction Involved in the Recognition of Carbohydrates by Aromatic Compounds, Confirmed by a Novel Interplay of NMR, Calorimetry, and Theoretical Calculations

Karla Ramírez-Gualito,^{*†} Rosa Alonso-Ríos,[‡] Beatriz Quiroz-García,[†]
Aarón Rojas-Aguilar,[‡] Dolores Díaz,[§] Jesús Jiménez-Barbero,[§] and Gabriel Cuevas[†]

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70213, 04510 Coyoacán, Circuito Exterior, México D.F., México, Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Apdo. Postal 14-740, 07000 México D.F., México, and Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

Received May 19, 2009; E-mail: karamirezg@prodigy.net.mx

Abstract: Specific interactions between molecules, including those produced by a given solute, and the surrounding solvent are essential to drive molecular recognition processes. A simple molecule such as benzene is capable of recognizing and differentiating among very similar entities, such as methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -D-galactopyranoside (α -Me₅Gal), methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -D-galactopyranoside (β -Me₅Gal), 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- β -D-galactopyranose (β -Ac₅Gal), and methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -D-mannopyranoside (α -Me₅Man). In order to determine if these complexes are formed, the interaction energy between benzene and the different carbohydrates was determined, using Calvet microcalorimetry, as the enthalpy of solvation. These enthalpy values were -89.0 ± 2.0 , -88.7 ± 5.5 , -132.5 ± 6.2 , and -78.8 ± 3.9 kJ mol⁻¹ for the four complexes, respectively. Characterization of the different complexes was completed by establishing the molecular region where the interaction takes place using NMR. It was determined that β -Me₅Gal is stabilized by the CH/ π interaction produced by the nonpolar region of the carbohydrate on the α face. In contrast, α -Me₅Man is not specifically solvated by benzene and does not present any stacking interaction. Although α -Me₅Gal has a geometry similar to that of its epimer, the obtained NMR data seem to indicate that the axial methoxy group at the anomeric position increases the distance of the benzene molecules from the pyranose ring. Substitution of the methoxy groups by acetate moieties, as in β -Ac₅Gal, precludes the approach of benzene to produce the CH/ π interaction. In fact, the elevated stabilization energy of β -Ac₅Gal is probably due to the interaction between benzene and the methyl groups of the acetyls. Therefore, methoxy and acetyl substituents have different effects on the protons of the pyranose ring.

Introduction

Interactions between carbohydrates and proteins mediate many fundamental and complex phenomena, such as allergic reactions, embryogenesis, tissue development, fertilization, metastasis, bacterial cell wall recognition, and protein hydration and stability.^{1–7} It has been demonstrated that these interactions are facilitated by the formation of hydrogen bonds.⁸ However, CH/ π stacking is very common in the recognition sites of

proteins that recognize carbohydrates such as galectins⁹ and mediate the interaction between carbohydrates and the aromatic residues of the side chains of Trp, Tyr, Phe, and His present in the receptors. CH/ π interactions have their origin in dispersion forces, which have an impact on the enthalpic term of the free energy.¹⁰ Depending on the chemical nature of the interacting groups, the CH/ π interaction may contribute more stabilizing energy than a hydrogen bond; therefore, it may become difficult to evaluate the actual energy contribution of each type of interaction when they are competing. Because of the importance of CH/ π interactions and the intrinsic difficulty in their proper description, multiple efforts have been made to characterize them. When the C–H group is highly acidic, as is the case for the C–H group of chloroform, the CH/ π interaction is intense. However, when the hydrogen group donor is not very acidic, the participation of several C–H bonds in the proper orientation

[†] Universidad Nacional Autónoma de México.

[‡] Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.

[§] Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

- (1) Kitov, P. I.; Bundle, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16271–16284.
- (2) Thobhani, S.; Ember, B.; Siriwardena, A.; Boons, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7154–7155.
- (3) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science* **2001**, *291*, 2357–2364.
- (4) Simanek, E. E.; McGarvey, G. J.; Jablonowski, J. A.; Wong, C. H. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 833–862.
- (5) Wies, W. L.; Drickamer, K. *Annu. Rev.* **1996**, *65*, 441–473.
- (6) Vyas, N. K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, *1*, 732–740.
- (7) Gabius, H.-J.; Siebert, H.-C.; André, S.; Jiménez-Barbero, J.; Rüdiger, H. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 740–764.

(8) Scheiner, S. *Molecular Interactions: From van der Waals to Strongly Bound Complexes*; Wiley: New York, 1997.

(9) Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637–674.

(10) Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*; University Science Books: Sausalito, CA, 2005.

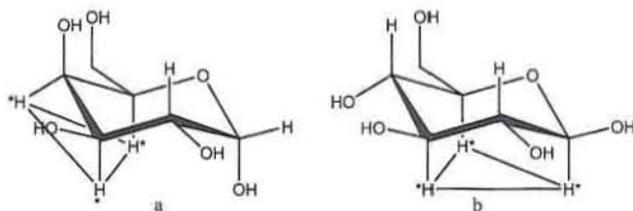


Figure 1. Orientation of the three hydrogen atoms required to interact with the aromatic molecule through the corresponding CH/ π interactions. The hydrogen atoms marked with an asterisk establish the molecular region capable of stacking. The disposition indicated in **a**, α -galactose (positions 3, 4, 5) corresponds to a consecutive arrangement; that in **b**, β -glucose, (positions 1, 3, 5) belongs to an alternated arrangement.

is necessary for interaction. This is very relevant when carbohydrates interact with aromatic compounds in the recognition site of a protein. Due to the lack of acidity of the hydrogen atoms of the carbohydrate's pyranose ring, at least three hydrogen atoms must be located in the same molecular region, and there must be enough space to allow their proximity to the aromatic compound (Figure 1). This orientation can be of two types: consecutive, as in α -galactose (**a**, Figure 1), or alternated, as in β -glucose (**b**, Figure 1). Previous studies of the CH/ π interaction have been based on the individual use of diverse analytical, biochemical, and biophysical techniques, such as calorimetry,¹¹ X-ray analysis,^{12–14} NMR,¹⁵ IR,¹⁶ and molecular modeling.^{17,18} These studies have been published as different attempts to properly describe the interactions.^{19–22} However, the method presented herein, with the combination of NMR, calorimetry, and theoretical calculations to adequately describe the nature of the interaction, has not been reported before.

Knowledge of all the factors that control this interaction would be of fundamental importance for modifying and modulating the affinity of natural receptors, depending on the process under study, and should be instrumental in improving the design of artificial receptors, as well as for the rational design of carbohydrate- or glycomimetic-based pharmaceuticals.²³

Undoubtedly, a rigorous way to establish the nature of a weak interaction would be to determine its associated energy, as well

as the molecular region where it is produced.¹⁷ Only with this knowledge it is possible to avoid speculation. Thermodynamic data may allow researchers to establish the magnitude of interactions but do not provide direct evidence of their specificity. The nature and structure of the solvent molecules, behaving as individuals or as a bulk, are also of paramount relevance to determine the specificity or lack thereof of the interaction between two different entities, or between any entity and the solvent.

Experimental determination of thermodynamic binding data is essential for understanding the process itself, but also for evaluating the adequacy of the theoretical methods employed to model and quantify molecular interactions. Theoretical data strongly depend on the level of theory as well as on the correction of intrinsic failures in methodology such as the basis set superposition or the scaling of the zero-point energy. Some of the corrections required have their origin in the fact that the energy is usually calculated considering complex molecules as ideal gases.

Simple models are very useful to understand molecular recognition processes. On this basis, we have decided to focus on the investigation of isolated CH/ π interactions between sugars and aromatic moieties by eliminating the possibility of hydrogen bonding by using *O*-substituted sugars as well as the proper solvents. In the study presented herein, the sugar hydroxyls have been substituted by two common protecting groups: *O*-methyl and *O*-acetyl moieties. As solvent, we have chosen benzene to mimic the nonpolar, hydrophobic, and aromatic character of the lectin binding sites. Even if these modifications do not reproduce the conditions of the biological systems, it is useful to isolate the interactions to determine if the potential interaction between carbohydrates and aromatic substrates has an enthalpic origin or if it is purely entropic.

A key question arises: Can an aromatic molecule (benzene) differentiate between two isomeric carbohydrates? It is generally accepted that, besides solvation, two factors govern molecular recognition: complementarity and preorganization.^{24,25} Our study shows that, in fact, the interacting groups should complement each other but preorganization is not strictly essential for the CH/ π interaction to take place. Since weak interactions have their origin in dispersion forces, they also have an impact on the enthalpic term of the free energy; the existence of the CH/ π interaction can be demonstrated by measuring the energy involved, which should be stabilizing and dependent on the chemical nature of the interacting molecules, to be specific.^{16,26,27} To the best of our knowledge, this is the first time the interplay of calorimetric solvation data, NMR shielding effects, intermolecular NOEs, and theoretical calculations is used to draw conclusions about specific interactions between carbohydrates and proteins, and this could be established as an adequate methodology for this type of study.

Results and Discussion

a. Theoretical Calculations. Benzene was chosen as a good model to perform computational studies, since this molecule maintains the essence of the interaction between an aromatic moiety and a carbohydrate molecule. It is the simplest possible model and could help answer a key question: What is the

- (11) Bautista-Ibañez, L.; Ramírez-Gualito, K.; Quiróz-García, B.; Rojas-Aguilar, A.; Cuevas, G. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 849–857.
- (12) Itaka, Y.; Kodama, Y.; Nishihata, K.; Nishio, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1974**, 389–390.
- (13) Kodama, K.; Nishihata, K.; Nishio, M.; Itaka, Y. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1976**, 1490–1495.
- (14) Nishihata, K.; Nishio, M. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 1041–1044.
- (15) Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L.; Cañada, F. J.; Poveda, A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 549–555.
- (16) Stanca-Kaposta, E. C.; Gamblin, D. P.; Screen, J.; Liu, B.; Snoek, L. C.; Davis, B. G.; Simons, J. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *8*, 4444–4451.
- (17) Fernández-Alonso, M. C.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7379–7386.
- (18) Raju, R. K.; Ramraj, A.; Vincent, N. A.; Hillier, I. H.; Burton, N. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6500–6508.
- (19) Sauter, N. K.; Hanson, J. E.; Glick, G. D.; Brown, J. H.; Crowther, R. L.; Park, S. J.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9609–9621.
- (20) Emsley, P.; Fotinov, C.; Black, I.; Fairweather, N. F.; Charles, I. G.; Watts, C.; Hewitt, E.; Isaacs, N. W. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8889–8894.
- (21) Pascal, J. M.; Day, P. J.; Monzingo, A. F.; Ernst, S. R.; Robertus, J. D.; Iglesias, R.; Pérez, Y.; Ferreras, J. M.; Citores, L.; Girbés, T. *Proteins: Struct., Funct. Genet.* **2001**, *43*, 319–326.
- (22) Vandenbussche, S.; Dolores Díaz, D.; Fernández-Alonso, M. C.; Pan, W.; Vincent, S. P.; Cuevas, G.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; K., K. B. *Chem.—Eur. J.* **2008**, *14*, 7570–7578.
- (23) Terraneo, G.; Potenza, D.; Canales, A.; Jiménez-Barbero, J.; Baldrige, K. K.; Bernardi, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2890–2900.

- (24) Koshland, D. E. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1958**, *44*, 98–123.
- (25) Fischer, E. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985–2993.
- (26) Eblinger, F.; Schneider, H.-J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 826–829.
- (27) Hossain, M. A.; Schneider, H.-J. *Chem.—Eur. J.* **1999**, *5*, 1284–1290.

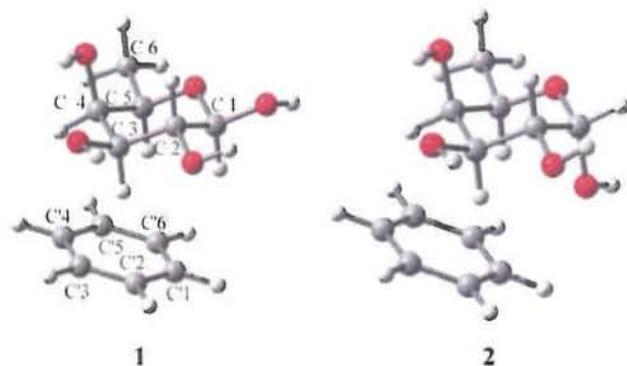


Figure 2. Structures of the benzene/ β -fucose (**1**) complex¹⁷ and benzene/ α -fucose (**2**) complex at the MP2/6-31G(d,p) level of theory with BSSE correction incorporated during the full geometry optimization procedure.

relationship between molecular complementarities and the specificity of the interaction?

At the beginning of this study, a nonsubstituted regular sugar was employed. Using computer simulations, it is possible to orient the aromatic group (benzene) toward the nonpolar region of the carbohydrate, thus avoiding the participation of hydrogen bonds, which prevails over CH/ π interactions *in vacuo*. To simplify the conformational problems posed by the presence of the sugar hydroxymethyl group, it was changed to a simple methyl group, as in 6-deoxy sugars. Therefore, we used fucose as the model for galactose. Moreover, to restrict the degrees of freedom of the hydroxyl groups, intramolecular OH \cdots OH hydrogen bonds were forced by orienting the hydroxyls in a cooperative counterclockwise (from the perspective of the carbohydrate's β face) manner.

The supramolecular structures of the β -(**1**) and α -fucose (**2**) associated with benzene obtained at the MP2/6-31G(d,p) level with the basis set superposition error (BSSE) correction incorporated during the full optimization process of the geometry are presented in Figure 2. The interaction energy reported for the benzene/**1** complex was previously described¹⁷ and is -12.5 kJ mol⁻¹, while we calculated that for epimer **2** in this study at the same level of theory to be -11.3 kJ mol⁻¹. Even when in both supramolecules the benzene is oriented laterally, the presence of a hydroxyl group in the anomeric position (C1) of **2** generates a repulsive environment that, on average, places the benzene moiety more separated from **2** than from **1**, especially at this region. Following are the distances for complexes **1** and **2**, respectively: C1–C'1, 4.52 and 4.94 Å; C2–C'2, 4.82 and 5.04 Å; C3–C'3, both 3.96 Å; C4–C'4, 4.05 and 3.97 Å; and C5–C'5, 3.89 and 4.02 Å.

b. Thermochemistry. Although factors such as the disruption of the packing forces in the presence of a solvent (i.e., benzene), the differences in the solvation of the solutes, and the degree of solvation, among others, may play a role in the enthalpic changes measured in an experiment, it is possible to estimate the energy associated with the interaction generated by van der Waals complexes because the system used as the reference (**6**) lacks the interaction of interest but it can be assumed, through the design of the experiment, that all the other conditions are similar. Thus, by measuring the amount of heat exchanged when benzene binds to the carbohydrate and comparing the systems, it is possible to assume that the difference in energy is related to the CH/ π interaction.

Nevertheless, since it is essential that the carbohydrate be soluble in benzene, the direct experiment could not be per-

formed. Therefore, substitutions at the hydroxyl groups were introduced. In principle, the chosen substituent should not interact with benzene to a significant extent; thus, methyl groups were chosen as a first approximation. Moreover, this structural modification has the advantage of removing the possibility of hydrogen bonding, which could compete with the CH/ π interaction.

To make the chemical modifications to the compounds of interest, permethylation was done according to the conditions described by Wang et al.²⁸ using iodomethane as the alkylating agent. Compounds were purified and characterized by different techniques (see Supporting Information). Compound β -Me₅Gal (**4**) was crystallized, and its X-ray diffraction-based structure is shown in Figure 3.

One more important issue that could arise is the fact that the methyl groups could generate a congested environment that would interfere with the interaction. Figure 3 shows the two conformers present in the crystalline network of β -Me₅Gal. In the solid state, β -Me₅Gal has an extended conformation where there is enough space for the approach of a benzene molecule. In fact, there are four C–H bonds on the α face of the carbohydrate available for providing CH/ π interactions. Mobility of the *O*-methyl groups could challenge the approach of the aromatic ring, and establishment of the interaction could, in addition, constrain the expected motion of these pendant groups in solution with the concomitant conformational restrictions and the corresponding entropic penalty.

Nevertheless, according to the X-ray structure for the putative complex with benzene, in the key sugar regions where three C–H vectors exist close in space to generate the patch for benzene interaction, the existing oxygen atoms are located in such a way that they are not able to generate repulsive environment to form the van der Waals complex.

Rigorous analysis of the interaction energy should also consider the solvation energy. In the present context, the term "solvation process" refers to the energetic and structural changes occurring in a system upon transferring solute molecules into the solvent. These changes could result in the disruption of intramolecular interactions within the solvent and solute, as well as the formation of new intermolecular interactions between the molecules of solute and solvent.²⁹ In our case, when comparing the different carbohydrates, the existing differences in the solvation enthalpies should reflect the magnitude of the interaction of each sugar isomer with the solvent molecules. Scheme 1 shows the terms required to determine this thermodynamic property. The enthalpy of phase change as well as the dissolution enthalpy can be determined by direct measurement in a calorimeter.¹¹ The dissolution enthalpy values of α -Me₅Gal (**3**), β -Me₅Gal (**4**), β -Ac₅Gal (**5**), and α -Me₅Man (**6**) solutes in benzene ($\Delta_{\text{dis}}H_m^\circ$) were then determined.

When considering the obtained $\Delta_{\text{dis}}H_m^\circ$ values, it is necessary to take into account the heat of the broken intramolecular interactions and the heat released when each molecule of solute gets in the bulk of the solution and is surrounded by a shell of solvent molecules.³⁰ It could be deduced that, for the solid compounds **4** and **5**, a positive value of this quantity was observed, indicating that these compounds are more stable in

(28) Wang, H.; Sun, L.; Glazebnik, S.; Zhao, K. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2953–2956.

(29) Krestov, G. A. *Thermodynamics of solvation*; Ellis Horwood: New York, 1991.

(30) Berry, R. S.; Rice, S. A.; Ross, J. *Physical Chemistry*; John Wiley and Sons: New York, 1980.

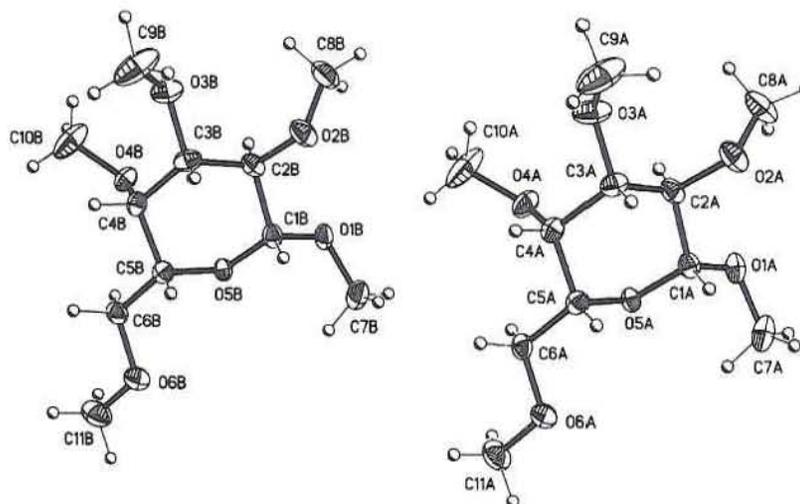


Figure 3. Conformation of β -Me₅Gal (**4**) in the solid state.

Scheme 1. Thermodynamic Determination of the Heat of Solvation

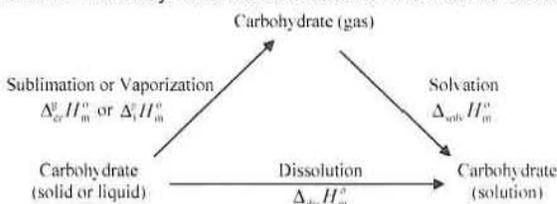


Table 1. Enthalpies of Solvation (in kJ mol⁻¹) of Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- α -D-galactopyranoside (α -Me₅Gal, **3**), Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- β -D-galactopyranoside (β -Me₅Gal, **4**), 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- β -D-galactopyranose (β -Ac₅Gal, **5**), and Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- α -D-mannopyranoside (α -Me₅Man, **6**) in benzene (1:10, mol:mol)^a

	$\Delta_{\text{sub}}H_m^0$	$\Delta_{\text{sub}}H_m^0$ or $\Delta_{\text{vap}}H_m^0$ ^b	$\Delta_{\text{sol}}H_m^0$	θ_{int} , \pm ^c
3	-0.67	88.37	-89.04	2.00
4	16.54	105.25	-88.71	5.54
5	12.10	144.64	-132.54	6.19
6	-3.65	75.18	-78.83	3.91

^a Calculated from the respective enthalpies of dissolution, determined by Calvet microcalorimetry at 303.15 K, and the enthalpies of phase change, determined by scanning calorimetry. ^b For solid compounds **4** and **5** it is reported the heat of sublimation $\Delta_{\text{sub}}H_m^0$, and for liquid compounds **3** and **6** it is reported the heat of vaporization $\Delta_{\text{vap}}H_m^0$. ^c θ_{int} is the overall uncertainty on the enthalpy of solvation, calculated from the uncertainties on the enthalpies of dissolution and phase change (see Supporting Information).

pure form than in solution. It can be anticipated that breaking the crystalline form of these molecules is energy demanding. In contrast, a negative, exothermic dissolution enthalpy can be observed for the two liquid compounds, **3** and **6**. The results are gathered in Table 1.

The mannose derivative **6** can be used as a reference since, according to our previous studies, the pyranose ring does not have the substitution pattern required for establishing a CH/ π interaction¹¹ (at least three C–H bonds exposed in the same molecular region).¹⁷ Thus, compound **6** cannot interact with benzene as a van der Waals complex. On the other hand, the data for **5** (β -Ac₅Gal) were employed to estimate the effect of the methyl group on the interaction. In this compound, the more acidic hydrogen atoms of the *O*-acetyl group show a distinct

chemical nature in comparison to those of the *O*-methyl group (as in **3**, **4**, and **6**).

The phase change enthalpies reflect the cohesive energy of the crystalline lattice in the case of the solid compounds. Strong dipolar intermolecular interactions must be predominant in compound **5** due to the *O*-acetyl groups. In fact, the heat of sublimation of this compound is the highest of the four substances studied. In pure compounds **3**, **4**, and **6**, intermolecular interactions between *O*-methyl groups must be generated by dispersion forces, thus significantly reducing the heat of sublimation of β -Me₅Gal (**4**) with respect to that of β -Ac₅Gal (**5**), and even making compounds **3** and **6** liquids.

It should be noted that, for solid compounds **4** and **5**, the heat of sublimation $\Delta_{\text{sub}}H_m^0$ is reported. On the other hand, for liquid compounds **3** and **6**, the heat of vaporization $\Delta_{\text{vap}}H_m^0$ is reported. The solvation energy $\Delta_{\text{sol}}H_m^0$ of the mannose derivative, **6** (-78.8 ± 3.9 kJ mol⁻¹), indicates that this is the least stable system in benzene solution. As expected from the stereochemistry of the pyranose ring, the $\Delta_{\text{sol}}H_m^0$ values are higher for compounds **3** (-89.0 ± 2.0 kJ mol⁻¹) and **4** (-88.7 ± 5.5 kJ mol⁻¹). In principle, we can infer that the energy difference between galactose derivatives **3** and **4**, and the mannose analogue, **6**, is due mainly to the CH/ π energy. This can be estimated through eq 1.¹¹

$$\text{CH}/\pi \text{ energy} = \Delta_{\text{sol}}H_m^0(\mathbf{3} \text{ or } \mathbf{4}) - \Delta_{\text{sol}}H_m^0(\mathbf{6}) \quad (1)$$

At this point, it is possible to assume that the $\Delta_{\text{sol}}H_m^0$ term of **6** only includes the interactions between the *O*-methyl groups and the solvent, while the same term $\Delta_{\text{sol}}H_m^0$ for **3** and **4** also includes the CH/ π interaction. According to this approximation, the CH/ π interaction between the methyl galactopyranoside epimers and benzene amounts to 10.2 and 9.9 kJ mol⁻¹ for **3** and **4**, respectively. Although only an approximation, these values are strikingly in agreement with the values calculated at the MP2/6-31G(d,p) level when the BSSE correction is included during the optimization process, 12.5 kJ mol⁻¹ for model complex **1**¹⁷ and 11.3 kJ mol⁻¹ for **2**.

Carbohydrate–aromatic interactions have been widely studied using computational methods. The obtained energy values oscillate between 10.5 and 20.9 kJ mol⁻¹ when the MP2 method is used. Since the different theoretical methods include different levels of approximation,^{31–33} with diverse considerations of the repulsive and attractive, it is of paramount importance to access

the experimental reference values around 10.0 kJ mol⁻¹ in order to estimate the quality of the different theoretical treatments.

For the penta-*O*-acetyl compound **5**, the heat of sublimation is 144.6 kJ mol⁻¹, in concordance with its vapor pressure. Interestingly, the interaction of this molecule with benzene amounts to -132.5 kJ mol⁻¹, the most stabilizing one observed in the present study. If there were no stabilization mediated by the CH/π interaction with the hydrogen atoms at the ring, the observed stabilization energy would have its origin in the independent interaction of the acetyl groups with the benzene molecules. If the solvation value of **5** is subtracted from the solvation of compound **6**, there is a difference of -53.7 kJ mol⁻¹. It is possible to contemplate that, on average, each of the *O*-acetyl group interactions contributes with -10.7 kJ mol⁻¹, a value expected for a CH/π interaction.

c. NMR Determinations. As mentioned above, thermodynamic data can be used to establish the existence of the interaction but not the region of the molecule where it happens. NMR can be safely employed for this purpose. This technique has been nicely used for the detection of intermolecular NOEs to study interactions of specific complexes such as cyclodextrins and trifluoroethanol³⁴ or cyclodextrins and aromatic compounds.³⁵ In this context, the use of an anisotropic titration procedure has established that β-galactose and benzene¹¹ or phenol¹⁷ interact in the region of the C3–C6 segment of the carbohydrate, basically as described by the theoretical calculations.

Saccharides are amphipathic substances.³⁶ Substitution of the carbohydrate hydroxyl with methyl groups increases its hydrophobic properties and, in principle, should facilitate the access of aromatic molecules to the proximity of the pyranose ring. However, a pattern originated by specific and stabilizing CH/π interactions would decrease the translational and rotational degrees of freedom of the molecule. On the other hand, when considering solvation, in the absence of specific interactions, the approach of benzene molecules to the sugar would be random.

Table 2 presents the differences in the ¹H NMR chemical shifts of the compounds under study in chloroform-*d* and benzene-*d*₆. A positive value indicates shielding, thus protection, and the possibility that the corresponding proton interacts with the benzene face. In other words, it is within the anisotropic cone of the aromatic entity and allows the location of one benzene molecule close to a specific region of the carbohydrate ring.

A factor common to all the carbohydrates studied herein is that all the methyl groups are shielded in the presence of benzene. For the *O*-methyl sugars, the observed values oscillate between 0.10 and 0.30 ppm, while for the acetylated systems, the values are much larger, ranging from 0.34 to 0.61 ppm. These observations can be correlated with the different chemical nature of the *O*-acetyl with respect to the *O*-methyl group and its tendency to interact in a much stronger manner with benzene molecules.

Table 2. Chemical Shift Difference, $\Delta\delta = \delta_{\text{CDCl}_3} - \delta_{\text{C}_6\text{D}_6}$ (in ppm), for Compounds **3–6**

	α -Me ₅ Gal, 3	β -Me ₅ Gal, 4	β -Ac ₅ Gal, 5	α -Me ₅ Man, 6
H1	0.01	0.01	-0.13	0.15
H2	-0.18	-0.37	-0.38	0.13
H3	-0.08	0.18	-0.09	-0.10
H4	0.17	0.20	0.01	-0.20
H5	-0.05	0.24	0.60	-0.15
H6proS	-0.01	0.04	0.06	0.01
H6proR	-0.04	-0.02	0.06	0.06
Me(1)	0.22	0.13	0.56	0.24
Me(2)	0.25	0.02	0.42	0.24
Me(3)	0.25	0.25	0.41 or 0.29 ^a	0.26
Me(4)	0.10	0.10	0.61	0.10
Me(5)	0.27	0.30	0.46 or 0.34 ^a	0.19

^aChemical shifts of methyl(3) and methyl(5) are interchangeable.

If the ring protons are now considered for β-galactoside **4**, the hydrogen atoms at positions 3, 4, and 5 are strongly shielded, with values that range between 0.18 and 0.24 ppm. This experimental fact contrasts with the observations for the α-mannoside **6**, where there is a lack of protection for the same hydrogen atoms. Indeed, the observed differences are the opposite, with values ranging between -0.10 and -0.20 ppm. This is expected since the presence of an equatorial methoxyl group at position 4 of mannose, just in the region of approach of benzene, generates a repulsive environment, and thus, the CH/π interaction does not take place.

Between these two cases, for **3** and **5** there are intermediate observations. For **3**, the protection of H-4 is high ($\Delta\delta = 0.17$ ppm), while there is lack of protection of H-3 and H-5 (-0.08 and -0.05 ppm, respectively). The presence of one axial methoxy group at the anomeric position should account for these values.

The ¹H NMR data of compound **5** are particularly relevant. The annular protons appear downfield from the methylated compounds, although this is a regular behavior for *O*-acetylated sugars. Besides the electron-withdrawing effect of the acetyl groups, there are some structural features that deserve attention. In the solid-state X-ray structures of both β-Ac₅Gal (**5**)^{37,38} and α-Ac₅Gal³⁹ (Figure 3), the OCOC segments (where the initial O is that of the carbonyl group and the final C is part of the carbohydrate ring of the β-Ac₅Gal) have values of 1.61° for C1, 7.19° for C2, 4.99° for C3, 3.13° for C4, and 1.47° for C5. This shows that the different carbonyl groups eclipse the protons that are part of the galactose ring; these protons are paramagnetically shifted because they are located in the deshielding region of the carbonyl group. These conformational preferences have been studied before,^{40,41} and it has been reported that the preferred conformation is that where the C–O bond of the carbonyl is parallel to the C–H bond of the pyranose ring. Indeed, our observations, including the chemical shifts, are in accordance with those studies, suggesting that the conformations in solution and in the solid state are similar. At the same time,

- (31) Spiwok, V.; Lipovová, P.; Skálová, T.; Vondráčková, E.; Dohnálek, J.; Hašek, J.; Králová, B. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2005**, *19*, 887–901.
 (32) Sujatha, M. S.; Sasidhar, Y. U.; Balaji, P. V. *Biochemistry* **2005**, *44*, 8554–8562.
 (33) Sujatha, M. S.; Sasidhar, Y. U.; Balaji, P. V. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 2502–2514.
 (34) Guerrero-Martínez, A.; Berger, S.; Tardajos, G. *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 2074–2076.
 (35) Ribeiro, J. P.; Bacchi, S.; Dell'Anna, G.; Morando, M.; Canada, F. J.; Cozzi, F.; Jimenez-Barbero, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5891–5898.
 (36) Quijcho, F. A.; Vyas, N. K. *Nature* **1984**, *310*, 381–386.

- (37) Thibodeaux, D. P.; Johnson, G. P.; Stevens, E. D.; French, A. D. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2301–2310.
 (38) Kumar, R.; Tiwari, P.; Maulik, P. R.; Misra, A. K. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2335–2339.
 (39) Roslund, M. U.; Klika, K. D.; Lehtilä, R. L.; Tähtinen, P.; Sillanpää, R.; Leino, R. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 18–25.
 (40) Lopez-Calahorra, F.; Velasco, D.; Castells, J.; Jaime, C. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3530–3536.
 (41) Osawa, E.; Imai, K.; Fujiyoshi-Yoneda, T.; Jaime, C.; Ma, P.; Masamune, S. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4579–4590.

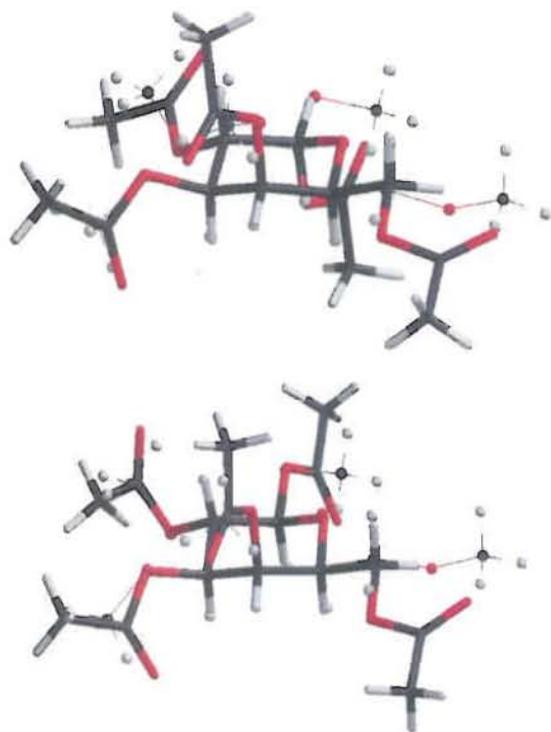


Figure 4. Superposition of β -Me₅Gal (**4**, ball and sticks) with the α -Ac₅Gal (top) and β -Ac₅Gal **5** analogues (bottom) (wire frame).

this conformational arrangement puts the oxygen atom in the region needed for the interaction with benzene. Similar results are observed in the α -Ac₅Gal anomer. Therefore, the interaction of the ring protons with the benzene moieties is geometrically disfavored by the repulsive environment generated by the carbonyl orientation. Figure 4 shows the superposition of one of the β -Me₅Gal conformers, **4** (balls and sticks), with the anomers β -Ac₅Gal, **5** (Figure 3a), and α -Ac₅Gal (Figure 3b) (wire frame), suggesting the difficulty of establishing proper interactions between the ring protons of the acetylated sugars and an approaching aromatic moiety.

Indeed, for **5**, only the region around H-5 on the side of the hydroxymethyl group is available for the interaction with the aromatic moiety. This explains the observed protection and thus shielding of H-5.

The NMR results may also be satisfactorily integrated with the calorimetry data. In fact, although in compound **5** the hydrogen atoms of the ring are not capable of participating in CH/ π interactions, the molecule can interact with the aromatic compound through the *O*-acetyl groups. Again, on this basis, it can be assessed that the nature of the *O*-methyl and *O*-acetyl groups is rather different.

NOE experiments were also performed to try to detect the possibility of close proximity between the carbohydrate and benzene. The detection of intermolecular NOEs between solvent and small organic molecules has been used to establish the way in which solutes are solvated.^{34,42–45} For the modified carbo-

hydrates **3–5** at the same concentration (ca. 0.24 M), similar experimental parameters were employed (Figure 5). The different behavior observed for those molecules is notorious. As expected, for all the molecules, the methyl group showed significant NOEs, indicating its direct interactions with benzene.

In contrast, the NOEs observed for the ring protons of the different molecules are rather different. For β -Me₅Gal (**4**) there are clear intermolecular NOEs on H-3, H-4, and H-5 based upon the difference of the steady NOE spectra, supporting the existence of interactions between the carbohydrate and the aromatic moiety. The observed NOEs for α -Me₅Gal **3** are smaller than those for **4**, and those observed for β -Ac₅Gal (**5**) are just above the noise signal.

Therefore, the experimental NOE data (supported by the chemical shift perturbation analysis) seem to indicate that benzene interacts with the different sugars, but much more strongly with the bottom ring face of β -Me₅Gal (**4**), as also indicated by the theoretical calculations. It is noticeable that the ring protons of mannopyranoside **6** have very little interaction with benzene, although it has been observed that this interaction depends on the sample concentration (the study of this effect is in progress, see Supporting Information). Finally, for the peracetylated compound **5**, very weak NOEs are observed. This observation may be safely explained by the lack of direct interaction between benzene and the sugar ring protons. The tiny effects observed could be due to indirect reorientation effects provoked by the interaction of benzene molecules with the methyl groups of the *O*-acetyl substituents. The different intensities of the NOEs observed in Figure 5 for each carbohydrate can be associated with its proximity to the benzene ring. In all cases, the methyl groups that are necessarily solvated and close to the solvent show intense signals. The intensity of the signals follows the order of approximation established by the theoretical calculations: higher intensities and thus closer proximity of the β -galactose derivative, less for the α isomer, and very small for the acetylated compound (Figure 6). For the peracetylated compound β -Ac₅Gal (**5**), the preferred interaction of the benzene molecules with the acetyl groups could be observed through NOESY cross peaks (see Supporting Information).

A scheme representing the observed interactions is shown in Figure 6. Very few experimental observations on the existence of aromatic–sugar interactions when exploring acetylated or methylated carbohydrate molecules have been reported and systematically compared. Recently, Waters et al.^{46–48} studied the attractive interaction between one tryptophan residue and a diagonally cross-stand tetra-*O*-acetyl-Glc-Ser, fundamental to stabilize the folding of a β -hairpin.⁴⁸ NMR data were used to demonstrate the existence of the interaction between the α face of the carbohydrate and the tryptophan residue. The authors stated that, when the acetyl groups are eliminated, the interaction with tryptophan is lost. This result is not expected since CH/ π interactions do, indeed, take place for natural carbohydrates (unsubstituted) in aqueous solutions.¹⁷ Thus, the absence of the acetyl groups should maintain the CH/ π interaction if it exists. Given the particular geometrical arrangement of the studied glycopeptides, it could be possible that instead of (or besides)

(42) Berger, S.; Diaz, M. D.; Hawat, C. *Pol. J. Chem.* **1999**, *73*, 193–197.

(43) Bagno, A.; Rastrelli, F.; Scorrano, G. *J. Magn. Reson.* **2004**, *167*, 31–35.

(44) Angulo, M.; Hawat, C.; Hofmann, H.-J.; Berger, S. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1049–1052.

(45) Brand, T.; Cabrita, E. J.; Berger, S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, *46*, 159–196.

(46) Kiehna, S. E.; Laughrey, Z. R.; Waters, M. L. *Chem. Commun.* **2007**, 4026–4028.

(47) Tatko, C. D.; Waters, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2028–2034.

(48) Laughrey, Z. R.; Kiehna, S. E.; Riemen, A. J.; Waters, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14625–14633.

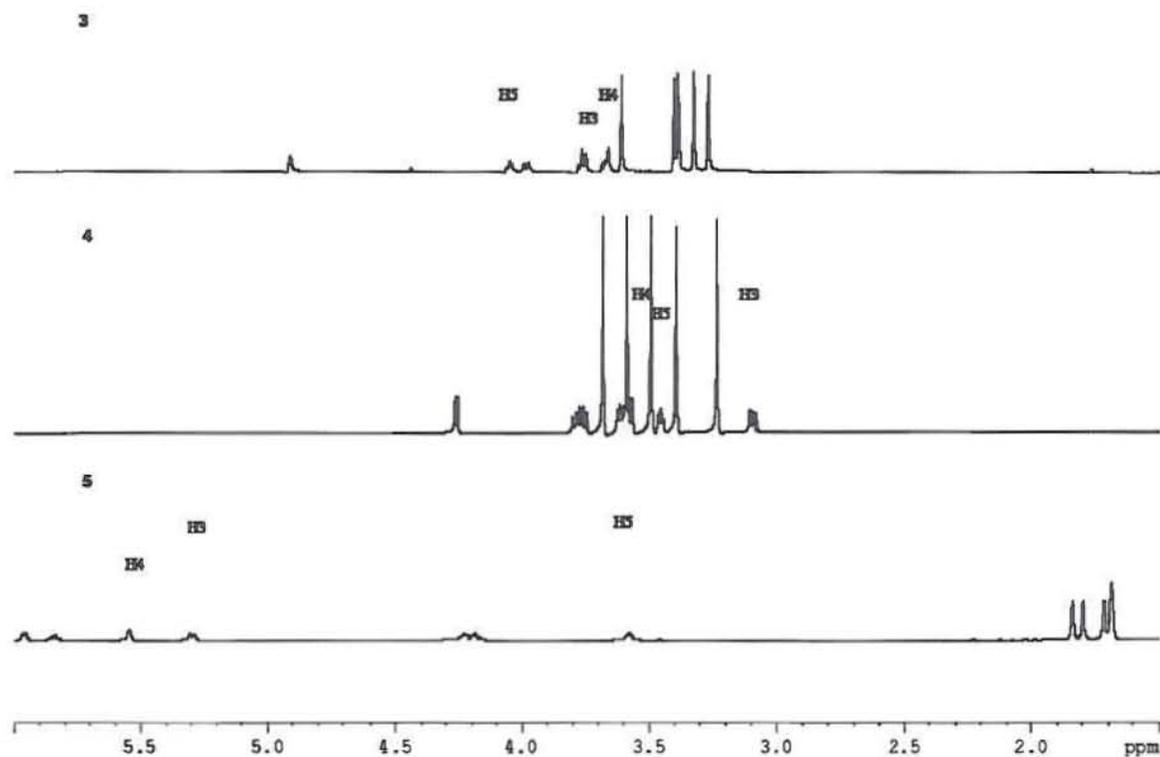


Figure 5. Comparative NOEs on compounds **3**, **4**, and **5** at 298 K upon inversion of the solvent signal (benzene). The intensity scale is the same for all cases.

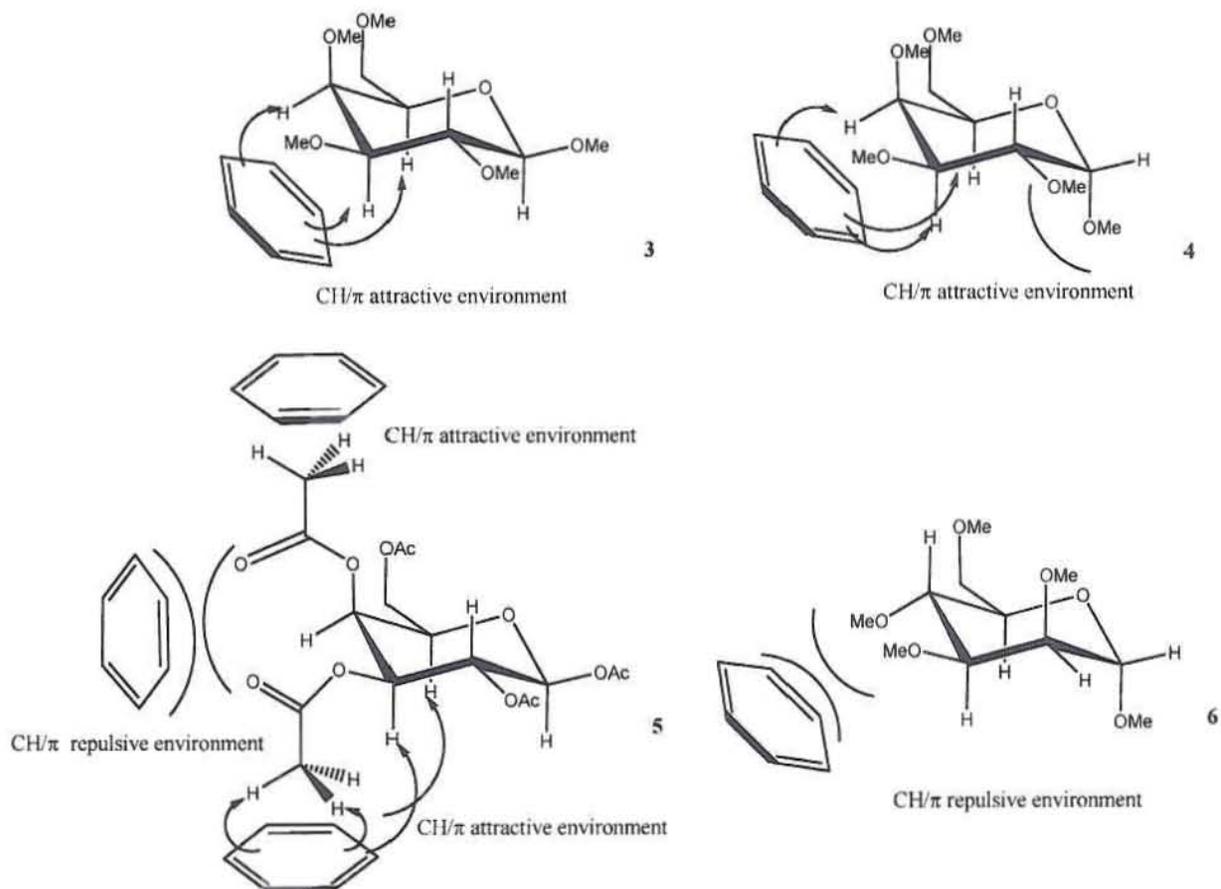


Figure 6. Origin of the observed NOE for compounds **3** and **4** (top), **5** and **6** (bottom).

an increase in the cost of solvation of the unsubstituted glucose suggested by the authors, additional dominant interactions between the methyl group of one of the acetyl groups and tryptophan take place. The energy associated with the phenomenon would certainly point toward this interaction and would be in line with our results. A study of the interaction between the carbohydrate and the aromatic in systems free of other interactions would be needed to better identify its energy and dynamics.

Obviously, in complex molecules, such as those glycopeptides mentioned above, the interaction phenomenon would be a consequence of different processes, including the solvation/desolvation process. However, it has also been shown that nonsubstituted sugars may also effectively interact with aromatic moieties, in a nonambiguous manner.¹⁷ Thus, for each particular case, many factors should be considered, including sugar ring-to-aromatic interactions, methyl-to-aromatic interactions, and the role of solvation, especially for complex biomolecules. In any case, from our perspective, it is sound to systematically study the interaction between carbohydrates and aromatic moieties in systems free of additional interactions, which may substantially modify and modulate the structural observations and energy measurements.

Today, structures of various complexes formed by carbohydrates bound to the recognition sites of proteins determined by X-ray are available in different databases. Many lectin/sugar complexes relevant to this study have been described.⁴⁹ For example, the complex formed by evulin I (a nontoxic protein that inactivates ribosomes) and β -galactose, where the relevant interaction occurs with a tryptophan residue of the protein, is in perfect agreement with the results described here.²¹ The same is true for the interaction between the nonreducing residue of the disaccharide α Gal1,3 β GalOMe and a tryptophan residue of isolectin I-B4 from *Griffonia simplicifolia*.⁵⁰ A good example where the aromatic residue is tyrosine is fucosyllactose (α Fuc1,2 β Gal1,4Glc), when this amino acid interacts with lectin II of *Ulex europaeus*.⁵¹ In light of the study presented, it is possible to establish that the interactions between the carbohydrate and the aromatic residues of the proteins mentioned above have a stabilizing nature and an effect on the enthalpic term of the Gibbs free energy. It is noticeable that the CH/ π interaction is a key contribution, in addition to rest of the typical interactions of the biological media that include hydrogen bonds, among others.

Conclusions

The interaction energies of α -Me₃Gal (**3**), β -Me₃Gal (**4**), β -Ac₃Gal (**5**), and α -Me₃Man (**6**) with benzene, computed as the enthalpy of solvation determined using Calvet microcalorimetry and differential scanning calorimetry, are -89.0 ± 2.0 , -88.7 ± 5.5 , -132.5 ± 6.2 , and -78.8 ± 3.9 kJ mol⁻¹, respectively. This confirms that the nature of these interactions is enthalpic.

From the structural viewpoint, the interacting regions have been determined by using NMR experiments. While for β -Me₃Gal, the interaction takes primarily place using the (*R*-) α -face of the carbohydrate for establishing CH/ π interactions with benzene, for α -Me₃Man no interaction of this type is

detected. For acetylated sugars, chemical shifts and NOE data demonstrate that the methyl groups of the *O*-acetyl substituents effectively interact with benzene. These methyl groups generate a repulsive environment around the sugar ring that precludes efficient CH/ π interaction with the *R*-face of the sugar. Calorimetry measurements indicate that every methyl group contributes to the stability of the system with an energy of ca. -10.7 kJ mol⁻¹. Moreover, methyl groups in *O*-acetyl substituents behave differently from those in *O*-Me moieties when interacting with benzene. Although not completely substantiated, this fact may have its origin in the polarization of the methyl hydrogens in the *O*-acetyl group, which contributes to its well-known acidity. Benzene can recognize and differentiate the α - and β -anomers of permethylated galactose from the mannose analogue and from the corresponding per-*O*-acetylated galactose derivatives. For the simple per-*O*-acetylated monosaccharide models, such as those studied herein, the acetyl groups do interact intensely with benzene and, in addition, block its access to the (*R*-) α -face of the carbohydrate. Previous reports suggesting that a methyl from an acetyl group is similar to a methyl group of a methoxy group were reinterpreted in terms of our findings. The observed effect could be a consequence of the methyl of the acetyl group—aromatic interaction instead of a carbohydrate—aromatic one.

Our novel use of a combination of NMR measurements with theoretical calculations and calorimetric data has satisfactorily supported an interaction model for substituted carbohydrate—aromatic interactions in simple models and could be adopted for other similar studies. The role of solvent and osmolites for modulating the observed interaction is now under study in our laboratories.

Experimental Section

General Procedure To Carry Out the Permethylation of Carbohydrates.²⁸ Methyl-*D*-pyranoside (1 g, 5.15 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dimethyl sulfoxide (7 mL). NaOH aqueous solution (50%, w/w) (10 mL, 50 mmol, 9.70 equiv) was added slowly. The mixture was stirred to form a gel suspension, and CH₃I (3 mL, 48.18 mmol, 9.35 equiv) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 24 h. Water (100 mL) was added, and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 \times 100 mL). The combined organic phases were dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. All compounds were purified by flash column chromatography (silica gel, hexane/ethyl acetate 9:1). The product, methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -*D*-galactopyranoside (**3**), was dissolved in EtOAc (30 mL), activated charcoal was added (20%, w/w), and the black suspension was stirred for 20 min. The final product was recrystallized from hexane/CH₂Cl₂ (\geq 99.9%).

Methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -*D*-galactopyranoside (**4**) and methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -*D*-mannopyranoside (**5**) were purified by flash column chromatography (silica gel, hexane/ethyl acetate 9:1) and by activated charcoal column (CH₂Cl₂) to get \geq 99.9% purity for each compound. NMR signals assignments for compound **4** were done using HSQC, HMBC, NOESY, and COSY. 2D experiments are included in the Supporting Information.

Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- β -*D*-galactopyranoside (3**).**^{52–54} Yield: 875 mg (68%). White solid, mp 45–47 °C. IR (KBr): 2979, 2921, 2836, 1448, 1373, 1334, 1305, 1183, 1073, 1106, 957, 997, 957, 908, 876, 740, 660. ¹H NMR (500 MHz, C₆D₆): 2.97 (dd, *J* = 9.5, 3.0, 1H_s); 3.11 (s, 3H, Me₃); 3.27 (s, 3H, Me₃); 3.33 (ddd, *J* = 1.5, 5.5, 7.5, 1H_s); 3.37 (s, H, Me₁); 3.46 (dd, *J* = 1.0, 3.0,

(49) <http://webenligne.cermav.cnrs.fr/lectines>.

(50) Templel, W.; Tschampel, S.; Woods, R. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6615–6621.

(51) Loris, R. D. G. H.; Dao-Thi, M.-H.; Messens, J.; Imberty, A.; Wyns, L. *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 987–1002.

(52) Asres, D. D.; Perreault, H. *Can. J. Chem.* **1999**, *77*, 319–325.

(53) Rathbone, E. B.; Stephen, A. M.; Pachler, K. G. R. *Carbohydr. Res.* **1971**, *20*, 141–150.

(54) Rathbone, E. B.; Stephen, A. M.; Pachler, K. G. R. *Carbohydr. Res.* **1972**, *21*, 73–81.

$^1\text{H}_1$); 3.50 (dd, $J = 5.5, 9.0, 1\text{H}_{6a}$); 3.57 (s, 3H, Me $_3$); 3.64 (dd, $J = 8.0, 9.5, 1\text{H}_{6b}$); 3.68 (dd, $J = 7.5, 10.0, 1\text{H}_2$); 4.15 (d, $J = 7.5, 1\text{H}_1$). ^{13}C NMR (125 MHz, C_6D_6): 56.3 (Me $_1$); 58.3 (Me $_3$); 58.8 (Me $_5$); 60.7 (Me $_2$); 60.9 (Me $_4$); 71.4 (C $_6$); 73.4 (C $_5$); 75.6 (C $_1$); 81.3 (C $_2$); 84.9 (C $_3$); 105.3 (C $_1$). CI-MS: 251 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; $[\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_6]^{H^+}$).

Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- α -*D*-galactopyranoside (4).^{52, 54}
Yield: 759 mg (59%). Yellow liquid. IR (film): 2979, 2910, 2829, 1450, 1359, 1252, 1199, 1098, 1053, 986, 954, 883, 764, 665. ^1H NMR (500 MHz, C_6D_6): 3.14 (s, 3H, Me $_5$); 3.20 (s, 3H, Me $_1$); 3.26 (s, 3H, Me $_2$); 3.27 (s, 3H, Me $_3$); 3.52 (m, 1H_{6a}); 3.53 (m, 1H_1); 3.60 (dd, $J = 2.5, 9.0, 1\text{H}_{6b}$); 3.62 (m, 1H_3); 3.82 (dd, $J = 4.0, 10.5, 1\text{H}_{6b}$); 3.90 (m, 1H_5); 4.77 (d, $J = 3.0, 1\text{H}_1$). ^{13}C NMR (125 MHz, C_6D_6): 55.0 (Me $_1$); 58.2 (Me $_3$); 58.4 (Me $_2$); 58.8 (Me $_5$); 61.0 (Me $_4$); 70.0 (C $_5$); 71.8 (C $_6$); 77.0 (C $_4$); 78.8 (C $_2$); 81.0 (C $_3$); 98.8 (C $_1$). CI-MS: 251 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; $[\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_6]^{H^+}$).

Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- α -*D*-mannopyranoside (6).⁵⁵
Yield: 797 mg (62%). Yellow liquid. IR (film): 2980, 2909, 2829, 1451, 1377, 1291, 1191, 1114, 1065, 997, 971, 871, 795, 662. ^1H NMR (500 MHz, C_6D_6): 3.13 (s, 3H, Me $_1$); 3.12 (s, 3H, Me $_3$); 3.22 (s, 3H, Me $_3$); 3.23 (s, 3H, Me $_1$); 3.42 (s, H $_4$); 3.43 (dd, $J = 2.0, 3.0, 1\text{H}_2$); 3.53 (dd, $J = 2.0, 11.0, 1\text{H}_{6a}$); 3.58 (m, 1H_{6b}); 3.60 (m, 1H_3); 3.62 (m, 1H_4); 3.70 (m, 1H_5); 3.68 (dd, $J = 7.5, 10.0, 1\text{H}_5$); 4.64 (d, $J = 2.0, 1\text{H}_1$). ^{13}C NMR (125 MHz, C_6D_6): 54.4 (Me $_1$); 57.2 (Me $_3$); 58.9 (Me $_2$); 59.0 (Me $_5$); 60.4 (Me $_4$); 72.4 (C $_6$); 72.5 (C $_5$); 77.0 (C $_4$); 77.4 (C $_2$); 82.6 (C $_3$); 99.0 (C $_1$). CI-MS: 251 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; $[\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_6]^{H^+}$).

Compound 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- β -*D*-galactopyranose (**5**, $\geq 99.0\%$) was purchased from Aldrich and used without further purification.

NMR Experiments. Modified methylpyranoside (15 mg, 0.06 mmol) was dissolved in a mixture of C_6D_6 – C_6H_6 (0.25 mL–0.25 mL) to measure the NOE effect using a Bruker 500 MHz spectrometer. 1D NOE difference spectra were obtained upon irradiation of the benzene signal and internal subtraction of data acquired by on-resonance and off-resonance selective excitation on alternate scans.

X-ray Determination. Solid-state structure was resolved in a Bruker Smart Apex CCD X-ray diffractometer. See Supporting Information for details.

General Procedure To Measure the Enthalpies of Dissolution by Heat Flux Calorimetry. Dissolution experiments were performed by heat flux calorimetry, using a differential Setaram C80 Calvet calorimeter working in isothermal mode at 303.15 K. Sensitivity and temperature control of the calorimetric device has been described elsewhere.¹⁰ For dissolution experiments, stainless steel mixing with membrane vessels were employed, and the mass of each pyranoside and aromatic solvent was calculated in order to generate the maximal possible thermal signal but with a resulting molar relation carbohydrate–solvent, after the dissolution process, as near as possible to 1:10. The masses of the substances involved in each dissolution experiment were measured in an MC210 P Sartorius balance sensitive to 10 μg . After loading of the mixing vessels into the fluxmeters of the Calvet calorimeter, temperature and heat flux were stabilized by 60 min, and then data acquisition was started. Five minutes was enough to get a good initial baseline, and then the aluminum membrane that separates carbohydrate from the solvent inside of the mixing vessel was broken, and reversing of the C80 calorimeter was performed during 15 min to promote a total dissolution process. Analysis of the amplified dissolution curves, generated by the data treatment software of the C80 calorimeter, showed that a lapse of 115 min was enough for a total heat transfer from the dissolution cell to the fluxmeters. The C80 calorimeter works at constant pressure; consequently, integration of the curve of heat flux as a function of time releases directly the enthalpy of dissolution of each carbohydrate in the respective aromatic solvent. Tables including all data of mass and heat

involved in each dissolution experiment are provided in the Supporting Information.

General Procedure To Measure the Enthalpies of Sublimation and Vaporization by Differential Scanning Calorimetry. The calorimetric measurements of the enthalpy associated with the change from condensed to gas phase were performed using the isothermal or scanning operation of a modified Perkin–Elmer DSC7 differential scanning calorimeter.^{56,57} The sensitive element of this device is a DSC7 calorimetric holder assembly, located inside of a vacuum chamber and connected to the DSC7 analyzer by an electrical feed. The vacuum chamber is evacuated with a rotary vacuum pump, and residual pressure is monitored by a pressure gauge relayed to a Pirani gauge control. Perkin–Elmer 0219-0041 open standard aluminum pans were utilized as vaporization or sublimation cells.

For isothermal vaporization experiments on the methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -*D*-galactopyranoside, a temperature of 323.15 K was established as the most suitable from preliminary tests. For the measurement experiments, samples of around 10 mg of the liquid substance were placed inside the vaporization pan and weighed on a Sartorius 4503 microbalance sensitive to 1.0 μg . Once the prepared sample pans were loaded in the calorimetric sensor, temperature and heat flux were stabilized and data acquisition began. Three minutes was enough to get a good initial baseline, and then a valve relaying the vacuum chamber to the vacuum pump was opened, the pressure inside the chamber was downloaded quickly to promote the vaporization process, and the complete calorimetric curve was registered in a lapse of 30 min.

For the phase change experiments with the solid 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- β -*D*-galactopyranoside, from preliminary tests, scanning operation and a range of temperature from 403.15 to 473.15 were established as the most appropriate. For the measurement experiments, samples of around 11 mg of the solid carbohydrates were placed inside the sublimation pan, and the set was weighed to 1.0 μg of sensitivity. The prepared sample pans were loaded in the calorimetric sensor, and then the pressure inside the vacuum chamber was fixed in the range of 100–150 Pa, while the temperature of the sample was held at 403.15 K. After 3 min for stabilizing the calorimeter's heat flux signal, scanning the temperature at a rate of 10 K/min started. In the range of 428–443 K, each calorimetric curve showed a sharp peak due to the melting of the sample, immediately followed by a wide rounded signal in the interval of 443–455 K, due to the vaporization of the melted substance.

In isothermal as well as in scanning methodology, throughout loading and thermal stabilization of the calorimetric system, a small fraction of the substance vaporizes or sublimates; therefore, an accurate quantification of the mass lost in this part of the experimental procedure is necessary and was performed by independent experiments as previously described.^{46,47}

Data acquisition and integration of the area under each calorimetric curve were performed using the Pyris software of the DSC-7 calorimeter. Prior to the measurements, the calorimetric system was calibrated for energy and temperature using high-purity samples of indium and zinc. Tables providing detailed experimental data and the procedure to calculate the enthalpy of the phase change are supplied in the Supporting Information.

Acknowledgment. This paper is dedicated to the memory of Prof. Irma González-Bravo. K.R.-G. thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for scholarships. This work was supported by CONACYT through grants 49921-Q and 47679-Q, and by DGAPA-UNAM grant IN-209606. J.J.-B. Thanks "Ramón y Cajal" programme and MICINN (Spain), grant CTQ2006-10374-C02-01. We are much indebted to Dr. R. Alfredo Toscano for providing single-crystal X-ray diffraction data. We are grateful

(55) Handa, N.; Montgomery, R. *Carbohydr. Res.* **1969**, *11*, 467–484.

(56) Rojas, A.; Orozco, E. *Thermochim. Acta* **2003**, *405*, 93–107.

(57) Rojas-Aguilar, A.; Orozco-Guareño, E.; Martínez-Herrera, M. *J. Chem. Thermodyn.* **2001**, *33*, 1405–1418.

to Ing. Luis Velasco and Dr. Javier Perez Flores for technical support and to Rebeca López-García for the revision of the English version of this manuscript. We also thank the Coordinación de Comunicación y Sistemas de la Universidad La Salle and DGSCA-UNAM for computer support.

Supporting Information Available: Full optimized geometries of the supramolecular complexes; complete ref 26; ^1H 500 MHz NMR spectra of compounds **3–6** (Figures S13–S16, pp S12–S15); enthalpies of dissolution and vaporization of compound **3** (Tables S4 and S6, pp S8, S9); enthalpies of dissolution

and sublimation of compound **5** (Tables S5 and S7, pp S8, S10); NOESY 500 MHz NMR spectrum of compound **5** (Figure S24, p S34); and CIF file for **4**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. CCDC-746171 β -Me₅Gal (**4**) contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Center via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

JA903950T

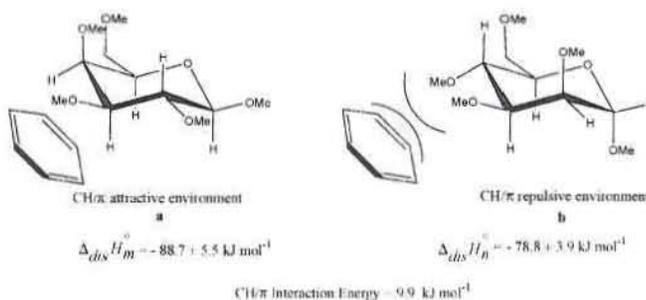
Calorimetric Measurement of the CH/ π Interaction Involved in the Molecular Recognition of Saccharides by Aromatic Compounds

Lorena Bautista-Ibáñez,[†] Karla Ramirez-Gualito,[†] Beatriz Quiroz-García,[‡]
Aarón Rojas-Aguilar,[‡] and Gabriel Cuevas^{*,‡}

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70213, 04510, Coyoacán, México, D.F., México, and Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional Apdo. Postal 14-740, 07000 México, D.F., México

gcegb@servidor.unam.mx

Received September 2, 2007



Can a benzene molecule differentiate between two isomeric carbohydrates? It is generally accepted that two factors govern molecular recognition: complementarity and preorganization. Preorganization requires the presence of cavities for positioning the host's groups of complementary nature to those of the guest. This study shows that, in fact, groups should be complementary to recognize each other (for the case presented here, it is controlled by the CH/ π interaction) but preorganization is not essential. Since weak interactions have their origin in dispersion forces, they also have impact on the enthalpic term of the free energy, so it was considered that their participation can be demonstrated by measuring the energy involved. For recognition to happen, two conditions must be satisfied: specificity and associated stabilizing energy. In this study we evaluated the heat of dissolution of different carbohydrates such as methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -D-mannopyranoside and methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -D-galactopyranoside using different aromatic solvents. The solvation enthalpies in benzene were -78.8 ± 3.9 and -88.7 ± 5.5 kJ mol⁻¹ for each carbohydrate, respectively; and these values yielded a CH/ π energy of interaction of 9.9 kJ mol⁻¹. In addition, NMR studies of the effect of the addition of benzene to chloroform solutions of the two carbohydrates showed that benzene specifically interacts with the hydrogen atoms of the pyranose ring at positions 3, 4, and 5 located on the α face of the methyl- β -galactoside, so it is, in fact, able to recognize it. Thus, the interactions between carbohydrates and the aromatic residues of proteins occur in the absence of the confinement generated by the protein structure. By experimentally measuring the energy associated with this interaction and comparing it to theoretical calculations, it was also possible to unequivocally determine the existence of CH/ π interactions between carbohydrates and proteins.

Introduction

The so-called weak interactions such as the hydrogen bonds or the interactions originating from dispersion forces are the heart of Supramolecular Chemistry and have their origin in electrostatic interactions such as dipole–dipole, dipole–quad-

rupole, and quadrupole–quadrupole among others. This is the origin of some noncovalent interactions that allow a specific association between a host and its guest.¹ This phenomenon is known as molecular recognition and it is generally accepted that the existence of host cavities in molecules of biological

[†] Universidad Nacional Autónoma de México.

[‡] Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.

(1) Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*; University Science Books: Sausalito, CA, 2006; p 207.

origin such as enzymes and antigens is essential for recognition.² This phenomenon is known as preorganization. Emil Fischer^{3–5} was the first scientist to explain the selectivity that is characteristic of enzymatic reactions using the rigid lock and key model.⁶ In 1958, Daniel Koshland^{7,8} proposed that a protein can show some flexibility that would allow an adaptation to the substrate. This led to the establishment of the induced fit model. The two models imply that preorganization plays a central role. On the other hand, the term complementarity, where the structure of the host is complementary to that of the guest, is the other factor that influences molecular recognition. Apparently, both factors are essential for recognition.

Sugar–protein interactions play an important role in a wide range of fundamental biological processes that include metabolic regulation, growth, embryogenesis, and apoptosis among many others.^{9–11} The determination of the mechanisms by which carbohydrates recognize proteins (lectins, antibodies, and enzymes among others) remains a fundamental question in biochemistry. This information will be useful in the future to control and manipulate the interactions and design structural mimics of oligosaccharides of pharmaceutical interest.¹² For this, it is important to understand the structural, thermodynamic, and kinetic phenomena that control the manner in which a carbohydrate is attached to its receptor by the participation of an aromatic molecule.

Interestingly it is usual to find aromatic amino acid residues (tryptophan, tyrosine, and phenylalanine) in the protein active sites that recognize and bond carbohydrates.^{13,14} Carbohydrate–protein complexes that have been studied by X-ray diffraction show that the carbohydrate is positioned in such a way that at least three hydrogen atoms of the hydrophobic region (that includes the C–H bonds of the tetrahydropyran ring) are oriented toward the amino acid aromatic nucleus (Figure 1).

For recognition to exist, two conditions should be satisfied: specificity and stabilizing energy. Since the energy associated with the recognition process of the system is important, the evaluation of the energy was considered an extremely important factor for the molecular recognition process. Thus, the evaluation of the thermodynamic properties of the carbohydrate–aromatic compound system is most relevant. Stabilizing weak interactions play an important role on the enthalpic term of the free Gibbs

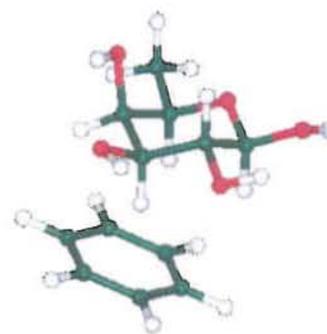


FIGURE 1. Supramolecular structure of the fucose and benzene complex determined at MP2/6-31G(d,p) including BSSE during the optimization process.¹⁵

energy, so it was considered that if this could be measured, it would be a clear sign of their existence and relevance.

Recent studies demonstrated theoretically and experimentally the existence of stabilizing interactions between fucose (a model of galactose free of conformational implications due to the rotation of the CH₂–OH segment) and benzene (Figure 1). The determination of the stabilization energy was performed using *ab initio* methods at the MP2/6-31G(d,p) level of theory considering a counterpoise correction during optimization of the supramolecule. This energy was on the order of 12.5 kJ mol⁻¹, approximately 4.16 kJ mol⁻¹ for each C–H bond involved in the interaction. On the other hand, the structure of the complex was very sensitive to the inclusion of the correction for the basis set superposition error (BSSE) during the optimization. It was, thus, demonstrated that the use of density functionals that lack terms that adequately describe the long-distance interaction is not good for evaluating the energy of the system since it has its origin in the dispersion forces.^{15,16} In addition, the authors established that the interaction produced by benzene (or phenol) on the hydrogen atoms of the α face of the methyl- β -galactoside is the most important, because the specific ¹H NMR resonances undergo upfield shifting upon addition of phenol. This behavior has been taken as direct proof of the existence of CH/ π interaction.¹⁵ The fact that this interaction does not require a well-defined mold or a structured rigid frame created by the protein where the conditions for interaction are generated is notable.

A study published recently exposed experimental evidence of the CH/ π interaction through the use of near-IR vibrational spectra of individual carbohydrate conformers isolated under molecular beam conditions in the gas phase.¹⁷ Since the analysis of weak interactions is controversial¹⁸ and it is important to establish the mechanisms by which these interactions occur, the experimental determination of the interaction energy between an aromatic compound and a carbohydrate where the energy

(2) Smith, M. B.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*; Wiley: New York, 2007.

(3) Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985.

(4) Lichtenthaler, F. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1994**, *33*, 2364.

(5) Lemieux, R.; Spohr, U. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 1.

(6) Lichtenthaler, F. W. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 4083.

(7) Koshland D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1958**, *44*, 98.

(8) Koshland, D. E., Jr. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2375.

(9) Simanek, E. E.; McGarvey, G. J.; Jablonowski, J. A.; Wong, C. H. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 833.

(10) Wies, W. L.; Drickamer, K. *Ann. Rev.* **1996**, *65*, 441.

(11) Vyas, N. K. *Curr. Opp. Struct. Biol.* **1991**, *1*, 732.

(12) Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637.

(13) Sauter, N. K.; Hanson, J. E.; Glick, G. D.; Brown, J. H.; Crowther, R. L.; Park, S. J.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9609. Emsley, P.; Fotinov, C.; Black, I.; Fairweather, N. F.; Charles, I. G.; Watts, C.; Hewitt, E.; Isaacs, N. W. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8889. Pascal, J. M.; Day, P. J.; Monzingo, A. F.; Ernst, S. R.; Robertus, J. D.; Iglesias, R.; Pérez, Y.; Ferreras, J. M.; Citores, L.; Girbes, T. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **2001**, *43*, 319–326.

(14) Fernández-Alonso, M. C. Interacciones proteína-carbohidrato: Estudio Teórico de los requisitos energéticos para la distorsión de anillos de piranosa y origen de las interacciones carbohidrato-anillo aromático. Ph.D. Thesis, Universidad de Vigo-Centro de Investigaciones Biológicas, Vigo, Spain, 2006.

(15) Fernández-Alonso, C. M.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7379.

(16) Jiménez-Barbero, J.; Cañada, F.; Cuevas, G.; Asensio, J. L.; Aboitiz, N.; Canales, A.; Chávez, M. I.; Fernández-Alonso, M. C.; García-Herrero, A.; Mari, S.; Vidal, P. In *Protein-Carbohydrate Interactions: A Combined Theoretical and NMR Experimental Approach on Carbohydrate-Aromatic Interactions and on Pyranose Ring Distortion*; Vliegthart, J. F. G., Woods, R. J., Eds.; NMR Spectroscopy and Computer Modeling of Carbohydrates, Recent Advances. *ACS Symp. Ser.* **2006**, *930*, 60.

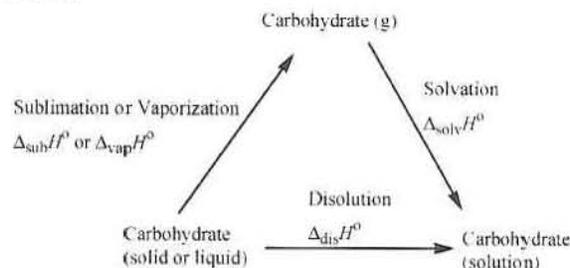
(17) Screen, J.; Stanea-Kaposta, C.; Gamblin, D. P.; Liu, B.; Macleod, N. A.; Snoek, L.; Davis, B. G.; Simons, J. P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 3644. Stanea-Kaposta, E. C.; Gamblin, D. P.; Screen, J.; Liu, B.; Snoek, L. C.; Davies, B. G.; Simons, J. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *8*, 4444.

(18) Dunitz, J. D.; Gavezotti, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 1766.

associated with the CH/ π interaction is evaluated is fundamental and is the topic of the present study. Trying to determine the contribution of the enthalpic and entropic terms to the free energy associated with the donor–acceptor–complex equilibria may prove challenging. This is because the first term includes the effects of the covalent bonds, the noncovalent interactions of electrostatic origin, the stereoelectronic effects, and hydrogen bonds among others, while the second term encompasses the evaluation of the change of degrees of freedom experienced by the compounds that participate in the chemical equilibrium under study. These include the changes in degrees of freedom of the solvent, the host, and the guest as well as the product of the interaction, the supramolecule. The contribution of the enthalpic term to the free conformational energy has allowed the understanding of conformational processes^{19,20} as well as molecular recognition.²¹ For the latter, it has been recently demonstrated that the interaction between *Amarantus caudatus* Antimicrobial Peptide 2 (AcAMP2)-like peptides and the trimer of *N*-acetylglucosamine (GluNAc)₃ is enthalpically driven and that both hydrogen bonds and van der Waals forces contribute to the stability of the complexes in aqueous solution.²² This is in sharp contrast to the previous idea that suggested that the liberation of the molecules from the solvents present at the binding site would make entropy the dominating term.²³ In this sense, it would be important to establish the role of the enthalpic term in the interaction and evaluate its magnitude in order to obtain fundamental information. This information would be quite useful for the understanding of the selectivity of receptors toward certain carbohydrates.^{24–29} This information can be used to rationally manipulate the carbohydrate–protein interaction to improve the selectivity of compounds of pharmaceutical importance.³⁰

There are two approaches to determine the interaction energy of interest. The first one is based on the evaluation of the solvation energy between the carbohydrate and the aromatic substrate. The term solvation process refers to the energetic and structural changes occurring in a system during the process of transferring molecules from the gas phase into the liquid solvent. Those changes are not only accompanied by disruption of intermolecular bonds in the solvent but also involve the formation of new interactions between the molecules of solute and solvent.³¹ So, for both carbohydrates, the difference in the

SCHEME 1. Thermodynamic Determination of the Heat of Solvation



enthalpy of solvation must be proportional to the magnitude of the interaction of each isomer with the solvent molecules. Scheme 1 shows the terms required to determine this thermodynamic property.

The enthalpy of phase change as well as the dissolution enthalpy can be determined by direct measurement in a calorimeter.³² However, these numbers can be useful to directly quantify the interaction energy for solute and solvents through a second approximation that can be established as:

$$\Delta E_{\text{dis}} = Z[E_{1,2} - \frac{1}{2}(E_{1,1} + E_{2,2})] \quad (1)$$

where ΔE_{dis} is the dissolution enthalpy, Z is the number of molecules in the carbohydrate solvation sphere, $E_{1,2}$ is associated with the molecular interaction between the carbohydrate molecules and the solvent, $E_{1,1}$ is the energy associated with the intermolecular interaction of the carbohydrate in the condensed phase and is directly proportional to the sublimation enthalpy, and finally $E_{2,2}$ is the cohesive energy of the liquid molecules that is proportional to the vaporization enthalpy. The direct interaction energy between the carbohydrate molecules and the aromatic solvent can be calculated through eq 1 and can be easily quantified through the enthalpies of solution and of change of phases applied to the solvation model.

Results and Discussion

Two carbohydrate derivatives were used for this study. The first, permethylated galactose,³³ is a derivative of fucose that, according to theoretical calculations and experimental results, has a CH/ π interaction when combined with an aromatic compound.¹⁵ The second, a mannose derivative,³⁴ lacks the interaction and was used as a reference. Since carbohydrates have a polar region (hydroxyl groups), they are insoluble in aromatic substrates that lack the groups that can form strong hydrogen bonds. The energy associated with the CH/ π interaction is less than the energy associated with the hydrogen bonds. Therefore, the use of aromatic compounds capable of forming hydrogen bonds to determine the CH/ π interaction is inadequate because it is possible to mask the interaction of interest. Thus, aromatic solvents such as benzene are useful to determine the interaction energy of interest. To use benzene and its derivatives as solvents, it was necessary to modify the carbohydrates through permethylation using iodomethane (Scheme 2). This reaction changes the amphiphilic character of the carbohydrate

(19) Torres, L. A.; Rojas, A.; Cuevas, G.; Juaristi, E. *J. Phys. Org. Chem.* **1994**, *7*, 561.

(20) Juaristi, E.; Cuevas, G. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 359.

(21) Kronis, K. A.; Carver, J. P. *Biochemistry* **1985**, *24*, 834.

(22) Chavez, M. I.; Andreu, C.; Vidal, P.; Aboitiz, N.; Freire, F.; Groves, P.; Asensio, J. L.; Asensio, G.; Muraki, M.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 7060.

(23) Quiñocho, F. A. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1293.

(24) Davis, A. P.; Wareham, R. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 2978. Davies, A. P.; Wareham, R. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2270.

(25) Vacca, A.; Nativi, C.; Cacciarini, M.; Pergoli, R.; Roelens, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16456.

(26) Nativi, C.; Cacciarini, M.; Francesconi, O.; Vacca, A.; Moneti, G.; Ienco, A.; Roelens, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4377.

(27) Francesconi, O.; Ienco, A.; Moneti, G.; Nativi, C.; Roelens, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 6693.

(28) Calderone, V.; Fragai, M.; Luchinat, C.; Nativi, C.; Richichi, B.; Roelens, S. *ChemMedChem*, **2006**, *1*, 598.

(29) Cacciarini, M.; Cordiano, E.; Nativi, C.; Roelens, S. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3933.

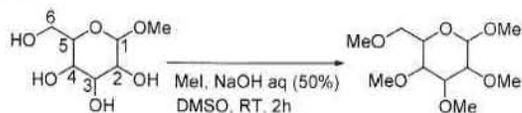
(30) Bernardi, A.; Arosio, D.; Potenza, D.; Sánchez-Medina, I.; Mari, S.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4395.

(31) Krestov, G. A. *Thermodynamics of solvation*; Ellis Horwood: New York, 1991.

(32) Berry, R. S.; Rice, S. A.; Ross, J. *Physical Chemistry*; John Wiley and Sons: New York, 1980.

(33) Asres, D. D.; Perreault, H. *Can. J. Chem.* **1999**, *77*, 319. Rathbone, E. B.; Stephen, A. M.; Pachler, K. G. R. *Carbohydr. Res.* **1971**, *20*, 141.

(34) Harada, M.; Montgomery, R. *Carbohydr. Res.* **1969**, *11*, 467.

SCHEME 2. Synthesis of the Modified Carbohydrates of Interest


by modifying the hydroxyl groups.^{35,36} The use of the methyl groups was considered adequate because it does not present strapping problems due to the steric volume. The modification was done using standard methods starting with the corresponding methyl pyranosides. The theoretical calculations and the recently published NMR experiments¹⁵ were useful to find the stabilization of methyl- β -galactoside through a CH/ π interaction. However, this interaction was not found for methyl- α -mannoside. During this study permethylation of the two carbohydrates rendered methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -D-mannopyranoside (**1**) and methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -D-galactopyranoside (**2**)³⁴ with purity greater than 99.8% determined through the use of gas chromatography.

Since the specific ¹H NMR signals of a group of protons attached to the pyran ring that undergo upfield shifting upon addition of an aromatic compound has been taken as direct evidence of the existence of CH/ π interactions, the modified carbohydrates were used for the NMR study.³⁷ Thus, the effect of benzene on the chemical shift of the hydrogen atoms of the molecules of interest was evaluated. Tables S1 and S2 (see the Supporting Information) show the effect that consecutive additions of the aromatic substrate have on the chemical shifts of the different hydrogen atoms. Except for the hydrogen atom at position H2, all other hydrogen atoms of the methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -D-galactopyranoside (**2**) show a shielding effect from the solvent. This effect can be evaluated through the difference $\Delta\delta = \delta(\text{CDCl}_3) - \delta(\text{C}_6\text{D}_6)$, since the chemical shift in the initial chloroform solution is slowly modified as the proportion of benzene increases. A positive value in the shift of the hydrogen atoms of molecule **2** shows a net shielding. Thus, the H3 hydrogen atom goes from 3.15 to 2.97 ppm, H4 goes from 3.65 to 3.45 ppm, and H5 goes from 3.57 to 3.33 ppm. This behavior is in sharp contrast to the effect that the same solvent has over compound **1**, where an opposed effect is observed on the same hydrogen atoms, i.e., H3 goes from 3.49 to 3.68 ppm, H4 goes from 3.42 to 3.75 ppm, and H5 goes from 3.55 to 3.82 ppm.

It is interesting to point out that a protective effect of benzene over the protons at position 6 of carbohydrate **2** is observed. However, the effect is not protective for carbohydrate **1**. All methyl groups are exposed to the solvent and in all cases show a protective effect that is increased as the benzene concentration is increased in the solution. These results support previously reported observations¹⁵ and unequivocally confirm the presence of a CH/ π interaction between benzene and the carbohydrate only for compound **2** that substitutes chloroform from the first solvation sphere.

Two important conclusions can be drawn from these results. The first one is the fact that even when the solvent–methyl group interactions are approximately similar for both compounds, the difference in the solvent–solute interaction energies,

if existent, can be attributed to the CH/ π interaction. The second is that the solvation of compound **2** is not random, even when there is no cavity or a preorganized site. In fact, the benzene ring protects the region of positions 3–6 of the carbohydrate as shown in Figure 2b. The benzene molecule is oriented due to the presence of the CH bonds at positions 3, 4, and 5 as has been determined by theoretical calculations,¹⁵ as a consequence of molecular recognition. This supramolecular arrangement does not occur in compound **1** (Figure 2a), which experiences solvation but not recognition. This can be observed through the fact that the most protected proton at position 6 is the *pro*-R that tends to orient itself toward the zone where benzene is located.¹⁶ The presence of the equatorial methoxy group at position 4 of molecule **1** generates a repulsive environment for benzene. The equatorial methoxy group at C4 prevents the arrangement of the three C–H bond pattern that is a condition for the existence of the CH/ π interaction.¹⁶

Figure 3 shows the evolution of the chemical shift of the carbohydrate's ring protons when benzene is added. These results provide support to the model where a benzene molecule approaches selectively to the α face of compound **2**. The negative slopes imply the shielding that is characteristic of compound **2** while the positive slopes show the unshielding of compound **1**.

With these results, a calorimetric study of the dissolution process of carbohydrates in aromatic solvents was designed to determine the energy associated with the interaction. Table 1 shows the solvation enthalpy data of compounds **1** and **2** obtained through the solvation model (Scheme 1). The solvents used for this study were 1-methoxy-4-methylbenzene (**3**), *o*-xylene (**4**), *m*-xylene (**5**), *p*-xylene (**6**), 1,2-dimethoxybenzene (**7**), 1,3-dimethoxybenzene (**8**), and benzene (**9**). In all cases, the substituents make the aromatic compound a better donor in comparison to benzene. It would be expected that if the electronic richness of benzene is increased, in the Hammett sense,³⁸ the interaction would be stronger if it had a hydrogen bond character. The solvents used to modify the term $\Delta_{\text{dis}}J_m'$ can be observed in Table 1. The data used to estimate the enthalpies of dissolution for every solvent are described in the Supporting Information.

The term $\Delta_{\text{dis}}J_m'$ is a measure of the amount of heat needed to break the molecular interactions of compound **1** that has a liquid nature and the crystalline network of compound **2**. This explains the magnitude of these values that is considerably larger for the solid than for the liquid. A positive value of this quantity is useful to establish that the compound is more stable in pure form than in solution because breaking the crystalline structure requires energy. An exothermic dissolution can be observed for only two of the cases and both belong to solutions of 1,3-dimethoxybenzene and benzene.

On the xylene series (**4**–**6**) the dissolution is markedly endothermic while the compounds that have oxygen (**3**, **7**, **8**) make it less endothermic and even exothermic. This trend is also observed in the dissolution heat of compound **2** even when, for these results, all observed cases are endothermic.

The solvation process is global, as described in the introduction of this paper. In this case, once the crystalline network is broken, the solvent interacts with the solute and it is possible to evaluate the energy exchanged in the process. Since both compounds under study vary in the configuration of the

(35) Quijcho, F. A. *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, *21*, 442.

(36) Elgavish, S.; Sanan, B. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 917.

(37) Terranco, G.; Potenza, D.; Canales, A.; Jiménez-Barbero, J.; Baldrige, K. K.; Bernardi, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2890.

(38) Johnson, C. D. *The Hammett Equation*; Cambridge University Press: Cambridge, England, 1973.

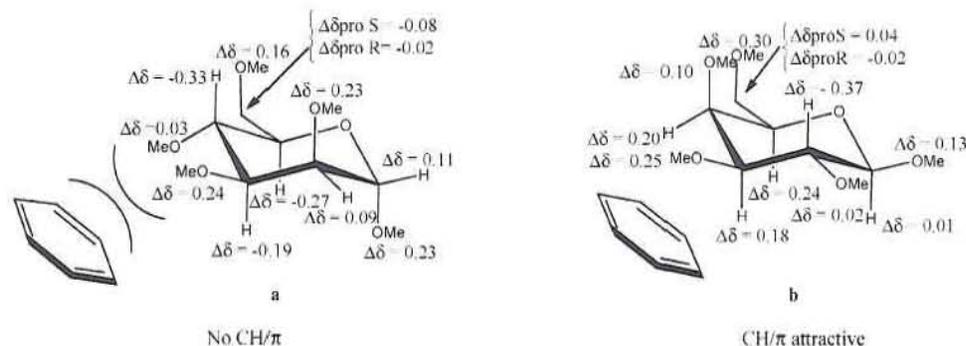


FIGURE 2. Effect of the CH/ π interaction in the chemical shift in ppm of carbohydrates studied here measured by $\Delta\delta = \delta(\text{CDCl}_3) - \delta(\text{C}_6\text{D}_6)$. (a) benzene-mannoside solution and (b) benzene-galactoside supramolecule.

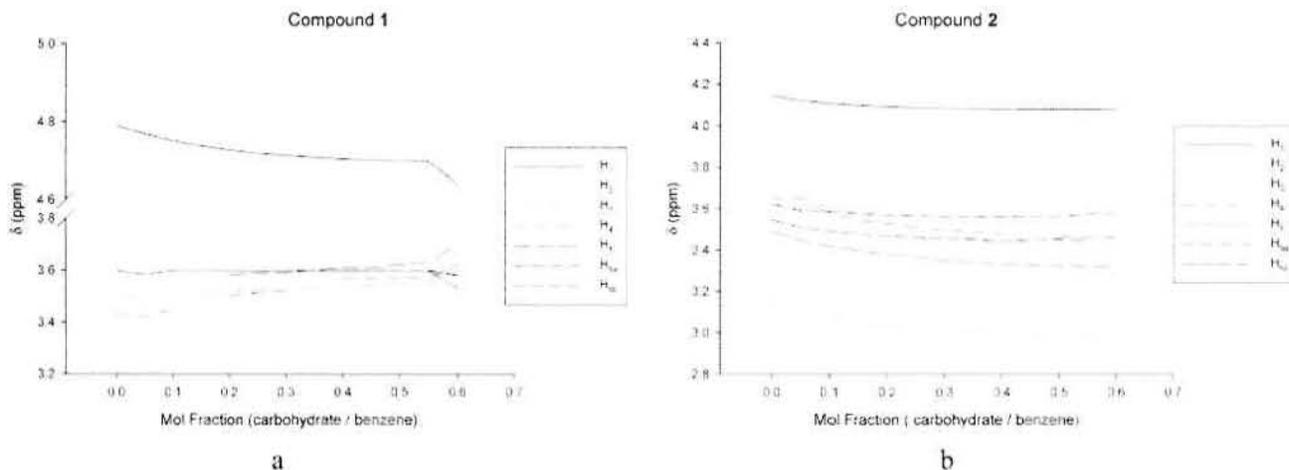


FIGURE 3. Dependence of the ring protons chemical shift of compounds **1** (a) and **2** (b) with respect to the addition of benzene in solutions of CDCl_3 .

TABLE 1. Enthalpies of Solvation (in kJ mol^{-1}) of Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- α -*D*-mannopyranoside (**1**) and Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- β -*D*-galactopyranoside (**2**) in Different Aromatic Solvents (1:10, mol:mol) Determined by Calvet Microcalorimetry at 303.15 K^a

solvent	1			2		
	$\Delta_{\text{dis}}H_m^\circ$	Δ_{solv}	$H_m^\circ\sigma_{\text{tot}} (\pm)^b$	$\Delta_{\text{dis}}H_m^\circ$	Δ_{solv}	$H_m^\circ\sigma_{\text{tot}} (\pm)^b$
3	0.938	-74.239	3.898	17.391	-87.854	5.655
4	2.623	-72.554	3.899	18.914	-86.331	5.536
5	2.996	-72.181	3.897	19.386	-85.859	5.547
6	2.625	-72.552	3.897	19.249	-85.996	5.564
7	1.055	-74.122	3.897	17.970	-87.275	5.582
8	-1.069	-76.246	3.899	16.175	-89.070	5.545
9	-3.649	-78.826	3.906	16.537	-88.708	5.536

^a The value of $\Delta_{\text{dis}}H_m^\circ$ for **1** is constant: $75.177 \text{ kJ mol}^{-1}$. $\Delta_{\text{dis}}H_m^\circ = 105.245$ for **2**. ^b σ_{tot} is the overall uncertainty, calculated from the uncertainties on the enthalpies of dissolution and phase change (see the Supporting Information).

stereogenic center at position 4, the region that shows the most changes in the NMR study, compound **1** cannot have the CH/ π interaction, while compound **2** does have the interaction (Figure 2).

The solvation energy $\Delta_{\text{solv}}H_m^\circ$ of compound **1** establishes a more stable system for benzene with a value of $-78.8 \pm 3.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ in relation to the other aromatic solvents. This is followed in terms of stability by solvation processes where oxygenated solvents are present with the least stable systems being those formed with xylene isomers. Of the xylene isomers, the more stable interactions are those where *o*- and *p*-xylene are present. The energy difference between the least and the most stable systems is of 6.6 kJ mol^{-1} . As can be expected the

$\Delta_{\text{solv}}H_m^\circ$ values are considerably higher for compound **2** ($-88.7 \pm 5.5 \text{ kJ mol}^{-1}$). For this solute, benzene does not generate the most stable system. In fact, the most stable system is generated by 1,3-dimethoxybenzene (Table 1). Xylenes contribute to a lesser extent to stability, but *m*-xylene contributes the least stabilization energy. The energetic difference between the extremes is 3.2 kJ mol^{-1} .

It is generally accepted that the energy difference between compounds **1** and **2** is due mainly to the CH/ π energy. This can be estimated through eq 2.

$$\text{CH}/\pi \text{ energy} = \Delta_{\text{solv}}H_m^\circ(1) - \Delta_{\text{solv}}H_m^\circ(2) \quad (2)$$

It is possible to take into account that the $\Delta_{\text{solv}}H_m^{\circ}(1)$ term includes only the interactions between the methyl groups and the solvent, while the $\Delta_{\text{solv}}H_m^{\circ}(2)$ term also includes the CH/ π interaction (due to recognition); thus, the interaction between the carbohydrates and benzene gives a CH/ π energy of 9.9 kJ mol⁻¹. This is in agreement with the value calculated at the MP2/6-31G(d,p) level when the base superposition correction is included (12.5 kJ mol⁻¹),¹⁵ and with previous results showing that enthalpy is a relevant contribution for the binding process.²²

Recently, the protein–carbohydrate interaction was evaluated using a simple model that was useful to establish that the energy of interaction is approximately 20.9 kJ mol⁻¹.³⁷ This was done using the B3LYP functional and the DZV(2d,p) base for the optimization of the molecular geometry followed by a single point calculation using the MP2 method with the same basis. This was done taking advantage of an intramolecular interaction that is free of BSSE. The calculation of the energy was done using an isodesmic reaction where the energy difference between the elements of the reaction is attributed only to the CH/ π interaction. Since the nature of the exo-anomeric effect present in both molecular systems is different, it is possible that the final value of the energy obtained at the MP2/DZV(2d,p)//B3LYP/DZV(2d,p) level has some of this contribution. In addition, the original geometries were calculated at the B3LYP/DZV(2d,p) level. However, it is well-known that this level does not describe long-distance interactions adequately, thus the geometry reported using this erroneous calculation is far from the best. The carbohydrate–aromatic compound interactions have been widely studied using computational methods and the energy values oscillate between 10.5 and 20.9 kJ mol⁻¹ when the MP2 method is used. Calculations using the Hartree–Fock method and hybrid functionals describe small and even repulsive interactions.^{39–41} Therefore, the different levels of theory can be used to somewhat justify the repulsive interactions as well as different magnitudes of attractive interactions. So, it is very important to have the experimental reference value of 9.9 kJ mol⁻¹ to estimate the quality of the theoretical values available.

The presence of the substituents increases the interaction energy because it increases the ring's donating capacity. However, xylenes produce similar stabilizing interactions (13.8 kJ mol⁻¹ for **4**, 13.4 for **6**, and 13.7 for **5**) with respect to ethers (13.2 kJ mol⁻¹ for **7** and 12.8 kJ mol⁻¹ for **8**). Ether **3** generates a CH/ π energy of 13.6 kJ mol⁻¹ similar to that of *m*-xylene **5**. This shows that benzene derivatives with strong donating groups do not necessarily produce the more stabilizing interactions, because the stronger methoxy group produces a weaker enthalpic effect with respect to the methyl group, in contrast with the previous suggestion.²²

These results show that the enthalpic term is a relevant contribution in the carbohydrate–aromatic compound recognition process. At 303 K with benzene being the molecule of interaction, the entropic term would be the same as the enthalpic term when it reaches 32.67 J K mol⁻¹, which is possible because high ΔS° values have been reported,⁴² over 32.67 J K mol⁻¹. The final interaction value would be the balance between both terms and where the enthalpic term is present and is relevant

as is demonstrated here, and this has been described already.²² Nevertheless, entropic contributions evaluated by NMR techniques must be carefully interpreted, for example, in small molecules their contribution to the conformational equilibrium is very high and this cannot be easily explained.²⁰ However, the elevated values have not been questioned in other processes associated with proteins where the same techniques have been used. Thus, the elevated entropies may be due to issues directly related to the determination and would not really represent the physical phenomenon.

The model proposed by Berry, Rice, and Ross was used to compare the interaction energy values obtained through the solvation energy.³² The results for both compounds are shown in Table 2. The determination of the $\Delta_f^{\circ}H_m^{\circ}$ values is described on the Experimental Section. The vaporization enthalpy values for aromatic solvents were taken from the literature.^{43,44} Since this energy has not been determined for 1-methoxy-4-methylbenzene and 1,3-dimethoxybenzene, values of the isomers 1-methoxy-3-methylbenzene and 1,2-dimethoxybenzene were used, so the values derived from either one of these compounds are only approximations.

The values described are useful to confirm the participation of the CH/ π interaction in the stabilization of compound **2** since $E_{1,2}$ is always higher for compound **2** in relation to compound **1**. In this case, the dispersion of values is small, and different from the previous case, the benzene yields the most stabilized system. This fact can be justified if the steric size of the aromatic compounds is considered.

The use of the 1 to 10 ratio of the carbohydrate in relation to the aromatic solvent guaranteed the saturation of the solvation sphere. It can be accepted that, in accordance with Figure 1 and Tables S1 and S2 (Supporting Information), this sphere is saturated with three benzene molecules for each carbohydrate molecule. At this point, most protons attached to the pyrane ring stop suffering an important effect on the chemical shift (Figure 3). This implies that the effect remains approximately constant. Nevertheless, the methyl groups exposed to the solvent suffer continuous shielding. The calculation of the interaction energy considering, in an extreme case, only three molecules of solvent for each one of the solutes is increased to practically 4.0 kJ mol⁻¹ when compared to 10 molecules for the case of molecule **2**. However, it remains practically constant for molecule **1** (Table 2). This can be attributed to the fact that the interaction energy is distributed between a smaller number of neighboring molecules. In consequence, the difference in the interaction energy between compounds **1** and **2** is also increased to 4 kJ mol⁻¹ making it more favorable by 20.5 kJ mol⁻¹ for compound **2**. This is in comparison with the 16.6 kJ mol⁻¹ obtained using 10 molecules in the solvation sphere. This for benzene, for example, makes the energy go from 17.1 to 21.7 kJ mol⁻¹. These results are in line with the fact that compound **2** experiences a stabilizing interaction in accordance with molecular recognition. This is followed by solvation while molecule **1** only experiences solvation. This implies the interaction of a benzene molecule with one carbohydrate molecule¹⁵ because both the energy observed experimentally and the calculated energy where the carbohydrate interacts with only one molecule of benzene are comparable. It is important to

(39) Spiwok, V.; Lipovova, P.; Skalova, T.; Vondrackova, E.; Dohnalek, J.; Hasek, J.; Kralova, B. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2005**, *19*, 887.

(40) Sujatha, M. S.; Sasidhar, Y. U.; Balaji, P. V. *Biochemistry* **2005**, *44*, 8554.

(41) Sujatha, M. S.; Sasidhar, Y. U.; Balaji, P. V. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 2502.

(42) Kronis, K. A.; Carver, J. P. *Biochemistry* **1985**, *24*, 834.

(43) Majer, J.; Svoboda, V.; Lencka, M. *J. Chem. Thermodyn.* **1985**, *17*, 365.

(44) Cox, J. D.; Pilcher, G. *Thermochemistry of Organic and Organometallic Compounds*; Academic Press: New York, 1970.

TABLE 2. Enthalpies of Interaction of Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- α -D-mannopyranoside (**1**) and Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- β -D-galactopyranoside (**2**) in Different Aromatic Solvents (1:3 and 1:10, mol:mol). Determined from Calvet Microcalorimetry at 303.15 K (in kJ mol⁻¹)

solvent	1				2					
	$\Delta_f^o H_m^o$	E_{12}^o ^a	E_{12}^b	O_{100} (\pm)	$\Delta_f^o H_m^o$	E_{12}^o	E_{12}^b	O_{100} (\pm)	ΔE_{12}^o	ΔE_{12}^b
3	51.500 ^c	63.432	63.651	2.121	51.500 ^c	80.112	84.170	2.893	16.680	20.518
4	43.450	59.576	60.188	1.949	43.450	76.239	80.652	2.767	16.663	20.464
5	42.680	59.228	59.927	1.959	42.680	75.901	80.425	2.774	16.673	20.497
6	40.000	57.851	58.463	1.959	40.000	74.547	79.039	2.775	16.696	20.575
7	66.900 ^d	71.144	71.390	2.212	66.900 ^d	87.869	92.063	2.959	16.725	20.672
8	66.900 ^d	70.931	70.682	2.212	66.900 ^d	87.690	91.464	2.958	16.759	20.782
9	33.920	54.183	53.332	1.959	33.920	71.236	75.095	2.774	17.053	21.763

^a Value for 10 molecules. ^b Value for 3 molecules. ^c The value is the value reported for the isomer 1-methoxy-3-methylbenzene.^{43–44} ^d The value is from 1,2-dimethoxybenzene.^{43–44}

TABLE 3. Enthalpies of Dissolution and Solvation (in kJ mol⁻¹) of Methyl Acetate in Different Aromatic Solvents (1:10, mol:mol), Determined by Calvet Microcalorimetry at 303.15 K^a

solvent	Q_{dis} (J)	$\Delta_{dis} H_m^o$	$\Delta_{solv} H_m^o$
3	1.72	0.642	-28.700 \pm 0.026
4	4.68	1.75	-27.570 \pm 0.018
5	4.8	1.83	-27.490 \pm 0.049
6	4.42	1.725	-27.600 \pm 0.009
7	3.44	1.35	-27.970 \pm 0.035
9	4.21	1.073	-28.250 \pm 0.007

^a The value of $\Delta_f^o H_m^o$ is constant: $\Delta H_{vap}(303.15) = 29.32$ kJ mol⁻¹.

differentiate between the recognition and the solvation processes. The former implies only one benzene molecule associated with a specific region of the carbohydrate through weak interactions. The latter includes several solvent molecules randomly associated with the carbohydrate.

In summary, the results are not affected importantly when three or ten molecules are considered within the solvation sphere because, in fact, regardless of the excess of solvent, the number of molecules involved in the first solvation sphere of the carbohydrate is three. Only one molecule is responsible for the recognition process and, as a consequence, its main energetic contribution.

During the NMR experiment, when benzene is added, the methyl groups of both carbohydrates show a shift to the lower field as was stated before. This led us to several questions: What is the effect in energetic terms of the contribution of methyl groups once it is solvated? Could this mask the CH/ π interaction of interest? In order to answer these questions, a study on the effect of benzene over a methyl acetate in chloroform solution was conducted (Table S18, Supporting Information) and the heat of solvation of methyl acetate in different aromatic compounds was also determined. The results are shown in Table 3.

The NMR study was useful to establish that both methyl groups, of different chemical nature due to the acidic nature of the hydrogens of the acetyl group, suffer equally the protective effect of benzene. So, the methyl acetate is solvated by the benzene and it orients itself toward the hydrogen atoms. This behavior must be similar to that expected experimentally on the five methoxy groups of the carbohydrates.

It can be observed that the $\Delta_{solv} H_m^o$ value presented in Table 3 is slightly exothermic and has negligible variation with the nature of the aromatic compound in this study. This is also usually the case for the carbohydrates used in the study. Since both methyl groups can be solvated in the same manner, for the case of benzene, it can be considered that each methyl group contributes with approximately 14.1 kJ mol⁻¹, so it can be

concluded that the energy associated with the pyranoside **1** corresponds to five times this value, so the additivity principle is preserved and undoubtedly, the value associated with compound **2** has its origin on the stabilization that goes with the CH/ π interaction.⁴⁵

Since saccharides may be considered as amphipathic substances,⁴⁶ the substitution of the carbohydrate's hydroxyl groups with methyl groups increases the hydrophobic properties and facilitates the access of the aromatic compound to the proximity of the pyrane ring. Solvation in the absence of specific interactions would be random. However, a pattern originated by the specific and stabilizing CH/ π interaction would make the system orderly. NOE experiments were performed to detect the possibility of close proximity between the carbohydrate and benzene. For both carbohydrates the signal of a mixture of benzene-*d*₆ and benzene (1:1) was inverted with a 180 selective pulse, and the corresponding NOEs were monitored after mixing periods of 1300 ms. The different behavior for both compounds is notorious. For **2** small but detectable NOEs (Figure 4b) were observed for all the annular protons. The larger NOEs (integrated in relation to the solvent) are H1 (0.28), H2 (0.15), H3 (0.56), H4 (0.16), H5 (0.32), H6a (0.15), and H6b (0.14), which confirm a structured complex. For compound **1** the determined NOEs of the ring protons were very small, close to zero or negative: H3 (0.14), H4 (0.08), H5 (0.06), H6a (0.14), and H6b (0.07), but 0.67 for H1 (Figure 4a). Interestingly, the H1 proton of compound **1** is the only one that suffers shielding by adding benzene (Figure 3a), a fact that is relevant to build the first solvation sphere. As is expected, all the methyl groups showed significant NOEs because of the direct interaction with benzene.

Conclusions

When the calorimetric and NMR results are combined with the previously reported computational calculations,¹⁵ it can be demonstrated that the CH/ π interaction is stabilizing in a magnitude that ranges from 9 to 13 kJ mol⁻¹, depending on the aromatic substrate in use, and is of enthalpic nature. These values were determined using the solvation energy method that is useful to obtain an energy value that can be compared with that calculated using the MP2/6-31G(d,p) level of theory including the BSSE during optimization. The calculation of the interaction energy confirmed the existence of a carbohydrate–

(45) For example, see: Kopp, H. as reported in: Glasstone, S. *Textbook of Physical Chemistry*, 2nd ed.; Van Nostrand: New York, 1946; p 525. Rossini, F. D. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **1931**, *6*, 37:7, 329. Rossini, F. D. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **1934**, *13*, 21. Prosen, E. J.; Johnson, W. H.; Rossini, F. D. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **1946**, *37*, 51.

(46) Quijcho, F. A. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1988**, *139*, 135.

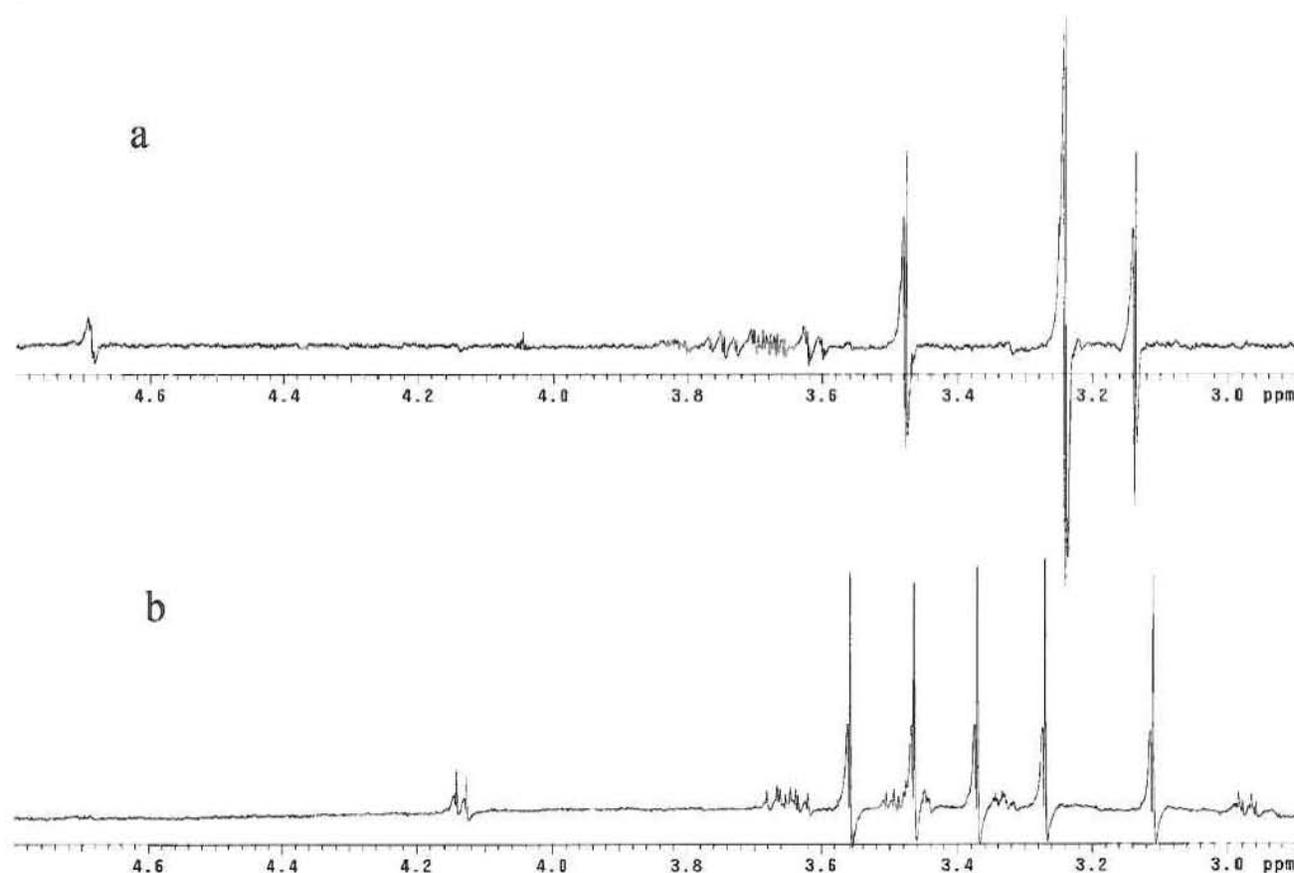


FIGURE 4. Comparative NOE effect of benzene-permethylated mannoside (a) and benzene-permethylated galactoside (b) at 298 K.

aromatic compound interaction that is stabilizing in energy and allowed to establish that at least three molecules of benzene are associated with the solute. These values can be used to establish that the HF and B3LYP theoretical methods are not useful to approach this problem because the dispersion terms are not included and should not be used for this purpose in the future. The value of the magnitude of the CH/π interaction does not vary with the electronic nature of the benzene substituent in the Hammett sense. Interestingly, the carbohydrate–aromatic compound interaction does not require the existence of a specific cavity or an environment generated by protein residues (confinement, preorganization) to occur and has a relevant enthalpic contribution. By experimentally measuring the energy associated with this interaction and comparing it to theoretical calculations it was possible to unequivocally determine the existence of CH/π interactions between carbohydrates and proteins.

It is well-known that solvents in general have properties that make them a macroscopic continuum characterized by physical properties such as density, the dielectric constant, the refraction index, etc.,⁴⁷ but as a discontinuum, it has individual molecules that interact among themselves through specific interactions. We show that these specific interactions are the origin of molecular recognition and these interactions in turn have their origin, at least partially, in electrostatic interactions.

Experimental Section

General Procedure To Carry Out the Permethylation of Carbohydrates. Methyl-D-pyranoside (1 g, 5.15 mmol, 1.0 equiv)

(47) Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 2nd ed.; VCH: Weinheim, Germany, 1990.

was dissolved in dimethyl sulfoxide (18 mL). NaOH aq disolution (50%, w/w) (1.8 mL, 8.75 mmol, 1.7 equiv) was added slowly. The mixture was stirred to form a gel-suspension and CH_3I (1.93 mL, 30.99 mmol, 6.00 equiv) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 2 h. Water (100 mL) was added. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (3×100 mL).⁴⁸ The combined organic phases were washed with sat. aq $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ disolution (200 mL), dried (Na_2SO_4), filtered, and concentrated in vacuo. The reaction mixture was dissolved in EtOAc (30 mL), activated charcoal was added (20%, w/w), then the black suspension was stirred into a water-bath for 20 min. The mixture was filtered over celite after 8 h. Finally the product methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -D-galactopyranoside was recrystallized from hexane ($\geq 90\%$) and the methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -D-mannopyranoside was treated with activated charcoal three more times, to obtain 99.8% purity for each compound. NMR signal assignments were done using HSQC, HMBC, NOESY, and COSY. 2D experiments are included in the Supporting Information.

Methyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- α -D-mannopyranoside (1).³⁴ Yield: 3.475 g (90%). Yellow oil. IR (film): 2980, 2910, 2829, 1451, 1377, 1325, 1291, 1191, 1114, 1065, 997, 972, 925, 883, 844, 796, 663, 633 cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, C_6D_6): δ 3.14 (s, 3H), 3.24 (s, 3H), 3.24 (s, 3H), 3.24 (s, 3H), 3.47 (m, 1H), 3.48 (s, 3H), 3.62 (dd, $J = 2.0, 10.5$, 1H), 3.67 (dd, $J = 5.5, 10.5$, 1H), 3.68 (dd, $J = 3.0, 9.0$, 1H), 3.75 (t, $J = 9.5$, 1H), 3.82 (ddd, $J = 2.0, 5.5, 9.5$, 1H), 4.68 (d, $J = 2.0$, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, C_6D_6): δ 54.4, 57.2, 58.9, 59.0, 60.5, 72.5, 72.6, 77.1, 77.4, 82.6, 99.0. CI-MS: 251 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, $[\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{O}_6]^{1+}$).

(48) Wang, H.; Sun, L.; Glazebnik, S.; Zhao, K. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2953. Majer, J.; Svoboda, V.; Lenka, M. *J. Chem. Thermodyn.* **1985**, 17, 365.

Methyl 2,3,4,6-Tetra-O-methyl- β -D-galactopyranoside (2).³³ Yield: 735 mg (73%). White solid, mp 43.34 °C. IR (KBr): 2932, 2824, 1551, 1388, 1256, 1185, 1124, 1079, 1050, 1000, 965, 754, 692 cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, C₆D₆): δ 2.97 (dd, $J = 3.0, 9.5$ 1H), 3.10 (s, 3H), 3.27 (s, 3H), 3.33 (ddd, $J = 1.5, 6.5, 13.0$, 1H), 3.37 (s, 3H), 3.45 (dd, $J = 1.0, 3.0$, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.50 (dd, $J = 5.5, 9.0$, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.64 (dd, $J = 7.5, 9.5$, 1H), 3.68, (dd, $J = 7.5, 10.0$, 1H), 4.14 (d, $J = 7.5$, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 56.6, 58.2, 59.1, 60.6, 61.1, 70.8, 73.1, 74.9, 80.6, 84.1, 104.5. CI-MS: 251 ([M + H]⁺, [C₁₁H₂₂O₆]¹¹⁺).

General Procedure To Measure the Enthalpies of Disolution by Heat Flux Calorimetry. Dissolution experiments were performed by heat flux calorimetry, using a differential Setaram C80 Calvet calorimeter working in isothermal mode. The sensors of the calorimeter are two fluxmeters with a calorimetric resolution of 0.12 μ W and a detection limit in power of 2 to 5 μ W, which are assembled inside of a calorimetric block with a temperature control of at least ± 0.001 K. An adequate temperature control in the environmental conditions of our laboratory is attained maintaining the calorimetric block at 303.15 K, so all the dissolution experiments were performed at this temperature. For this set of experiments, stainless steel mixing with membrane vessels was employed, utilizing masses around 50 mg for each pyranoside and an amount of 350 to 55 mg of aromatic solvent, which were the largest masses able to be located in each of the containers of the vessel, in order to generate a maximal thermal signal. The resulting molar relation of the carbohydrate:solvent, after the dissolution process, was 1:10. The masses of the substances involved in a dissolution experiment with this technique were measured in a MC210 P Sartorius balance sensitive to 10 μ g.

Once the dissolution vessels are loaded in the fluxmeters of the Calvet Calorimeter, temperature and heat flux are stabilized by around 60 min then data acquisition begins. Five minutes is enough to get a good initial baseline, then the Teflon membrane of the mixing vessel is broken and reversing of the C80 is performed several times to promote the dissolution process.

Analysis of the amplified dissolution curves, generated by the data treatment software of the C80 calorimeter, showed that for the quantity of energy of 7.0 J involved in some of the dissolution experiments, the transfer of heat finished before 120 min. At the end of the experiment of dissolution, the difference between the initial and final baseline is not more than 0.01 mW, which introduces a maximal uncertainty in the measurement of the area under the measured curve of ± 0.069 J. The C80 calorimeter works at constant pressure, consequently the integration of the curve of heat flux as a function of time releases directly the enthalpy of dissolution of each carbohydrate in the respective aromatic solvent. In Table 1 the uncertainty associated with the average value of enthalpy of dissolution represents the standard deviation. The tables including all the experimental data involved in the dissolution experiments are provided in the Supporting Information.

Enthalpies of Sublimation and Vaporization by Differential Scanning Calorimetry. The calorimetric measurements of enthalpies of sublimation or vaporization of the carbohydrates were performed using the isothermal mode operation of a modified DSC7 calorimeter.^{49,50}

The sensitive element of this device is a Perkin-Elmer DSC7 calorimetric holder assembly within a vacuum chamber connected to the DSC7 control device by an electrical feed. The vaporization system is evacuated with a rotary vacuum pump and residual pressure inside of the chamber is monitored by a pressure gauge, which is relayed to a Pirani gauge control. The Perkin-Elmer commercial aluminum open standard pans were utilized as sublimation cells. A working temperature of 333.15 K was established as the most recommendable from preliminary experiments.

In each experiment of sublimation, samples of around 10.0 mg of the solid carbohydrates were placed inside the sublimation pan and were weighed on a Sartorius 4503 microbalance sensitive to 1.0 μ g.

Once the prepared sample pans are loaded in the calorimetric sensor, temperature and heat flux are stabilized and data acquisition begins. Five minutes is enough to get a good initial baseline, then a valve connected to the vacuum pump is opened, and the pressure inside the vacuum chamber is downloaded quickly to promote the sublimation process.

During loading, thermal stabilization and pressure change due to initial evacuation and a small fraction of the substance sublimates or vaporizes, therefore, the calculation of mass lost is necessary and was performed by independent experiments as has been previously described.^{49,50}

Data acquisition and integration of the area under the change of phase curve were performed using the Pyris software of the DSC7 calorimeter. Knowing the area under the sublimation curve, the initial mass, the loss of mass during loading, and thermal stabilization, the enthalpy of sublimation was obtained using the relation:

$$\Delta H_{\text{sub or vap}} = \frac{\text{change phase area (W}\cdot\text{s)}}{\left\{ \begin{array}{l} \text{initial mass (g)} - \\ \text{lost mass (g)} \end{array} \right\}} \quad (3)$$

The tables providing detailed experimental data of the change of phase experiments are supplied in the Supporting Information. There the uncertainty associated to the average value of enthalpy of sublimation or vaporization of the pyranosides represents the standard deviation.

Currently the calorimetric holder assembly associated with the vacuum system and that of the commercial DSC7 are calibrated for energy and temperature using high-purity samples of indium and zinc.

NMR Experiments. Modified methyl pyranoside (108 mg, 0.43 mmol) was dissolved in CDCl₃ (0.5 mL) and the NMR spectrum was measured in a 500 MHz spectrometer. After that C₆D₆ (19.4 μ L, 0.42 mmol) was added several times starting from 1:0.5 (carbohydrate/benzene) to get a carbohydrate saturated dissolution with benzene (see Tables S1 and S2, Supporting Information) and in each case the spectrum was recorded. NOE difference were done using the cycling technique⁵¹ (cyclenOe) with mixing times of 1300 ms and internal subtraction of data acquired by on-resonance and off-resonance selective excitation on alternate scans.

Acknowledgment. L.B.I. acknowledges Conacyt for financial support. We also thank Francisco Ginez Carbajal for his technical assistance for the dissolution experiments. We are grateful to the reviewers for their useful comments that led to the improvement of this paper. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for financial support via grants 49921-Q, P47679-Q, and DGAPA grant IN-209606. We are grateful to Rebeca López-García for the revision of the English version of this manuscript.

Supporting Information Available: ¹H NMR chemical shifts (ppm) of compounds **1** and **2** (Tables S1–S2, pp S4 and S5), enthalpies of solution of compounds **1** and **2** in solvents **3–9** (Tables S3–S15, pp S6–S18), and enthalpies of Vaporization of compounds **1** and **2** (Tables S16–S17, pp S19–S20). ¹H NMR chemical shifts (ppm) of methyl acetate and mixtures of benzene and chloroform (Table S18, p S21), ¹H NMR chemical shifts (ppm) of compounds **1** and **2** of benzene-*d*₆ and chloroform-*d* (Table S18, p S22), Sidgwick's temperature correction (p S23), and ¹H, ¹³C, NOESY, COSY, HMBC, and HSQC 500 MHz NMR spectra of compounds **1** and **2**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JO701926R

(49) Rojas-Aguilar, A.; Orozco-Guareño, E.; Martínez-Herrera, M. *J. Chem. Thermodyn.* **2001**, *33*, 1405.

(50) Rojas, A.; Orozco, E. *Thermochim. Acta* **2003**, *405*, 93.

(51) Kinns, M.; Sanders, J. K. M. *J. Magn. Reson.* **1984**, *56*, 518.