

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Funcionalización de materiales monolíticos con derivados de calix[4]resorcinareno y evaluación de su aplicación en el desarrollo de columnas para el análisis de péptidos por HPLC**

**Betty Astrid Velásquez Silva**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia  
2018



# **Funcionalización de materiales monolíticos con derivados de calix[4]resorcinareno y evaluación de su aplicación en el desarrollo de columnas para el análisis de péptidos por HPLC**

**Betty Astrid Velásquez Silva**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctorado en Ciencias - Química**

Director:

Doctor Mauricio Maldonado Villamil

Codirectora:

Doctora Zuly Jenny Rivera Monroy

Línea de Investigación:

Química orgánica y química analítica

Grupo de Investigación:

Aplicaciones Analíticas de Compuestos Orgánicos (AACO)

Síntesis y Aplicaciones de Moléculas Peptídicas (SAMP)

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia  
2018





*A mis angelitos, Matteo y Gabriela*



## Agradecimientos

Agradezco al Departamento Administrativo de Ciencia e Innovación (COLCIENCIAS) (Proyecto: "Diseño, síntesis y caracterización de columnas monolíticas para la separación de biomoléculas"; Código: 110165843141; Contrato: 037-2015) y al programa crédito-beca Colciencias Doctorado Nacional No. 647 por la financiación del proyecto bajo el cual se desarrolló esta investigación y la financiación de mis estudios doctorales.

A la Universidad Nacional de Colombia, por la formación académica durante mi posgrado.

A mi director, Dr. Mauricio Maldonado Villamil y codirectora, Dra. Zuly Rivera Monroy, quienes con su dirección, enseñanzas y amplia experiencia me condujeron al desarrollo de la presente investigación.

A mis compañeros del grupo de Investigación Aplicaciones Analíticas de Compuestos Orgánicos: José Casas, Roger Sarmiento, Fredy David, Miguel Vela, Gabriel Ramírez, Alex Castillo, Katherin Gelvez, Cristina Cubillos, Brian Cortés, Cindy Palacio, Frank Báez, por su gran colaboración, compañía y enseñanzas tanto académicas como personales.

A mis compañeros del grupo de Investigación de Síntesis y Aplicaciones de Moléculas Peptídicas quienes a lo largo de mi formación doctoral fueron un gran apoyo académico.

A mis más queridos amigos por su constante apoyo y consejo: José Casas, Ingrid Miranda, y Roger Sarmiento.

Mis más sinceros agradecimientos a la familia Chantré por su apoyo y motivación incondicional.

A todas las personas, amigos, colegas, docentes, administrativos que contribuyeron al desarrollo de la presente investigación.

Finalmente, a mi familia, Blanca Cecilia Silva, Matteo Marín Orjuela, Danilo Marín Silva y Angie Lorena Orjuela por ser el motor de mi vida, por estar presentes en todas las batallas y triunfos.

## Resumen

Los macrociclos conocidos como resorcinarenos han sido ampliamente estudiados en las últimas décadas debido a sus características estructurales, entre muchos de los usos que se han dado, los encontramos como cavitandos, hospederos, quimiosensores, y como agentes modificantes de fases estacionarias para HPLC, en este último campo se encuentran algunas fases estacionarias poliméricas que son de gran interés en la actualidad, conocidas como monolitos y de las cuales existe una gran variedad, como aquellas derivadas de glicidilmetacrilato que permiten obtener materiales monolíticos que contienen grupos oxirano muy lábiles a la reacción con nucleófilos. Con base en las propiedades estructurales de los resorcinarenos y de materiales monolíticos derivados de glicidilmetacrilato, se sintetizaron varios resorcinarenos modificados en el borde superior con sustituyentes funcionalizados con ácidos carboxílicos, los cuales se emplearon para funcionalizar material monolítico derivado de glicidilmetacrilato mediante “grafting”-método epoxi. Posteriormente se evaluó la interacción de péptidos con estos materiales monolíticos modificados, estableciendo su potencial uso como fases estacionarias para HPLC.

**Palabras clave:** calix[4]resorcinareno, material monolítico, glicidilmetacrilato, funcionalización.

## Abstract

In recent decades, macrocycles known as calix[4]resorcinarenes have been widely studied due to their structural characteristics, among many of the uses that have been given we find them as cavitands, hosts, chemosensors and as stationary phase modifying agents for HPLC. In this last field are some polymer stationary phases that are very interesting, known as monoliths and there are a wide variety, such as those derived from glycidyl methacrylate that allow to obtain monolithic materials containing oxirane groups very labile to reaction with nucleophiles. Based on the structural properties of the resorcinarenes and monolithic materials derived from glycidyl methacrylate, were synthesized several resorcinarenes with different length in the aliphatic chain that were modified in upper rim, with carboxylic acids, which were used as nucleophiles and esterification was promoted with oxirane group of the monolithic material derived from glycidyl methacrylate. Subsequently, behavior of these monolithic materials modified with peptides was evaluated. Establish their interaction with peptide chains of different characteristics and establishing their potential use as stationary phases for HPLC.

**Keywords:** calix[4]resorcinarene, monolithic material, glycidylmethacrylate, functionalization.

# Contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Contenido</b> .....	<b>XI</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>13</b>
<b>Lista de esquemas</b> .....	<b>15</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>16</b>
<b>Lista de anexos</b> .....	<b>17</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>19</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>21</b>
<b>1. Fundamento Teórico</b> .....	<b>23</b>
1.1 Calix[4]resorcinarenos .....	23
1.1.1 Generalidades .....	23
1.1.2 Características conformacionales de calix[4]resorcinarenos .....	24
1.1.3 Síntesis .....	25
1.1.4 Funcionalización de calix[4]resorcinarenos .....	25
1.1.5 Aplicaciones de calix[4]resorcinarenos .....	28
1.2 Columnas Monolíticas .....	30
1.2.1 Generalidades .....	30
1.2.2 Clasificación de Columnas Monolíticas .....	32
1.2.3 Control del Tamaño del Poro .....	36
1.2.4 Aplicaciones de Columnas Monolíticas .....	37
1.3 Funcionalización de Columnas Monolíticas .....	37
<b>2. Hipótesis</b> .....	<b>41</b>
<b>3. Metodología</b> .....	<b>42</b>
3.1 Técnicas Generales utilizadas .....	42
3.2 Síntesis y funcionalización de resorcinarenos .....	44
3.2.1 Síntesis de resorcinarenos 1A, 1B y 1C .....	44
3.2.2 Acetilación de resorcinarenos .....	45
3.2.3 Reacción de acoplamiento azoico de los resorcinarenos y cloruro de 4-carboxibenceno diazonio .....	47
3.2.4 Formación de benzoxazinas a partir de los macrociclos 1A, 1B y 1C .....	48
3.3 Preparación de copolímeros .....	50
3.4 Modificación de la superficie de copolímeros con resorcinarenos .....	51
3.5 Síntesis de péptidos .....	52
3.6 Interacción de péptidos con material monolítico <i>poli</i> (BMA-co-EDMA-co-GMA) .....	54

3.7	Evaluación de la reacción de polimerización en los moldes de acero, PEEK y vidrio	54
3.7.1	Tratamiento de las paredes internas de la columna PEEK	54
3.7.2	Tratamiento de paredes internas de capilar de vidrio	55
<b>4.</b>	<b>Discusión de Resultados</b>	<b>57</b>
4.1	Síntesis y caracterización de resorcinarenos (etapa 1)	58
4.1.1	Conformación de resorcinarenos	63
4.1.2	Acetilación de 1A, 1B y 1C	67
4.2	Funcionalización en el borde superior de los resorcinarenos (etapa 2)	75
4.2.1	Funcionalización del borde superior mediante acoplamiento azoico con cloruro de 4-carboxibencenodiazonio	76
4.2.2	Funcionalización del borde superior mediante obtención de benzoxazinas	83
4.3	Preparación de material monolítico (Etapa 3)	88
4.3.1	Copolímero <i>poli</i> (MMA-co-EDMA-co-GMA)	88
4.3.2	Copolímero <i>poli</i> (GMA-co-EDMA)	90
4.3.3	Copolímero <i>poli</i> (BMA-co-EDMA-co-GMA)	92
4.4	Modificación de la superficie de materiales monolíticos mediante "Grafting" (Etapa 4)	95
4.4.1	Modificación de la superficie de materiales monolíticos con grupos hidroxilo	95
4.4.2	Modificación de la superficie de materiales monolíticos con ácido <i>p</i> -aminobenzoico, como modelo de grafting	97
4.4.3	Modificación de la superficie de materiales monolíticos con resorcinarenos diazotados	99
4.4.4	Modificación de la superficie de materiales monolíticos con benzoxazinas de resorcinarenos	101
4.5	Síntesis de péptidos	108
4.6	Interacción de péptidos con <i>poli</i> (BMA-co-EDMA-co-GMA) (Etapa 5)	111
4.7	Evaluación de los materiales obtenidos como posibles soportes para separaciones analíticas – Estudios preliminares	116
<b>5.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>121</b>
<b>6.</b>	<b>Productos Académicos</b>	<b>125</b>
<b>7.</b>	<b>Anexos</b>	<b>127</b>
7.1	Caracterización de los resorcinarenos	127
7.2	Caracterización de copolímeros sin funcionalizar	158
7.3	Caracterización de copolímeros funcionalizados	161
7.4	Caracterización de péptidos	175
7.5	Interacción de péptidos con copolímeros derivados de <i>poli</i> (BMA-co-EDMA-co-GMA)	179
	<b>Bibliografía</b>	<b>183</b>



## Lista de figuras

<b>Figura 1-1.</b> Calix[4]resorcinareno.....	23
<b>Figura 1-2.</b> Conformaciones y configuraciones del anillo macrociclo <sup>5</sup> y los sustituyente de los puentes metileno .....	24
<b>Figura 1-3.</b> Comparación entre la estructura de una columna de sílica empacada y una columna monolítica <sup>48,62,63</sup> .....	32
<b>Figura 1-4.</b> MEB de Columna Monolítica de sílice. ....	33
<b>Figura 1-5.</b> Monómeros y entrecruzantes .....	34
<b>Figura 1-6.</b> Preparación de columnas monolíticas mediante polimerización <sup>62</sup> .....	35
<b>Figura 4-1.</b> Espectro RMN- <sup>1</sup> H ( $\delta$ , ppm (CD <sub>3</sub> Cl)) para 2,4,6-trinonil-1,3,5-trioxano.....	63
<b>Figura 4-2.</b> Comparación espectros RMN- <sup>1</sup> H de <b>1A</b> , <b>1B</b> y <b>1C</b> .....	64
<b>Figura 4-3.</b> Cristalografía de <b>1B</b> ·DMSO .....	65
<b>Figura 4-4.</b> Cristalografía de <b>1C</b> ·5(DMSO).....	66
<b>Figura 4-5.</b> RMN- <sup>1</sup> H dinámica para <b>2A</b> .....	71
<b>Figura 4-6.</b> Interconversión entre las dos conformaciones bote de <b>2A</b> en disolución. ....	72
<b>Figura 4-7.</b> Cristalografía de <b>2A</b> .....	74
<b>Figura 4-8.</b> Cristalografía de <b>2C</b> .....	75
<b>Figura 4-9.</b> Comparación conformación cono <b>1A</b> y conformación bote <b>3A</b> .....	81
<b>Figura 4-10.</b> Isomería para <b>4A</b> , <b>4B</b> y <b>4C</b> .....	86
<b>Figura 4-11.</b> TGA/DSC y MEB de <i>poli</i> (MMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA).....	89
<b>Figura 4-12.</b> Fotografías de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA) preparado con las metodologías de la tabla 4-16 .....	91
<b>Figura 4-13.</b> MEB de la estructura de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA) .....	92
<b>Figura 4-14.</b> MEB de la estructura de <i>poli</i> (BMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA) .....	93
<b>Figura 4-15.</b> Comparación RMN- <sup>1</sup> H de <b>1A</b> y <b>5A</b> .....	96
<b>Figura 4-16.</b> Comparación Raman y MEB funcionalización de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA) con PABA .....	98
<b>Figura 4-17.</b> Comparación IR-ATR y Raman de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA) tratado con resorcinarenos diazotados .....	100
<b>Figura 4-18.</b> Comparación Raman de <i>poli</i> (BMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA) tratado con <b>3A</b> ....	101
<b>Figura 4-19.</b> Comparación IR-ATR y Raman de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA) funcionalizado con <b>4A</b> , <b>4B</b> y <b>4C</b> .....	103
<b>Figura 4-20.</b> Comparación IR-ATR y Raman de copolímero <i>poli</i> (BMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA) funcionalizado con <b>4A</b> , <b>4B</b> y <b>4C</b> .....	104
<b>Figura 4-21.</b> Comparación MEB de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA) funcionalizado con <b>4A</b> , <b>4B</b> y <b>4C</b> .....	106
<b>Figura 4-22.</b> Comparación MEB de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA) funcionalizado con <b>4A</b> , <b>4B</b> y <b>4C</b> .....	106
<b>Figura 4-23.</b> Caracterización de péptido KAEAEAKA .....	110
<b>Figura 4-24.</b> Curvas de calibración para péptidos.....	112
<b>Figura 4-25.</b> Interacción de péptidos con <b>4B</b> - <i>poli</i> (BMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA) en medio ácido .....	114

<b>Figura 4-26.</b> Interacción de péptidos con <b>4A-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)</b> en medio neutro.....	115
<b>Figura 4-27.</b> Acoples y columna de acero.....	117
<b>Figura 4-28.</b> Comparación de cromatogramas de ácido gálico e ibuprofeno en columna Chromolith® y columna de acero- <i>poli(GMA-co-EDMA)</i> .....	118
<b>Figura 4-29.</b> Columna de PEEK- <i>poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)</i> , con tratamiento de paredes y polimerización exitosa y montaje de llenado .....	119

## Lista de esquemas

<b>Esquema 1-1.</b> Obtención de macrociclos tipo resorcinareno .....	25
<b>Esquema 1-2.</b> Funcionalización del borde superior de resorcinarenos .....	26
<b>Esquema 1-3.</b> Acoplamiento azo de calix[4]resorcinarenos <sup>21</sup> .....	27
<b>Esquema 1-4.</b> Acetilación de calix[4]resorcinarenos <sup>8</sup> .....	27
<b>Esquema 1-5.</b> Funcionalización de calix[4]resorcinarenos en el borde inferior <sup>25</sup> .....	28
<b>Esquema 1-6</b> Fase estacionaria de sílica con calix[4]resorcinareno <sup>41</sup> .....	29
<b>Esquema 1-7.</b> Post-funcionalización (“grafting”) de columnas derivadas de GMA <sup>87,93,94</sup> .....	39
<b>Esquema 4-1.</b> Esquema general para la modificación de la superficie de copolímeros derivados de GMA con resorcinarenos y evaluación de su interacción con péptidos.....	57
<b>Esquema 4-2.</b> Síntesis de calix[4]resorcinarenos .....	58
<b>Esquema 4-3.</b> Mecanismo de reacción obtención de resorcinarenos <sup>5</sup> .....	61
<b>Esquema 4-4.</b> Mecanismo propuesto para la obtención de resorcinarenos <b>1A, 1B y 1C</b> .....	62
<b>Esquema 4-5.</b> Acetilación de <b>2A, 2B y 2C</b> .....	67
<b>Esquema 4-6.</b> Mecanismo de acetilación.....	68
<b>Esquema 4-7.</b> Síntesis de resorcinarenos diazotados, metodología 1 y 2 .....	77
<b>Esquema 4-8.</b> Mecanismo de reacción de diazotación de resorcinarenos.....	79
<b>Esquema 4-9.</b> Síntesis de benzoxazinas .....	83
<b>Esquema 4-10.</b> Mecanismo de reacción formación de benzoxazinas .....	84
<b>Esquema 4-11.</b> Reacción de preparación copolímero <i>poli</i> (MMA-co-EDMA-co-GMA) ....	88
<b>Esquema 4-12.</b> Reacción de preparación copolímero <i>poli</i> (GMA-co-EDMA) .....	91
<b>Esquema 4-13.</b> Reacción de preparación copolímero <i>poli</i> (BMA-co-EDMA-co-GMA) .....	93
<b>Esquema 4-14.</b> Mecanismo de polimerización por radicales libres .....	94
<b>Esquema 4-15.</b> Modificación de superficie de <i>poli</i> (GMA-co-EDMA) con PABA.....	97
<b>Esquema 4-16.</b> Mecanismo de reacción de ácidos carboxílicos con grupo oxirano .....	99
<b>Esquema 4-17.</b> Modificación de superficie de <i>poli</i> (GMA-co-EDMA) y <i>poli</i> (BMA-co-EDMA-co-GMA) con <b>4A, 4B y 4C</b> .....	102
<b>Esquema 4-18.</b> Esquema general de síntesis de péptidos .....	109

## Lista de tablas

<b>Tabla 1-1.</b> Lista de algunas aplicaciones de columnas monolíticas.....	37
<b>Tabla 1-2.</b> Modificaciones químicas realizadas en columnas monolíticas .....	38
<b>Tabla 3-1.</b> IR-ATR y análisis elemental de copolímeros .....	50
<b>Tabla 3-2.</b> IR-ATR y análisis elemental de copolímeros funcionalizados con <b>4A, 4B y 4C</b> .....	52
<b>Tabla 3-3.</b> Caracterización de péptidos .....	53
<b>Tabla 4-1.</b> Caracterización de <b>1B y 1C</b> .....	59
<b>Tabla 4-2.</b> Caracterización de <b>2B y 2C</b> .....	69
<b>Tabla 4-3.</b> Parámetros de activación medidos en $\text{CDCl}_3$ para <b>2A</b> .....	72
<b>Tabla 4-4.</b> Distancias C...C para las dos moléculas cristalizadas de <b>2A</b> .....	73
<b>Tabla 4-5.</b> Longitudes de enlaces de hidrógeno relevantes para <b>2A</b> .....	73
<b>Tabla 4-6.</b> Caracterización de <b>3B y 3C</b> .....	81
<b>Tabla 4-7.</b> Caracterización de <b>4B y 4C</b> .....	86
<b>Tabla 4-8.</b> Metodologías para la preparación de <i>poli</i> (GMA-co-EDMA) .....	90
<b>Tabla 4-9.</b> Análisis elemental de copolímeros funcionalizados con <b>4A, 4B y 4C</b> .....	105
<b>Tabla 4-10.</b> Características de péptidos.....	108
<b>Tabla 4-11.</b> Comportamiento de la presión al variar el flujo en la columna de acero- <i>poli</i> (GMA-co-EDMA).....	117
<b>Tabla 4-12.</b> Tratamiento de paredes internas de PEEK y capilar de vidrio .....	119

## Lista de anexos

<b>Anexo 1.</b> 2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.1 <sup>3,7</sup> .1 <sup>9,13</sup> .1 <sup>15,19</sup> ]octacos-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol (1A) .....	129
<b>Anexo 2.</b> 2,8,14,20-tetrapentilpentaciclo[19.3.1.1 <sup>3,7</sup> .1 <sup>9,13</sup> .1 <sup>15,19</sup> ]octacos-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol (1B) .....	131
<b>Anexo 3.</b> 2,8,14,20-tetranonilpentaciclo[19.3.1.1 <sup>3,7</sup> .1 <sup>9,13</sup> .1 <sup>15,19</sup> ]octacos-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol (1C).....	134
<b>Anexo 4.</b> 2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.1 <sup>3,7</sup> .1 <sup>9,13</sup> .1 <sup>15,19</sup> ]octacos-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaen-4,6,10,12,16,18,22,24-octail-octaacetato (2A) .....	137
<b>Anexo 5.</b> 2,8,14,20-tetrapentilpentaciclo[19.3.1.1 <sup>3,7</sup> .1 <sup>9,13</sup> .1 <sup>15,19</sup> ]octacos-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaen-4,6,10,12,16,18,22,24-octail-octaacetato (2B) .....	140
<b>Anexo 6.</b> 2,8,14,20-tetranonilpentaciclo[19.3.1.1 <sup>3,7</sup> .1 <sup>9,13</sup> .1 <sup>15,19</sup> ]octacos-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaen-4,6,10,12,16,18,22,24-octail-octaacetato (2C) .....	142
<b>Anexo 7.</b> 4,6,10,12,16,18,22,24-octahidroxi-5,11,17,23-tetrakis[ <i>p</i> -(4-carboxifenilazo)] - 2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.1 <sup>3,7</sup> .1 <sup>9,13</sup> .1 <sup>15,19</sup> ]octacos-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno (3A).....	144
<b>Anexo 8.</b> 4,6,10,12,16,18,22,24-octahidroxi-5,11,17,23-tetrakis[ <i>p</i> -(4-carboxifenilazo)]- 2,8,14,20-tetrapentilpentaciclo[19.3.1.1 <sup>3,7</sup> .1 <sup>9,13</sup> .1 <sup>15,19</sup> ]octacos-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno (3B).....	147
<b>Anexo 9.</b> 4,6,10,12,16,18,22,24-octahidroxi-5,11,17,23-tetrakis[ <i>p</i> -(4-carboxifenilazo)]- 2,8,14,20-tetranonilpentaciclo[19.3.1.1 <sup>3,7</sup> .1 <sup>9,13</sup> .1 <sup>15,19</sup> ]octacos-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno (3C) .....	149
<b>Anexo 10.</b> 2,12,22,32-tetrapropil-4,14,24,34-tetrahidroxi-7,17,27,37-tetra-(2-carboxi etil)-7,17,27,37-tetra-azanonaciclo[31.3(7).1.1 <sup>3,11</sup> .1 <sup>13,21</sup> .1 <sup>23,31</sup> 1(41).3.5(10)-11(44).13.1 <sup>23,31</sup> .0 <sup>5,10</sup> .0 <sup>15,20</sup> .0 <sup>25,30</sup> .0 <sup>35,40</sup> ]tetraconta[15(20),21(43),23,25(30),31(42),33,35(41)]dodecaeno (4A) .....	151
<b>Anexo 11.</b> 2,12,22,32-tetrapentil-4,14,24,34-tetrahidroxi-7,17,27,37-tetra-(2-carboxi etil)-7,17,27,37-tetra-azanonaciclo[31.3(7).1.1 <sup>3,11</sup> .1 <sup>13,21</sup> .1 <sup>23,31</sup> 1(41).3.5(10)-11(44).13.1 <sup>23,31</sup> .0 <sup>5,10</sup> .0 <sup>15,20</sup> .0 <sup>25,30</sup> .0 <sup>35,40</sup> ]tetraconta[15(20),21(43),23,25(30),31(42),33,35(41)]dodecaeno (4B) .....	154
<b>Anexo 12.</b> 2,12,22,32-tetranonil-4,14,24,34-tetrahidroxi-7,17,27,37-tetra-(2-carboxi etil)-7,17,27,37-tetra-azanonaciclo[31.3(7).1.1 <sup>3,11</sup> .1 <sup>13,21</sup> .1 <sup>23,31</sup> 1(41).3.5(10)-11(44).13.1 <sup>23,31</sup> .0 <sup>5,10</sup> .0 <sup>15,20</sup> .0 <sup>25,30</sup> .0 <sup>35,40</sup> ]tetraconta[15(20),21(43),23,25(30),31(42),33,35(41)]dodecaeno (4C) .....	156
<b>Anexo 13.</b> <i>poli</i> (MMA-co-EDMA-co-GMA) .....	158
<b>Anexo 14.</b> <i>poli</i> (GMA-co-EDMA) .....	159
<b>Anexo 15.</b> <i>poli</i> (BMA-co-EDMA-co-GMA) .....	160
<b>Anexo 16.</b> PABA- <i>poli</i> (GMA-co-EDMA) .....	161
<b>Anexo 17.</b> 4A- <i>poli</i> (GMA-co-EDMA).....	163

<b>Anexo 18.</b> 4B- <i>poli</i> (GMA-co-EDMA).....	165
<b>Anexo 19.</b> 4C- <i>poli</i> (GMA-co-EDMA) .....	167
<b>Anexo 20.</b> 4A- <i>poli</i> (BMA-co-EDMA-co-GMA) .....	169
<b>Anexo 21.</b> 4B- <i>poli</i> (BMA-co-EDMA-co-GMA).....	171
<b>Anexo 22.</b> 4C- <i>poli</i> (BMA-co-EDMA-co-GMA).....	173
<b>Anexo 23.</b> Péptido AcEYSFEFSYNH <sub>2</sub> .....	175
<b>Anexo 24.</b> Péptido KAEAEAKA .....	176
<b>Anexo 25.</b> Péptido RYRRKKK .....	177
<b>Anexo 26.</b> Mecanismo de síntesis de péptidos .....	178
<b>Anexo 27.</b> Interacción de péptido AcEYSFEFSYNH <sub>2</sub> .....	179
<b>Anexo 28.</b> Interacción de péptido KAEAEAKA.....	180
<b>Anexo 29.</b> Interacción de péptido RYRRKKK .....	181

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
ACN	Acetonitrilo
MAA	Ácido metacrílico
TFA	Ácido trifluoroacético
H	Altura Equivalente de un Plato Teórico
AA	Aminoácido
TGA	Análisis Termogravimétrico
BMA	Butilmetacrilato
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Calorimetría de barrido diferencial)
DIPEA	Diisopropiletilamina
EDMA	Etilendimetacrilato
GMA	Glicidilmetacrilato
GRAVY	Grand average of hydrophobicity (Índice de hidropatía)
IPA	Isopropanol
DMAE	Metacrilato de 2-dimetilaminoetilo
MMA	Metilmetacrilato
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformaamida
N	Número de platos teóricos
BPO	Peróxido de benzoilo
PEG	Polietilenglicol
RTH	Resorcinareno tetrahidrazida
ROMP	Ring-Opening Metathesis Polymerization
SPPS-Fmoc/tBu	Síntesis de péptidos en fase sólida mediante la estrategia Fmoc/tBu
SPE	Solid phase extraction (Extracción en fase sólida)
TEOS	Tetraetoxisilano
TBTU	Tetrafluoroborato- <i>o</i> -benzotriazol-il- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronium
TMOS	Tetrametoxisilano
TIS	Triisopropilsilano
HOBT	1-hidroxibenzotriazol
ABCN	1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo)
EDT	1,2-etanoditiol
AIBN	2,2'-azobisisobutironitrilo





## Introducción

Los macrociclos conocidos como resorcinarenos, son ampliamente usados en química supramolecular, química analítica, bioquímica y medicina.<sup>1,2</sup> Sus características estructurales permiten formar estructuras similares a un cáliz mediante los cuales interactúan con diferentes tipos de analitos como cationes, aniones o moléculas neutras. Adicionalmente, pueden tener sustituyentes alifáticos o aromáticos en el borde inferior que podría aumentar las posibilidades de interacción con otras moléculas. Esta característica ha permitido que en las últimas décadas hayan sido usados en el desarrollo de hospederos, cavitandos, cápsulas, dendrímeros e incluso como catalizadores.<sup>2</sup>

Sin lugar a duda, los resorcinarenos son compuestos que presentan potenciales usos, pero uno de los más destacados es como agentes modificantes de fases estacionarias.<sup>1</sup> Algunos estudios anteriores a esta investigación han presentado la modificación con resorcinarenos de columnas empacadas con sílica y las han empleado en la separación de analitos, como isómeros de nitroanilina.<sup>3</sup> Por ello se exploraron otras fases estacionarias que pudieran ser modificadas con estos tetrámeros, entre las que se encontraron las fases estacionarias preparadas a partir de derivados de metacrilato, como las que contiene 2,3-epoxipropilo, conocido comercialmente como glicidilmetacrilato (GMA). Esta reacción permitiría obtener materiales monolíticos modificados con este tipo de macrociclos y su aplicación como fases estacionarias para RP-HPLC podría ser muy útil, considerando la gran afinidad huésped-hospedero que han presentado estos macrociclos con aminoácidos,<sup>4</sup> podría extrapolarse su interacción a biomoléculas como péptidos.

Ahora bien, el objetivo de este trabajo es modificar la superficie de un material monolítico derivado de glicidilmetacrilato con resorcinarenos y evaluar su uso en el análisis de péptidos por HPLC. Para ello se sintetizaron varios resorcinarenos, se prepararon varios

materiales monolíticos que contenían GMA y por primera vez, se realizó una reacción entre resorcinarenos y copolímeros derivados de metacrilatos, empleando “*grafting*”-método epoxi. Posteriormente, se evaluó la interacción entre el material monolítico modificado con resorcinarenos y diferentes péptidos y finalmente se evaluó el comportamiento de los materiales monolíticos en moldes (vidrio, PEEK y acero) con el fin de aportar al desarrollo de fases estacionarias para HPLC.

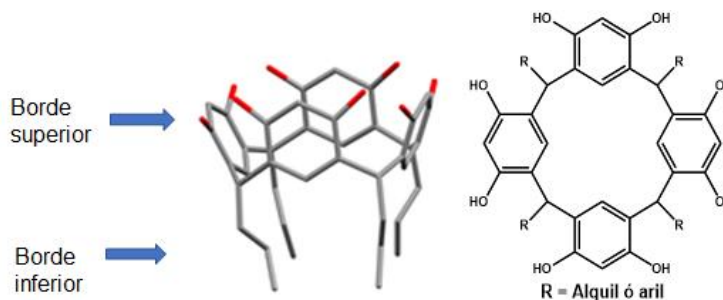
# 1. Fundamento Teórico

## 1.1 Calix[4]resorcinarenos

### 1.1.1 Generalidades

Los calix[4]resorcinarenos son compuestos análogos a los calixarenos, conocidos también como resorcinarenos, resorcinoles, octoles, etc. Están conformados por cuatro unidades de resorcinol unidos mediante un puente metileno que puede o no estar sustituido (Figura 1-1). La síntesis de calixarenos se remonta a 1872 cuando Bayer presentó la reacción de fenol con aldehídos. Posteriormente Michael publicó la síntesis de calix[4]resorcinareno a partir de benzaldehído y resorcinol. Pero no fue sino hasta 1940 que Niederl y Vogel propusieron la estructura como la de un tetrámero cíclico y finalmente en 1968 Erdtman estableció inequívocamente la estructura de estos compuestos mediante el análisis de monocristales por Rayos-X.<sup>5</sup>

**Figura 1-1.** Calix[4]resorcinareno



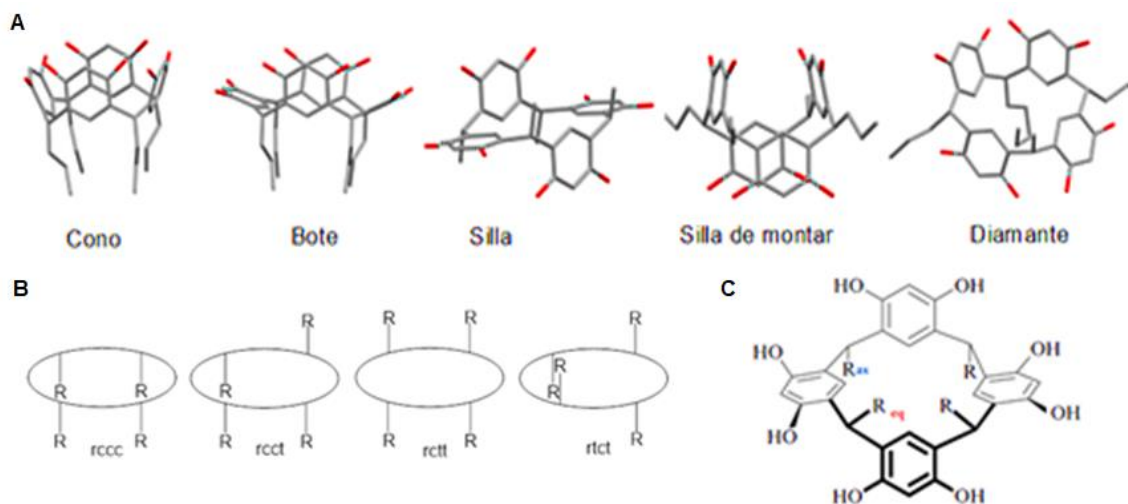
Una de las principales características de estos macrociclos es la flexibilidad que confieren los puentes metileno que unen las unidades aromáticas, de ahí que los

calix[4]resorcinarenos tengan la capacidad de adquirir diferentes conformaciones permitiendo la formación de enlaces de hidrógeno. La estructura de los calix[4]resorcinarenos está dividida en dos partes: borde superior y borde inferior (Figura 1-1).<sup>6</sup>

### 1.1.2 Características conformacionales de calix[4]resorcinarenos

Estos macrociclos pueden generar cinco conformaciones diferentes: cono, bote, silla, diamante y silla de montar, como se muestra en la Figura 1-2-A.<sup>5</sup> Adicional a la conformación de los anillos del macrociclo se debe analizar la estereoquímica de los resorcinarenos teniendo en cuenta la configuración de los sustituyentes de los puentes metileno. De esta manera se toma como referencia uno de los sustituyentes (*r*) y con respecto a este se define si los otros tres sustituyentes están en posición *cis* (*c*) o *trans* (*t*) (Figura 1-2-B). Finalmente, debe tenerse en cuenta la configuración individual de los sustituyentes de los puentes metileno (Figura 1-2-C).

**Figura 1-2.** Conformaciones y configuraciones del anillo macrociclo<sup>5</sup> y los sustituyente de los puentes metileno



A. Conformaciones de resorcinarenos; B. configuración del anillo macrociclo y C. Configuración de los sustituyentes del puente metileno

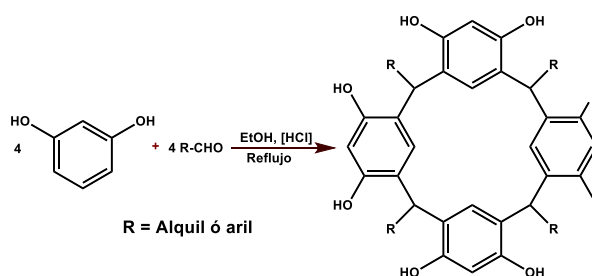
La estabilidad de los conformeros está determinada por las condiciones de reacción, sin embargo, la mayoría de las publicaciones presenta la obtención de la conformación tipo

cono como la más frecuente, aunque también se encuentra la presencia del confórmero bote, pero la rápida interconversión de este confórmero se describe como cono. También la presencia de enlaces de hidrógeno y las interacciones entre el calix[4]resorcinareno y el disolvente pueden afectar la conformación que adquiere el macrocíclico.<sup>7</sup>

### 1.1.3 Síntesis

Los calix[4]resorcinarenos se obtienen comúnmente por condensación de resorcinol con aldehídos alifáticos o aromáticos catalizado con ácido.<sup>7,8</sup> (Esquema 1-1) Para la obtención de calix[4]resorcinarenos se emplea una mezcla de etanol:agua en donde se solubiliza resorcinol y aldehído, se adiciona ácido y la mezcla se lleva a reflujo.<sup>9-12</sup> La síntesis de estos macrociclos también puede realizarse mediante metodologías alternativas; empleando ácidos de Lewis y 2,4-dimetoxicinamatos,<sup>13</sup> 1,3-dialcoxibencenos,<sup>14</sup> 1,3,5-trioxano y Sc(OTf)<sub>3</sub>,<sup>15</sup> entre otros.

**Esquema 1-1.** Obtención de macrociclos tipo resorcinareno



### 1.1.4 Funcionalización de calix[4]resorcinarenos

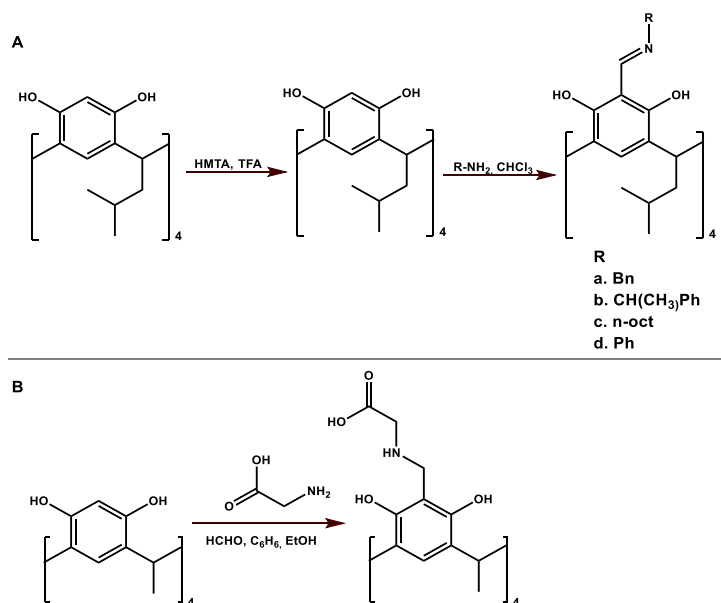
La funcionalización de los calix[4]resorcinarenos puede presentarse en el borde superior o en el borde inferior como se describe a continuación:

#### ✚ Funcionalización del borde superior

La funcionalización en el borde superior se puede realizar en el oxígeno fenólico o en la posición *orto* libre a estos grupos hidroxilos (carbono 2). Los carbonos ubicados en posición *orto* a los hidroxilos son lábiles a ataques con electrófilos, lo cual permite llevar a cabo reacciones de sustitución electrofílica aromática, lo cual aumenta las posibilidades de

síntesis de resorcinarenos. Para la funcionalización de la posición *orto* a los hidroxilos se puede emplear la reacción de Duff<sup>16</sup> obteniendo calix[4]resorcinarenos formilados que pueden reaccionar fácilmente con aminas alifáticas o aromáticas (Esquema 1-2-A).<sup>17</sup> Los calix[4]resorcinarenos también pueden ser modificados con aminoácidos como alanina y glicina, mediante la reacción de Mannich, mejorando la solubilidad en agua (Esquema 1-2-B), y permitiendo que estos macrociclos modificados puedan ser empleados como cavitandos.<sup>17</sup> De la misma manera, Kanaura ha empleado piridina, N-óxidos, acetatos, nitrilos y cloruros de alquilo para la obtención de cavitandos.<sup>18</sup> Además, estas modificaciones en los calix[4]resorcinarenos permite mejorar su habilidad de interacción con aminoácidos.<sup>4</sup>

### Esquema 1-2. Funcionalización del borde superior de resorcinarenos

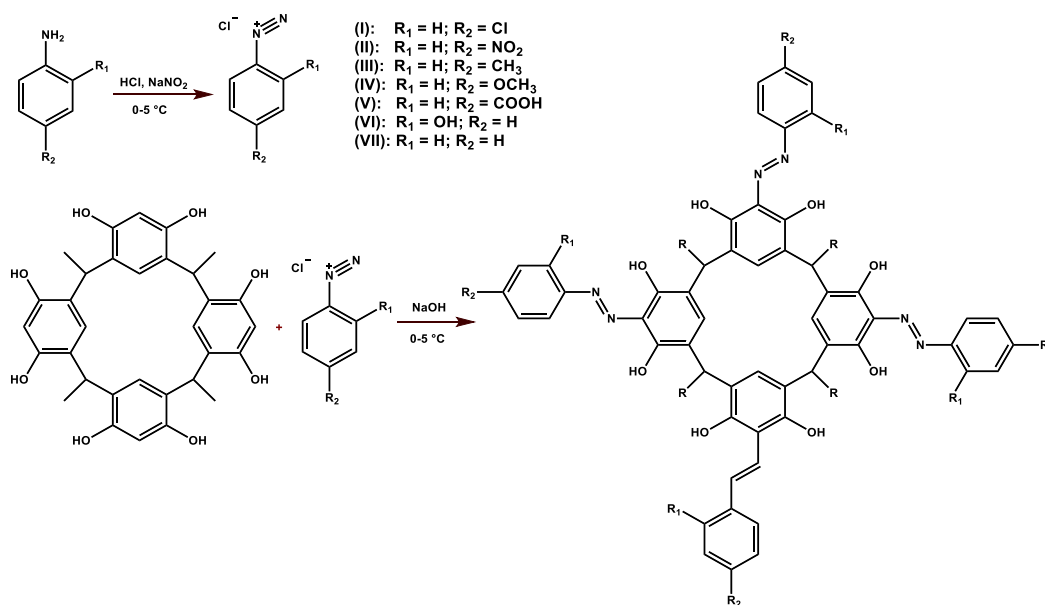


A. Funcionalización del borde superior mediante reacción de Duff<sup>16</sup> y B. Obtención de aminoácidos C-metilcalix[4]resorcinareno<sup>17</sup>

Así mismo, al realizar la sulfonato metilación de los calix[4]resorcinarenos con formaldehído y sulfito de sodio se obtiene supramoléculas tipo huésped-hospedero capaces de interactuar con varias moléculas.<sup>10</sup> También puede modificarse el carbono 2 del resorcinol para la obtención de tetrabromoresorcinarenos,<sup>19</sup> tiometilaciones<sup>5</sup> y adiciones de Michael para la obtención de resorcinarenos con sustituyentes derivados de naftol.<sup>20</sup> Pero sin lugar a duda, una de las reacciones más interesantes en la modificación

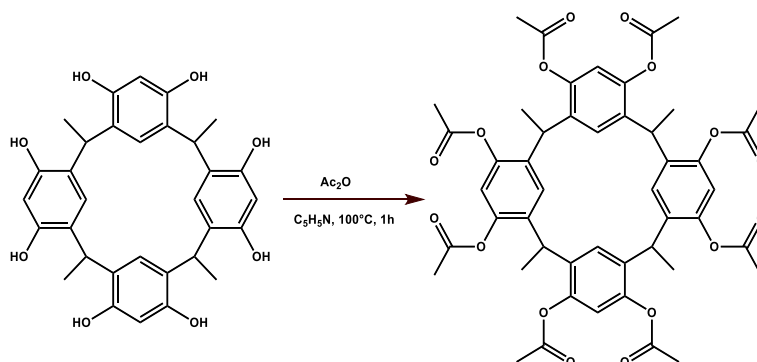
del borde superior de calix[4]resorcinarenos es la diazotación para la obtención de azocalix[4]resorcinarenos (Esquema 1-3),<sup>21</sup> ya que los compuestos diazotados en general pueden presentar múltiples aplicaciones: apertura y cierre de membranas celulares, control de conformación  $\alpha$ -helical, bisagras moleculares, etc.<sup>22</sup>

### Esquema 1-3. Acoplamiento azo de calix[4]resorcinarenos<sup>21</sup>



Por otro lado, las modificaciones sobre los grupos hidroxilo de las unidades de calix[4]resorcinareno han sido ampliamente estudiadas. Por ejemplo, Hörberg acetiló los hidroxilos de una serie de calix[4]resorcinarenos mediante reacción de este macrociclo con anhídrido acético y piridina (Esquema 1-4).<sup>8,23,24</sup> Al igual que Hörberg, autores como Rissanen,<sup>24</sup> han realizado la acetilación de los grupos hidroxilo, así como reacciones de acilación y bromometilación.

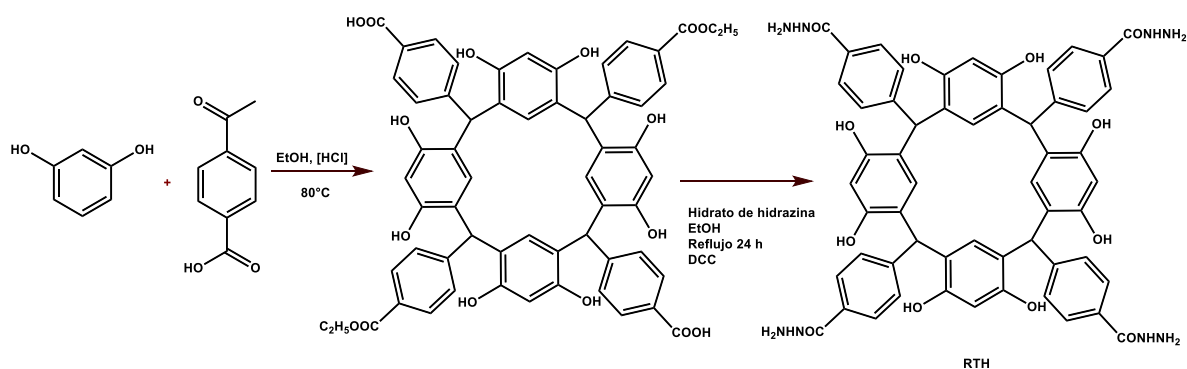
### Esquema 1-4. Acetilación de calix[4]resorcinarenos<sup>8</sup>



## Funcionalización del borde inferior

La funcionalización del borde inferior de los calix[4]resorcinarenos se presenta en los sustituyentes del puente metileno. Por ejemplo, Mishra preparó un calix[4]resorcinareno a partir de resorcinol y ácido 4-formilbenzoico, en este paso, dos de los grupos carboxilos son esterificados e impiden la esterificación de los otros dos grupos carboxilo. Posteriormente mediante sustitución nucleofílica en los grupos carboxilos de los sustituyentes del puente metileno se produce resorcinareno tetrahidrazida (RTH). Este macrociclo se empleó para estabilizar nanopartículas de oro y para detección de fenilalanina en suero humano (Esquema 1-5).<sup>25</sup>

**Esquema 1-5.** Funcionalización de calix[4]resorcinarenos en el borde inferior<sup>25</sup>



### 1.1.5 Aplicaciones de calix[4]resorcinarenos

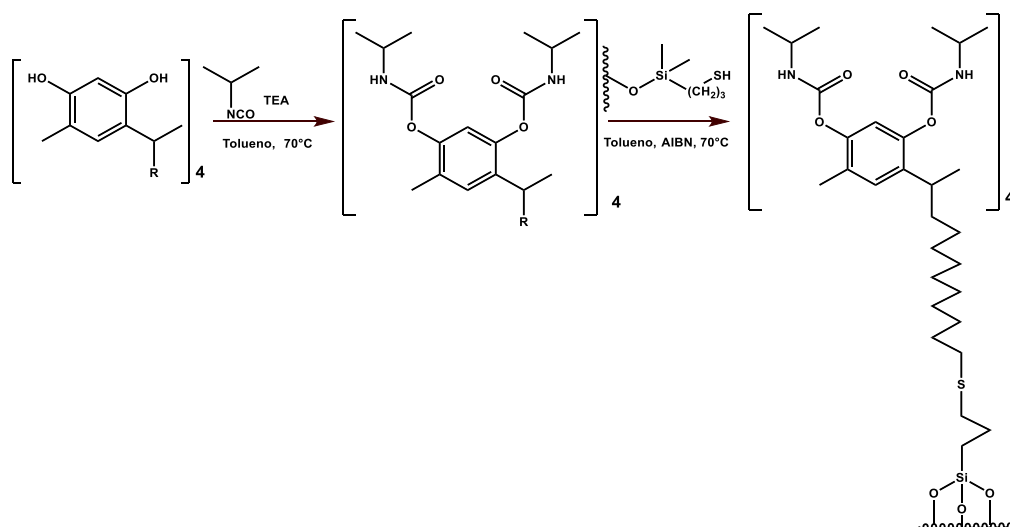
Sus características estructurales permiten que puedan ser empleados en múltiples áreas como química supramolecular, analítica, bioquímica, medicina, cromatografía y muchos otros campos. Han sido empleados en nanomedicina,<sup>26</sup> como catalizadores en síntesis orgánica,<sup>27</sup> como cavitandos: para la formación de complejos o el transporte de fármacos.<sup>28-30</sup> Y una aplicación de gran relevancia para el presente estudio es en la formación de sistemas huésped hospedero,<sup>31,32</sup> con moléculas orgánicas<sup>3</sup> y es de esperar que puedan interactuar con aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos de la misma manera que han sido empleados calixarenos publicados por Mutihac<sup>33</sup> o éter corona presentados por Paik.<sup>34</sup>



Adicionalmente han sido usados como colorantes para fibras como algodón o lana,<sup>35,36</sup> como quimiosensores para la detección de cationes, aniones y moléculas neutras,<sup>37</sup> como cápsulas,<sup>38,39</sup> en la síntesis de dendrímeros.<sup>26,40</sup> y también se emplean en técnicas de separación como extracción en fase sólida, cromatografía de gases, electroforesis capilar, cromatografía iónica, en membranas líquidas,<sup>1</sup> y como agentes modificantes de fases estacionarias para HPLC.<sup>41</sup> Por ejemplo, Gong y colaboradores realizaron la modificación de una columna de sílica con tetrametilresorcinareno para la separación de isómeros de nitrofenol y de enantiómeros de compuestos quirales.<sup>3</sup>

En estudios recientes se ha presentado la modificación de fases estacionarias sílica gel RP-18 para HPLC con *C*-tetra-*n*-undecilcalix[4]resorcinareno, aprovechando sus diferentes propiedades hidrofílicas en el borde superior y propiedades lipofílicas en el borde inferior.<sup>42</sup> Sokoließ y colaboradores también emplearon calix[4]resorcinarenos para la separación de antipsicóticos derivados de tioxanteno (flupentixol, clopentixol, clorprotixeno) y un antidepresivo tricíclico (doxepina).<sup>43</sup> Ruderisch modificó todos los grupos hidroxilo de calix[4]resorcinarenos con isocianato de isopropilo y posteriormente inmovilizó el calix[4]resorcinareno derivatizado a través de los sustituyentes de los puentes metileno que contienen doble enlace terminal mediante una reacción de radicales libres sobre una fase estacionaria de sílica funcionalizada con mercaptopropil (Esquema 1-6).<sup>41</sup>

**Esquema 1-6** Fase estacionaria de sílica con calix[4]resorcinareno<sup>41</sup>



Sin lugar a duda estos antecedentes, permiten explorar otras fases estacionarias para la posible modificación con resorcinarenos, como por ejemplo, aquellas preparadas a partir de derivados de metacrilato, como 2,3-epoxipropilmetacrilato, el cual contiene un grupo oxirano muy reactivo que pueden sufrir fácilmente una reacción de apertura seguida de una sustitución nucleofílica en los carbonos electrofílicos lábiles a ataques con reactivos nucleofílicos que contienen grupos amina, hidroxilo o carboxilo,<sup>44</sup> como los calix[4]resorcinarenos. Este tipo de reacción no se ha realizado hasta la fecha, y permitiría el uso de fases estacionarias poliméricas modificadas con resorcinarenos como una potencial técnica de separación y análisis de mezclas complejas.

## **1.2 Columnas Monolíticas**

### **1.2.1 Generalidades**

La cromatografía es una técnica desarrollada hace más de un siglo por Tswett, que define el método cromatográfico como el uso de adsorbentes y disolventes específicos para la separación de un analito de interés.<sup>45</sup> A partir de entonces, la técnica ha evolucionado<sup>45-51</sup> y las fases estacionarias pasaron a considerarse el “corazón” del HPLC, puesto que en gran medida la separación de mezclas complejas depende de ellas, por ello las mejoras y modificaciones químicas de las fases estacionarias no se hicieron esperar, empezando con la disminución del tamaño de partícula.<sup>51</sup>

La técnica de producción de partículas uniformes permitió que el tamaño de estas disminuyese a ~2  $\mu\text{m}$ , lo cual redundó en mejores separaciones, pero se generó un aumento en la presión del equipo, debido a la reducción de espacios intersticiales y la permeabilidad, por ello fue necesario fabricar equipos que pudieran resistir presiones de hasta 1200 bar, sin embargo, el costo de fabricación y mantenimiento de estos equipos era elevado, lo cual limitó su asequibilidad.

Por lo anterior, algunos investigadores sugirieron que era necesario desarrollar materiales más porosos que permitieran reducir la resistencia hidráulica de la fase estacionaria al paso de la fase móvil (altos flujos con presiones bajas) y que además mantuvieran igual o mayor eficiencia que las columnas empacadas empleadas en HPLC. De allí surge, hacia

1990, la idea de columnas monolíticas, que son estructuras rígidas porosas derivadas de reacciones de polimerización orgánica<sup>52</sup> o inorgánica,<sup>53</sup> su estructura está conformada por una red de canales mediante la cual se separan eficientemente moléculas y biomoléculas.<sup>54</sup>

Estos materiales han sido estudiados durante las últimas décadas y el avance en cuanto a su preparación, funcionalización y aplicación ha crecido exponencialmente, desde 1967, cuando se desarrolló la primer matriz polimérica<sup>55</sup> hasta las investigaciones de Hjertén,<sup>56</sup> Tennikova,<sup>57</sup> Švec,<sup>58</sup> entre otros, que lograron considerables avances en el desarrollo, obtención y aplicación de columnas monolíticas.

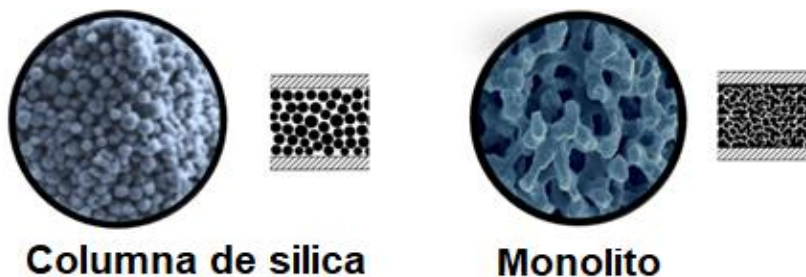
Es claro que los monolitos se han convertido en una alternativa cromatográfica, permiten aumentar la velocidad del flujo sin comprometer la resolución. El aumento de flujo trae consigo un aumento en la presión ejercida sobre el lecho polimérico, pero es gracias a los macroporos, que son canales interconectados por donde fluye la fase móvil, que es posible controlar la presión y por tanto la estructura del monolito no se ve comprometida. Por otro lado, si se desea mantener o mejorar la resolución de las muestras analizadas debe contarse con un material capaz de proporcionar suficiente área superficial, en donde la transferencia de masa sea eficiente y el anclaje (interacción del analito con la fase estacionaria) a las moléculas se dé con facilidad. Estas características son propias de los monolitos, los cuales están conformados por mesoporos, dentro de los cuales se realiza la retención de los analitos.<sup>48,59,60</sup>

Las columnas monolíticas se caracterizan por su buena permeabilidad, se pueden preparar *in situ*<sup>61</sup> y están herméticamente unidas a las paredes de la columna, razón por la cual no presentan pérdida de la fase estacionaria ni de eficiencia. Los monolitos de base orgánica presentan tolerancia a valores de pH mayores que los lechos de sílica convencionales.

Lo que diferencia una columna monolítica de las columnas empacadas convencionales, es su estructura (Figura 1-3). Las columnas monolíticas son estructuras rígidas con canales entrecruzados, herméticamente unida a la columna, mientras que las columnas de sílica están compuestas por partículas empacadas, el volumen intersticial entre las partículas es de ~50-60%, mientras que en las columnas monolíticas es de ~80%. Este aumento se debe a que en las columnas monolíticas el espacio que ocuparían las partículas de sílica

en la empacada corresponde a los macroporos, que son los que permiten mejorar la permeabilidad. Esto permite aumentar la velocidad de flujo, sin afectarse por la presión, lo cual significa que los tiempos de análisis se reducen.

**Figura 1-3.** Comparación entre la estructura de una columna de sílica empacada y una columna monolítica<sup>48,62,63</sup>



Las características estructurales de los monolitos permiten que presenten menor riesgo de compresión, encogimiento y deformidad que las columnas de sílica empacadas.<sup>62</sup> Adicionalmente, los monolitos pueden ser modificados químicamente, esto aumenta su aplicación en las diferentes ramas de la química y potencializa su papel en el campo de la cromatografía.

### 1.2.2 Clasificación de Columnas Monolíticas

Los monolitos pueden clasificarse en inorgánicos y orgánicos. Los primeros se obtienen de la polimerización de sílica y los segundos mediante la reacción de polimerización entre moléculas orgánicas

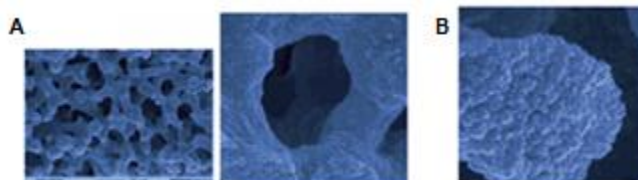
#### Columnas monolíticas inorgánicas

Este tipo de columnas se preparan a partir de alcoxisilanos y polietilenglicol (PEG) mediante un proceso conocido como sol-gel lo que permite que posean estructura multimodal (Figura 1-4)<sup>63</sup> y generalmente se preparan dentro de tubos o capilares de sílice fundida.<sup>64</sup>

Merck, patentó el monolito inorgánico, conocido como Chromolith®, el cual es actualmente comercializado y sus bases y principios están en el trabajo realizado por Minakuchi y col.<sup>53</sup>

La columna de sílice de alta pureza patentada por Merck tienen un tamaño de macroporo de 2  $\mu\text{m}$  y de mesoporo de 13 nm, permite realizar separaciones eficientes en pocos minutos. Sin embargo, el uso de estas columnas se ve limitado por su baja resistencia al uso de pH básicos (rango de pH de trabajo 2,0-8,0).

**Figura 1-4.** MEB de Columna Monolítica de sílice.



(a) MEB de la estructura porosa de una columna monolítica de sílice (izquierda) y vista aumentada de la entrada a un macroporo (derecha). (b) Imagen MEB de la estructura de un mesoporo en el esqueleto de una columna monolítica de sílice.<sup>63</sup>

#### **Columnas Monolíticas Orgánicas**

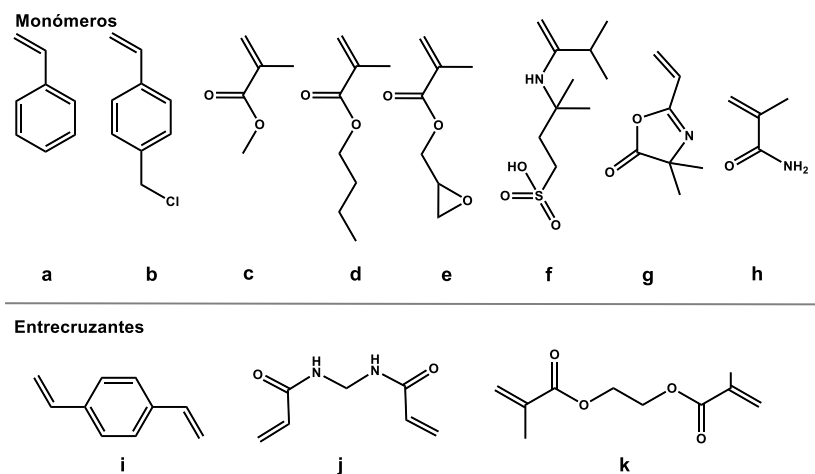
En cuanto a las columnas monolíticas orgánicas, son las que pueden obtenerse mediante la reacción de polimerización entre compuestos como metacrilatos, acrilatos, o estireno, generalmente se preparan in situ, es decir, que la mayoría de grupos de investigación hacen sus propias columnas y las adaptan a sus intereses.<sup>65</sup> La ventaja de los monolitos orgánicos radica en su mayor resistencia a cambios de pH en comparación con los monolitos inorgánicos.

Para la preparación de los monolitos orgánicos se requiere una mezcla de polimerización compuesta por: monómeros, entrecruzante, iniciador y porógenos. La lista de los monómeros que pueden emplearse para la formación de los monolitos orgánicos es bastante extensa, en la Figura 1-5 se enumeran algunos ejemplos.<sup>62,66</sup> La naturaleza química de los monómeros influye en las propiedades del polímero obtenido. Por ejemplo, si se requiere disminuir la polaridad del monómero puede emplearse derivados de metacrilato, como: butilmetacrilato o laurilmetacrilato, ya que la polaridad de estos compuestos cambia en función de la cadena radical del éster.

En lo que respecta al entrecruzante, la cantidad empleada afecta las propiedades del monolito, así, cuanto mayor porcentaje de este se adicione mayor área superficial

presentará la fase estacionaria.<sup>67</sup> Algunos entrecruzantes empleados en la preparación de monolitos orgánicos son: divinilbenceno (i), *N,N'*-metanodiilbisprop-2-enamida (j) y etilendimetacrilato (EDMA) (k) (Figura 1-5).

**Figura 1-5.** Monómeros y entrecruzantes



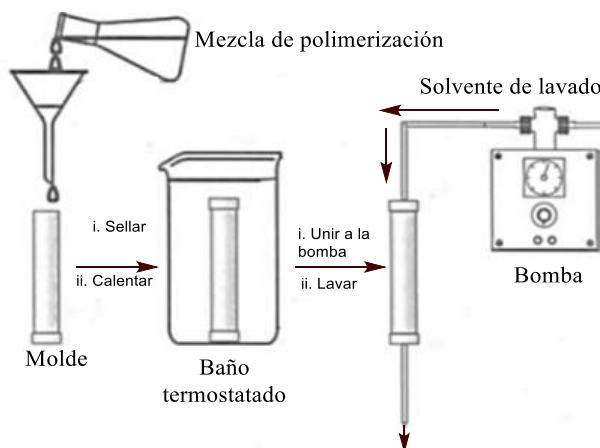
Monómeros: Estireno (a), clorometilestireno (b), metilmetacrilato (MMA) (c), butilmetacrilato (BMA) (d), glicidilmetacrilato (GMA) (e), Ácido 1-propano sulfónico (f), 2-vinil-4,4-dimetilaza lactona (g), Acrilamida (h). Entrecruzantes: Divinilbenceno (i), *N,N'*-metanodiilbisprop-2-enamida (j), etilendimetacrilato (EDMA) (k).

Por otro lado, los iniciadores son compuestos que permiten dar comienzo a la reacción, los más empleados para realizar la polimerización: 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN), peróxido de benzoilo (BPO), 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (ABCN).<sup>68</sup> Adicionalmente, la mezcla de polimerización debe contener porógenos, que son disolventes empleados en la polimerización para formar los poros. El uso del porógeno depende en gran medida de la metodología empleada para sintetizar el monolito e incluso de las propiedades que se esperan en el lecho polimérico. Por ejemplo, Švec y colaboradores prepararon un monolito orgánico y los porógenos empleados fueron dodecanol y ciclohexanol,<sup>69</sup> al igual que Okay.<sup>70</sup> Horák preparó una columna monolítica orgánica usando como porógeno tolueno,<sup>71</sup> posteriormente se empleó propanol/1,4-butanodiol/H<sub>2</sub>O<sup>72</sup>

Los monolitos orgánicos son fases estacionarias que pueden prepararse mediante polimerización, existen dos metodologías: la primera metodología consiste, brevemente, en verter la mezcla de polimerización en un molde generalmente un tubo, posteriormente se sella el molde y se introduce en un baño termostataado que permite controlar la

temperatura. Cuando la polimerización termina, el molde se debe conectar a una bomba que permita lavar el monolito, retirando cualquier vestigio de mezcla porogénica o compuestos que no reaccionaron (Figura 1-6).<sup>62</sup> En esta metodología se prepara el monolito dentro de la columna que se acoplará al equipo HPLC.

**Figura 1-6.** Preparación de columnas monolíticas mediante polimerización<sup>62</sup>



Uno de los problemas que se presenta en esta metodología es que los porógenos pueden desplazar el polímero del molde o que el material polimérico sufra encogimiento radial, separando el monolito de las paredes del molde y formando canales entre estos dos, deficiencia que afectaría el flujo y por ende el correcto funcionamiento del lecho polimérico. Es por ello que se realiza el anclaje del monolito a la pared del molde mediante silanización.<sup>62</sup>

Los moldes empleados para este tipo de fases estacionarias monolíticas pueden ser de vidrio, acero, cuarzo, policarbonato, polipropileno, polímeros sintéticos, etc. La selección del tipo de molde depende de las características de la reacción de polimerización. Por ejemplo, si se desea realizar una polimerización inducida fotoquímicamente se deben emplear moldes de cuarzo, que permitan la irradiación de la mezcla de polimerización.<sup>62</sup>

La segunda metodología es descrita por Barut y colaboradores,<sup>62</sup> y requieren tres pasos: (i) Inicialmente se mezcla el monómero, entrecruzante e iniciador, preparando una solución con los porógenos y agua, se debe expulsar el aire con  $N_2$ , se inicia la polimerización mediante calentamiento y se agita. Cuando la reacción finaliza (ii) se debe dejar enfriar

manteniendo la agitación. Los componentes solubles se retiran del polímero por decantación repetida con agua y alcohol. Posteriormente se retira el polímero del molde, se corta de acuerdo al dispositivo en el cual se vaya a acoplar, (iii) se realiza la modificación química y se introduce el monolito en un dispositivo apropiado.<sup>57,69,73</sup> A diferencia de la primera metodología, en esta la preparación del monolito se realiza en un molde diferente al que se acoplara en el equipo HPLC.

### 1.2.3 Control del Tamaño del Poro

La utilidad y eficiencia del monolito depende en gran medida de la estructura porosa: cantidad de fase estacionaria y tamaño de macroporos y mesoporos. Estas características, controlan el área superficial, la velocidad y volumen de flujo, así como la presión y permeabilidad, de allí que múltiples estudios se hayan realizado en torno a las condiciones que influyen en el proceso de polimerización y en la estructura porosa.<sup>60,74</sup>

Entre los parámetros que deben tenerse en cuenta esta (i) la temperatura<sup>74</sup>, (ii) la concentración del iniciador que afecta considerablemente la homogeneidad del monolito, la temperatura de reacción y determina el número de núcleos de crecimiento que alteran la etapa de separación del monolito y el tamaño de los poros. Así, Buchmeiser, para la obtención de monolitos mediante polimerización vía metátesis por apertura de anillo (ROMP por sus siglas en inglés), estableció que adicionar entre 0,1-1% del iniciador no afecta el tamaño de los poros.<sup>62,75</sup> Otro de los parámetros que influye en la obtención de una columna monolítica útil es (iii) la mezcla de porógenos, la cual condiciona el tamaño de los poros, ya que la polimerización inicia en un medio homogéneo hasta que las cadenas poliméricas aumentan su tamaño, entrecruzándose y separándose del porógeno. Si el polímero se solvata en el porógeno, el radio de los poros será menor, por el contrario, si la fase de separación entre el porógeno y el polímero formado es evidente, el radio de los poros será mayor, por ello es necesario identificar la mezcla porogénica que contribuya a formar mejor tamaño de poro.<sup>66</sup>

Adicionalmente, debe tenerse en cuenta (iv) el punto de ebullición de los disolventes seleccionados como mezcla porogénica, ya que si la temperatura de polimerización es mayor, el disolvente se evapora, generando un estructura porosa irregular y heterogénea.<sup>74</sup> Del mismo modo (v) la proporción entre monómero, entrecruzante y porógenos, modifica



la estructura porosa. Por ejemplo, si la mezcla porogénica favorece la formación de canales, la cantidad de fase estacionaria será reducida, lo cual disminuirá el área superficial y por ende afectará la retención de analitos y la capacidad de la columna. Generalmente se emplea un porcentaje cercano a ~60% para los porógenos y ~40% de mezcla monómero/entrecruzante para obtener un monolito homogéneo y útil.<sup>52,58,69,76</sup>

### 1.2.4 Aplicaciones de Columnas Monolíticas

Las columnas monolíticas de base sílice son una fase estacionaria ampliamente usada en HPLC;<sup>77</sup> en un estudio reciente, Prasanna y col. modificaron un disco rígido CIM® con el fin de purificar inmunoglobulina G (IgG),<sup>78</sup> además de usarse en la separación de proteínas, se ha usado para la separación de ADN y pequeñas moléculas.<sup>79,80</sup> Las publicaciones en cuanto a la aplicación de columnas monolíticas son extensas, a continuación, se destacan algunas de ellas:

**Tabla 1-1.** Lista de algunas aplicaciones de columnas monolíticas

MONOLITO	APLICACIÓN	Ref
Poli(ácido metacrilato-co-etilendimetacrilato)	Cuantificación de sulfonamidas en miel	79
Columnas derivadas de glicidil modificadas con grupos tiol.	Separación moléculas pequeñas ácidas, básicas y neutras	81
Viniltrimetoxisilano-1,6-hexanoditiol y Viniltrimetoxisilano-tetrakis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol	Separación de fenoles, productos naturales, proteínas.	82
Alcoxisilanos-poli(etilenglicol)	Separación de analitos aromáticos	83
Metilmetacrilato-glicidilmetacrilato-base de Schiff de paladio	Actividad catalítica	84
1-dodeceno-triacrilato de trimetilolpropano-EDMA	Separación de la lisozima de clara de huevo y moléculas pequeñas (aminas y derivados del benceno)	80
Acrilamida-dimetacrilamida de etilenglicol-modificado con hesperetina	Extracción de hesperetina en pulpa de <i>Citrus reticulata</i> cv. <i>Chachiensis</i>	85

## 1.3 Funcionalización de Columnas Monolíticas

La superficie de los monolitos puede ser modificada con el fin de emplear la fase estacionaria en una cromatografía específica, por ejemplo, si se requiere una fase estacionaria para separaciones por intercambio iónico se requerirá grupos ionizables en la

superficie del monolito.<sup>62</sup> La funcionalización de estas columnas puede realizarse mediante tres metodologías:<sup>86,87</sup> La primera de ellas consiste en realizar la funcionalización del monómero antes de realizar la reacción de copolimerización,<sup>88</sup> la segunda corresponde a la funcionalización después de la polimerización (post-funcionalización o “*grafting*”) y la tercera mediante impresión molecular.<sup>89,90</sup> De estas tres metodologías, la más empleada es la post-funcionalización o “*grafting*”, ya que permite el uso de un polímero estandarizado, del cual la metodología de preparación ha sido completamente descrita y la modificación de su superficie no involucra nuevas estandarizaciones de metodologías de obtención del polímero.

La modificación química por “*grafting*” puede darse fácilmente en monómeros como estireno, el cual mediante modificación química puede convertirse en un grupo altamente hidrofílico,<sup>91</sup> o con polímeros que contengan monómeros muy reactivos como glicidilmetacrilato (GMA).<sup>74,92</sup> Los copolímeros derivados de GMA, han tenido una gran acogida como material de preparación de columnas monolíticas, debido al grupo oxirano que posibilita su post-funcionalización, ya que este grupo es bastante lábil a una reacción de apertura anular y una posterior reacción con nucleofílicos.<sup>87,93,94</sup> La funcionalización de las columnas monolíticas es un procedimiento que aumenta sus ventajas y aplicabilidad. A continuación, se presenta un resumen de algunas modificaciones realizadas hasta la fecha.

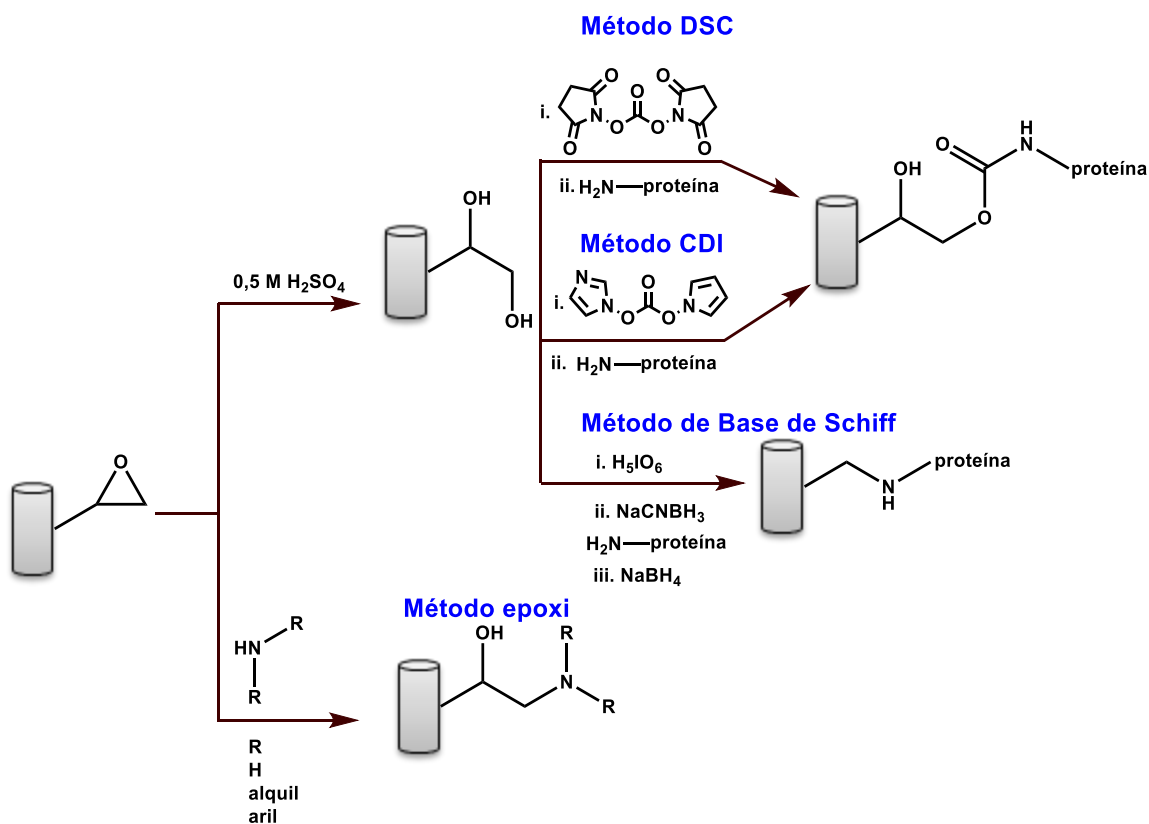
**Tabla 1-2.** Modificaciones químicas realizadas en columnas monolíticas

MATRIZ	AGENTE MODIFICANTE	Ref.
<i>poli</i> (ácido metacrilato-co-etilendimetacrilato)	3-(trimetoxisilil)propilmetacrilato	95
Alcoxisilanos	Poli(etilenglicol)	83
Metilmetacrilato-glicidilmetacrilato	Base de Schiff de paladio	84
Columnas monolíticas de sílica (OnyxTM)	Selectores quirales derivados de poliprolina	96
Acrilamida-dimetacrilamida de etilenglicol	Hesperetina	85

En la modificación de superficies de polímeros derivados de GMA se han descrito cuatro métodos (Esquema 1-7). i.) Método DSC (por sus siglas en inglés “*disuccinimidyl carbonate*”), ii.) Método CDI (por sus siglas en inglés “*carbonyldiimidazole*”) y iii.) Método de bases de Schiff, estos tres métodos son empleados para el anclaje de proteínas a los polímeros derivados de GMA y consisten en la conversión inicial del grupo oxirano en diol,

el cual es modificado por diferentes reacciones que posteriormente permitirían el anclaje de la proteína por el grupo amino.<sup>94</sup> Y finalmente el iv.) Método epoxi: en el cual se realiza el ataque nucleofílico al sistema anular de GMA y generalmente se emplean aminas como nucleófilos.<sup>87,93,94</sup>

**Esquema 1-7.** Post-funcionalización (“grafting”) de columnas derivadas de GMA<sup>87,93,94</sup>



Generalmente el método epoxi se emplea para el anclaje covalente de proteínas o de compuestos que contienen grupos amino, sin embargo, en esta investigación se propone la modificación de la superficie de copolímeros derivados de GMA con macrociclos que contienen grupos carboxilo, lo cual, hasta el momento no ha sido explorado. El uso de resorcinarenos como agentes modificantes para materiales monolíticos derivados de GMA, amplía las posibles aplicaciones de columnas monolíticas modificadas, considerando las propiedades estructurales de los resorcinarenos y sus múltiples aplicaciones debido a la interacción que puede establecer con analitos de interés.



## **2. Hipótesis**

Los macrociclos conocidos como resorcinarenos pueden ser usados como agentes modificantes de materiales monolíticos derivados de glicidilmetacrilato, que podrían ser empleados como fases estacionarias para HPLC, útiles en el análisis de biomoléculas de tipo peptídico.

### 3. Metodología

En este trabajo se sintetizaron materiales monolíticos con su superficie funcionalizada químicamente con resorcinarenos y posteriormente se evaluó su interacción con diferentes péptidos. Para obtener estos materiales fue necesario realizar las etapas que se describen a continuación:

Etapas 1. Síntesis de los resorcinarenos derivados del butanal, hexanal y decanal, (**1A**, **1B** y **1C**, respectivamente)

Etapas 2. Funcionalización de los resorcinarenos obtenidos en la etapa 1 con cloruro de 4-carboxibencenodiazonio y  $\beta$ -alanina

Etapas 3. Obtención de materiales monolíticos: *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) y *poli*(GMA-co-EDMA), los cuales presenta grupos oxirano altamente reactivos expuestos en su superficie.

Etapas 4. Modificación de la superficie de copolímeros con resorcinarenos empleando la metodología “*grafting*”-método epoxi.

Etapas 5. Evaluación de la interacción del material monolítico funcionalizado con péptidos sintéticos.

A continuación, se describen los métodos empleados en cada una de las etapas del trabajo

#### 3.1 Técnicas Generales utilizadas

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon las siguientes técnicas y metodologías. Todos los reactivos químicos fueron adquiridos comercialmente y usados sin purificación previa.

**Puntos de fusión:** fueron tomados en un fusiómetro Electrothermal 9100 y se reportan sin corregir.

**Infrarrojo:** Todos los espectros se realizaron en espectrofotómetro PERKIN-ELMER Paragón, SHIMADZU IR Prestige-21 y THERMO Nicolet iS10, en pastillas KBr 1%. Los espectros de IR para polímeros se tomaron empleando reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés, *Attenuated Total Reflection*).

**Análisis Elemental:** se realizó en un equipo Thermo Scientific Flash 2000 CHN S-O con detector de conductividad térmica.

**Cromatografía en Capa Delgada (CCD):** se empleó como fase estacionaria sílica de la casa Merck, en cromatofolios de 0,25 mm de espesor y diámetro de partícula de 10  $\mu\text{m}$ . Como eluyentes y agente revelador se emplearon diferentes mezclas de disolventes y vapor de yodo, respectivamente.

**Masas:** La muestra (1 mg/mL) fue mezclada con la matriz (1 mg/mL de ácido 2,5-dihidroxibenzoico o ácido sinapínico para péptidos y 4-nitroanilina para resorcinarenos) (2:18, v/v), después 1  $\mu\text{L}$  de esta mezcla fue sembrado en el “*target*”. El experimento fue tomado en un espectrómetro de masas Microflex TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), Laser: 250 disparos y 25-30% poder.

**Resonancia Magnética Nuclear:** Los espectros de RMN fueron realizados en un espectrómetro BRUKER Avance 400 operado a 400,131 MHz para RMN- $^1\text{H}$  y 100,623 MHz para RMN- $^{13}\text{C}$ . Los desplazamientos químicos se informan en ppm, utilizando la señal de disolvente como referencia.

**Microscopía Electrónica de Barrido (MEB):** se realizó en un microscopio TESCAN VEGA3 SB.

**Análisis Termogravimétrico-Calorimetría de Barrido Diferencial (TGA/DSC):** se llevó a cabo en un analizador térmico simultáneo Mettler Toledo (TGA / DSC 3+). Se calentaron 10 mg de cada compuesto de 20 a 600° C (velocidad de calentamiento 10° C min $^{-1}$ ).

**Raman:** se registraron en un microscopio Raman Thermo Scientific DXR con el desplazamiento de Raman en  $\text{cm}^{-1}$ .

**HPLC:** se usó un cromatógrafo Agilent Series 1260. Se empleó 1 mg/mL de muestra y como fase móvil mezclas de 0,05% TFA en  $\text{H}_2\text{O}$  (Solvente A) y 0,05% TFA en ACN (Solvente B), dependiendo de las características de cada muestra. Como fase estacionaria se empleó una columna Chromolith® C-18 (4,6x50mm) y una columna Kromasil Eternity 2.5-C18 (4,6x100 mm), los métodos de análisis cromatográfico variaron de acuerdo con la muestra, estos serán especificados en cada uno de los análisis. Para todas las muestras la longitud de onda de detección fue de 210 nm y el volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$ .

## 3.2 Síntesis y funcionalización de resorcinarenos

### 3.2.1 Síntesis de resorcinarenos 1A, 1B y 1C

La síntesis de los resorcinarenos se realizó teniendo como metodología de partida el trabajo realizado dentro del grupo de investigación. A una solución de resorcinol (x mmol) en una mezcla etanol:agua (1:1) se adicionó x mmol del aldehído correspondiente (butanal, hexanal o decanal) y 10 mL de HCl 37%, se dejó reaccionar a reflujo con agitación constante hasta reacción completa de reactivos, verificando mediante CCD, posteriormente se enfrió en un baño de hielo y se filtró. El precipitado fue filtrado y lavado con agua y se secó a presión reducida. Así se obtuvieron los siguientes resorcinarenos:

**2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol (1A)** Se obtuvo un sólido amarillo pálido. El Rendimiento fue del 82%. El Punto de fusión (descomp.) fue  $>250^\circ\text{C}$ . IR (KBr)  $\text{vmáx. (cm}^{-1}\text{)}$ : 3.318 (OH), 2.955 (ArCH), 2.929 (C-H alifático), 1.617 (C=C Ar.), 1.285 (C-O). UV-vis (máx. nm): 286. Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{O}_8$ : C, 67,58; H, 7,66; O, 24,76. Encontrado: C, 67,94; H, 6,93. RMN- $^1\text{H}$  ( $\delta$ , ppm  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ): 0,90 (t,12H,- $\text{CH}_3$ ), 1,20 (m,8H, $\text{CH}_2$ ), 2,08 (q,8H, $\text{CH}_2$ ), 4,23 (t,4H,CH), 6,15 (s,4H,orto a OH), 7,24 (s,4H,meta a OH), 8,93 (s,8H,OH). RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ , ppm  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ): 16,1, 25,3, 32,7, 49,2, 112,1, 127,2, 129,0, 151,1.<sup>9</sup> (Anexo 1)



**2,8,14,20-tetrapentilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol (1B):** Se obtuvo un sólido amarillo. Rendimiento 83%. Punto de fusión (descomp.) >250 °C. Espectro IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ . ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3.416 (OH), 2.950 (ArCH), 2.928-2.858 (C-H alifático), 1.620 (C=C Ar.), 1.292 (C-O). UV-vis ( $\nu_{\text{máx}}$ . nm): 285. Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{48}\text{H}_{64}\text{O}_8$ : C, 74,97; H, 8,39; O, 16,64. Experimental: C, 70,22; H, 8,14. RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$ , ppm ( $\text{CD}_3$ )<sub>2</sub>SO): 0,85 (t, 12H, CH<sub>3</sub>), 1,19 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 1,28 (m, 16H, CH<sub>2</sub>), 2,03 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 4,24 (t, 4H, CH), 6,17 (s, 4H, H *orto* a OH), 7,16 (s, 4H, H *meta* a OH), 8,90 (s, 8H, OH). RMN-<sup>13</sup>C ( $\delta$ , ppm ( $\text{CD}_3$ )<sub>2</sub>SO): 14,1, 22,4, 27,6, 31,6, 33,1, 34,1, 102,5, 123,2, 124,9, 151,8. (Anexo 2)

**2,8,14,20-tetranonilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol (1C):** Se obtuvo un sólido amarillo pálido. Se cristalizó obteniendo un sólido cristalino blanco. Rendimiento 87%. Punto de fusión(descomp.) >250 °C. Espectro IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ . ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3.258 (OH), 2.925 (ArCH), 2.853 (CH alifático), 1.620 (C=C), 1.294 (C-O). UV-vis. ( $\nu_{\text{máx}}$ . nm): 286. Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{64}\text{H}_{96}\text{O}_8$ : C, 77,38; H, 9,74; O, 12,88. Experimental: C, 76,13; H, 9,91. RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$ , ppm ( $\text{CD}_3$ )<sub>2</sub>SO): 0,83 (t, 12H, CH<sub>3</sub>), 1,20 (s. ancho, 56H, CH<sub>2</sub>), 1,96 (s. ancho, 8H, CH<sub>2</sub>), 4,21 (t, 4H, CH), 6,15 (s, 4H, H *orto* a OH), 7,07 (s, 4H, H *meta* a OH), 8,88(s, 8H, OH). RMN-<sup>13</sup>C ( $\delta$ , ppm ( $\text{CD}_3$ )<sub>2</sub>SO): 13,8, 22,1, 27,8, 28,8, 28,9, 29,2, 29,2, 29,3, 31,4, 34,2, 102,4, 123,0, 124,3, 151,7. (Anexo 3)

### 3.2.2 Acetilación de resorcinarenos

Después de obtener los resorcinarenos **1A**, **1B** y **1C**, se procedió a realizar la modificación en el borde superior de cada resorcinareno, mediante reacción de acetilación. Siguiendo la metodología planteada por Reinhoudt y col.:<sup>97</sup> se disolvió el resorcinareno (**1A**, **1B** o **1C**) correspondiente (x mmol) en una mezcla de anhídrido acético (40 mL) y piridina (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a 100 ° C durante 1 h. Luego se añadió metanol (40 mL), y finalmente se cristalizó por evaporación lenta del disolvente a temperatura ambiente. El precipitado se filtró, se lavó con etanol y se secó a temperatura ambiente, obteniendo los siguientes resorcinarenos acetilados:

**2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacos-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaen-4,6,10,12,16,18,22,24-octail-octaacetato (2A):**

Se obtuvo un sólido cristalino blanco. Rendimiento 83%. Punto de fusión 277-282 °C. Espectro IR (KBr)  $\nu_{\text{máx.}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2.961 (ArCH), 2.936-2.873 (CH alifático), 1.761 (éster C=O), 1.207-1.162 (C-O). Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{56}\text{H}_{64}\text{O}_{16}$ : C, 67,73; H, 6,50; O, 25,78. Experimental: C, 69,13; H, 6,60. Masas MALDI-TOF (4-nitroanilina): calcd. para  $\text{C}_{56}\text{H}_{64}\text{O}_{16}$ :  $m/z = 992,42$   $[\text{M}]^+$ ; Encontrado:  $m/z = 1.015$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ . RMN- $^1\text{H}$  ( $\delta$ , ppm ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ )): 0,92 (t, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 1,34 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 1,85 (s. ancho, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 2,17 (s. ancho, 24H,  $\text{CH}_3$ ), 4,18 (t, 4H, CH), 6,90 (s. ancho, 4H, H *meta* y *orto* a OH). RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ , ppm ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ )): 14,0, 20,8, 20,9, 36,4, 36,5, 116,6, 126,2, 146,7, 168,5. (Anexo 4)

**2,8,14,20-tetrapentilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacos-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaen-4,6,10,12,16,18,22,24-octail-octaacetato (2B):**

Se obtuvo un sólido amarillo pálido. Rendimiento de 67%. Espectro IR (KBr)  $\nu_{\text{máx.}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2.930 (ArCH), 2.859 (CH alifático), 1.760 (éster C=O), 1.116 (C-O). Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{64}\text{H}_{80}\text{O}_{16}$ : C, 69,55; H, 7,30; O, 23,16. Experimental: C, 78,41; H, 9,09; N, 2,85. MALDI-TOF-MS (4-nitroanilina): calcd. para  $\text{C}_{64}\text{H}_{80}\text{O}_{16}$ :  $m/z = 1.104,54$   $[\text{M}]^+$ ; Encontrado:  $m/z = 1.125$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ . RMN- $^1\text{H}$  ( $\delta$ , ppm ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ )): 0,86 (s. ancho, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 1,28 (s. ancho, 24H,  $\text{CH}_2$ ), 1,65 (s ancho, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 1,97-2,36 (24H,  $\text{CH}_3$ ), 4,15 (t, 4H, CH), 6,32-6,98 (H *meta* y *orto* a OH). (Anexo 5)

**2,8,14,20-tetranonilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacos-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaen-4,6,10,12,16,18,22,24-octail-octaacetato (2C):**

Se obtuvo un sólido amarillo pálido. Rendimiento de 68%. Espectro IR (KBr)  $\nu_{\text{máx.}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2.923 (ArCH), 2.853 (CH alifático), 1.758 (éster C=O), 1.189 (C-O). Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{80}\text{H}_{112}\text{O}_{16}$ : C, 72,26; H, 8,49; O, 19,25. Experimental: C, 74,81; H, 8,66. MALDI-TOF-MS (4-nitroanilina): calcd. para  $\text{C}_{80}\text{H}_{112}\text{O}_{16}$ :  $m/z = 1.328,80$   $[\text{M}]^+$ ; Encontrado:  $m/z = 1.330$   $[\text{M} + 1]^+$ . RMN- $^1\text{H}$  ( $\delta$ , ppm ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ )): 0,87 (t, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 1,23-1,28 (s. ancho, 56H,  $\text{CH}_2$ ), 1,85 (s ancho, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 2,17 (24H,  $\text{CH}_3$ ), 4,14 (t, 4H, CH), 6,91 (H *meta* y *orto* a OH). (Anexo 6)

### 3.2.3 Reacción de acoplamiento azoico de los resorcinarenos y cloruro de 4-carboxibenzeno diazonio

Para la funcionalización de los resorcinarenos **1A**, **1B** y **1C**, mediante acoplamiento azoico, se emplearon dos metodologías:

**Metodología 1:** Se preparó una disolución de ácido *p*-aminobenzoico (4x mmol), HCl 37% y H<sub>2</sub>O, se enfrió a 0 °C, se adicionó gota a gota una disolución de NaNO<sub>2</sub> (4x mmol) manteniendo la temperatura inferior a 5 °C. La sal de diazonio se adicionó a una disolución básica (NaOH) de resorcinareno (**1A**, **1B** o **1C**) (x mmol), manteniendo la temperatura entre 0-5 °C y se dejó agitando durante 4 h a 0 °C, el sólido resultante se solubilizó adicionando NaHCO<sub>3</sub> y se reprecipitó con HCl 37%, se filtró al vacío, se lavó con H<sub>2</sub>O y se maceró con acetona.

**Metodología 2:** se adicionó gota a gota una disolución de NaNO<sub>2</sub> (x mmol) a una disolución de ácido *p*-aminobenzoico (x mmol, HCl 37% y H<sub>2</sub>O) a 0°C, con agitación constante para la formación de sal de diazonio. Esta sal fue adicionada gota a gota a una disolución de resorcinareno (**1A**, **1B** o **1C**) (x mmol/mezcla de piridina:THF (5:2)), manteniendo la temperatura a 0°C y con agitación constante. Después de agitar 15 min en un baño de hielo, se dejó reaccionando a temperatura ambiente durante 24 h. El producto obtenido se filtró, se lavó con H<sub>2</sub>O y se maceró con acetona.

**4,6,10,12,16,18,22,24-octahidroxi-5,11,17,23-tetrakis[*p*-(4-carboxifenilazo)]-2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19 (26),21, 23-dodecaeno (3A):** Se obtuvo un sólido rojo. Rendimiento de 97%. Punto de fusión (descomp.) >250 °C. Espectro IR (KBr) vmáx. (cm<sup>-1</sup>): 3.427 (OH), 2.927 (ArCH), 2.870 (C-H alifático), 1.691-1.605 (C=O), 1.504 (N=N). UV-vis (máx. nm): 406. Análisis elemental calculado para C<sub>68</sub>H<sub>64</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub>: C, 65,38; H, 5,16; N, 8,97; O, 20,49. Experimental: C, 65,66; H, 5,47; N, 8,08. RMN-<sup>1</sup>H (δ, ppm (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): 0,91 (t,12H, CH<sub>3</sub>), 1,28 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 1,83 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 4,37 (t, 4H, CH), 6,34 (s, 2H, H *meta* a OH), 7,14 (s, 2H, H *meta* a OH), 7,36-8,03 (dd, H ar.) 8,57 (OH), 14,77 (s. ancho, 4COOH). RMN-<sup>13</sup>C (δ, ppm (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): 14,0, 20,8, 26,0, 35,1, 115,3, 117,3, 123,9, 130,9, 131,0, 136,1, 145,2, 149,6, 166,6. (Anexo 7)

**4,6,10,12,16,18,22,24-octahidroxi-5,11,17,23-tetrakis[*p*-(4-carboxifenilazo)]-2,8,14,20-tetrapentilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacos-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno (3B):** Se obtuvo un sólido rojo. Rendimiento de 92%. Punto de fusión: descomp. >250 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{máx.}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3.419 (OH), 2.928 (ArCH), 2.857 (C-H alifático), 1.694-1.605 (C=O), 1.502 (N=N). UV-vis ( $\lambda_{\text{máx.}}$  nm): 412. Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{76}\text{H}_{80}\text{N}_8\text{O}_{16}$ : C, 67,05; H, 5,92; N, 8,23; O, 18,80. Experimental: C, 66,30; H, 5,78; N, 8,28. RMN- $^1\text{H}$  ( $\delta$ , ppm  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ): 0,84 (m,  $\text{CH}_3$ ), 1,27 (m,  $\text{CH}_2$ ), 1,83 (m,  $\text{CH}_2$ ), 4,35 (t, 4H, CH), 6,34 (s, 2H, H *meta* a OH), 7,14 (s, 2H, H *meta* a OH), 7,36-8,57 (dd, H ar.) 8,57 (OH), 14,79 (s. ancho, 4COOH). RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ , ppm  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ): 13,9, 22,0, 27,3, 28,7, 31,5, 32,6, 115,3, 117,4, 123,9, 128,5, 131,0, 136,1, 144,9, 149,6, 166,6. (Anexo 8)

**4,6,10,12,16,18,22,24-octahidroxi-5,11,17,23-tetrakis[*p*-(4-carboxifenilazo)]-2,8,14,20-tetranonilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacos-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno (3C):** Se obtuvo un sólido rojo. Rendimiento de 83%. Punto de fusión: descomp. >250 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{máx.}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3.411 (OH), 2.922 (ArCH), 2.852 (C-H alifático), 1.688-1.603 (C=O), 1.500 (N=N). UV-vis ( $\lambda_{\text{máx.}}$  nm): 420. Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{92}\text{H}_{112}\text{N}_8\text{O}_{16}$ : C, 69,67; H, 7,12; N, 7,07; O, 16,14. Experimental: C, 69,34; H, 7,14; N, 7,13. RMN- $^1\text{H}$  ( $\delta$ , ppm  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ): 0,81 (s. ancho,  $\text{CH}_3$ ), 1,20 (s. ancho,  $\text{CH}_2$ ), 1,96 (m,  $\text{CH}_2$ ), 4,36 (t, 4H, CH), 6,14 (s, 2H, H *meta* a OH), 7,10 (s, 2H, H *meta* a OH), 7,36-8,03 (dd, H ar.) 8,31 (OH), 14,77 (s. ancho, 4COOH). RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ , ppm  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ): 14,4, 22,6, 29,1, 29,2, 29,4, 29,6, 31,7, 31,8, 31,8, 33,4, 115,8, 117,8, 123,5, 124,4, 131,5, 136,6, 150,1, 152,1, 167,1. (Anexo 9)

### 3.2.4 Formación de benzoxazinas a partir de los macrociclos 1A, 1B y 1C

La reacción de formación de benzoxazinas a partir de los resorcinarenos (1A, 1B y 1C), formaldehído y  $\beta$ -alanina se realizó empleando la siguiente metodología.

A una disolución de resorcinareno (1A, 1B o 1C) (x mmol) en 44 mL de una mezcla  $\text{C}_6\text{H}_6$ :EtOH (1:1) se adicionó una disolución de 4x mmol de  $\beta$ -alanina y 10x mmol HCHO, se dejó reaccionar a reflujo con agitación constante hasta consumo total del resorcinareno, el seguimiento se realizó por CCD, el producto se filtró, se lavó con EtOH y se secó en pistola de vacío.

**2,12,22,32-tetrapropil-4,14,24,34-tetrahidroxi-7,17,27,37-tetra-(2-carboxietil)-7,17,27,37-tetra-azanonaciclo[31.3(7).1.1<sup>3,11</sup>.1<sup>13,21</sup>.1<sup>23,31</sup>1(41).3.5(10)-11(44).13.1<sup>23,31</sup>.0<sup>5,10</sup>.0<sup>15,20</sup>.0<sup>25,30</sup>.0<sup>35,40</sup>]tetraconta[15(20),21(43),23,25(30),31(42),33,35(41)]dodecaeno (4A):** Se obtuvo un sólido rosado. Rendimiento de 88%. Punto de fusión: descomp. >250 °C. IR (KBr) vmáx. (cm<sup>-1</sup>): 3.374 (OH y COOH), 2.955 (ArCH), 2.869 (C-H alifático), 1.714-1603 (C=O), 1.214 (C-N), 1.115 (C-O). UV-vis (máx. nm): 293. Análisis elemental calculado para C<sub>60</sub>H<sub>76</sub>N<sub>4</sub>O<sub>16</sub>: C, 64,97; H, 6,91; N, 5,05; O, 23,08. Experimental: C, 60,90; H, 6,90; N, 4,41. RMN-<sup>1</sup>H (δ, ppm (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): 0,93 (s. ancho, 12H, CH<sub>3</sub>), 1,25 (s. ancho, 8H, CH<sub>2</sub>), 2,20 (s. ancho, 8H, CH<sub>2</sub>), 2,43 (s. ancho, 8H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 2,90 (s. ancho, 8H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 3,97 (s. ancho, 8H, C-CH<sub>2</sub>-N), 4,27 (s. ancho, 4H, CH), 6,20 (s. ancho, 12H, N-CH<sub>2</sub>-O y OH), 7,26 (s. ancho, 4H, H *meta* a OH). RMN-<sup>13</sup>C (δ, ppm (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): 13,9, 20,8, 31,7, 33,6, 35,4, 42,9, 56,0, 85,0, 107,6, 123,6, 124,5, 152,5, 152,6, 172,9, 174,1. (Anexo 10)

**2,12,22,32-tetrapentil-4,14,24,34-tetrahidroxi-7,17,27,37-tetra-(2-carboxietil)-7,17,27,37-tetra-azanonaciclo[31.3(7).1.1<sup>3,11</sup>.1<sup>13,21</sup>.1<sup>23,31</sup>1(41).3.5(10)-11(44).13.1<sup>23,31</sup>.0<sup>5,10</sup>.0<sup>15,20</sup>.0<sup>25,30</sup>.0<sup>35,40</sup>]tetraconta[15(20),21(43),23,25(30),31(42),33,35(41)]dodecaeno (4B):** Se obtuvo un sólido naranja-rosa. Rendimiento de 89%. Punto de fusión: descomp. >250 °C. IR (KBr) vmáx. (cm<sup>-1</sup>): 3.411 (OH y COOH), 2.926 (ArCH), 2.855 (C-H alifático), 1.722-1607 (C=O), 1.211 (C-N), 1.109 (C-O). UV-vis (máx. nm): 293. Análisis elemental calculado para C<sub>68</sub>H<sub>92</sub>N<sub>4</sub>O<sub>16</sub>: C, 66,86; H, 7,59; N, 4,59; O, 20,96. Experimental: C, 63,35; H, 7,51; N, 4,05. RMN-<sup>1</sup>H (δ, ppm (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): 0,85 (s. ancho, 12H, CH<sub>3</sub>), 1,27 (s. ancho, 16H, CH<sub>2</sub>), 2,18 (s. ancho, 8H, CH<sub>2</sub>), 2,40 (s. ancho, 8H, CH<sub>2</sub>), 2,86(s. ancho, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 2,94 (s. ancho, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 3,94 (s. ancho, 8H, C-CH<sub>2</sub>-N), 4,19 (s. ancho, 4H, CH), 4,67 (s. ancho, N-CH<sub>2</sub>-O), 4,85 (s. ancho, OH), 7,20 (s. ancho, 4H, H *meta* a OH). (Anexo 11)

**2,12,22,32-tetranonil-4,14,24,34-tetrahidroxi-7,17,27,37-tetra-(2-carboxietil)-7,17,27,37-tetra-azanonaciclo[31.3(7).1.1<sup>3,11</sup>.1<sup>13,21</sup>.1<sup>23,31</sup>1(41).3.5(10)-11(44).13.1<sup>23,31</sup>.0<sup>5,10</sup>.0<sup>15,20</sup>.0<sup>25,30</sup>.0<sup>35,40</sup>]tetraconta[15(20),-21(43),23,25(30),31(42),33,35(41)]dodecaeno (4C):** Se obtuvo un sólido rosa. Rendimiento de 77%. Punto de fusión: descomp. >250 °C. IR (KBr) vmáx. (cm<sup>-1</sup>): 3.279 (OH y COOH), 2.922 (ArCH), 2.889 (C-H alifático), 1.714-1620 (C=O), 1.212 (C-N), 1.103 (C-O). UV-vis (máx. nm) = 297. Análisis elemental calculado para C<sub>84</sub>H<sub>124</sub>N<sub>4</sub>O<sub>16</sub>: C, 69,78; H, 8,64; N, 3,87; O, 17,70. Experimental: C, 68,17; H, 8,80; N, 4,05. RMN-<sup>1</sup>H (δ, ppm (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): 0,86 (s. ancho, 12H, CH<sub>3</sub>), 1,24 (s. ancho, 64H, CH<sub>2</sub>),

2,18 (s. ancho, 8H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 2,33 (s. ancho, 8H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 2,84 (s. ancho, C-CH<sub>2</sub>-N), 3,87 (s. ancho, CH), 4,04 (s. ancho, OH), 4,16 (s. ancho, N-CH<sub>2</sub>-O), 7,05 (s. ancho, 2H, H *meta* a OH), 7,13 (s. ancho, 2H, H *meta* a OH). (Anexo 12)

### 3.3 Preparación de copolímeros

Los copolímeros *poli*(MMA-*co*-EDMA-*co*-GMA) y *poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA) fueron preparados mediante la metodología planteada por Štrancar<sup>66</sup> y el copolímero *poli*(GMA-*co*-EDMA) se preparó siguiendo la metodología planteada por Rassi.<sup>98</sup> Antes de realizar las copolimerizaciones se removió el inhibidor de los monómeros (Monometil éter de hidroquinona), empleando sílica gel de columna.

**Preparación del copolímero *poli*(MMA-*co*-EDMA-*co*-GMA) y *poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA):** Se preparó la mezcla de polimerización con GMA (0,45 mL), MMA o BMA (0,15 mL), EDMA (0,40 mL), 1,1-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (11 mg), y ciclohexanol (1,50 mL), se purgó con N<sub>2</sub> y se dejó reaccionar a 57°C por 24 h. El polímero obtenido fue enfriado a temperatura ambiente, el porógeno fue retirado por lavados con etanol y se secó a presión reducida.<sup>66</sup> (Anexo 13 y anexo 15)

**Preparación del copolímero *poli*(GMA-*co*-EDMA):** Se preparó la mezcla de polimerización con GMA (0,345 mL), EDMA (0,229 mL), 1,1-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (6,3 mg), ciclohexanol (1,225 mL) y dodecanol (0,269 mL). Se purgó la mezcla con N<sub>2</sub> durante 5 min, se selló el molde y se dejó reaccionar a 70°C por 24 h en un baño de maría.<sup>98</sup> El polímero obtenido fue enfriado a temperatura ambiente, el porógeno fue retirado por lavados con acetonitrilo y agua y se secó a presión reducida. (Anexo 14)

**Tabla 3-1.** IR-ATR y análisis elemental de copolímeros

Copolímeros	IR-ATR <i>vmáx.</i> (cm <sup>-1</sup> )				Análisis elemental	
	C-H	C=O	C-O	C-O-C	C	H
<i>poli</i> (BMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA)	2.994-2.852	1.724	1.147	906	59,68	7,09
<i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)	2.924-2.853	1.723	1.144	907	62,41	7,86
<i>poli</i> (MMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA)	2.988-2.947	1.723	1.147	907		

### 3.4 Modificación de la superficie de copolímeros con resorcinarenos

Inicialmente se realizó la modificación de la superficie del copolímero *poli*(MMA-co-EDMA-co-GMA) con resorcinarenos **1A** y **1B**, adaptando el proceso propuesto por Dan y colaboradores.<sup>99</sup> Al copolímero *poli*(MMA-co-EDMA-co-GMA) triturado (x mmol) se le adicionó resorcinareno (**1A** o **1B**), (2x mmol) en *N,N*-dimetilformamida (DMF) y NaOH. La mezcla de funcionalización se dejó agitando por 15 h a 57°C. El sólido resultante se enfrió a temperatura ambiente, se lavó con DMF y etanol absoluto y se secó a presión reducida. El producto se caracterizó mediante IR-ATR y Raman, demostrando que no ocurre reacción entre el grupo oxirano y los resorcinarenos **1A** y **1B** y es necesario funcionalizar los resorcinarenos. De los lavados precipitó un sólido que fue caracterizado mediante técnicas espectroscópicas:<sup>12</sup>

**Tetrasodio 2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.13,7.19,13.115,19]octacosa-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno-4,10,16,22-tetraol-6,12,18,24-tetrakis (olato) (5A):** IR (KBr cm<sup>-1</sup>): 3.319 (O-H), 1.210 (C-O), 1.609 (C-H aromático), 2.929 (C-H alifático); RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 0,91 (t, 12H, CH<sub>3</sub>), 1,22 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 2,15 (q, 8H, CH<sub>2</sub>), 4,18 (t, 4H, CH), 6,05 (s, 4H, *orto* a OH), 7,25 (s, 4H, *meta* a OH), 9,56 (s, 4H, OH); RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 13,.9 (CH<sub>3</sub>), 20,8 (CH<sub>2</sub>), 32,6 (CH<sub>2</sub>), 34,9 (CH), 102,8, 124,0, 132,4, 152,3 (C aromáticos).<sup>12</sup>

Para la modificación de la superficie de copolímeros *poli*(GMA-co-EDMA) y *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) con resorcinarenos funcionalizados (resorcinarenos diazotados y benzoxazinas de resorcinarenos) la metodología empleada se adaptó del procedimiento planteado por Zargin y colaboradores.<sup>93</sup> A una disolución de 2x mmol de resorcinarenos funcionalizados (diazotados: **3A**, **3B** y **3C** y benzoxazinas: **4A**, **4B** y **4C**) en DMF, se adicionó gota a gota cloruro de tetrabutilamonio (2x mmol en DMF), a temperatura ambiente con agitación constante. Luego, esta mezcla se adicionó a una suspensión de *poli*(GMA-co-EDMA) o *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) (que contienen x mmol de GMA) en DMF, la adición se realizó gota a gota, durante 1 h, la mezcla de reacción se purgó con N<sub>2</sub> y se selló. La mezcla de reacción se dejó durante 24 h con agitación constante a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de reacción el copolímero se filtró y se lavó

repetidamente con DMF y finalmente con EtOH. El sólido resultante se secó a presión reducida y se caracterizó mediante IR-ATR, Raman y MEB.

Los copolímeros *poli*(GMA-*co*-EDMA) y *poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA) no reaccionaron con los resorcinarenos diazotados, pero sí con las benzoxazinas. Los copolímeros resultantes se caracterizan mediante Raman, MEB, los cuales están anexos en la discusión de resultados y el espectro IR-ATR y análisis elemental que se describen a continuación y también se encuentra en la sección anexos (Anexo 17 a 22).

**Tabla 3-2.** IR-ATR y análisis elemental de copolímeros funcionalizados con **4A**, **4B** y **4C**

Polímeros funcionalizados con benzoxazinas	IR-ATR <i>vm</i> áx. ( <i>cm</i> <sup>-1</sup> )							Análisis elemental		
	OH	C-H ar.	C-H alif.	C=O	C-H ar.	C-N	C-O	C	H	N
4A- <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)	3.259	2.954	2.907	1.723	1.600	1.255	1.147	58,96	6,88	0,62
4B- <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)	3.432	2.998	2.854	1.723	1.607	1.255	1.146	60,28	7,06	0,84
4C- <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)	3.220	2.923	2.853	1.723	1.603	1.255	1.147	61,78	7,62	1,33
4A- <i>poli</i> (BMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA)	3.260	2.953	2.890	1.723	1.601	1.255	1.168	54,49	6,42	1,79
4B- <i>poli</i> (BMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA)	3.280	2.928	2.854	1.723	1.559	1.255	1.170	59,82	6,94	2,21
4C- <i>poli</i> (BMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA)	3.270	2.923	2.869	1.723	1.602	1.255	1.149	63,41	7,90	2,37

### 3.5 Síntesis de péptidos

Los péptidos modelos se sintetizaron vía SPPS-Fmoc/tBu, usando 4-metilpiperidina (20% v/v en DMF) como el reactivo de eliminación del grupo Fmoc. El procedimiento descrito es el empleado por Vergel y col.,<sup>100</sup> El procedimiento seguido es el desarrollado en el grupo de investigación Síntesis y Aplicaciones de Moléculas Peptídicas (SAMP).

Se usó la resina Rink amida (100mg, 0,46 meq/g) como soporte sólido. Se trató la resina con el reactivo de eliminación del grupo Fmoc (4-metilpiperidina al 25% v/v que contiene tritón al 0,1% v/v), esta reacción fue asistida por microondas y después se lavó con DMF (x5), Isopropanol (x3) y DCM (x3) y se realizó la prueba de Kaiser. Posteriormente para la reacción de acoplamiento, se pre-activaron 0,23 mmol de aminoácido Fmoc con



DCC/HOBt (0,23/0,23 mmol), 5 excesos respecto a los mEq de resina en DMF. La mezcla de pre-activación se dejó agitando a temperatura ambiente por 15 min. Luego, el Fmoc-aminoácido activado se adicionó al reactor que contenía la resina. La eliminación del grupo Fmoc y la incorporación de cada aminoácido se confirman mediante la prueba de Ninhidrina.

La separación del péptido del soporte se lleva a cabo mediante un cóctel de “escisión” que contiene TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS/EDT (92,5/2,5/2,5/2,5 % v/v), la reacción se agitó por 2 h a temperatura ambiente, se filtró la mezcla y el péptido crudo se precipitó mediante tratamiento de la disolución filtrada con éter etílico (-20°C), se centrifugó y finalmente se realizaron cinco lavados al sólido con éter frío. El crudo obtenido se purificó mediante columnas de RP-SPE de 5 g (40-60 µm). El crudo se disolvió en el 0,05% TFA en H<sub>2</sub>O (Solvente A) y se sembró en la columna, posteriormente se eluyó empleando diferentes porcentajes de 0,05% TFA en ACN (Solvente B). Finalmente, se liofilizaron las fracciones que contenían el péptido puro y se almacenaron a -4°C. Los péptidos se caracterizaron mediante Cromatografía líquida RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF.

**Péptido KAEAEAKA y AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>:** Las condiciones para RP-HPLC fueron: Fase estacionaria: Columna Chromolith® C-18 (50x4,6 mm); Fase móvil: Solvente A: H<sub>2</sub>O con 0,05% TFA y Solvente B: ACN con 0,05% TFA; método por gradiente: 5-50% Solvente B; Flujo: 2 mL/min; volumen de inyección: 10 µL; Longitud de onda: 210 nm; disolución del péptido: 1 mg/mL. (Anexo 23 y anexo 24)

**RYRRKKK:** Las condiciones para RP-HPLC fueron: Fase estacionaria: Columna Kromasil® C-18 (100x4,6 mm); método isocrático: 5% Solvente B; Flujo: 0,8 mL/min; volumen de inyección: 10 µL; Longitud de onda: 210 nm; disolución del péptido: 1 mg/mL. (Anexo 25)

**Tabla 3-3.** Caracterización de péptidos

SECUENCIA	t <sub>R</sub> (min)
AcEYSFEFSYNH <sub>2</sub>	5,56
KAEAEAKA	5,73
RYRRKKK	2,59

### **3.6 Interacción de péptidos con material monolítico *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA)**

Para determinar si se presenta interacción entre el monolito *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) y los péptidos sintetizados en el numeral anterior. Inicialmente se realizaron las curvas de calibración de los péptidos AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>, KAEAEAKA y RYRRKKK.

Para la interacción, se empleó el copolímero *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) sin modificar y el copolímero *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) modificado con las benzoxazinas de resorcinarenos (**4A**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA), **4B**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) y **4C**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA), se emplearon los 3 péptidos sintetizados y se planteó realizar los ensayos en medio ácido, básico y neutro. El procedimiento que se siguió fue pesar 1 mg de cada copolímero y preparar una disolución de cada péptido (1 mg/mL), a cada mg de copolímero se le adicionó 500 µL de péptido y se dejaron agitando durante 24h, se realizó seguimiento del péptido mediante RP-HPLC. El seguimiento se realiza, centrifugando la muestra, y tomando una alícuota del sobrenadante que se analiza por HPLC.

Para el seguimiento por RP-HPLC de los péptidos AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>, KAEAEAKA se emplea una columna Chromolith® C-18 (4,6x50mm); y para el péptido RYRRKKK se emplea una columna Kromasil Eternity 2.5-C18 (4,6x100 mm).

### **3.7 Evaluación de la reacción de polimerización en los moldes de acero, PEEK y vidrio**

#### **3.7.1 Tratamiento de las paredes internas de la columna PEEK**

Se llenó el tubo PEEK con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% y se dejó actuar durante 6 h, se lavó con agua Milli-Q, se llenó con disolución 1M de GMA en diclorometano y se dejó reaccionar por 4 h, se enjuagó con acetona y se secó con N<sub>2</sub>.<sup>101</sup>

### **3.7.2 Tratamiento de paredes internas de capilar de vidrio**

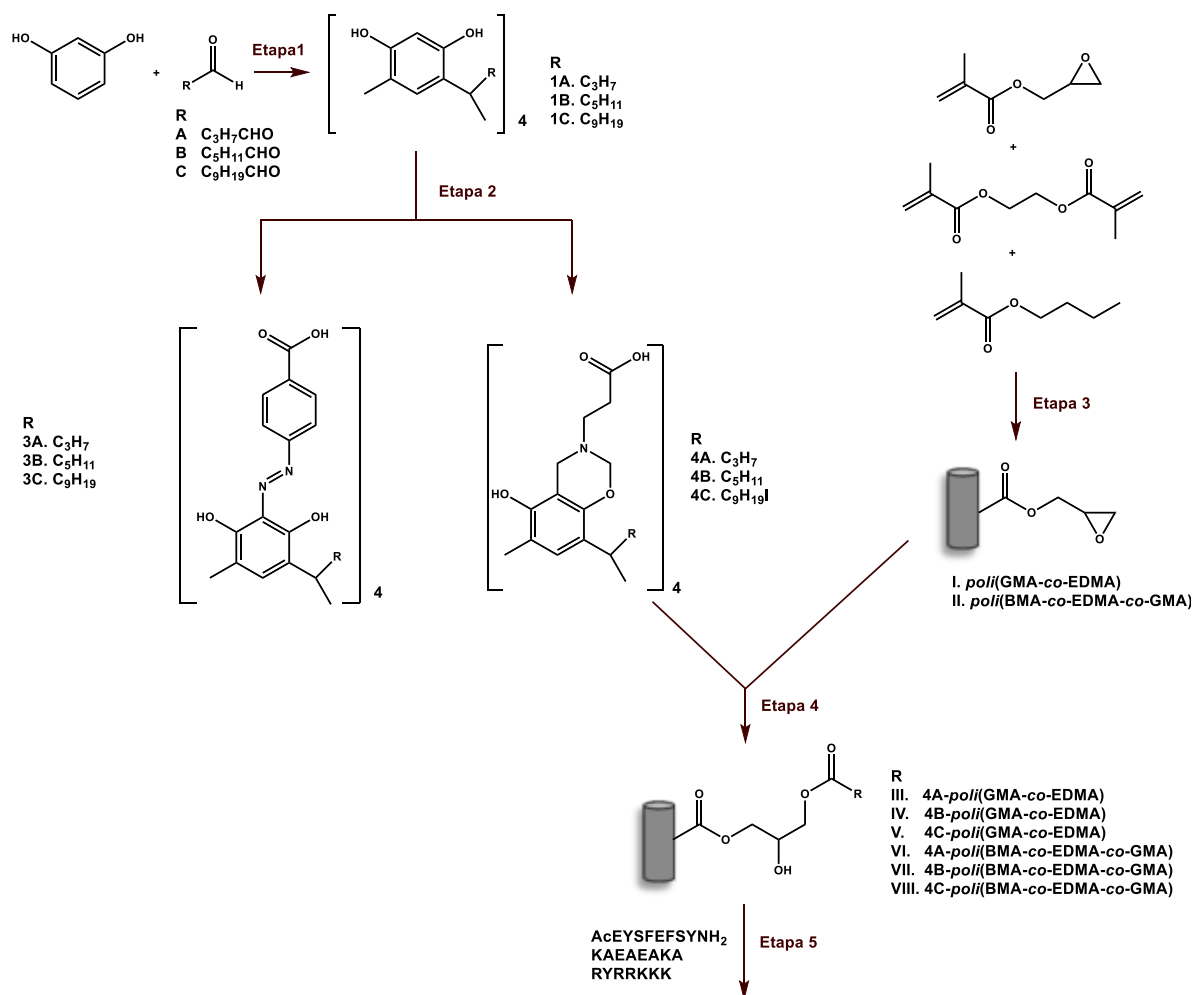
Las paredes internas del capilar de vidrio se enjuagaron con NaOH 1M durante 5 min, se llenó con la misma disolución y se dejó actuar por 10 min. Se enjuagó con agua y se secó con aire, dos veces, posteriormente se lavó HCl por 2 min y se secó con aire por 5 min. Seguido se lavó con tolueno durante 10 min y se enjuagó con metacrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo (TMSM) en tolueno durante 10 min, luego se llenó con metacrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo (TMSM) en tolueno durante 2 h, finalmente se enjuagó con tolueno y se secó.<sup>102</sup>



## 4. Discusión de Resultados

Esta investigación se dividió en etapas, como se ilustra en el esquema 4-1.

**Esquema 4-1.** Esquema general para la modificación de la superficie de copolímeros derivados de GMA con resorcinarenos y evaluación de su interacción con péptidos.

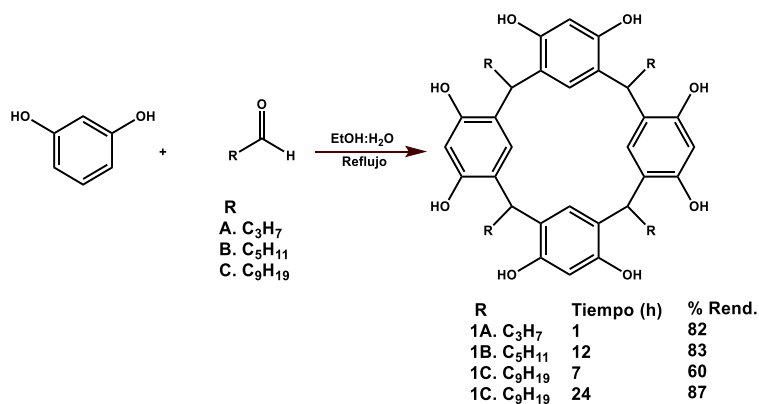


Etapa 1, obtención de calix[4]resorcinarenos: **1A**, **1B** y **1C**; Etapa 2, funcionalización de los calix[4]resorcinarenos con cloruro de 4-carboxibencenodiazonio y  $\beta$ -alanina. Etapa 3, evaluación las mejores condiciones de polimerización para obtener materiales monolíticos derivados de glicidilmetacrilato. Etapa 4, modificación la superficie de copolímeros con resorcinarenos empleando la metodología “*grafting*”-método epoxi; destacando en este punto la funcionalización, por primera vez, de materiales monolíticos derivados de glicidilmetacrilato con macrociclos tipo calix[4]resorcinareno. Etapa 5, Evaluación de la interacción de péptidos sintéticos con el material monolítico funcionalizado, para esto se seleccionaron secuencias de carácter ácido, básico y neutro. Finalmente se evaluó la reacción de copolimerización en moldes tales como acero inoxidable, PEEK y vidrio. A continuación, se discutirán los resultados generados en cada una de las etapas de la investigación.

## 4.1 Síntesis y caracterización de resorcinarenos (etapa 1)

Los resultados preliminares de la síntesis de resorcinarenos **1A**, **1B** y **1C** de acuerdo con la metodología desarrollada dentro del grupo de investigación,<sup>9,10</sup> se muestran en el esquema 4-2.

**Esquema 4-2.** Síntesis de calix[4]resorcinarenos



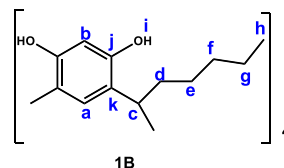
Los productos **1A**, **1B** y **1C** fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas, como IR, RMN y análisis elemental. A manera de ejemplo se describe la caracterización realizada al compuesto **1A**. En el espectro IR del compuesto **1A** se observa la señal correspondiente al estiramiento O-H ( $3.318\text{ cm}^{-1}$ ), las señales entre  $2.954\text{-}2.869\text{ cm}^{-1}$

correspondiente al estiramiento C-H aromático y C-H alifático, respectivamente, y en  $1.202\text{ cm}^{-1}$  la señal correspondiente al estiramiento de C-O (Anexo 1A). Para el análisis elemental de  $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{O}_8$  se calculó: C, 67,58; H, 7,66; O, 24,76 y se encontró: C, 67,94; H, 6,93 (Anexo 1B). En los espectros de RMN- $^1\text{H}$  para **1A**, se observa a campo alto un triplete para 12 protones correspondiente a los metilos de la cadena alifática (0,90 ppm), con señales más desplazadas un multiplete y un cuartete para los metilenos de la cadena alifática, cada uno integrando para 8H (1,20 y 2,08 ppm, respectivamente). En 4,23 ppm, la señal para los protones del puente, con integral para 4H. En la zona aromática con desplazamiento de 6,15 ppm se encuentra un singlete para los protones del sistema aromático ubicados en la posición *orto* al hidroxilo, integrando para 4H y en 7,24 ppm la señal correspondiente a los protones aromáticos ubicados en posición *meta* a los hidroxilos, también integrando para 4H. Finalmente un singlete para los 8 protones de los grupos hidroxilo del macrociclo (8,93 ppm). En la zona aromática para **1A** se resuelven dos singletes, estas dos señales nos indican que, en disolución, se obtienen estos macrociclos en conformación cono (Anexo 1C). Para la caracterización de **1A** mediante RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ , ppm) se encuentran las señales de 16,1 ( $\text{CH}_3$ ), 25,3( $\text{CH}_2$ ), 32,7( $\text{CH}_2$ ), 49,2( $\text{CH}$ ), 112,1 (C ar.-H), 127,2 (C ar.-H), 129,0 (C ar.), 151,1 (C ar -OH)<sup>103</sup>.

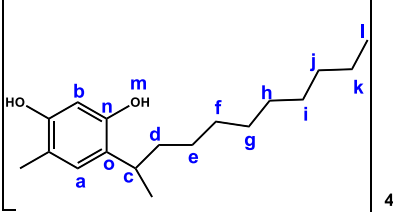
De la misma manera los resorcinarenos **1B** y **1C** (Tabla 4-1) se caracterizaron, los datos asociados se presentan a continuación y en los anexos 2 y 3.

**Tabla 4-1.** Caracterización de **1B** y **1C**

Caracterización de <b>1B</b>		
IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	OH	3.416
	CH ar.	2.950
	CH alif.	2.928-2.858
	C=C Ar,	1.620
	C-O	1.292
Análisis elemental	Calculado	C, 74,97; H, 8,39; O, 16,64
	Encontrado	C, 70,22; H, 8,14
Entrada	RMN- $^1\text{H}$ ( $\delta$ , ppm)	RMN- $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , ppm)
a	7,16 (s, 4H)	123,2
b	6,17 (s, 4H)	102,5
c	4,24 (t, 4H)	34,1
d	2,03 (m, 8H)	33,1
e		31,6
f	1,28 (m, 16H)	27,6
g		22,4
h	0,85 (t, 12H)	14,1
i	8,90 (s, 8H)	151,8
j		124,9



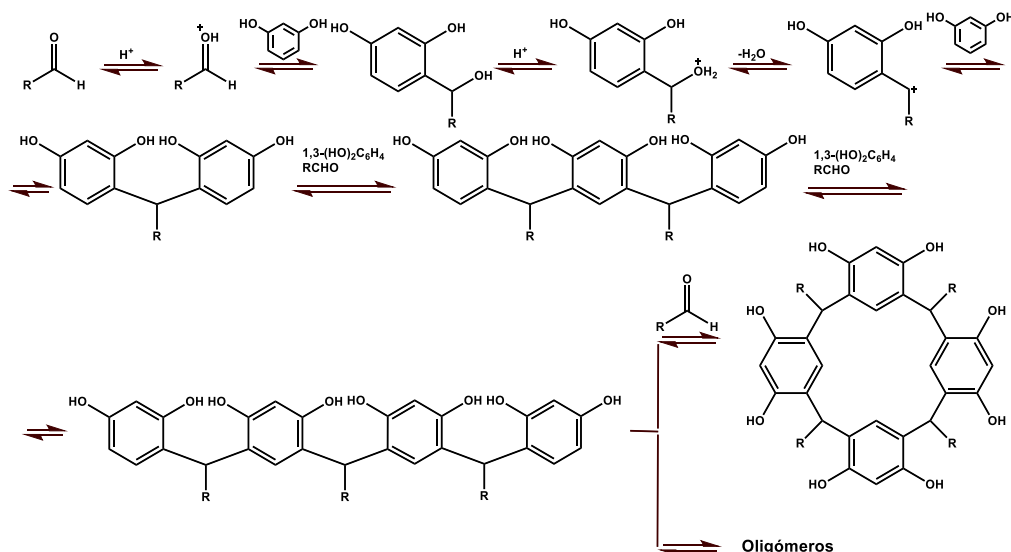
Continuación Tabla 4-1

Caracterización de 1C			
IR (cm <sup>-1</sup> )	OH	3.258	
	CH ar.	2.925	
	CH alif.	2.853	
	C=C Ar.	1.620	
	C-O	1.294	
Análisis elemental	Calculado	C, 77,38; H, 9,74; O, 12,88	
	Encontrado	C, 76,13; H, 9,91	
Entrada	RMN- <sup>1</sup> H (δ, ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (δ, ppm)	
a	7,07 (s, 4H)	123,0	
b	6,15 (s, 4H)	102,4	
c	4,21 (t, 4H)	34,2	
d	1,96 (s. ancho, 8H)	31,4	
e		29,3	
f		29,2	
g		29,2	
h	1,20 (s. ancho, 56H)	28,9	
i		28,8	
j		27,8	
k		22,1	
l	0,83 (t, 12H)	13,8	
m	8,88(s, 8H)		
n		151,7	
o		124,3	

En cuanto al mecanismo de reacción, Jain y colaboradores proponen que la formación del macrociclo inicia con la protonación del aldehído, como se muestra en el esquema 4-3. El aldehído protonado sirve como electrófilo inicial que se adiciona al resorcinol, y el hidroxilo del aducto formado es protonado nuevamente para eliminar una molécula de agua. La pérdida de agua permite la formación de un carbocatión, el cual, bajo una segunda adición electrofílica a otra molécula de resorcinol forma el dímero. Posteriormente, el acoplamiento del dímero con otras unidades de resorcinol produce trímeros, tetrámeros u oligómeros de más de cuatro monómeros. La reacción de condensación es reversible bajo condiciones ácidas, de manera que los oligómeros de más de cuatro unidades son consumidos al final de la reacción, favoreciendo la rápida ciclación de los tetrámeros para generar calix[4]resorcinarenos.<sup>5</sup>



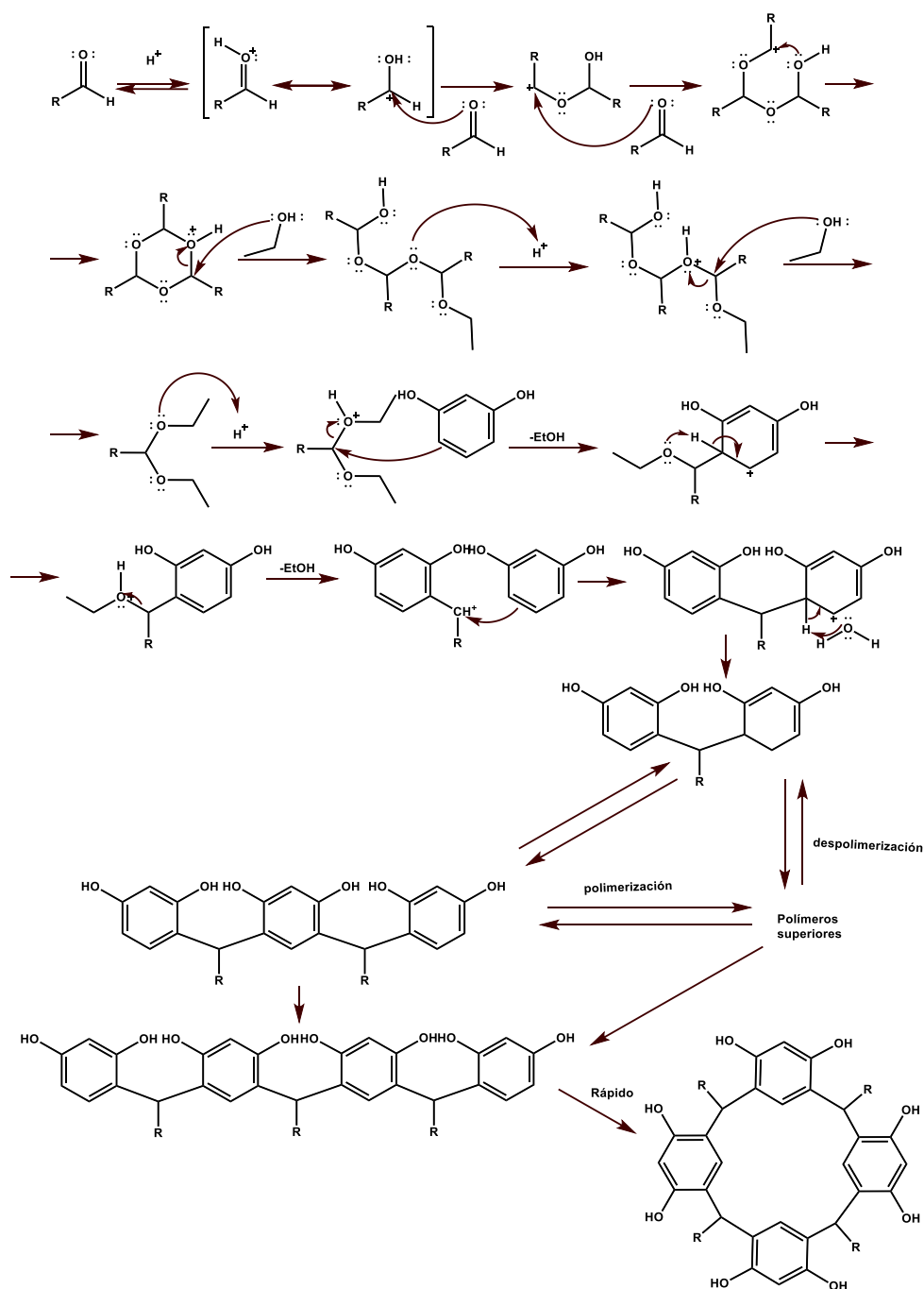
### Esquema 4-3. Mecanismo de reacción obtención de resorcinarenos<sup>5</sup>



Por otro lado, Weinelt y colaboradores, propusieron que la formación de resorcinarenos inicia con la formación de intermediarios tipo trioxano, que generan acetales, los cuales se adicionan a las unidades de resorcinol.<sup>7</sup> Mediante la síntesis del macrociclo **1C**, en mezcla EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1), se pudo comprobar que el mecanismo de reacción propuesto por Weinelt es coherente con nuestros resultados, ya que, bajo estas condiciones, el intermediario 2,4,6-trinonil-1,3,5-trioxano precipitó de la mezcla de reacción, lo cual redujo el porcentaje de rendimiento de **1C** al 60%. La hidrofobicidad del intermediario trioxano influyó directamente en el rendimiento del macrociclo, por ello, el medio de reacción se modificó y únicamente se empleó etanol, lo cual redujo la polaridad del medio y por tanto se obtuvo el compuesto **1C** con un rendimiento de 87%, es decir que la conversión de trioxano a **1C** en medio etanólico es mayor que al emplear una mezcla EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1) (Esquema 4-2). Esto permite confirmar que el trioxano es un intermediario en la reacción de obtención de macrociclos calix[4]resorcinareno. Basado en la evidencia experimental se propone el mecanismo de reacción presentado en el esquema 4-4. Inicialmente el oxígeno del aldehído se protona, propiciando el ataque nucleofílico de una segunda y tercera molécula de aldehído para ciclarse formando trioxano, el cual al reaccionar con etanol en medio ácido genera dietil acetal. La formación de resorcinareno se produce mediante acoplamiento secuencial del acetal con unidades de resorcinol para formar dímeros, trímeros, tetrámeros u oligómeros. Los oligómeros de más de cuatro unidades desaparecen en gran medida hacia el final de la reacción, debido a la acidez del medio y

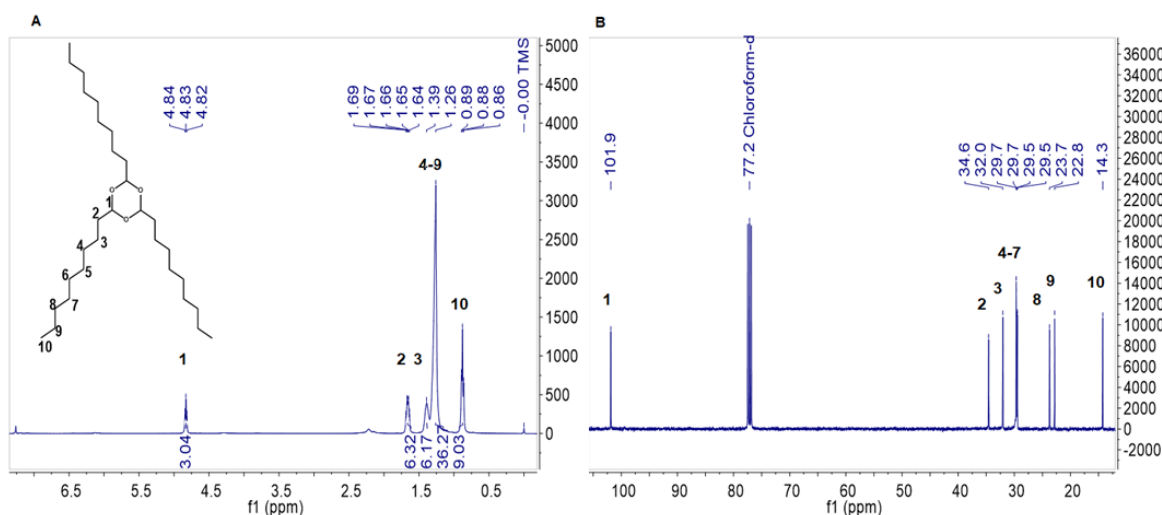
los tetrámeros se ciclan rápidamente. Esta rápida ciclación, para formar el macrociclo es favorecida por las características conformacionales de estos tetrámeros que buscan la menor tensión en el sistema y también como consecuencia de los enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los hidroxilos adyacentes.

#### Esquema 4-4. Mecanismo propuesto para la obtención de resorcinarenos 1A, 1B y 1C



El intermediario aislado 2,4,6-trinonil-1,3,5-trioxano, que permitió comprobar que el mecanismo de reacción de formación de resorcinarenos procede como lo había descrito Weinelt, fue caracterizado mediante RMN-<sup>1</sup>H (Figura 4-1-A). En el espectro no se observan señales aromáticas que tendrían que aparecer en el caso de haber obtenido un macrociclo, sino las señales características de trioxano: Un triplete en 0,88 ppm que integra para 9 protones de los metilos, en 1,26 ppm, 1,39 ppm con multiplicidad singlete ancho para los protones de los metilenos, integrando para 36H y 6H, respectivamente. En 1,66 ppm, un multiplete para 6H y finalmente en 4,83 ppm un triplete para el puente metileno del 2,4,6-trinonil-1,3,5-trioxano. En el espectro RMN-<sup>13</sup>C (Figura 4-1-B) se ven las señales correspondientes a los metilos y los metilenos de la cadena alifática ( $\delta$ , ppm): 14,3, 22,8, 23,7, 29,5, 29,5, 29,7, 29,7, 32,0, 34,6 y desplazado a campo bajo (101,9 ppm) la señal característica del carbono del puente para este tipo de compuestos.

**Figura 4-1.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$ , ppm (CD<sub>3</sub>Cl)) para 2,4,6-trinonil-1,3,5-trioxano.



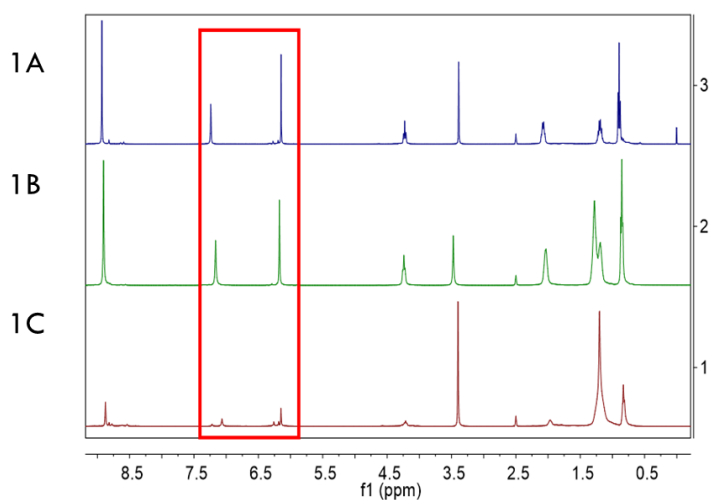
Espectros A. RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$ , ppm (CD<sub>3</sub>Cl)) y B. RMN-<sup>13</sup>C para 2,4,6-trinonil-1,3,5-trioxano

#### 4.1.1 Conformación de resorcinarenos

Los macrociclos tipo calix[4]resorcinareno pueden tener diferentes conformaciones como cono, silla, bote, silla de montar y diamante (Figura 1-2). La diferencia en cada una de estas conformaciones radica en la ubicación de las unidades de resorcinol del borde superior y de los sustituyentes del borde inferior. Así, por ejemplo, en el conformero cono, los sustituyentes presentan configuración rccc, mientras las unidades de resorcinol del

borde superior forman una cavidad similar a un cáliz. Esta distribución espacial de los conformeros les permite ser útiles para diferentes aplicaciones, por ejemplo, el conformero cono puede ser empleado como hospedero en un sistema huésped-hospedero, gracias a la cavidad que permite la interacción con otras moléculas. En este sentido, la caracterización espectroscópica de **1A**, **1B** y **1C** permitió confirmar cual era la conformación en disolución. En la figura 4-2 se observa la simplicidad de los espectros RMN- $^1\text{H}$  de estos resorcinarenos y en la zona aromática dos singletes correspondientes a los protones aromáticos ubicados *orto* y *meta* al -OH (señalados en un cuadro rojo), estas dos señales nos indica que la conformación predilecta es corona.

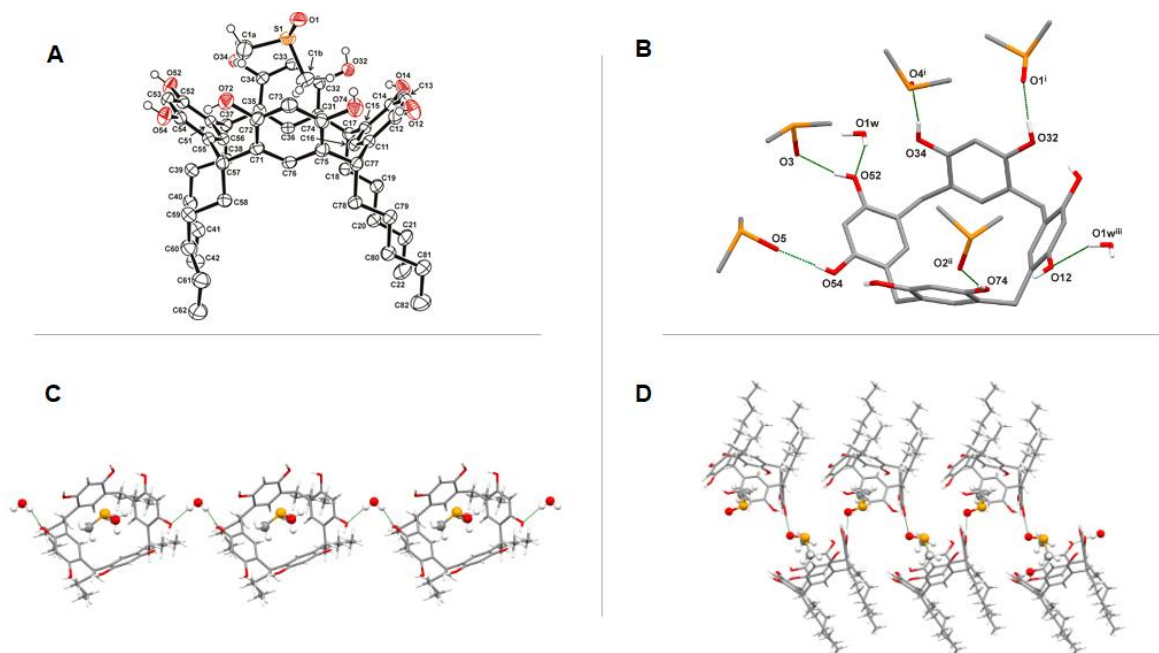
**Figura 4-2.** Comparación espectros RMN- $^1\text{H}$  de **1A**, **1B** y **1C**



Con el fin de comprobar si en estado cristalino la conformación se mantenía, se procedió a cristalizar **1B** y **1C**. Para **1B** se obtuvo una muestra cristalina de una mezcla DMSO:H<sub>2</sub>O (1:1) por evaporación lenta a temperatura ambiente (Figura 4-3). La difracción por rayos X reveló la estructura del complejo de inclusión entre **1B** y DMSO, mediante interacciones CH $\cdots\pi$  (Figura 4-3-A). El macrociclo **1B** cristaliza con cuatro moléculas de DMSO y una molécula de agua, mediante interacciones débiles de enlaces de hidrógeno C-H $\cdots$ O, (Figura 4-3-B). Las distancias C $\cdots$ C para el macrociclo **1B** son C(16) $\cdots$ C(56) 5,264(4) Å, C(13) $\cdots$ C(53) 9,416(5) Å, C(36) $\cdots$ C(76) 5,174(5) Å, y C(33) $\cdots$ C(73) 7,453 Å. Las distancias centroide a centroide son 6,30 y 7,34 Å, respectivamente. Para conocer la conformación del macrociclo se usa el índice de conformación cono-bote (CBCConf index, por sus siglas en inglés, “*cone-boat conformation index*”). Un cono perfecto tiene un índice de 1,00, mientras que un valor cercano a 0,50 indica conformación bote. El valor del índice CBCConf

para la estructura cristalina del complejo **1B**·DMSO es 0,86, es decir, que la geometría puede ser descrita como un intermedio entre cono y bote, aunque esté más cerca de la conformación cono. Esta conformación intermedia es consecuencia de tres enlaces de hidrógeno O-H...O, con distancias O...O de O(12)...O(74) 2,752(4) Å, O(14)...O(32) 2,684(4) Å, y O(72)...O(54) 2,792(4) Å (promedio 2,74 Å). La distancia entre O(34)...O(52) es 3,074(4) e indica ausencia de enlace de hidrógeno. El análisis del empaquetamiento del cristal muestra que el complejo **1B**·DMSO está conectado por las moléculas de agua, construyendo una cadena infinita (Figura 4-3-C). Estas disposiciones producen una matriz en capas, que se sostiene por las interacciones hidrofóbicas entre los grupos pentilo. Las moléculas de cristalización de DMSO contribuyen a la formación del empaquetamiento en capas a través de las interacciones de enlaces de hidrógeno C-H ...O (Figura 4-3-D). Los datos cristalográficos de **1B** se muestran en el anexo 2F.

**Figura 4-3.** Cristalografía de **1B**·DMSO

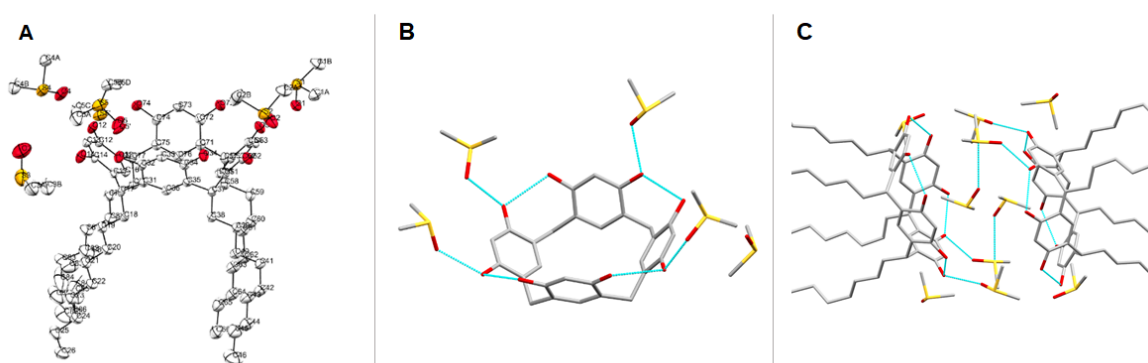


Todos los átomos de hidrógeno vinculados al carbono se omiten para mayor claridad, excepto los de DMSO. A. Diagrama de ORTEP del complejo **1B**·DMSO; B. Interacciones entre resorcinareno **1B**, DMSO y H<sub>2</sub>O; C. Complejo **1B**·DMSO y D. Patrón zig-zag del empaquetamiento del complejo **1B**·DMSO

Para el sistema macrociclo **1C** se obtuvo una muestra cristalina de una mezcla DMSO:H<sub>2</sub>O (1:1) por evaporación lenta a temperatura ambiente. La difracción por rayos X reveló la estructura de **1C** cristalizado con 5 moléculas de DMSO (Figura 4-4-A), mediante

interacciones  $\text{CH}\cdots\pi$  e interacciones débiles por enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los hidroxilos del borde superior. La formación de cuatro enlaces de hidrógeno intramoleculares contribuye a que la estructura adquiera conformación como en estado cristalino (Figura 4-4-B). En el análisis del empaquetamiento del cristal **1C**-5(DMSO) muestra que dos moléculas de **1C** interactúan mediante enlaces de hidrógeno con las moléculas de DMSO (Figura 4-4-C). Los datos cristalográficos se muestran en el anexo 3F.

**Figura 4-4.** Cristalografía de **1C**-5(DMSO)



Todos los átomos de hidrógeno vinculados al carbono se omiten para mayor claridad. Y en la figura B se omiten las cadenas alifáticas. A. Diagrama de ORTEP del complejo **1C**-5(DMSO); B. Interacciones entre **1C**-5(DMSO) y C. Interacción entre dos moléculas de **1C** con DMSO

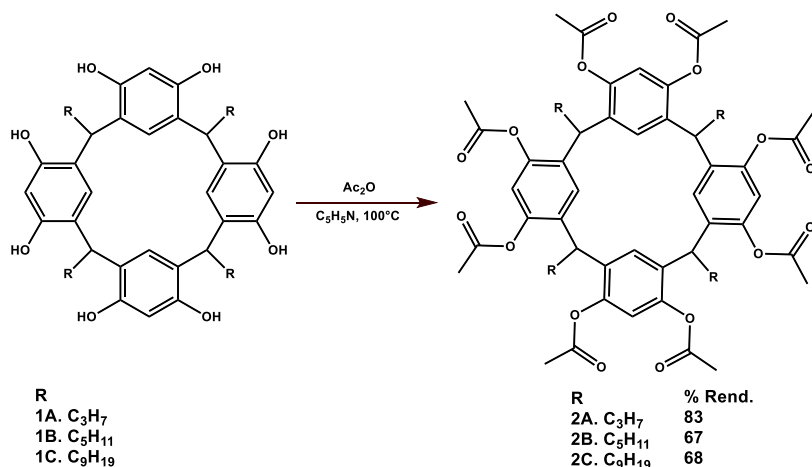
De esta primera parte de la investigación se logró sintetizar tres macrociclos: **1A**, **1B** y **1C**, cada uno caracterizado mediante técnicas espectroscópicas y los dos últimos fueron caracterizados mediante Difracción de Rayos-X. Se logró comprobar que el mecanismo de reacción para la obtención de resorcinarenos procede vía trioxano, equivalente al propuesto por Weinelt y fue posible aislar el intermediario 2,4,6-trinonil-1,3,5-trioxano, caracterizándolo mediante RMN. Adicionalmente, se logró someter un artículo a la revista *Journal of Molecular Liquids* titulado “*Influence of DMSO and alkyl substituent of tetra(alkyl)calix[4]resorcinarenes in complexation of choline: Dynamic NMR studies and X-ray structural characterization of the 1:1 inclusion complex*”

### 4.1.2 Acetilación de 1A, 1B y 1C

Los macrociclos tipo resorcinareno pueden obtenerse con estructura tetramérica, hexamérica, octamérica, etc. Para conocer el tipo de estructura de **1A**, **1B** y **1C**, inequívocamente, se procedió a acetilar en el borde superior, de manera que se pudiera determinar indirectamente el tipo de estructura. Se decidió acetilar, porque la solubilidad de los productos acetilados en cloroformo y metanol es mejor, lo cual posibilitaba conocer la masa molecular mediante masas MALDI-TOF. Adicionalmente, la cristalización de los productos acetilados presentaba un gran reto que permitió estudiar la conformación de los resorcinarenos al ser modificados en el borde superior.

Para la acetilación se hizo reaccionar los resorcinarenos **1A**, **1B** o **1C** con anhídrido acético en un medio básico (Esquema 4-5). El tiempo de reacción fue de 1 hora y se obtuvieron los resorcinarenos acetilados: **2A**, **2B** y **2C** con rendimientos de 83, 67 y 68 %, respectivamente y se lograron cristalizar los tetrámeros **2A** y **2C**.

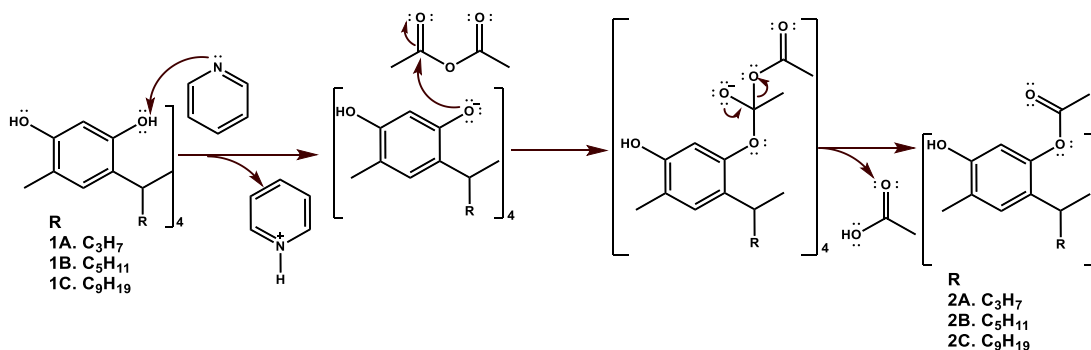
**Esquema 4-5.** Acetilación de **2A**, **2B** y **2C**



La obtención de los compuestos acetilados **2A**, **2B** y **2C** (Esquema 4-6), inicia con la desprotonación de los hidroxilos del borde superior del macrociclo por la piridina, formando el fenolato y el ion piridinio. A continuación, ocurre la adición nucleofílica del ion fenolato al carbono del carbonilo, posteriormente, mediante una deslocalización electrónica se genera el doble enlace C=O permitiendo la eliminación del ion acetato y formando el éster.

Finalmente, el ion piridinio se desprotona por reacción con el ion acetato, produciendo ácido acético.

#### Esquema 4-6. Mecanismo de acetilación



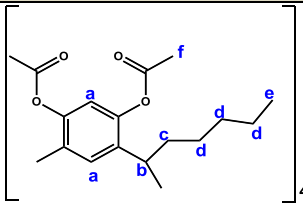
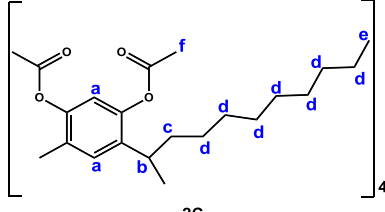
La caracterización de **2A**, **2B** y **2C** se realizó mediante diferentes técnicas espectroscópicas como masas MALDI-TOF, IR, análisis elemental, RMN-<sup>1</sup>H. A modo de ejemplo se describirá la elucidación del compuesto **2A**. La masa molar fue determinada por espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics) usando como matriz 4-nitroanilina para el proceso de desorción/ionización. Se encontró una señal en  $m/z = 1.015$  correspondiente a la especie  $[M + Na]^+$ , La masa monoisotópica calculada para C<sub>56</sub>H<sub>64</sub>O<sub>16</sub> corresponde a: 992,42 uma, confirmando la obtención de una estructura tetramérica coherente con la propuesta (Anexo 4F). En el espectro IR de **2A** la señal característica de los hidroxilos desaparece, lo que indica que los 8 grupos -OH del borde superior fueron acetilados y adicionalmente aparece la señal característica del grupo carbonilo (1.761 cm<sup>-1</sup>), también aparecen las bandas de estiramiento C-H aromáticos y alifáticos (2.961 y 2.936-2.873 cm<sup>-1</sup>, respectivamente) (ver anexo 4A). En cuanto al análisis elemental para **2A** se calculó para C<sub>56</sub>H<sub>64</sub>O<sub>16</sub>: C, 67,73; H, 6,50; O, 25,78 y se obtuvo C, 69,13; H, 6,60, lo cual confirma la acetilación (ver anexos 4B). En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **2A**, a campo alto (0,92 ppm) se encuentran un triplete correspondiente al metilo, un multiplete (1,34 ppm) y un singlete ancho (1,85 ppm) para los metilenos, un singlete ancho (2,17 ppm) correspondiente a los metilos del acetil, en 4,18 ppm el triplete del puente y a campo bajo se observa un singlete ancho (6,90 ppm) para los protones aromáticos del macrociclo (anexo 4C). No se resuelven las señales en la zona aromática, lo cual no permite determinar la conformación que adoptó el macrociclo al ser acetilado en el borde superior. En cuanto al espectro RMN-<sup>13</sup>C de **2A** (Anexo 4D), se observan las señales características



de los carbonos alifáticos (14,0, 20,8, 36,4 ppm) y de los metilos del acetyl (20,9 ppm), así como del puente metileno (36,5 ppm), a campo bajo se puede observar las señales correspondientes a los carbonos aromáticos (116,6, 126,2, 146,7 ppm) y la señal correspondiente al carbonilo del éster (168,5 ppm), sin embargo en la zona aromática no alcanzan a diferenciarse las señales de los 4 carbonos, esto es una muestra del dinamismo del resorcinareno acetilado en disolución.

De la misma manera los resorcinarenos **2B** y **2C** se caracterizaron, los datos asociados se presentan en la tabla 4-2 y en los anexos 5 y 6.

**Tabla 4-2.** Caracterización de **2B** y **2C**

Caracterización de <b>2B</b>			
IR (cm <sup>-1</sup> )	CH ar.	2.930	
	CH alif.	2.859	
	C=O éster	1.760	
	C-O	1.116	
Análisis elemental	Calculado	C, 69,55; H, 7,30; O, 23,16	<p style="text-align: center;"><b>2B</b></p>
	Encontrado	C, 70,07; H, 7,28	
Entrada	RMN- <sup>1</sup> H (δ, ppm)	MALDI-TOF-MS	
a	6,32-6,98	Calculado	
b	4,15 (t, 4H)	C <sub>64</sub> H <sub>80</sub> O <sub>16</sub> : m/z= 1.104,54 [M] <sup>+</sup>	
c	1,65 (s ancho, 8H)	Encontrado	
d	1,28 (s. ancho, 24H)	m/z = 1.125 [M + Na] <sup>+</sup>	
e	0,86 (s. ancho, 12H)		
f	1,97-2,36 (24H)		
Caracterización de <b>2C</b>			
IR (cm <sup>-1</sup> )	CH ar.	2.923	
	CH alif.	2.853	
	C=O éster	1.758	
	C-O	1.189	
Análisis elemental	Calculado	C, 72,26; H, 8,49; O, 19,25	<p style="text-align: center;"><b>2C</b></p>
	Encontrado	C, 74,81; H, 8,66	
Entrada	RMN- <sup>1</sup> H (δ, ppm)	MALDI-TOF-MS	
a	6,91	Calculado	
b	4,14 (t, 4H)	C <sub>80</sub> H <sub>112</sub> O <sub>16</sub> : m/z= 1.328,80 [M] <sup>+</sup>	
c	1,85 (s ancho, 8H)	Encontrado	
d	1,23-1,28 (s. ancho, 56H)	m/z = 1.330 [M + 1] <sup>+</sup>	
e	0,87 (t, 12H)		
f	2,17 (24H)		

De acuerdo con los resultados de caracterización de **2A**, **2B** y **2C** (Tabla 4-2), se logró confirmar la obtención de sistemas tetaméricos para todos los calix[4]resorcinarenos

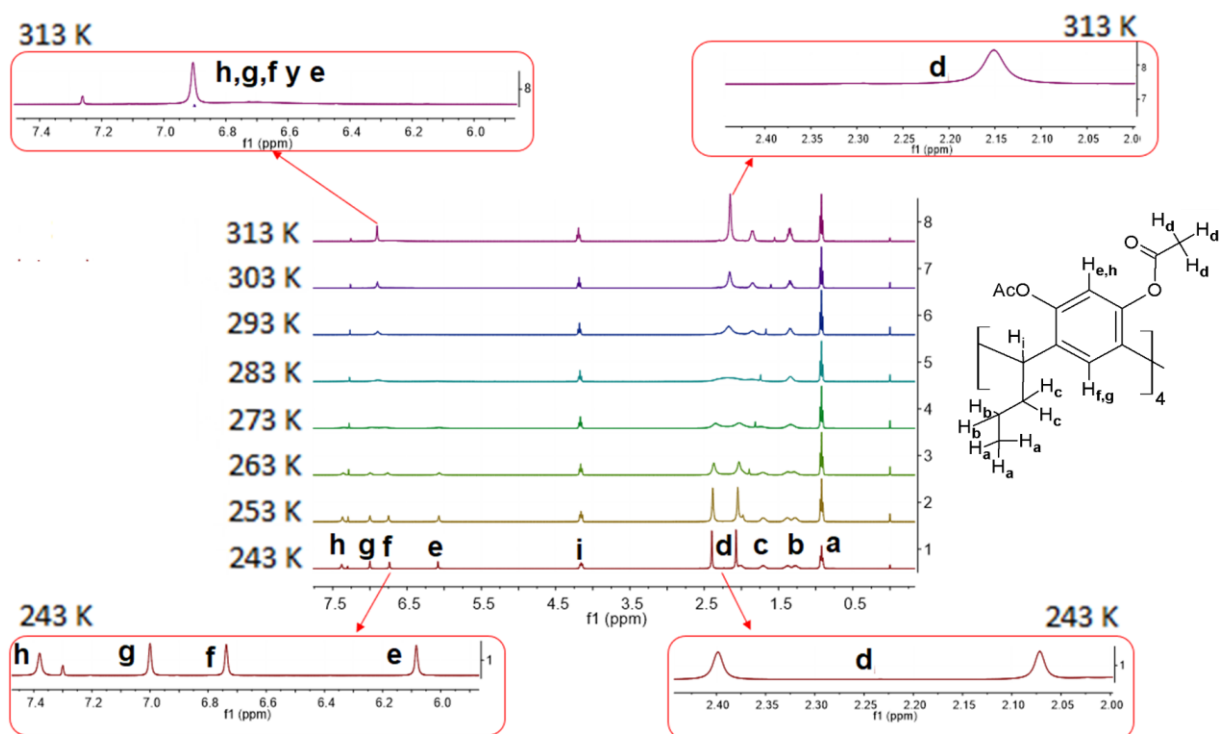
mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis elemental, logrando el objetivo primordial de las acetilaciones. Adicionalmente, se encuentra en los espectros IR para los tres compuestos acetilados, la desaparición de la banda característica de O-H y la aparición de la banda correspondiente a C=O, confirmando una vez más la acetilación de los grupos hidroxilo del borde superior. En cuanto a las señales en RMN-<sup>1</sup>H a temperatura ambiente, se distingue el triplete característico de macrociclos tipo resorcinareno entre 4-5 ppm para los tres compuestos y se observa en la zona aromática una señal ancha para los protones *orto* y *meta* del sistema aromático (6-7 ppm), dificultando la asignación de una conformación para **2A**, **2B** y **2C**. Este comportamiento en disolución es característico de mezclas conformacionales que presentan dinamismo y por ende interconversiones conformacionales que hacen que a temperatura ambiente los desplazamientos se promedien en una señal, dificultando la elucidación conformacional inequívoca del compuesto.<sup>2,8,104,105</sup>

Con el fin de determinar la conformación de **2A**, **2B** y **2C** y su comportamiento en disolución se realizó RMN-<sup>1</sup>H dinámica (RMND) de **2A**. La resonancia magnética nuclear es una técnica muy útil e importante para la investigación y el estudio de procesos dinámicos. Cuando hablamos del término dinámica en química nos referimos a un proceso en el cual ocurren cambios en un determinado tiempo. En los procesos dinámicos reversibles, que son los que nos interesan al tener mezclas conformacionales, se habla de cambios entre una molécula a otra, estos pueden ser cambios intramoleculares o intermoleculares y en estas mezclas la concentración de los componentes no cambia lo que cambia es la velocidad de interconversión entre las estructuras.<sup>106</sup> Estos cambios ocurren muy rápido de manera que al tomar el espectro de RMN a temperatura ambiente lo que se observa es un promedio de los desplazamientos tal como ocurrió en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de los resorcinarenos acetilados. Para identificar las diferentes conformaciones se puede realizar un estudio dinámico por RMN, que consiste en tomar varios espectros cada uno a diferente temperatura sin comprometer la estructura del sistema macrocíclico ya que no involucra rompimiento de enlaces químicos o cambio en la conectividad de los átomos.

La RMN-<sup>1</sup>H dinámica se realizó para el compuesto **2A**, se tomaron varios espectros, cada uno a diferente temperatura (243 a 313 K) (Figura 4-5), con una disolución de los cristales (10mM en CDCl<sub>3</sub>). Iniciando con el espectro a 313 K en el cual solamente se ve una señal para los hidrógenos aromáticos (6,91 ppm) y un singlete ancho para los metilos del grupo

acetil (2,16 ppm). Al ir disminuyendo la temperatura se observó que la resolución de estas dos señales fue mejorando y fue consistente con la presencia de dos conforméromos. Podemos ver que el límite de intercambio rápido en donde no se ve diferenciación de las señales fue a 303 K, el límite de intercambio lento donde logramos diferenciar los conforméromos fue a 243 K y la temperatura de coalescencia fue 293 K. En la zona alifática se ve que la señal de metilos del grupo acetil (H<sub>d</sub>) a 303 K es un singlete ancho, pero al disminuir la temperatura a 243 K se ven dos singletes (2,03 y 2,36 ppm) lo cual indica la presencia de dos tipos de metilos del acetil. Y en la zona aromática ocurre algo similar, en el espectro a 243 K, se observaron 4 señales: dos para los protones aromáticos del borde inferior (H<sub>f</sub> y H<sub>g</sub>) (6,70 y 6,96 ppm) y otras dos señales para los protones del borde superior (H<sub>e</sub> y H<sub>h</sub>) (6,04 y 7,34 ppm). Además, en el espectro de 293 K se observan las dos coalescencias (Figura 4-5).

**Figura 4-5.** RMN-<sup>1</sup>H dinámica para **2A**



La RMN dinámica permitió calcular la energía libre de activación, la constante de velocidad y los valores de entropía y entalpía para la mezcla conformacional. Para calcular la barrera de energía se tomaron como referencia las dos señales de los hidrógenos ubicados en posición *orto* al hidroxilo que son los últimos en coalescer. Se tomaron los

desplazamientos, se calculó la constante de velocidad empleando la ecuación de Gutowsky-Holm ( $K_c = \frac{\pi * \Delta v}{\sqrt{2}}; 2,22 * \Delta v$ ), se graficó el logaritmo natural de la constante de velocidad sobre la temperatura versus el inverso de la temperatura que permitió hallar la ecuación de la recta, con la se determinó la entalpía ( $\Delta H^\ddagger = R(363,1 * 1/T)$ ) y la entropía ( $\Delta S^\ddagger = R(0,0778 - \ln K_B/h)$ ) del sistema dinámico, la energía libre de Gibbs del sistema se calculó empleado la ecuación de Eyring. ( $\Delta G^\ddagger = RT_c [LnT_c - LnK_c + 23,76]; 19.14T_c(10.32 + \log(T_c/K_c))J.mol^{-1}$ ) (Tabla 4-3). Los cálculos se realizaron de acuerdo con el método planteado por Chehidi y col.<sup>107</sup>

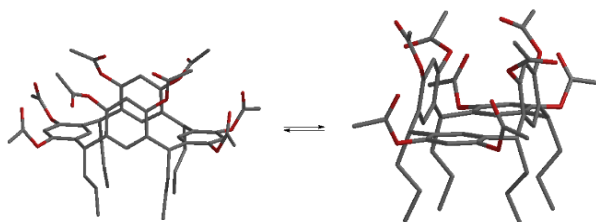
**Tabla 4-3.** Parámetros de activación medidos en  $CDCl_3$  para **2A**

T (K)	H ( $\delta$ ( $s^{-1}$ )))		$k_{c\ e-h}$	$\Delta G^\ddagger_{a-d}$	$Ln(k_{a-d}/T)$	1/T	$\Delta H^\ddagger_{a-d}$
	e	H					
243	2432	2952	1155,150	54,56	1,5583	0,0041	-12,4159443
253	2428	2948	1155,150	54,56	1,5180	0,0040	-11,9254863
263	2428	2944	1146,264	54,58	1,4715	0,0038	-11,4723042
273	2428	2936	1128,492	54,62	1,4186	0,0037	-11,0523041
283	2444	2932	1084,063	54,72	1,3425	0,0035	-10,6619702

Ecuación de la recta:  $y=363,14x+0,0778$ ;  $\Delta S^\ddagger=-196,8978571$

La energía libre para el equilibrio en cuestión es de  $54,7\text{ kJmol}^{-1}$ , más baja que para otros esteres de resorcinarenos,<sup>8</sup> esto puede deberse a la naturaleza del  $CDCl_3$  que tiene la habilidad de formar interacciones con los grupos alquil del sistema resorcinareno acetilado, al igual que las cadenas alifáticas del borde inferior pueden estar interaccionando con el disolvente lo que influye considerablemente en el equilibrio conformacional. El sistema y todos los grupos involucrados en las interacciones son dinámicos lo que propicia una barrera de energía baja. Estos experimentos permitieron confirmar que en disolución existen dos conforméromos bote, así mismo, que en disolución el sistema es dinámico debido a las interacciones con el disolvente y la influencia de la temperatura lo cual contribuye a la interconversión entre las dos conformaciones (Figura 4-6).

**Figura 4-6.** Interconversión entre las dos conformaciones bote de **2A** en disolución.



Ahora bien, conociendo la conformación en disolución del compuesto acetilado **2A**, se procedió a determinar si esta conformación variaba en estado cristalino. De los macrociclos acetilados **2A** y **2C** se obtuvieron cristales que fueron caracterizados por difracción de Rayos X (ver datos cristalográficos en los anexos 4E y 6D). El compuesto **2A** cristalizó con dos moléculas independientes en la unidad asimétrica. Estas dos moléculas independientes muestran algunos parámetros estructurales diferentes, pero la geometría en general es similar en ambos casos (Figura 4-7-A). **2A** adopta dos conformaciones bote, en donde las cadenas propil se localizan todas en la parte inferior del bote mientras que los grupos acetil apuntan todos hacia afuera del resorcinareno, dejando la cavidad del resorcinareno libre de átomos. Las distancias de enlace C...C, para las dos conformaciones bote, son diferentes, como se puede observar en la tabla 4-4.

Los átomos de oxígeno de los grupos acetil de las dos moléculas de **2A** forman enlaces de hidrógeno C-H...O. Estas interacciones débiles mantienen unidas las dos moléculas, generando un dímero (Figura 4-7-B), mediante la difracción de rayos X fue posible determinar la longitud de estos enlaces de hidrógeno (Tabla 4-5). Ahora cuando se observa la red cristalina se puede ver que los dímeros están organizados en matrices unidimensionales con dos orientaciones diferentes mediante nuevos enlaces de hidrógeno (Figura 4-7-C), el empaquetamiento produce capas las cuales están conectadas por enlaces de hidrógeno débiles e interacciones entre las cadenas alifáticas.

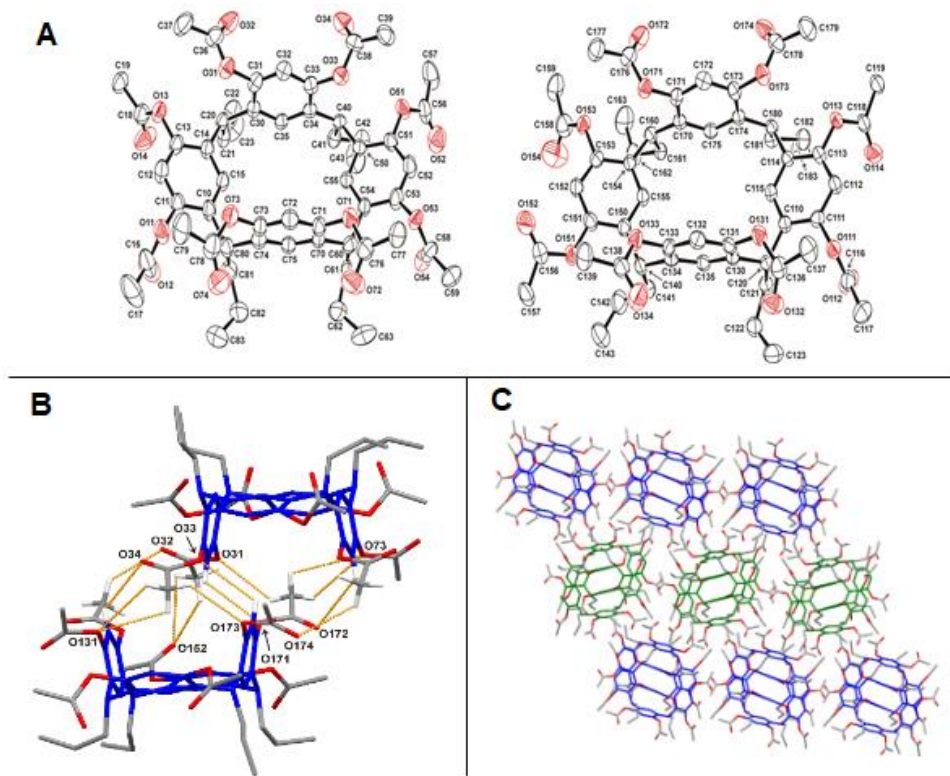
**Tabla 4-4.** Distancias C...C para las dos moléculas cristalizadas de **2A**

Átomos	Longitud (Å)	Átomos	Longitud (Å)
C(15)...C(55)	5.288(5)	C(115)...C(155)	5.299(5)
C(12)...C(52)	10.467(6)	C(112)...C(152)	10.577(5)
C(35)...C(75)	5.016(5)	C(135)...C(175)	4.982(5)
C(32)...C(72)	5.845(6)	C(132)...C(172)	5.818(5)

**Tabla 4-5.** Longitudes de enlaces de hidrógeno relevantes para **2A**

D-H...A	D...A/ Å	D-H...A	D...A/ Å
C(32)-H(32)...O(171)	3.393(4)	C(77)-H(77)b...O(174)	3.332(6)
C(37)-H(37)a...O(152)	3.229(6)	C(177)-H(77)h...O(31)	3.359(5)
C(37)-H(37)b...O(152)	3.229(6)	C(139)-H(39)i...O(32)	3.279(6)
C(39)-H(39)a...O(131)	3.327(5)	C(172)-H(72)g...O(33)	3.394(4)
C(39)-H(39)b...O(131)	3.327(5)	C(132)-H(32)g...O(34)	3.459(5)
C(39)-H(39)c...O(173)	3.354(5)	C(177)-H(77)g...O(73)	3.340(6)
C(72)-H(72)...O(172)	3.643(6)	C(177)-H(77)i...O(73)	3.340(6)

(A = aceptor; D = donador)

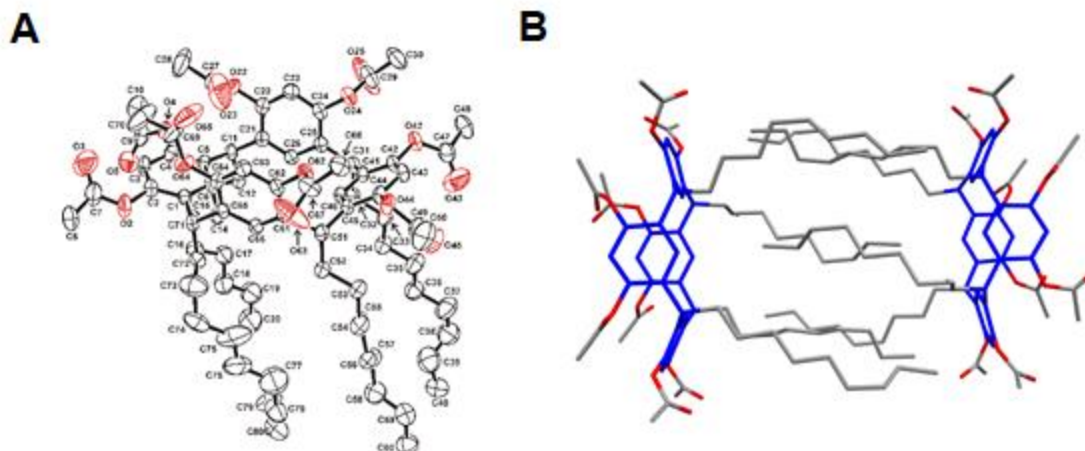
Figura 4-7. Cristalografía de **2A**.

Los átomos de hidrógeno se han omitido para mayor claridad. A. Vista en perspectiva con elipsoides térmicos de las dos moléculas cristalográficamente independientes de **2A** y C. Empaquetamiento para los cristales de **2A**: Dos diferentes orientaciones (azul y verde) del empaquetamiento para los cristales de **18**. (Se omiten los átomos de hidrógeno para mayor claridad)

Nuestros resultados nos permitieron evidenciar que en estado cristalino la conformación del compuesto **2A** cambia, de cono a bote y esto se debe a los grupos acetyl propician los enlaces de hidrógeno intermoleculares a diferencia del resorcinareno **1A** que al tener una conformación cono favorece los enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos OH adyacentes, además la ubicación de los grupos acetyl hacia afuera de la cavidad aumenta el aplanamiento de dos de las unidades de resorcinol. Este resultado es coherente con artículos publicados anteriormente, en los cuales se evidencia que al realizar modificaciones en el borde superior, la conformación del macrociclo varía, tanto en disolución como en estado cristalino.<sup>17,104,108,109</sup> En el compuesto **2C**, los cristales analizados también presentan conformación bote, confirmando los resultados obtenidos con **2A** (Figura 4-8-A). A diferencia de los cristales de **2A**, que interactúan por los grupos

acetil, los dímeros que forman los cristales de **2C** interactúan por las cadenas alquílicas (Figura 4-8-B).

**Figura 4-8.** Cristalografía de **2C**



Los átomos de hidrógeno se han omitido para mayor claridad. A. Vista en perspectiva con elipsoides térmicos de las dos moléculas cristalográficamente independientes de **2C** y B. Dímero formado por las dos moléculas de **2C**

En esta parte del trabajo, se logró confirmar la estructura tetramérica de **1A**, **1B** y **1C** de manera indirecta realizando la acetilación. Se obtuvo los compuestos **2A**, **2B** y **2C**, se caracterizaron con técnicas espectroscópicas y difracción de rayos X y se pudo comprobar que la conformación como de los resorcinarenos de partida (**1A**, **1B** y **1C**) cambió al modificar el borde superior, adquiriendo conformación bote en los compuestos **2A**, **2B** y **2C**. Algunos de los resultados de esta etapa de la investigación fueron publicados en la revista *Journal of Molecular Structure*, “*Crystal structure and dynamic NMR studies of octaacetyl-tetra(propyl) calix[4]resorcinarene*”.<sup>11</sup>

## 4.2 Funcionalización en el borde superior de los resorcinarenos (etapa 2)

En la segunda parte del trabajo se realizó la funcionalización del borde superior de **1A**, **1B** y **1C**. Como se ha mencionado anteriormente, los macrociclos tipo calix[4]resorcinareno pueden ser modificados con gran cantidad de reacciones químicas, desde acetilaciones, descritas en el numeral anterior, hasta reacciones de eterificación, esterificación,

aminometilación y copulación con sales de diazonio. Para decidir el grupo funcional con el cual se modificaría los compuestos **1A**, **1B** y **1C**, se tuvo en cuenta que el fin último de estas modificaciones era el anclaje químico a un material monolítico que contenía un grupo oxirano, lábil a ataque de nucleofílicos como hidroxilo, carboxilo y amina,<sup>87,93,94</sup> por ello, inicialmente la reacción de anclaje al material monolítico se realizó con los resorcinarenos **1A** y **1B**, pero se demostró que la reacción entre el fenolato derivado de los resorcinarenos y el grupo oxirano contenido en el material monolítico no procedía, por lo tanto era indispensable realizar una modificación en el borde superior.

La modificación del borde superior de los resorcinarenos **1A**, **1B** y **1C** se realizó con compuestos que contenían grupos carboxilo, de manera que pudiera propiciarse la apertura del epóxido seguida del ataque nucleofílico del ion carboxilato derivado del resorcinareno modificado.<sup>93</sup> Para las modificaciones se eligió cloruro de 4-carboxibencenodiazonio y  $\beta$ -alanina con el fin de comparar el comportamiento de un ácido carboxílico aromático y uno alifático al momento de realizar la modificación de la superficie del material monolítico. Cabe resaltar que la modificación de materiales monolíticos derivados de GMA, se ha realizado con grupos amino mediante el método epoxi, pero no se ha empleado ácidos carboxílicos mediante “*grafting*”-método epoxi, lo cual implicó un gran reto sintético y metodológico que fue abordado en la presente investigación.

#### **4.2.1 Funcionalización del borde superior mediante acoplamiento azoico con cloruro de 4-carboxibencenodiazonio**

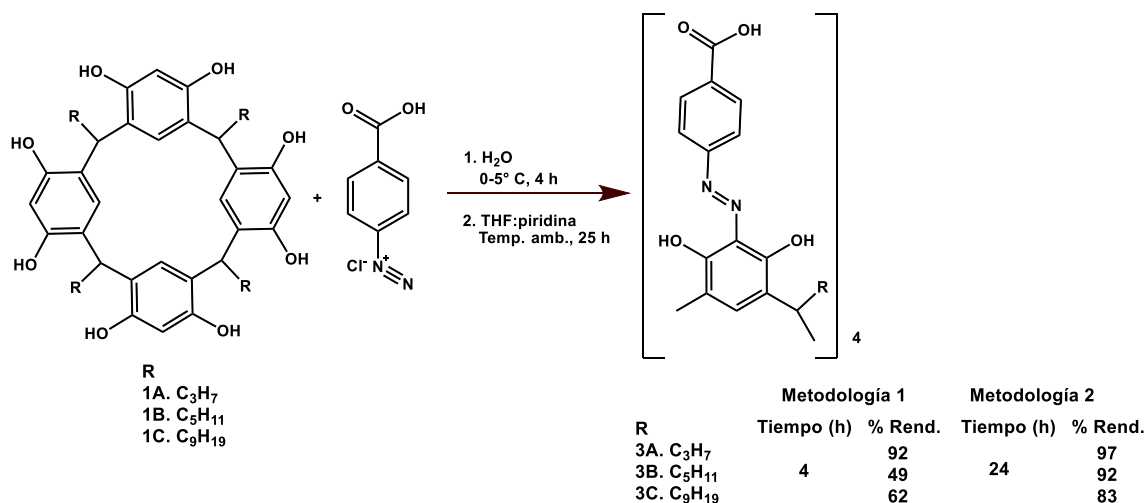
Con **1A**, **1B** y **1C** se realizó la reacción de acoplamiento azo para obtener los macrociclos diazotados: **3A**, **3B** y **3C**. Inicialmente se usó la metodología propuesta por Bhojak (metodología 1. Numeral 3.2.3),<sup>21</sup> pero la estabilidad de los compuestos diazotados era muy baja, pues se oxidaban con rapidez. Por ello se adaptó la metodología propuesta para calix[4]arenos, análogos a los resorcinarenos (metodología 2. Numeral 3.2.3) (Esquema 4-7).<sup>110</sup>

Tanto en la metodología 1 como en la metodología 2 la obtención de la sal de diazonio fue la misma: se adicionó una disolución acuosa de nitrito de sodio a una disolución ácida del ácido *p*-aminobenzoico, manteniendo en ambos casos la temperatura lo más cercano a 0°C y el menor tiempo de exposición a la luz con el fin de evitar la descomposición. En



ambos casos se empleó como amina el ácido *p*-aminobenzoico que permitió obtener una sal de diazonio más estable debido a la interacción resonante entre el grupo azo y el sistema aromático. A continuación, se adicionó la sal de diazonio a la disolución del fenolato preparado a partir del resorcinareno. En el caso de la metodología 1, se usó una disolución de NaOH para la disolución del resorcinareno mientras que en la metodología 2 se empleó como disolvente una mezcla de THF:piridina. En ambos casos se logró obtener los macrociclos azoicos, para la metodología 1 los rendimientos fueron del 92, 49 y 62% para los compuestos **3A**, **3B** y **3C**, respectivamente. La metodología 2 permitió aumentar los rendimientos a 97, 92 y 83%, así mismo, los productos obtenidos con este procedimiento fueron más estables a temperatura ambiente.

#### Esquema 4-7. Síntesis de resorcinarenos diazotados, metodología 1 y 2



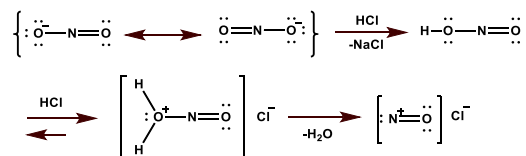
La metodología 2 permitió solucionar un gran problema sintético del acoplamiento azoico de resorcinarenos, ya que fue más estable al secar los productos. Mediante la metodología 2, se emplea piridina para el acoplamiento azoico, esto disminuye la descomposición, puesto que, el volumen de la piridina al formar los enlaces de hidrógeno permite que el grupo azo este mejor protegido estéricamente, lo cual disminuye la descomposición del compuesto por radicales libres. En la metodología 1, se genera igualmente enlaces de hidrógeno, pero estos se generan con el agua, que tiene menor impedimento estérico. Finalmente, se puede afirmar que el uso de THF como disolvente en la metodología 2 facilita el secado y purificación del producto, ya que es más volátil que el agua. Así mismo, en ambas metodologías las soluciones son básicas por que favorecen la diazotación de la

sal de diazonio con el fenolato, sin embargo, el medio menos básico empleado en la metodología 2 (24 h), hace necesario que el tiempo de la reacción sea mucho mayor que en la metodología 1 (4 h), este control termodinámico de la reacción en la metodología 2, posiblemente permita obtener un producto más estable.

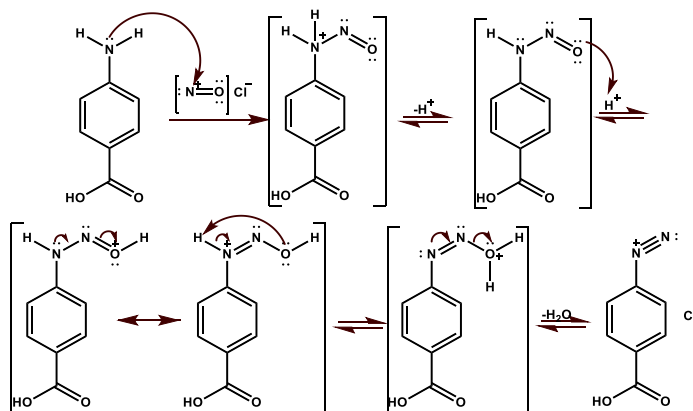
El mecanismo de la reacción de acoplamiento azoico inicia con la formación de sal de diazonio, producto de la reacción entre una amina primaria aromática y  $\text{NaNO}_2$ , en presencia de ácido. La cantidad de  $\text{NaNO}_2$  es estequiométrica, pero el ácido debe adicionarse en exceso para evitar la condensación y la diazotación parcial. La sal de diazonio se obtiene en un medio acuoso ácido y no debe aislarse sino usarse inmediatamente, manteniendo la temperatura a  $0^\circ\text{C}$ . La reacción inicia cuando el anión nitrito se protona dos veces, eliminando agua y formando el catión nitrosilo, muy electrófilo y reactivo, el cual reaccionara con el ácido *p*-aminobenzoico. El par de electrones libres de la amina atacan al centro más deficiente en electrones, es decir el nitrógeno del catión nitrosilo, formándose la sal de *N*-nitrosoamonio, que pierde un protón formando *N*-nitrosoamina, esta se protona, debido al medio ácido, y los pares electrónicos del nitrógeno unido al anillo aromático regeneran el doble enlace  $\text{N}=\text{N}$ , propiciando otra protonación del átomo de O, que sale como  $\text{H}_2\text{O}$  porque los pares de electrones libres de uno de los átomos de nitrógeno permite la formación del triple enlace del grupo azo, para la formación de la sal de diazonio. El ion diazonio formado se acopla con sustratos activos como las unidades de resorcinol de los macrociclos **1A**, **1B** o **1C**. Generalmente la sustitución se da mayoritariamente en *para* respecto a  $-\text{OH}$ , pero como esta posición ya tiene el puente metileno con el sustituyente, la sustitución ocurre en la posición *orto*. El macrociclo se disolvió previamente en una disolución alcalina (piridina o  $\text{NaOH}$ ), donde se convierte en fenóxido una especie activante, rica en electrones y un grupo electrodonador fuerte. La reacción inicia con el ataque del enlace  $\pi$  del anillo rico en electrones a la sal de diazonio, la cual por polarización de un de los enlaces, neutraliza la carga positiva del nitrógeno central. La salida del protón permite la regeneración de la aromaticidad de la unidad de resorcinol, formando el macrociclo diazotado (Esquema 4-8)

### Esquema 4-8. Mecanismo de reacción de diazotación de resorcinarenos

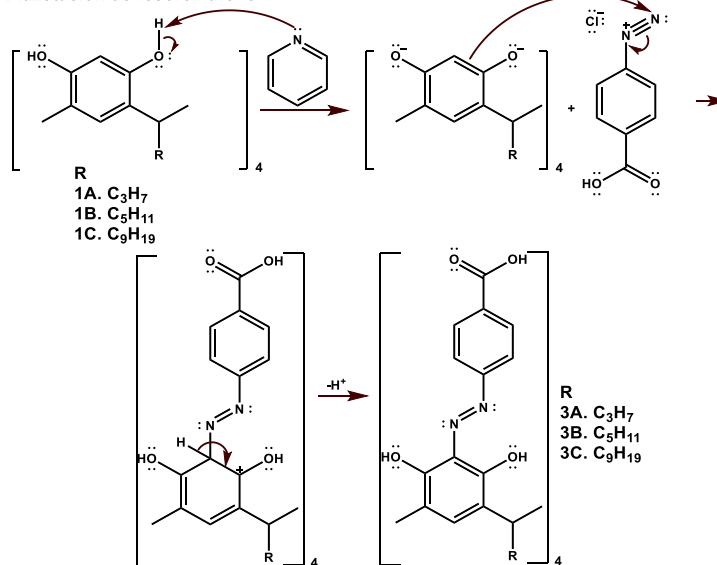
#### 1. Formación catión nitrosilo



#### 2. Formación sal de diazonio



#### 3. Diazotación de resorcinarenos



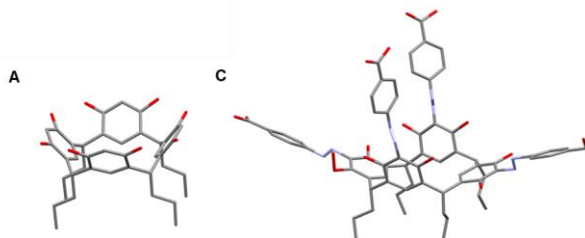
Los productos **3A**, **3B** y **3C** fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas, como IR, análisis elemental y RMN. A manera de ejemplo se describe la caracterización realizada al compuesto **3A**. En el espectro IR (Anexo 7A) se puede ver: la señal característica para el estiramiento OH de los hidroxilos de la unidad de resorcinol y OH del grupo carboxilo, (**3A**, 3.427 cm<sup>-1</sup>), esta señal tiene mayor intensidad y es más ancha debido al ácido carboxílico, las señales para el estiramiento C-H aromático y alifático entre 2.927-2.852 cm<sup>-1</sup>. Como el acoplamiento azoico se realizó con ácido *p*-aminobenzoico, se

resuelve la señal correspondiente al C=O del grupo carboxilo (**3A**, 1.691 cm<sup>-1</sup>) y finalmente la señal característica del enlace N=N (**3A**, 1.504 cm<sup>-1</sup>). Mediante el análisis elemental (Anexos 7B), se pudo determinar el contenido total de carbono, hidrógeno y nitrógeno, los resultados nos indican que la cantidad de carbono, hidrógeno y nitrógeno encontrados en las muestras concuerdan con las calculadas: para **3A**, calculado: C, 65,38; H, 5,16 y N, 8,97, encontrado: C, 65,66; H, 5,47 y N, 8,08. Ahora bien, en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **3A** (Anexos 7C), se encuentra mezcla conformacional, se describen las señales del conformero mayoritario, que en todos los casos es el conformero bote. Para **3A** se resuelve una señal en 0,91 ppm, para 12 protones, correspondiente al CH<sub>3</sub>, en 1,28 y 1,83 ppm dos multipletes para los CH<sub>2</sub>, cada uno integrando para 8 protones. En 4,37 ppm un triplete para 4H y en 6,43 y 7,14 un singlete para dos tipos de hidrógenos *meta* al OH, indicativo de conformación bote (Figura 4-9). Entre 7,36-8,03 ppm los doble dobles característicos de los hidrógenos aromáticos del 4-carboxifenilazo, en 8,57 ppm un singlete para 8 protones de OH y 14,77 ppm un singlete para 4 protones de COOH. En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Anexo 7D), se ven las señales en 14,0, 20,8, 26,0 (C alifáticos), 35.1 (puente metileno), 115,3, 117,3, 123,9, 130,9, 131,0, 136,1, 145,2, 149,6 (C aromáticos) y 166.6 (carboxilo).

Ahora bien, en cuanto a la conformación de los compuestos diazotados, las señales de los hidrógenos aromáticos ubicados en posición *meta* al OH se diferencian al funcionalizar el resorcinareno de partida, puesto que la conformación del macrociclo cambia de cono, que es la que inicialmente tiene el resorcinareno sin funcionalizar, a bote al recibir un grupo voluminoso, lo cual genera un aplanamiento en dos de los anillos alternados que permite la diferenciación de los dos pares de hidrógenos (Figura 4-9). Adicionalmente, la piridina en medio polar aprótico o la solución básica de NaOH contienen pares de electrones libres que permiten la formación de enlaces de hidrógeno. En anteriores investigaciones se demostró que al haber en el medio de reacción un fuerte aceptor de enlace de hidrógeno se presentaba competencia con el enlace de hidrógeno intramolecular que se forma en los resorcinarenos, pero debido a la naturaleza de aceptores fuertes de enlace de hidrógeno, como la piridina, se favorecían los enlaces de hidrógeno intermoleculares que facilitan la conversión de una conformación cono a una conformación bote.<sup>111,112</sup> Otros autores como Ziaja et al.<sup>32</sup> confirmaron que la conversión de cono a bote se puede dar en presencia de compuestos aceptores fuertes de enlaces de hidrógeno y que debido al comportamiento

de los resorcinarenos como donador o aceptor de enlaces de hidrógeno, dependiendo del medio, la conversión de una conformación a otra se veía favorecida.<sup>113,114</sup>

**Figura 4-9.** Comparación conformación como **1A** y conformación bote **3A**



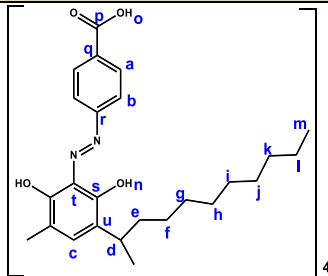
(Se omiten los átomos de hidrógeno para mayor claridad de las estructuras)

La caracterización espectroscópica se realizó también para **3B** y **3C**, a continuación, se describen los datos obtenidos y en los anexos 8 y 9 se encuentran los espectros para **3B** y **3C**, respectivamente.

**Tabla 4-6.** Caracterización de **3B** y **3C**

Caracterización de <b>3B</b>			
IR (cm <sup>-1</sup> )	OH y COOH	3.419	
	CH ar.	2.928	
	CH alif.	2.857	
	C=O	1.694-1.605	
	N=N	1.502	
Análisis elemental	Calculado	C, 67,05; H, 5,92; N, 8,23; O, 18,80.	
	Encontrado	C, 66,30; H, 5,78; N, 8,28.	
Entrada	RMN- <sup>1</sup> H (δ, ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (δ, ppm)	
a	7,36-8,57 (dd, H ar.)	128,5	
b		115,3	
c	6,34 y 7,14 (2s, 4H meta a OH)	123,9	
d	4,35 (t, 4H, CH)	32,6	
e	1,83 (m, CH <sub>2</sub> )	31,5	
f	1,27 (m, CH <sub>2</sub> )	28,7	
g		27,3	
h		22,0	
i	0,84 (m, CH <sub>3</sub> )	13,9	
j	8,57 (OH)		
k	14,79 (s. ancho, 4COOH)		
l		166,6	
m		131,0	
n		149,6	
o		144,9	
p		136,1	
q		117,4	

Continuación Tabla 4-6

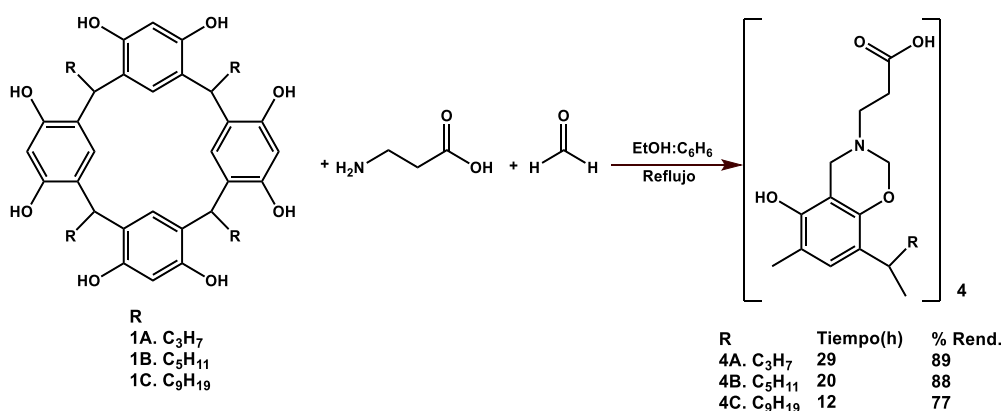
Caracterización de <b>3C</b>			
IR (cm <sup>-1</sup> )	OH y COOH	3.419	
	CH ar.	2.928	
	CH alif.	2.857	
	C=O	1.694-1.605	
	N=N	1.502	
Análisis elemental	Calculado	C, 67,05; H, 5,92; N, 8,23; O, 18,80.	
	Encontrado	C, 66,30; H, 5,78; N, 8,28.	
Entrada	RMN- <sup>1</sup> H (δ, ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (δ, ppm)	
a	7,36-8,03 (dd, H ar.)	124,4	
b		115,8	
c	6,14 y 7,10 (2s, 4H, H <i>meta</i> a OH)	123,5	
d	4,36 (t, 4H, CH)	33,4	
e	1,96 (m, CH <sub>2</sub> )	31,8	
f		31,8	
g		31,7	
h		29,6	
i	1,20 (s. ancho, CH <sub>2</sub> )	29,4	
j		29,2	
k		29,1	
l		22,6	
m	0,81 (s. ancho, CH <sub>3</sub> )	14,4	
n	8,31 (OH)		
o	14,77 (s. ancho, 4COOH)		
p		167,1	
q		131,5	
r		152,1	
s		150,1	
t		136,6	
u		117,8	

Como puede observarse en la descripción espectroscópica y la tabla 4-6, los compuestos diazotados **3A**, **3B** y **3C** presentan comportamiento similar. En los espectros IR, todos muestran la banda característica para O-H y COOH, con un apreciable ensanchamiento. De la misma manera, se distinguen las bandas características para C=O y N=N, confirmando la presencia de estos grupos en los macrociclos funcionalizados. En los espectros RMN, se obtienen mezclas conformacionales, pero todos muestran perfiles similares al contener la señal característica del puente metileno entre 4-5 ppm, las señales características para los protones del grupo hidroxilo (8-9 ppm), los protones del grupo carboxilo (14-15 ppm), así como los dobles dobletes del sistema aromático derivado de 4-carboxifenil (7,3 y 8,7 ppm) y los protones *meta* del sistema macrociclo (6 y 7,2 ppm). Y finalmente el análisis elemental se encuentra en total concordancia entre el valor calculado y el encontrado. Logrando de esta manera obtener y caracterizar los macrociclos diazotados **3A**, **3B** y **3C**.

## 4.2.2 Funcionalización del borde superior mediante obtención de benzoxazinas

La síntesis de benzoxazinas a partir de **1A**, **1B** y **1C** significó un reto sintético, puesto que este tipo de reacciones conllevan a la estandarización de condiciones y adicionalmente, el análisis de los productos mediante técnicas espectroscópicas es difícil debido a las mezclas conformacionales que pueden obtenerse. Los resultados mostrados a continuación, fueron el producto de múltiples síntesis, en las que se variaron las condiciones y se hicieron replanteamientos metodológicos, que finalmente, nos permitieron proponer una metodología con la cual se obtienen benzoxazinas a partir de resorcinarenos con buenos rendimientos (Esquema 4-9).

**Esquema 4-9.** Síntesis de benzoxazinas

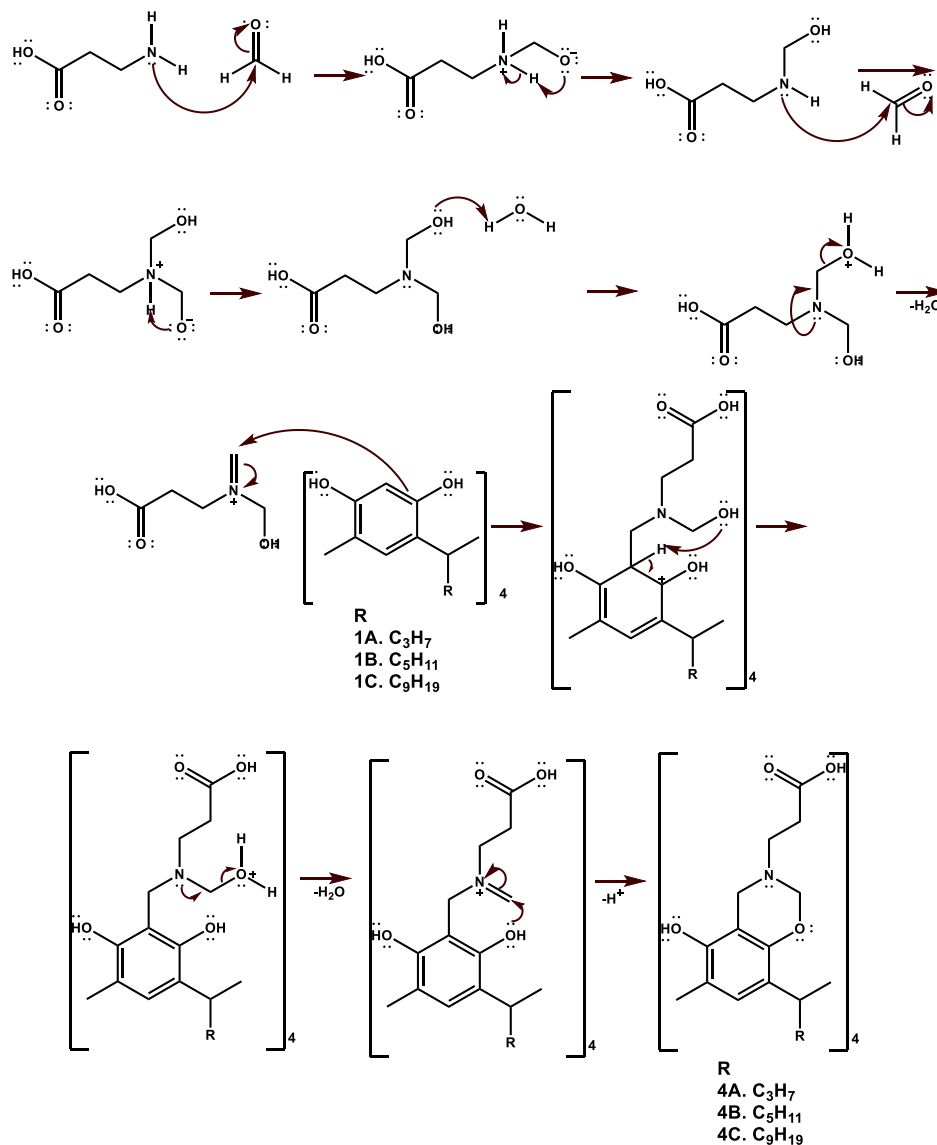


La reacción se realiza en una mezcla C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>:H<sub>2</sub>O (1:1) en la cual se disuelve el respectivo resorcinareno, seguido de la adición de  $\beta$ -alanina y HCHO en proporción (1:5:10). Los rendimientos de la reacción aumentan al disminuir la longitud de la cadena alifática, el compuesto **4A** presentó el mejor rendimiento (89%) seguido del compuesto **4B** y **4C**. El seguimiento de la reacción se realizó mediante CCD, empleando como fase móvil acetonitrilo:metanol (4:6) y se estableció que se requiere mayor tiempo de reacción para obtener el compuesto **4A**.

El mecanismo de reacción para la obtención de benzoxazinas de resorcinarenos se puede observar en el esquema 4-10. La reacción inicia cuando el par de electrones libres del nitrógeno de  $\beta$ -alanina atacan nucleofílicamente al carbono del carbonilo de HCHO,

deslocalizando el doble enlace, formando el metanolato de 2-(carboxietil)amonio. Luego el ion metanolato se protona, formando ácido 3-((hidroximetil)amino) propanoico, y nuevamente se adiciona a otra molécula de formaldehído, generando ácido 3-(bis(hidroximetil)amino) propanoico. Posteriormente, uno de los alcoholes se protona, liberando  $\text{H}_2\text{O}$  y se genera un doble enlace  $\text{C}=\text{N}$ . El carbono deficiente en electrones es atacado por el doble enlace del anillo aromático del sistema macrociclo. Finalmente, se protona nuevamente el grupo  $\text{OH}$ , liberando agua, regenerando la aromaticidad del anillo y formando un enlace  $\text{C}=\text{N}$ , el cual es atacado por el  $\text{OH}$  más próximo para formar el puente benzoxazínico.

**Esquema 4-10.** Mecanismo de reacción formación de benzoxazinas



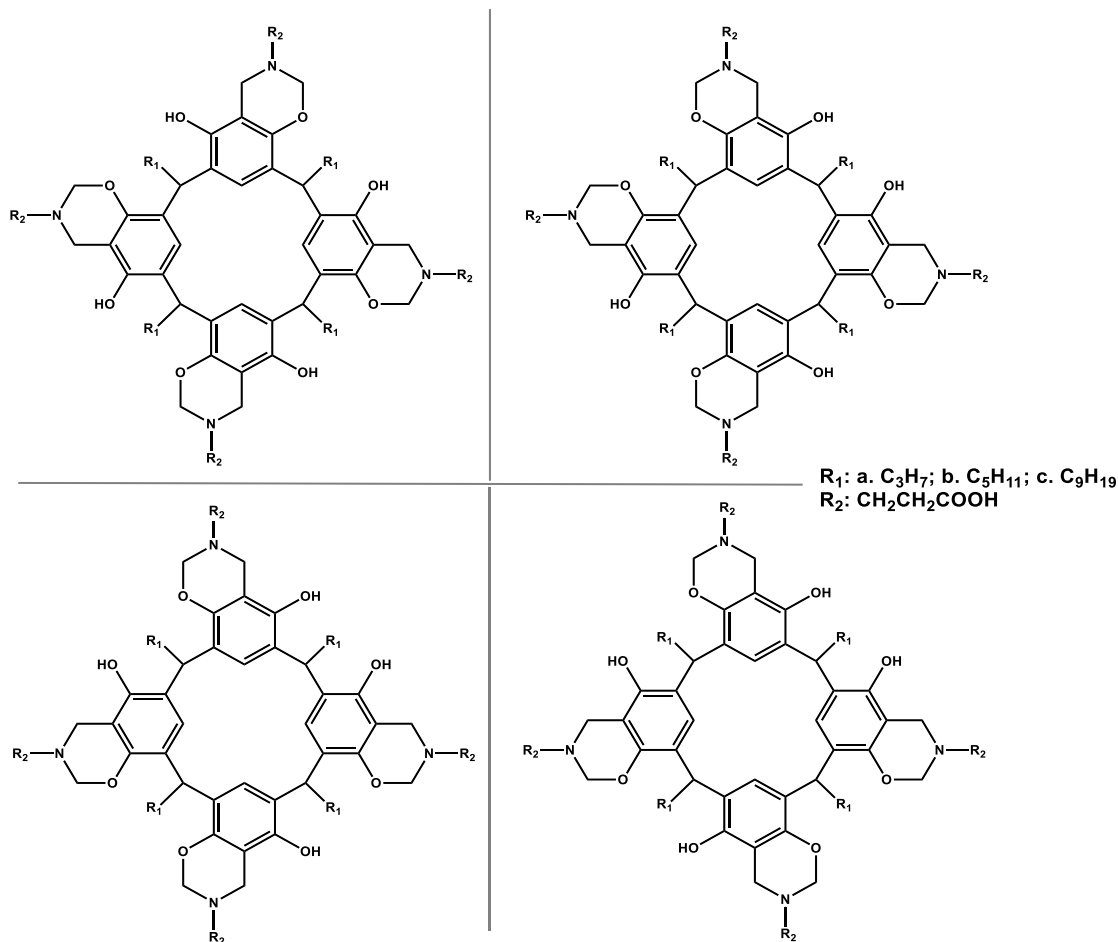


La caracterización **4A**, **4B** y **4C** se realizó inicialmente por IR, RMN y análisis elemental. A manera de ejemplo se describe la caracterización realizada al compuesto **4A**. En el espectro IR (Anexo 10A), en  $3.374\text{ cm}^{-1}$  se encuentran las bandas correspondientes al estiramiento O-H de los grupos hidroxilos y los grupos COOH, en  $2.955$  y  $2.869\text{ cm}^{-1}$  las señales características de los estiramientos C-H aromáticos y alifáticos, respectivamente. En  $1.714\text{-}1603\text{ cm}^{-1}$  se encuentran las señales de C=O del grupo carboxílico, en  $1.214\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la señal característica de la flexión C-N y en  $1.115\text{ cm}^{-1}$  la banda característica a la tensión C-O-C. En cuanto al análisis elemental los resultados son coherentes y cercanos a los calculados, para el compuesto **4A** (Anexo 10B), se calculó 64,97% C, 6,91% H y 5,05% N y se encontró 60,90% C, 6,90% H y 4,41% N.

En cuanto al espectro RMN- $^1\text{H}$  de **4A** (Anexo 10C), desplazado a campo alto, se resuelve un singlete ancho (0,93 ppm) para 12 protones de  $\text{CH}_3$ , en 1,25 un singlete ancho para  $\text{CH}_2$  integrando para 8 protones, en 2,20 otro singlete ancho para 8  $\text{CH}_2$ , en 2,43 ppm y 2,90 ppm, se desplazan dos singletes anchos para  $\text{CH}_2$  de la fracción  $\beta$ -alanina, y en 3,97 ppm la señal correspondiente a C- $\text{CH}_2$ -N, en 4,27 ppm un singlete ancho para los protones del puente CH, con un singlete ancho desplazado a 6,20 ppm la señal integrando para 12 protones, (N- $\text{CH}_2$ -O y OH), y desplazado a campo alto un singlete ancho para 4 protones *meta* a OH. Es importante mencionar que la complejidad y ensanchamiento de las señales en los espectros es evidencia de la mezcla conformacional que se obtiene,<sup>115</sup> a parte de las conformaciones características de estos tipos de macrociclos (cono, bote, silla, silla de montar y diamante), la benzoxazina también puede formarse en diferentes posiciones dentro del macrociclo, aumentando la complejidad de los espectros RMN- $^1\text{H}$  (Figura 4-10).

Finalmente, en el espectro RMN- $^{13}\text{C}$  (Anexo 10D), se encuentran las señales correspondientes a los 15 tipos de carbonos del compuesto **4A**: (C alifáticos borde inferior): 13,9, 20,8 y 31,7 ppm, (C alifáticos  $\beta$ -alanina) 33,6 y 56,0 ppm, (C puente metileno): 35,4 ppm, (C- $\text{CH}_2$ -N): 42,9 ppm, (O- $\text{CH}_2$ -N): 85,0 ppm, (C aromáticos) 107,6, 123,6, 124,5, 152,5, 152,6, 172,9 ppm y (COOH): 174,1 ppm.

Figura 4-10. Isomería para 4A, 4B y 4C



Al igual que para el compuesto **4A**, se realizó la caracterización espectroscópica para **4B** y **4C**, en la siguiente tabla se relacionan los datos y en los anexos 11 y 12 se encuentran los espectros para **4B** y **4C**, respectivamente.

Tabla 4-7. Caracterización de **4B** y **4C**

Caracterización de <b>4B</b>		
IR (cm <sup>-1</sup> )	OH y COOH	3.411
	CH ar.	2.926
	CH alif.	2.855
	C=O	1.722-1607
	C-N	1.211
	C-O	1.109
Análisis elemental	Calculado	C, 66,86; H, 7,59; N, 4,59; O, 20,96
	Encontrado	C, 63,35; H, 7,51; N, 4,05

**4B**

Continuación Tabla 4-7

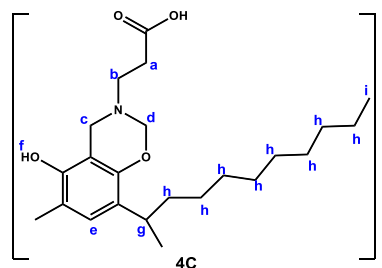
Entrada	RMN- <sup>1</sup> H (δ, ppm)
a	2,86 (s. ancho)
b	2,94 (s. ancho)
c	3,94 (s. ancho, 8H)
d	4,85 (s. ancho)
e	7,20 (s. ancho, 4H)
f	4,67 (s. ancho)
g	4,19 (s. ancho, 4H)
h	2,40 (s. ancho, 8H)
i	2,18(s. ancho, 8H)
j	1,27 (s. ancho, 16H)
k	0,85 (s. ancho, 12H)

Caracterización de 4C		
IR (cm <sup>-1</sup> )	OH y COOH	3.279
	CH ar.	2.922
	CH alif.	2.889
	C=O	1.714-1620
	C-N	1.212
	C-O	1.103
Análisis elemental	Calculado	C, 69,78; H, 8,64; N, 3,87; O, 17,70
	Encontrado	C, 68,17; H, 8,80; N, 4,05.

Entrada	RMN- <sup>1</sup> H (δ, ppm)
a	2,18 (s. ancho, 8H)
b	2,33 (s. ancho, 8H)
c	2,84 (s. ancho)
d	4,04 (s. ancho)
e	7,05-7,13 (s. ancho)
f	4,16 (s. ancho)
g	3,87 (s. ancho)
h	1,24 (s. ancho, 64H)
i	0,86 (s. ancho)



En la tabla anterior se pudo observar claramente la tendencia en el espectro IR para las benzoxazinas de resorcinarenos, puesto que, se encuentran las bandas características para el estiramiento O-H y COOH, así como la banda del estiramiento C=O para ácidos carboxílicos, y la banda correspondiente a C-N, que confirmó la presencia de este grupo en los compuestos obtenidos. Mediante el análisis elemental, también se confirma la obtención de macrociclos con contenido de N cercano al calculado para las benzoxazinas **4A**, **4B** y **4C**. y en el espectro de RMN, el perfil espectroscópico es similar para los tres compuestos, presentando ensanchamiento de las señales, pero aun así mostrando señales características de estos macrociclos, como el puente benzoxazínico, o el puente metileno.

En esta etapa se logró sintetizar y caracterizar seis calix[4]resorcinarenos modificados en el borde superior (**3A**, **3B**, **3C**, **4A**, **4B** y **4C**), los cuales presentan en su estructura la función ácido carboxílico que permitirá la posterior modificación de los materiales monolíticos, por la reacción de esterificación con el grupo oxirano de los derivados de glicidilmetacrilato.

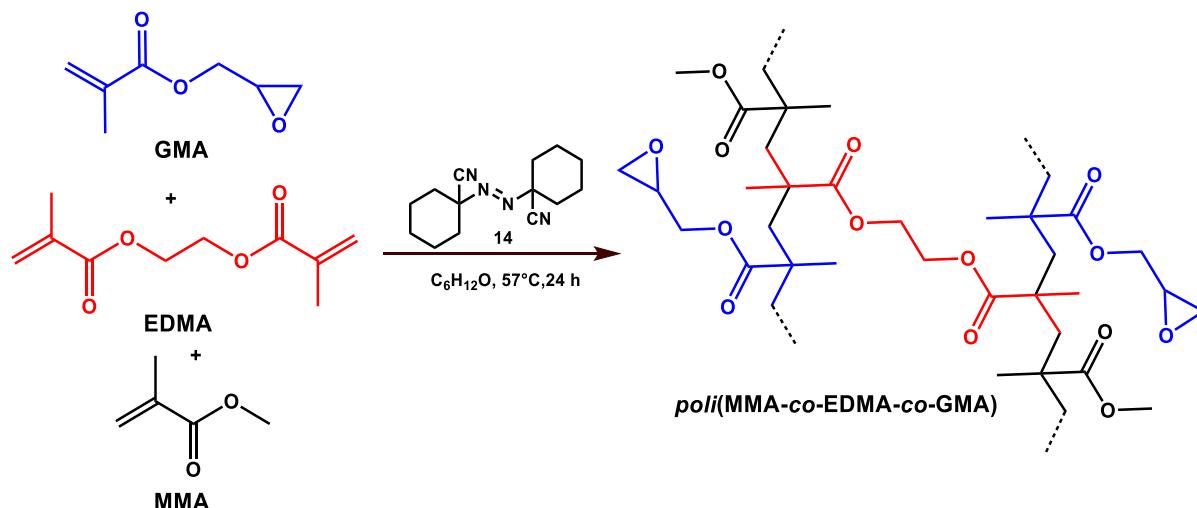
### 4.3 Preparación de material monolítico (Etapa 3)

Después de sintetizar los macrociclos que se emplearían en la modificación del material monolítico, se procedió a preparar los copolímeros. Se decidió sintetizar materiales monolíticos derivados de GMA, porque contienen en su estructura grupos oxirano, lábiles a la apertura anular seguida de ataque de agentes nucleofílicos como ácidos carboxílicos, de manera que, su reactividad los convierte en materiales muy promisorios para la reacción con los resorcinarenos sintetizados en este trabajo. Cabe destacar que estos materiales han sido ampliamente empleados en la preparación de columnas monolíticas.<sup>44,116</sup>

#### 4.3.1 Copolímero *poli(MMA-co-EDMA-co-GMA)*

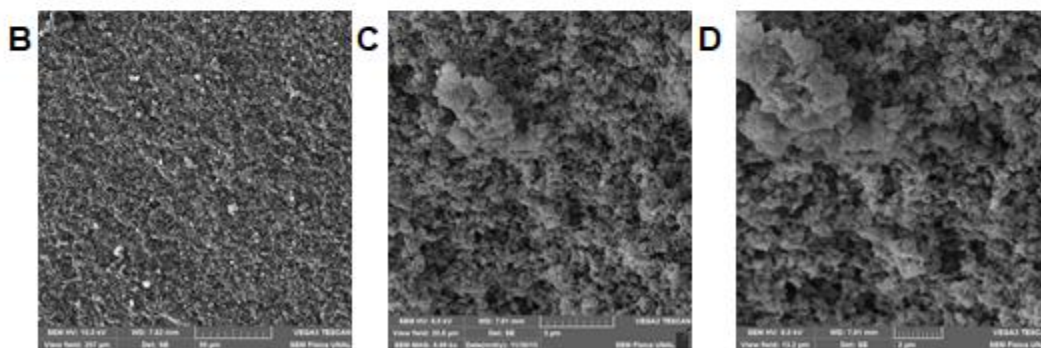
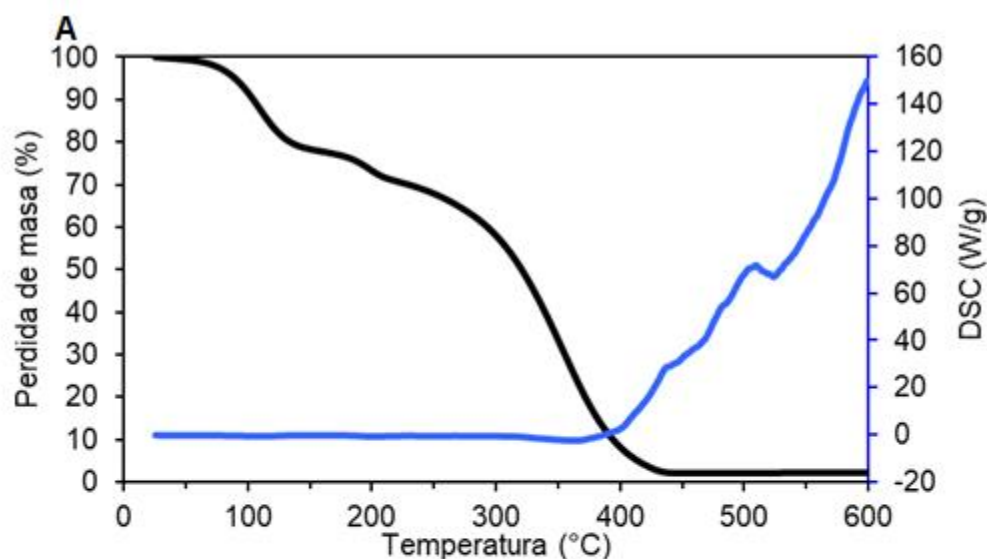
Inicialmente se preparó el copolímero *poli(MMA-co-EDMA-co-GMA)* de acuerdo con el procedimiento propuesto por Štrancar y Tennikova<sup>44,66</sup> en el cual se emplea una mezcla de polimerización compuesta de 60% de porógeno y 40% de monómeros y entrecruzante (Esquema 4-11).

**Esquema 4-11.** Reacción de preparación copolímero *poli(MMA-co-EDMA-co-GMA)*



Para la preparación se mezcló los monómeros: GMA, MMA y el entrecruzante (EDMA), seguido se adicionó el iniciador 1,1-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) y como porógeno ciclohexanol, la mezcla de polimerización fue llevada a 57°C por 24 h. Luego se lavó el copolímero con etanol y se secó a presión reducida. El copolímero que se obtuvo fue de color blanco, con muy baja resistencia mecánica y se caracterizó empleando IR-ATR (anexo 13A), empleando TGA/DSC (análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido) (Figura 4-11-A) y MEB (Figura 4-1-B-D).

**Figura 4-11.** TGA/DSC y MEB de *poli(MMA-co-EDMA-co-GMA)*



A. TGA/DSC (línea negra: TGA y línea azul: DSC) y MEB de la estructura de *poli(MMA-co-EDMA-co-GMA)*: B. 50 µm, C. 5 µm, D. 2 µm

En el espectro IR-ATR se observan las señales características del estiramiento C-H alifático entre 2.988-2.947  $\text{cm}^{-1}$ , en 1.723  $\text{cm}^{-1}$  la señal correspondiente al estiramiento C=O, en 1.449  $\text{cm}^{-1}$  el pico correspondiente a la flexión C-H alifático, en 1.146  $\text{cm}^{-1}$  la señal correspondiente al estiramiento C-O y la señal característica del oxirano en 907  $\text{cm}^{-1}$ . No

se observan señales de estiramientos o flexiones C=C insaturado, lo cual indica que el método de polimerización fue efectivo. Adicionalmente, se quiso conocer la estabilidad térmica del copolímero con el fin de determinar la temperatura segura para realizar la modificación, esto se hizo empleando TGA/DSC (análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido). Este análisis mostraron pérdida de disolvente cerca de 110°C, y una temperatura de descomposición cercana a 355°C.

Para la caracterización del copolímero se empleó también microscopia electrónica de barrido, en la figura 4-11 (B-D) se pueden observar diferentes aumentos: 50, 5 y 2  $\mu\text{m}$ , las microscopias muestran que el copolímero es bastante uniforme. Esta estructura uniforme y porosa es adecuada para la eficiente transferencia de masa para la reacción entre el grupo oxirano y los resorcinarenos sintetizados. Se ve que la formación de microglóbulos interconectados es eficiente y similar a microscopias tomadas otros materiales monolíticos.<sup>66</sup>

### 4.3.2 Copolímero *poli(GMA-co-EDMA)*

La preparación de este copolímero se hizo empleando la metodología planteada por Štrancar, el copolímero se formó hasta una semana después de iniciada la polimerización, razón por la cual se buscó otras metodologías que permitieran menor tiempo de reacción. En la tabla 4-8 se describen las cantidades y bibliografía de cada metodología que se probó y en la figura 4-12 se muestran las fotografías tomadas a los copolímeros preparados.

**Tabla 4-8.** Metodologías para la preparación de *poli(GMA-co-EDMA)*

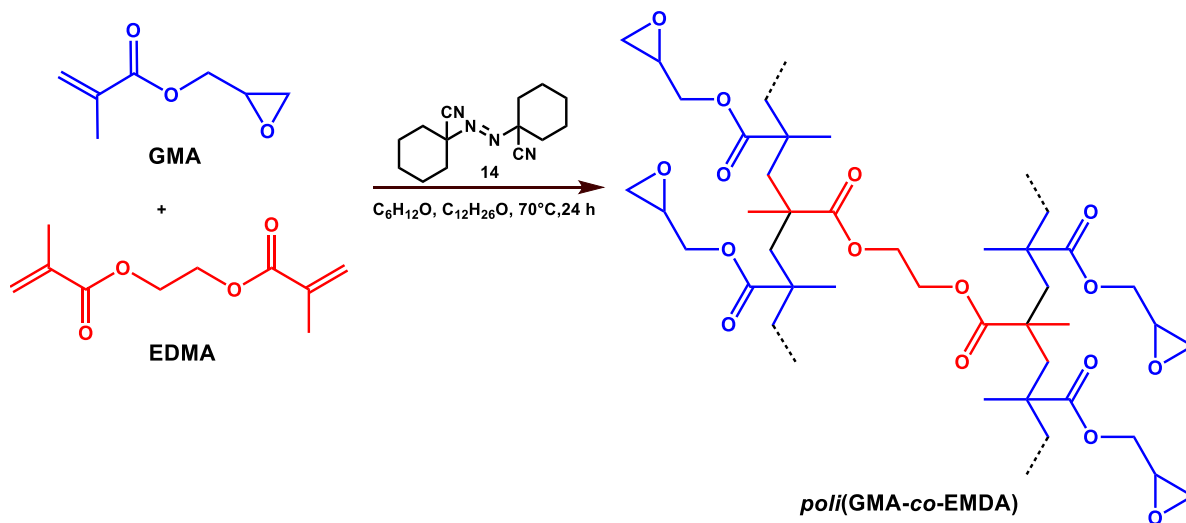
No.	GMA (%m/m)	EDMA (%m/m)	CyOH (%m/m)	DDL (%m/m)	AIBN (%m/m)	Temp. (°C)	Purga	Tiempo (h)
1 <sup>90,117-119</sup>	24	16	31	30		60	N <sub>2</sub> x 15 min	24
2 <sup>120</sup>	18	12	63	7				
3 <sup>120</sup>	20,4	13,6	59,4	6,6		60	N <sub>2</sub> x 10 min	24
4 <sup>120</sup>	22,8	15,2	55,8	6,2	1			
5a <sup>98</sup>						50		
5b <sup>98</sup>	18	12	55,8	11,2		70	N <sub>2</sub> x 5 min	24
6 <sup>121</sup>	24	16	48	12		70	N <sub>2</sub> x 15 min	6

**Figura 4-12.** Fotografías de *poli(GMA-co-EDMA)* preparado con las metodologías de la tabla 4-16



Las mejores condiciones de polimerización fueron las del ensayo número 5b<sup>98</sup> en el cual se empleó 18% m/m de GMA, 12% de EDMA, 58,8% ciclohexanol, 11,2% dodecanol y 1% de iniciador ABCN con respecto a los monómeros. Se purgó con N<sub>2</sub> y se dejó reaccionar la mezcla a 70°C por 24 h (Esquema 4-12). En cuanto a las otras condiciones ensayadas se encontraron varios inconvenientes: (i) largos tiempos de polimerización, > 120 h, (polímero 1, 2, 3, 4). (ii) Materiales de baja estabilidad mecánica (polímeros 1, 2, 3,6). (iii) polimerizaciones incompletas (polímero 5a) y (iv) en los otros 6 materiales la polimerización fue irregular.

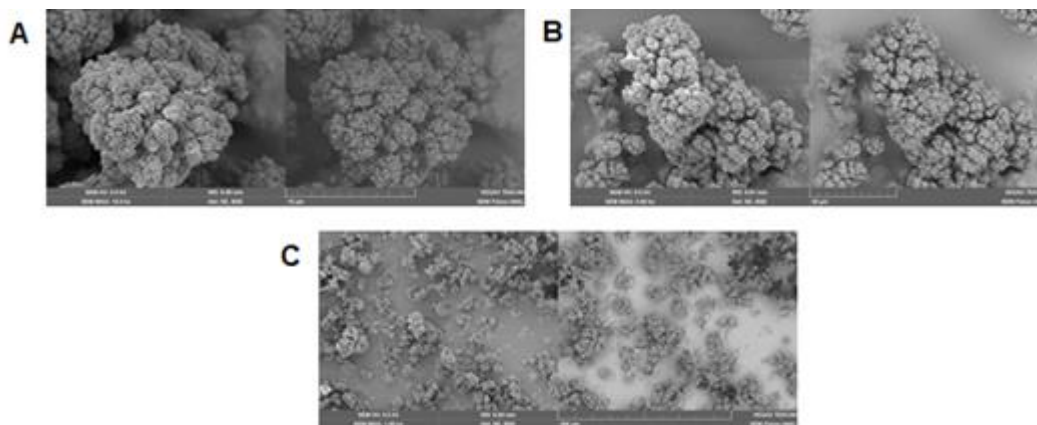
**Esquema 4-12.** Reacción de preparación copolímero *poli(GMA-co-EDMA)*



El copolímero obtenido, por la metodología 5b, se caracterizó mediante IR-ATR y Raman. En el espectro IR-ATR (anexo 14A) se ven las bandas correspondientes a los estiramientos C-H alifáticos 2.924-2.853 cm<sup>-1</sup>, la señal correspondiente al grupo C=O en 1.723 cm<sup>-1</sup>, a la flexión C-O en 1.144 cm<sup>-1</sup> y la señal característica del oxirano en 907cm<sup>-1</sup>. También se

empleó MEB para observar la estructura del polímero *poli*(GMA-co-EDMA) en la figura 4-13 se pueden observar diferentes aumentos: 100, 10 y 5 um, en la microscopía C (100 um) se observan perfectamente los glóbulos en grupos, que finalmente dan la estructura característica a los monolitos, las micrografías A y B permiten distinguir estructuras granulares que dan lugar al espacio intersticial.

**Figura 4-13.** MEB de la estructura de *poli*(GMA-co-EDMA)



MEB A. 5 um, B. 10 um, C. 10

### 4.3.3 Copolímero *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA)

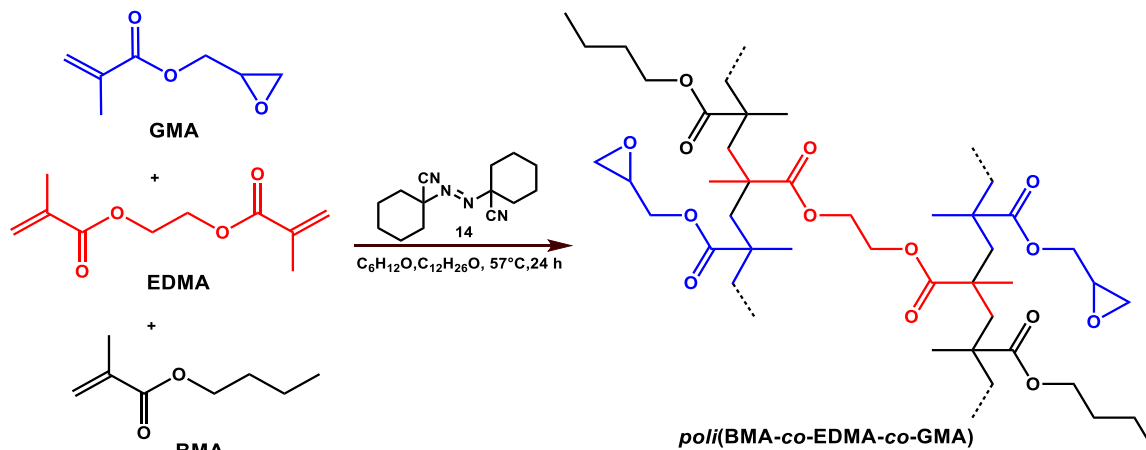
Para la obtención del copolímero *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA), se emplea la metodología planteada por Štrancar (Esquema 4-13).<sup>66</sup> Del 60% de porógenos, 90% corresponde a ciclohexanol y el 10% restante a dodecanol. En cuanto al 40% de monómeros y entrecruzante: 40% corresponde al entrecruzante y 60% a los monómeros. De este 60%, 15% corresponde a BMA y 85% a GMA. Para el iniciador se debe calcular el 1% de la mezcla de monómeros y entrecruzante.

En la caracterización por IR-ATR (anexo 15A) se encuentran las señales características de estos compuestos  $2.994\text{-}2.852\text{ cm}^{-1}$  (C-H),  $1.724\text{ cm}^{-1}$  (C=O),  $1.147\text{ cm}^{-1}$  (C-O),  $906\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C). La microscopía electrónica de barrido (Figura 4-14) muestra también la formación de “cluster” o microglóbulos y la estructura bimodal<sup>122</sup> de este tipo materiales monolíticos, que es producto de la nucleación al momento de la polimerización.<sup>61</sup> Los poros entre los glóbulos, permiten velocidades de flujo altas de fase móvil, mientras que los más pequeños proporcionan área superficial, necesaria para una alta capacidad de enlace del

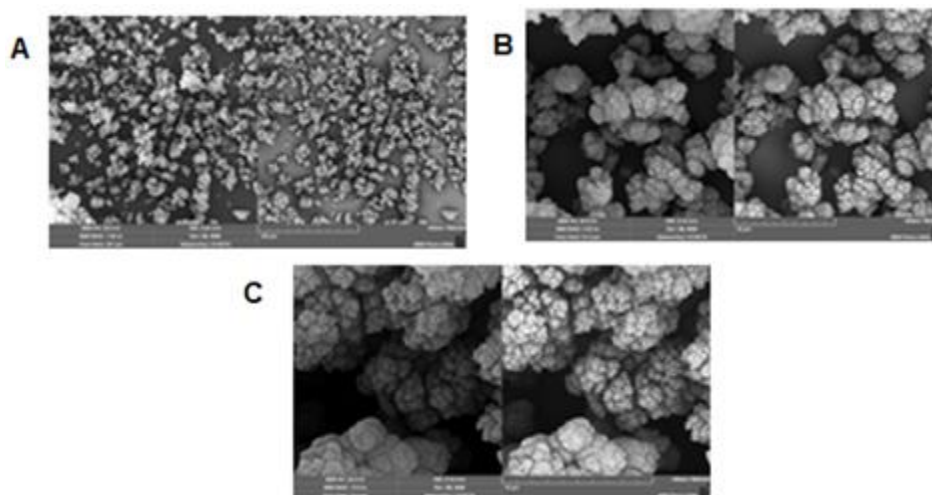


monolito. Si se observa el crecimiento granular de cada uno de los copolímeros preparados, se puede ver que el más homogéneo es *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA).

**Esquema 4-13.** Reacción de preparación copolímero *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA)



**Figura 4-14.** MEB de la estructura de *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA)

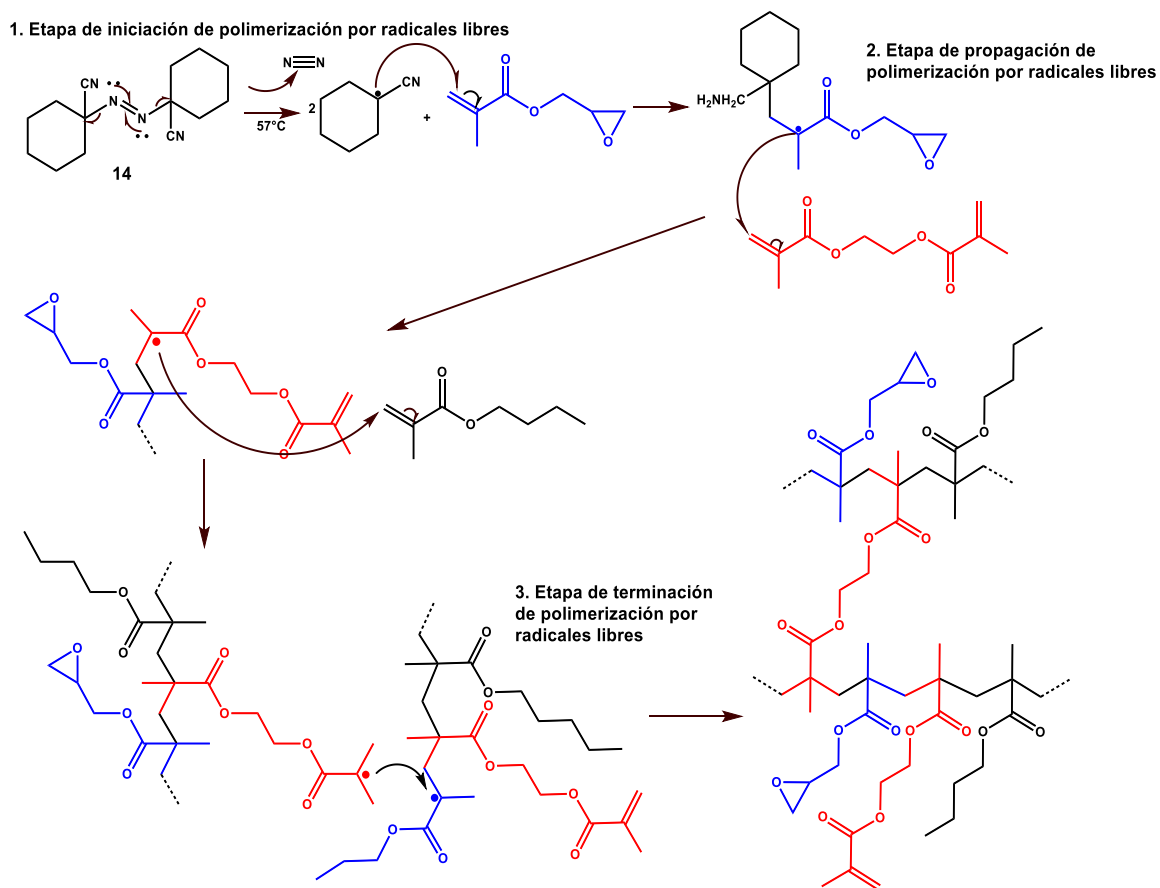


MEB A. 50 μm, B. 10 μm, C. 5 μm

La polimerización de los tres copolímeros procede por radicales libres (Esquema 4-14), el iniciador, en este caso 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (ABCN), se escinde, cuando el par de electrones del enlace -N=N- se rompe, produciendo dos fragmentos de iniciador, cada una con un electrón desapareado, el cual ataca al doble enlace vinílico, formándose un nuevo radical. Este nuevo radical reacciona con otro doble enlace de alguno de los monómeros o entrecruzante de la mezcla de polimerización, este proceso se repite varias

veces. Los radicales son inestables y encuentran la manera de acoplarse sin generar un nuevo radical, esto puede ocurrir mediante acoplamiento <sup>123,124</sup> y es la reacción entre dos cadenas en crecimiento. Los dos electrones desapareados formaran un nuevo enlace finalizando la polimerización (Esquema 4-14).

#### Esquema 4-14. Mecanismo de polimerización por radicales libres



En esta etapa 3 de la investigación se logró preparar tres copolímeros: *poli*(MMA-co-EDMA-co-GMA), *poli*(GMA-co-EDMA) y *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA), caracterizándolos mediante IR-ATR y MEB.

## 4.4 Modificación de la superficie de materiales monolíticos mediante “*Grafting*” (Etapa 4)

Después de obtenidos los copolímeros se procedió a realizar la modificación de sus superficies mediante la técnica conocida como “*grafting*”,<sup>87</sup> en esta técnica se modifica un copolímero ya estandarizado con el fin de ampliar sus aplicaciones en técnicas de separación por HPLC. El método empleado se conoce como epoxi, y consiste en propiciar la apertura anular del epóxido que contiene los copolímeros derivados de GMA, seguido de un ataque con un agente nucleofílico como hidroxilo o ácido carboxílico, con el primero se generaría un éter mientras con el segundo ocurriría una esterificación. La modificación con -OH y COOH de superficies poliméricas derivadas de GMA mediante “*grafting*”-método epoxi se aborda por primera vez en esta investigación.

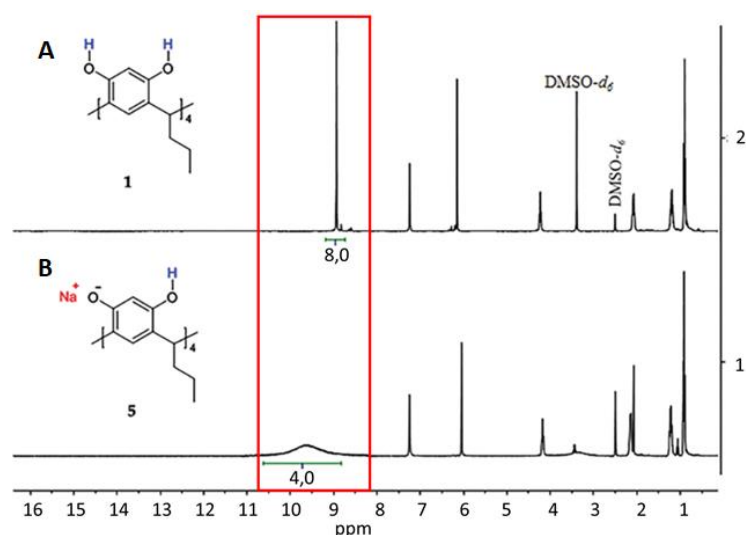
### 4.4.1 Modificación de la superficie de materiales monolíticos con grupos hidroxilo

Se realizó inicialmente la modificación del copolímero *poli*(MMA-*co*-EDMA-*co*-GMA) con los grupos hidroxilo de **1A** y **1B**. La metodología de modificación se adapta del procedimiento propuesto por Dan y colaboradores.<sup>99</sup> Se hace reaccionar el resorcinareno (**1A** o **1B**) con el copolímero *poli*(MMA-*co*-EDMA-*co*-GMA) triturado en DMF y NaOH, pero la reacción no procede, los resorcinarenos alifáticos no reaccionan con el grupo oxirano bajo estas condiciones. Esto se debe a que en disoluciones básicas el grupo oxirano se hidroliza permitiendo la apertura del anillo, pero los grupos hidroxilo de los resorcinarenos forman los fenolatos de sodio correspondiente, impidiendo la sustitución nucleofílica. Esto es evidencia que los resorcinarenos **1A** y **1B** presentan baja reactividad debido a la formación del fenolato en medio básico, que presenta gran afinidad por la formación de puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura del macrociclo, disminuyendo su reactividad con los grupos oxirano del copolímero. De la reacción de modificación de la superficie monolítica con **1A** se recuperó el fenolato **5A**. Este fue caracterizado mediante técnicas espectroscópicas.

En el espectro IR se observa la banda en  $3.319\text{ cm}^{-1}$  para el estiramiento O-H, en  $1.210\text{ cm}^{-1}$  la flexión característica para C-O, en  $1.609\text{ cm}^{-1}$  (C-H aromático) y  $2.929\text{ cm}^{-1}$  (C-H alifático), en cuanto al espectro RMN-<sup>1</sup>H se observa un triplete para 12 protones en 0,91

ppm, en 1,22 ppm un multiplete para 8 protones característico para CH<sub>2</sub>, en 2,15 ppm un cuadruplete integrando para los otro 8 protones alifáticos (CH<sub>2</sub>), en 4,18 se resuelve el triplete del puente metileno integrando para 4 protones, a campo bajo (6,05 ppm) un singlete integrando para 4 protones correspondiente a los protones *orto* al OH y en 7,25 ppm otro singlete para los 4 protones *meta* al OH, y en 9,56 ppm un singlete para 4 protones de los grupo OH. En el espectro RMN-<sup>13</sup>C se encontraron las siguientes señales ( $\delta$  ppm): 13,9 (CH<sub>3</sub>), 20,8 (CH<sub>2</sub>), 32,6 (CH<sub>2</sub>), 34,9 (CH), 102,8, 124,0, 132,4, 152,3 (C aromáticos).<sup>12</sup> En la figura 4-15 se observa una comparación de los espectros RMN-<sup>1</sup>H de **1A** con el espectro **5A**, se observa que la integral de los hidroxilos en **5A** disminuye a la mitad y se puede confirmar que no hay reacción entre **1A** y el copolímero debido a la formación del fenolato.

**Figura 4-15.** Comparación RMN-<sup>1</sup>H de **1A** y **5A**



Comparación RMN-<sup>1</sup>H A. **1A** y B. **5A**.

De esta parte del trabajo de investigación se logró concluir que para modificar los materiales monolíticos con resorcinarenos era necesario modificar los resorcinarenos en el borde superior. Los resultados expuestos anteriormente fueron publicados en la revista *Journal of the Brazilian Chemical Society*, “*Surface Modification of Poly(GMA-co-EDMA-co-MMA) with Resorcarenos*”. Adicionalmente, esta fase de la investigación permitió descartar el uso de *poli(MMA-co-EDMA-co-GMA)*, puesto que mostró muy baja estabilidad mecánica, lo cual implica dificultades al momento de emplearla como fase estacionaria en

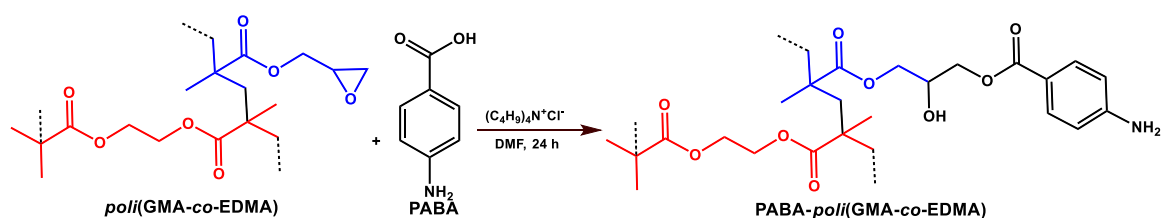
HPLC, pues no podría resistir flujo de solventes o uso repetitivo en análisis cromatográficos.

#### 4.4.2 Modificación de la superficie de materiales monolíticos con ácido *p*-aminobenzoico, como modelo de grafting

Como no ocurrió la reacción nucleofílica entre el oxirano y los grupos hidroxilos de los resorcinarenos **1A** y **1B**, se planteó la reacción con grupos carboxílicos, ya que son buenos nucleófilos como carboxilatos, posibilitando la modificación de los copolímeros y como se mencionó anteriormente son nucleófilos que no han sido empleados en la metodología “*grafting*”-método epoxi para la modificación de la superficie de copolímeros derivados de GMA, lo cual implica un gran reto sintético e infinidad de posibles aplicaciones en el desarrollo de fases estacionarias para HPLC.

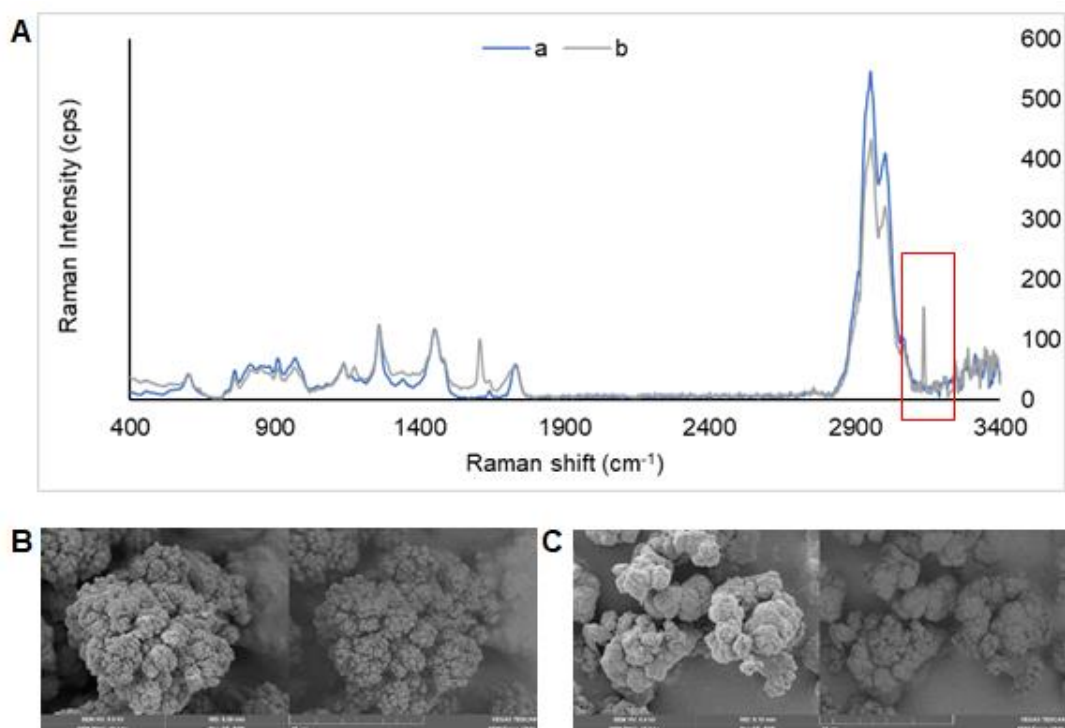
En primer lugar, como modelo de “*grafting*”, para estandarizar las condiciones de la reacción del copolímero *poli*(GMA-*co*-EDMA) con el grupo funcional ácido carboxílico y con el fin de determinar si era posible propiciar la apertura del anillo de oxirano seguido por la esterificación (Esquema 4-15), se seleccionó el ácido *p*-aminobenzoico (PABA), como modelo. En este sentido se siguió el procedimiento descrito en la metodología, el cual consistió en preparar una disolución del ácido carboxílico en DMF, a la cual se adicionó gota a gota cloruro de tetrabutilamonio. Luego, esta mezcla se adicionó a una suspensión del material monolítico en DMF, y se dejó reaccionar en atmósfera inerte durante 24 h con agitación constante a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de reacción el material monolítico se filtró y se lavó repetidamente con DMF y finalmente con EtOH. El sólido resultante se secó a presión reducida y se caracterizó mediante IR-ATR (anexo 16A), Raman y MEB (anexo 16B).

**Esquema 4-15.** Modificación de superficie de *poli*(GMA-*co*-EDMA) con PABA



En el espectro IR-ATR, se observa una señal en  $3.612\text{ cm}^{-1}$ , que se atribuye a  $\text{NH}_2$ , en  $3.005\text{ cm}^{-1}$  el estiramiento C-H aromático, en  $2.952\text{ cm}^{-1}$  la banda correspondiente a los estiramientos C-H alifáticos. En  $1.723\text{ cm}^{-1}$ , la señal correspondiente al grupo carbonilo. En  $1.605\text{ cm}^{-1}$  y  $1.145\text{ cm}^{-1}$ , la señal correspondiente a la flexión C=C aromático y C-O, respectivamente, que confirman la modificación del copolímero *poli*(GMA-co-EDMA). En la figura 4-16-A se observa la comparación entre el espectro Raman de *poli*(GMA-co-EDMA) y PABA-*poli*(GMA-co-EDMA) y se observa una señal en  $3.137\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al sistema aromático del PABA, confirmando la funcionalización. En la figura 4-16-B se observa la MEB de *poli*(GMA-co-EDMA) y en la figura 4-16-C se encuentra la MEB de PABA-*poli*(GMA-co-EDMA), esta comparación permite confirmar que el copolímero mantiene su estructura granular después de la funcionalización.

**Figura 4-16.** Comparación Raman y MEB funcionalización de *poli*(GMA-co-EDMA) con PABA

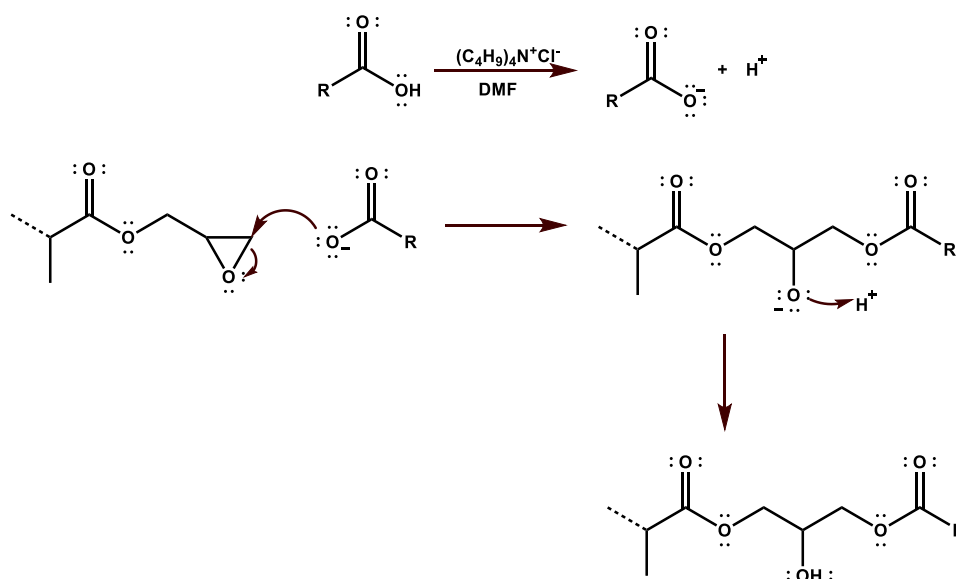


A. Raman a. *poli*(GMA-co-EDMA) y b. PABA-*poli*(GMA-co-EDMA); B MEB de *poli*(GMA-co-EDMA) (10  $\mu\text{m}$ ) y C. MEB de PABA-*poli*(GMA-co-EDMA) (10  $\mu\text{m}$ )

La modificación del copolímero *poli*(GMA-co-EDMA) con PABA fue exitoso, lo cual indica que la apertura del grupo oxirano seguido del ataque nucleofílico con un ion carboxilato es posible y conlleva a la obtención del éster esperado. El mecanismo de reacción que se

propone para la reacción de esterificación se encuentra en el esquema 4-16. El grupo carboxilo, en forma de ion carboxilato se estabiliza en el medio polar aprótico de la reacción y la sal de amonio, convirtiendolo en un nucleofilo fuerte que ataca el carbono menos sustituido del oxirano, formando el ión hidroxilo que se protona generando el alcohol característico de la apertura del oxirano y finalmente formando el éster que permite el anclaje químico al copolímero.

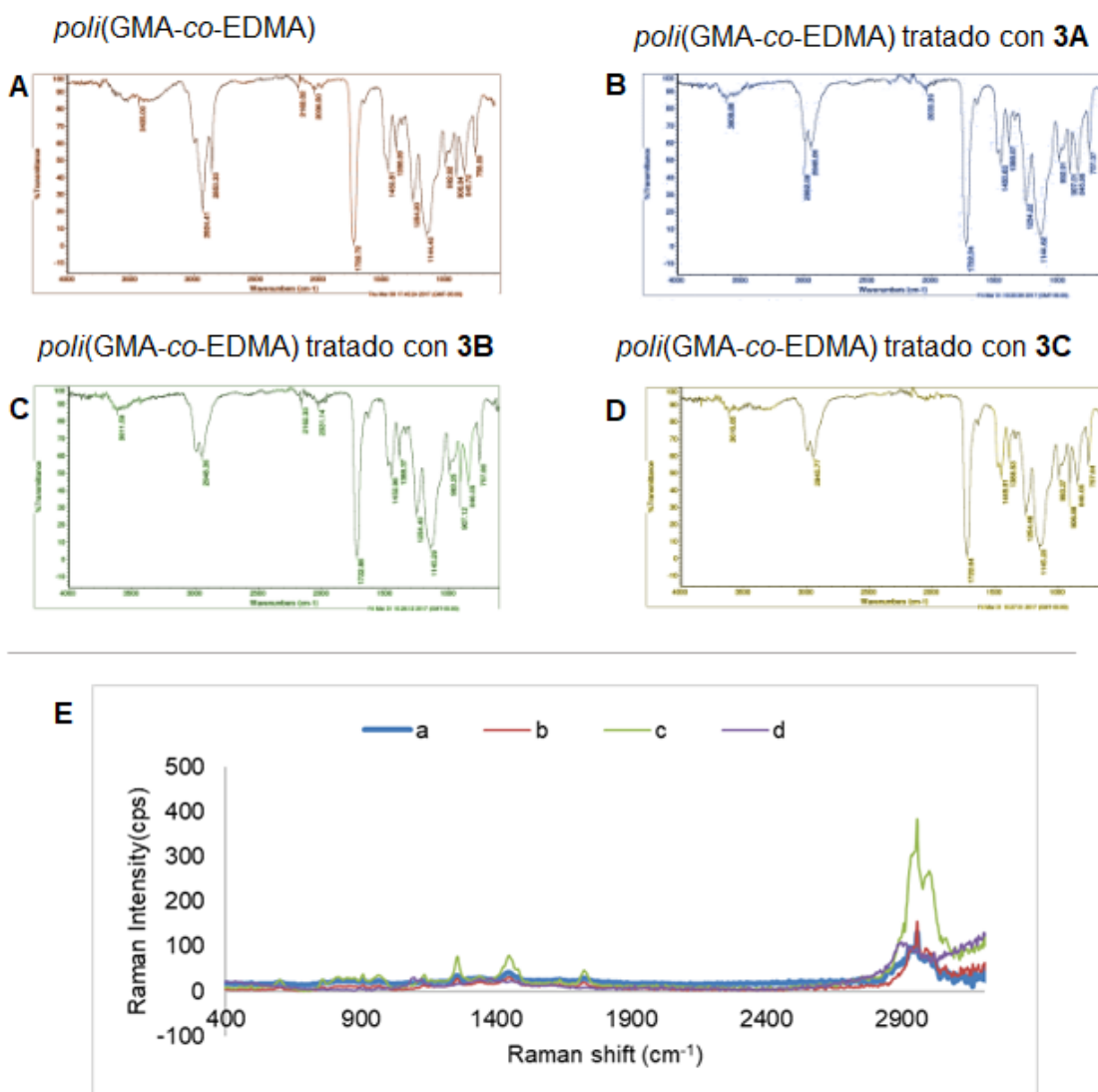
**Esquema 4-16.** Mecanismo de reacción de ácidos carboxílicos con grupo oxirano



#### 4.4.3 Modificación de la superficie de materiales monolíticos con resorcinarenos diazotados

Considerando que la modificación del material monolítico derivado de GMA con PABA fue exitosa, se procedió a realizar la funcionalización de los copolímeros *poli*(GMA-co-EDMA) y *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) con los resorcinarenos diazotados, siguiendo el mismo procedimiento que el empleado con PABA. En el espectro IR-ATR de todos los copolímeros tratados con los resorcinarenos diazotados se ve el mismo perfil espectroscopio IR-ATR que en el copolímero de partida. En los espectros Raman se confirma que no hay modificación de la superficie del copolímero *poli*(GMA-co-EDMA) ni del copolímero *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA). En ninguno de los espectros se observa alguna señal característica de un sistema macrocíclico tipo resorcinareno (Figura 4-17 para *poli*(GMA-co-EDMA) y Figura 4-18 para *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA)).

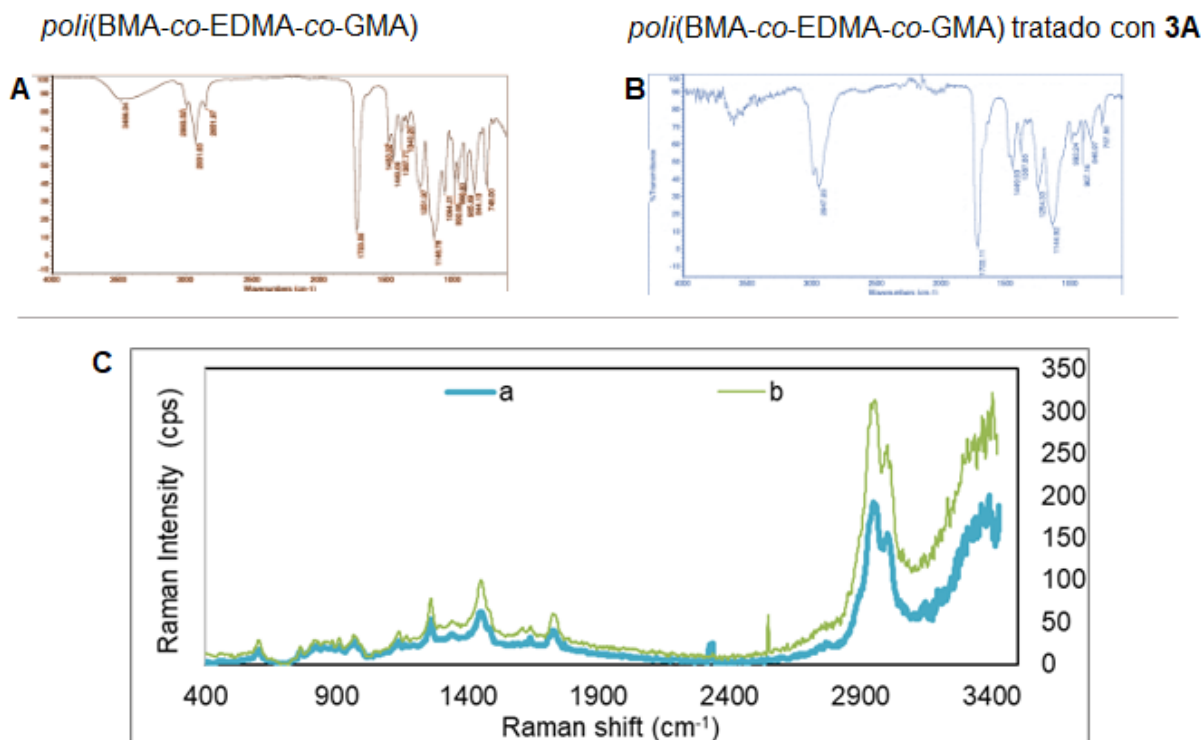
**Figura 4-17.** Comparación IR-ATR y Raman de *poli(GMA-co-EDMA)* tratado con resorcinarenos diazotados



IR-ATR A. *poli(GMA-co-EDMA)* sin modificar, B. *poli(GMA-co-EDMA)* tratado con **3A**, C. *poli(GMA-co-EDMA)* tratado con **3B**, D *poli(GMA-co-EDMA)* tratado con **3C**. E. Raman a. *poli(GMA-co-EDMA)* sin modificar, b. *poli(GMA-co-EDMA)* tratado con **3A**, c. *poli(GMA-co-EDMA)* tratado con **3B** y d. *poli(GMA-co-EDMA)* tratado con **3C**



**Figura 4-18.** Comparación Raman de *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) tratado con **3A**



IR-ATR A. *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) sin funcionalizar y B. *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) tratado con **3A**  
Raman a. *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) y b. *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) tratado con **3<sup>a</sup>**

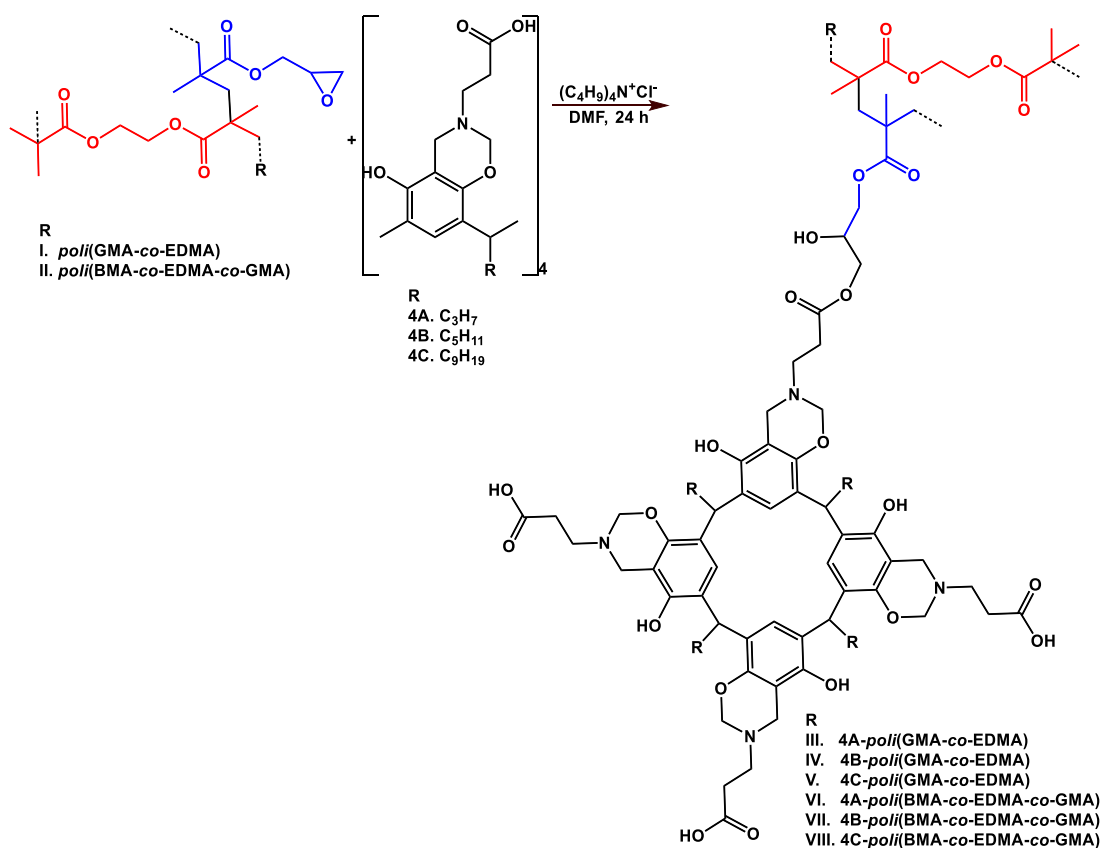
En el tratamiento de ambos copolímeros es evidente que no se presenta anclaje químico con resorcinarenos diazotados, a pesar de que los resorcinarenos **3A**, **3B** y **3C** presentan en su estructura un grupo carboxilo lábil a generar un carboxilato, que en teoría debería propiciar la esterificación con el oxirano de los copolímeros, sin embargo, el sistema puede verse estabilizado por resonancia o debido al impedimento estérico no puede llevarse a cabo la reacción de esterificación entre el epóxido y el carboxilato de los resorcinarenos diazotados.

#### 4.4.4 Modificación de la superficie de materiales monolíticos con benzoxazinas de resorcinarenos

Viendo que la funcionalización con resorcinarenos diazotados no fue exitosa se procedió a realizar la reacción de modificación entre los copolímeros *poli*(GMA-co-EDMA) y *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) y las benzoxazinas de resorcinarenos (Esquema 4-17), pues estos macrociclos también contienen el grupo carboxilo de interés para la reacción

nucleofílica con el grupo oxirano, pero unidos a una cadena alifática de dos carbonos y luego unido a la benzoxazina del resorcinareno, de esta manera se podía observar si había influencia del tipo de ácido carboxílico en la modificación de la superficie del copolímero. El procedimiento de modificación es el mismo realizado con los resorcinarenos diazotados.

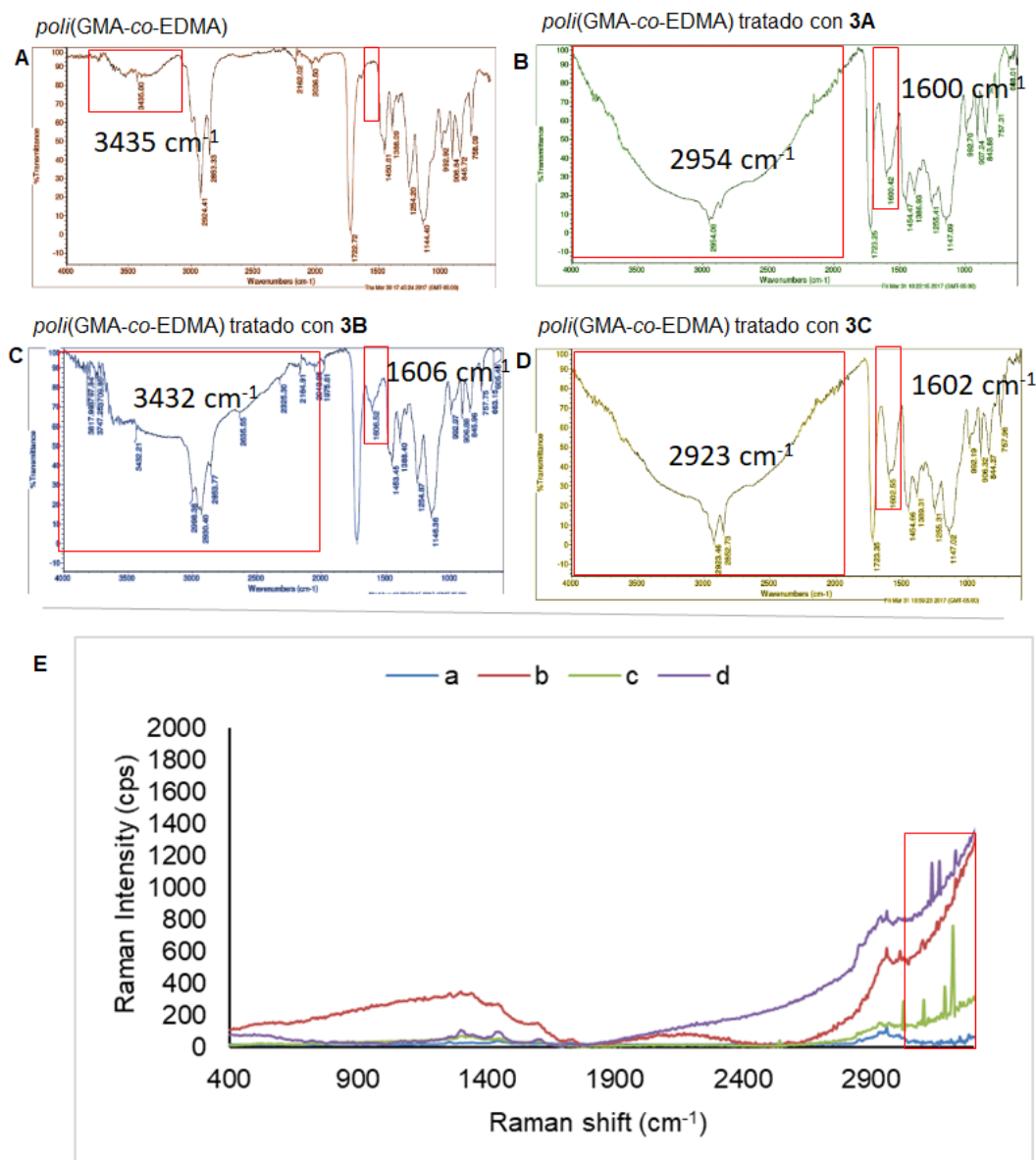
**Esquema 4-17.** Modificación de superficie de *poli(GMA-co-EDMA)* y *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)* con **4A**, **4B** y **4C**



Se obtuvieron seis copolímeros modificados: **4A-*poli(GMA-co-EDMA)***, **4B-*poli(GMA-co-EDMA)***, **4C-*poli(GMA-co-EDMA)***, **4A-*poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)***, **4B-*poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*** y **4C-*poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)***. Los copolímeros modificados se caracterizaron mediante IR-ATR, Raman, análisis elemental y MEB. En los espectros IR-ATR de los copolímeros modificados se observa la banda correspondiente al estiramiento OH de los grupos hidroxilo del borde superior de los resorcinarenos, así como la banda asignada al estiramiento C-H aromático del sistema macrocíclico y en los seis copolímeros modificados, se encuentra la señal de la flexión C=C aromático que nos confirmarían que

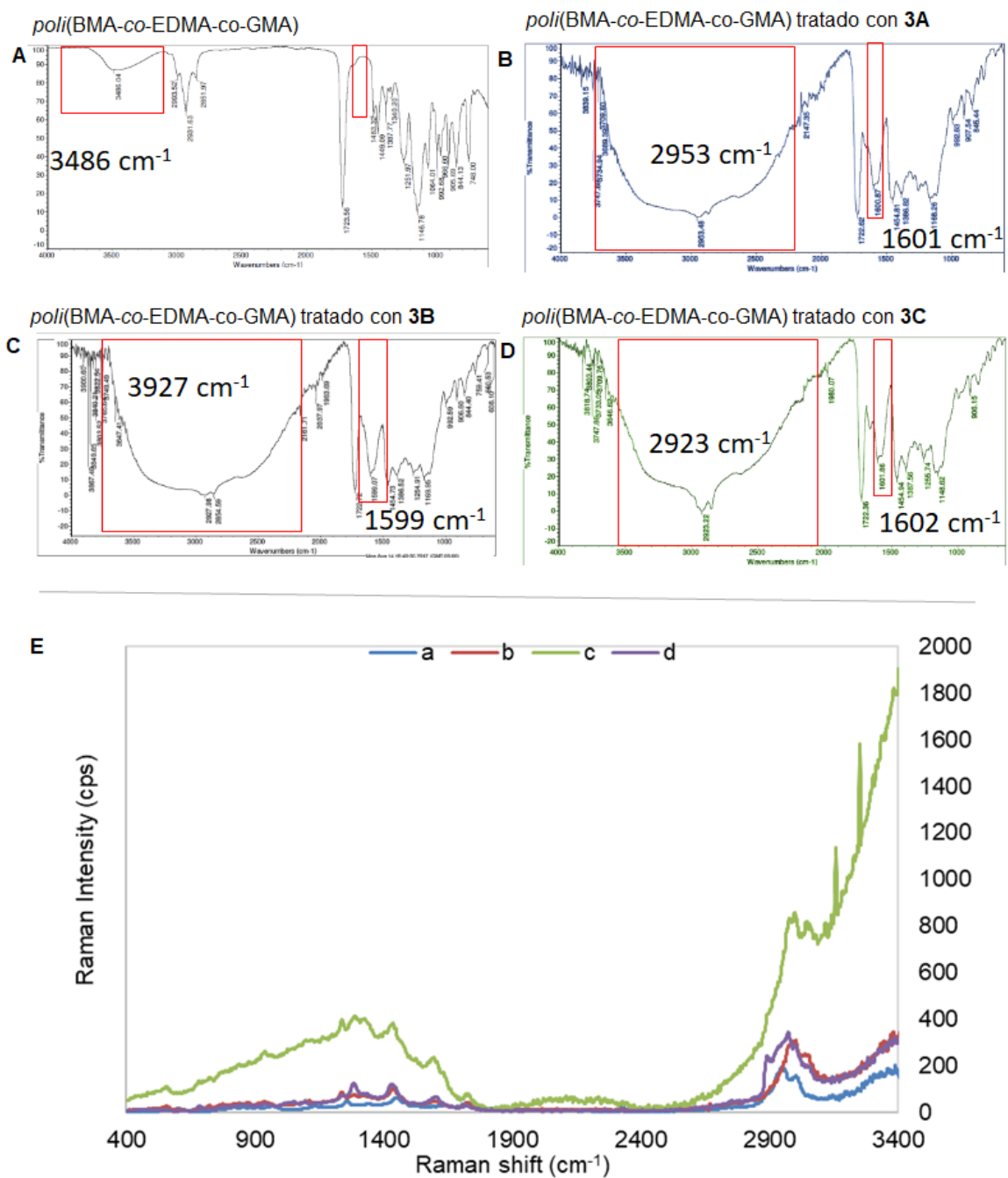
la modificación de la superficie de *poli*(GMA-co-EDMA) y *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) fue exitosa (anexos 17A, 18A, 19A, 20A, 21A, 22A). En los espectros Raman (Figura 4-19 y Figura 4-20) se observan señales correspondientes a los sistemas aromáticos que indicarían la presencia de resorcinarenos (Figura 4-19 para *poli*(GMA-co-EDMA) y Figura 4-20 para *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA))

**Figura 4-19.** Comparación IR-ATR y Raman de *poli*(GMA-co-EDMA) funcionalizado con **4A**, **4B** y **4C**



IR-ATR A. *poli*(GMA-co-EDMA) sin modificar, B. **4A**-*poli*(GMA-co-EDMA), C. **4B**-*poli*(GMA-co-EDMA) y D. **4C**-*poli*(GMA-co-EDMA). E. Raman a. *poli*(GMA-co-EDMA) sin modificar, b. **4A**-*poli*(GMA-co-EDMA), c. **4B**-*poli*(GMA-co-EDMA) y d. **4C**-*poli*(GMA-co-EDMA)

**Figura 4-20.** Comparación IR-ATR y Raman de copolímero *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)* funcionalizado con **4A**, **4B** y **4C**



IR-ATR A. *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*, B. **4A**-*poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*, C. **4B**-*poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)* y D. **4C**- *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*. E. Raman a. *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)* sin modificar, b. **4A**-*poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*, c. **4B**- *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)* y d. **4C**- *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*

En los análisis elementales se observa la presencia de nitrógeno en las muestras de copolímeros funcionalizados, lo cual nos confirmaría la presencia del anillo benzoxazínico de los macrociclos (anexo 17B, 18B, 19B, 20B, 21B, 22B). En la tabla 4-9 se puede ver los porcentajes de C, H y N en cada copolímero sin modificar y cada copolímero modificado con los compuestos **4A**, **4B** y **4C**. El contenido de nitrógeno en los copolímeros sin modificar (*poli*(GMA-*co*-EDMA) y *poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA)) es cero, pero en los copolímeros modificados se encontró contenido de nitrógeno, lo cual confirmaría la presencia de la benzoxazina de resorcinareno

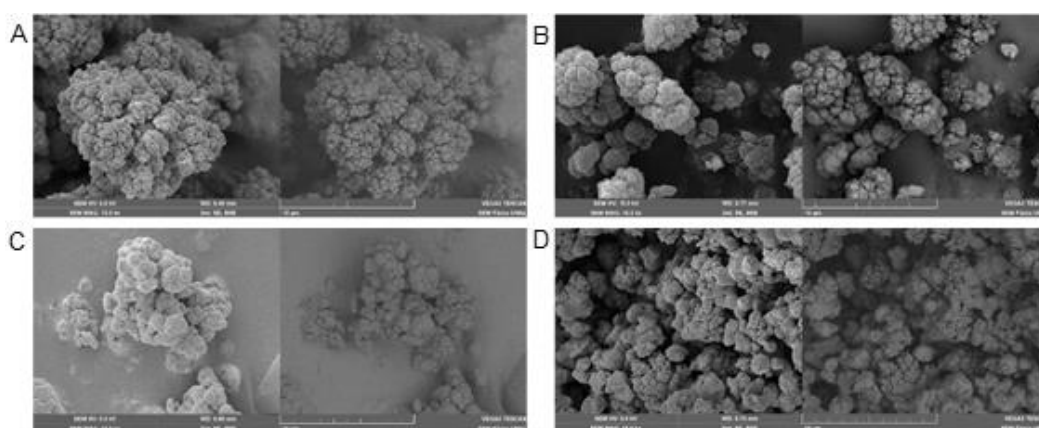
**Tabla 4-9.** Análisis elemental de copolímeros funcionalizados con **4A**, **4B** y **4C**

Copolímeros	C	H	N	mol R/g polímero
<i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)	62,42	7,86	-	-
<b>4A</b> - <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)	58,96	6,88	0,62	1,E-04
<b>4B</b> - <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)	60,28	7,06	0,84	2,E-04
<b>4C</b> - <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)	61,78	7,63	1,33	2,E-04
<i>poli</i> (BMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA)	59,69	7,09	-	-
<b>4A</b> - <i>poli</i> (BMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA)	54,49	6,42	1,79	3,E-04
<b>4B</b> - <i>poli</i> (BMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA)	59,82	6,94	2,22	4,E-04
<b>4C</b> - <i>poli</i> (BMA- <i>co</i> -EDMA- <i>co</i> -GMA)	63,41	7,91	2,37	4,E-04

En los copolímeros **4A**-*poli*(GMA-*co*-EDMA), **4B**-*poli*(GMA-*co*-EDMA) y **4C**-*poli*(GMA-*co*-EDMA), el contenido de N es 0,62%, 0,84% y 1,33%, respectivamente y en los copolímeros **4A**-*poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA), **4B**-*poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA) y **4C**-*poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA) el contenido de N es 1,79%, 2,22% y 2,37%, respectivamente. Como puede observarse a medida que aumenta la longitud de la cadena alifática del macrociclo con el cual se modificó el copolímero, es mayor el anclaje. Esto puede deberse a que en los resorcinarenos con mayor cadena alifática se estabiliza mejor el conformero cono, disminuyendo el dinamismo en la estructura y por ende los grupos carboxilato quedan mejor ubicados para reaccionar con el grupo oxirano. En cuanto al copolímero *poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA), el anclaje de los compuestos **4A**, **4B** y **4C** es mayor que en el copolímero *poli*(GMA-*co*-EDMA), posiblemente la presencia del monómero BMA en la estructura de *poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA) permite que haya mayor espaciamiento para que los macrociclos puedan reaccionar con los grupos oxirano.

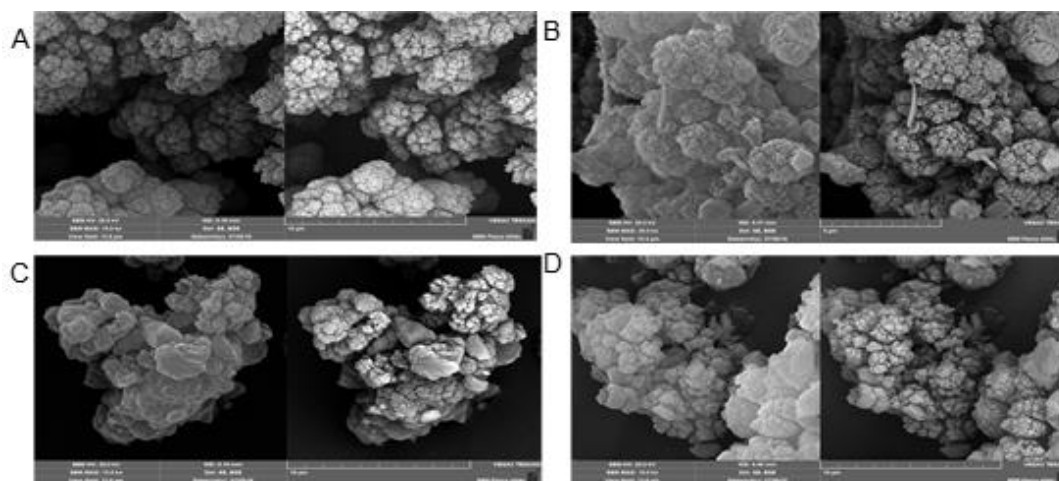
Ahora bien, recordemos que los compuestos diazotados no reaccionaron con el grupo oxirano mientras que las benzoxazinas si lo hicieron. Sin lugar a duda, la estructura alifática derivada de  $\beta$ -alanina que acompaña a las benzoxazinas facilita la disposición de los grupos carboxilo para la reacción con el oxirano, disminuyendo el impedimento estérico, además la estabilización por resonancia en las benzoxazinas es menor que en los resorcinarenos diazotados. En las MEB (Figura 4-21 y Figura 4-22), se conserva la estructura granular del copolímero de partida.

**Figura 4-21.** Comparación MEB de *poli*(GMA-co-EDMA) funcionalizado con **4A**, **4B** y **4C**



MEB 5 µm: A. *poli*(GMA-co-EDMA) sin modificar, B. **4A**-*poli*(GMA-co-EDMA), C. **4B**-*poli*(GMA-co-EDMA) y D. **4C**-*poli*(GMA-co-EDMA)

**Figura 4-22.** Comparación MEB de *poli*(GMA-co-EDMA) funcionalizado con **4A**, **4B** y **4C**



MEB 5 µm: A. *poli*(GMA-co-EDMA) sin modificar, B. **4A**-*poli*(GMA-co-EDMA), C. **4B**-*poli*(GMA-co-EDMA) y D. **4C**-*poli*(GMA-co-EDMA)

De esta parte de la investigación se logró demostrar que los copolímeros no reaccionan con **1A** y **1B**, debido a la formación de fenolatos que imposibilita la eterificación del grupo oxirano. Y tampoco reaccionan con **3A**, **3B**, y **3C**, debido al impedimento estérico de los sustituyentes voluminosos de los resorcinarenos y la estabilización por resonancia que genera el grupo azo y los sistemas aromáticos. Por otro lado, se logró modificar la superficie de dos copolímeros (*poli(GMA-co-EDMA)* y *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*) con las benzoxazinas de resorcinarenos (**4A**, **4B** y **4C**), obteniendo los siguientes copolímeros modificados: **4A-poli(GMA-co-EDMA)**, **4B-poli(GMA-co-EDMA)**, **4C-poli(GMA-co-EDMA)**, **4A-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)**, **4B-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)** y **4C-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)**. Estos resultados son un gran logro en la modificación de superficies monolíticas derivadas de GMA, ya que nos permitieron demostrar, por primera vez, que es posible anclar químicamente macrociclos voluminosos tipo resorcinareno que contienen grupos carboxilo a materiales monolíticos derivados de GMA empleando, también por primera vez, el método “*grafting*”-epoxi.

## 4.5 Síntesis de péptidos

Los péptidos usados para evaluar la interacción con el material monolítico fueron seleccionados, teniendo en cuenta su carácter ácido, básico y neutro, así como el índice de hidropatía (GRAVY). Las características de los péptidos se especifican en la tabla 4-10. Los datos fueron calculados empleando el programa “*Peptide Synthesis and Proteotypic Peptide Analyzing*”.<sup>125</sup> Las secuencias de cada péptido se especifican en la tabla 4-10.

**Tabla 4-10.** Características de péptidos

Secuencia	Punto isoeléctrico	Hidrofobicidad	GRAVY
AcEYSFEFSYNH <sub>2</sub>	3,1	28	-0,70
KAEAEAKA	7,1	3	-0,95
RYRRKKK	12,2	3,7	-3,79

AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>

KAEAEAKA

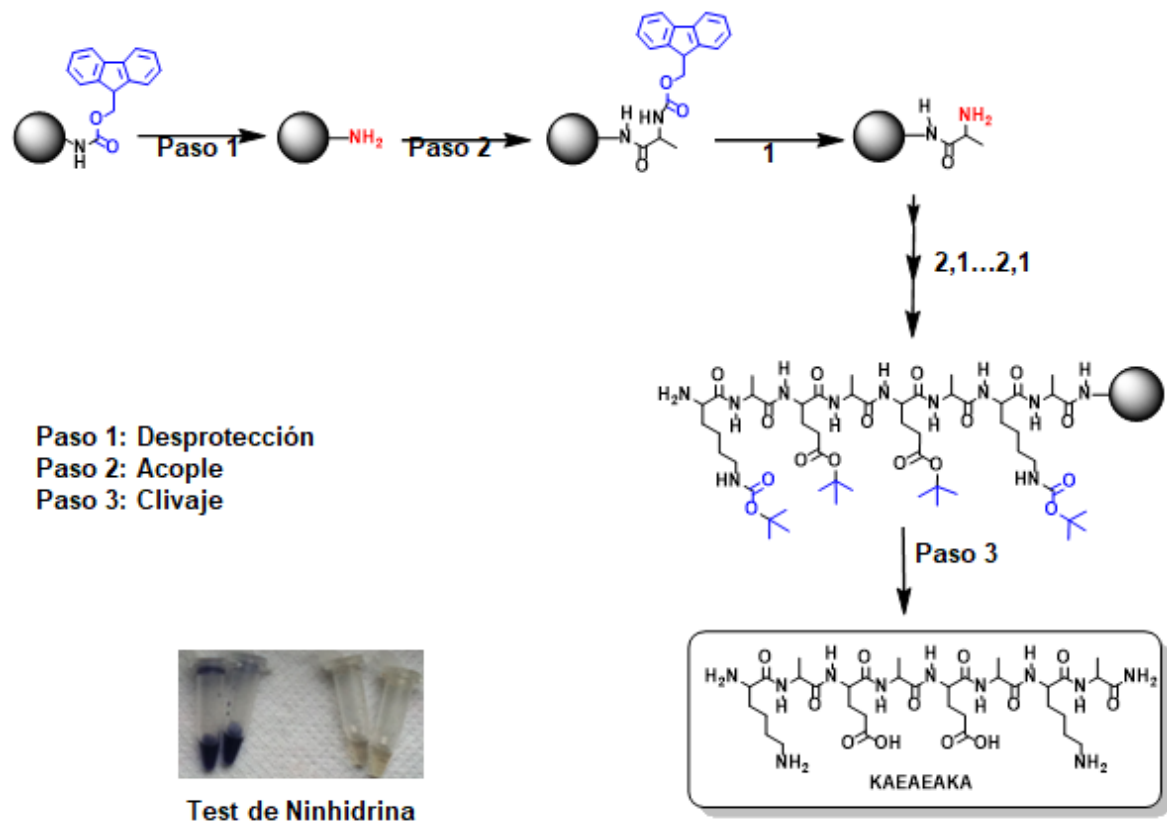
RYRRKKK

Los péptidos se sintetizaron empleando la metodología diseñada por el grupo de investigación Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP), anexo se encuentra el mecanismo de reacción (Anexo 26).<sup>100</sup> La metodología SPPS-Fmoc/tBu consta de



reacciones de desprotección, acople y monitoreo que se lleva a cabo varias veces hasta sintetizar la secuencia deseada. Inicialmente, se somete la resina (Rink amida-soporte sólido) a un proceso de hinchamiento con N,N-dimetilformaamida (DMF) y diclorometano (DCM). El proceso de síntesis consta de tres pasos: 1. La desprotección: que consiste en la reacción de remoción del grupo Fmoc, 2. Acople: correspondiente a la reacción de formación del enlace peptídico entre los aminoácidos que harán parte de la secuencia y 3. Desprotección y clivaje: que consiste en remover los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y separar el péptido de la resina. Cabe resaltar que todos los péptidos tienen terminación amida (C-terminal) (Esquema 4-18).

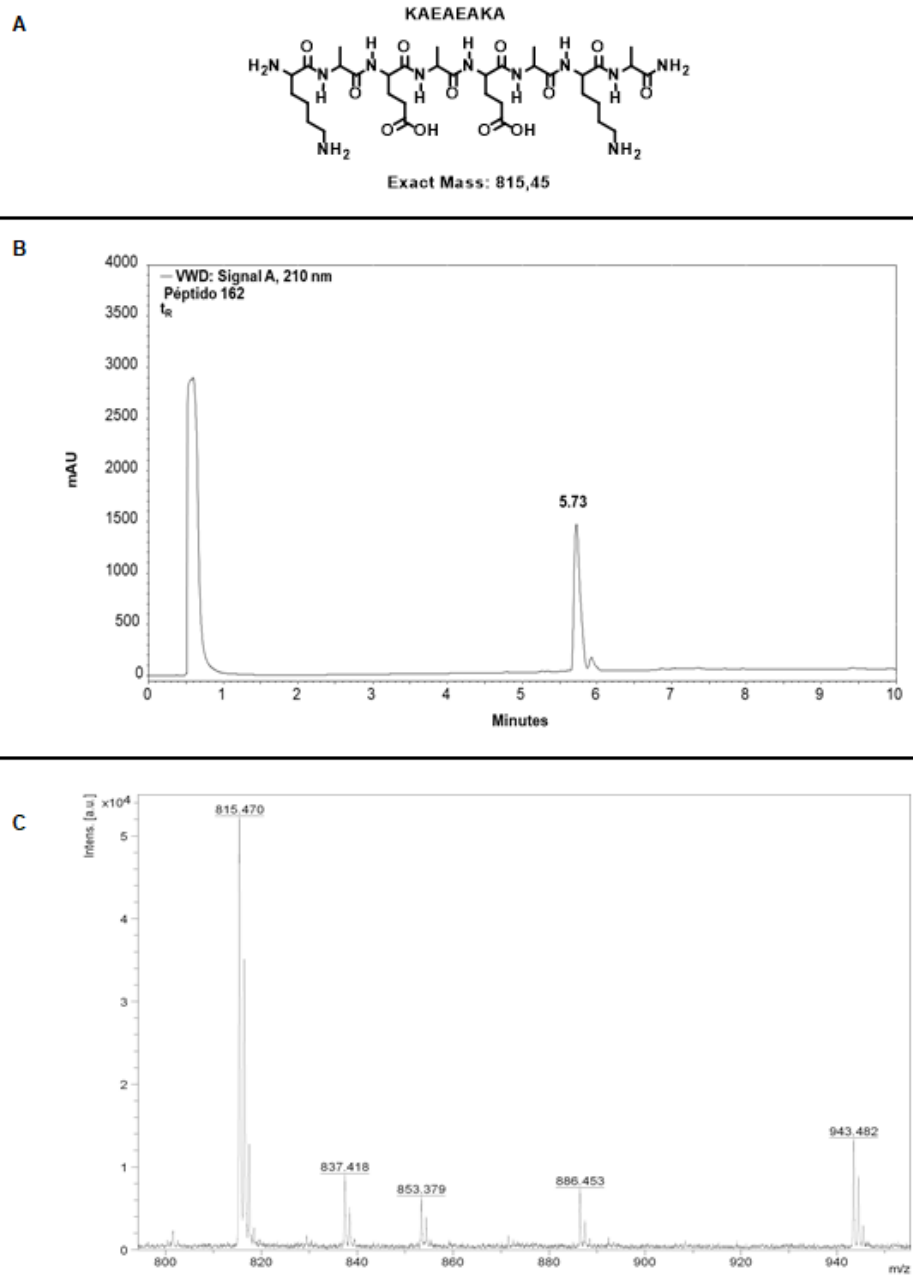
**Esquema 4-18.** Esquema general de síntesis de péptidos



Los péptidos sintetizados fueron caracterizados por RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF, y en los tres casos se obtuvo la molécula deseada. Los péptidos fueron sintetizados teniendo en cuenta que se requería tener un péptido de carácter ácido (AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>), uno neutro (KAEAEAKA) y uno básico (RYRRKKK) para determinar

su interacción con los materiales monolíticos modificados. En cuanto a la caracterización, se describe a modo de ejemplo la caracterización de KAEAEAKA (Anexos 23, 24 y 25) (Figura 4-23-A). En el perfil cromatográfico se presenta una especie mayoritaria en  $t_R = 5,73$  min (Figura 4-23-B) y en el espectro de masas se encontró una señal en  $m/z = 815,4$  uma, la masa monoisotópica calculada corresponde a 815,45 uma (Figura 4-23-C)

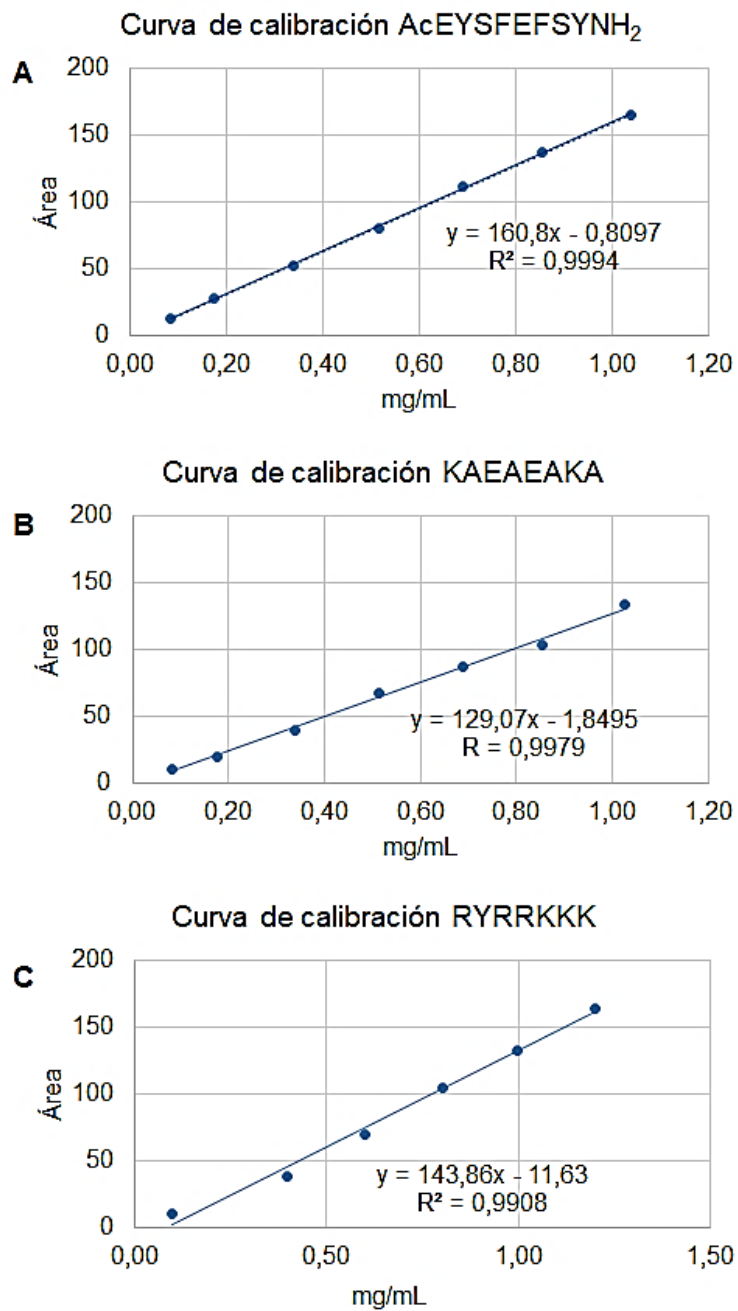
**Figura 4-23.** Caracterización de péptido KAEAEAKA



Los péptidos KAEAEAKA y RYRRKKK contiene lisina, razón por la cual su síntesis fue más demorada porque se debía repetir el acople del aminoácido lisina, sin embargo, el rendimiento de KAEAEAKA y AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub> fueron buenos en comparación con el péptido RYRRKKK, que, al ser higroscópico, condujo a menores rendimientos y dificultades en la purificación debido a su baja retención en columnas C-18. A pesar de las dificultades en la síntesis del péptido RYRRKKK, se logró obtener la cantidad suficiente de los tres péptidos para realizar los ensayos de interacción con el material monolítico modificado con resorcinarenos. Después de obtenidos los péptidos se procedió a evaluar la interacción de cada péptido con los materiales monolíticos funcionalizados con resorcinarenos.

#### **4.6 Interacción de péptidos con *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) (Etapa 5)**

Inicialmente se realizaron las curvas de calibración para los péptidos (Figura 4-24). Para realizar estas curvas y el posterior seguimiento de las interacciones con el copolímero se realizó análisis por RP-HPLC. Se empleó como fase móvil mezclas de 0,05% TFA en H<sub>2</sub>O (Solvente A) y 0,05% TFA en ACN (Solvente B). Para los péptidos AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub> y KAEAEAKA se usó como fase estacionaria una columna Chromolith® C-18 (4,6x50mm) y se realizó un gradiente de elución de 5 a 50% de 0,05% TFA en ACN (Solvente B) en 8 minutos. El flujo fue de 2 mL/min, con longitud de onda de detección de 210 nm y un volumen de inyección de 10 µL. Para el péptido RYRRKKK se empleó una columna Kromasil Eternity 2,5-C18 (4,6x100 mm) y se realizó un análisis isocrático de 95% de 0,05% TFA en ACN (Solvente B), con flujo de 0,8 mL/min, en 6 minutos, empleando 210 nm como longitud de onda de detección y un volumen de inyección de 10 µL. Para las curvas de calibración se empleó 1,04 mg/mL para AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>, 1,03 mg/mL para KAEAEAKA y 1,2 mg/mL para RYRRKKK y se realizaron las correspondientes disoluciones, el procedimiento se repitió tres veces para cada péptido y se muestran los mejores resultados obtenidos para cada uno (Figura 4-24).

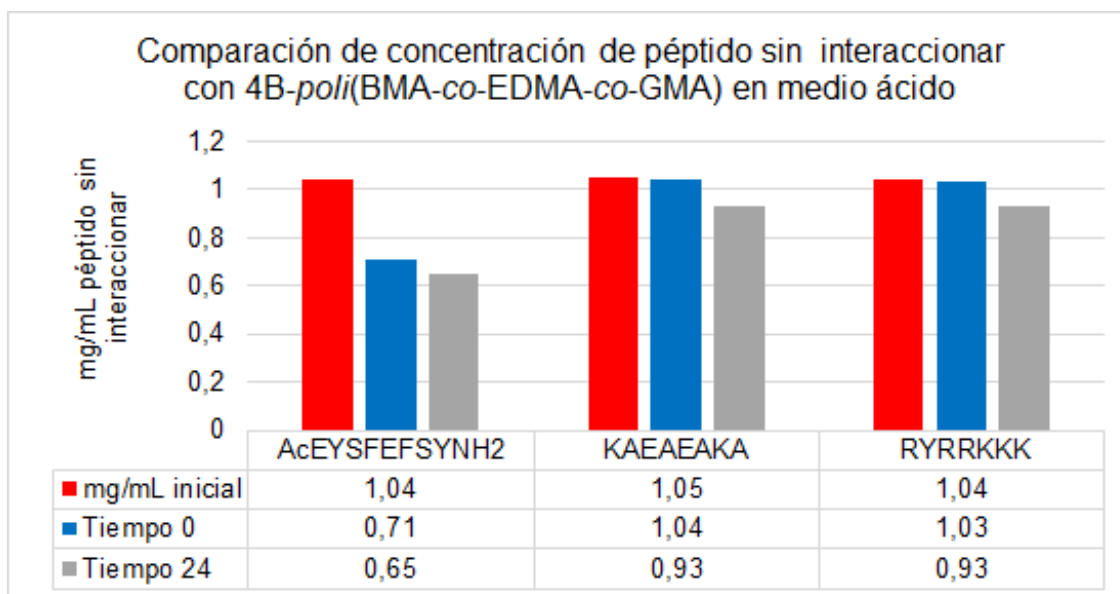
**Figura 4-24.** Curvas de calibración para péptidos

Curva de calibración (A) AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>, (B) KAEAEAKA y (C) RYRRKKK

Para determinar la interacción entre los péptidos y los materiales monolíticos se pesó 1 mg de cada copolímero: (*poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA), **4A**-*poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA), **4B**-*poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA) y **4C**-*poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA). Se escogió este

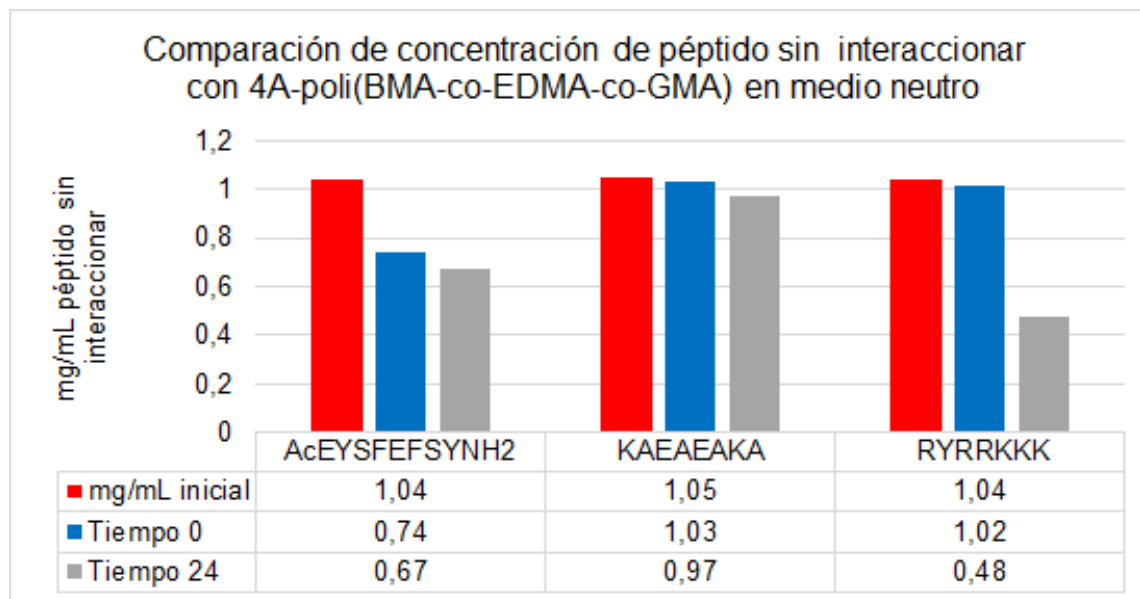
copolímero porque es el que mejor resistencia mecánica tiene y mostró mejores resultados al momento de polimerizar dentro del molde PEEK. Luego de pesar cada copolímero se adicionó una disolución de péptido (1 mg/mL), se centrifugó y se tomó el sobrenadante para realizar el seguimiento del péptido por RP-HPLC (*tiempo 0*), el resto de copolímero-péptido se dejó agitando y a las 24 h se centrifugó de nuevo y se tomó una nueva alícuota del sobrenadante para realizar el segundo monitoreo (*tiempo 24h*). En cada uno de los cromatogramas se determinó el área del pico del péptido y mediante la ecuación de la recta calculada para cada péptido se determinó la concentración. Este valor indicó la cantidad de péptido que aún no había interactuado con el material monolítico y también se determinó el porcentaje de péptido que si había interactuado para cada caso. Los análisis de interacción se realizaron en medio ácido y neutro, pero en medio básico (pH:10) se propició la hidrólisis del éster que une al material monolítico con el resorcinareno. El medio ácido contenía 0,05% TFA en H<sub>2</sub>O y el medio neutro únicamente H<sub>2</sub>O.

A continuación, se muestran los resultados de interacción de los péptidos AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>, KAEAEAKA y RYRRKKK con los copolímeros mencionados anteriormente en medio ácido: se muestran y describen los resultados más relevantes. En la figura 4-25 se observa en color rojo la concentración inicial de cada péptido, en azul la concentración de esa misma solución en *tiempo 0*, es decir, al entrar en contacto con el copolímero **4B**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) y en gris, el *tiempo 24*, es decir, el monitoreo después de pasar 24 horas en agitación con el copolímero. Los mejores resultados de interacción para KAEAEAKA y RYRRKKK se presentan con **4B**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA): la interacción inicial para ambos casos es de 1 % con respecto a la concentración inicial de cada péptido, esa interacción se incrementa al dejar el péptido en solución con el copolímero durante 24 h, incrementando a 11,4% para KAEAEAKA y 10,6% para RYRRKKK. En cuanto a AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>, es él que mejores resultados muestra en medio ácido, pues se presenta una interacción de 31,7% en el *tiempo 0*, es decir que, solamente al entrar en contacto con el copolímero se presenta interacción entre el péptido y el macrociclo anclado al copolímero, en el monitoreo *tiempo 24* la interacción incrementa a 37,5%. Por otro lado, los resultados de AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub> con **4C**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) son similares a los obtenidos con **4B**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA). En *tiempo 0* se encuentra 32,7% de péptido interactuando y aumenta a 40,4%.

**Figura 4-25.** Interacción de péptidos con **4B-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)** en medio ácido

A continuación, se muestran los resultados de interacción de los péptidos AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>, KAEAEAKA y RYRRKKK con los copolímeros en medio neutro, se muestran los resultados más relevantes: En la figura 4-26 se observa la disminución de la concentración de los péptidos al interaccionar con el copolímero **4A-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)**. Para KAEAEAKA y RYRRKKK se presentan interacción inicial con el monolito de 2,9% y 1,9%, respectivamente. Esa interacción se incrementa al dejar el péptido en solución con el copolímero durante 24 h, registrando 54,3% para KAEAEAKA y 53,8% para RYRRKKK. En cuanto a AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>, el porcentaje de interacción inicial es alto (28,8%), en el monitoreo *tiempo 24* la interacción incrementa a 35,6%. Por otro lado, los mejores resultados para AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub> se presentan con **4B-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)**: en *tiempo 0* se encuentra 41,3% de péptido interaccionando y en *tiempo 24* aumenta a 58,7%. Las gráficas completas de interacción se encuentran en los anexos (numeral 7.5).

**Figura 4-26.** Interacción de péptidos con **4A-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)** en medio neutro



El comportamiento de KAEAEAKA con los copolímeros es mejor en medio neutro que en medio ácido, posiblemente por su comportamiento con zwitterión, ya que sus cadenas laterales con grupos amino están protonados y permitirían generar más enlaces de hidrógeno con los oxígenos del macrociclo e interacciones con la cavidad del macrociclo. En el *tiempo 0* la concentración del péptido KAEAEAKA con todos los copolímeros no muestra demasiado cambio de la concentración inicial, el cambio se observa al dejar interaccionar por más tiempo. Los mejores resultados de interacción en medio neutro se presentan con **4A-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)**, en este caso la influencia de la hidrofobicidad de los sustituyentes alifáticos de los resorcinarenos no parece mostrar mayor influencia. Las interacciones en este caso, pueden deberse a que los grupos carboxilo y amino de las cadenas laterales pueden generar enlaces de hidrógeno, entre el grupo hidroxilo libre de las benzoxazinas, el grupo carboxilo del borde superior de los macrociclos e interacciones con la cavidad del macrociclo.<sup>4</sup>

Al igual que con el péptido KAEAEAKA se presenta una disminución considerable en la concentración de RYRRKKK con **4A-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)** en medio neutro. En medio ácido se presenta el mejor cambio de la concentración del péptido RYRRKKK con **4B-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)**, seguido de **4C-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)** y **4A-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)**. El comportamiento del péptido RYRRKKK con los

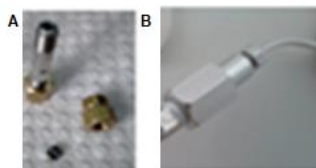
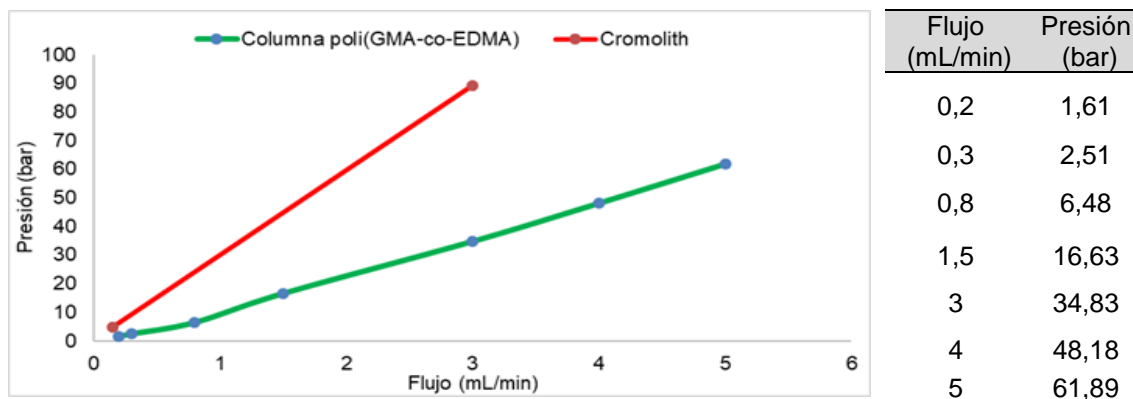
copolímeros tanto en medio ácido como neutro, al ser analizado por RP-HPLC reveló la formación de otra especie, con tiempo de retención menor al del péptido RYRRKKK. Es decir que para el péptido RYRRKKK el uso de estos materiales monolíticos como fase estacionaria no sería muy conveniente pues altera la composición de la muestra, ya sea por la formación de un producto o la hidrólisis del compuesto macrociclo que se separa del copolímero.

Ahora bien, la interacción entre los copolímeros modificados de *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) y el péptido AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>, tanto en medio ácido como en medio neutro es inmediata y revela los mejores resultados de interacción. En el monitoreo de 24 h la interacción del péptido con los materiales monolíticos es mejor en medio neutro que en medio ácido, pero en ambos se presenta disminución de la concentración del péptido, esta interacción puede deberse a su comportamiento como zwitterión en medio neutro. La disminución de la concentración del péptido AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub> en medio ácido es mayor al aumentar la longitud de la cadena de los resorcinarenos con los cuales está modificado el copolímero, esto posiblemente indica que la interacción entre el péptido y los monolitos modificados puede estar presentando por la formación de complejos de inclusión debidas a la interacción  $\pi$ - $\pi$ ,<sup>4</sup> considerando los sistemas aromáticos presentes en las cadenas laterales del péptido y las cavidades formadas por los macrociclos que son más estables a medida que aumenta la longitud de las cadenas alifáticas del borde inferior.

#### **4.7 Evaluación de los materiales obtenidos como posibles soportes para separaciones analíticas – Estudios preliminares**

Para la polimerización de copolímeros en diferentes moldes, se escogió los copolímeros *poli*(GMA-co-EDMA) y *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA), puesto que el copolímero *poli*(MMA-co-EDMA-co-GMA) tenía baja resistencia mecánica y se pulverizaba con mucha facilidad, lo cual dificultaba su manipulación en los moldes. Los moldes que se emplearon fueron: acero, vidrio y PEEK. El mejor resultado para el molde de acero (5 cm de largo y 4,6 mm de diámetro con tapas y acoples de acero) (Figura 4-27) se logró con el copolímero *poli*(GMA-co-EDMA): inicialmente se realizó una prueba de presión y se comparó con la columna Chromolith® (Tabla 4-11). Y se pudo ver que el mejor comportamiento lo presentaba nuestra columna.



**Figura 4-27.** Acoples y columna de acero**Tabla 4-11.** Comportamiento de la presión al variar el flujo en la columna de acero-*poli*(GMA-*co*-EDMA).

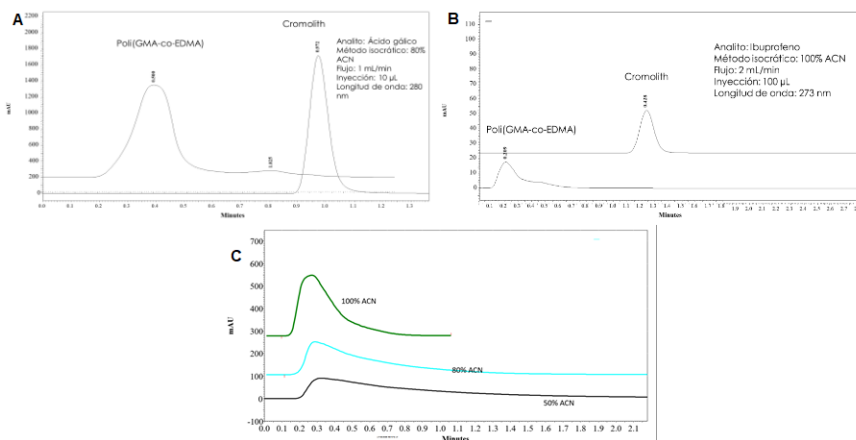
Fase móvil (ACN:H<sub>2</sub>O; 5:95). Variación del flujo cada 5 min.

Este resultado previo de la columna de acero-*poli*(GMA-*co*-EDMA), permitió plantear un experimento, en el cual se comprobó el comportamiento de la columna con diferentes analitos (ácido gálico e ibuprofeno) y se compararon con los resultados obtenidos en una columna Chromolith® (Figura 4-28-A-B). El tiempo de retención de los analitos en la columna de acero-*poli*(GMA-*co*-EDMA) fue mucho menor que en la columna Chromolith®, así como su resolución. Se presentó ensanchamiento del pico, lo cual no es deseable en una separación cromatográfica. Además, el pico del ácido gálico tuvo asimetría “*fronting*”, lo cual puede ser consecuencia de una sobrecarga de la columna. El analito ibuprofeno en la columna de acero-*poli*(GMA-*co*-EDMA), salió con el frente de solvente y presentó asimetría “*tailing*”, lo cual indica que algunos sitios sobre la fase estacionaria retienen más fuertemente que otras. Con el fin de comprobar el efecto de la fase estacionaria en la interacción del analito con la columna, se varió la proporción de la fase móvil (Figura 4-28-C). Como puede observarse en los cromatogramas, al disminuir el porcentaje de ACN, aumenta la asimetría del pico, lo que indica mayor afinidad por la fase estacionaria pero esta afinidad no es homogénea en toda la columna, lo que hace que algunas moléculas se retengan mayor tiempo. La columna finalmente se desangró después de los usos

explicados anteriormente, lo que indica que posiblemente la unión entre las paredes de la columna y *poli*(GMA-co-EDMA) no es química sino física o que la resistencia mecánica del copolímero no es suficiente. Esto nos permitió comprobar el problema de reproducibilidad que presentan este tipo de columnas monolíticas.<sup>54</sup>

Con respecto al copolímero *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA), el mejor resultado se observó al emplear el molde PEEK (5 cm longitud) y tratar la paredes internas (Tabla 4-12).<sup>101</sup> Adicionalmente, se decidió tratar vidrio con el fin de determinar si este material era viable para la obtención de columnas. Ambos moldes se llenaron con la mezcla de polimerización y se logró demostrar que el molde de vidrio no es adecuado para la fabricación de columnas monolíticas. En cuanto a la columna PEEK el tratamiento de las paredes fue satisfactorio y se garantizó el llenado de la columna usando un montaje diseñado por nosotros, consistente en una jeringa y una llave para cartuchos de extracción en fase sólida (Figura 4-29). Se realizó una prueba preliminar de acople al equipo HPLC, encontrando que el anclaje de *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) fue eficiente (fase móvil: 100% ACN; flujo: 0,5 mL/min, tiempo: 1 hora). Sin embargo, es necesario diseñar chaquetas de metal en las cuales se pueda introducir la columna PEEK y se garantice perfecto acople con el equipo sin pérdida de presión

**Figura 4-28.** Comparación de cromatogramas de ácido gálico e ibuprofeno en columna Chromolith® y columna de acero-*poli*(GMA-co-EDMA)



A. Comparación de cromatogramas de ácido gálico en columna Chromolith® y columna de acero-*poli*(GMA-co-EDMA) B. Comparación cromatogramas de ibuprofeno en columna Chromolith® y columna de acero-*poli*(GMA-co-EDMA). C. Cromatogramas de ibuprofeno en columna de acero-*poli*(GMA-co-EDMA), variando fase móvil.

**Tabla 4-12.** Tratamiento de paredes internas de PEEK y capilar de vidrio

Material	Tratamiento de las paredes internas
PEEK	Se llenó el tubo PEEK con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50% y se dejó actuar durante 6 h, se lavó con agua Milli-Q, se llenó con disolución 1M de GMA en diclorometano y se dejó reaccionar por 4 h, se enjuago con acetona y se secó con N <sub>2</sub> . <sup>101</sup>
Capilar de vidrio	Las paredes internas del capilar de vidrio se enjuagaron con NaOH 1M durante 5 min, se llenó con la misma disolución y se dejó actuar por 10 min. Se enjuagó con agua y se secó con aire, dos veces, posteriormente se lavó HCl por 2 min y se secó con aire por 5 min. Seguido se lavó con tolueno durante 10 min y se enjuagó con metacrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo (TMSM) en tolueno durante 10 min, luego se llenó con metacrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo (TMSM) en tolueno durante 2 h, finalmente se enjuagó con tolueno y se secó. <sup>102</sup>

**Figura 4-29.** Columna de PEEK- *poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA), con tratamiento de paredes y polimerización exitosa y montaje de llenado

Esta parte adicional del trabajo de investigación nos permitió comprobar que el mejor copolímero para hacer columnas monolíticas es *poli*(BMA-*co*-EDMA-*co*-GMA), puesto que los ensayos preliminares que se realizaron demuestran que presenta mayor resistencia mecánica que los otros copolímeros. Adicionalmente, se comprobó que para hacer columnas de acero monolíticas derivadas de metacrilatos es pertinente diseñar una manera de anclaje químico del copolímero a las paredes de acero. Así mismo, se comprobó que no es viable emplear columnas de vidrio. Con respecto a las columnas PEEK, se comprobó que el tratamiento previo de las paredes internas fue eficiente y permite anclar el copolímero a las paredes del molde. Con respecto a este último es pertinente diseñar material para acoplar el PEEK al equipo de HPLC, pero sin lugar a duda los resultados permiten vislumbrar un excelente futuro en el diseño de este tipo de columnas monolíticas.



## 5. Conclusiones

Se logró comprobar que los macrociclos conocidos como calix[4]resorcinarenos pueden ser usados como agentes modificantes de materiales monolíticos derivados de glicidilmetacrilato y que podrían ser empleados como fases estacionarias para HPLC, útiles en el análisis de moléculas como péptidos. El trabajo tuvo los siguientes alcances.

Se logró sintetizar y caracterizar inequívocamente los resorcinarenos: **1A**, **1B** y **1C**, con rendimientos de 82, 83 y 87%, respectivamente. Estas moléculas tienen en su estructura motivos hidrofóbicos por incorporación de grupos propilo, pentilo y nonilo, lo cual aporta en su uso como modificantes para fases estacionarias para RP-HPLC. Adicionalmente, se logró comprobar que el mecanismo de reacción para la obtención de **1A**, **1B** y **1C** procede mediante el mecanismo propuesto por Weinelt y colaboradores, en donde en una primera etapa se requiere la formación de trioxano, intermediario que fue aislado y caracterizado inequívocamente. De los resorcinarenos anteriormente mencionados, se logró obtener las estructuras cristalinas de **1B** y **1C**, que fueron analizadas mediante difracción de rayos X, confirmando conformación como en estado cristalino. Así mismo se logró demostrar indirectamente que se obtuvieron las estructuras tetraméricas de **1A**, **1B** y **1C**, mediante acetilación de estos macrociclos y demostrar que, al acetilar, la conformación como de **1A**, **1B** y **1C** cambia a bote tanto en solución como en estado cristalino.

Se obtuvo los copolímeros *poli*(MMA-co-EDMA-co-GMA), *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) y *poli*(GMA-co-EDMA), comprobando su obtención mediante MEB, IR-ATR y Raman.

Se comprobó que el método “*grafting*”-epoxi no es viable para funcionalizar materiales monolíticos derivados de GMA con los grupos hidroxilo del borde superior de los resorcinarenos **1A** y **1B**, puesto que estos macrociclos forman fenolatos que impiden la

reacción de eterificación con los grupos oxirano. El fenolato **5A** obtenido a partir de **1A** fue caracterizado mediante técnicas espectroscópicas. Este resultado permitió proponer la funcionalización de los resorcinarenos con grupos que pudieran formar carboxilatos y que permitieran esterificar los monolitos, por primera vez, mediante el método “*grafting*”-epoxi.

Se consiguió funcionalizar los resorcinarenos **1A**, **1B** y **1C** mediante dos tipos de reacciones que permitieron obtener macrociclos con grupos carboxilo. La primera funcionalización se realizó con cloruro de 4-carboxibenzenodiazonio mediante acoplamiento azoico, obteniendo los compuestos **3A**, **3B** y **3C**, con excelentes rendimientos, 97, 92 y 83%, respectivamente. Y la segunda funcionalización se realizó empleando  $\beta$ -alanina para obtener las benzoxazinas **4A**, **4B** y **4C** con muy buenos rendimientos, 88, 89 y 77%, respectivamente. Los macrociclos obtenidos fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas y es pertinente resaltar que estos macrociclos fueron indispensables para llevar a cabo la modificación de copolímeros derivados de GMA mediante “*grafting*”-epoxi, metodología que no había sido empleada con resorcinarenos hasta el presente trabajo de investigación.

Se diseñó un nuevo método “*grafting*”-epoxi para modificar monolitos derivados de GMA con grupos carboxilo. Los macrociclos empleados para la modificación fueron los diazotados: **3A**, **3B** y **3C** y las benzoxazinas: **4A**, **4B** y **4C**. Cabe resaltar que es la primera vez que se usan este tipo de macrociclos tan voluminosos para modificar la superficie de materiales monolíticos. Los resultados permitieron demostrar que el impedimento estérico y la estabilidad debida a la resonancia en los compuestos diazotados imposibilita su uso como modificantes de materiales monolíticos. Sin embargo, el uso de benzoxazinas de resorcinarenos, derivadas de  $\beta$ -alanina, permitieron disminuir la estabilización por resonancia y el impedimento estérico, logrando de esta manera, por primera vez, la modificación de copolímeros derivados de GMA con macrociclos tipo resorcinareno mediante el método “*grafting*”-epoxi, diseñado en esta investigación. Los copolímeros modificados obtenidos fueron los siguientes: **4A-poli(GMA-co-EDMA)**, **4B-poli(GMA-co-EDMA)**, **4C-poli(GMA-co-EDMA)**, **4A-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)**, **4B-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)** y **4C-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)**. Estos fueron caracterizados mediante IR-ATR, Raman, MEB y análisis elemental. Es importante resaltar que los resorcinarenos empleados contenían sustituyentes alifáticos en el borde inferior de diferente longitud (**A**: propilo; **B**: pentilo y **C**: nonilo) que contribuyeron a su comportamiento

bimodal (formación de cavitados y aumento de hidrofobicidad), característica que es indispensable para la interacción con otras moléculas como péptidos, característica indispensable si se desea usar estos monolitos como fases estacionarias.

Se logró sintetizar tres péptidos: AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>, KAEAEAKA y RYRRKKK mediante la metodología SPPS-Fmoc/tBu. Estos fueron caracterizados por RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF. Los péptidos escogidos para esta investigación se seleccionaron debido a su carácter: ácido, neutro y básico, lo cual permitió determinar el comportamiento de los materiales monolitos modificados con resorcinarenos con diferentes péptidos.

Se pudo observar que se presenta degradación de las fases estacionarias por hidrólisis alcalina a pesar de tener un macrociclo esterificado muy impedido. Por lo anterior la interacción de péptidos con los copolímeros se realizó en medio neutro y ácido. Se logró determinar que en medio ácido en el tiempo 0 de monitoreo, la interacción de los péptidos KAEAEAKA y RYRRKKK con **4B**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) es de 1%, mientras que el péptido AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub> muestra interacción inmediata de 31,7%. Con respecto a la interacción en medio ácido a las 24 h de monitoreo, la interacción de los péptidos KAEAEAKA, RYRRKKK y AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub> con el copolímero **4B**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) es buena, 11,4, 10,6 y 37,5%, respectivamente. Adicionalmente, en el mismo medio, el péptido AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub> con el copolímero **4C**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) muestra interacción inicial de 32,7% y a las 24 h incrementa a 40,4%. Esto demuestra que la mejor fase estacionaria para péptidos ácidos es **4C**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) o **4B**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA), mientras que para péptidos neutros y básicos se podría emplear el copolímero **4B**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA)

Fue posible demostrar en medio neutro, la mejor fase estacionaria para analizar péptidos básicos y neutros es **4A**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA), pues para KAEAEAKA y RYRRKKK se presenta interacción inicial de 2,9% y 1,9%, respectivamente, e interacción final de 54,3% para KAEAEAKA y 53,8% para RYRRKKK. En cuanto al péptido AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub> los mejores resultados se encontraron con la fase estacionaria **4B**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA), con una interacción inicial de 41,3%, la cual incremento hasta 58,7% al pasar 24 horas.

Mediante pruebas preliminares, fue posible comprobar que *poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA) se ancla a las paredes del molde PEEK, siempre y cuando las paredes internas del molde PEEK reciban tratamiento en las paredes internas.



## 6. Productos Académicos

### Publicaciones:

1. Crystal structure and dynamic NMR studies of octaacetyl-tetra(propyl) calix[4]resorcinarene. Velásquez-Silva A, Cortés B, Rivera-Monroy ZJ, Pérez-Redondo A, Maldonado M. J. Mol. Struct. 2017; 1137: 380–386.
2. Surface Modification of poly(GMA-co-EDMA-co-MMA) with Resorcarenos. Castillo-Aguirre AA, Velásquez-Silva BA, Palacio C, Baez F, Rivera-Monroy ZJ, Maldonado M. J. Braz. Chem. Soc. 2018; 29: 1965-1972
3. Sometido: Host-guest inclusion systems of tetra(alkyl)resorcin[4]arenes with choline in DMSO: Dynamic NMR studies and X-ray structural characterization of the 1:1 inclusion complex
4. Sometido: Aminomethylated Calix[4]resorcinarene as modifying agents for Glycidyl Methacrylate (GMA) Rigid Copolymers Surface

### Congresos:

1. XVII Congreso Colombiano de Química  
Bucaramanga, Colombia, 25 – 27 octubre 2017  
Interferencia del disolvente en la actividad quimiosensora de C-tetra(pentil)calix[4]resorcinareno. Roger Amilkar Sarmiento Forero, Astrid Velásquez Silva, Mauricio Maldonado Villamil

2. XVII Congreso Colombiano de Química

Bucaramanga, Colombia, 25 – 27 octubre 2017

Síntesis de macrociclos diazotados derivados de resorcinarenos. Astrid Velásquez-Silva, Mauricio Maldonado Villamil

3. IX Congreso Colombiano de Cromatografía Cococro – SILAE - 2017

Cartagena De Indias, Colombia, 25 – 29 septiembre 2017

Functionalization of *poly*(GMA-co-EDMA) with *p*-aminobenzoic and 6-maleimidehexanoic acids. Insuasty Cepeda D, Velásquez Silva B, García Castañeda J, Maldonado Villamil M, Rivera Monroy Z

4. VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica y Encuentro Nacional de Química Ambiental

Cancún, Quintana Roo, México, 15 – 18 noviembre 2016

Uso de la espectroscopía Raman en la caracterización de un monolito con base en metilmetacrilato modificado con calix[4]resorcinarenos. Alver Alex Castillo, Betty Astrid Velásquez Silva, Cindy Palacio, Frank Báez, Zuly Jenny Rivera Monroy, Mauricio Maldonado Villamil

5. VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica y Encuentro Nacional de Química Ambiental

Cancún, Quintana Roo, México, 15 – 18 noviembre 2016

Uso de espectroscopía U.V-visible en la determinación de las propiedades solvatocrómicas de *p*-(4-carboxifenilazo)tetrapropilcalix[4]resorcinareno. Betty Astrid Velásquez Silva, Brian Steven Cortés Caicedo, Zuly Jenny Rivera Monroy, Mauricio Maldonado Villamil

**Publicaciones en preparación:**

1. Effect of the solvent on the conformational dynamics of azocalix[4]resorcinarenes: Study DFT and RMN
2. Evidence of conformational change in the acetylation reaction of tetranonylcalix[4]resorcinarene by Rx diffraction
3. Comparative study of the density values of the three regioisomers of diazotated tetra(propyl)resorcin[4]arene in DMSO at several temperatures.

## 7. Anexos

A continuación, se presentan los anexos de caracterización de resorcinarenos, copolímeros sin funcionalizar, copolímeros funcionalizados y péptidos:

### 7.1 Caracterización de los resorcinarenos

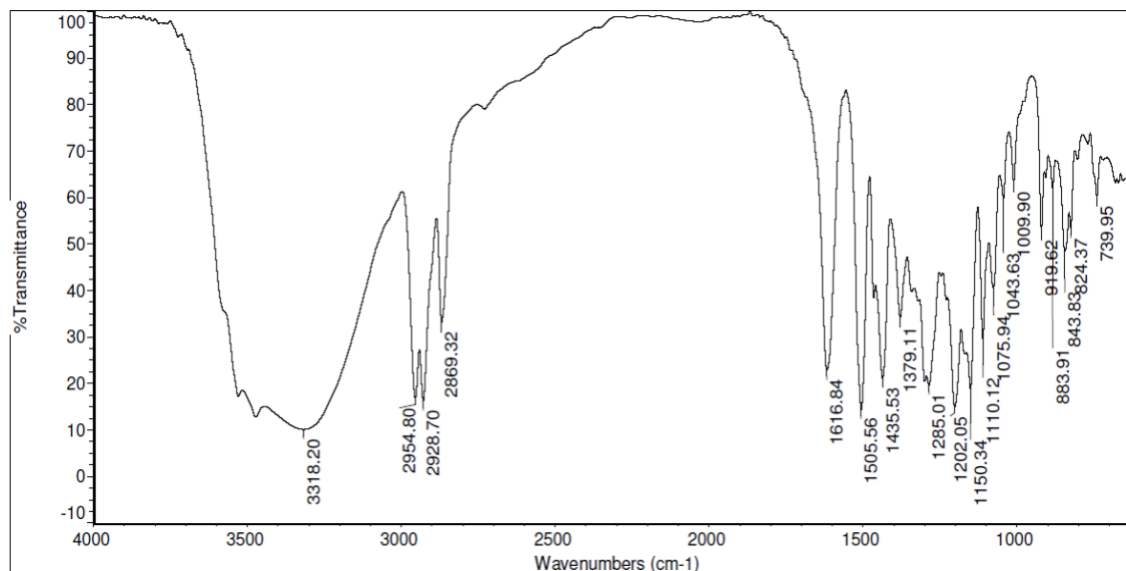
A continuación, se muestran los resultados de caracterización obtenidos en esta investigación en el siguiente orden: espectro IR, análisis elemental, espectro RMN-<sup>1</sup>H, datos cristalográficos, espectro UV-vis de los siguientes resorcinarenos:

- Anexo 1.** 2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol **(1A)**
- Anexo 2.** 2,8,14,20-tetrapentilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol **(1B)**
- Anexo 3.** 2,8,14,20-tetranonilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol **(1C)**
- Anexo 4.** 2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaen-4,6,10,12,16,18,22,24-octail-octaacetato **(2A)**
- Anexo 5.** 2,8,14,20-tetrapentilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaen-4,6,10,12,16,18,22,24-octail-octaacetato **(2B)**
- Anexo 6.** 2,8,14,20-tetranonilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaen-4,6,10,12,16,18,22,24-octail-octaacetato **(2C)**
- Anexo 7.** 4,6,10,12,16,18,22,24-octahidroxi-5,11,17,23-tetrakis[*p*-(4-carboxifenilazo)]-2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno **(3A)**
- Anexo 8.** 4,6,10,12,16,18,22,24-octahidroxi-5,11,17,23-tetrakis[*p*-(4-carboxifenilazo)]-2,8,14,20-tetrapentilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno **(3B)**

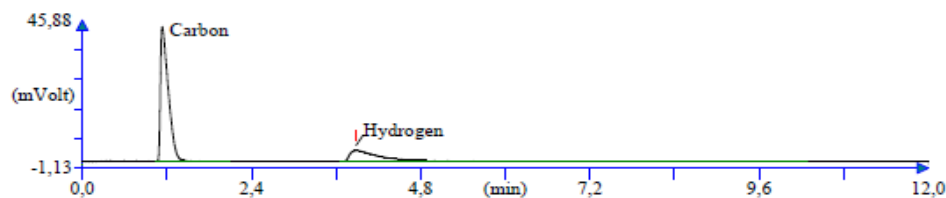
- Anexo 9.** 4,6,10,12,16,18,22,24-octahidroxi-5,11,17,23-tetrakis[*p*-(4-carboxifenilazo)]-2,8,14,20-tetranonilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacos-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno **(3C)**
- Anexo 10.** 2,12,22,32-tetrapropil-4,14,24,34-tetrahidroxi-7,17,27,37-tetra-(2-carboxi etil)-7,17,27,37-tetra-azanonaciclo[31.3(7).1.1<sup>3,11</sup>.1<sup>13,21</sup>.1<sup>23,31</sup>](41).3.5(10)-11(44).13.1<sup>23,31</sup>.0<sup>5,10</sup>.0<sup>15,20</sup>.0<sup>25,30</sup>.0<sup>35,40</sup>]tetraconta[15(20),21(43),23,25(30),31(42),33,35(41)]dodecaeno **(4A)**
- Anexo 11.** 2,12,22,32-tetrapentil-4,14,24,34-tetrahidroxi-7,17,27,37-tetra-(2-carboxi etil)-7,17,27,37-tetra-azanonaciclo[31.3(7).1.1<sup>3,11</sup>.1<sup>13,21</sup>.1<sup>23,31</sup>](41).3.5(10)-11(44).13.1<sup>23,31</sup>.0<sup>5,10</sup>.0<sup>15,20</sup>.0<sup>25,30</sup>.0<sup>35,40</sup>]tetraconta[15(20),21(43),23,25(30),31(42),33,35(41)]dodecaeno **(4B)**
- Anexo 12.** 2,12,22,32-tetranonil-4,14,24,34-tetrahidroxi-7,17,27,37-tetra-(2-carboxi etil)-7,17,27,37-tetra-azanonaciclo[31.3(7).1.1<sup>3,11</sup>.1<sup>13,21</sup>.1<sup>23,31</sup>](41).3.5(10)-11(44).13.1<sup>23,31</sup>.0<sup>5,10</sup>.0<sup>15,20</sup>.0<sup>25,30</sup>.0<sup>35,40</sup>]tetraconta[15(20),21(43),23,25(30),31(42),33,35(41)]dodecaeno **(4C)**

**Anexo 1.** 2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol (1A)

**A. Espectro IR de 1A**

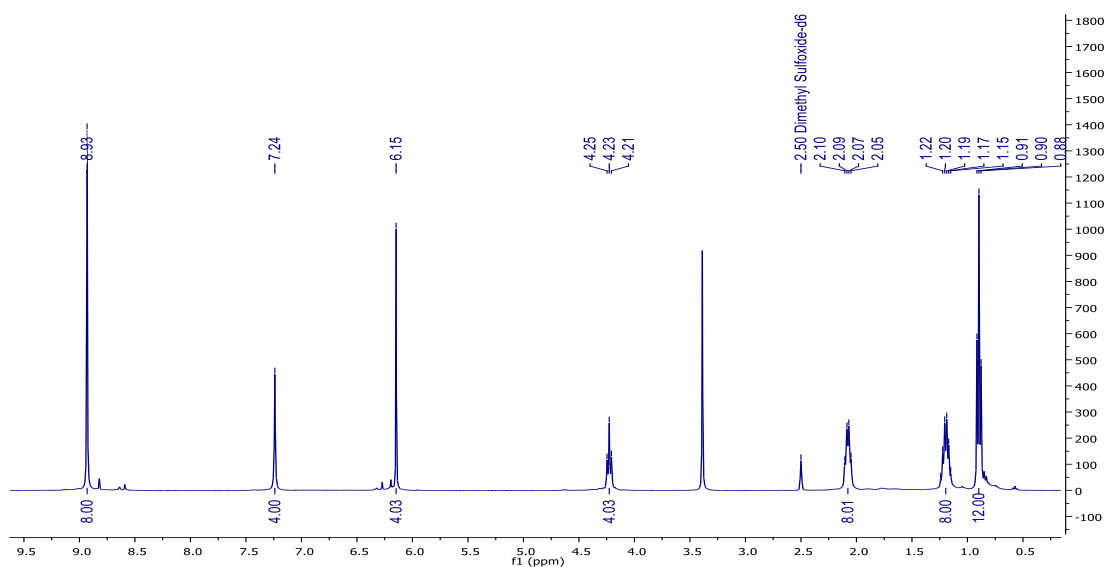
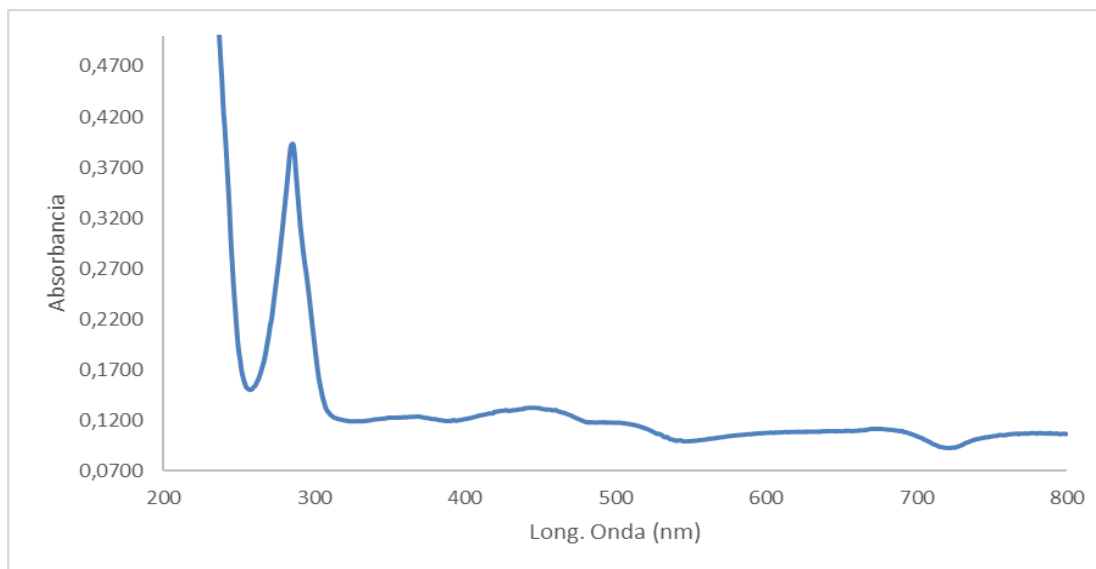


**B. Análisis elemental de 1A**



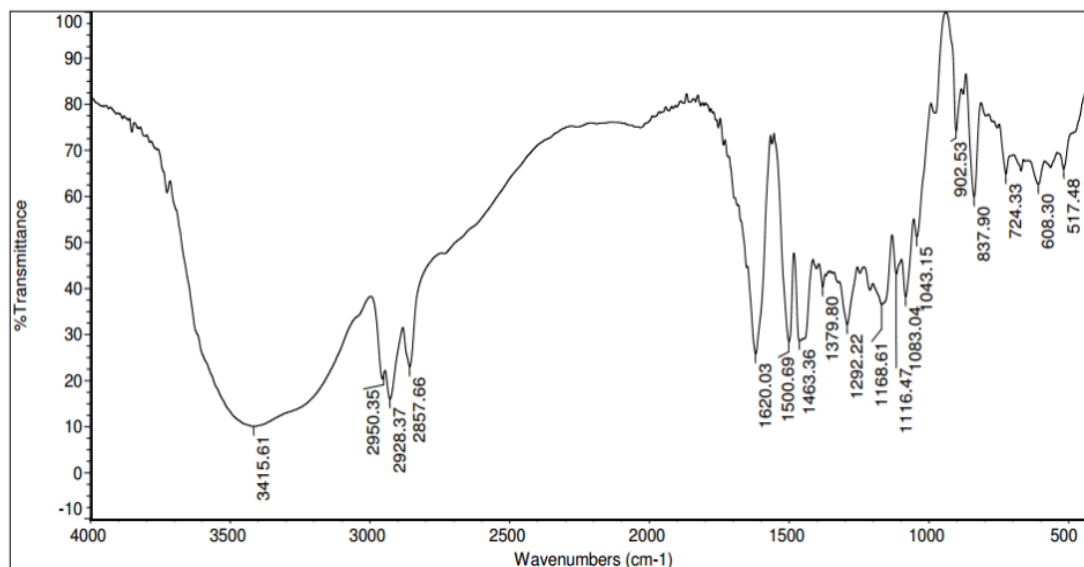
Operator ID:  
 Company name: ThermoFinnigan  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2017\JUNI  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/29/2017 10:53  
 Printed: 08-14-2017 15:35  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 17AEP-049 (# 12)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 17AEP-049.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.031  
 Protein factor: 6.25

Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Carbon	67.9351	68	3329594	RS	1.000000 .4743
Hydrogen	6.9294	233	1099517	RS	3.028233 .1520
Totals	74.8645		4429111		

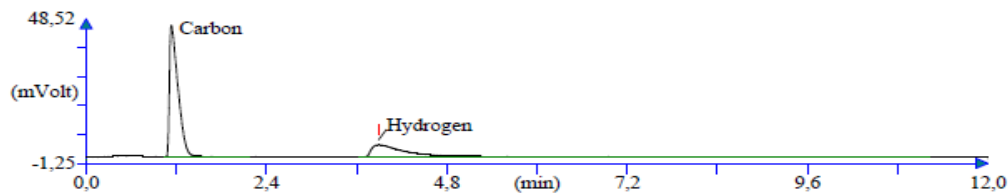
**C. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de 1A****D. Espectro UV-vis de 1A**

**Anexo 2.** 2,8,14,20-tetrapentilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol (1B)

**A. Espectro IR de 1B**

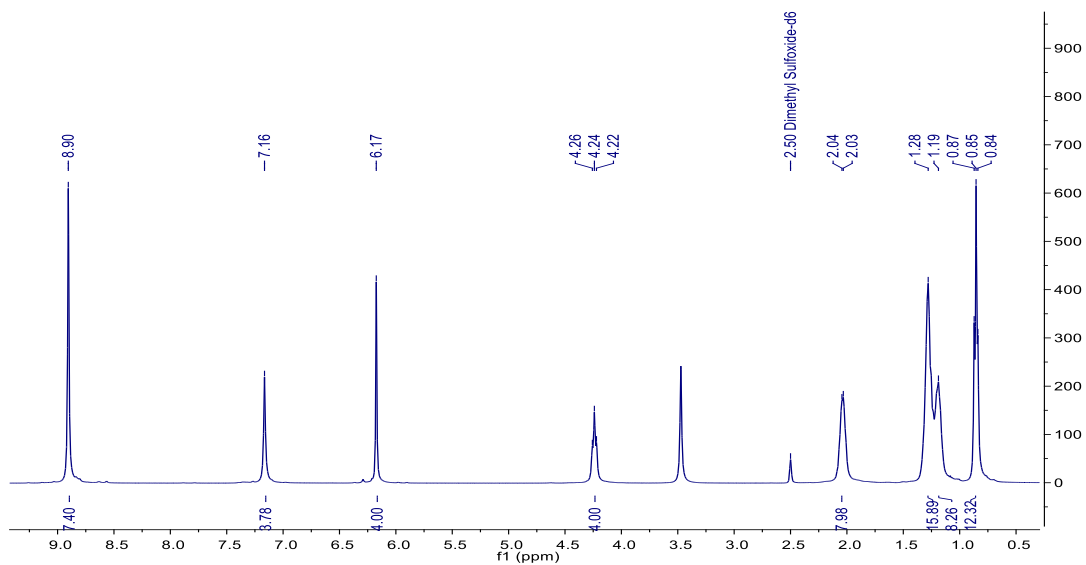
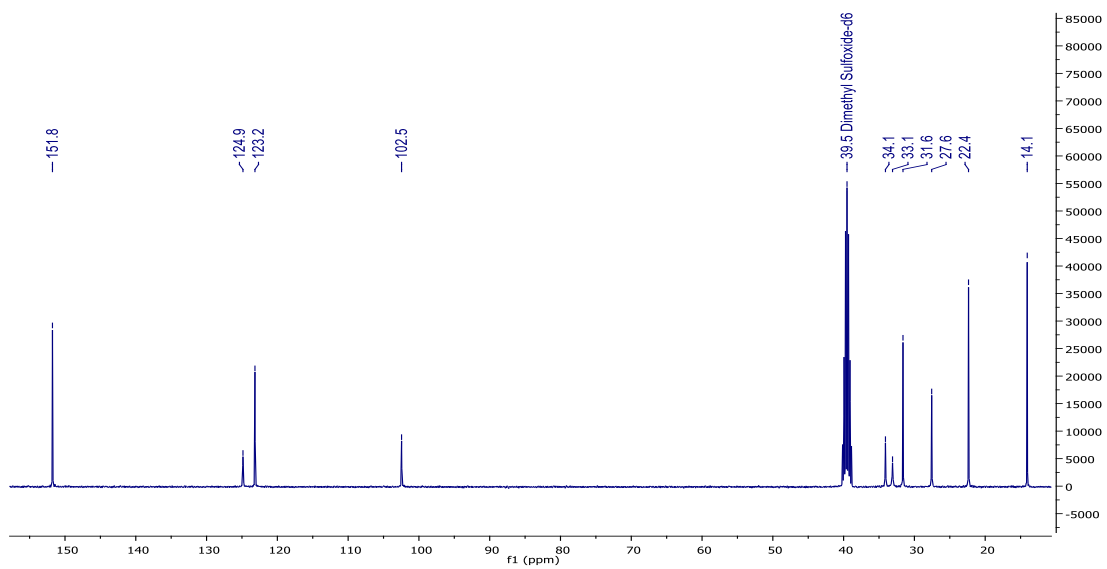


**B. Análisis elemental de 1B**



Operator ID:  
 Company name: ThermoFinnigan  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2017JUNIO  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/29/2017 11:05  
 Printed: 08-14-2017 15:36  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 17AEP-050 (# 13)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 17AEP-050.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.072  
 Protein factor: 6.25

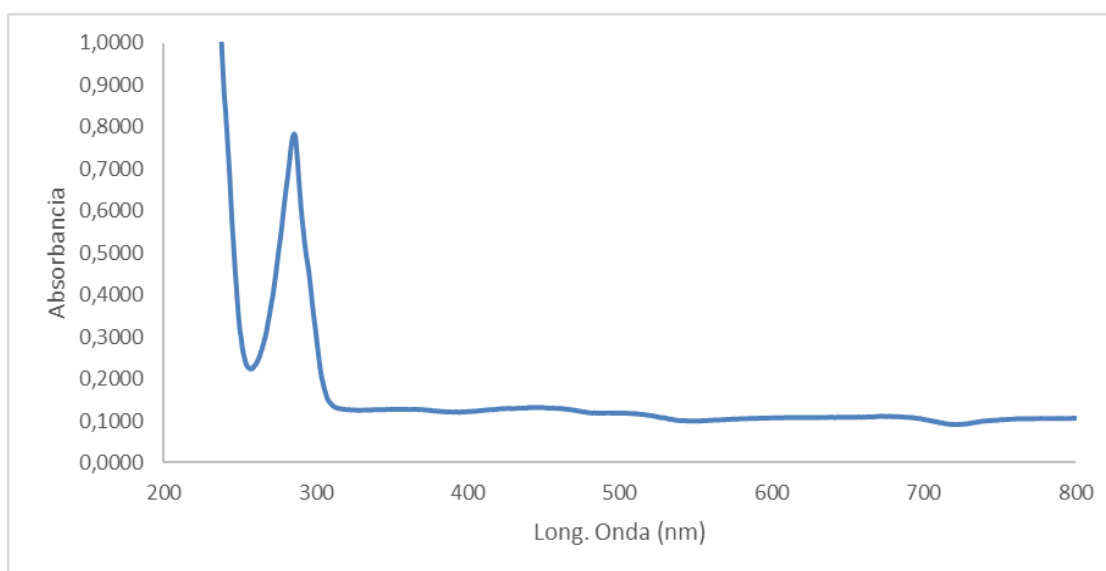
Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa	
Carbon	70.2192	68	3577874	RS	1.000000	.4743
Hydrogen	8.1399	234	1340051	RS	2.669955	.1520
Totals	78.3590		4917925			

C. . Espectro RMN-<sup>1</sup>H de **1B**D. Espectro RMN-<sup>13</sup>C de **1B**



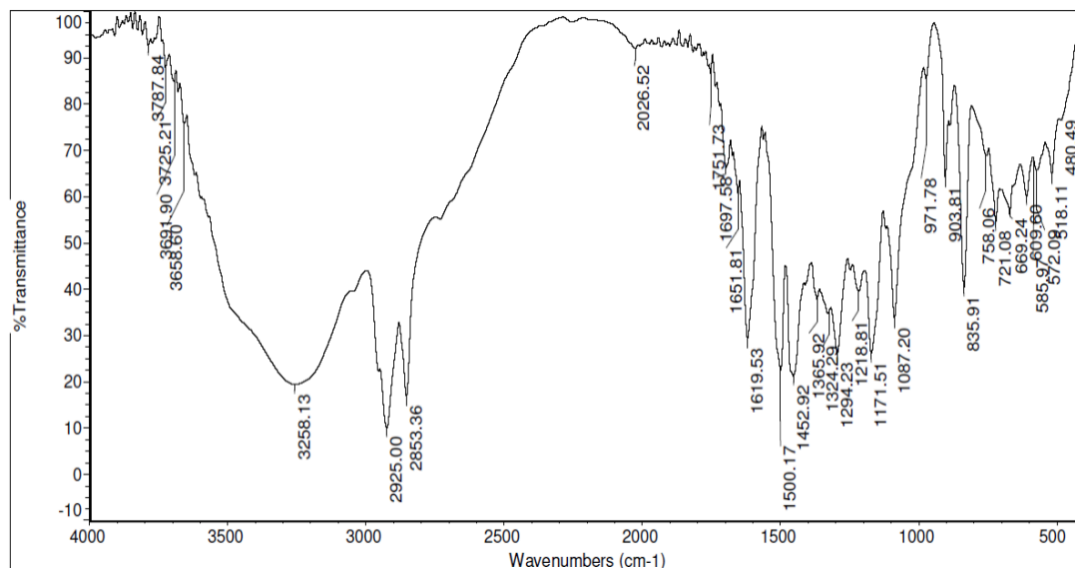
E. Datos cristalográficos de **1B**·DMSO

Parámetros del cristal	Datos / Valores
Número de depósito CCDC <sup>a</sup>	1841816
Formula Empírica	C <sub>58</sub> H <sub>96</sub> O <sub>14</sub> S <sub>5</sub>
Peso formula	1177,64
Temperatura	200(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Triclinic
Grupo espacial	<i>P</i> -1
Dimensiones de la celda unidad	<i>a</i> = 11,7596(15) Å $\alpha$ = 97,933(6) °. <i>b</i> = 13,3232(10) Å, $\beta$ = 92,063(10) °. <i>c</i> = 25,396(3) Å $\gamma$ = 94,286(10) °.
Volumen	3925,5(7) Å <sup>3</sup>
Z	2
D <sub>cal</sub>	1,232 mg/m <sup>-3</sup>
Coefficiente de absorción	0,242 mm <sup>-1</sup>
F(000)	2544
Tamaño del cristal	0,40 x 0,28 x 0,12 mm <sup>3</sup>
Rango <i>theta</i> para la recopilación de datos	3,04 a 27,00°
Rangos de índice	-18 a 18 -48 a 47 -14 a 14
Reflexiones recogidas	94595
Reflexiones independientes	13826 [ <i>R</i> (int) = 0,112]
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	7243
Índices finales de <i>R</i> <sup>b</sup> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	1,044
Índices <i>R</i> <sup>b</sup> (todos los datos)	<i>R</i> 1 = 0,073, <i>wR</i> 2 = 0,136
Pico y orificio de difracción más grandes	<i>R</i> 1 = 0,166, <i>wR</i> 2 = 0,175
Coefficiente de absorción	0,500 and -0,493 e·Å <sup>-3</sup>

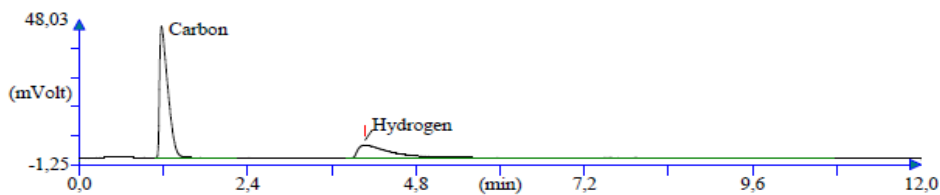
F. Espectro UV-vis de **1B**

**Anexo 3.** 2,8,14,20-tetranonilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol (1C)

**A. Espectro IR de 1C**

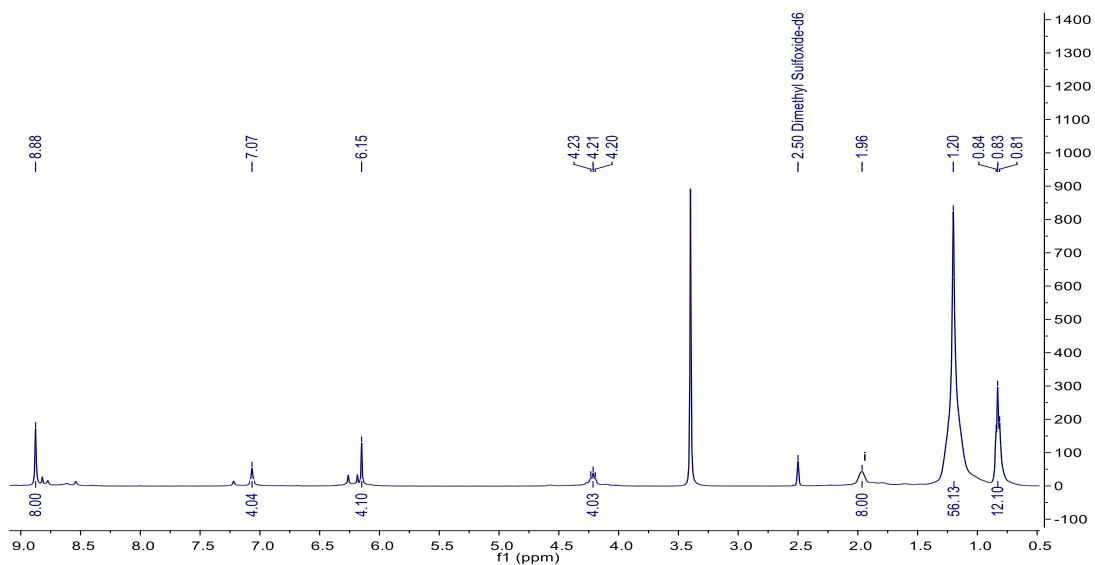
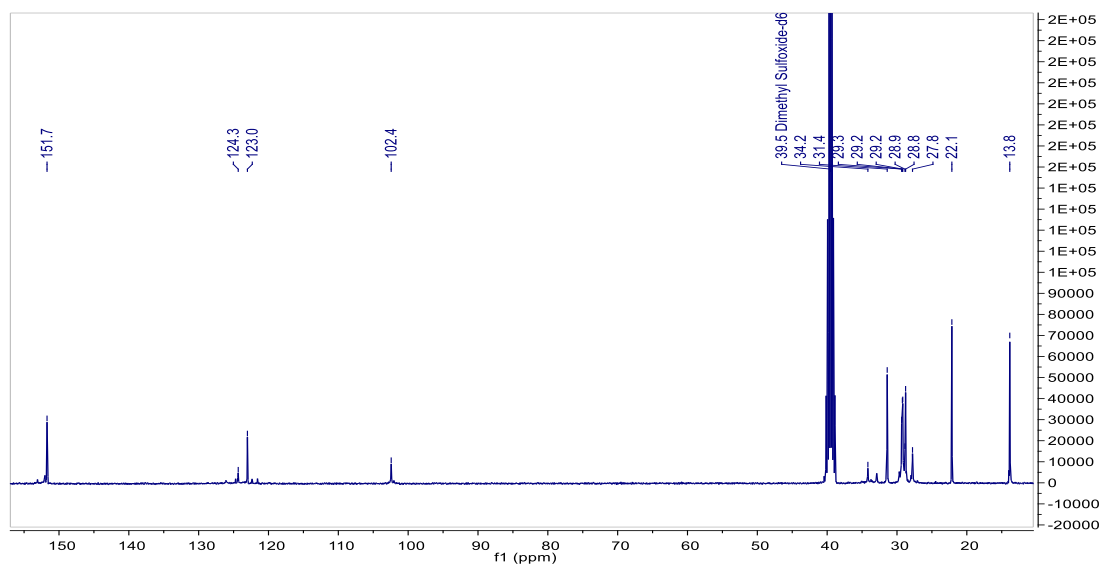


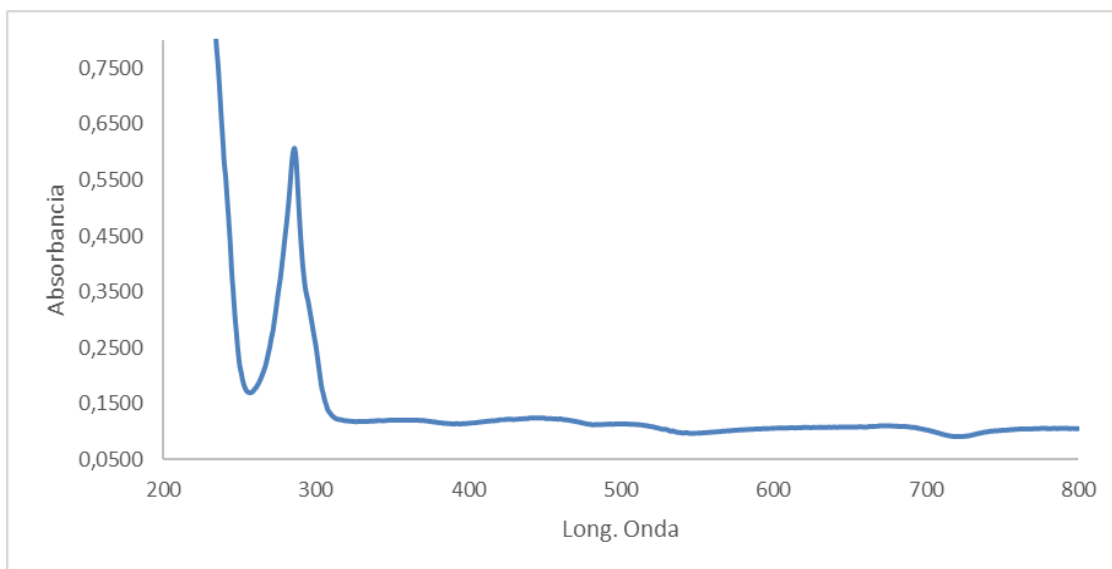
**B. Análisis elemental de 1C**



Operator ID:  
 Company name: ThermoFinnigan  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2017\JUNI\NCHS  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/29/2017 14:14  
 Printed: 08-14-2017 15:38  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 17AEP-051 (# 15)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 17AEP-051.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.01  
 Protein factor: 6.25

Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Carbon	76.1275	71	3654428	RS	1.000000 .4743
Hydrogen	9.9066	245	1534666	FU	2.381253 .1520
Totals	86.0341		5189094		

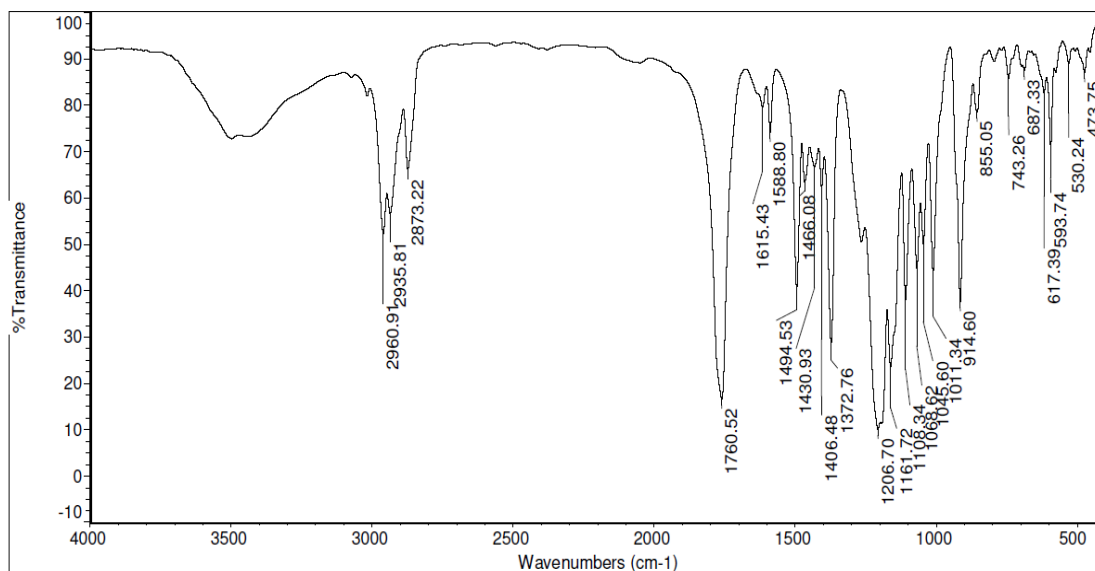
C. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de **1C**D. Espectro RMN-<sup>13</sup>C de **1C**

E. Espectro UV-vis **1C**F. Datos cristalográficos de **1C**·5(DMSO)

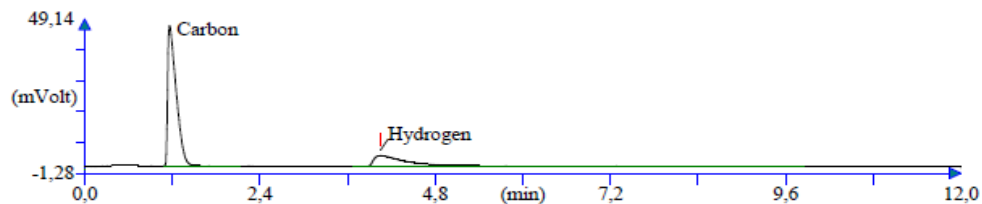
Parámetros del cristal	Datos / Valores
Número de depósito CCDC <sup>a</sup>	
Formula Empírica	C <sub>74</sub> H <sub>126</sub> O <sub>13</sub> S <sub>5</sub>
Peso formula	1384,04
Temperatura	200(2) K
Longitud de onda	0,710073 Å
Sistema cristalino	Triclinico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /c
Dimensiones de la celda unidad	a = 14,6491(2) Å b = 37,725(3) Å, β = 101,371(1) ° c = 11,723(1) Å
Volumen	6351(1) Å <sup>3</sup>
Z	4
D <sub>cal</sub>	1,171 g·cm <sup>-3</sup>
Coficiente de absorción	0,204 mm <sup>-1</sup>
F(000)	1508
Tamaño del cristal	0,23 x 0,2 x 0,2 mm <sup>3</sup>
Rango <i>tefa</i> para la recopilación de datos	3.056 a 27.499°.
Rangos de índice	-15 ≤ h ≤ 15, -17 ≤ k ≤ 17, -32 ≤ l ≤ 32
Reflexiones recogidas	100956
Reflexiones independientes	17974 [R(int) = 0,0913]
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1,037
Índices finales de R <sup>b</sup> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	R1 = 0,0718, wR2 = 0,1418
Índices R <sup>b</sup> (todos los datos)	R1 = 0,1274, wR2 = 0,1691
Pico y orificio de difracción más grandes	0,949 and -0,444 e·Å <sup>-3</sup>

**Anexo 4.** 2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.13,7.19,13.115,19]octacos-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaen-4,6,10,12,16,18,22,24-octail-octaacetato (2A)

**A. Espectro IR de 2A**

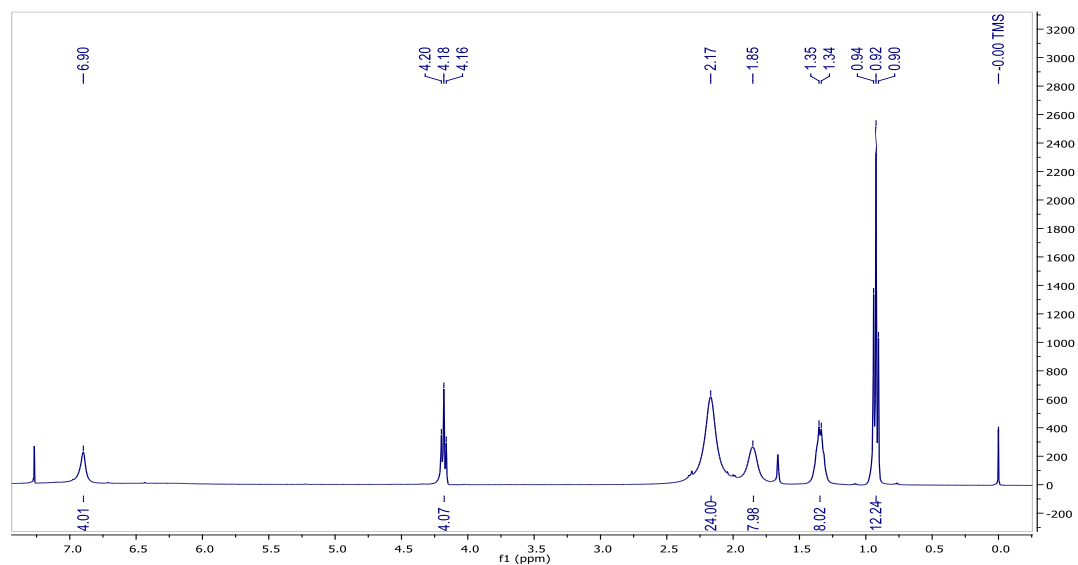
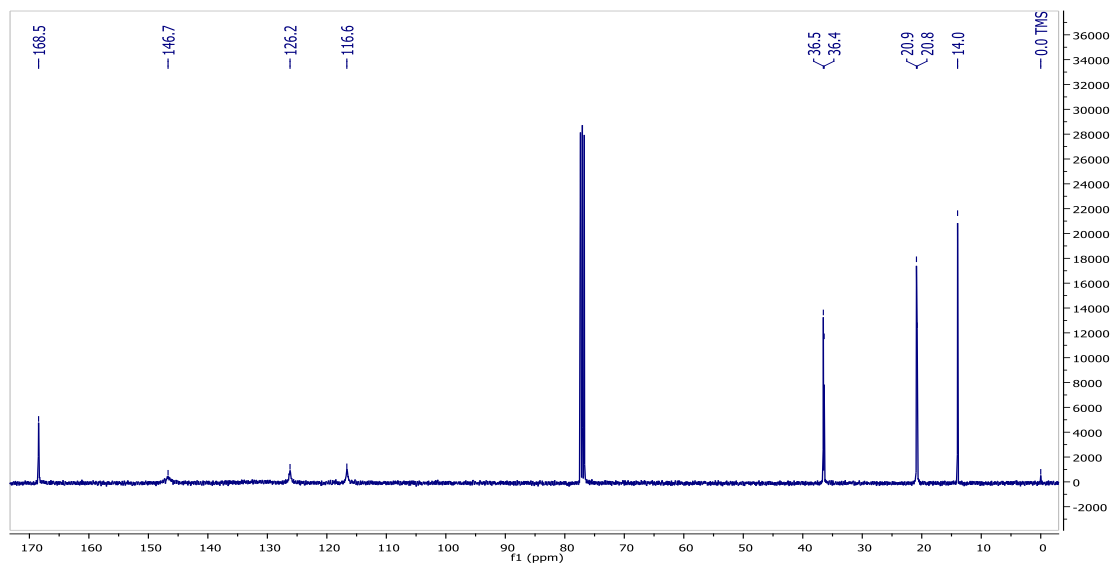


**B. . Análisis elemental de 2A**



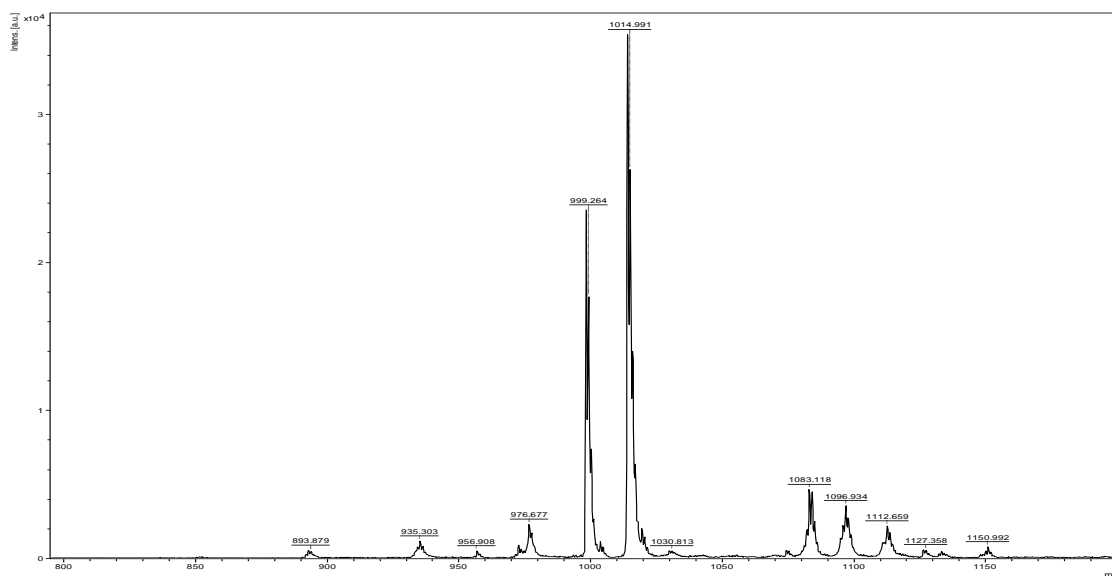
Operator ID:  
 Company name: ThermoFinnigan  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2017\JUNI  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/29/2017 14:30  
 Printed: 08-14-2017 15:39  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 17AEP-052 (# 16)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 17AEP-052.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.14  
 Protein factor: 6.25

Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Carbon	69.1308	70	3745522 RS	1.000000	.4743
Hydrogen	6.5978	243	1156884 RS	3.237595	.1520
Totals	75.7285		4902406		

C. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de **2A**D. Espectro RMN-<sup>13</sup>C de **2A**

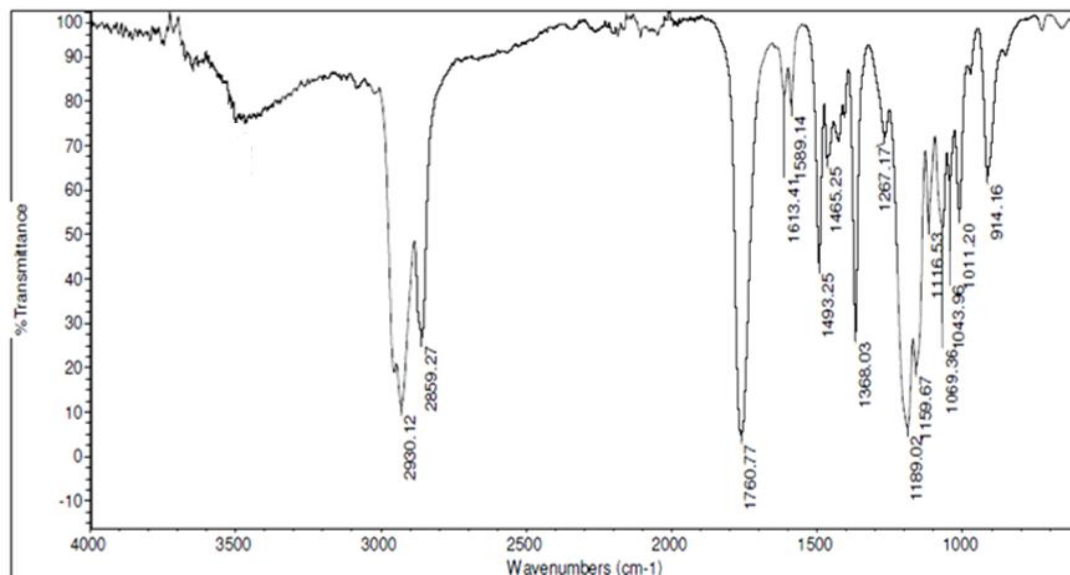
E. Datos cristalográficos de **2A**

Parámetros del cristal	Datos / Valores
Número de depósito CCDC <sup>a</sup>	1498775
Formula Empírica	C <sub>56</sub> H <sub>64</sub> O <sub>16</sub>
Peso formula	993,07
Temperatura	200(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclinic
Grupo espacial	<i>P2<sub>1</sub>/c</i>
Dimensiones de la celda unidad	<i>a</i> = 33,827(7) Å <i>b</i> = 13,972(1) Å, $\beta$ = 102,50(1) ° <i>c</i> = 22,918(3) Å
Volumen	10575(3) Å <sup>3</sup>
Z	8
D <sub>cal</sub>	1,248 mg/m <sup>-3</sup>
Coefficiente de absorción	0.091 mm <sup>-1</sup>
F(000)	4224
Tamaño del cristal	0,31 x 0,20 x 0,13 mm <sup>3</sup>
Rango <i>teta</i> para la recopilación de datos	3,04 a 25,24°
Rangos de índice	-40 a 40 -16 a 16 -27 a 27
Reflexiones recogidas	143281
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1,054
Indices finales de <i>R</i> <sup>b</sup> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	1,044
Índices <i>R</i> <sup>b</sup> (todos los datos)	<i>R</i> 1 = 0,077, w <i>R</i> 2 = 0,159
Pico y orificio de difracción más grandes	<i>R</i> 1 = 0,166, w <i>R</i> 2 = 0,204
Coefficiente de absorción	0,532 and -0,243 e·Å <sup>-3</sup>

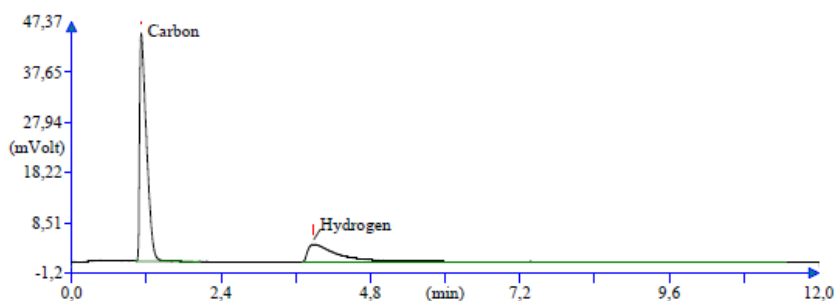
F. MALDI-TOF-MS **2A**

**Anexo 5.** 2,8,14,20-tetrapentilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacos-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaen-4,6,10,12,16,18,22,24-octail-octaacetato (2B)

**A. Espectro IR de 2B**



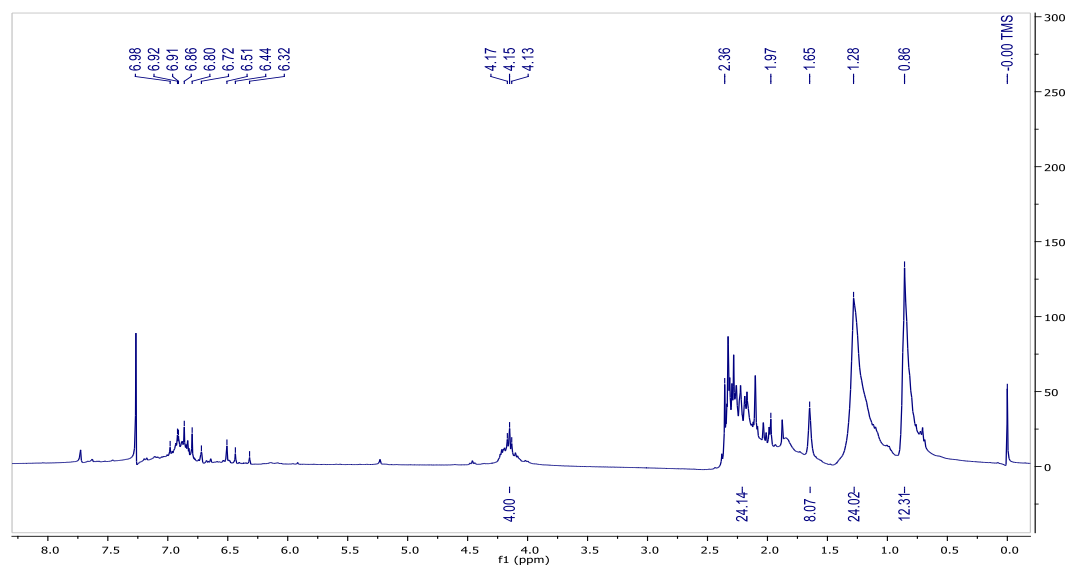
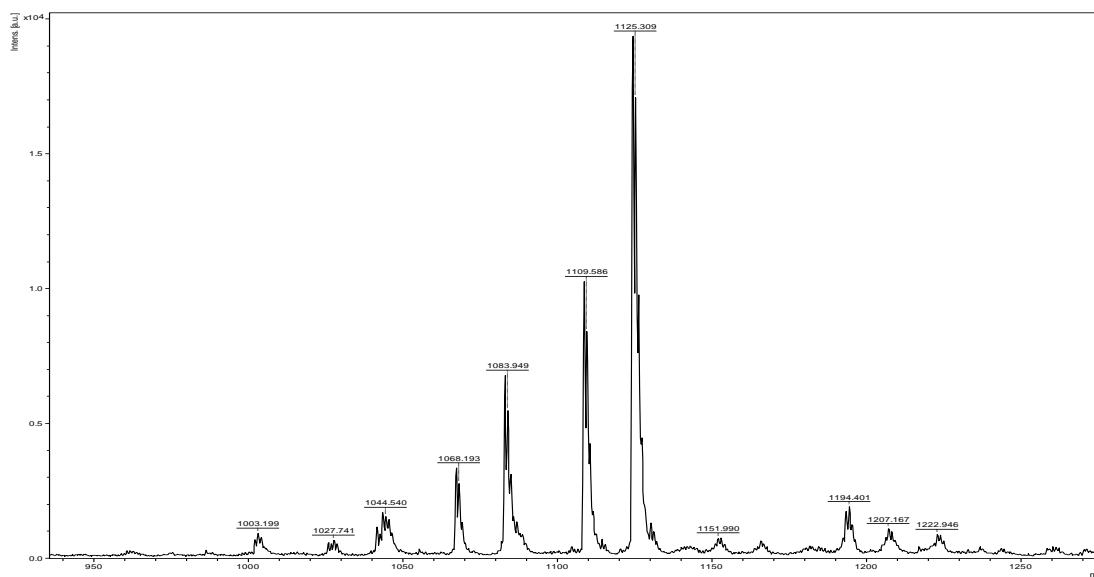
**B. Análisis elemental de 2B**



Operator ID: WALTER MEDINA  
 Company name: UN-BOGOTA  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2017\SEPTIEM  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 09/08/2017 18:03  
 Printed: 03-14-2019 08:30  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 17AEPD-002 (# 10)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 17AEPD-002.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.024  
 Protein factor: 6.25

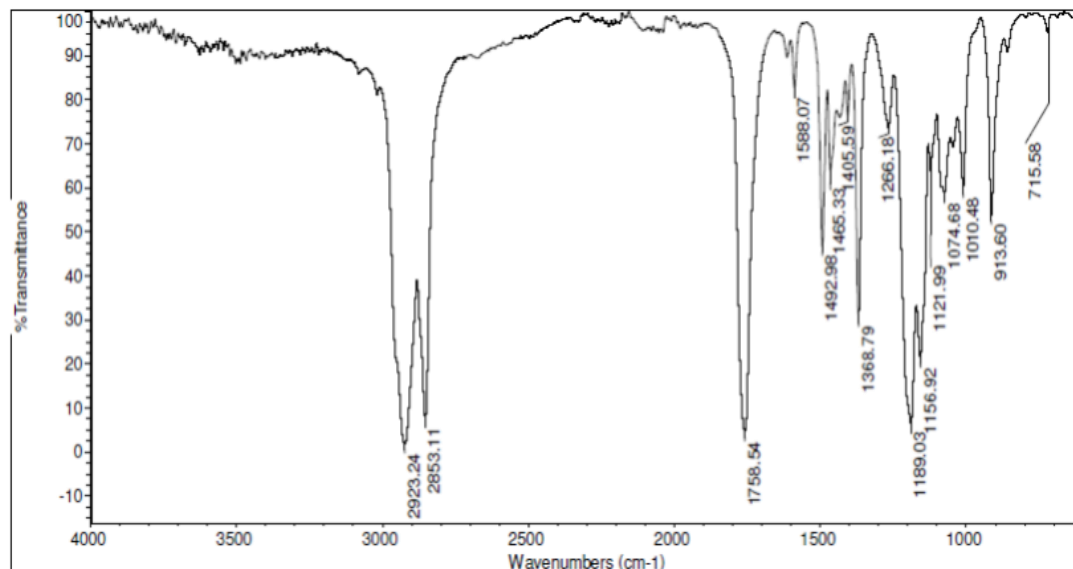
Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Carbon	70.0712	67	3413280	FU	1.000000 .4742
Hydrogen	7.2850	234	1151910	RS	2.963148 .1504
Totals	77.3562		4565190		



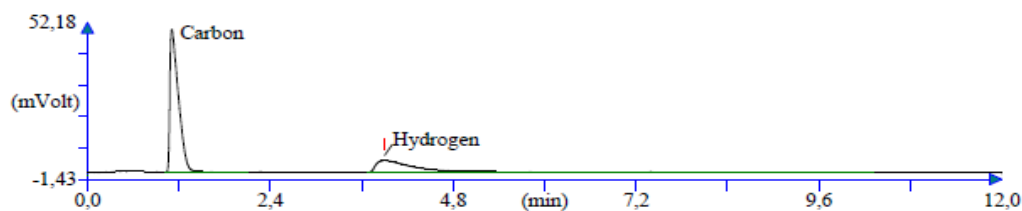
C. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de **2B**D. MALDI-TOF-MS **2B**

**Anexo 6.** 2,8,14,20-tetranonilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacos-1(25),3(28),4,6,9(27),10,12,15(26),16,18,21,23-dodecaen-4,6,10,12,16,18,22,24-octail-octaacetato (2C)

**A. Espectro IR de 2C**

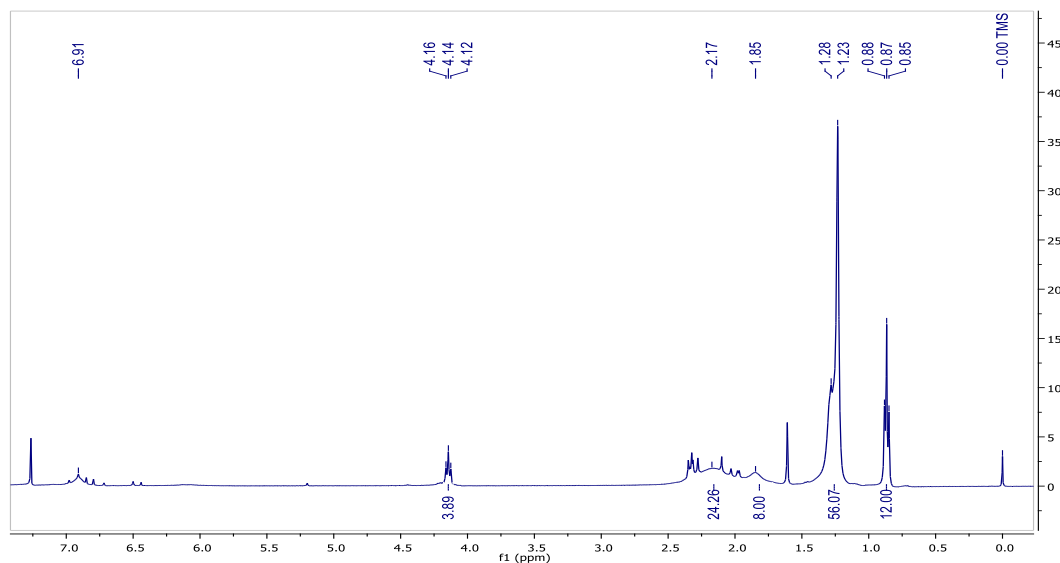


**B. Análisis elemental de 2C**



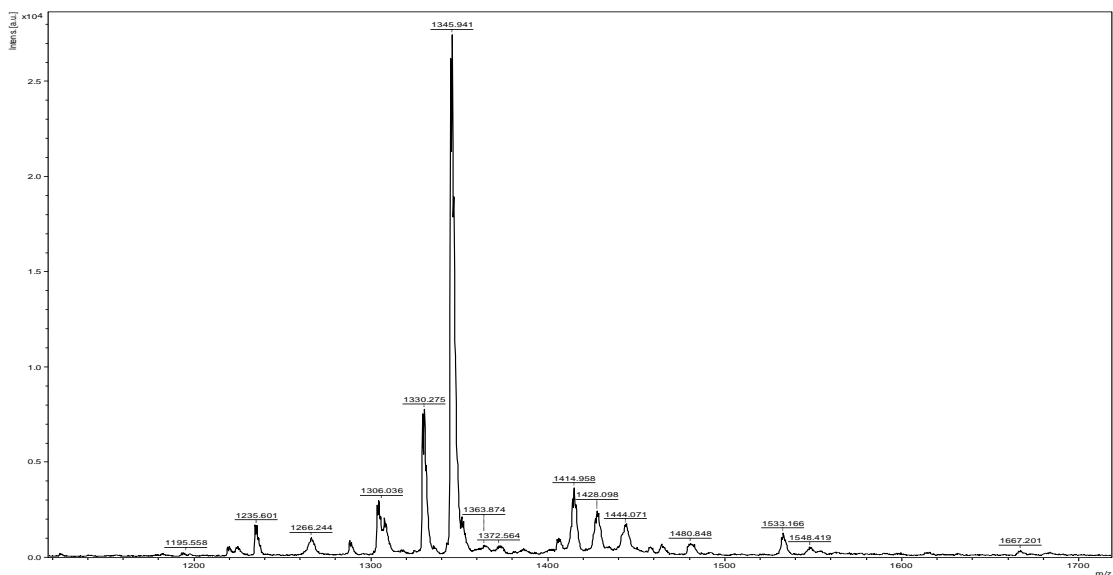
Operator ID:  
 Company name: ThermoFinnigan  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2017JULIC  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 07/06/2017 12:13  
 Printed: 08-14-2017 16:03  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 17AEP-064 (# 12)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 17AEP-064.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.103  
 Protein factor: 6.25

Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Carbon	74.8105	67	3816892	RS	1.000000 .4617
Hydrogen	8.6665	234	1441540	RS	2.647788 .1493
Totals	83.4770		5258432		

C. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de **2C**D. Datos cristalográficos **2C**·CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH

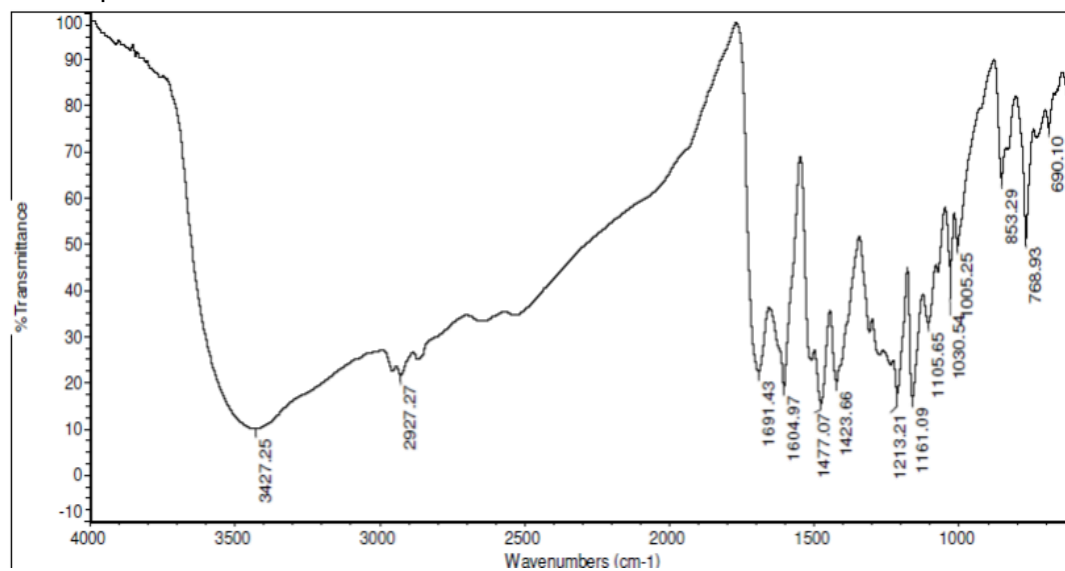
Parámetros del cristal	Datos / Valores
Formula Empírica	C <sub>82</sub> H <sub>118</sub> O <sub>17</sub>
Peso formula	1375.76
Temperatura	200(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Triclinic
Grupo espacial	<i>P</i> -1
Dimensiones de la celda unidad	<i>a</i> = 12.2580(12) Å <i>b</i> = 14.9453(11) Å, β = 82.360(9) ° <i>c</i> = 22.4795(18) Å □ = 76.789(6) °
Volumen	3973.3(6) Å <sup>3</sup>
Z	2
D <sub>cal</sub>	1.150 mg/m <sup>3</sup>
Coefficiente de absorción	0.079 mm <sup>-1</sup>
F(000)	1492
Tamaño del cristal	0.3 x 0.3 x 0.26 mm <sup>3</sup>
Rango <i>theta</i> para la recopilación de datos	3.001 to 25.242°
Rangos de índice	-14 a 14, -17 a 17, -26 a 26
Reflexiones recogidas	60345
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.030
Índices finales de R <sup>b</sup> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	R1 = 0.0841, wR2 = 0.2111
Índices R <sup>b</sup> (todos los datos)	R1 = 0.0841, wR2 = 0.2111

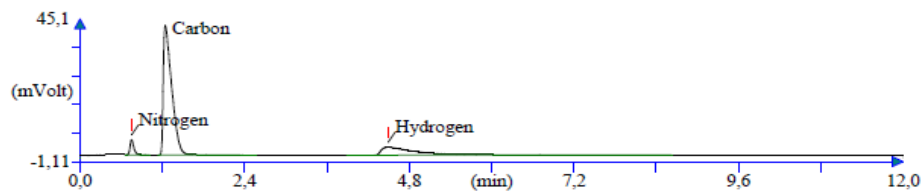
## E. MALDI-TOF-MS 2C



**Anexo 7.** 4,6,10,12,16,18,22,24-octahidroxi-5,11,17,23-tetrakis[*p*-(4-carboxifenilazo)] - 2,8,14,20-tetrapropilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacos-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno (3A)

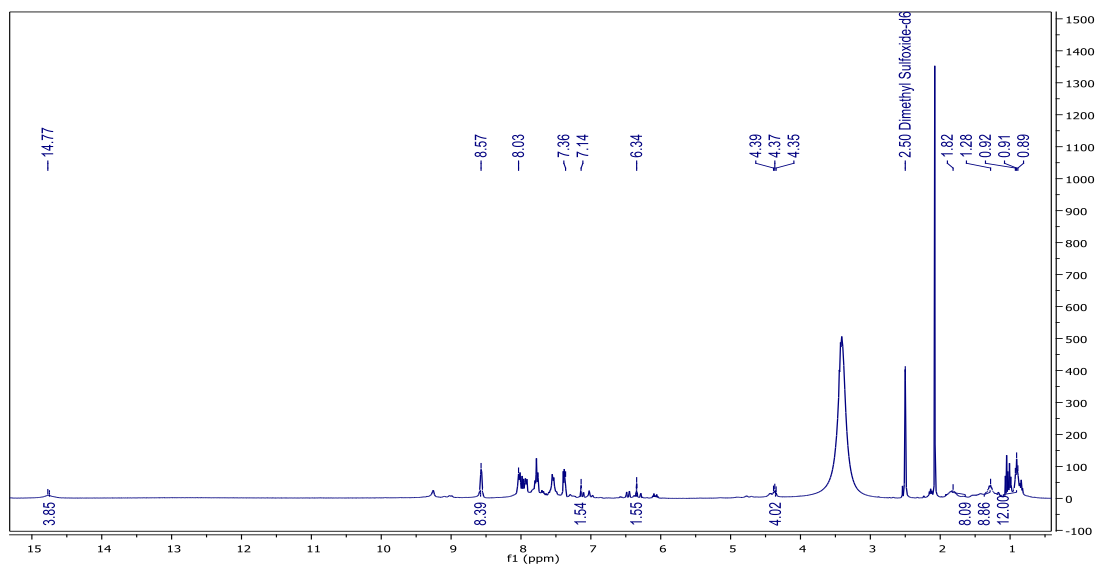
## A. Espectro IR de 3A

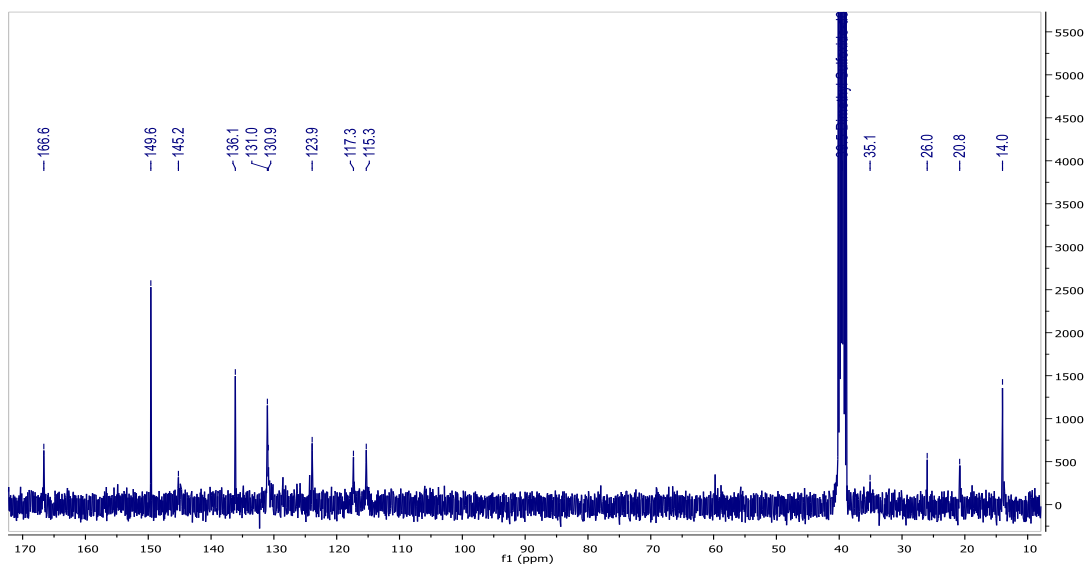
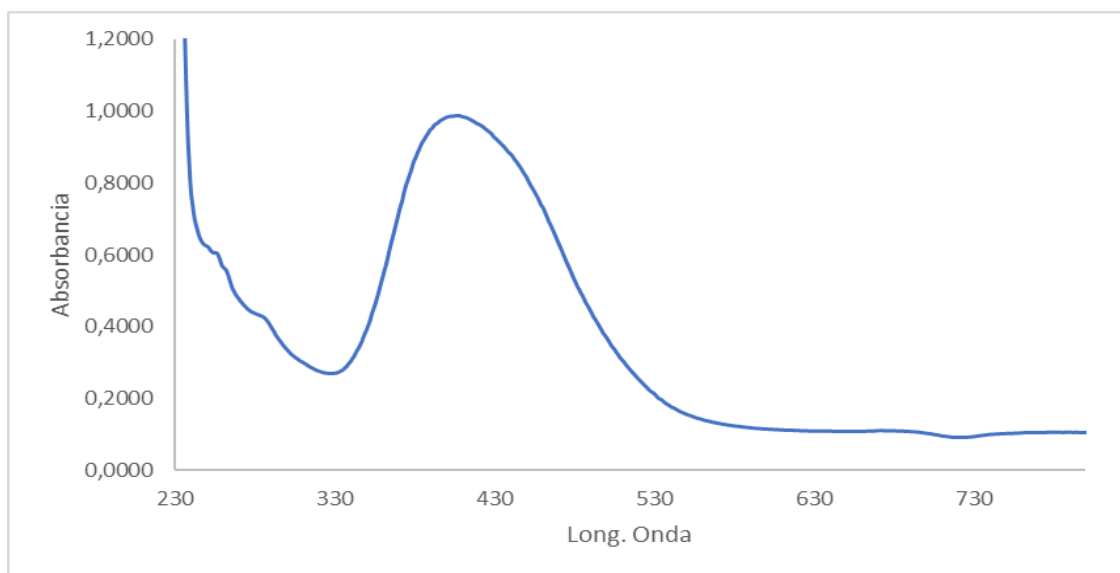


B. Análisis elemental de **3A**

Operator ID:  
 Company name: ThermoFinnigan  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2017\JUNI  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/29/2017 15:26  
 Printed: 08-14-2017 15:42  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 17AEP-055 (# 19)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 17AEP-055.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.15  
 Protein factor: 6.25

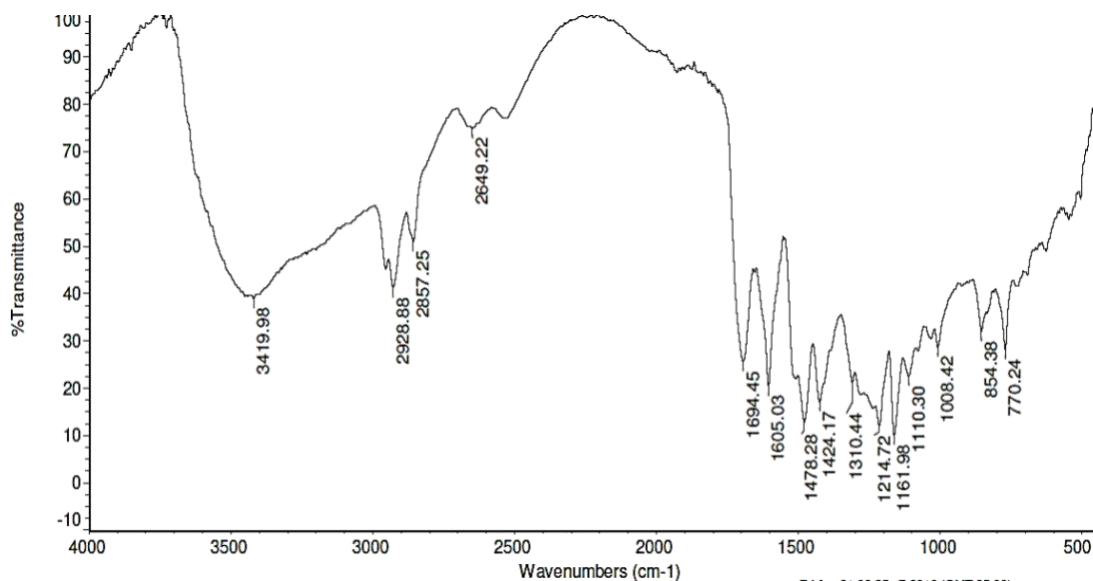
Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Nitrogen	8.0809	45	185973	RS 19.300920	.2001
Carbon	65.6685	75	3589440	RS 1.000000	.4743
Hydrogen	5.4742	270	970418	RS 3.698860	.1520
Totals	79.2236		4745831		

C. Espectros RMN-<sup>1</sup>H de **3A**

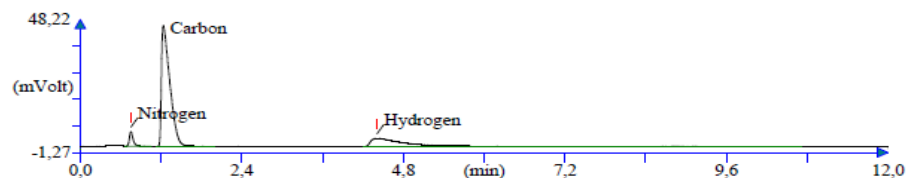
D. Espectro RMN-<sup>13</sup>C de **3A**E. Espectro UV-vis de **3A**

**Anexo 8.** 4,6,10,12,16,18,22,24-octahidroxi-5,11,17,23-tetrakis[*p*-(4-carboxifenilazo)]-2,8,14,20-tetrapentilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacos-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno (3B)

**A. Espectro IR de 3B**

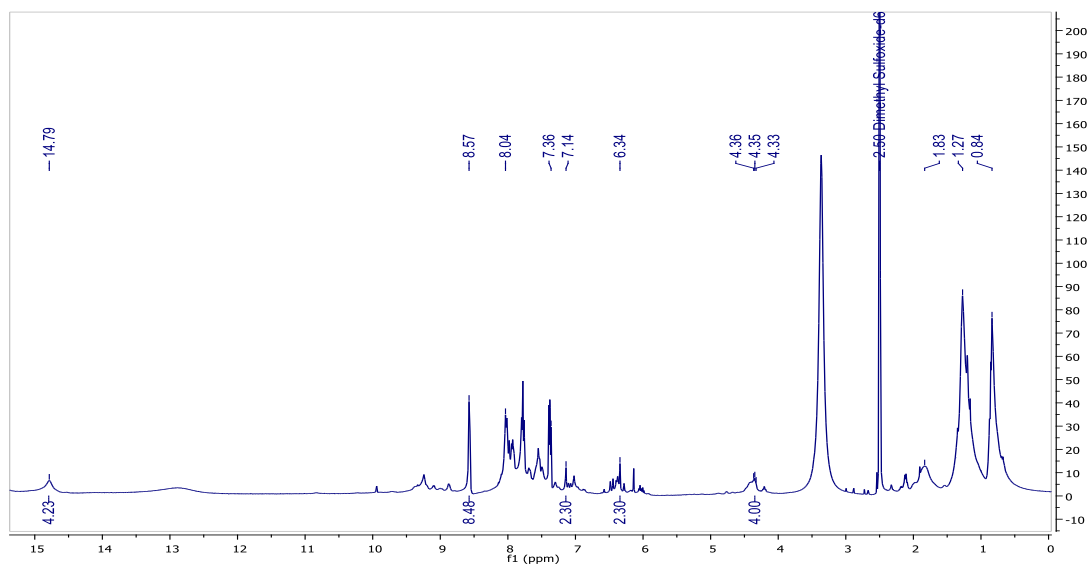
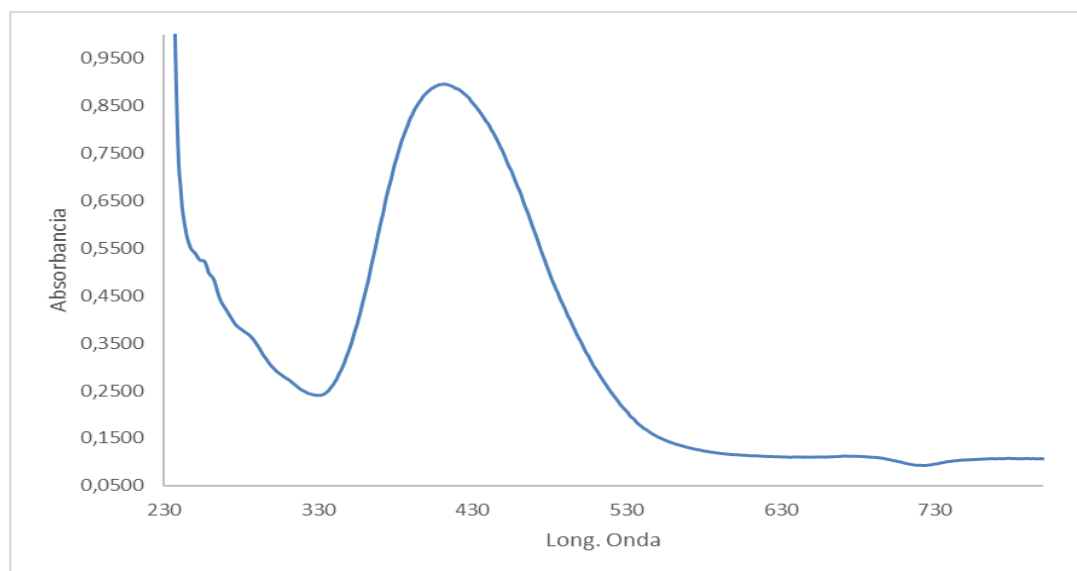


**B. Análisis elemental de 3B**



Operator ID:  
 Company name: ThermoFinnigan  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2017\JUNI\NCHS  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/29/2017 18:41  
 Printed: 08-14-2017 15:46  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 17AEP-057 (# 22)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 17AEP-057.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.237  
 Protein factor: 6.25

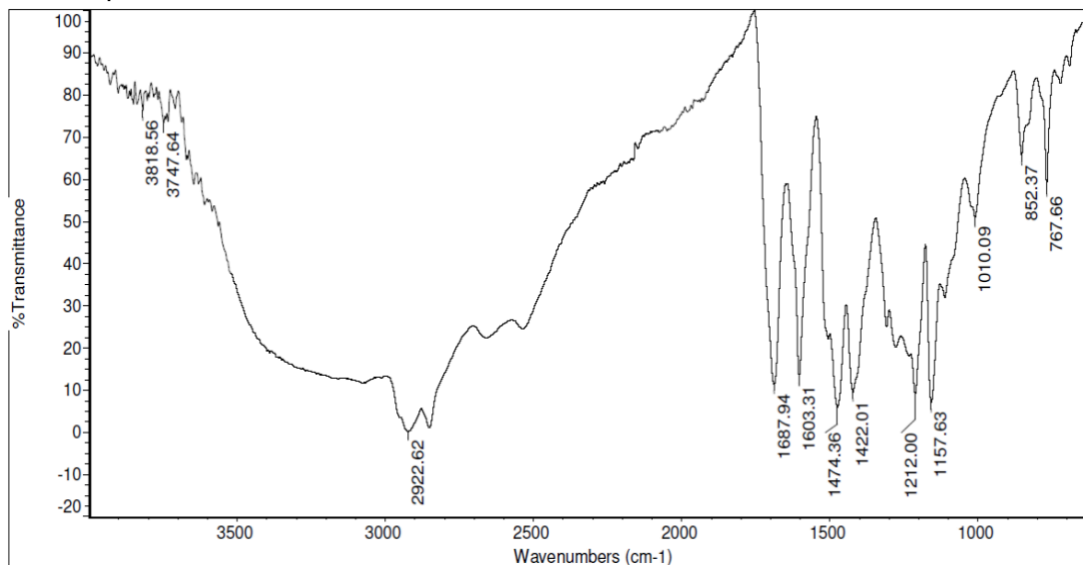
Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Nitrogen	8.2873	45	205152	RS	18.998850 .2001
Carbon	66.3024	74	3897653	RS	1.000000 .4743
Hydrogen	5.7891	265	1102086	FU	3.536614 .1520
Totals	80.3788		5204891		

C. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de **3B**D. Espectro UV-vis de **3B**

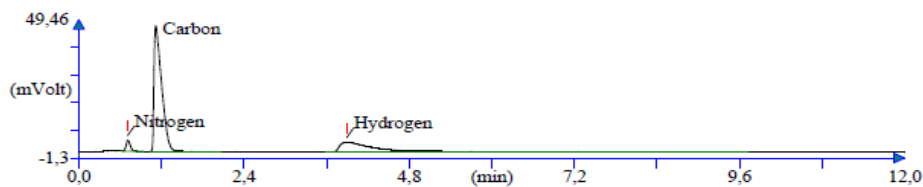


**Anexo 9.** 4,6,10,12,16,18,22,24-octahidroxi-5,11,17,23-tetrakis[*p*-(4-carboxifenilazo)]-2,8,14,20-tetranonilpentaciclo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,19</sup>]octacos-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno (3C)

**A. Espectro IR de 3C**

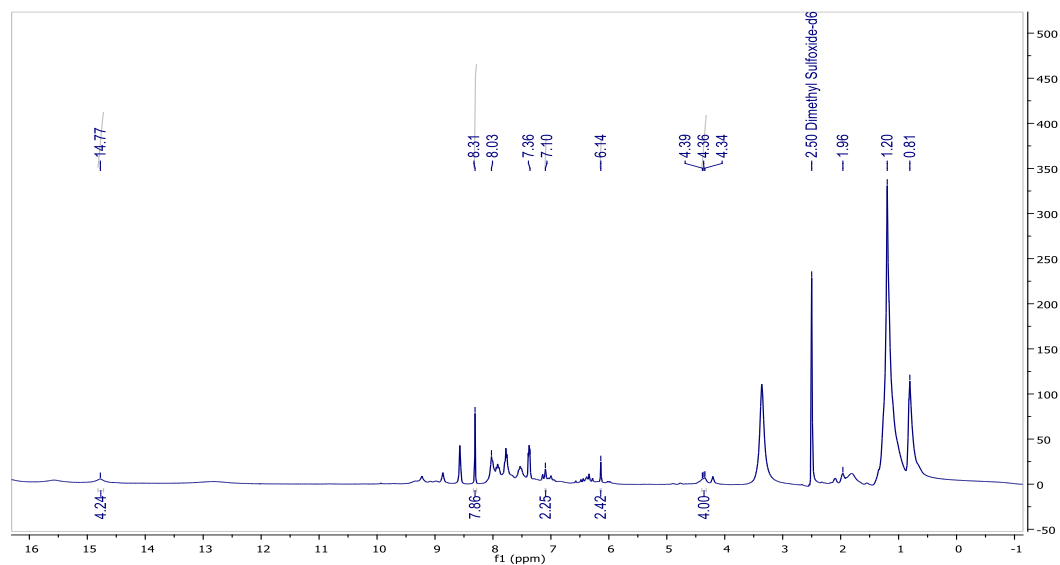
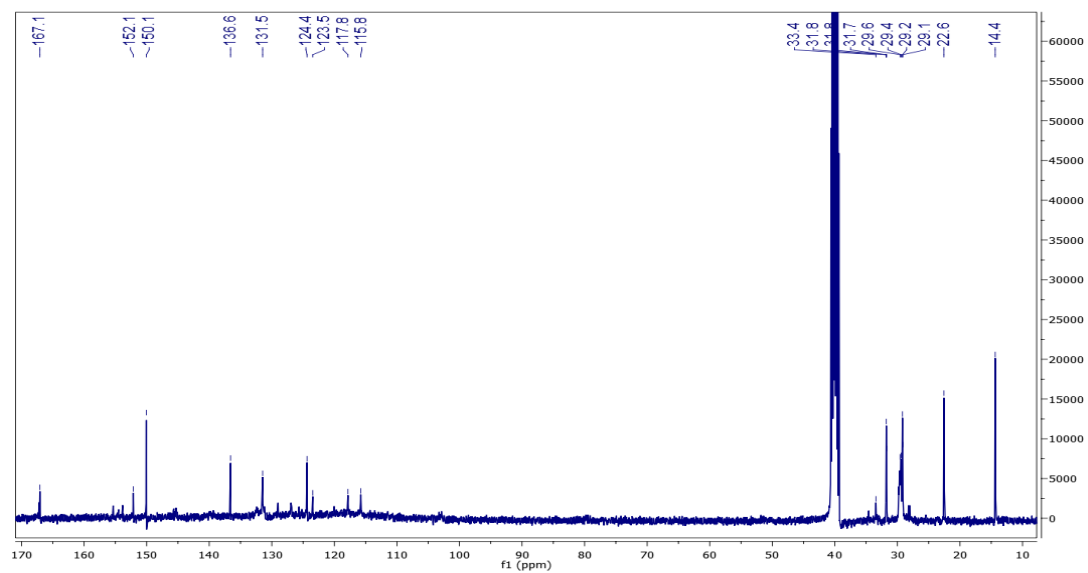


**B. Análisis elemental de 3C**

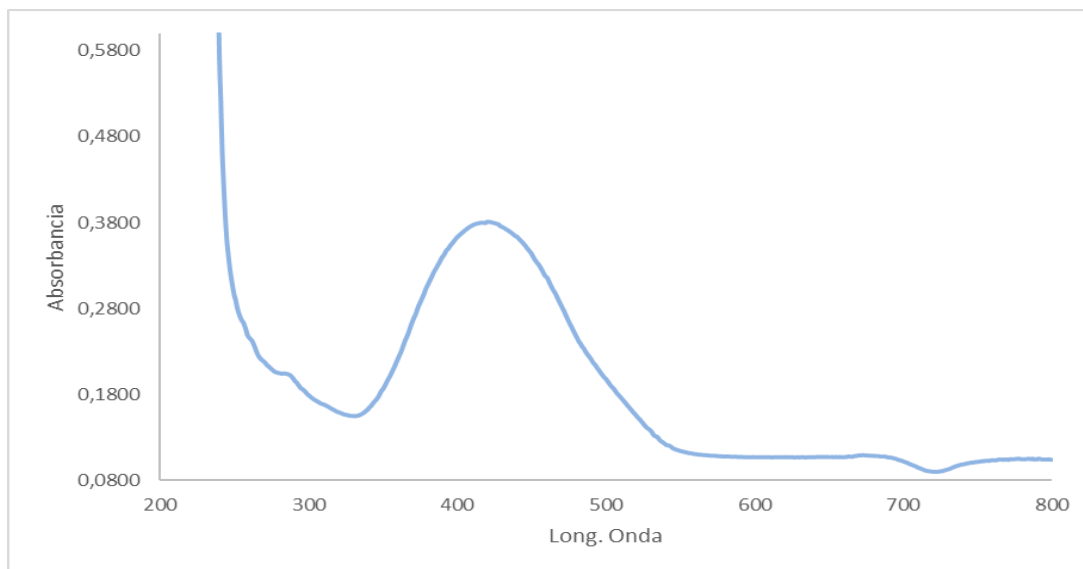


Operator ID:  
 Company name: ThermoFinnigan  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2017\JULIC  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 07/06/2017 11:43  
 Printed: 08-14-2017 16:01  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 17AEP-062 (# 10)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 17AEP-062.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.113  
 Protein factor: 6.25

Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Nitrogen	7.1374	43	169042	RS 21.122030	.2127
Carbon	69.3437	67	3570500	RS 1.000000	.4617
Hydrogen	7.1420	234	1201022	RS 2.972885	.1493
Totals	83.6231		4940564		

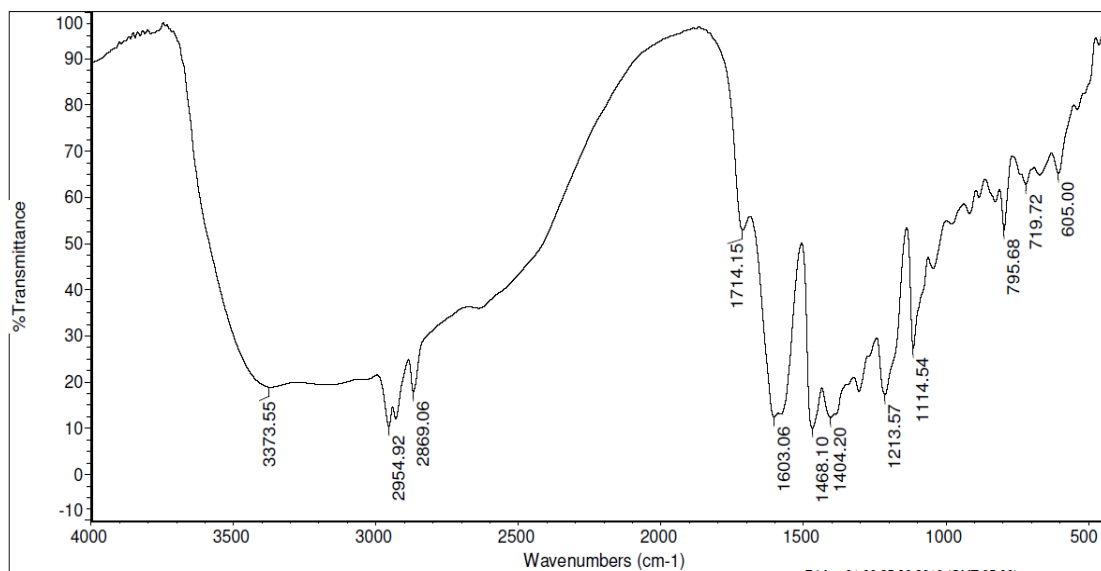
C. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de **3C**D. Espectro RMN-<sup>13</sup>C de **3C**

## E. Espectro UV-vis de 3C

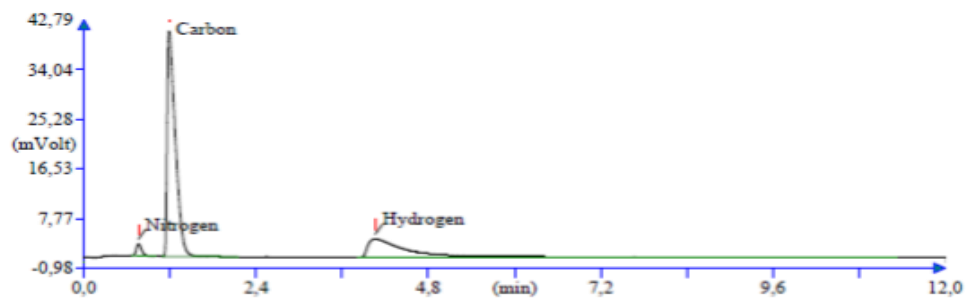


**Anexo 10.** 2,12,22,32-tetrapropil-4,14,24,34-tetrahidroxi-7,17,27,37-tetra-(2-carboxi etil)-7,17,27,37-tetra-azanonaciclo[31.3(7).1.1<sup>3,11</sup>.1<sup>13,21</sup>.1<sup>23,31</sup>1(41).3.5(10)-11(44).13.1<sup>23,31</sup>.0<sup>5,10</sup>.0<sup>15,20</sup>.0<sup>25,30</sup>.0<sup>35,40</sup>]tetraconta[15(20),21(43),23,25(30),31(42),33,35(41)]dodeceno (4A)

## A. Espectro IR de 4A

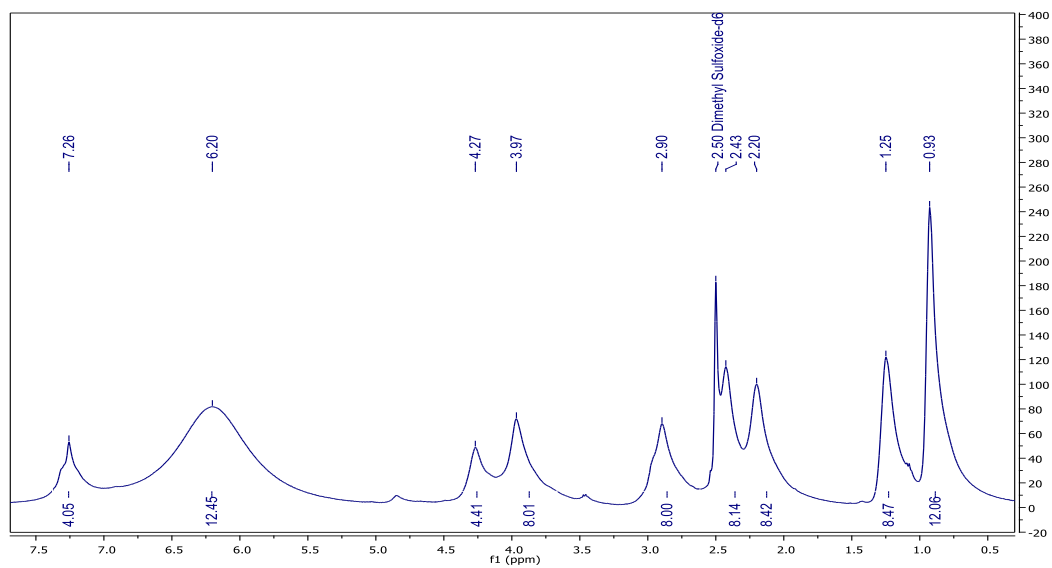


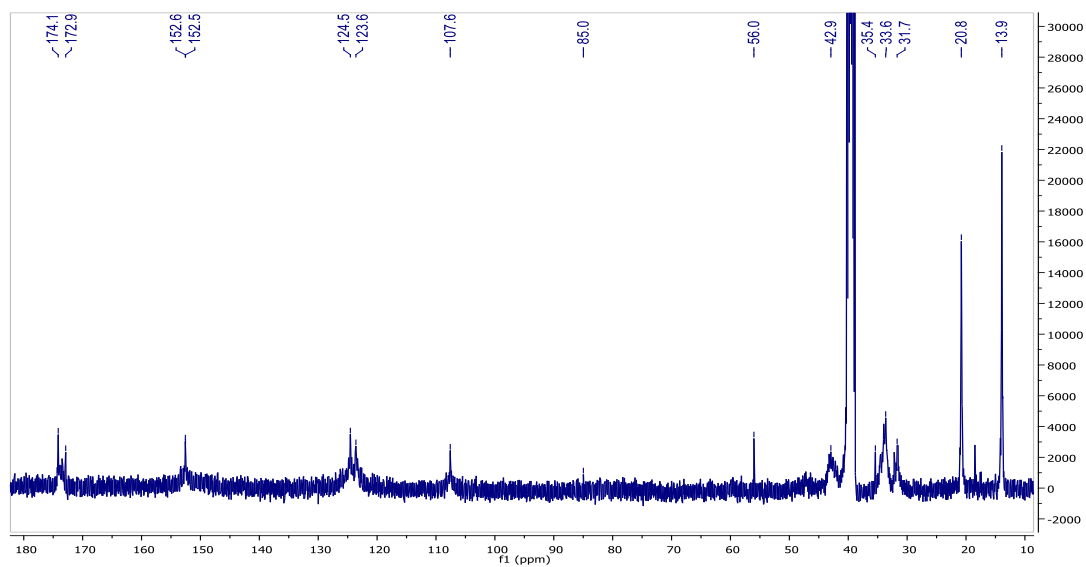
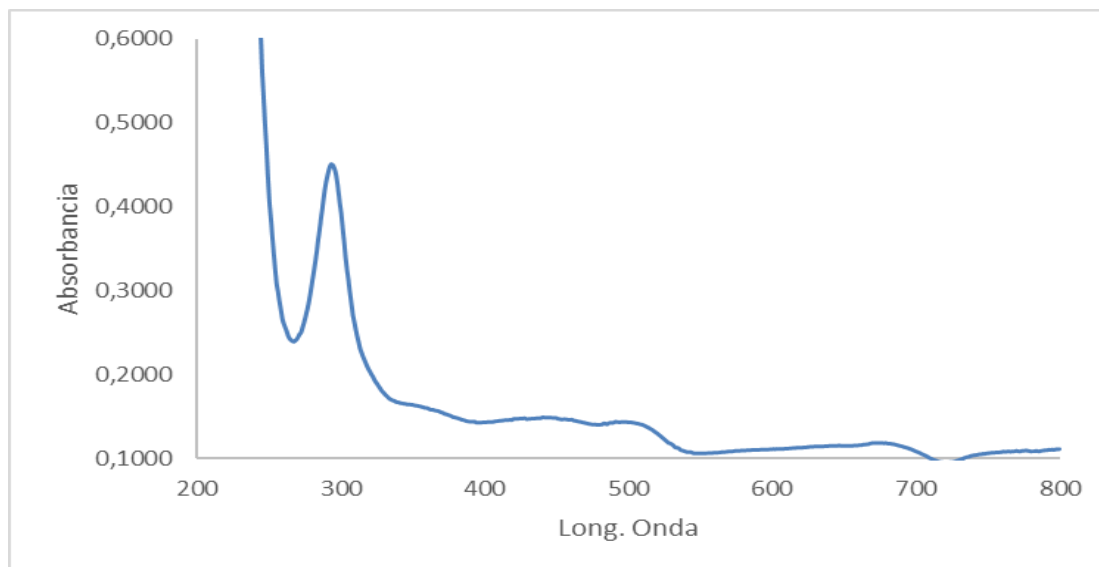
## B. Análisis elemental de 4A



Operator ID: WALTER MEDINA  
 Company name: UN-BOGOTA  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2018JUNIO\20  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/26/2018 12:11  
 Printed: 06-26-2018 16:46  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 1SAQ-109 (# 34)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 1SAQ-109.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.082  
 Protein factor: 6.25

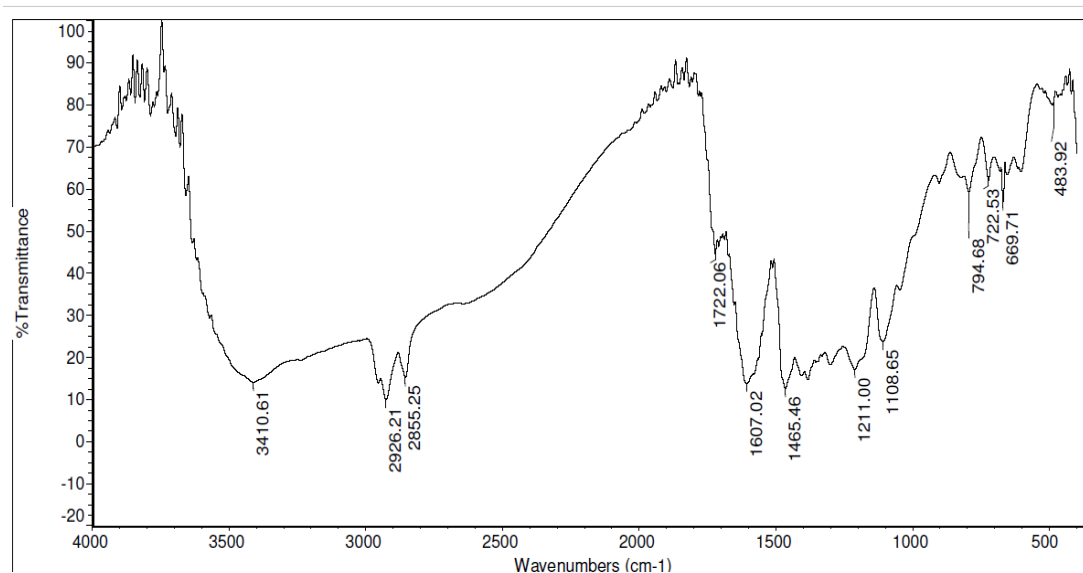
Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Nitrogen	4.4151	46	103512	RS	30.558410 .2166
Carbon	60.9011	71	3163162	RS	1.000000 .4783
Hydrogen	6.9026	244	1152374	RS	2.744909 .1530
Totals	72.2188		4419048		

C. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de 4A

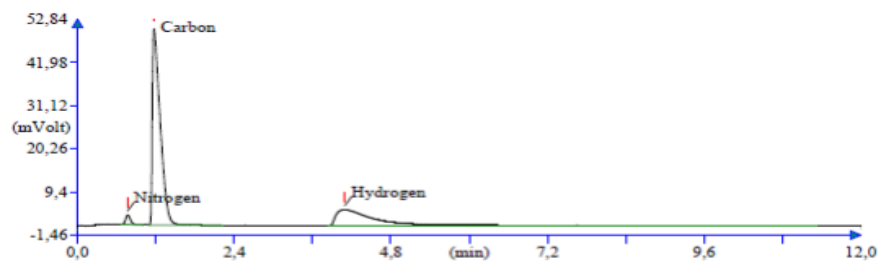
D. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de **4A**E. Espectro UV-vis de **4A**

**Anexo 11.** 2,12,22,32-tetrapentil-4,14,24,34-tetrahidroxi-7,17,27,37-tetra-(2-carboxi etil)-7,17,27,37-tetra-azanociclo[31.3(7).1.1<sup>3,11</sup>.1<sup>13,21</sup>.1<sup>23,31</sup>1(41).3.5(10)-11(44).13.1<sup>23,31</sup>.0<sup>5,10</sup>.0<sup>15,20</sup>.0<sup>25,30</sup>.0<sup>35,40</sup>]tetraconta[15(20),21(43),23,25(30),31(42),33,35 (41)]dodecaeno (4B)

**A. Espectro IR de 4B**

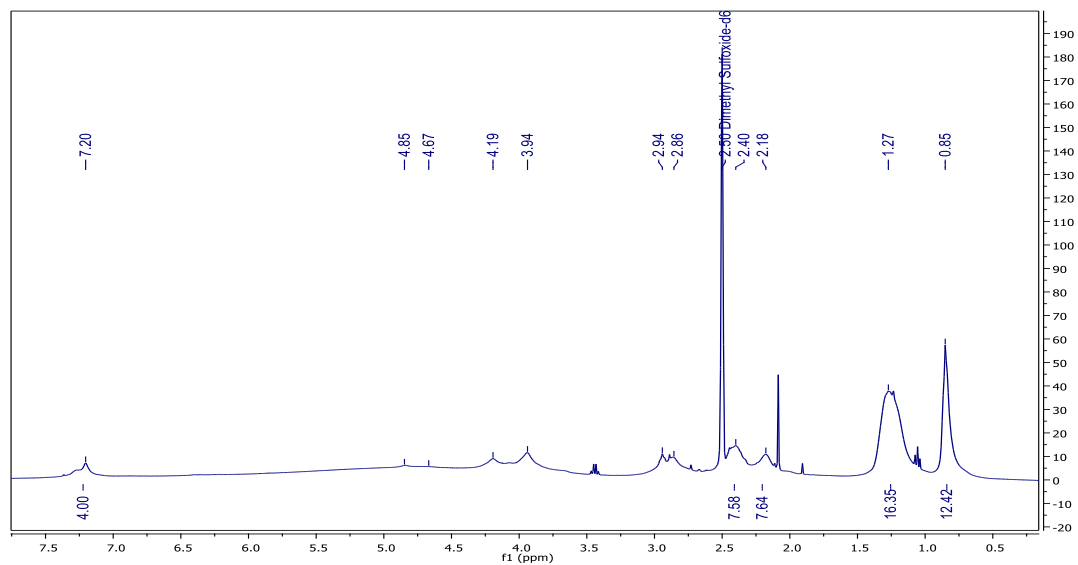
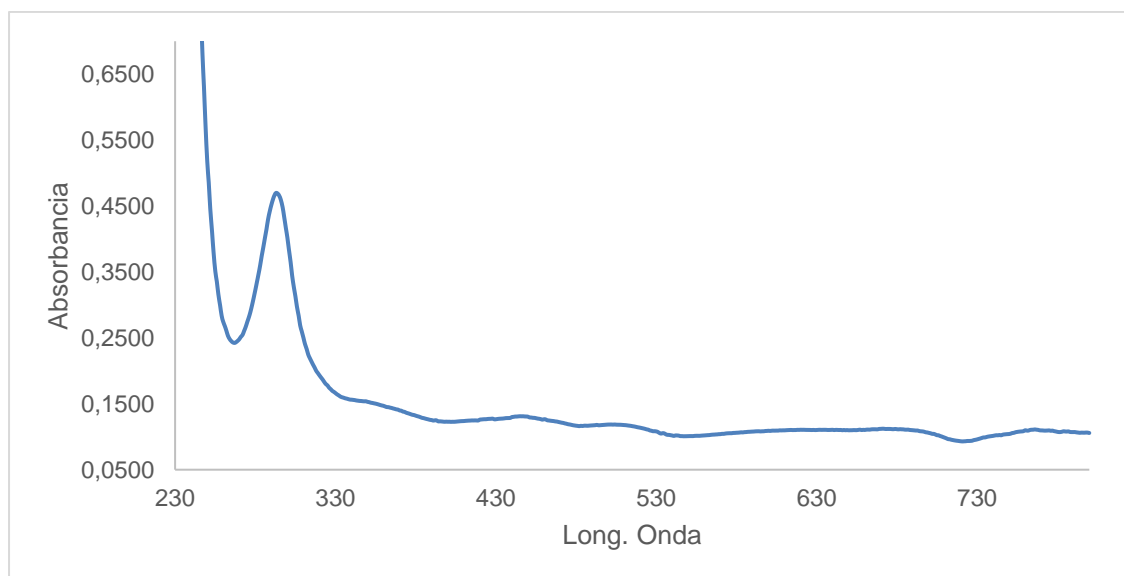


**B. Análisis elemental de 4B**



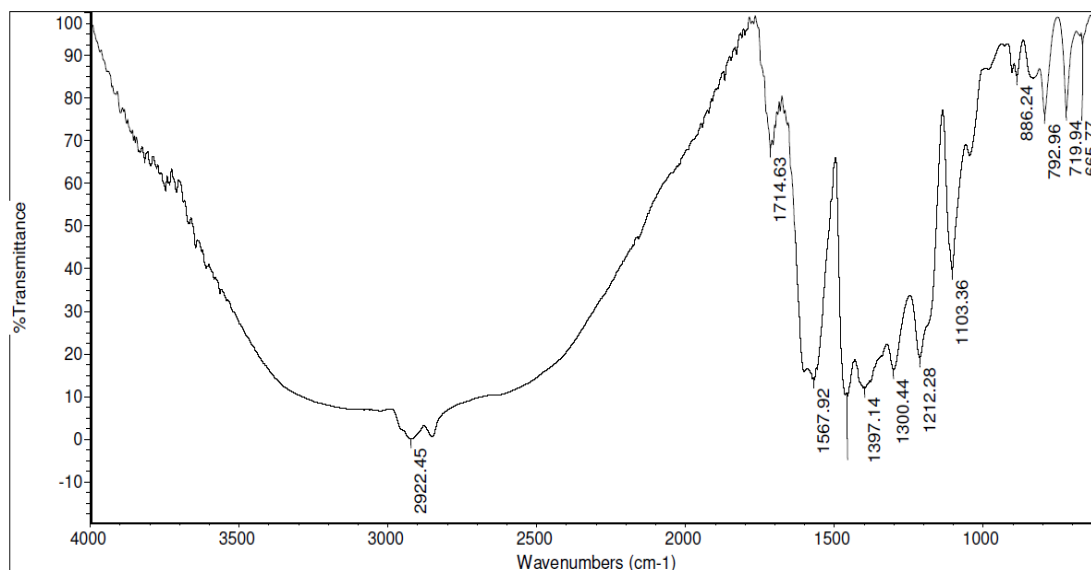
Operator ID: WALTER MEDINA  
 Company name: UN-BOGOTA  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2018\JUNIO\20  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/26/2018 12:24  
 Printed: 06-26-2018 16:47  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 18AQ-110 (# 35)  
 Analysis type: Unk:Known  
 Chromatogram filename: 18AQ-110.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.358  
 Protein factor: 6.25

Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa	
Nitrogen	4.0559	46	119345	RS	34.576620	.2166
Carbon	63.3528	71	4126547	RS	1.000000	.4783
Hydrogen	7.5054	246	1569272	RS	2.629593	.1530
Totals	74.9140		5815164			

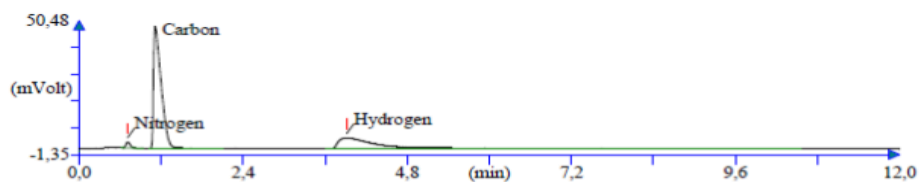
C. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de **4B**D. UV-vis de **4B**

**Anexo 12.** 2,12,22,32-tetranonil-4,14,24,34-tetrahidroxi-7,17,27,37-tetra-(2-carboxi etil)-7,17,27,37-tetra-azanonaciclo[31.3(7).1.1<sup>3,11</sup>.1<sup>13,21</sup>.1<sup>23,31</sup>1(41).3.5(10)-11(44).13.1<sup>23,31</sup>.0<sup>5,10</sup>.0<sup>15,20</sup>.0<sup>25,30</sup>.0<sup>35,40</sup>]tetraconta[15(20),21(43),23,25(30),31(42),33,35 (41)]dodecaeno (4C)

### A. Espectro IR de 4C



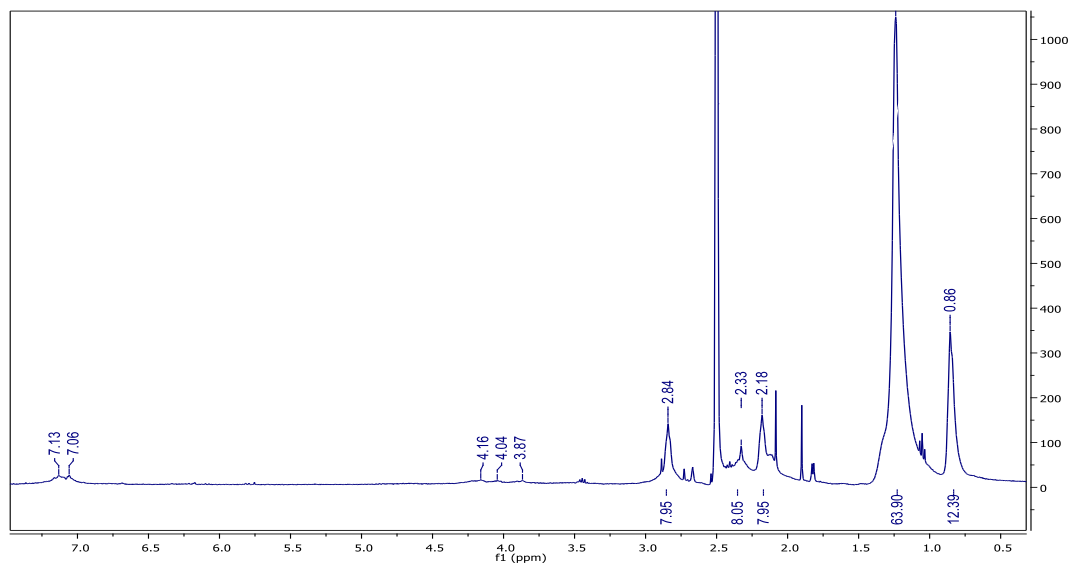
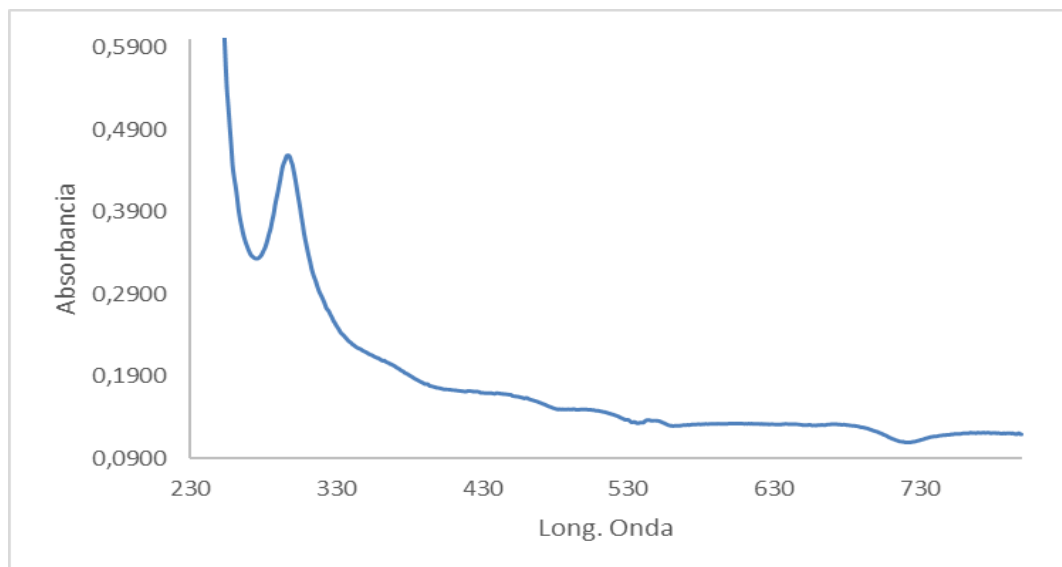
### B. Análisis elemental de 4C



Operator ID:  
 Company name: ThermoFinnigan  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2017\JULIO  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 07/06/2017 12:00  
 Printed: 08-14-2017 16:02  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 17AEP-063 (# 11)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 17AEP-063.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.164  
 Protein factor: 6.25

Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Nitrogen	4.0505	43	100326	RS	36.587690 .2127
Carbon	68.1698	67	3670697	RS	1.000000 .4617
Hydrogen	8.7955	235	1542942	RS	2.379024 .1493
Totals	81.0157		5313965		



C. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de **4C**D. Espectro UV-vis de **4C**

## 7.2 Caracterización de copolímeros sin funcionalizar

A continuación, se anexan los espectros IR-ATR, análisis elemental y MEB correspondientes a copolímeros sin funcionalizar:

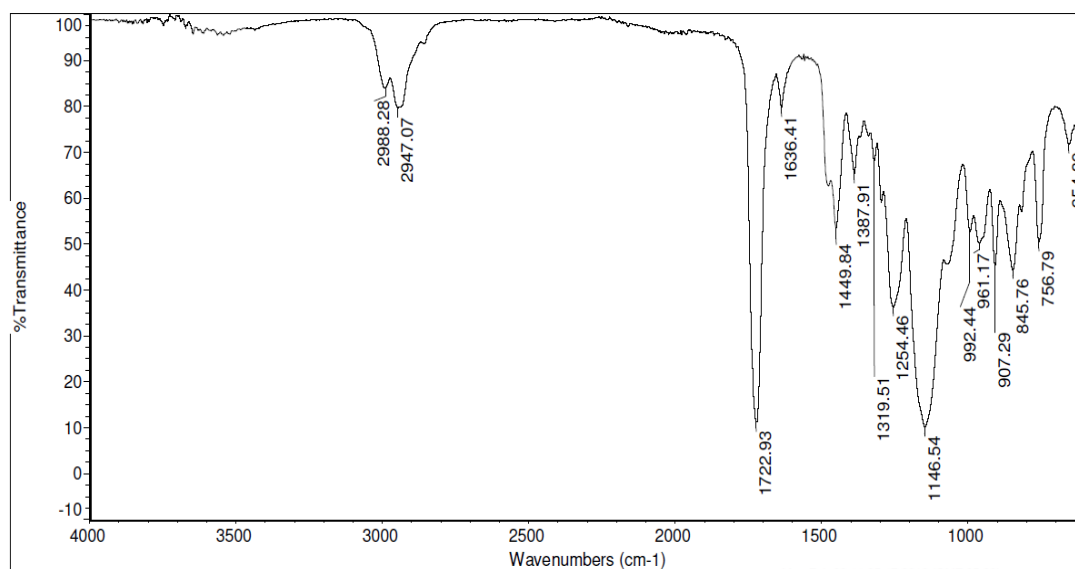
**Anexo 13.** *poli(MMA-co-EDMA-co-GMA)*

**Anexo 14.** *poli(GMA-co-EDMA)*

**Anexo 15.** *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*

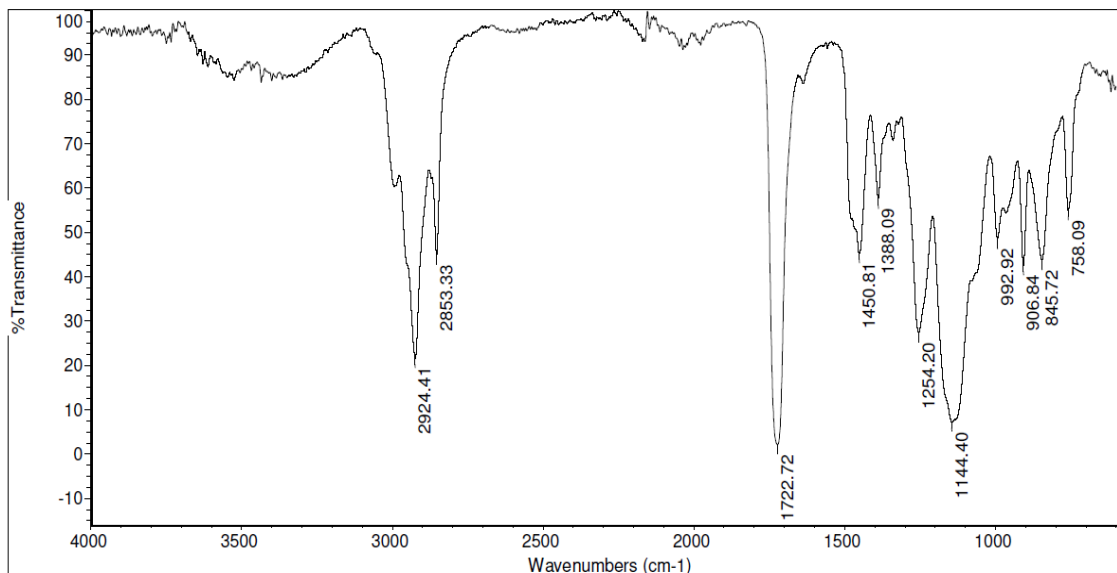
**Anexo 13.** *poli(MMA-co-EDMA-co-GMA)*

A. Espectro IR-ATR de *poli(MMA-co-EDMA-co-GMA)*

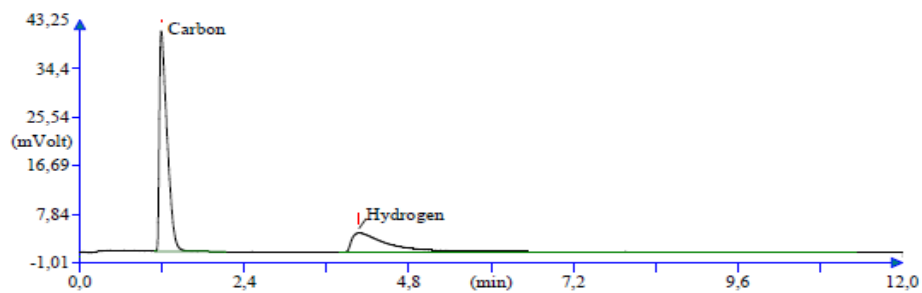


## Anexo 14. *poli(GMA-co-EDMA)*

### A. Espectro IR-ATR de *poli(GMA-co-EDMA)*



### B. Análisis elemental de *poli(GMA-co-EDMA)*

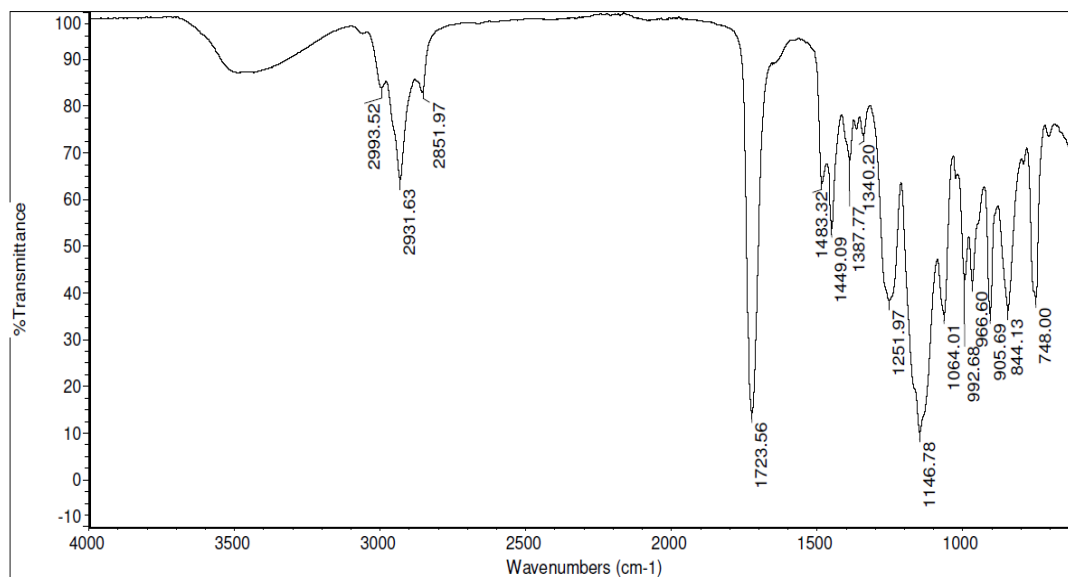


Operator ID: WALTER MEDINA  
 Company name: UN-BOGOTA  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2018\JUNIO\20  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/25/2018 21:28  
 Printed: 06-26-2018 16:22  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 18AQ-101 (# 24)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 18AQ-101.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.06  
 Protein factor: 6.25

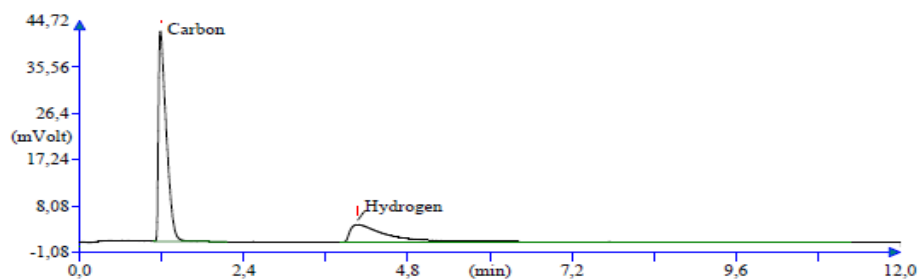
Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Carbon	62.4178	71	3175979	RS	1.000000 .4783
Hydrogen	7.8577	245	1284092	RS	2.473328 .1530
Totals	70.2755		4460071		

## Anexo 15. *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*

### A. Espectro IR-ATR de *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*



### B. Análisis elemental de *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*



Operator ID: WALTER MEDINA  
 Company name: UN-BOGOTA  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2018\JUNIO\20  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/26/2018 11:10  
 Printed: 06-26-2018 16:29  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 18AQ-105 (# 29)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 18AQ-105.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.157  
 Protein factor: 6.25

Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa	
Carbon	59.6854	71	3314384	RS	1.000000	4783
Hydrogen	7.0903	244	1264857	RS	2.620363	1530
Totals	66.7758		4579241			

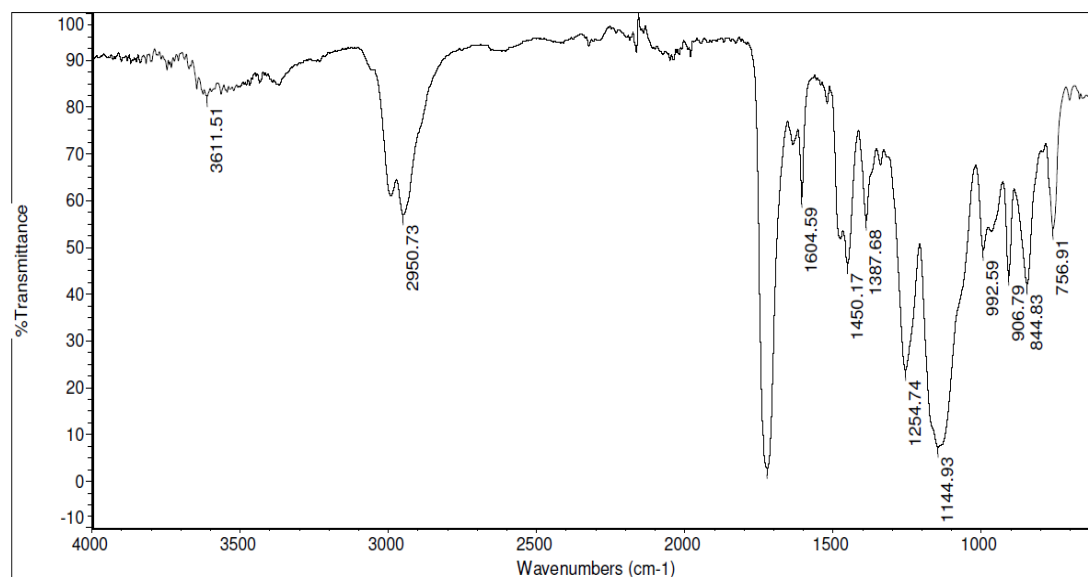
## 7.3 Caracterización de copolímeros funcionalizados

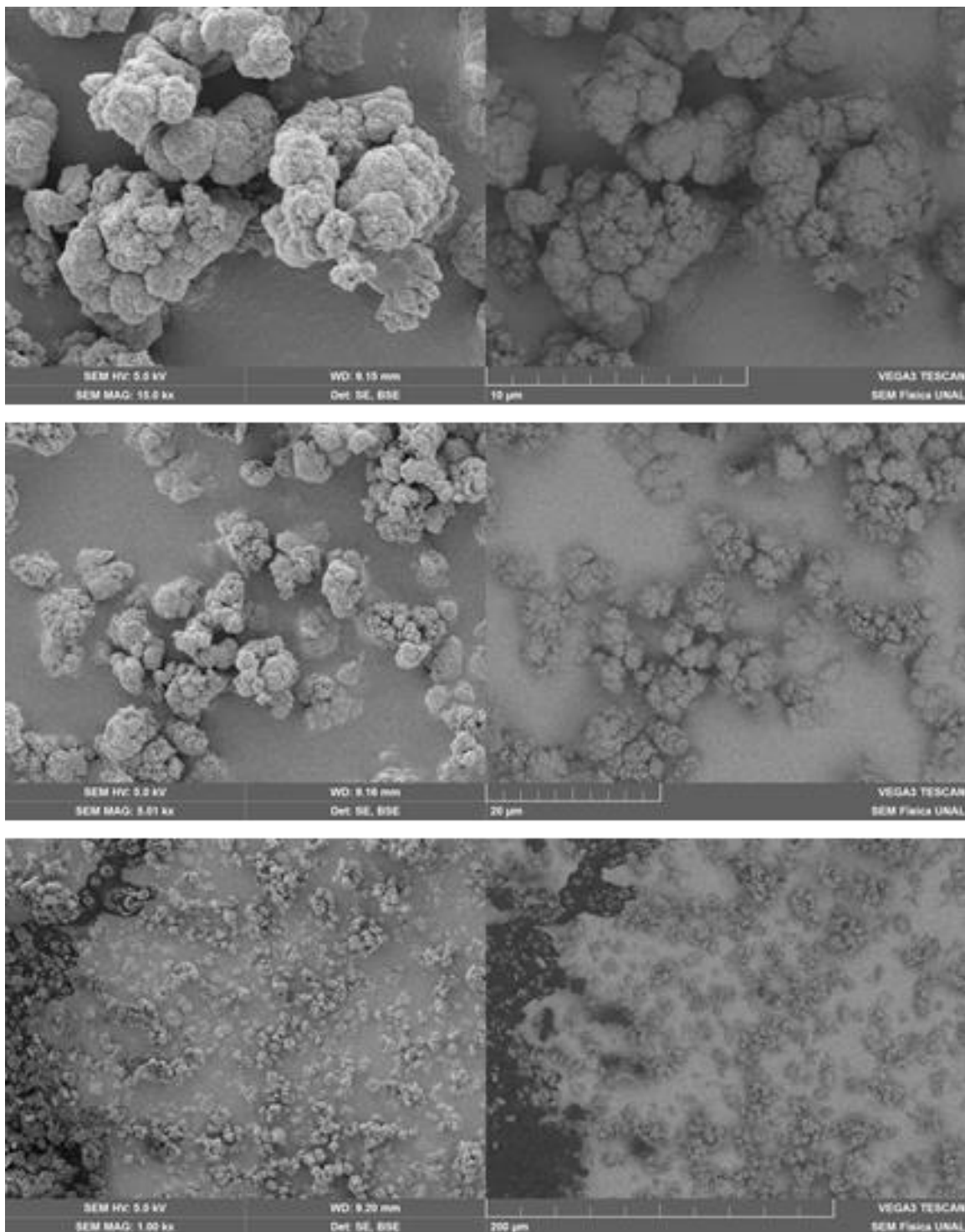
A continuación, se anexan los espectros IR-ATR, análisis elemental y MEB correspondientes a copolímeros funcionalizados:

- Anexo 16.** PABA-*poli*(GMA-co-EDMA)
- Anexo 17.** 4A-*poli*(GMA-co-EDMA)
- Anexo 18.** 4B-*poli*(GMA-co-EDMA)
- Anexo 19.** 4C-*poli*(GMA-co-EDMA)
- Anexo 20.** 4A-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA)
- Anexo 21.** 4B-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA)
- Anexo 22.** 4C-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA)

### Anexo 16. PABA-*poli*(GMA-co-EDMA)

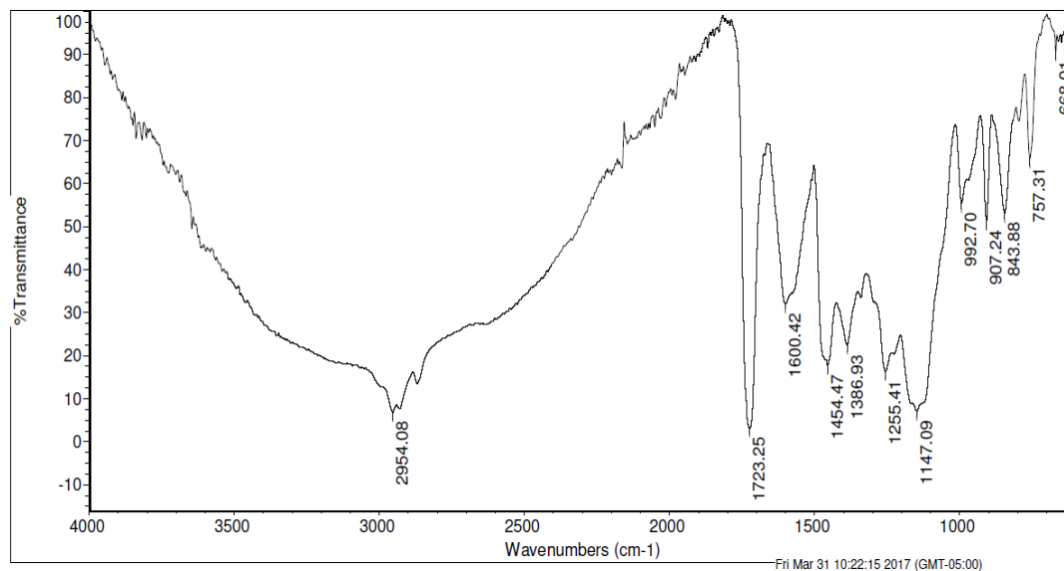
#### A. Espectro IR-ATR de PABA-*poli*(GMA-co-EDMA)



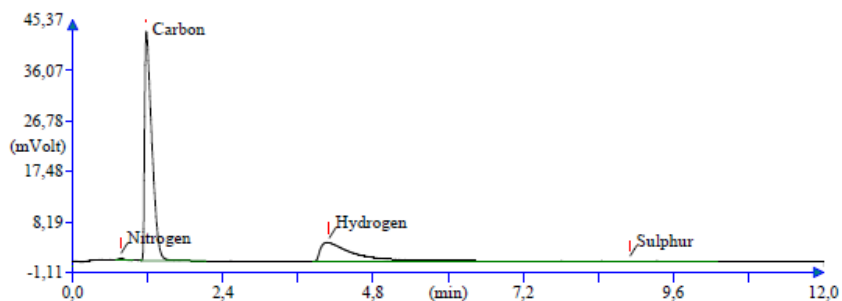
B. MEB de ácido PABA-*poli*(GMA-co-EDMA)

## Anexo 17. 4A-poli(GMA-co-EDMA)

### A. Espectro IR-ATR de 4A-poli(GMA-co-EDMA)

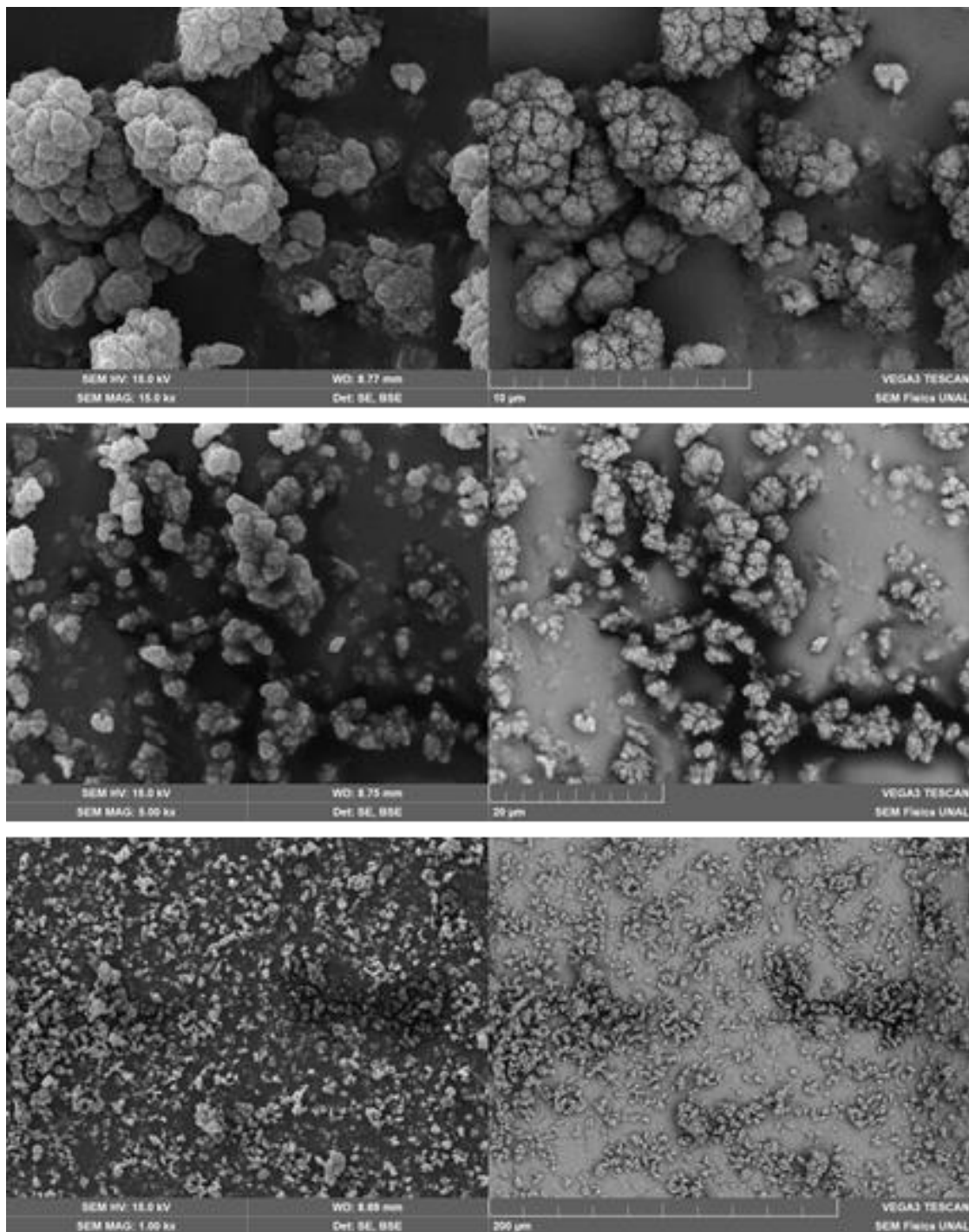


### B. Análisis elemental de 4A-poli(GMA-co-EDMA)



Operator ID: WALTER MEDINA  
 Company name: UN-BOGOTA  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2018\JUNIO\20  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/25/2018 21:40  
 Printed: 06-26-2018 16:24  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 18AQ-102 (# 25)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 18AQ-102.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.191  
 Protein factor: 6.25

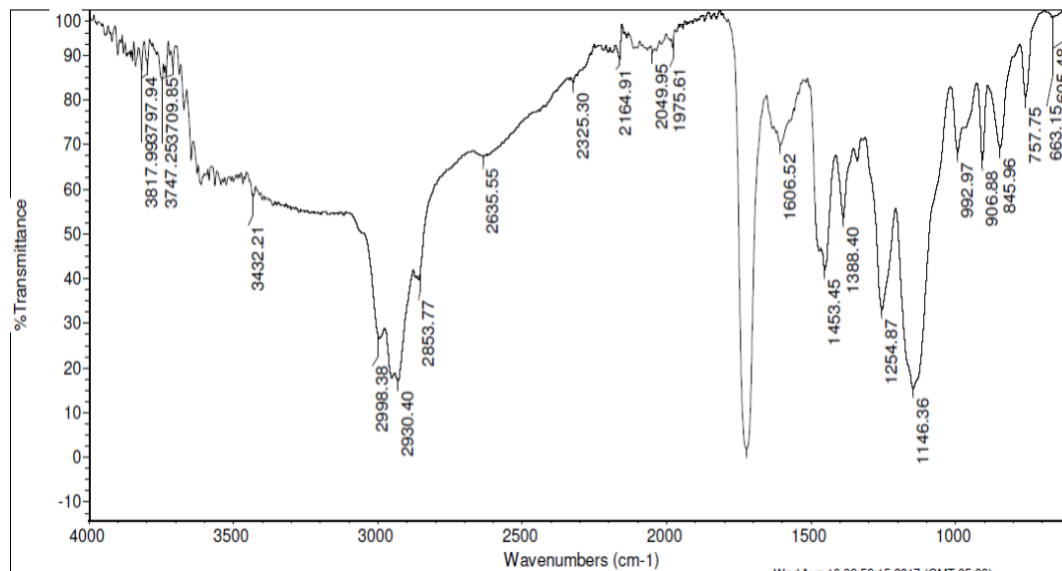
Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Nitrogen	0.6190	47	15974	RS	210.986400 .2166
Carbon	58.9629	71	3370297	RS	1.000000 .4783
Hydrogen	6.8779	246	1263025	TL	2.668432 .1530
Sulphur	0.2761	535	6553	CR	514.313500 .1992
Totals	66.7359		4655849		

C. MEB de **4A**-*poli*(GMA-co-EDMA)

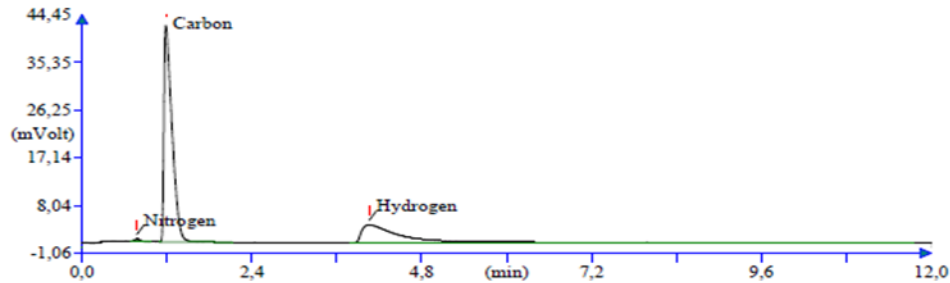


## Anexo 18. 4B-poli(GMA-co-EDMA)

### A. Espectro IR-ATR de 4B-poli(GMA-co-EDMA)

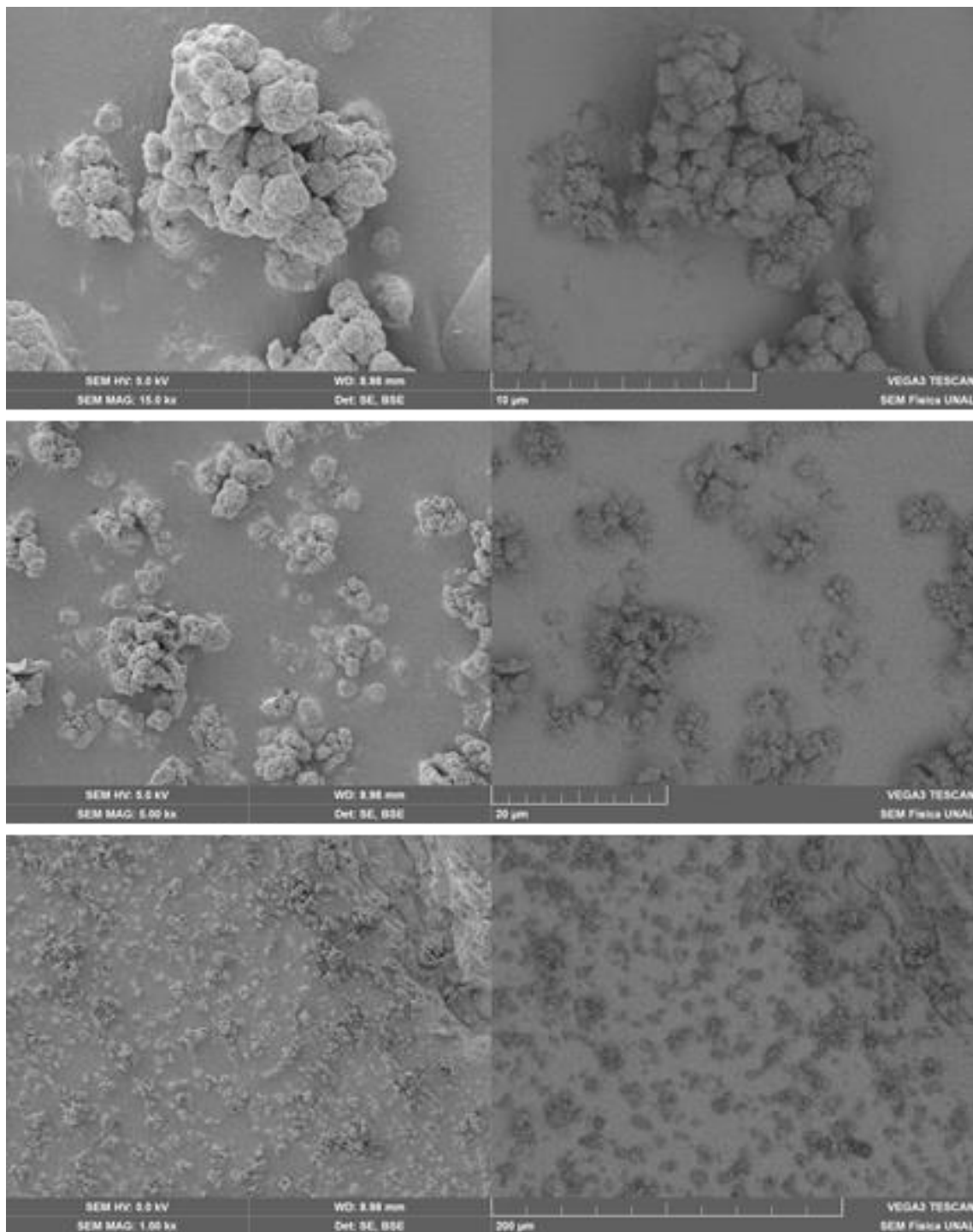


### B. Análisis elemental de 4B-poli(GMA-co-EDMA)



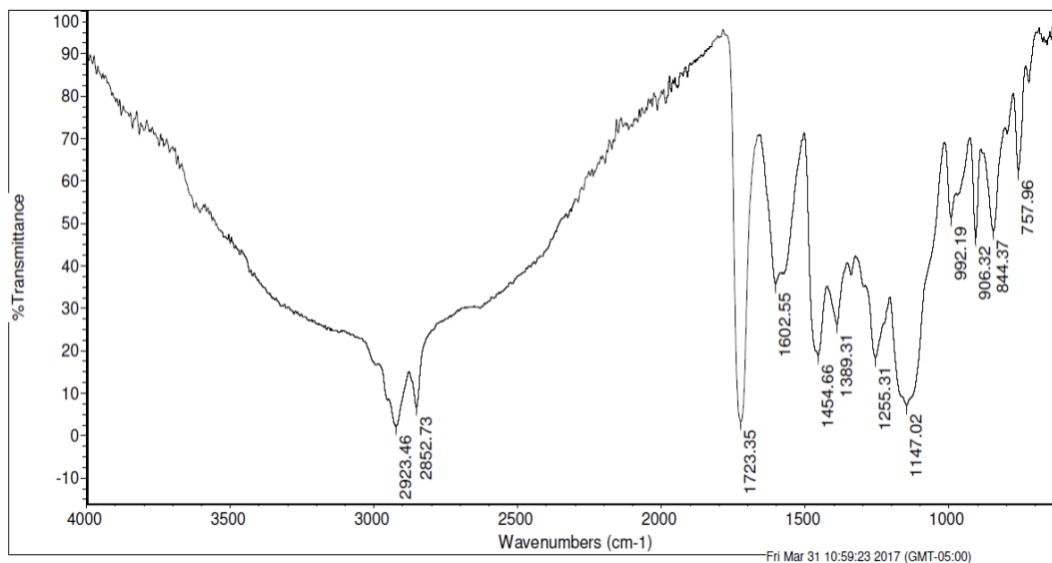
Operator ID: WALTER MEDINA  
 Company name: UN-BOGOTA  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2018\JUNIO\20  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/26/2018 10:46  
 Printed: 06-26-2018 16:27  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 18AQ-103 (# 27)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 18AQ-103.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.132  
 Protein factor: 6.25

Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Nitrogen	0.8392	47	20583	RS	159.128200 .2166
Carbon	60.2825	71	3275336	RS	1.000000 .4783
Hydrogen	7.0632	244	1233019	RS	2.656355 .1530
Totals	68.1848		4528938		

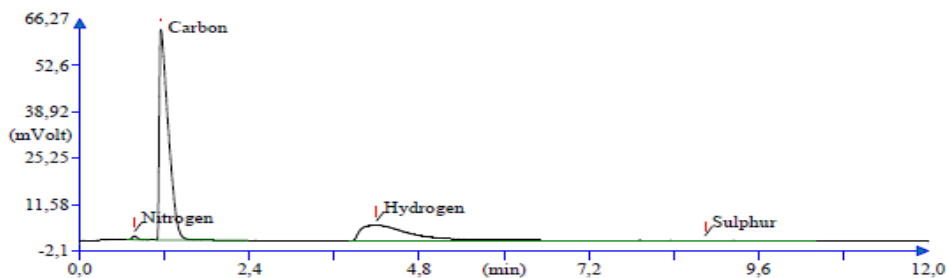
C. MEB de **4B**-*poli*(GMA-co-EDMA)

## Anexo 19. 4C-poli(GMA-co-EDMA)

### A. Espectro IR-ATR de 4C-poli(GMA-co-EDMA)



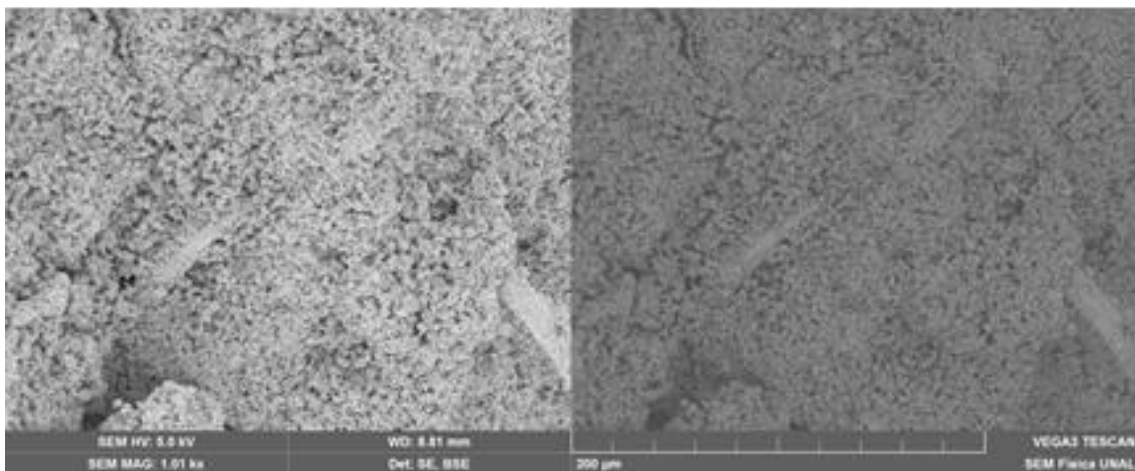
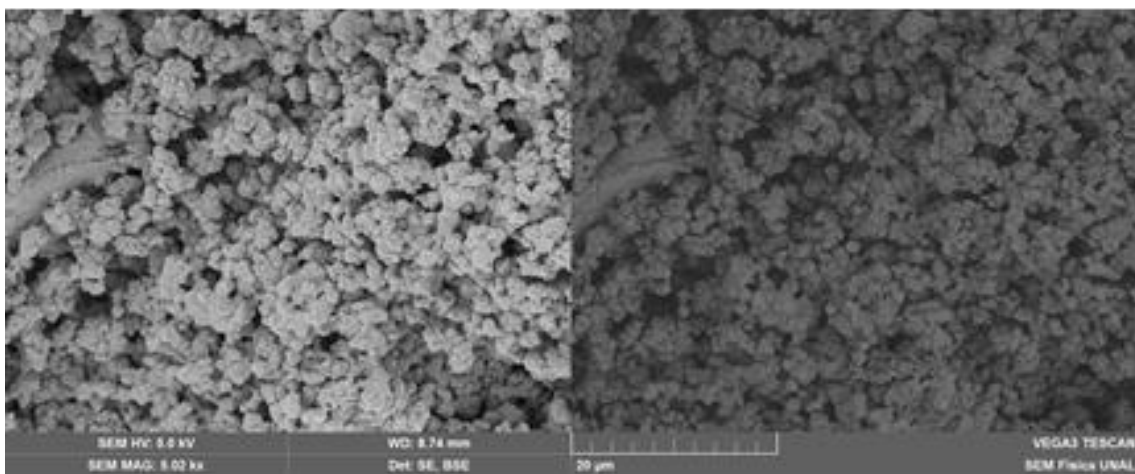
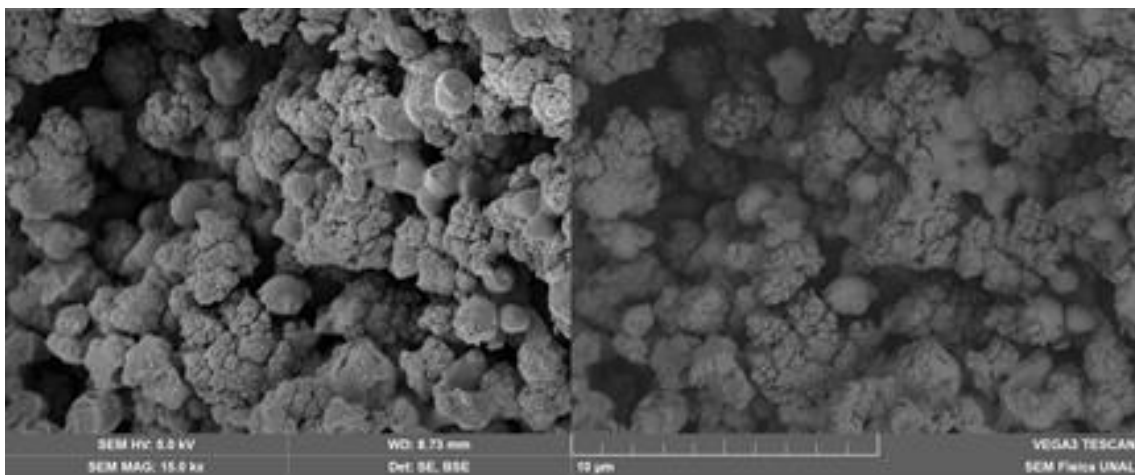
### B. Análisis elemental de 4C-poli(GMA-co-EDMA)



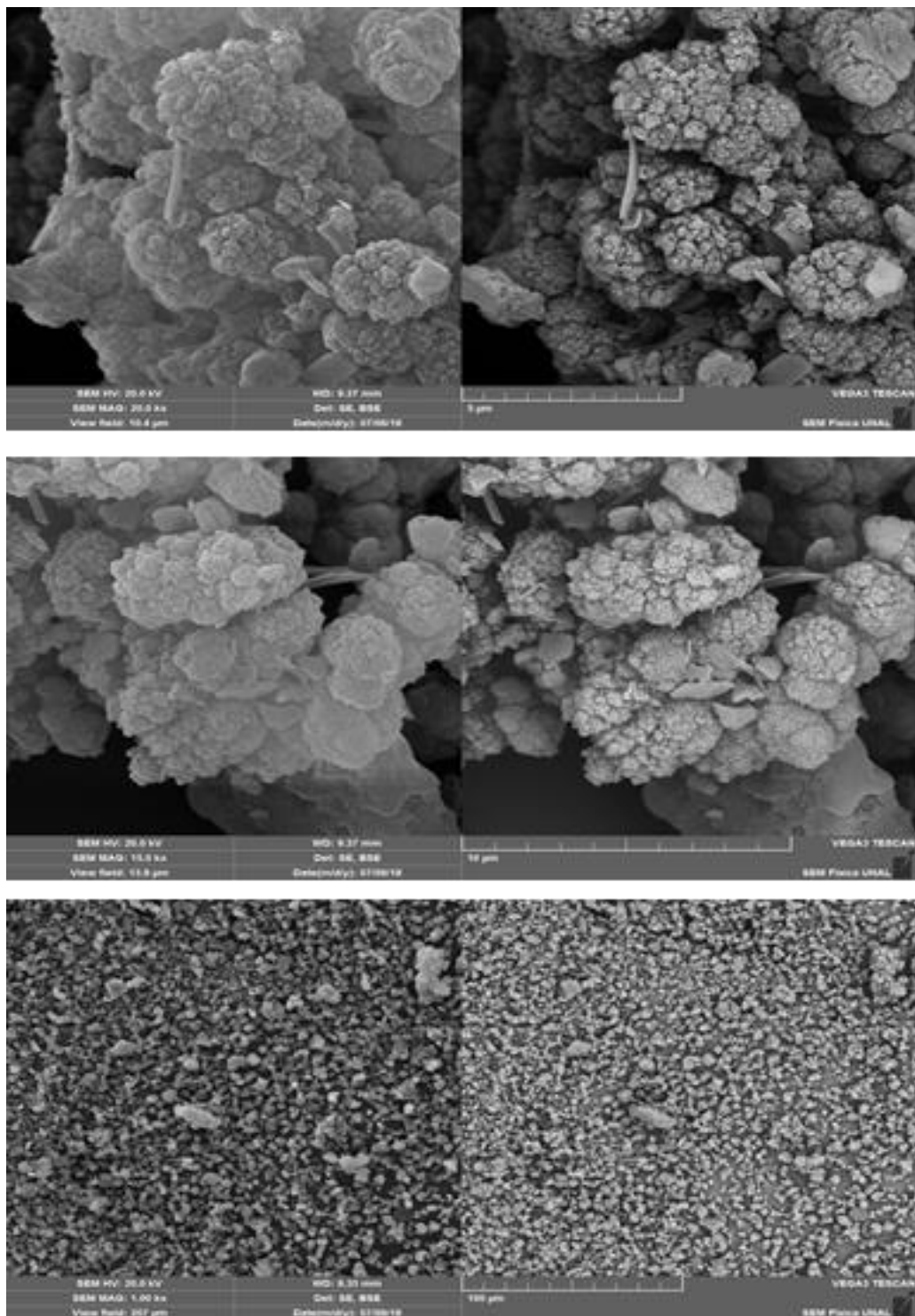
Operator ID: WALTER MEDINA  
 Company name: UN-BOGOTA  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2018JUNIO\20  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/26/2018 10:58  
 Printed: 06-26-2018 16:28  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 18AQ-104 (# 28)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 18AQ-104.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.861  
 Protein factor: 6.25

Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Nitrogen	1.3324	47	53727	RS	102.567400
Carbon	61.7761	69	5510641	RS	1.000000
Hydrogen	7.6256	252	2181338	TL	2.526266
Sulphur	0.2097	531	7777	CR	708.581800
Totals	70.9438		7753483		

## C. MEB de 4C-poli(GMA-co-EDMA)

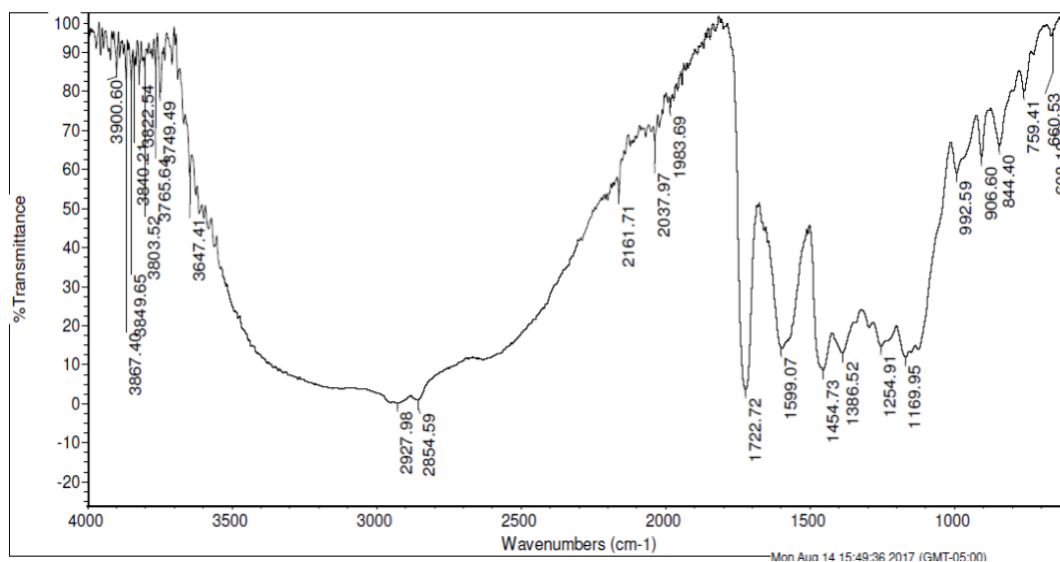




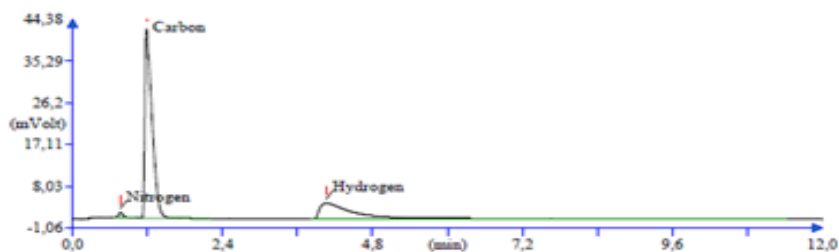
C. MEB de **4A**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA)

## Anexo 21. 4B-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)

### A. Espectro IR-ATR de 4B-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)

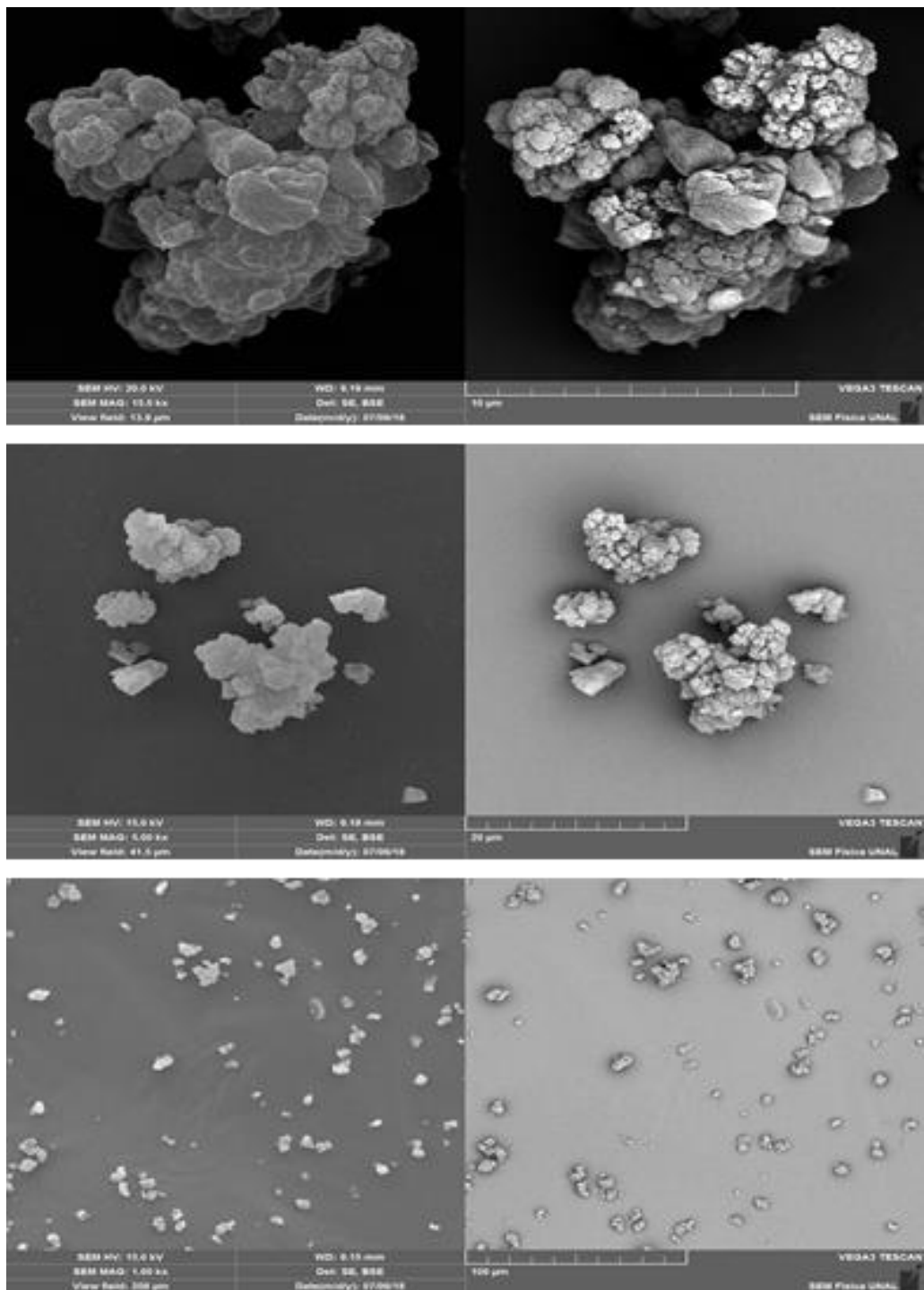


### B. Análisis elemental de 4B-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)



Operator ID: WALTER MEDINA  
 Company name: UN-BOGOTA  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2018\JUNIO\20  
 Method name: NCHS  
 Analyzed: 06/26/2018 11:35  
 Printed: 06-26-2018 16:43  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 18AQ-107 (#31)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 18AQ-107.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.472  
 Protein factor: 6.25

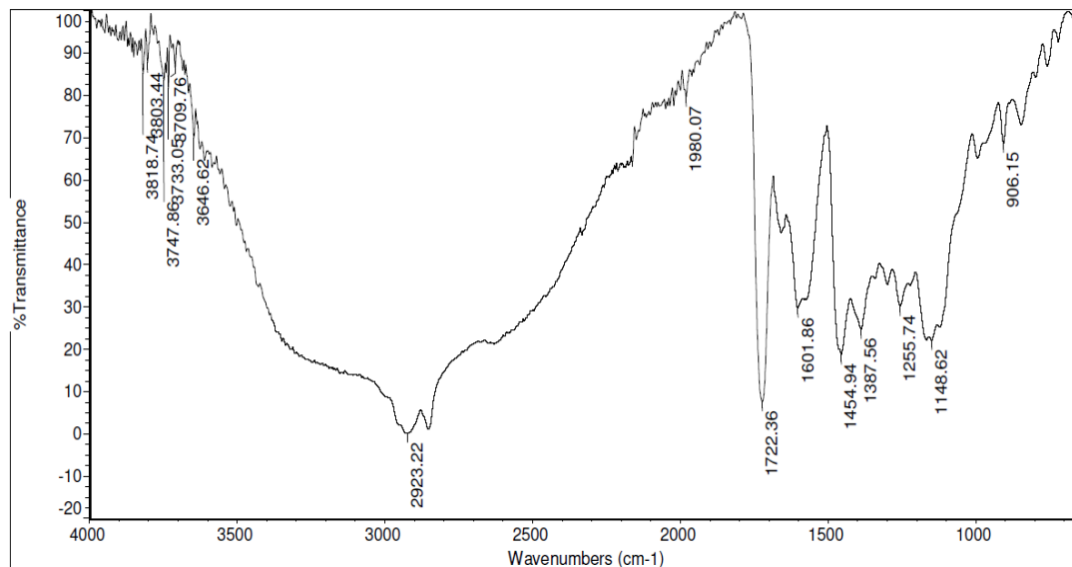
Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Nitrogen	2.2161	46	55030	RS	59.788120
Carbon	5.8161	71	3290140	RS	1.000000
Hydrogen	6.9439	244	1227232	RS	2.680945
Totals	68.9761		4572402		

C. MEB de **4B**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA)

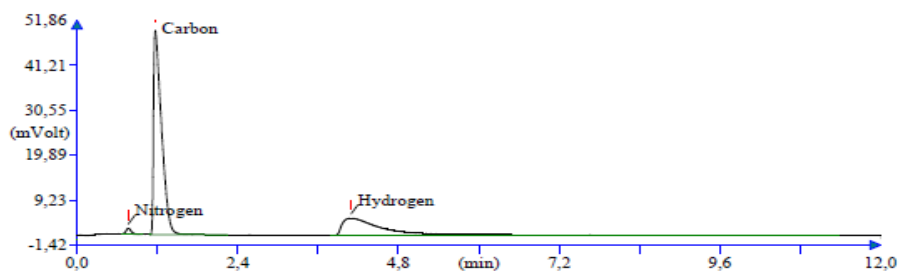


## Anexo 22. 4C-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)

### A. Espectro IR-ATR de 4C-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)

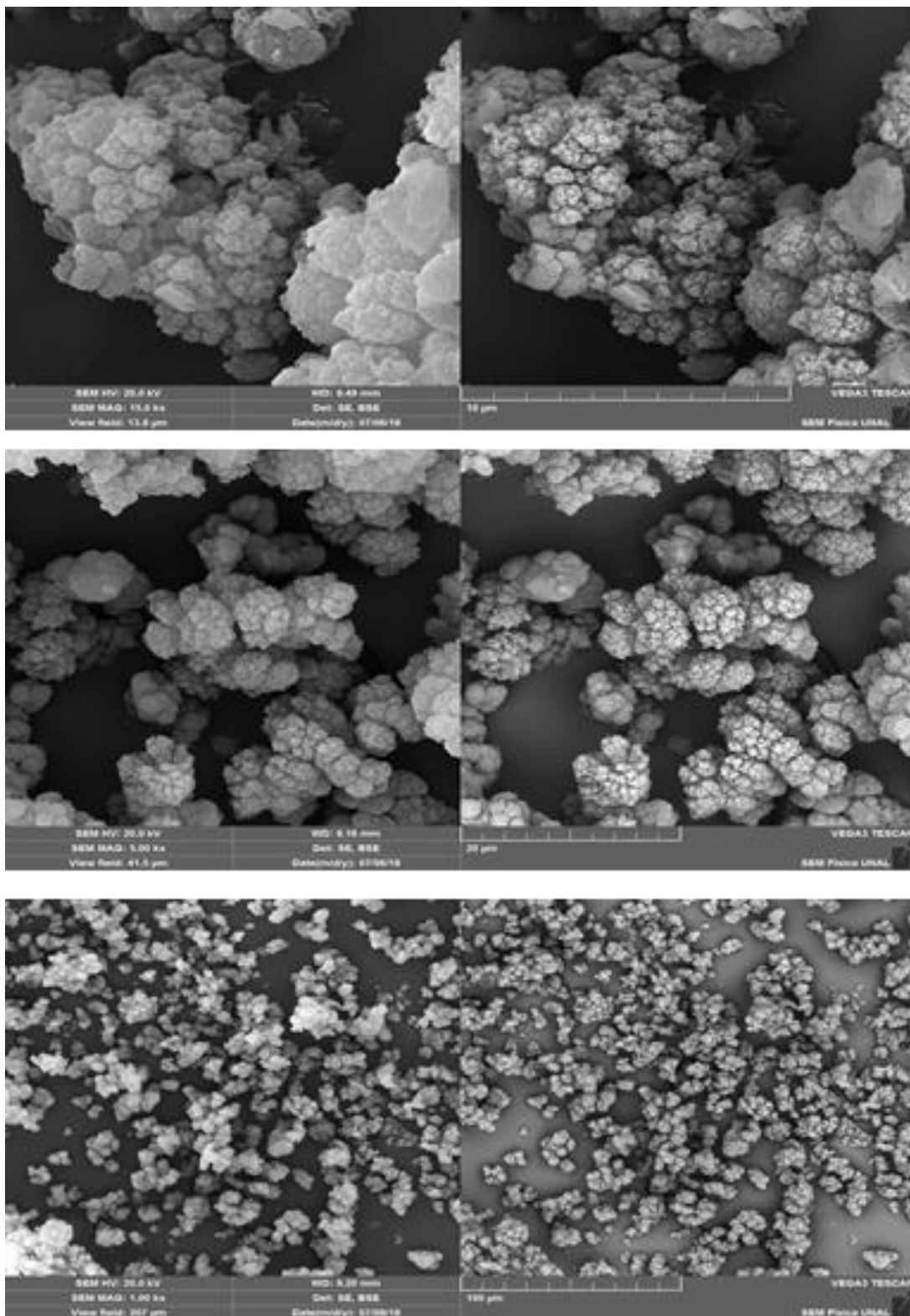


### B. Análisis elemental de 4C-poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)



Operator ID: WALTER MEDINA  
 Company name: UN-BOGOTA  
 Method filename: C:\Documents and Settings\Universidad Nacional\My Documents\METODOS\2018\JUNIO\20  
 Method name: NCHS  
 Analysed: 06/26/2018 11:59  
 Printed: 06-26-2018 16:45  
 Elemental Analyser method:  
 Sampler method:  
 Sample ID: 18AQ-108 (# 33)  
 Analysis type: UnkNown  
 Chromatogram filename: 18AQ-108.dat  
 Calibration method: K Factors  
 Sample weight: 1.315  
 Protein factor: 6.25

Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K fa
Nitrogen	2.3723	46	67596 RS	59.174070	.2166
Carbon	63.4116	70	3999931 RS	1.000000	.4783
Hydrogen	7.9052	246	1600337 RS	2.499430	.1530
Totals	73.6892		5667864		

C. MEB de **4C**-*poli*(BMA-co-EDMA-co-GMA)

## 7.4 Caracterización de péptidos

A continuación, se encuentran los cromatogramas de los péptidos sintetizados:

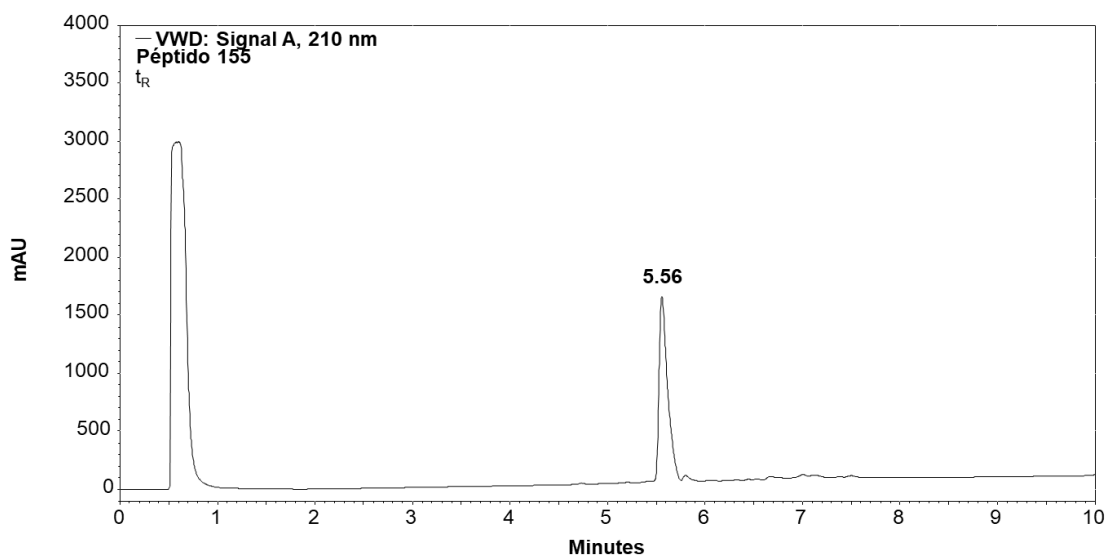
**Anexo 23.** Péptido AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>

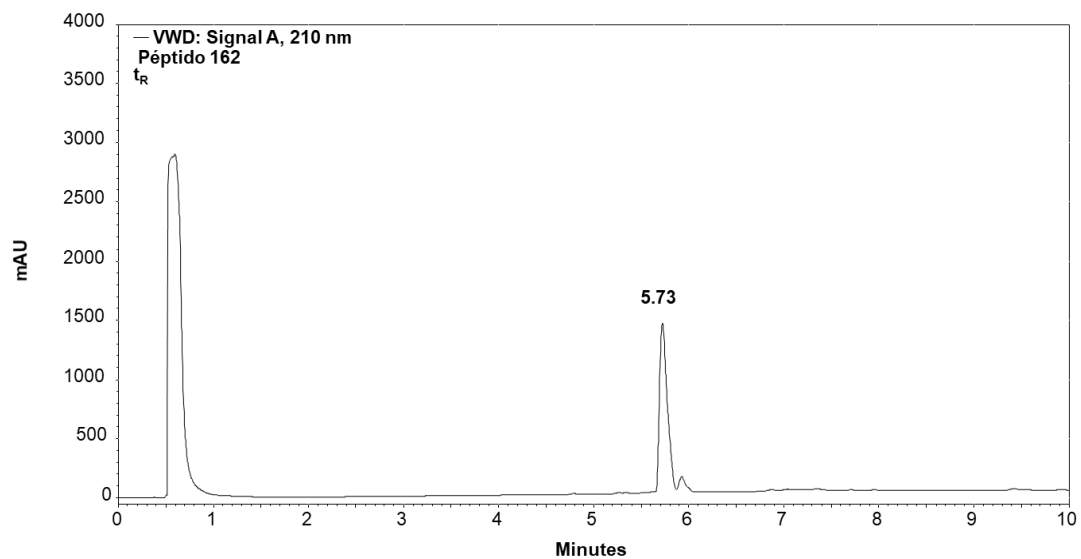
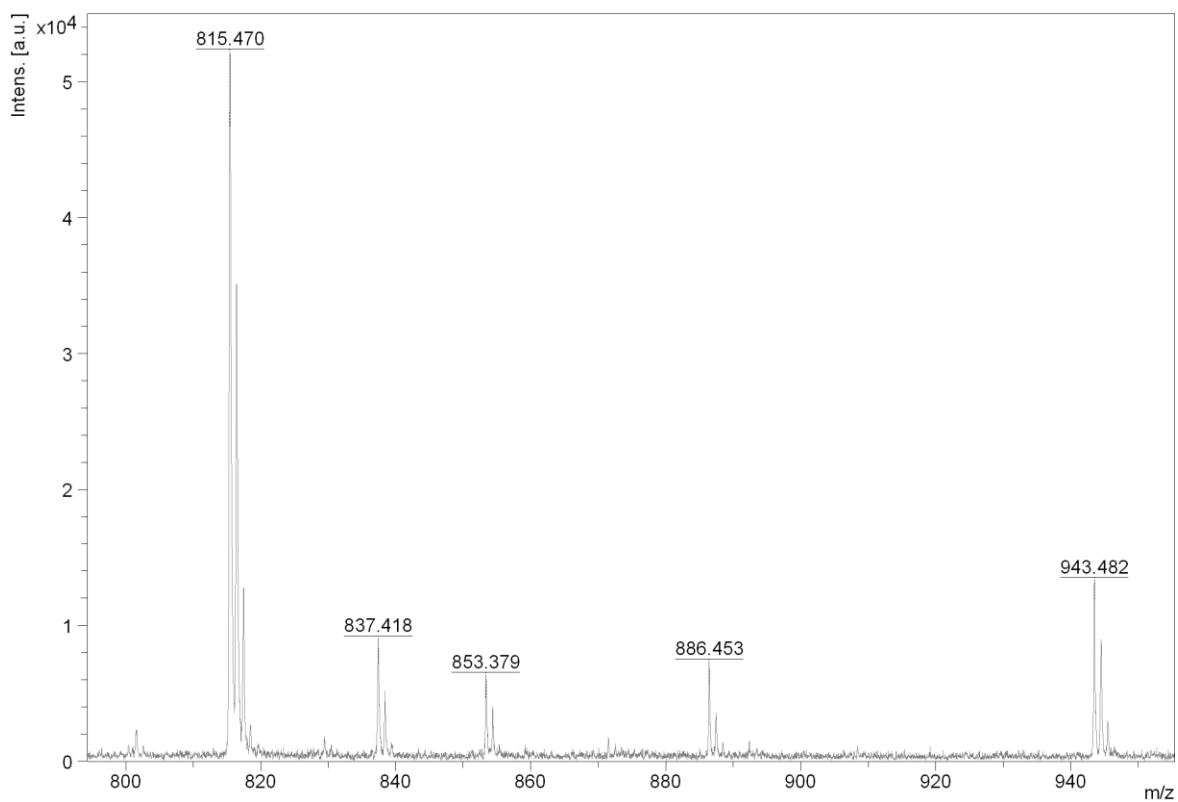
**Anexo 24.** Péptido KAEAEAKA

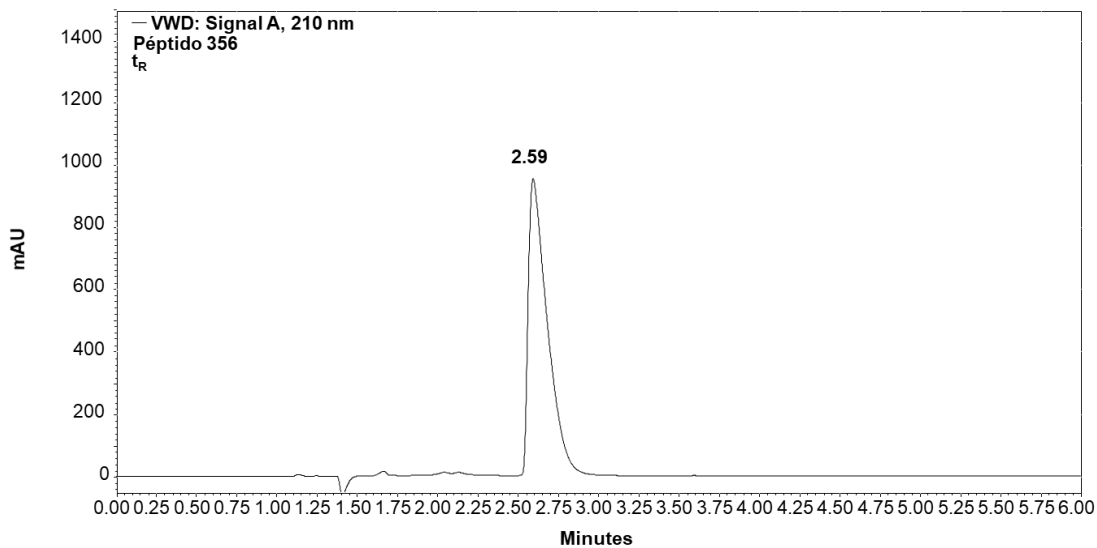
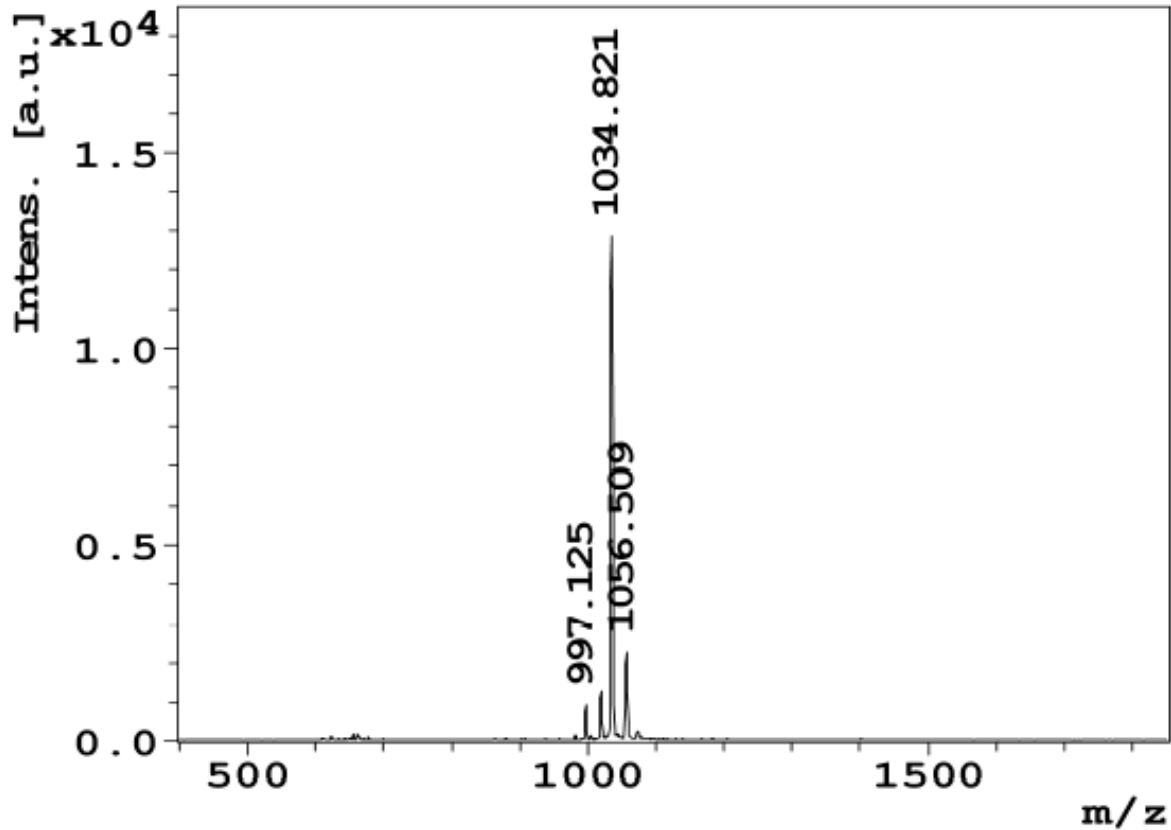
**Anexo 25.** Péptido RYRRKKK

**Anexo 23.** Péptido AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>

A. Cromatograma de péptido AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>

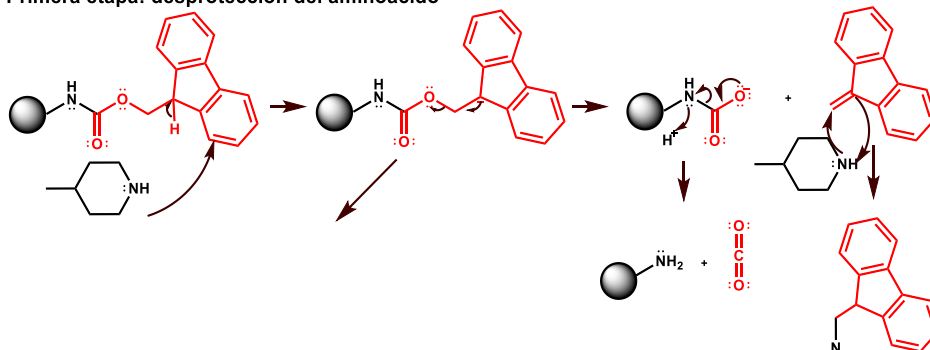


**Anexo 24. Péptido KAEAEAKA****A. Cromatograma de péptido KAEAEAKA****B. Masas péptido KAEAEAKA**

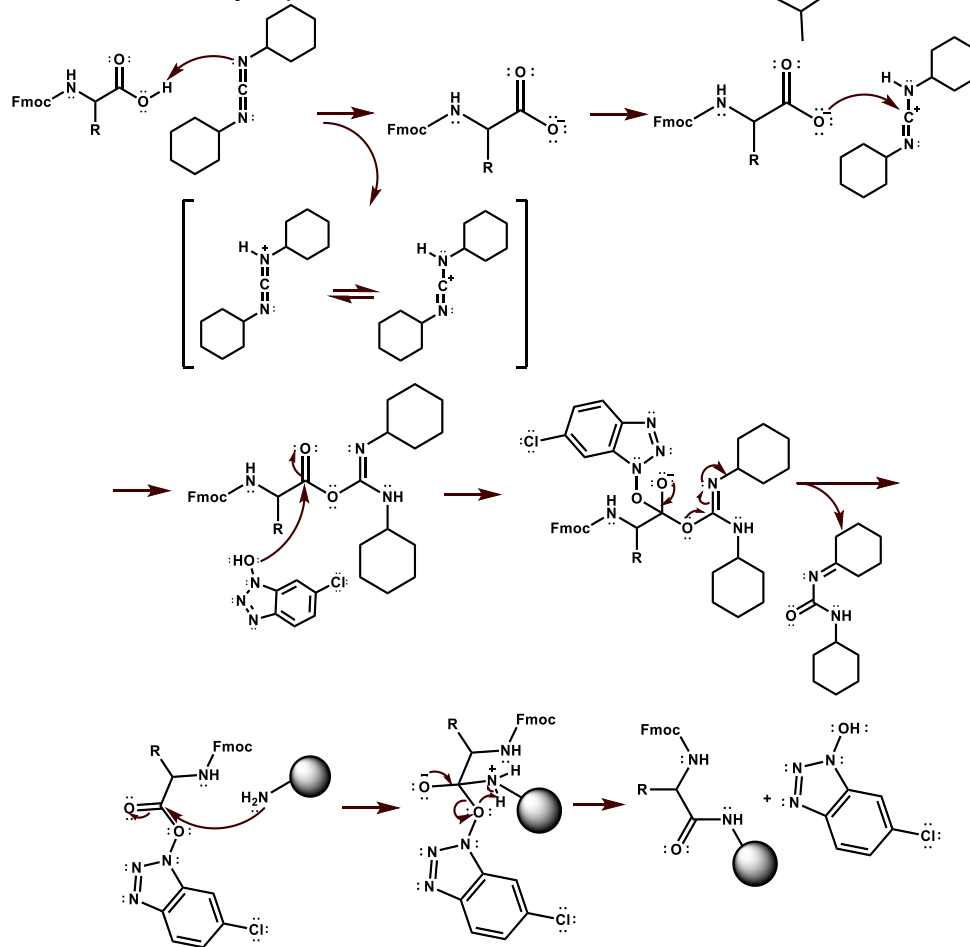
**Anexo 25. Péptido RYRRKKK****A. Cromatograma de péptido RYRRKKK****B. Masas péptido RYRRKKK**

## Anexo 26. Mecanismo de síntesis de péptidos

### Primera etapa: desprotección del aminoácido



### Activación del aminoácido y acoplamiento



## 7.5 Interacción de péptidos con copolímeros derivados de *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*

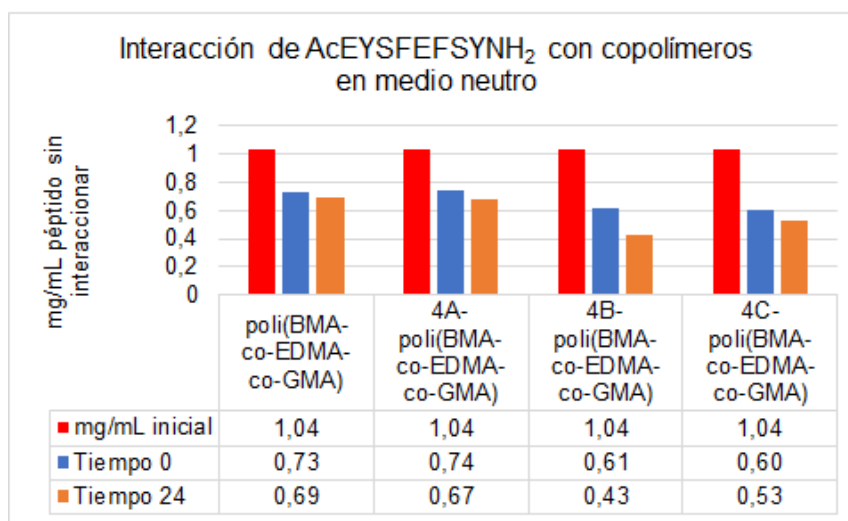
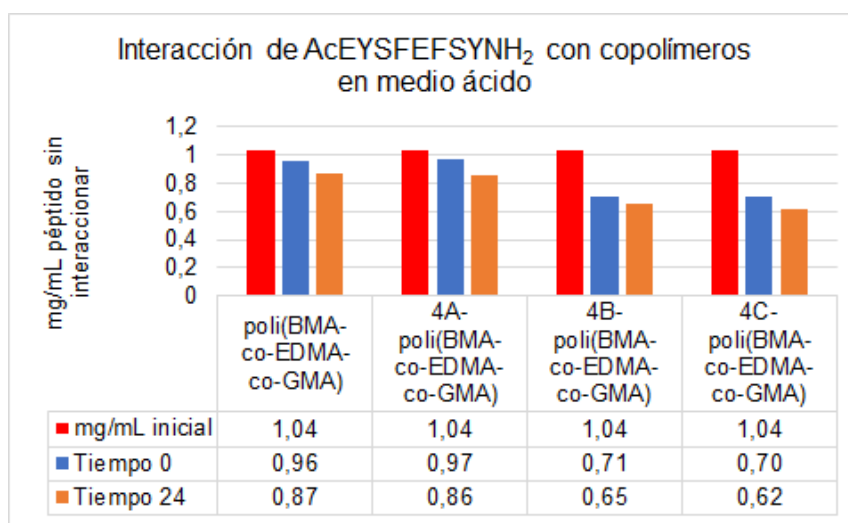
A continuación, se encuentran las gráficas que ilustran la interacción de los péptidos con *poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*, **4A-*poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)***, **4B-*poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)*** y **4C-*poli(BMA-co-EDMA-co-GMA)***.

**Anexo 27.** Interacción de péptido AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>

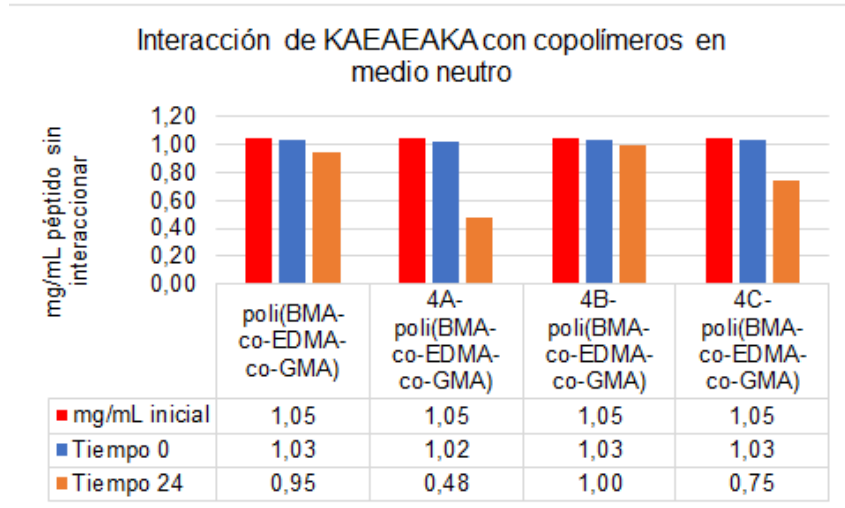
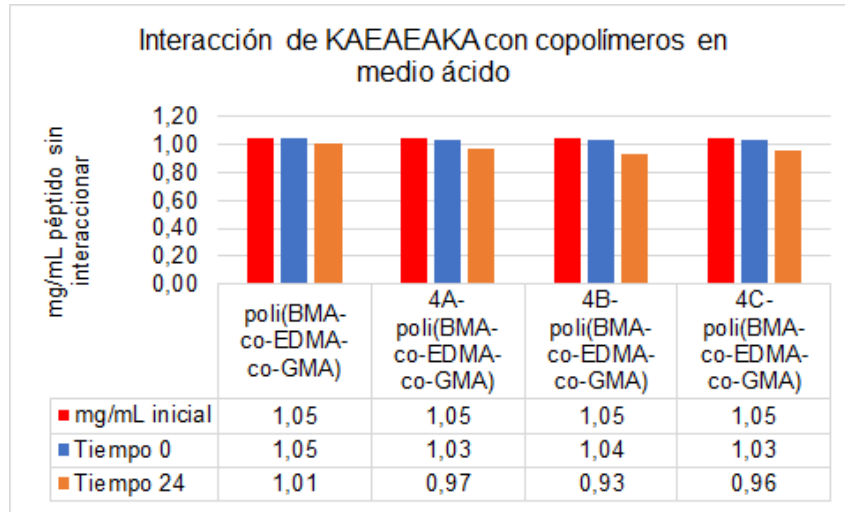
**Anexo 28.** Interacción de péptido KAEAEAKA

**Anexo 29.** Interacción de péptido RYRRKKK

**Anexo 27.** Interacción de péptido AcEYSFEFSYNH<sub>2</sub>

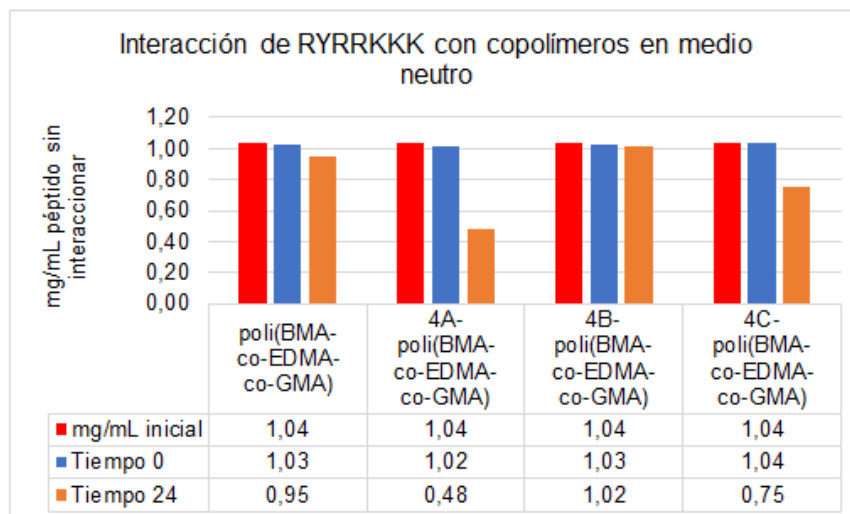
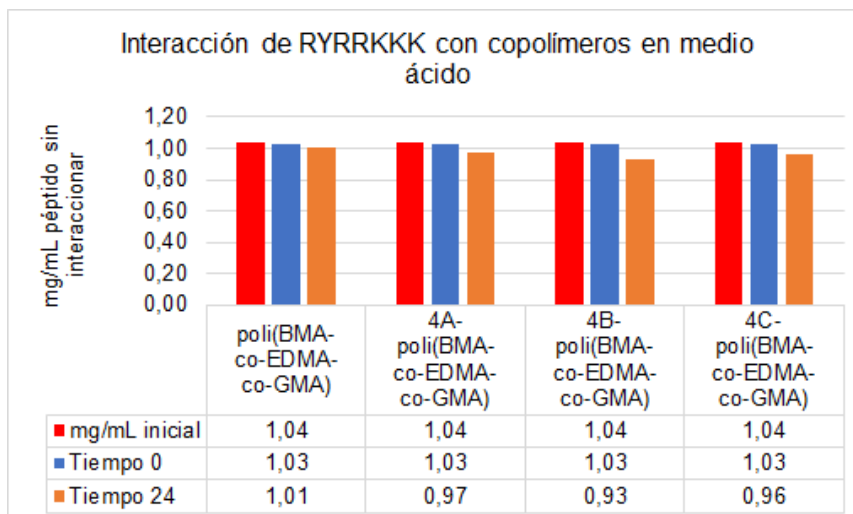


## Anexo 28. Interacción de péptido KAEAEAKA





## Anexo 29. Interacción de péptido RYRRKKK





## Bibliografía

- (1) Li, N.; Harrison, R. G.; Lamb, J. D. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2013**, *78*, 39.
- (2) Jain, V. K. *Russ. Chem. Rev.* **2011**, *80*, 75–102.
- (3) Tan, H. M.; Soh, S. F.; Zhao, J.; Yong, E. L.; Gong, Y. *Chirality* **2011**, *23*, E91–E97.
- (4) Kazakova, E. K.; Ziganshina, A. U.; Muslinkina, L. A.; Morozova, J. E.; Makarova, N. A.; Mustafina, A. R.; Habicher, W. D. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *43*, 65–69.
- (5) Jain, V. K.; Kanaiya, P. H. *Russ. Chem. Rev.* **2011**, *80* (1), 75–102.
- (6) McMahon, G.; O'Malley, S.; Nolan, K.; Diamond, D. *Arkivoc* **2003**, *7*, 23–31.
- (7) Weinelt, F.; Schneider, H.-J. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (19), 5527–5535.
- (8) Högberg, A. G. S. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4498–4500.
- (9) Franco, L. S.; Salamanca, Y. P.; Maldonado, M.; Vargas, E. F. *J. Chem. Eng. Data* **2010**, *55* (2), 1042–1044.
- (10) Sanabria, E.; Estesó, M. Á.; Pérez-Redondo, A.; Vargas, E.; Maldonado, M. *Molecules* **2015**, *20*, 9915–9928.
- (11) Velásquez-Silva, B. A.; Cortés, B.; Rivera-Monroy, Z. J.; Pérez-Redondo, A.; Maldonado, M. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1137*, 380–386.
- (12) Castillo-Aguirre, A. A.; Velásquez-Silva, B. A.; Palacio, C.; Baez, F.; Rivera-Monroy, Z. J.; Maldonado, M. *J. Braz. Chem. Soc.* **2018**, *29* (9), 1965–1972.
- (13) Agrawal, Y. K.; Patadia, R. N. *Rev. Anal. Chem.* **2006**, *25* (3), 155–239.
- (14) Morikawa, O.; Nagamatsu, Y.; Nishimura, A.; Kobayashi, K.; Konishi, H. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3991–3994.
- (15) Smith, W. E. *J. Org. Chem.* **1972**, *37* (24), 3972–3973.
- (16) Grajda, M.; Wierzbicki, M.; Cmoch, P.; Szumna, A. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 11597–11601.
- (17) Kashapov, R. R.; Zakharova, L. Y.; Saifutdinova, M. N.; Kochergin, Y. S.; Gavrilova, E. L.; Sinyashin, O. G. *J. Mol. Liq.* **2015**, *208*, 58–62.

- 
- (18) Kanaura, M.; Ito, K.; Schramm, M. P.; Ajami, D.; Iwasawa, T. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 4824–4828.
- (19) Balasubramanian, R.; Kwon, Y.-G.; Wei, A. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 105–112.
- (20) Iwanek, W.; Stefańska, K.; Szumna, A.; Wierzbicki, M. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 2222–2225.
- (21) Jain, V. K.; Kanaiya, P. H.; Bhojak, N. *Fibers Polym.* **2008**, *9* (6), 720–726.
- (22) Ribagorda, M.; Merino, E. *An. Quim.* **2009**, *105*, 209–299.
- (23) Egberink, R. H. M.; Cobben, P. L. H. M.; Verboom, W.; Harkema, S.; Reinboudt, D. N. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **1992**, *12*, 151–158.
- (24) Nummelin, S.; Falábu, D.; Shivanyuk, A.; Rissanen, K. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2869–2872.
- (25) Mishra, D. R.; Darjee, S. M.; Bhatt, K. D.; Modi, K. M.; Jain, V. K. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2015**, *82*, 425–436.
- (26) Pedro-Hernández, L. D.; Martínez-Klimova, E.; Cortez-Maya, S.; Mendoza-Cardozo, S.; Ramírez-Ápan, T.; Martínez-García, M. *Nanomaterials* **2017**, *7* (7), 163–172.
- (27) Yao, Y.; Sun, Y.; Han, Y.; Yan, C. *Chinese J. Chemistry* **2010**, *28*, 705–712.
- (28) Panchal, U.; Modi, K.; Panchal, M.; Mehta, V.; Jain, V. K. *Chinese J. Catal.* **2016**, *37*, 250–257.
- (29) Boerrigter, H.; Grave, L.; Nissink, J. W. M.; Chrisstoffels, L. A. J.; van der Maas, J. H.; Verboom, W.; de Jong, F.; Reinhoudt, D. N. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (13), 4174–4180.
- (30) Boerrigter, H.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7148–7155.
- (31) Beyeh, N. K.; Pan, F.; Bhowmik, S.; Mäkelä, T.; Ras, R. H. A.; Rissanen, K. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22*, 1355–1361.
- (32) Ziája, P.; Krogul, A.; Pawłowski, T. S.; Litwinienko, G. *Thermochim. Acta* **2016**, *623*, 112–119.
- (33) Mutihac, L.; Lee, J.; Kim, J.; Vicens, J. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2777–2796.
- (34) Paik, M.; Kang, J.; Huang, B.; Carey, J.; Lee, W. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1274*, 1–5.
- (35) Jain, V. K.; Pillai, S. G.; Kanaiya, P. H. *J. Chem.* **2008**, *5* (S1), 1037–1047.
- (36) Elçin, S.; Karakuş, Ö. Ö.; Kara, I.; Deligöz, H. *J. Mol. Liq.* **2015**, *202*, 134–140.
- (37) Yang, Q.; Yan, C.; Zhu, X. *Sensors Actuators B Chem.* **2014**, *191*, 53–59.
- (38) Sakano, T.; Ohashi, T.; Yamanaka, M.; Kobayashi, K. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 8359–8364.
- (39) Palmer, L. C.; Rebek, J. J. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3051–3059.

- 
- (40) Yamakawa, Y.; Ueda, M.; Nagahata, R.; Takeuchi, K.; Asai, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 4135–4139.
- (41) Ruderisch, A.; Iwanek, W.; Pfeiffer, J.; Fischer, G.; Albert, K.; Schurig, V. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1095, 40–49.
- (42) Pietraszkiewicz, O.; Pietraszkiewicz, M. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **1999**, 35 (1–2), 261–270.
- (43) Sokoließ, T.; Menyés, U.; Roth, U.; Jira, T. *J. Chromatogr. A* **2002**, 948, 309–319.
- (44) Vlakh, E. G.; Tennikova, T. B. *J. Sep. Sci.* **2007**, 30 (17), 2801–2813.
- (45) Ettre, L.; Zlatkis, A. *In 75 years of chromatography-a historical dialogue*; Elsevier Scientific Publishing Co.: Amsterdam, 1979; Vol. 17.
- (46) Martin, A. J. P.; Synge, R. L. M. *Biochem. J.* **1941**, 35, 1358–1368.
- (47) James, A. T.; Martin, A. J. P. *Biochem. J.* **1952**, 50, 679–690.
- (48) Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1168, 101–168.
- (49) Gidding, J. C. *Anal. Chem.* **1963**, 35 (13), 2215–2216.
- (50) Horváth, C. G.; Preiss, B. A.; Lipsky, S. R. *Anal. Chem.* **1967**, 39 (12), 1422–1428.
- (51) Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *In Introduction to Modern Liquid Chromatography*; John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2010; Vol. 3.
- (52) Švec, F.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules* **1995**, 28, 7580–7582.
- (53) Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3498–3501.
- (54) Peters, E. C.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J. *Adv. Mater.* **1999**, 11 (14), 1169–1181.
- (55) Kubín, M.; Špaček, P.; Chromeček, R. *Collect. Czechosl. Chem. Commun.* **1967**, 32, 3881–3887.
- (56) Hjertén, S.; Liao, J.-L.; Zhang, R. *J. Chromatogr.* **1989**, 473, 273–275.
- (57) Tennikova, T. B.; Švec, F.; Belenkii, B. G. *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, 13 (1), 63–70.
- (58) Beneš, M.; Horák, D.; Švec, F. *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 1855–1875.
- (59) Nakanishi, K.; Minakuchi, H.; Soga, N.; Tanaka, N. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **1997**, 8, 547–552.
- (60) Švec, F. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 747–766.
- (61) Ongkudon, C. M.; Kansil, T.; Wong, C. *J. Sep. Sci.* **2014**, 37, 455–464.
- (62) Švec, F.; Tennikova, T. B.; Deyl, Z. *In Monolithic materials: preparation, properties and application*; František, S., Tennikova, T., Deyl, Z., Eds.; Elsevier Scientific Publishing Co.: Amsterdam, 2003; Vol. 67.

- (63) Cabrera, K. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 843–852.
- (64) Motokawa, M.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Jinnai, H.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **2002**, *961* (1), 53–63.
- (65) Švec, F. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 902–924.
- (66) Merhar, M.; Podgornik, A.; Barut, M.; Žigon, M.; Štrancar, A. *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 322–330.
- (67) Eeltink, S.; Švec, F. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 137–147.
- (68) Bindis, M. P.; Bretz, S. L.; Danielson, N. D. *J. Chem. Educ.* **2011**, *88*, 675–678.
- (69) Švec, F.; Hradil, J.; Coupek, J.; Kálal, J.; Čoupek, J.; Kálal, J. *Angew. Makromol. Chem.* **1975**, *48* (1), 135–143.
- (70) Okay, O. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 711–779.
- (71) Horák, D.; Labský, J.; Pilař, J.; Bleha, M.; Pelzbauer, Z.; Švec, F. *Polymer (Guildf)* **1993**, *34* (16), 3481–3489.
- (72) Peters, E. C.; Lewandowski, K.; Petro, M.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J. *Anal. Commun.* **1998**, *35*, 83–86.
- (73) Geiser, L.; Eeltink, S.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1140*, 140–146.
- (74) Peters, E. C.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J. *Chem. Mater.* **1997**, *9* (8), 1898–1902.
- (75) Horák, D.; Labský, J.; Pilař, J.; Bleha, M.; Pelzbauer, Z.; Švec, F. *Polymer (Guildf)* **1993**, *34* (16), 3481–3489.
- (76) Viklund, C.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J.; Irgum, K. *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 744–750.
- (77) Schulte, M.; Dingenen, J. *J. Chromatogr. A* **2001**, *923*, 17–25.
- (78) Prasanna, R.; Kamalanathan, A.; Vijayalakshmi, M. *J. Mol. Recognit.* **2015**, *28*, 129.
- (79) Qi, R.; Lv, X.; Niu, Q.; Hu, B.; Jia, Q. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 6323–6331.
- (80) Qin, J.; Bai, L.; Wang, J.; Ma, Y.; Liu, H.; He, S.; Li, T.; An, Y. *Anal. Methods* **2014**, *7*, 218–225.
- (81) Lin, H.; Ou, J.; Liu, Z.; Wang, H.; Dong, J.; Zou, H. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (6), 3476–3483.
- (82) Zheng, H.; Liu, Q.; Jia, Q. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1343*, 47.
- (83) Meinus, R.; Hormann, K.; Hakim, R.; Tallarek, U.; Smarsly, B. M. *RSC Adv.* **2015**, *5* (26), 20283–20294.
- (84) Nandi, M.; Uyama, H. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 20847–20855.
- (85) Shao, H.; Zhao, L.; Chen, J.; Zhou, H.; Huang, S.; Li, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *111*, 241–247.

- (86) Tong, S.; Liu, S.; Wang, H.; Jia, Q. *Chromatographia* **2014**, *77*, 5–14.
- (87) Buchmeiser, M. R. *Polymer (Guildf)*. **2007**, *48*, 2187–2198.
- (88) Mustafina, A. R.; Elistratova, Y. G.; Syakaev, V. V.; Amirov, R. R.; Konovalov, A. I. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **2006**, *55* (8), 1419–1424.
- (89) Lv, Y.; Linb, Z.; Švec, F. *Analyst* **2012**, *137*, 4114–4118.
- (90) Lv, Y.; Lin, Z.; Švec, F. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 8457–8460.
- (91) Wang, Q. C.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 670–674.
- (92) Azanova, V. V.; Hradil, J.; Švec, F.; Pelzbauer, Z. *React. Polym.* **1990**, *12*, 247–260.
- (93) Nasirtabrizi, M. H.; Khodabandlou, S.; Zargin, L.; Parchehbaf Jadid, A. *Int. J. Ind. Chem.* **2014**, *5*, 1–8.
- (94) Pfaunmiller, E. L.; Courtney, M. L.; Dupper, C. M.; Hage, S., D. *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405*, 2133–2145.
- (95) Qi, R.; Lv, X.; Niu, Q.; Hu, B.; Jia, Q. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 6323.
- (96) Sancho, R.; Novell, A.; Švec, F.; Minguillón, C. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 2805–2813.
- (97) Thoden van Velzen, E. U.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N.; David N. Reinhoudt. *Synthesis (Stuttg)*. **1995**, *8*, 989–997.
- (98) Okanda, F. M.; El Rassi, Z. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1020–1030.
- (99) Ge, F.; Huang, Y.; Luo, Y.; Jiang, L.; Dan, Y. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 63118–63127.
- (100) Vergel Galeano, C. F.; Rivera-Monroy, Z. J.; Rosas Pérez, J. E.; García Castañeda, J. E. *J. Mex. Chem. Soc.* **2014**, *58* (4), 386–392.
- (101) Shu, S.; Kobayashi, H.; Okubo, M.; Sabarudin, A.; Butsugan, M.; Umemura, T. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1242*, 59–66.
- (102) ALOthman, Z. A. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16* (3), 271–278.
- (103) Maldonado, M.; Sanabria, E.; Batanero, B.; Estes, M. Á. *J. Mol. Liq.* **2017**, *231*, 142–148.
- (104) Tunstad, L. M.; Tucker, J. A.; Dalcanale, E.; Weiser, J.; Bryant, J. A.; Sherman, J. C.; Helgeson, R. C.; Knobler, C. B.; Cram, D. J.; Weiser, J.; Knobler, C. B.; Cram, D. J.; Bryant, J. A.; Dalcanale, E.; Tucker, J. A.; Dalcanale, E.; Weiser, J.; Bryant, J. A.; Sherman, J. C.; Helgeson, R. C.; Knobler, C. B.; Cram, D. J. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (6), 1305–1312.
- (105) Kashapov, R. R.; Pashirova, T. N.; Zhiltsova, E. P.; Lukashenko, S. S.; Ziganshina, A. Y.; Zakharova, L. Y. *Russ. J. Phys. Chem. A* **2012**, *86* (2), 200–204.
- (106) Macomber, R. S. *A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*, John

Wiley.; Canada, 1998.

- (107) Chniti, I.; Sanhoury, M. A. K.; Merlet, D.; Chehidi, I. *J. Fluor. Chem.* **2014**, *168*, 223–229.
- (108) Momose, A. A.; Bosch, E. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 4043–4049.
- (109) Thondorf, I.; Brenn, J.; Böhmer, V. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 12823–12828.
- (110) Kim, B.; Kim, T. H. *J. Anal. Methods Chem.* **2015**, 1–7.
- (111) Zhang, Y.; Kim, C. D.; Coppens, P. *Chem. Commun.* **2000**, 2299–2300.
- (112) Matheny, J. M.; Bosch, E.; Barnes, C. L. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7* (5), 984–988.
- (113) MacGillivray, L. R.; Atwood, J. L. *Nature* **1997**, *389*, 469–472.
- (114) Nissinen, M.; Wegelius, E.; Falábu, D.; Rissanen, K. *Cryst. Eng. Commun.* **2000**, *28*, 1–3.
- (115) Zhang, C. X.; Deng, Y. Y.; Zhang, Y. Y.; Yang, P.; Gu, Y. *Chinese Chem. Lett.* **2015**, *26* (3), 348–352.
- (116) Benaglia, M.; Alberti, A.; Giorgini, L.; Magnoni, F.; Tozzi, S. *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 124–132.
- (117) Jiang, Q.; Zeng, T.; Yang, S.; Chen, Q.; Chen, L.; Ye, Y.; Zhou, J.; Xu, S. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *141*, 244–251.
- (118) Cao, Q.; Xu, Y.; Liu, F.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7416–7421.
- (119) Xu, Y.; Cao, Q.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (8), 3352–3358.
- (120) Tong, S.; Zhou, X.; Zhou, C.; Li, Y.; Li, W.; Zhou, W.; Jia, Q. *Analyst* **2013**, *138*, 1549–1557.
- (121) Švec, F.; Fréchet, J. M. J. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 820–822.
- (122) Tennikova, T. B.; Bleha, M.; Švec, F.; Almazova, T. V.; Belenkii, B. G. *J. Chromatogr.* **1991**, *555*, 97–107.
- (123) Nakamura, Y.; Yamago, S. *Macromolecules* **2015**, *48* (18), 6450–6456.
- (124) Nguyen, D. H.; Vana, P. *Aust. J. Chem.* **2006**, *59* (8), 549–559.
- (125) ThermoFisher. Peptide Synthesis and Proteotypic Peptide Analyzing Tool  
<https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/protein-biology/peptides-proteins/custom-peptide-synthesis-services/peptide-analyzing-tool.html>.