



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
INSTITUTO DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ENCAPSULAMIENTO
DE SONDAS PARAMAGNÉTICAS DE Dy^{3+} POR PARTE
DE FRUCTANOS DE BAJO PESO MOLECULAR**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

QUÍM. ANA VIANEY FIGUEROA RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. HUGO VAZQUEZ LIMA

Octubre 2024

Agradecimientos

A CONACyT por la beca otorgada número 1225555.

Al Laboratorio Nacional de Supercómputo del sureste de México (LNS), perteneciente al padrón de laboratorios nacionales CONACyT, por los recursos computacionales, el apoyo y la asistencia técnica brindados. Proyecto 202301029C.

Al proyecto VIEP 2023-2024 números 00041 y 00048 por la compra de reactivos.

Al equipo de trabajo del laboratorio de biomacromoléculas del CIIDIR Oaxaca, por proporcionarnos las muestras de fructanos, especialmente a la Dra. Delia Soto Castro, por su asesoría y amabilidad.

A la Dr. Hugo Vásquez Lima, constantemente me demostraste la importancia que das a la preparación, escucha y tolerancia de tus alumnos y alumnas, gracias por la confianza que adquirí en este periodo.

Al Dr. Samuel Hernández Anzaldo, por generar un ambiente de laboratorio fraterno, respetuoso y alegre y por promover la reflexión sobre el papel de los estudiantes en el desarrollo científico.

A la Dra. Yasmi, porque entendí que ninguna adversidad es grande si estás acompañada.

A mi hermana Mauritania, todos mis logros son por tu guía, siempre un solo corazón.

A mi mamá y mi papá, mis mayores maestros, los más sabios, los más llenos de amor.

A Christian, por creer en mí, por impulsar mis sueños, por generar nuevos.

A mis amigas, por ser un refugio y una fuente de inspiración para superarme.

A mi perrito Mol, gracias bebé, por ti me levanté cada mañana intentando ser una mejor humana.

A mí, por perseverar.

Índice

Índice de figuras.....	4
Lista de símbolos y abreviaturas.....	5
Resumen.....	6
Introducción	7
Justificación	9
Antecedentes	9
Agentes de Contraste.....	9
Compuestos de Dy	12
Dendrímeros	14
Fructanos	16
Generalidades de las técnicas de simulación y espectroscopía.....	20
Simulaciones Computacionales.....	20
<i>Dinámica molecular</i>	20
<i>Aplicaciones</i>	24
Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	27
<i>RMN de moléculas paramagnéticas</i>	31
Constante de Asociación	33
Hipótesis	38
Objetivo general.....	38
Objetivos específicos	38
Metodología	39
Reactivos y Equipos	39
Parte Experimental: Titulación por RMN ^1H	39
Parte Computacional	40
Discusión de Resultados	42
Sistema DyADP: PAMAM G3	42
<i>Mediciones de RMN ^1H</i>	42
<i>Dinámica molecular</i>	48
<i>Constante de asociación</i>	53
Sistema DyADP: Fructanos	57
<i>Mediciones por RMN ^1H</i>	57
<i>Dinámica molecular</i>	62
Conclusiones	66
Bibliografía	67
Apéndice A	72
Apéndice B.....	82

Índice de figuras

Figura 1. Agentes de contraste basados en gadolinio.	10
Figura 2. Estructura del compuesto DyADP. Dy aqua, N azul, O rojo, C gris, H blanco.	14
Figura 3. Estructura de PAMAM generación 3.	16
Figura 4. Estructuras de fructanos: a) 1-Kestosa, b) 6-Kestosa, c) Neokestosa	17
Figura 5. Estructuras de fructanos a) DP 6, b) DP 11.	19
Figura 6. Correlación normalizada del sistema PAMAM: DyADP 1:1, en los primeros 100 ps.	21
Figura 7. Parámetros geométricos, d: distancia, θ : ángulo, ω : ángulo diedro.	22
Figura 8. Interacciones intermoleculares.	23
Figura 9. Estructura del sistema PAMAM G3: DyADP 1:16 en el paso 2000 ps	26
Figura 10. Representación de un núcleo con $I = 1/2$ como una esfera giratoria.	27
Figura 11. Efecto Zeeman nuclear; desdoblamiento de los niveles energéticos al aplicar un campo magnético H_0	28
Figura 12. a) Representación en los tres ejes del experimento de RMN b) Mecanismos de relajación longitudinal	29
Figura 13. Isoterma de unión. Supramolecular.org. Recuperado el 25 de mayo de 2024, de http://supramolecular.org/	34
Figura 14. Espectro RMN ^1H (DMSO- d^6) de PAMAM G3.	42
Figura 15. Espectro RMN ^1H (DMSO- d^6) de DyADP.	42
Figura 16. Espectros de RMN ^1H (DMSO- d^6) región diamagnética de	44
Figura 17. Gaussianas en la señal NH_{amida} del espectro de PAMAM G3.	45
Figura 18. Deconvolución con gaussianas en la señal NH_{amida} del espectro de PAMAM G3. ...	46
Figura 19. Espectros de RMN ^1H (DMSO- d^6) región paramagnética de la mezcla	47
Figura 20. Dinámica molecular DyADP: PAMAM G3 1:1, se destacan en.	48
Figura 21. Gráfico de las distancias de los 60 NH_{amida} de PAMAM G3 a Dy^{3+}	49
Figura 22. Distribución de las distancias de los 60 NH_{amida} de PAMAM G3 a Dy^{3+}	50
Figura 23. Dinámica molecular, a) ocho DyADP y un PAMAM G3, b) dieciséis DyADP y un PAMAM G3.	51
Figura 24. Gráfico de las distancias del centro de PAMAM G3 al Dy^{3+} de los ocho compuestos DyADP.	52
Figura 25. Gráfico de las distancias del centro de PAMAM G3 al Dy^{3+} de los dieciséis compuestos DyADP.	52
Figura 26. Isoterma de unión del sistema DyADP:PAMAM G3.	53
Figura 27. Regresión lineal de los desplazamientos químicos en función de la concentración del complejo.	55
Figura 28. Espectro RMN ^1H (DMSO- d^6) de DyADP:PAMAM G3 1:1.	56
Figura 29. Espectros de RMN ^1H (DMSO- d^6) región diamagnética de la mezcla DyADP: Fructano a diferentes relaciones molares.	58
Figura 30. Espectros de RMN ^1H (DMSO- d^6) región diamagnética de la mezcla	58
Figura 31. Espectros de RMN ^1H (DMSO- d^6) región paramagnética de la mezcla DyADP: Inulina ramificada a diferentes relaciones molares.	59
Figura 32. Espectros de RMN ^1H (DMSO- d^6) región paramagnética de la mezcla	60
Figura 33. Espectros de RMN ^1H (DMSO- d^6) región paramagnética de la mezcla	60
Figura 34. Espectros de RMN ^1H (DMSO- d^6) región paramagnética de la mezcla	61
Figura 35. Dinámicas moleculares. I) DyADP y DP 6. II) DyADP y DP 11.	63
Figura 36. Gráfico de las distancias de los CH_2 de DP 6 al Dy^{3+}	64
Figura 37. Gráfico de las distancias de los CH_2 de DP 11 al Dy^{3+}	65

Lista de símbolos y abreviaturas

AC - Agente de Contraste

ADP - Ácido 2,6-piridindicarboxílico, ácido dipicolínico

CF - Campo de fuerza

DFT - Density Functional Theory

DM - Dinámica Molecular

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP - Degree of polymerization

DyADP - Ácido piridin-2,6-dicarboxílico de disprosio(III)

FSN - Fibrosis sistémica nefrogénica

Gd-DOTA - 1,4,7,10-tetraaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacetato de gadolinio(III)

Gd-DTPA - 2-[bis[2-[carboxilometil-[2-(metilamino)-2-oxoetil]amino]etil]amino]acetato de gadolinio(III)

H_0 - Campo magnético externo

HF - Hartree Fock

IC – Índice de coordinación

K_a - Constante de asociación

M - Magnetización

M - Molaridad

MHz - Megahertz

MMFF94x - Merck Molecular Force Field 94

MOE - Molecular Operating Environment

NS – Number of scans

OPLS3 - Optimized Potentials for Liquid Simulations generation 3

PAA - Ácido poliacrílico

PAMAM G3 - Poliamidoamina generación 3

PEG – Polietilenglicol

ppm- Partes por millón

RMN - Resonancia Magnética Nuclear

RMI - Resonancia Magnética de Imagen

TD – Time domain

TMS - Tetrametilsilano

UHF - Ultra high field

Resumen

La presente investigación se centra en el estudio de las de interacciones supramoleculares entre moléculas de fructanos y el compuesto de coordinación ácido piridin-2,6-dicarboxílico de disprosio(III) (DyADP), mediante resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y simulaciones de dinámica molecular (DM), para su evaluación como posibles sondas paramagnéticas que mejoren las imágenes de resonancia magnética de imagen (RMI).

El compuesto DyADP consiste en tres ligantes de ácido dipicolínico unidos a un ion Dy^{3+} . Los compuestos paramagnéticos de Dy^{3+} son de especial interés en RMI debido a su alto momento magnético. Para facilitar la distribución de las sondas paramagnéticas dentro del cuerpo y contrarrestar la toxicidad de los iones metálicos, se utilizan moléculas acarreadoras. Para estudiar dichos acarreadores se usará como modelo los dendrímeros PAMAM.

Se calibró una metodología basada en las interacciones supramoleculares entre el dendrímero PAMAM de tercera generación (G3) y el compuesto DyADP, utilizando titulación por RMN y DM. Los resultados obtenidos mostraron una fuerte interacción entre el PAMAM G3 y el DyADP. Además, se demostró que existe el encapsulamiento del compuesto de coordinación por parte del dendrímero y se calculó el valor de la constante de asociación K_a .

La metodología calibrada se empleó para evaluar las interacciones supramoleculares entre el compuesto DyADP y diferentes moléculas de fructanos. Los resultados de RMN y DM mostraron que los fructanos ramificados de DP mayor a 10 establecen puentes de hidrogeno estables con el DyADP, sin embargo, las interacciones no son suficientes para generar un proceso de encapsulamiento.

Introducción

La resonancia magnética de imagen es una técnica destacada en el campo del diagnóstico médico, su desarrollo ha ido en aumento con el creciente interés por mejorar las imágenes obtenidas del interior del cuerpo humano. La técnica no es invasiva; mediante la aplicación de un campo magnético y ondas de radio, produce imágenes detalladas de los tejidos. La RMI es ampliamente utilizada en diferentes aplicaciones clínicas: vasculares, neurológicas, cardíacas, musculoesqueléticas, etc. Esto es posible debido a que el contraste de las imágenes está basado en la concentración de protones presentes en el agua de los tejidos y en los mecanismos de relajación que efectúan los protones para regresar al equilibrio una vez que las radiofrecuencias se detienen; generando, por tanto, un contraste particular de cada órgano o tejido (Yousaf et al., 2018).

En algunas ocasiones la imagen obtenida por RMI no es lo suficientemente clara y es necesario la aplicación de agentes de contraste (AC) que ayudan a obtener imágenes con un realce de los tejidos, lo que facilita la diferenciación entre el tejido patológico, del sano. Existen diversos compuestos químicos utilizados como AC que contienen centros metálicos que provocan cambios en los tiempos de relajación de los núcleos de hidrógeno (Geraldés & Laurent, 2009). Esta categoría comprende dos grupos, los compuestos paramagnéticos con iones de metales lantánidos, incluyendo al ion Mn^{2+} ; y los compuestos superparamagnéticos, principalmente compuestos de óxido de hierro. Nos enfocaremos en AC paramagnéticos también conocidos como sondas paramagnéticas (Shokrollahi, 2013).

El constante desarrollo de esta técnica ha conducido a la investigación de sondas paramagnéticas, que además de perfeccionar la claridad de las imágenes de los tejidos no representen un daño a la salud humana. En la búsqueda de iones metálicos para emplearse como AC, los compuestos de Dy^{3+} son una de las propuestas más llamativas debido a que este ion presenta el momento magnético más alto del grupo de los lantánidos, influyendo en la protección o desprotección de los protones, a través de la relajación de los núcleos luego de una transición magnética (Gómez-González et al., 2021; Shokrollahi, 2013).

Asimismo, la exposición a la toxicidad de los iones metálicos, debido a su acumulación por los AC que actualmente son administrados, puede contrarrestarse con el empleo de moléculas capaces de encapsular y acarrear de manera más eficiente a los AC (Rogosnitsky & Branch, 2016). Los

acarreadores y encapsuladores son moléculas que facilitan la administración de AC a los pacientes a la vez que aseguran su protección y su estabilidad para lograr una óptima bio-distribución y la expulsión de la molécula encapsulada. Dentro de las estructuras moleculares utilizadas como acarreadoras de iones metálicos se encuentran los dendrímeros. Estos polímeros sintéticos están compuestos por un núcleo central rodeado por varias capas de grupos funcionales que se van ramificando y que en la superficie presentan una alta reactividad. Los PAMAM (poli(amidoamina)) son un tipo de dendrímero que presentan alta estabilidad, solubilidad y capacidad para ser modificados con grupos funcionales (Tomalia & Fréchet, 2002). A pesar de estas características deseables, presentan una gran desventaja. Se ha encontrado que los dendrímeros PAMAM con terminales amino provocan el deterioro de los glóbulos rojos acortando su tiempo de vida y, por tanto, representan un daño a la salud física de las personas (R. Xu et al., 2007).

El equipo de trabajo del Laboratorio de Química Inorgánica del Instituto de Ciencias de la BUAP llevó a cabo un estudio con RMN sobre las interacciones supramoleculares de un compuesto constituido por tres ligantes de ácido dipicolínico que se coordinan a un ion de Dy^{3+} (DyADP) con el dendrímero PAMAM de tercera generación (G3) sugiriendo una posible interacción entre estos (Vasquez, 2021).

El propósito de este trabajo es continuar dicho estudio aplicando una metodología computacional de dinámicas moleculares que se conjunta y valida mediante titulaciones por RMN 1H , lo que permite cuantificar la constante de afinidad para el sistema DyADP: PAMAM G3. Posteriormente, una vez calibrada la metodología se evaluaron las interacciones supramoleculares entre el DyADP y moléculas de fructanos de agave y achicoria, como alternativa al uso de PAMAM G3.

Justificación

El estudio de los fructanos interactuando con compuestos de coordinación es un campo inexplorado que puede dar apertura a nuevas aplicaciones usando un recurso altamente disponible, ya que actualmente los fructanos se pueden obtener de manera comercial a partir de los agaves utilizados en la producción de mezcal (Plascencia et al., 2020). Si se demuestra que los fructanos encapsulan al compuesto de coordinación DyADP evaluando las interacciones supramoleculares entre éstos, se podrá proponer su uso como sondas paramagnéticas que mejoren las imágenes por RMI.

Antecedentes

La resonancia magnética de imagen es una técnica ampliamente utilizada para el diagnóstico médico de enfermedades presentes en los órganos internos (Arshiya Ara et al., 2011). El equipo de RMI induce un campo magnético externo que alinea los momentos magnéticos nucleares de los protones del agua presente en el cuerpo. Posteriormente, aplica una onda de radiofrecuencia específica que es resonante con los protones del agua, provocando que los núcleos de hidrógeno pasen a un estado de mayor energía y una vez que se remueve la onda, los protones regresan a su estado basal. Este proceso de relajación de los núcleos para regresar a su estado de equilibrio se divide en dos mecanismos: la relajación longitudinal T_1 (red-espín) y la relajación transversal T_2 (espín-espín). Finalmente, el cambio energético es detectado para generar las imágenes por computadora, por lo cual la alteración del tiempo en el que los mecanismos se llevan a cabo puede influir significativamente en la obtención de imágenes más nítidas (Caspani et al., 2020).

Agentes de Contraste

Precisamente, con la intención de mejorar la calidad de imagen se desarrollaron compuestos químicos denominados agentes de contraste (AC). En la década de los 80's se inició el desarrollo de los primeros AC, definiéndolos como sales de compatibilidad fisiológica compuestas por un átomo central (número atómico del 22 al 29, 42, 44 y 57 a 83) contenidos en moléculas quelatos (Pierre et al., 2014).

Existen muchos tipos de AC, han sido clasificados de acuerdo con su composición química, con su comportamiento biológico y también según sus propiedades magnéticas y por cómo afectan los tiempos de relajación longitudinal y transversal. Esta última categoría se divide en dos grupos: los compuestos paramagnéticos o AC positivos y los super paramagnéticos o AC negativos. El primer grupo comprende iones metálicos que tienen varios electrones desapareados como los iones lantánidos Gd^{3+} o el ion metálico de transición Mn^{2+} que promueven que los protones disipen la energía absorbida de manera más eficiente, por tanto, acortan el tiempo de relajación T_1 lo que a su vez provoca un aumento en la señal observada, es decir, un incremento en el brillo de las imágenes. En el grupo de los super-paramagnéticos se encuentran compuestos como el óxido de hierro, que generan imágenes más oscuras en las zonas de absorción del AC debido a que la señal disminuye al ocurrir un corto tiempo de relajación T_2 (Bottrill et al., 2006; Gómez-González et al., 2022; Zhou et al., 2017).

El primer AC descrito fue el pentaacetato de dietilentriamina Gd^{3+} (Gd-DTPA). Un año más tarde se desarrolló el AC ácido tetraaza-ciclododecano-tetraacético Gd^{3+} (Gd-DOTA) (Telgmann et al., 2013). Ambos compuestos, cuyas estructuras se muestran en la Figura 1, están presentes en el mercado como Magnevist y Dotarem respectivamente y son los más utilizados actualmente (Bottrill et al., 2006).

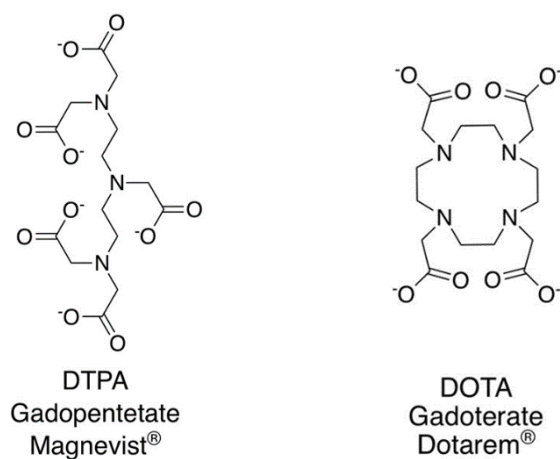


Figura 1. Agentes de contraste basados en gadolinio.

Estos compuestos se han considerado AC ideales para emplearse en RMI debido a su alta estabilidad y también por el gran momento magnético que presentan los iones Gd^{3+} (Babailov et

al., 2014); podemos observar en su configuración electrónica ($[\text{Xe}] 4f^7$) que el nivel $4f$ contiene siete electrones desapareados los cuales acortan los tiempos de relajación de los espines de los protones del agua presente en los tejidos. Por otra parte, los átomos de oxígeno y nitrógeno de los quelatos poliaminocarboxilatos tienen pares de electrones disponibles para formar enlaces covalente-coordinado con el gadolinio formando una unión fuerte (Sherry et al., 2009), es así como diferentes autores (Babailov et al., 2014; Bottrill et al., 2006) coinciden en mencionar que estos compuestos presentan estabilidad tanto cinética como termodinámica. Estas características adquieren vital importancia ya que los iones gadolinio no deben ser administrados libremente, para evitar su toxicidad es necesario que estén contenido en una molécula biocompatible, lo suficientemente afín al ion lantánido para que no ocurra la disociación del metal o se produzca un intercambio por otros cationes presentes en el cuerpo como Ca^{2+} , Zn^{2+} o Cu^{2+} (Pollet & Marx, 2007; Rodríguez Nava et al., 2008).

Sin embargo, estudios posteriores señalaron toxicidad por inestabilidad termoquímica, intercambio de ligantes y transmetalación (Pierre et al., 2014). No es de sorprender que se encontrara una estrecha relación con el desarrollo de la enfermedad fibrosis sistémica nefrogénica (FSN) en las personas a las que se aplicaron los AC, dado que, al ocurrir la disociación del compuesto de coordinación, los iones libres de gadolinio se acumulaban en los tejidos, planteando un problema de salud, especialmente en pacientes con función renal comprometida (Mekuria et al., 2017).

Los AC propuestos como alternativas al uso de Gd^{3+} que a su vez pueden considerarse como nuevas opciones para conseguir imágenes ponderadas en T_2 , incluyen compuestos con iones lantánidos. Andolina y colaboradores, sintetizaron, caracterizaron y evaluaron como AC bimodales (RMI en combinación con espectroscopia de infrarrojo cercano NIR) compuestos con Yb, Dy, Eu y Sm coordinados a quelantes heteroatómicos de nitrógeno y oxígeno; los resultados demostraron nula toxicidad por parte de los compuestos y determinaron que el compuesto de Yb es el mejor candidato para AC bimodal, resaltando continuar el desarrollo de compuestos de Dy^{3+} para AC T_2 (Andolina et al., 2012).

Asimismo, otros autores han propuesto compuestos de coordinación lantánidos como posibles AC para RMI: Babailov y colaboradores realizan un estudio sobre las propiedades magnéticas de compuestos de Ho^{3+} coordinado a ligantes del tipo aminopolicarboxilatos sugeridos para

diagnóstico de cáncer (Babailov et al., 2014). Por otra parte, Burai y colaboradores reportan compuestos de Eu^{2+} con quelatos macrocíclicos con particularidades óptimas para utilizarse como AC con respuesta redox, proyectando continuar el estudio en pro de mejorar la estabilidad y evitar la disociación de la especie Eu^{2+} (Burai et al., 2000).

Compuestos de Dy

El disprosio es un elemento metálico del bloque f , del grupo de los lantánidos, con número atómico 66 y configuración electrónica $[\text{Xe}] 4f^{10}6s^2$. Los lantánidos suelen encontrarse en los compuestos con estado de oxidación de +3. El Dy^{3+} es un ion f^9 es decir tiene cinco electrones desapareados y por lo tanto es un ion paramagnético (Atkins et al., 2010).

En el contexto del diagnóstico médico, los compuestos de Dy^{3+} son una propuesta prometedora. Actualmente RMI utiliza un campo magnético permanente (H_0) de entre 1 y 3 T, sin embargo, es posible obtener una mejor resolución de las imágenes al aumentar H_0 . El desarrollo de instrumentos con campos muy altos (3 a 7 T) y ultra altos (UHF) ($H_0 > 7$ T) conlleva al mismo tiempo a la búsqueda y generación de AC óptimos, ya que los empleados para campos < 1 T (como los de gadolinio y hierro) no son eficaces a mayor fuerza magnética (Gómez-González et al., 2021).

El ion Dy^{3+} exhibe dos características de suma importancia: presenta el momento magnético más alto dentro del grupo de los lantánidos; y tiene una eficiente relajación electrónica. Ambas particularidades tienen efecto sobre el mecanismo de relajación de Curie (que a su vez contribuye a la relajación transversal T_2). El mecanismo se produce a partir de la interacción dipolar entre los momentos magnéticos nucleares de los protones y los momentos magnéticos de los electrones desapareados del Dy^{3+} . La relajación de Curie es proporcional al cuadrado del momento magnético del ion lantánido y aumenta a medida que el campo magnético permanente se intensifica. Por tanto, los compuestos basados en Dy^{3+} son una propuesta de AC ideales para utilizarse en RMI de UHF (Norek & Peters, 2011).

Gómez-González y colaboradores reportaron la síntesis de nanopartículas primero de DyVO_4 y posteriormente de DyPO_4 (Gómez-González et al., 2022) ambos compuestos funcionalizados con moléculas de ácido poliacrílico (PAA) que ayudaron a estabilizar a las NPs en condiciones fisiológicas. El estudio comprobó que bajo la aplicación de un escáner de 9.4 T las NPs fueron

capaces de aumentar el contraste negativo de las imágenes, además se les reconoció como AC específicos para RMI de UHF. La mejor respuesta en cuanto a relaxividad (es decir la capacidad de acortar T_2) fue de las NPs de DyPO_4 las cuales también fueron evaluadas en cuanto a su biocompatibilidad y seguridad encontrando efectos de toxicidad no significativos.

De manera similar, Wan y colaboradores sintetizan nanopartículas de oro modificadas con Dy^{3+} ($\text{AuNP-DyDOTA(amida)}_x$) para aplicarse como AC T_2 para imágenes por RM de UHF debido a su tamaño pequeño, estabilidad y no toxicidad. Los estudios realizados *in vivo* a diferentes H_0 (1.2 T, 4.7 T, 7 T, 9.4 T) comprobaron que el contraste de las imágenes mejoró a medida que aumentaba la intensidad del campo magnético (Wan et al., 2020).

Por otra parte, Baek y colaboradores presentan una interesante propuesta de un compuesto de Dy^{3+} de bajo peso molecular evaluado como AC de UHF específico para el hígado. Sintetizan el compuesto macrocíclico de estabilidad quelante alta $\text{Dy}[\text{DO3A-EOB}]$ al cual le miden los tiempos de relajación T_1 y T_2 a diferentes campos magnéticos (1.5, 3, 4.7, 7 y 9.4 T). Los resultados muestran un incremento del realce negativo de las imágenes de hasta siete veces su valor a 1.5 T al incrementar el campo a 9.4 T. Los resultados fueron comparados con los obtenidos para el compuesto comercial $\text{Gd}[\text{DO3A-BT}]$ en ellos se aprecia que aun coordinados a un ligante con la misma estructura, no obtuvieron una bio-distribución equivalente, señalando que el metal también tiene un efecto particular sobre la captación y absorción del AC. Finalmente, los estudios *in vivo* demostraron una excelente respuesta como AC de UHF para diagnóstico de enfermedades del hígado (Baek et al., 2020).

El compuesto DyADP utilizado para el presente trabajo de investigación fue sintetizado y caracterizado por el equipo de trabajo del Laboratorio de Química Inorgánica de la BUAP. El compuesto obtenido posee un IC 9, con una geometría prismática trigonal triapicada y está coordinado a tres ligantes de ácido dipicolínico (ADP) uno de ellos con un radical deslocalizado en el sistema π (Fig. 2) (Carmona-Pérez et al., 2023). La formación de enlaces coordinados entre el Dy^{3+} y los átomos de oxígeno y nitrógeno en el ligante contribuye a la alta estabilidad termodinámica de este tipo de compuestos, característica que concuerda con las estructuras de los AC clínicamente aprobados (Sherry et al., 2009).

Las mediciones por RMN ^1H realizadas al compuesto confirman sus propiedades paramagnéticas, su rápida relajación electrónica, así como una mayor eficiencia de los mecanismos de relajación

de los protones del ligante cuando el ion lantánido está presente, señalando que las principales interacciones magnéticas son de tipo dipolar (Carmona-Pérez et al., 2023).

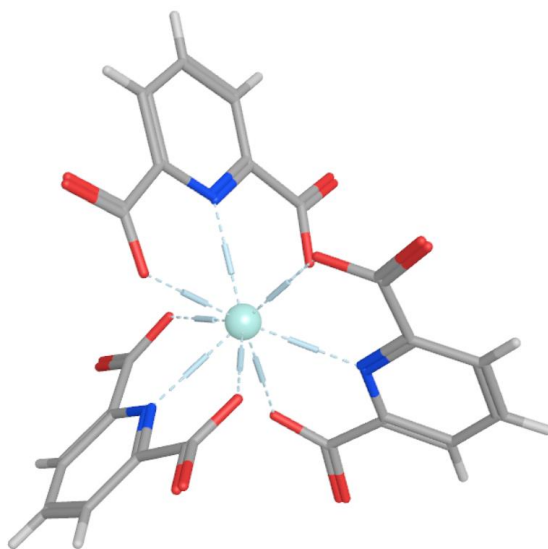


Figura 2. Estructura del compuesto DyADP. Dy aqua, N azul, O rojo, C gris, H blanco.

Dendrímeros

Para la bio-distribución de las sondas paramagnéticas se emplean moléculas acarreadoras como los dendrímeros. En específico, los dendrímeros PAMAM son moléculas formadas por un núcleo inicial que crece mediante la adición sucesiva de unidades amida, cada iteración de este proceso se considera una generación (Maiti et al., 2004). Tienen como características un tamaño nanométrico controlado, una alta capacidad de carga y una superficie altamente funcionalizable. Los PAMAM muestran interacciones supramoleculares, es decir que se unen a otras moléculas mediante enlaces no covalentes como las fuerzas de Van der Waals, los enlaces iónicos y los enlaces por puentes de hidrógeno. Estas interacciones hacen posible el encapsulamiento de moléculas huésped, sumado a las propiedades mencionadas, los PAMAM son útiles en aplicaciones como el acarreamiento de fármacos, la purificación de proteínas y las imágenes en RMI para diagnóstico (Varshey et al., 2012).

Los AC basados en Gd macrocíclico (DOTA, DTPA, DO3A, etc.) en combinación con dendrímeros PAMAM de distintas generaciones han sido diseñados con el objetivo de mejorar el contraste de las imágenes, así como su distribución dentro del cuerpo. Por lo general los dendrímeros mantienen a los compuestos cerca de las terminales. Es posible controlar la cantidad de AC que se injertan al dendrímero o si parte de las ramificaciones se funcionalizan con otras moléculas que intervengan en la biocompatibilidad, el tiempo de circulación o la estabilidad a largo plazo. Un ejemplo de este caso son los dendrímeros PAMAM de generación 5 los cuales primero se funcionalizaron con PEG y después se le añadieron derivados de Gd-DTPA, para aplicarse en ratones con injertos de cáncer de hígado humano, lo que condujo a la obtención de imágenes hiperintensas. También PAMAM G2.5 se funcionalizó secuencialmente con beta-ciclodextrina y adamantano y a continuación con Gd-DO3A, demostrando una respuesta exitosa en la obtención de imágenes de tumores en ratones. Otro ejemplo son los nanoclusters de PAMAM G3 con compuestos de Gd-DOTA que de igual manera mejoraron el realce de las imágenes en los estudios *in vivo*. Estas optimizaciones a las imágenes se deben a la gran cantidad de agentes paramagnéticos presentes en una sola entidad, sin embargo, un punto en contra a consecuencia de su gran tamaño es un mayor tiempo de retención en el sistema, aumentando el riesgo de generar efectos secundarios no deseados (Caminade et al., 2021).

En el trabajo de Mekuria y colaboradores se sintetizaron NPs de Gd₂O₃ cultivadas en el centro del dendrímero PAMAM G4.5 y funcionalizadas con polietilenglicol (PAMAM-G4.5-Gd₂O₃-PEG) propuestas como AC dual (T_1 y T_2) para RMI. Uno de los parámetros evaluados fue la relaxividad longitudinal (r_1) a 7 T; se encontró que el valor de r_1 para este compuesto era casi 5 veces mayor comparado con el obtenido para el AC Gd-DTPA. Las imágenes conseguidas de los estudios *in vivo* ponderadas para T_1 mostraron un mayor realce del contraste en hígado, bazo y vejiga; además para el caso del riñón, las imágenes presentaron mejor contraste tanto en T_1 como en T_2 (Mekuria et al., 2017b).

Otra propuesta de AC basados en dendrímeros (G1-G4) fue presentada por Huang y colaboradores quienes extienden la plataforma de imagen molecular Biosensor Imaging of Redundant Deviation in Shifts (BIRDS), la cual mide los desplazamientos químicos de protones no intercambiables en monómeros paramagnéticos, a sistemas con dendrímeros paramagnéticos. La evaluación del compuesto de Tm³⁺ coordinado al ligante DOTA⁴⁻ en combinación con dendrímeros PAMAM de diferentes generaciones, demostró que la relación señal-ruido de los BIRDS fue igual o mejor que

la sensibilidad obtenida para los monómeros de TmDOTA⁻ por lo que concluyen que este tipo de compuestos tendrán aplicaciones biomédicas tanto para RMI como para la técnica de imagen óptica (Huang et al., 2015).

Desafortunadamente una desventaja importante a destacar es que los dendrímeros PAMAM causan hemólisis; esto es la degradación de glóbulos rojos y también su deformación y agregación, por lo que estos dendrímeros son considerados sustancias peligrosas para el cuerpo humano (R. Xu et al., 2007). En consecuencia, se ha decidido para este trabajo concluir la parte experimental-computacional con el DyADP y el PAMAM G3 con la intención de calibrar una metodología y posteriormente aplicar el método a otras moléculas con posibilidad de encapsular el compuesto DyADP.

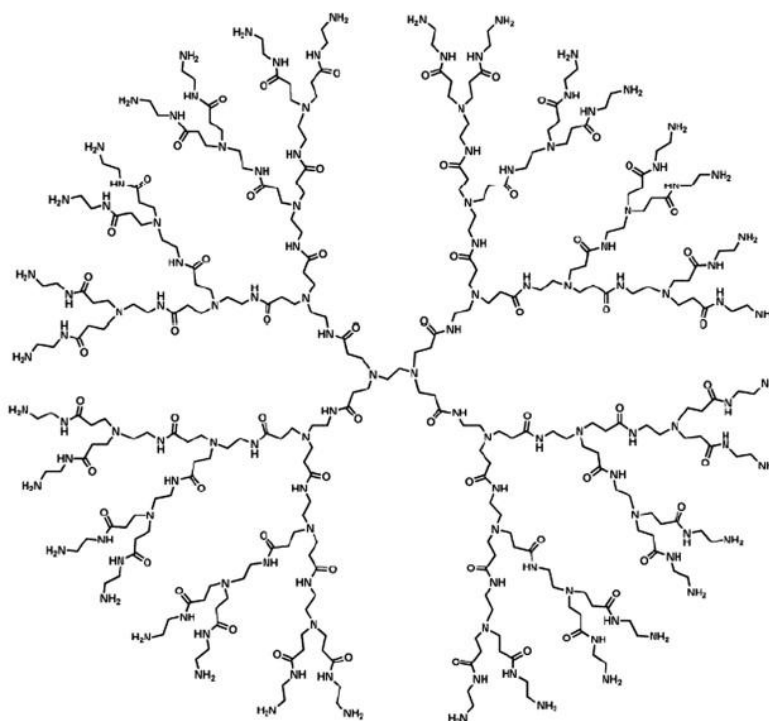


Figura 3. Estructura de PAMAM generación 3.

Fructanos

Como propuesta alternativa a los PAMAM se consideran las moléculas de fructanos. Los fructanos son un tipo de carbohidrato hidrosoluble de cadena lineal o ramificada. Se componen de varias unidades de fructosa y una molécula de glucosa, unidas mediante enlaces glucosídicos (Moreno-

Vilet et al., 2016). Su grado de polimerización (DP) va desde tres a cientos de unidades según su origen, y presentan diferencias de acuerdo con las posiciones de los enlaces entre las unidades de fructosa, la posición de la molécula de glucosa, y si se ramifican. Dentro de las estructuras más simples de cadena lineal está el fructano 1-kestosa con enlace β (2,1) lo cual significa que dos moléculas de fructosas forman un enlace entre el carbono anomérico de una unidad y un grupo -OH del carbono en posición 1 de la siguiente unidad. El fructano 6-kestosa, tiene un enlace glucosídico β (2,6) y la neokestosa contiene la unidad de glucosa entre dos fructosas (Fig. 4)(Van den Ende, 2013).

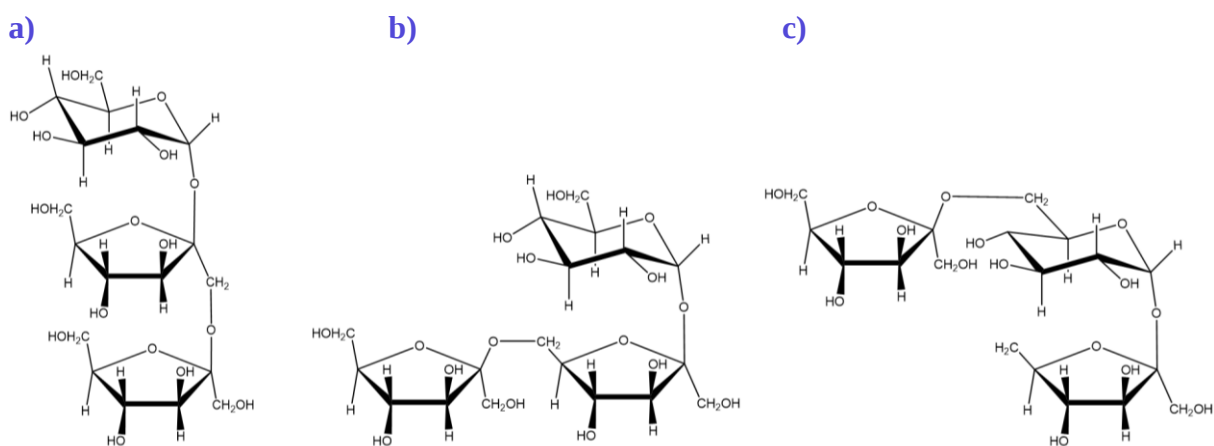


Figura 4. Estructuras de fructanos: a) 1-Kestosa, b) 6-Kestosa, c) Neokestosa

Los fructanos con grado de polimerización mayor a 10 se les conoce como moléculas de tipo inulina cuando son lineales. Existen diferentes plantas que presentan un alto contenido de inulina, como el agave, la achicoria, el diente de león, la dalia, la alcachofa, etc. Entre sus propiedades destacan la formación de gel, la retención de agua y el espesamiento, además muestran funciones fisiológicas como inmunoestimulantes y anticancerígenas (Ni et al., 2019).

Estos polisacáridos naturales han sido ampliamente investigados desde el campo de la nutrición como alimentos funcionales, demostrando muchos beneficios para la salud humana debido a sus efectos prebióticos (Hughes et al., 2022). Una de las aplicaciones de los fructanos que va en aumento es en el campo farmacéutico. Tanto la inulina como los fructanos no son procesados por el sistema digestivo hasta que llega al colon, lo que ha promovido su uso como sistemas de

liberación de moléculas bioactivas específicas para esta parte del intestino grueso (Tripodo & Mandracchia, 2019). Además, nuevas aplicaciones de moléculas basadas en inulina han surgido a partir de su funcionalización, por ejemplo, la inulina ha sido modificada para obtener surfactantes o también para la obtención de hidrogeles, micelas o nanopartículas que incorporan fármacos (Gupta et al., 2019).

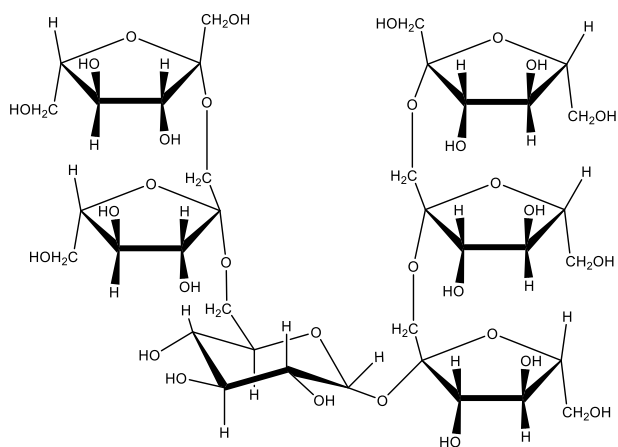
Uno de los trabajos dónde se puede apreciar la aplicación de estos polisacáridos como moléculas acarreadoras de fármacos es el de Joseph y colaboradores. La síntesis de NPs de inulina de achicoria reticuladas con calcio y estabilizadas con miel demostraron un eficaz encapsulamiento del fármaco clorhidrato de irinotecán trihidratado (IHT), el cual es utilizado en el tratamiento contra el cáncer de colon. Las NPs mostraron una actividad anticancerígena mejor que la obtenida por el fármaco IHT puro, además de acuerdo con los resultados de estabilidad tanto coloidal como de almacenamiento se encontró una excelente biocompatibilidad proponiéndolo como un sistema nano acarreador perfecto para la administración de fármacos específicos para el colon (Joseph et al., 2024).

Por otro lado, Delgadillo y colaboradores presentan un sistema de liberación de fármacos basado en microesferas de fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul. Los fructanos fueron modificados por acetilación con la intención de aumentar su liposolubilidad y así mejorar su degradación por las bacterias del colon logrando liberar las moléculas huésped. Para este estudio el fármaco utilizado fue el ibuprofeno y encontraron que las microesferas de fructanos eran capaces de cargarse hasta con un 33% del fármaco, consiguiendo a su vez una óptima, estable y específica liberación (Delgadillo et al., 2015).

En este trabajo se utilizaron fructanos de agave tequilana (fructanos ramificados con diferentes grados de polimerización) e inulina de origen achicoria (la inulina se caracteriza por poseer una estructura lineal). A la par de utilizar polisacáridos naturales como posibles acarreadores de AC biocompatibles, se persiguen como intereses complementarios: el aprovechamiento de una fuente explotable de fructanos presentes en la piña y la parte basal de las hojas de la planta de agave, estos últimos en el proceso de elaboración de mezcal son totalmente desechados (Soto-Castro et al., 2021). Y por otra parte se contribuye al estudio de los fructanos en el campo de la química supramolecular y sus interacciones con compuestos de coordinación, con la intención de expandir posibles aplicaciones de estos polisacáridos. Cabe destacar que para las dinámicas moleculares se

simularon moléculas de fructanos sencillas como las presentadas anteriormente y también de DP 6, constituido por cinco fructosas y una glucosa y de DP 11, el cual presenta tres ramificaciones con un total de diez fructosas y una glucosa (Fig. 5).

a)



b)

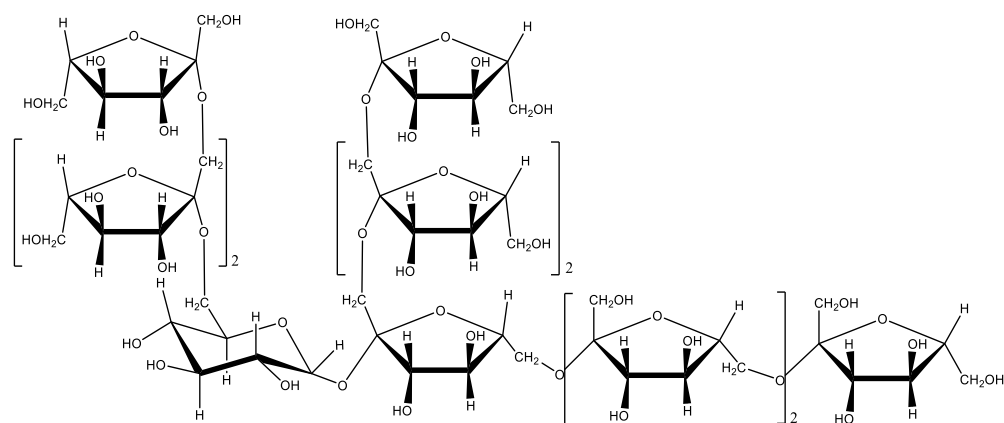


Figura 5. Estructuras de fructanos a) DP 6, b) DP 11.

Generalidades de las técnicas de simulación y espectroscopía

Simulaciones Computacionales

En las últimas décadas, el desarrollo de las simulaciones computacionales ha escalado significativamente, considerándose una valiosa herramienta para la investigación en diferentes áreas científicas. Dentro de su aplicación en el campo de la química, las simulaciones se basan en diferentes métodos para modelar y predecir sistemas moleculares. Entre los principales beneficios podemos destacar en primer lugar el ahorro económico y temporal en experimentos dentro del laboratorio y la reducción de riesgos a la salud humana a causa de la manipulación de sustancias peligrosas. Y, por otra parte, la química computacional complementa y enriquece el análisis e interpretación de fenómenos complejos, que pueden ser difíciles de explicar exclusivamente por técnicas analíticas (González, 2011).

La historia de las simulaciones computacionales parte de los métodos de cálculo de la mecánica cuántica: *ab initio* (que significa primeros principios). Con la intención de modelar sistemas moleculares más grandes o complejos y de estudiar las interacciones moleculares y las reacciones, los cálculos teóricos se alimentaron con datos experimentales, de ahí surgieron los métodos conocidos como semiempíricos. A pesar de ser métodos más eficientes computacionalmente y una herramienta útil para estimar propiedades de sistemas mucho más grandes comparados con los métodos *ab initio*, la gran desventaja radica en una menor precisión (Cramer, 2004).

Sin embargo, cuando queremos describir un sistema molecular de tamaño moderado a grande que además se desea monitorear en un periodo de tiempo, no es posible abordarlo con los métodos mencionados anteriormente; precisar todos los efectos electrónicos resulta imposible por el alto coste computacional, sea por insuficiencias temporales o espaciales. Es así como resulta necesario escalar a un nivel más alto en las aproximaciones. Desde la mecánica molecular, el estudio de estos sistemas se puede plantear mediante simulaciones de dinámica molecular (DM) (González, 2011).

Dinámica molecular

La DM es un tipo de simulación computacional que utiliza aproximaciones basadas en la mecánica clásica de Newton. Este tipo de simulaciones proporcionan información de las estructuras

moleculares y sus conformaciones, así como las interacciones con otros sistemas moleculares y los cambios ocurridos en función del tiempo. Las simulaciones de DM tienen una amplia gama de aplicaciones en química, bioquímica, farmacología, etc. (Karplus & McCammon, 2002).

En un sistema de coordenadas cada partícula que compone el modelo de estudio tiene una posición (x_i, y_i, z_i) y lleva un momento (p_{xi}, p_{yi}, p_{zi}) , que permiten describir el estado del sistema en cada punto del espacio, a esto se le conoce como espacio de fase. En la figura 6 se muestra la correlación normalizada del monitoreo de la variación de la distancia entre un átomo de nitrógeno de una amida de PAMAM G3 al átomo de Dy del compuesto durante los primeros 100 ps.

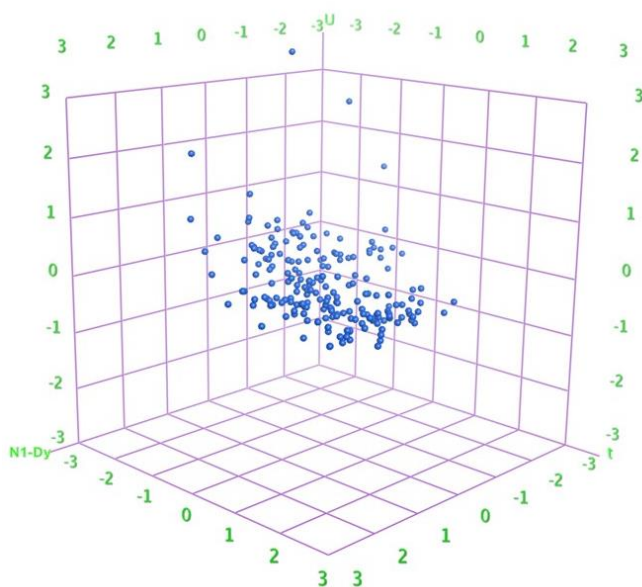


Figura 6. Correlación normalizada del sistema PAMAM: DyADP 1:1, en los primeros 100 ps.
En los ejes; x: tiempo; y: distancia Namida-Dy; z: energía.

Conforme avanza el tiempo, el espacio de fase va trazando una trayectoria. La trayectoria es clave para conocer el comportamiento del sistema a medida que evoluciona en el tiempo, por ello para obtener el análisis de las regiones de interés entre la cantidad tan grande de puntos que abarca el espacio de fase (incluye regiones de muy alta energía que no son relevantes), es necesario partir de un estado de mínima energía. Además, como la trayectoria es continua y periódica, cada punto de fase condiciona el siguiente, por tanto, es posible conocer el comportamiento de la sustancia y/o las tendencias de interacción, es decir, el dinamismo representativo del sistema (Cramer, 2004).

Campo de fuerza

Para realizar las simulaciones de DM se requiere un modelo matemático denominado campo de fuerza (CF) que describe las interacciones entre átomos y moléculas. Existen muchos CF; dependiendo del sistema a estudiar se considera cual es el más apropiado o incluso es común el desarrollo de campos para sistemas específicos que no se han podido simular de forma adecuada con los existentes. Aun así, todos establecen un potencial energético a partir de las fuerzas que se generan entre los diferentes tipos de interacciones moleculares (Martinho et al., 2014).

Podemos clasificar estas interacciones en intramoleculares e intermoleculares. En las primeras se abarca la conectividad entre átomos, se describe el enlace como un vector que conecta dos átomos, la flexión que existe entre ellos proporciona el ángulo y si hay más de cuatro átomos se describe añadiendo términos torsionales (Fig. 7). Además, el ensamble de estas tres características es otra cuantificación, que se incluye en los términos cruzados. Estas contribuciones a la energía total se encuentran en los primeros cuatro términos de la ecuación 1 (Cramer, 2004; González, 2011).

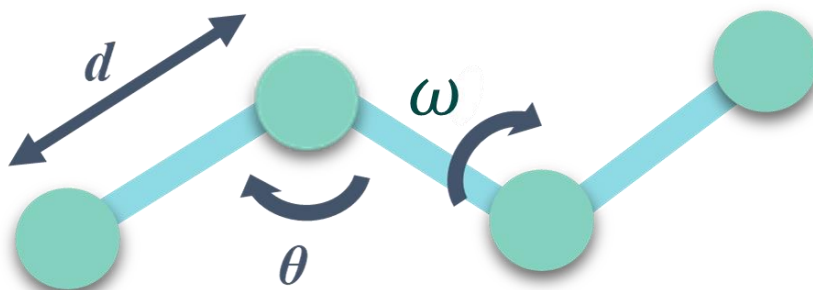


Figura 7. Parámetros geométricos, d : distancia, θ : ángulo, ω : ángulo diedro.

En el segundo tipo de interacción se pueden destacar dos construcciones de energía potencial, las interacciones de Van der Waals y de repulsión, referidas por medio del potencial de Lennard Jones (LJ) y la interacción únicamente electrostática (Fig. 8), que se expone con la ecuación de Coulomb.

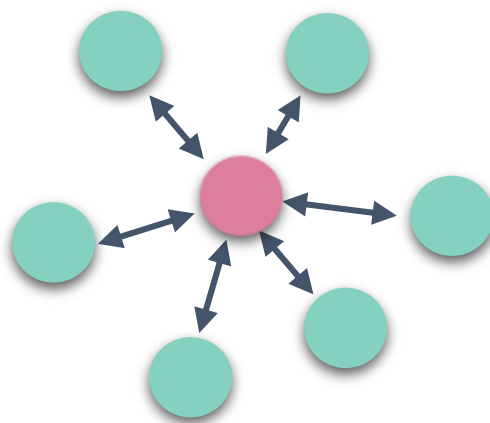


Figura 8. Interacciones intermoleculares.

Las respectivas ecuaciones matemáticas están expresadas en los últimos dos términos de la ecuación 1 (Cramer, 2004; González, 2011).

$$U = \sum_{\text{enlaces}} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torsiones}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \delta)] + \sum_{\text{imp}} V_{\text{imp}} + \sum_{LJ} 4\epsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right) + \sum_{\text{elec}} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (1)$$

De acuerdo con lo mencionado por Xu y colaboradores (P. Xu et al., 2015), existen dos tipos de CF, los *precisos* integrados por MM3, CHARMM, OPLS, AMBER y el CF que se utilizó para este trabajo Merck Molecular Force Field (MMFF94), que se utilizan principalmente para biomoléculas, en específico para sistemas locales. Y, por otra parte, se encuentran los denominados *completos* (AUA, UFF, DREIDING, COMPASS, etc.) que se aplican en el área de la ciencia de los materiales.

El campo de fuerza MMFF94 fue creado con el objetivo de aplicarse en los campos de bio-orgánica y farmacia, en su desarrollo consiguió parametrizar (mediante cálculos de mecánica cuántica) las interacciones electrostáticas, así como de Van der Waals y también, los términos cruzados y de valencia coordinada para generar geometrías moleculares óptimas. Su aplicación se enfoca en sistemas receptor-ligante de biomoléculas como proteínas o ácidos nucleicos, pues dedican

especial atención en la correcta descripción tanto de los receptores como de una amplia variedad de ligantes, así como del proceso de unión entre estas (Halgren, 1996; Tosco et al., 2014).

Es importante señalar que la calidad de un CF se reconoce por evaluación experimental. La parametrización de MMFF94 es derivada de cálculos *ab initio* lo que le concede precisión, pero es justamente mediante la validación experimental que se reconoce y recomienda su aplicación para sistemas de moléculas orgánicas y macromoléculas biológicas (Halgren, 1996; Lewis-Atwell et al., 2022).

Aplicaciones

Las simulaciones de dinámica molecular seguramente son una de las mejores opciones para el modelado de dendrímeros, en gran parte porque al ser un sistema molecular de tamaño moderado-grande los métodos cuánticos resultan inconvenientes y aún mediante métodos híbridos (cálculos de mecánica cuántica/ mecánica molecular) la descripción de este tipo de sistemas representa un reto. Conseguir una representación fiable de los dendrímeros, es decir, una que considere las diferentes características como: el número de generación, grupos funcionales presentes, ramificaciones y vacíos, etc., resulta de gran importancia pues permite conocer su comportamiento en disolución y las interacciones con fármacos, biomoléculas o compuestos metálicos. A través del uso de DM podemos obtener información respecto a la interacción entre el dendrímero y la molécula huésped, indicando la estabilidad, retención y liberación de esta, así como el papel del disolvente. Por ejemplo, evaluar por DM a los dendrímeros PAMAM, que son sistemas sumamente estudiados, permite validar metodologías y campos de fuerza, que finalmente proporcionarán un mejor entendimiento del comportamiento de los dendrímeros y un avance en la parametrización de las simulaciones para sistemas específicos (Martinho et al., 2014).

En el trabajo de Krishnan y colaboradores (Krishnan Namboori et al., 2013) se generaron, mediante el software MOE y con un CF MMFF94, las siguientes propiedades de diferentes polímeros entre ellos dendrímeros PAMAM G3 a G5: volumen de Van der Waals, capacidad calorífica, tensión superficial, temperatura de transición vítrea, constante dieléctrica, índice de refracción molar, momento dipolar efectivo, parámetros de solubilidad, susceptibilidad magnética, rigidez molar y conductividad térmica. El análisis computacional de este estudio tuvo como

objetivo la evaluación de hidrogeles basados en dendrímeros como sistemas de administración de fármacos, concluyendo que los hidrogeles formulados con PAMAM G5 eran una opción apropiada para este propósito.

También, en el estudio teórico de Bayat y colaboradores (Bayat et al., 2019), abordan una metodología que combina métodos *ab initio*, semiempíricos y dinámicas moleculares con CF MMFF94 para compuestos de fármacos que inhiben el crecimiento del virus de la hepatitis (Adefovir, Entecavir, Telbivudina, Lamivudina y Tenofovir) monitoreando el área de unión con dendrímeros PAMAM G3: el área A comprende las ramificaciones de la generación 2.5 a 3, área B va de la generación 1.5 a 2 y el área C del centro a la generación 1; con relaciones molares 1:1 y 1:18 PAMAM-fármaco. Para el diseño de estos compuestos se tomaron en cuenta los efectos de los puentes de hidrógeno, las interacciones electrostáticas, los espacios vacíos y los efectos estéricos. Además de predecir las estructuras más probables, se evaluó la posibilidad de liberación, administración y separación de los fármacos. Los resultados demostraron que la formación de un complejo de PAMAM con Entecavir y de PAMAM con Adefovir eran teóricamente posibles, además informan que en este último el fármaco se unió en el área B y fue el de mayor estabilidad. Por último, determinan la secuencia de liberación del fármaco.

Por otra parte, Abraham y colaboradores (Abraham et al., 2017) utilizan MMFF94 en conjunto con el desplazamiento inducido por lantánidos (LIS por sus siglas en inglés) de la técnica de RMN para un estudio conformacional de lactamas con $\text{Yb}(\text{fod})_3$. Los resultados demostraron una buena concordancia en las geometrías calculadas para cada compuesto.

El modelado de metales lantánidos con moléculas orgánicas es un área activa de la investigación. En general, no existen muchos ejemplos de estudios de compuestos lantánidos que utilicen MMFF94, o cualquier CF de modelado de biomoléculas (como CHARMM, AMBER, GROMOS) debido a la falta de parametrización de iones lantánidos. Algunas estrategias a las que se puede recurrir para lograr modelar estos sistemas son el modelo de enlace, el modelo de no enlace, la aproximación de átomo catiónico ficticio o la aproximación de modelo polarizable. Otra opción es utilizar Python Based Metal Center Parameter Builder (MCBP.py), una herramienta que permite generar parámetros específicos para centros metálicos y pueden integrarse con los programas de los CF mencionados, como en el estudio de Oliveira donde se emplea MCBP para modelado del

AC Gd-DOTA. La elección de la estrategia depende del sistema de estudio y de los recursos computacionales disponibles (Oliveira et al., 2022).

En este proyecto se eligió utilizar el CF MMFF94 con el modelo de enlace, es decir, se considera al compuesto de coordinación como está descrito en la estructura cristalográfica donde es necesario asignar las longitudes de enlace entre el átomo de metal y los ligantes de manera fija, así como las constantes de fuerza para estos enlaces (Fig. 9). El software, que utilizamos fue el Molecular Operating Environment (MOE) (Chemical Computing Group ULC., 2022).

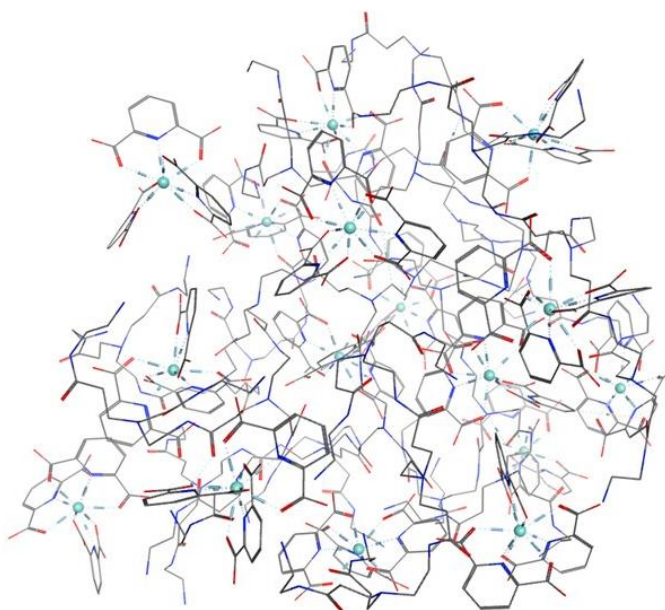


Figura 9. Estructura del sistema PAMAM G3: DyADP 1:16 en el paso 2000 ps producida después de una DM en el software MOE.

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los núcleos atómicos están compuestos esencialmente por neutrones y protones, con valores de espín nuclear de $\frac{1}{2}$. Los espines desapareados de estas partículas se describen por medio del número cuántico de espín nuclear I , si todos los espines se han apareado $I = 0$, estos núcleos no pueden observarse por RMN, sin embargo, si uno de los espines queda sin aparearse con otro, entonces el número cuántico de espín neto será diferente de cero; por ejemplo, si $I_N = +\frac{1}{2}$ e $I_P = +\frac{1}{2}$, entonces $I_N + I_P \neq 0$, o en el caso de ^{13}C con seis protones y siete neutrones el espín nuclear total $I = \frac{1}{2}$. Existen numerosos núcleos con $I = \frac{1}{2}$; por ejemplo, el ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , etc. Este espín desapareado confiere un momento magnético al núcleo, μ_N , con una distribución esférica cuando se encuentra en un campo magnético (Drago, 1992).



Figura 10. Representación de un núcleo con $I = 1/2$ como una esfera giratoria.

Las orientaciones que presentan los espines se asocian con el número cuántico del momento angular de espín m_I , que puede tomar valores que van desde $I, I-1, \dots, (-I+1)$, hasta $-I$. Así para $I = \frac{1}{2}$, $m_I = \pm \frac{1}{2}$. En ausencia de un campo magnético, μ_N puede tener dos orientaciones. Al someter a los núcleos a un campo magnético permanente, H_0 , de acuerdo con la distribución de Boltzmann, la población de los espines se repartirá en dos niveles energéticos, siendo el nivel de menor energía el mayormente poblado. Los espines se alinearán con el campo magnético; algunos se orientarán en contra de la dirección de las líneas de campo magnético, conformando un estado más negativo de energía potencial y otros espines lo harán a favor del campo conformando el estado de energía potencial menos negativa (estado excitado). Esto se conoce como efecto Zeeman nuclear. El estado α alude al primer caso con $m_I = +\frac{1}{2}$, y el estado excitado β corresponde al estado excitado con $m_I = -\frac{1}{2}$. La suma de los momentos magnéticos nucleares y electrónicos individuales

de toda la molécula sometida a un campo magnético genera una magnetización neta, $\vec{M}$ (Drago, 1992).

La separación entre los estados energéticos depende de la fuerza del campo aplicado, con un campo magnético de baja fuerza la separación es pequeña; caso contrario, aplicando un campo magnético de intensidad alta el desdoblamiento de los niveles energéticos es más grande, dando lugar a que la relajación nuclear tome más tiempo y se pueda obtener una mejor resolución en el espectro (Drago, 1992).

El experimento inicia cuando el equipo de RMN aplica un campo magnético permanente H_0 sobre los núcleos con $I = 1/2$ (por convención definido el eje z). El campo magnético interactúa con los momentos nucleares y se elimina la degeneración de los estados $m_I = \pm 1/2$. La diferencia energética ΔE , entre los niveles α y β está dada por:

$$\Delta E = g_N \beta_N H_0 \quad (2)$$

donde g_N es el factor g para el núcleo y el magnetón de Bohr es $\beta_N = \frac{eh}{2mc}$, e es la carga y m la masa del protón, fig. 11 (Pavia et al., 2013).

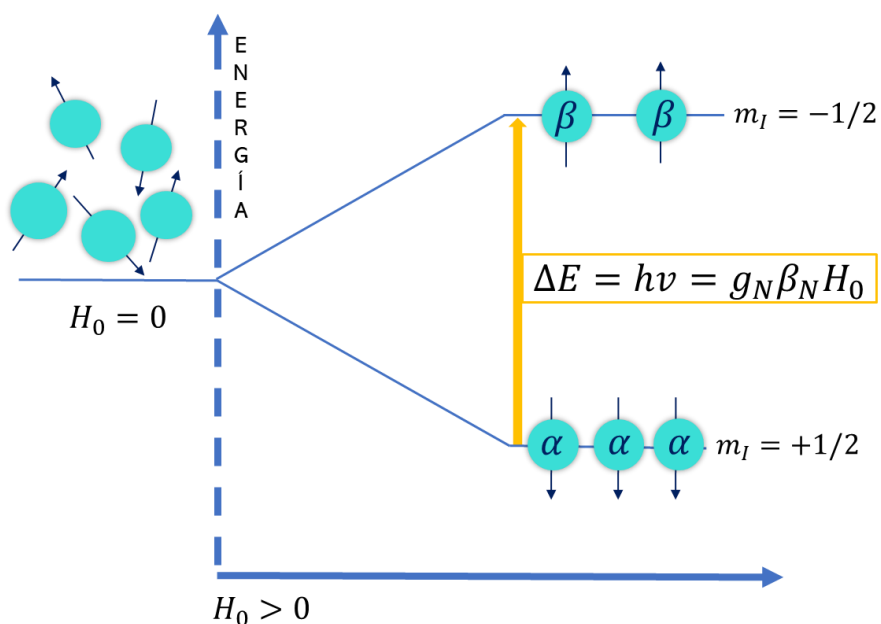


Figura 11. Efecto Zeeman nuclear; desdoblamiento de los niveles energéticos al aplicar un campo magnético H_0 .

Posteriormente, se aplica perpendicularmente a H_0 , un pulso correspondiente a un campo magnético aplicado, H_1 , con energía suficiente para generar la transición ($h\nu$) comparable al ΔE , así, los espines en α absorben la energía de la radiación de H_1 , esto produce que el vector de magnetización neta de los espines nucleares $\vec{M}_z$ (localizada sobre el eje z) se oriente a 90° sobre el plano transversal xy, donde el núcleo estudiado puede ser observado por el detector del equipo.

La condición para que pueda ser detectado este proceso es la coincidencia de la radiofrecuencia con la frecuencia de Larmor (ω): la frecuencia de precesión de un núcleo alrededor del campo magnético aplicado, la cual es proporcional a la constante giromagnética (γ) (Ec.3) y por lo tanto particular de cada núcleo con sus respectivos isótopos. Si esto sucede se dice que están en resonancia (Pavia et al., 2013).

$$\omega = \gamma H_0 \quad (3)$$

Al momento de detener la radiación electromagnética H_1 , los espines resonantes regresan al estado de menor energía, el estado basal α .

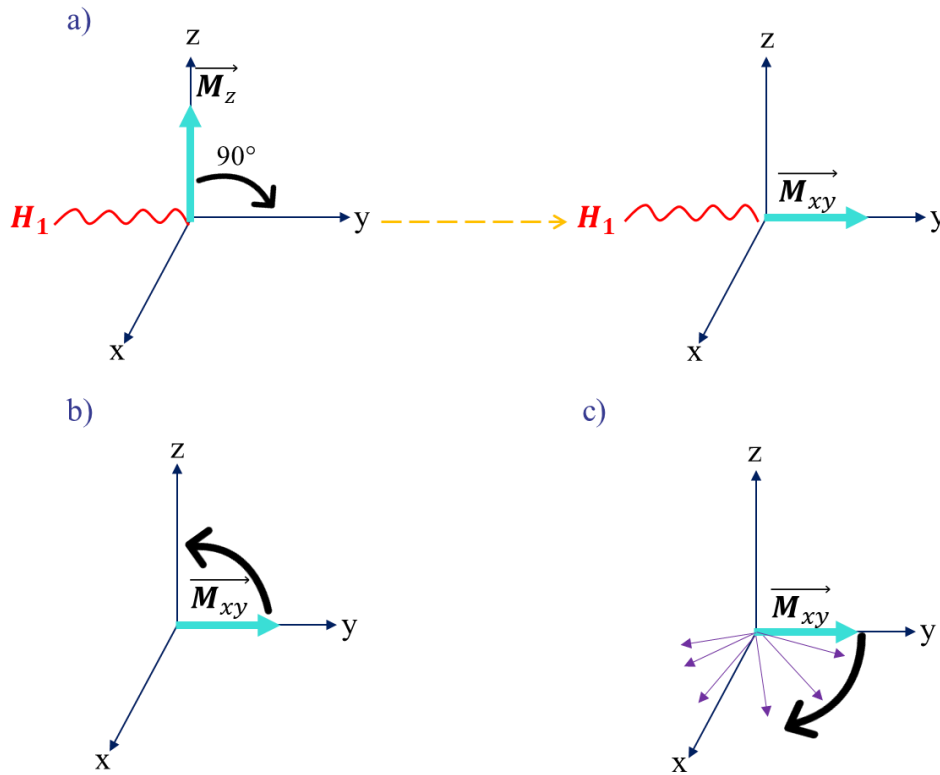


Figura 12. a) Representación en los tres ejes del experimento de RMN b) Mecanismos de relajación longitudinal c) mecanismo de relajación transversal.

Para disipar la energía absorbida, los espines llevan a cabo dos mecanismos de relajación, el mecanismo T_1 espín-red o longitudinal, y el mecanismo T_2 espín-espín o transversal. El primero es un proceso donde los espines nucleares intercambian energía con la red (otros núcleos o electrones de la molécula o incluso del disolvente). El segundo mecanismo ocurre por interacción de dos núcleos, un núcleo con $m_I = +\frac{1}{2}$ pasa a un estado de mayor energía mientras que otro núcleo con $m_I = -\frac{1}{2}$ presenta el cambio contrario, fig. 12 (Drago, 1992).

Cuando el equipo de RMN apaga el campo magnético en la dirección del plano xy y enciende el campo magnético permanente, la magnetización $\vec{M}_{xy}$ transversal decae y comienza nuevamente el crecimiento de la magnetización longitudinal $\vec{M}_z$. Las ecuaciones del decaimiento y crecimiento (Ec. 4 y 5) son presentadas a continuación, donde $\vec{M}_0$ es la magnetización en el equilibrio:

$$\dot{M}_{xy} = -\frac{M_{xy}}{T_2} \quad (4)$$

$$\dot{M}_z = -\frac{1}{T_1}(M_z - M_0) \quad (5)$$

En presencia de un ion metálico con uno o varios electrones desapareados, el momento magnético de espín electrónico μ_e interactúa con el momento magnético de espín nuclear, obligando a que la relajación nuclear sea más rápida (este efecto se profundiza en el apartado siguiente). El mecanismo de relajación T_2 se vuelve entonces muy eficiente; sin embargo, es también por esta característica que el equipo detecta al espín nuclear por un tiempo menor generando señales de poca resolución. De acuerdo con el principio de incertidumbre de Heisenberg:

$$\Delta E \Delta t \approx \hbar \quad (6)$$

podemos observar que no es posible medir la variación de la frecuencia a la vez que transcurre el tiempo de vida que tarda en el estado excitado. Así, asociando la ecuación anterior con $\Delta E = h\Delta\nu$, y despejado para la frecuencia, obtenemos que $\Delta\nu$ es inversamente proporcional a Δt puesto que:

$$\Delta\nu \propto \frac{1}{2\pi\Delta t} \quad (7)$$

es decir, a menor tiempo de relajación mayor será la variación de la frecuencia, produciendo una señal muy ancha (Drago, 1992).

Los espectros obtenidos por RMN presentan diferentes señales que corresponden a un tipo específico de núcleo de acuerdo con su momento y su entorno magnético en el que se encuentra. Por lo general, la sustancia utilizada como referencia para determinar las posiciones de otros compuestos es el tetrametilsilano (TMS), debido a que no reacciona con la mayoría de los disolventes comúnmente utilizados, posee una simetría isotrópica magnética ya que no cuenta con electrones desapareados y no afecta la composición de la muestra. Una alternativa al TMS para utilizarse como sustancia de referencia es la señal no deuterada del disolvente que se emplea (Drago, 1992).

RMN de moléculas paramagnéticas

El experimento de RMN puede aplicarse a sistemas paramagnéticos. Las sustancias paramagnéticas son aquellas que tienen al menos un electrón desapareado. Los espines nucleares de los protones perciben a los electrones desapareados como una densidad de espín electrónica distribuida a través del espacio. Los efectos transmitidos por la densidad electrónica a los núcleos pueden dividirse en tres contribuciones: efectos espín-orbita, acoplamiento de contacto de Fermi y acoplamiento de pseudocontacto o dipolar. La interacción entre el momento magnético de espín electrónico y el momento magnético de espín nuclear, presente en las contribuciones mencionadas se engloba bajo el concepto de acoplamiento hiperfino (Bertini et al., 2015).

Los efectos espín-órbita surgen por la interacción entre el momento de espín electrónico S y su momento magnético angular orbital L , alrededor de un núcleo generando un campo magnético percibido por el núcleo resonante. Los momentos angulares individuales resultantes de cada electrón ($\vec{j}$) se acoplan para dar un vector $\vec{J}$ del sistema.

$$\vec{J} = \vec{L} + \vec{S} \quad (8)$$

A mayor número de electrones desapareados el acoplamiento espín-órbita incrementa, por tanto, para los iones de metales lantánidos (por ejemplo, para Dy^{3+} $S=5/2$), el efecto es incluso mayor que las interacciones electrón-electrón del campo cristalino (Bertini et al., 2015).

Los acoplamientos de contacto y pseudocontacto son efectos que contribuyen al campo magnético permanente al proveer un campo magnético adicional debido a la interacción entre el momento magnético del espín nuclear y el momento magnético de espín electrónico promedio; la diferencia entre estos radica en si la densidad de espín se encuentra directo sobre el núcleo resonante (contacto de Fermi) o localizada en el resto de la molécula interactuando a través del espacio (pseudocontacto) (Bertini et al., 2015).

Estos efectos promueven la relajación nuclear, por lo cual en los espectros de RMN de moléculas paramagnéticas se puede observar un ensanchamiento de las señales comparadas con las de los espectros de moléculas diamagnéticas. Además, tienen efecto en el desplazamiento químico; los iones paramagnéticos tienden a atraer a los electrones desprotegiendo a los núcleos resonantes y por tanto provocan que estos últimos perciban el campo magnético con mayor intensidad. La diferencia entre el desplazamiento químico de las moléculas diamagnéticas (típicamente entre 0 y 16 ppm) y el desplazamiento anisotrópico originado por la presencia de las moléculas paramagnéticas (desplazamientos a ppm muy positivas o negativas) es llamado desplazamiento isotrópico hiperfino (Ec. 9) (Drago, 1992).

$$\delta_{isotrópico} = \delta_{paramagnético} - \delta_{diamagnético} \quad (9)$$

Las principales contribuciones para el sistema evaluado en este proyecto provienen del acoplamiento espín-órbita dada la presencia de un ion lantánido, así como los efectos de acoplamiento dipolar ocurridos entre la densidad de espín electrónica del DyADP y los núcleos de los protones de las moléculas encapsuladoras (PAMAM G3 y fructanos). Tomando en cuenta estas consideraciones, se propone el siguiente hamiltoniano (Ec. 10) para describir nuestro sistema; el primer término corresponde a la interacción del campo magnético con el momento de espín nuclear, después la contribución producida por el acoplamiento dipolar, donde $\vec{r}$ es el vector de los momentos magnéticos nuclear y electrónico y r es la distancia entre ellos. El tercer término es el acoplamiento espín orbita donde $\hat{L}$ es el momento angular orbital del electrón y r es la distancia entre espines (Drago, 1992).

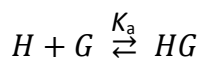
$$\hat{H} = -g_N\beta_N H_0 \hat{I}_z - g_e\beta_e g_N\beta_N \left\{ \frac{\hat{I} \cdot \hat{S}}{r^3} - \frac{3(\hat{I} \cdot \vec{r})(\hat{S} \cdot \vec{r})}{r^5} \right\} + g_N\beta_N\beta_e \frac{2\hat{L} \cdot \hat{I}}{r^3} \quad (10)$$

Constante de Asociación

Jean-Marie Lehn, ganó el premio Nobel por su trabajo en química supramolecular en 1987. Lehn definió la química supramolecular como “la química más allá de la molécula”, un área que comprende la formación de sistemas químicos a partir de moléculas unidas por interacciones no covalentes. En un principio, el sistema fue descrito como la unión entre una molécula anfitriona, normalmente de gran tamaño que tiene como característica una cavidad de unión (por ejemplo, los macrociclos como los éteres corona o los criptandos) y una molécula huésped que reside dentro de esta cavidad (cationes de metales). Este complejo huésped-anfitrión (o supermolécula) se mantiene unido por fuerzas electrostáticas diferentes al enlace covalente como las interacciones por puentes de hidrógeno, el enlace iónico, las fuerzas de Van der Waals, las interacciones de coordinación metal-ligante, el apilamiento aromático, etc., y por las cuales presenta una energía de unión estimable (Steed & Atwood, 2009).

La fuerza de interacción entre una molécula anfitrión (H) y una molécula huésped (G) puede ser cuantificada por la constante de asociación K_a . La aproximación más utilizada para obtener K_a es el método de titulación supramolecular donde el huésped es añadido gradualmente a la solución del anfitrión a la par que se monitorea una propiedad física por medio de técnicas espectroscópicas como RMN, UV-vis o fluorescencia (Kadam et al., 2014).

El equilibrio y su correspondiente ecuación para K_a de la formación del complejo HG con $n=m$ es:



$$K_a = \frac{[HG]}{[H][G]} \quad (11)$$

Para cualquier equilibrio diferente del sistema 1:1, la ecuación general está dada por:

$$mH + nG \xrightleftharpoons{\beta_{mn}} H_m G_n$$
$$\beta_{mn} = \frac{[H_m G_n]}{[H]^m [G]^n} \quad (12)$$

Por ejemplo, si $m=1$ y $n=2$ se describiría el equilibrio 1:2. Las interacciones involucran asociaciones y disociaciones reversibles, es decir, los equilibrios son dinámicos y con frecuencia no es posible conocer $[HG]$ en los experimentos de química supramolecular, por ello, a través del método de titulación es posible obtener de manera indirecta $[HG]$ y finalmente determinar K_a . Por lo general, en la titulación, la concentración del anfitrión se mantiene mientras que la concentración del huésped varía. Graficando el cambio en la propiedad física medida por una espectroscopia, por ejemplo, el desplazamiento químico en el caso de RMN o el cambio en la absorbancia en UV-vis en función de la variación de la concentración, se obtendrá una curva de valoración llamada isoterma de unión (Fig. 13) (Thordarson, 2011).

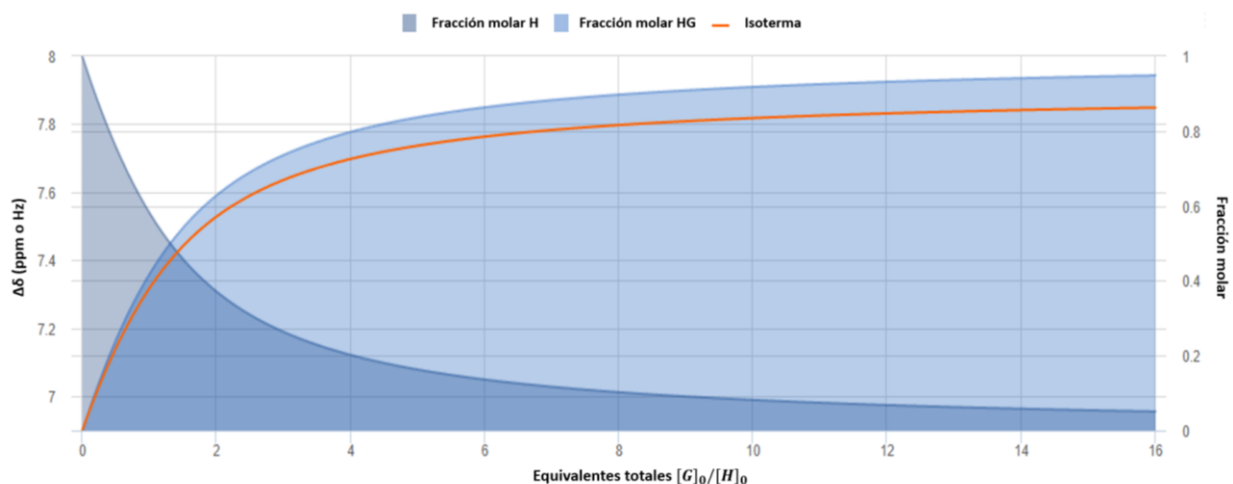


Figura 13. Isoterma de unión. Supramolecular.org. Recuperado el 25 de mayo de 2024, de <http://supramolecular.org/>

El isoterma de unión es ajustado a un modelo matemático. Tomando en cuenta que:

$$[H]_0 = [H] + [HG] \quad (13)$$

$$[G]_0 = [G] + [HG] \quad (14)$$

Donde $[H]_0$ y $[G]_0$ son las concentraciones totales (o iniciales) y $[H]$ y $[G]$ son las concentraciones libres del huésped y del anfitrión, respectivamente. Por otra parte, el cambio en el observable espectroscópico monitoreado (Y) puede comprenderse como el conjunto de los componentes individuales (H, G, HG) en función de las fracciones molares, $f_{HG} = [HG]/[H]_0$:

$$Y = Y_H f_H + Y_G f_G + Y_{HG} f_{HG} \quad (15)$$

Ahora bien, podemos reorganizar las ecuaciones 13 y 14 y después sustituir en la ecuación 11, obteniendo:

$$K_a = \frac{[HG]}{([H]_0 - [HG])([G]_0 - [HG])} \quad (16)$$

Expandiendo el denominador, tenemos que:

$$K_a = \frac{[HG]}{[H]_0[G]_0 - [HG]([H]_0 + [G]_0) + [HG]^2} \quad (17)$$

Al reorganizar la ecuación anterior para igualar a cero obtenemos la ecuación cuadrática (Ec. 18) y su correspondiente solución (Ec.19):

$$[HG]^2 - [HG] \left([G]_0 + [H]_0 + \frac{1}{K_a} \right) + [H]_0[G]_0 = 0 \quad (18)$$

$$[HG] = \frac{1}{2} \left\{ \left([G]_0 + [H]_0 + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\left([G]_0 + [H]_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 - 4[H]_0[G]_0} \right\} \quad (19)$$

La ecuación 19 nos permite obtener K_a y también resolver la ecuación 15. Si a una de las componentes, digamos el huésped, la asumimos como silenciosa (no absorbente de radiación, como en el caso del DyADP que no presenta señales en la región del espectro donde monitoreamos el cambio físico), podemos simplificar la ecuación 15 sustituyendo $[H] = [H]_0 - [HG]$ y $f_{HG} = [HG]/[H]_0$, quedando:

$$Y = Y_H + \frac{[HG]}{[H]_0} (Y_{HG} - Y_H) \quad (20)$$

$$\Delta Y = Y_{\Delta HG} \left(\frac{[HG]}{[H]_0} \right) \quad (21)$$

La obtención de K_a y ΔY es posible mediante una regresión no lineal multiparamétrica, ejecutada por programas que utilizan un algoritmo que solo requiere los valores conocidos de $[H]_0$ y $[G]_0$ y una estimación inicial de los parámetros desconocidos (K_a y ΔY) los cuales se comparan y varían de manera iterativa hasta llegar al mejor ajuste. El sitio web: supramolecular.org (Thordarson, 2011) fundado por el Dr. Pall Thordarson, provee una calculadora que realiza el ajuste matemático, para ello, el usuario debe proporcionar un documento de Excel que contenga el cambio en los desplazamientos en cada punto de la titulación frente a las concentraciones del huésped y el anfitrión. En el tutorial también se indica que el método de titulación por RMN es confiable para estudiar constantes de asociación en un intervalo de 10^{-10} a 10^{-1} M; para valores 10^{-5} a 10^{-1} M y por encima de 10^{-1} M la precisión disminuye (Fielding, 2000; Thordarson, 2011).

En el trabajo de Hu y colaboradores, aplican el método de titulación por RMN 1H para conocer la afinidad de la supermolécula PAMAM G5/guanosínmonofosfato (GMP) con la intención de comprender los procesos de transfección de genes con participación de dendrímeros. El desplazamiento químico de las señales de los protones de los diferentes metilenos del PAMAM demostró una interacción entre los grupos de aminas catiónicos del dendrímero y los grupos fosfato del GMP. La ecuación que utilizaron para conocer K_a y el número de sitios de unión n es:

$$\Delta\delta = \frac{\Delta\delta_{\text{máx}}}{2} \left\{ \left(1 + \frac{1}{nK_a[H]_0} + \frac{[G]_0}{n[H]_0} \right) - \sqrt{\left(1 + \frac{1}{nK_a[H]_0} + \frac{[G]_0}{n[H]_0} \right)^2 - \frac{4[G]_0}{n[H]_0}} \right\} \quad (22)$$

El valor reportado de K_a para este complejo fue de 1.7×10^4 M $^{-1}$ así como un total de 107 sitios de unión por cada dendrímero G5 (Hu et al., 2010).

Por otro lado, Buckoswski y colaboradores realizan un estudio espectroscópico de la formación del compuesto supramolecular basado en PAMAM G5 con terminales amino y este mismo con terminales hidroxilo como moléculas anfitrionas y el fármaco antitumoral 5-fluorouracil como molécula huésped. Un tratamiento matemático similar al de Hu fue llevado a cabo a partir de los datos de la titulación por RMN 1H . Para la supermolécula 5-fluorouracil/PAMAM G5-NH $_2$ catiónico se encontró un valor de $K_a = 240 \pm 50$ y un valor de $n = 70 \pm 2$; y para el sistema análogo basado en PAMAM G5-OH neutral se reportó un valor de $K_a = 110 \pm 40$ y de $n = 14 \pm 2$, confirmando una mayor afinidad entre el fármaco y el dendrímero catiónico resultado de interacciones electrostáticas fuertes debidas a la disociación de los protones del fármaco y la

protonación de los grupos aminos superficiales a $pK_a = 8.13$, a diferencia del sistema neutral donde las interacciones son a través de puentes de hidrógeno (Buczowski et al., 2012).

Tomando en cuenta las características del compuesto DyADP y del dendrímero PAMAM G3 consideramos que la combinación del análisis espectroscópico por RMN 1H junto a las simulaciones por dinámica molecular ofrecen un método adecuado para conocer la interacción entre ambas sustancias. La aplicación de los modelos mencionados al sistema supramolecular DyADP:PAMAM G3 pretende informar la afinidad entre las moléculas a través de la obtención de la constante de asociación K_a . Este procedimiento nos permitirá evaluar y comparar al sistema DyADP con moléculas de fructanos.

Hipótesis

Es posible comprobar la existencia de interacciones supramoleculares entre fructanos de bajo peso molecular y el compuesto DyADP, experimentalmente mediante la técnica de RMN ^1H y computacionalmente por simulaciones de dinámica molecular.

Objetivo general

Establecer la metodología experimental y computacional para evaluar las interacciones supramoleculares entre fructanos y el compuesto DyADP por RMN ^1H en combinación con simulaciones de dinámica molecular.

Objetivos específicos

- I. Estudiar experimentalmente las interacciones del compuesto DyADP con fructanos mediante RMN ^1H .
- II. Realizar simulaciones de dinámica molecular del compuesto DyADP con modelos de fructanos para identificar los grupos funcionales de interacción supramolecular.
- III. Calibrar la metodología propuesta con PAMAM G3 y el compuesto DyADP, con diferentes concentraciones y parámetros de adquisición, utilizando RMN ^1H y datos de dinámica molecular reportados en la literatura.

Metodología

Reactivos y Equipos

Para la síntesis del compuesto de coordinación DyADP se siguió el protocolo descrito por Carmona y colaboradores (Carmona-Pérez et al., 2023). Se pesaron en una balanza analítica marca Ohaus, modelo AP250E, 0.3342 g (2mmoles) del ligante ácido dipicolínico (ADP) adquirido con el proveedor Sigma-Aldrich y 0.0812 g (0.5mmoles) de Dy⁰ marca Strem Chemicals y se añadieron a un matraz de bola de 25 mL y se agregaron 5 mL de disolvente DMSO marca Química Mercurio. La reacción se llevó a cabo en atmósfera de N₂ con agitación constante con una modificación en la temperatura de 80°C en lugar de 60°C, durante 5 h.

Parte Experimental: Titulación por RMN ¹H

Los experimentos de RMN ¹H para la titulación del PAMAM G3 20% en metanol marca Sigma Aldrich y el compuesto DyADP se llevaron a cabo en un equipo Bruker de 500 MHz en DMSO-*d*⁶, utilizando como referencia DMSO sin deuterar. Los parámetros de adquisición para estas mediciones fueron; ancho de ventana: 200 ppm, NS: 2000, TD:130 000. De manera similar se realizaron los experimentos para el sistema DyADP: Fructanos. Los fructanos fueron purificados por el equipo de trabajo del laboratorio de biomacromoléculas del CIIDIR Oaxaca a partir de los productos comerciales inulina de achicoria marca *ebien* y fructanos de agave azul marca *Hacienda de oro de agave*, consiguiendo tres muestras diferentes; Muestra 1: Fructano utilizando disolvente acetona para su precipitación (DP intermedio). Muestra 2: Inulina lineal de la planta de achicoria (DP intermedio). Muestra 3: Fructanos ramificados de la planta de agave (DP alto).

Se prepararon las disoluciones de PAMAM G3 y del compuesto DyADP, ambas con una concentración de 7.5 mM: en un tubo eppendorf se pesaron 0.0026 g del DyADP y se adicionaron con una micropipeta 500 µL de DMSO-*d*⁶. A otro tubo se agregaron 492 µL de PAMAM G3 y se disolvieron en 1500 µL DMSO-*d*⁶. A partir de estas disoluciones se realizaron una serie de diluciones obteniendo las siguientes relaciones molares de la mezcla DyADP: PAMAM G3:

0.016:1, 0.031:1, 0.063:1, 0.071:1, 0.083:1, 0.1:1, 0.125:1, 0.166:1, 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 1:0.5, 1:0.25, 1:0.125, 1:0.063, 1:0.031.

Se planteó una metodología similar para el sistema con fructanos; se pesaron 0.0264 g de los fructanos y se añadieron 1800 μL DMSO- d^6 . Para la disolución del DyADP se disolvieron 0.0070 g en 1300 μL DMSO- d^6 . Finalmente se prepararon una serie de diluciones con las siguientes relaciones molares de la mezcla DyADP: Fructanos, 0.031:1, 0.063:1, 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 1:0.5, 1:0.25, 1:0.125 y se midieron en el equipo de RMN con los parámetros de adquisición establecidos anteriormente.

Con la intención de facilitar la discusión de los espectros se denominó como región diamagnética al fragmento del espectro entre 0 y 16 ppm y como región paramagnética a la parte del espectro que va desde 16 a 100 ppm, así como los valores de ppm negativos. Además, las señales de los disolventes se marcan con un símbolo de estrella. Se utilizaron los softwares de Mnova y Origin para el análisis de los espectros obtenidos mediante RMN.

Parte Computacional

La metodología computacional se llevó a cabo utilizando el programa Molecular Operating Environment (MOE)(Chemical Computing Group ULC., 2022) con un campo de fuerza Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94x) (Halgren, 1996). Para las DM se hizo el intercambio del ion metálico de Dy^{3+} por Fe^{2+} debido a que los lantánidos no están parametrizados en el CF MMFF94x y para asegurar que las distancias cristalográficas se conservaran durante toda la simulación se restringieron los nueve enlaces de coordinación del ligante ADP hacia el ion metálico. La selección de cambio de carga obedece a la complejidad del sistema para que los estados de protonación coincidieran con lo reportado por Carmona (Carmona-Pérez et al., 2023). De esta manera se consideró bajar en una unidad la carga del metal central debido al electrón deslocalizado en los ligantes determinado experimentalmente.

Para el sistema DyADP: PAMAM G3 se realizaron dos simulaciones de DM la primera colocando ocho compuestos de DyADP alrededor de una molécula de PAMAM G3 y en la segunda simulación se colocó al PAMAM G3 rodeado con dieciséis DyADP. Debido a la cantidad de

átomos se eligió modelar las condiciones de solvatación con la constante dieléctrica del DMSO para ambas simulaciones.

En cuanto a los fructanos, se ejecutaron diferentes simulaciones, primero con las estructuras simples (1-kestosa, 6-kestosa y neokestosa) y un DyADP, colocando las moléculas a una distancia inicial de 3Å del centro metálico a cada molécula de fructano y otra serie de simulaciones sin imponer alguna distancia inicial. Posteriormente se propuso el envío de dos simulaciones con DyADP, la primera interactuando con el fructano DP 6 y la segunda con el fructano DP 11. Además, para cada una se realizaron tres inicios de simulación diferente, el primero sin acercar ninguna de las estructuras moleculares. En el segundo inicio se impuso una distancia inicial entre ambas moléculas, eligiéndose dos átomos extremos del fructano y se acercaron 3Å al compuesto de coordinación. En la tercera simulación se inició con una distancia de 3Å al DyADP desde fructano pero ahora desde tres átomos, para el caso del DP 6 se eligen dos átomos extremos y uno del centro de la cadena y para el DP 11 se escoge un átomo en el extremo de las tres ramificaciones que presenta. En la Tabla 1, se sintetizan los parámetros aplicados para los sistemas mencionados:

Tabla 1. Parámetros de las dinámicas moleculares.

Parámetros	DyADP:PAMAM G3 (8 y 16 DyADP)	DyADP:Fructanos (1-kestosa, 6-kestosa, neokestosa)	DyADP:Fructanos (DP 6, DP 11)
Temperatura	298K	298K	298K
Disolvente	Constante dieléctrica del DMSO	Esfera de moléculas explícitas de DMSO	Esfera de moléculas explícitas de DMSO
Tiempo de equilibrio	50 ps	50 ps	50 ps
Tiempo de simulación	4000 ps	6000 ps	14000 ps

Discusión de Resultados

Sistema DyADP: PAMAM G3

Mediciones de RMN ^1H

Se llevaron a cabo experimentos de titulación por RMN ^1H que involucran la adición gradual del compuesto huésped, el DyADP, al dendrímero PAMAM G3 clasificado como molécula anfitriona en DMSO- d^6 . Se obtuvieron los espectros de RMN ^1H de ambas moléculas por separado (Figs. 14 y 15) así como los espectros de todas las concentraciones de la mezcla DyADP: PAMAM G3 (Apéndice A. Fig. A3-A18). La asignación de las señales de PAMAM G3, del DyADP y los desplazamientos químicos una vez que se realiza la titulación, se concentran en la tabla 2.

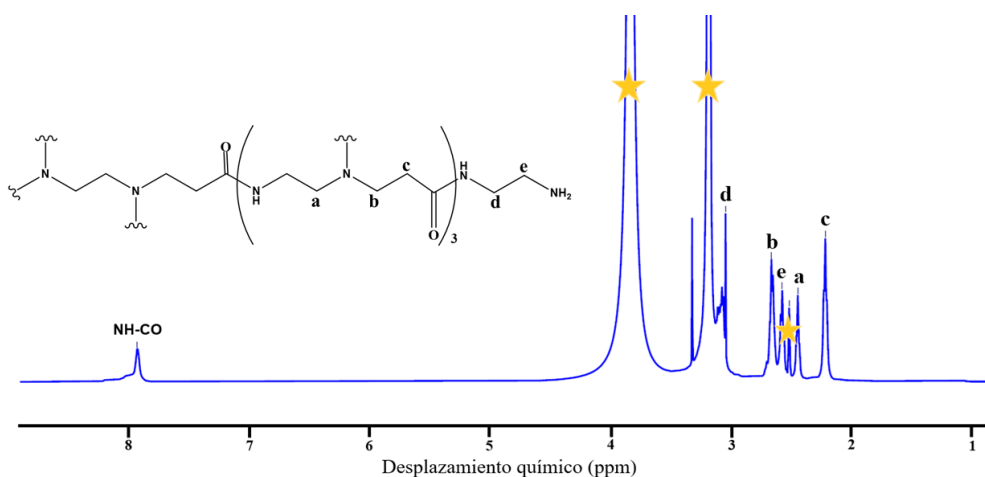


Figura 14. Espectro RMN ^1H (DMSO- d^6) de PAMAM G3.

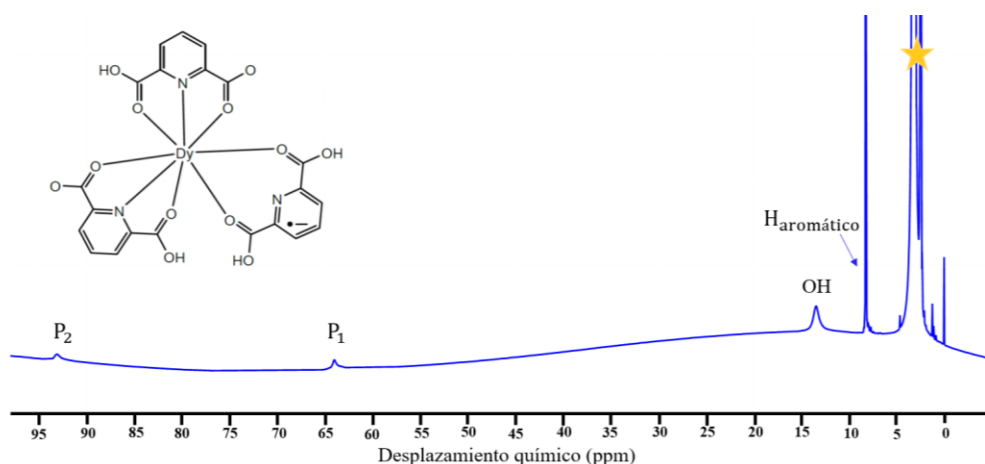


Figura 15. Espectro RMN ^1H (DMSO- d^6) de DyADP.

Tabla 2. Desplazamientos químicos (ppm) RMN ¹H con diferentes relaciones molares del sistema DyADP:PAMAM G3.

	PAMAM G3	0.016:1	0.031:1	0.063:1	0.071:1	0.083:1	0.1:1	0.125:1	0.167:1	0.25:1	0.5:1	1:1	1:0.5	1:0.25	1:0.125	1:0.062	1:0.031	DyADP
a	2.420	2.425	2.420	2.435														
b	2.641	2.646	2.641	2.642														
c	2.202	2.198	2.188	2.189														
d	3.071	3.029	3.029	3.028														
e	2.556	2.55																
NH-CO	8.003	7.923	7.894	7.884	7.898	7.886	7.882	7.876	7.876	7.887	7.823	7.784	7.783					
H _{aromático}																		8.236
OH																		13.416
I ₁							30.214	28.964	29.816	28.944	28.501	28.180	30.378					
I ₂							33.304	32.208	33.233	32.217	31.658	31.434	34.116	34.007	32.041			
P ₁																70.151	63.472	63.999
P ₂																		93.039

I_{1,2} = señales de interacción. *P_{1,2}* = señales paramagnéticas características del DyADP (Carmona-Pérez et al., 2023).

A partir del espectro de PAMAM G3 solo, se puede observar el desplazamiento químico en la región diamagnética de los grupos NH_{amida} y CH_2 (Fig. 14). Las señales de los grupos CH_2 del PAMAM G3 rápidamente se ensanchan y deforman con el incremento de la concentración de DyADP (Apéndice A. Fig. A3-A6). Sin embargo, podemos darle seguimiento a la señal NH_{amida} , que aparece alrededor de 7.8-7.9 ppm en las relaciones molares 0.016:1 hasta 1:0.500 (Fig. 16).

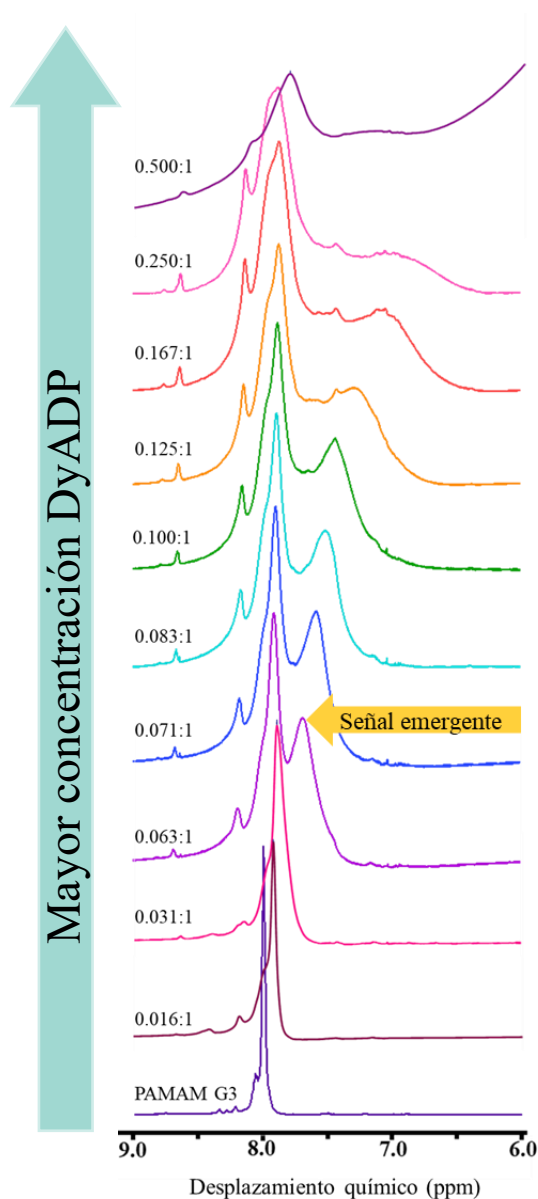


Figura 16. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) región diamagnética de la mezcla DyADP: PAMAM G3 con diferentes relaciones molares.

En los espectros DyADP: PAMAM G3 con relación molar 0.063:1 hasta 0.500:1 es evidente que una nueva señal se deriva de la de NH_{amida} , se desplaza hacia campo alto y finalmente ambas señales se unen en una sola banda muy ancha.

A partir de estas observaciones se propone que con bajas concentraciones del DyADP, gran parte de los 60 NH_{amida} que tiene el PAMAM G3 no están interactuando con un centro metálico; por lo cual, no son afectadas por el paramagnetismo de Dy^{3+} y en sus espectros se observan señales con ligera deformación causadas por las moléculas que si están interactuando con un centro metálico (espectros 0.016:1, 0.031:1). Pero cuando aumenta la concentración del DyADP, el efecto paramagnético se extiende sobre una cantidad mayor de protones de los grupos NH_{amida} , provocando no solo un aumento en el ancho de la señal debido al acoplamiento hiperfino de los electrones del ion metálico y los núcleos de hidrógeno de los grupos amida, sino también, el desplazamiento hacia mayor energía a causa de la desprotección de los núcleos más cercanos al centro metálico, generando finalmente la señal que llamamos emergente (Fig. 16).

Considerando lo anterior, se realizó la deconvolución de las señales de los espectros con relaciones molares de 0.063:1 a 0.250:1 y al de PAMAM G3 para obtener el total de gaussianas dentro de las señales mencionadas (Apéndice A. Fig. A4). Para el caso del dendrímero se obtuvieron un total de tres señales, que corresponden a las diferentes poblaciones de los grupos NH_{amida} que tiene cada generación del PAMAM (Fig. 17).

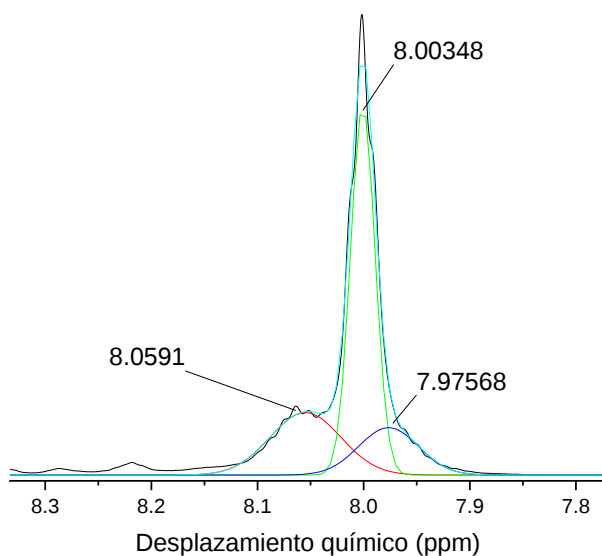


Figura 17. Deconvolución con gaussianas en la señal NH_{amida} del espectro de PAMAM G3.

Las deconvoluciones de los espectros con DyADP agregado, mantienen un total de cinco gaussianas, sugiriendo que las nuevas señales son producto de las interacciones de los protones de NH_{amida} con el compuesto DyADP. Por ejemplo, para el espectro con relación molar 0.071:1 (Fig. 18), la señal que denominamos emergente (en color magenta) corresponde a los protones de las NH_{amida} más perturbados (en comparación con el resto de los protones de NH_{amida}) por la cercanía al ion paramagnético, por lo que podemos proponer que son los NH_{amida} de más fácil acceso, es decir, los de la última generación. Se hace énfasis en que esta es la señal que podemos monitorear más no significa que sea el punto de contacto con el DyADP.

La gaussiana que se localiza entre las dos principales (en color azul) surge debido a que los protones NH_{amida} de las generaciones intermedias del PAMAM G3 comienzan a percibir el efecto paramagnético. Bajo este planteamiento, es factible considerar que en un principio el DyADP es rodeado por parte de las terminales del PAMAM G3 y que, al aumentar la concentración del compuesto, las moléculas de DyADP se adentran en el dendrímero, fortaleciendo el encapsulamiento.

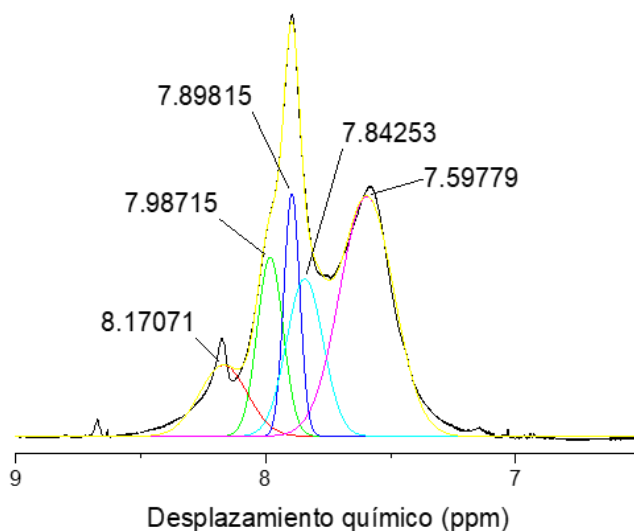


Figura 18. Gaussianas en la señal NH_{amida} del espectro de la mezcla DyADP:PAMAM G3.

En cuanto a la región paramagnética podemos observar en la mayoría de los espectros obtenidos señales alrededor de 30 ppm, que no aparecen en el espectro de DyADP solo (Fig. 19).

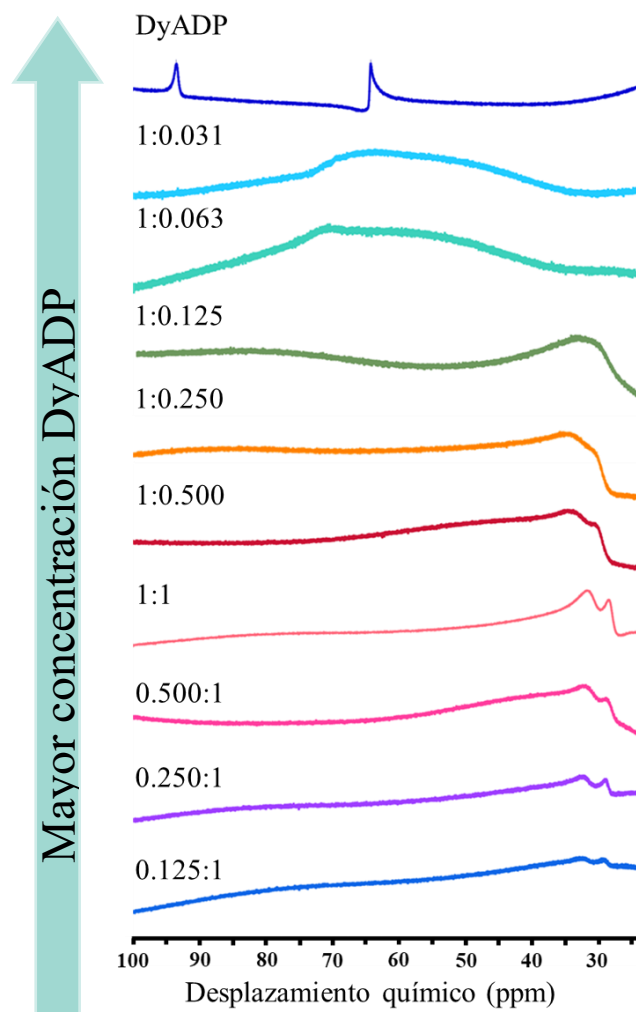


Figura 19. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) región paramagnética de la mezcla DyADP: PAMAM G3, con diferentes relaciones molares.

Si bien en la figura 19 partimos de la relación molar 0.125:1, es importante destacar que estas señales comienzan a aparecer desde 0.063:1 (aunque se observan con menor intensidad), misma concentración del compuesto de coordinación en la que aparece la señal emergente en la región diamagnética. Por ello se propone que las señales que aparecen a partir de esta relación molar y hasta 1:0.125, son propias de la interacción entre ambas sustancias. En el espectro 1:0.063 se observa una señal en 70 ppm indicando el inicio de saturación del PAMAM G3 por el compuesto de Dy^{3+} y en el espectro de 1:0.031 la señal se recorre a 63 ppm, coincidiendo con la señal que presenta el espectro del DyADP solo.

Dinámica molecular

La información obtenida por simulaciones de dinámica molecular nos ayudó a fortalecer la descripción de la interacción entre el compuesto DyADP y el PAMAM G3. A partir de las DM generadas anteriormente (Vásquez, 2021), para este sistema, se dieron seguimiento a las distancias de los 60 grupos NH_{amida} al ion lantánido, en una simulación con relación DyADP: PAMAM G3 1:1 (Fig. 20).

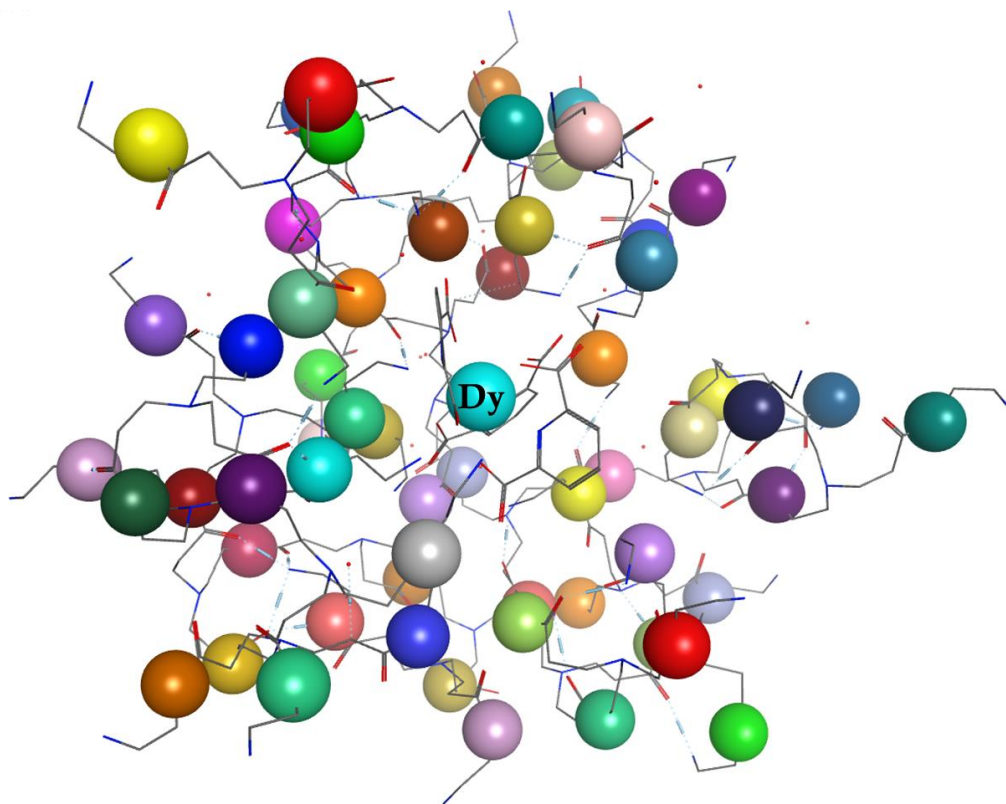


Figura 20. Dinámica molecular DyADP: PAMAM G3 1:1, se destacan en círculos grandes y de colores los grupos NH_{amida} de PAMAM G3.

El gráfico obtenido indica que la distancia que mantienen los grupos amida hacia el Dy^{3+} se encuentra entre 5 y 20 Å (Fig. 21).

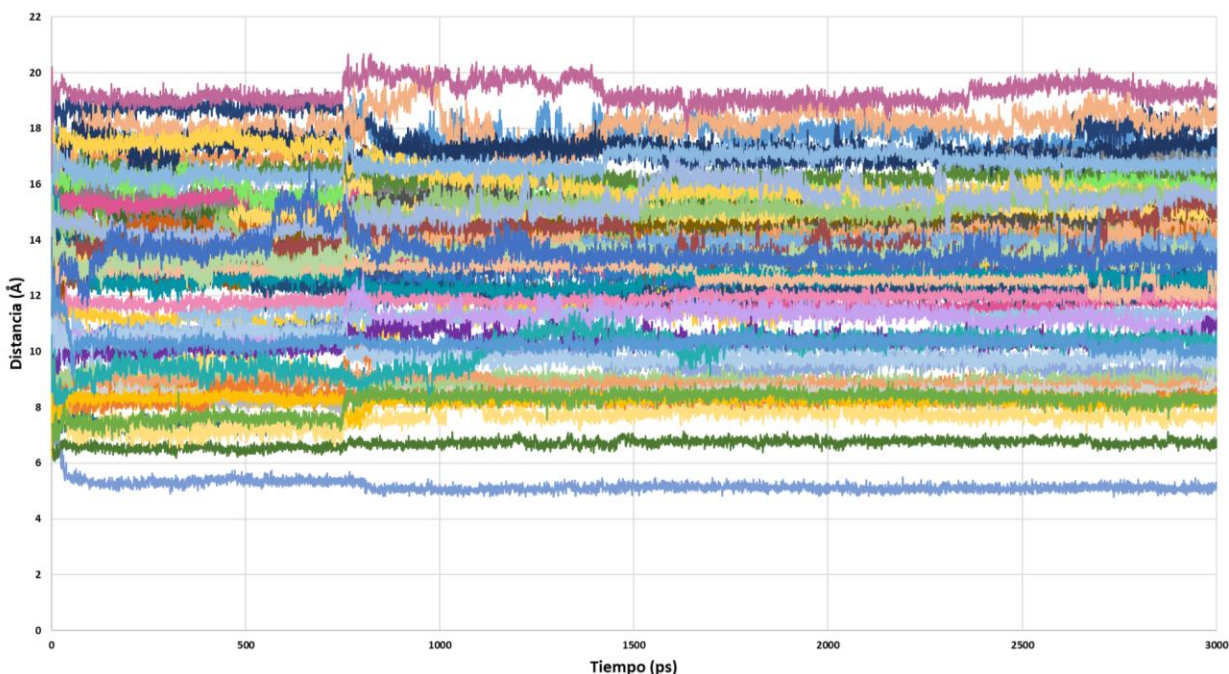


Figura 21. Gráfico de las distancias de los 60 NH_{amida} de PAMAM G3 a Dy^{3+} .

Este intervalo de distancia concuerda con lo reportado en la literatura: el efecto de pseudocontacto sobre los espines nucleares de los protones debido al paramagnetismo de Dy^{3+} es medible hasta alrededor de $40\text{\AA}$ desde el ion lantánido y las señales en los espectros de RMN ^1H son difíciles de observar desde una distancia de $14\text{\AA}$ (Pintacuda et al., 2007). Al medir las distancias de las amidas terminales más cercanas al DyADP (se consideraron 16 de un total de 32 terminales), se encontró que no sobrepasaban los $14\text{\AA}$ (Apéndice A. Fig. A27) y en el espectro obtenido por RMN ^1H relación 1:1 (Apéndice A. Fig. A13) podemos observar que las señales de la región diamagnética se encuentran englobadas bajo una sola banda, confirmando lo planteado por Pintacuda.

Posteriormente se hizo una distribución de todas las distancias presentadas a lo largo de la simulación, con la intención de conocer si existían grupos de poblaciones diferenciables y lo que encontramos son dos fenómenos principales (Fig. 22). En primer lugar, se puede observar que existe una distribución normal (barras en color aqua), procedente del comportamiento aleatorio del movimiento de las ramificaciones del PAMAM G3.

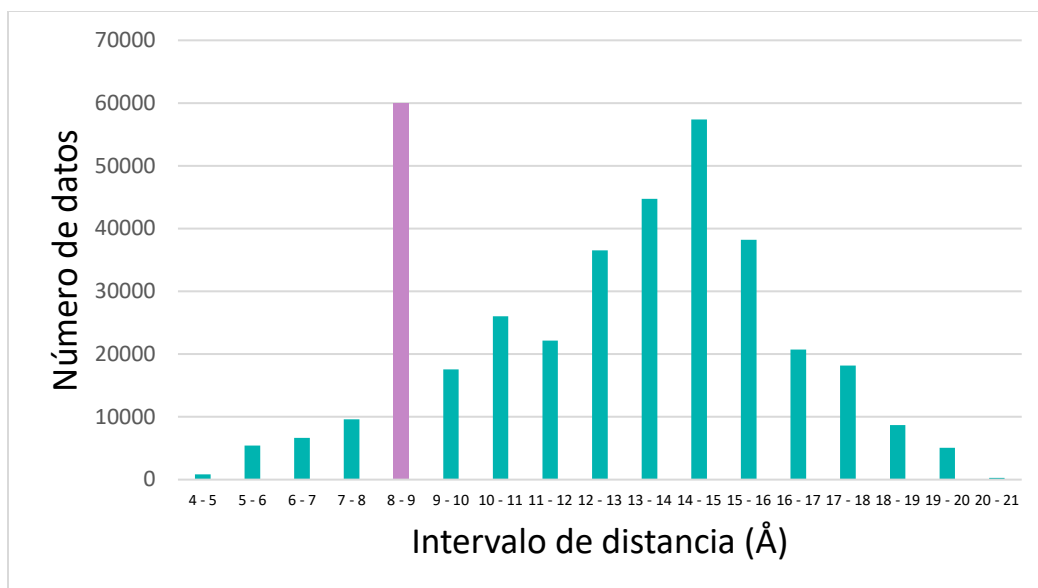


Figura 22. Distribución de las distancias de los 60 NH_{amida} de PAMAM G3 a Dy^{3+} .

Y, por otra parte, se destaca en color lila la barra que corresponde a la población que tiene un intervalo de distancia entre 8 y 9 Å. A diferencia de los otros intervalos, es en el mencionado, donde se agrupan el mayor número de datos (15.85%) indicando un comportamiento atípico de las poblaciones causado por la afinidad entre los grupos aminos protonados del dendrímero y el compuesto de coordinación.

Podemos interpretar que existen interacciones supramoleculares originadas por el encapsulamiento del DyADP por parte de las terminales del PAMAM G3 debidas a la interacción electrostática y por tanto los protones de las amidas de la última generación que se mantienen a una distancia forzada son los primeros en perturbarse por Dy^{3+} (barra magenta en la figura 22).

Por último, se realizaron dos simulaciones de DM, en la primera se colocó al PAMAM G3 en el centro y se ubicaron ocho compuestos DyADP a su alrededor. En la segunda simulación el dendrímero se rodeó por dieciséis compuestos (Fig. 23).

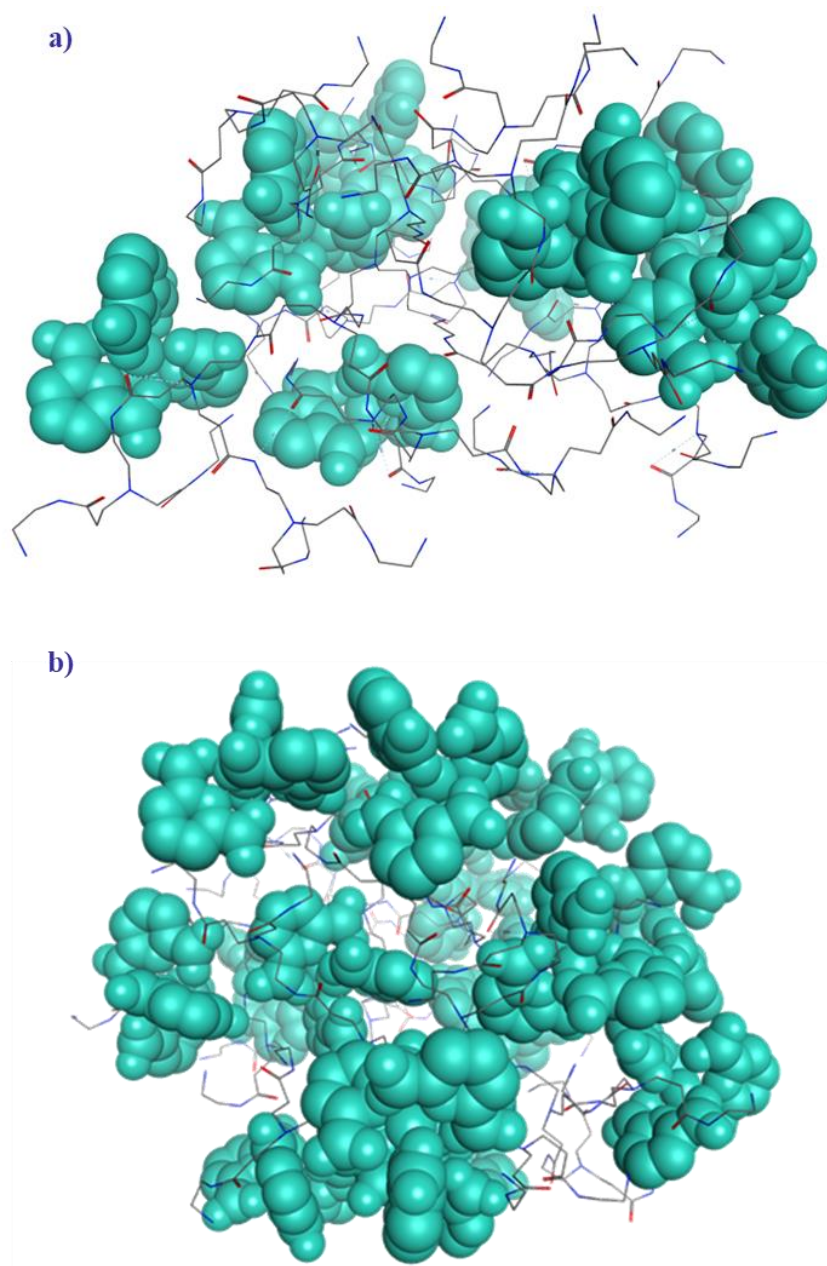


Figura 23. Dinámica molecular, a) ocho DyADP y un PAMAM G3, b) dieciséis DyADP y un PAMAM G3.

La DM con ocho DyADP mantuvo estabilidad a lo largo de la simulación, sin embargo, cuando se colocaron dieciséis DyADP alrededor de PAMAM G3, la repulsión entre los compuestos provocó que se distanciaran del centro del PAMAM G3 y en la simulación se observó la expulsión de uno de los compuestos. En ambas DM se midieron las distancias del centro del PAMAM G3 a cada uno de los compuestos localizados alrededor del dendrímoro. En el caso con ocho DyADP, el intervalo de distancias se encontró entre 5 y 25 Å (Fig. 24). En la simulación con dieciséis DyADP las distancias más lejanas están por encima de los 30 Å (Fig. 25).

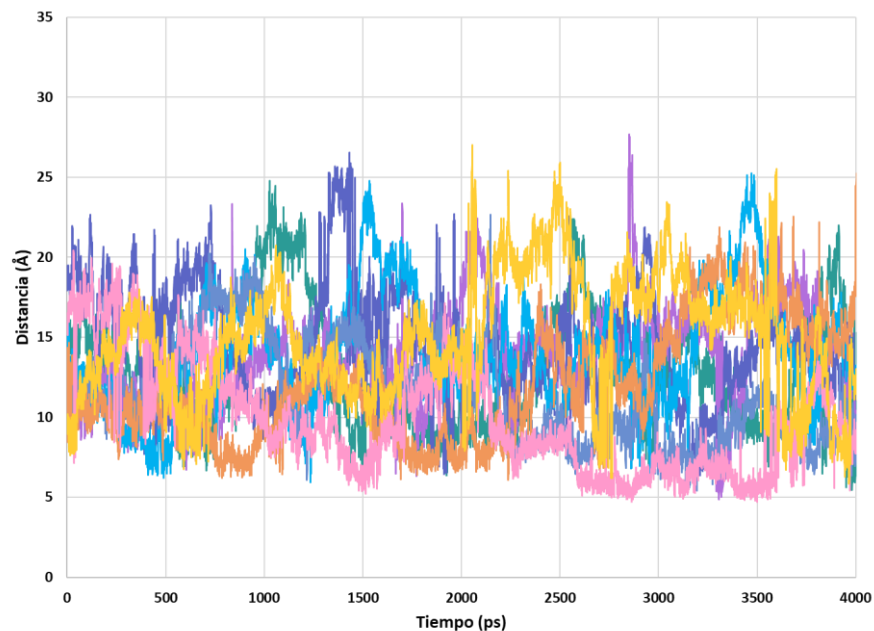


Figura 24. Gráfico de las distancias del centro de PAMAM G3 al Dy^{3+} de los ocho compuestos DyADP.

Estos resultados son congruentes con los espectros experimentales, la saturación de PAMAM G3 inicia posterior a la relación 8:1 DyADP: PAMAM G3 (o bien 1:0.125), pero en la siguiente relación molar, con la cantidad tan grande de dieciséis compuestos cercanos al dendrímero, se genera un sistema regido mayoritariamente por las características magnéticas del DyADP.

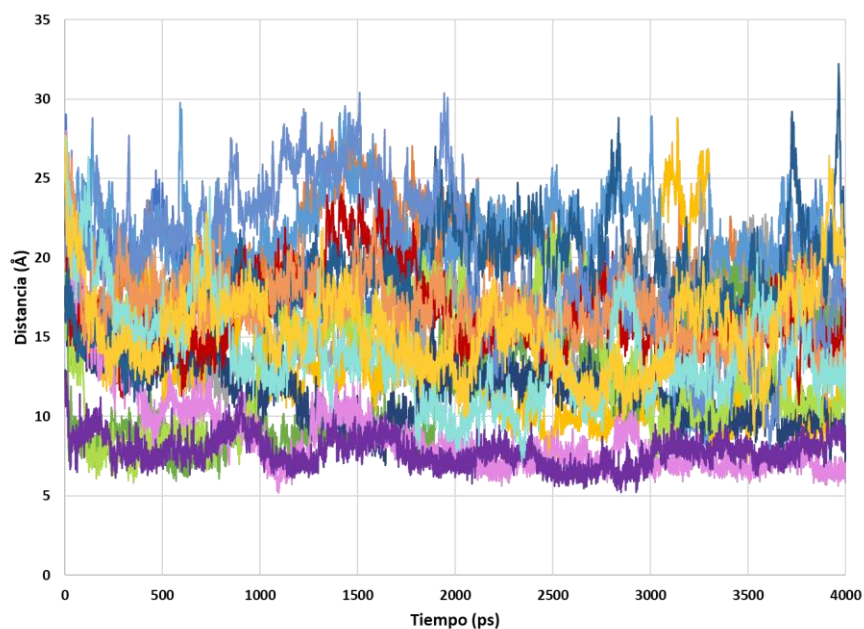


Figura 25. Gráfico de las distancias del centro de PAMAM G3 al Dy^{3+} de los dieciséis compuestos DyADP.

Constante de asociación

Ahora que hemos caracterizado la supermolécula DyADP:PAMAM G3, compete cuantificar la constante de asociación del sistema. Los desplazamientos químicos de la señal emergente NH_{amida} , de los espectros de RMN ^1H de las relaciones molares 0.063:1 a 0.250:1, en función de las concentraciones iniciales del PAMAM G3 y del DyADP se graficaron para obtener la isoterma de unión presentada en la figura 26.

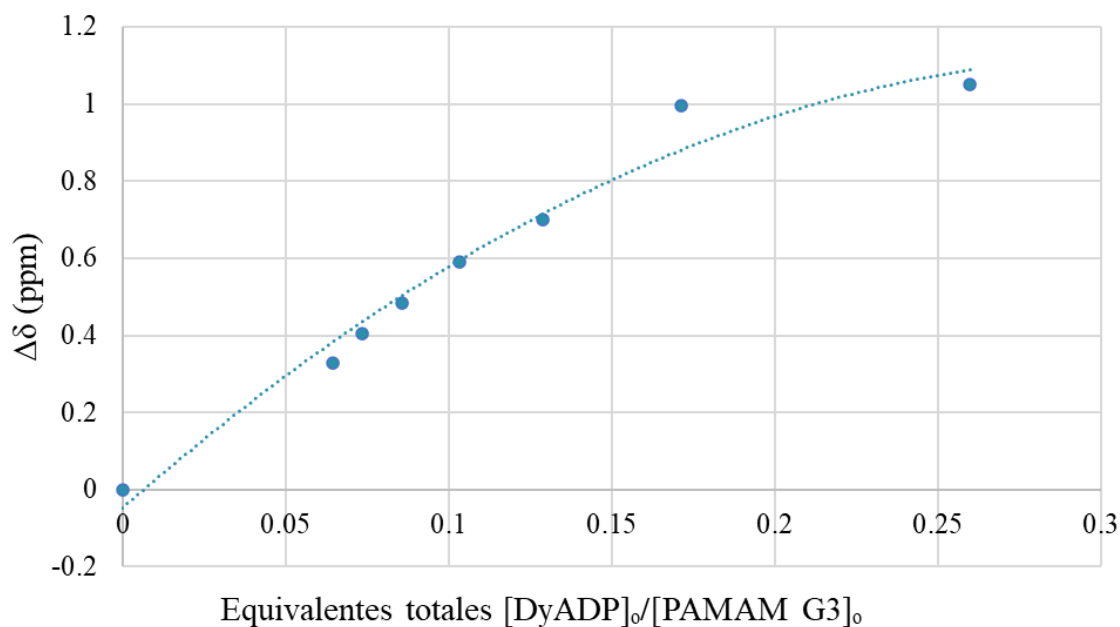


Figura 26. Isotherma de unión del sistema DyADP:PAMAM G3.

Posteriormente se realizó el ajuste matemático por medio del sitio web supramolecular.org. Los datos proporcionados a la plataforma se concentran en la tabla 3.

Tabla 3. Desplazamientos químicos de la señal NH_{amida} en la titulación por RMN del sistema DyADP:PAMAM G3.

[PAMAM G3] (M)	[DyADP] (M)	$\Delta\delta$ (ppm)
0.007491	0.001945	6.94711
0.007491	0.001283	7.00828
0.007491	0.000965	7.30307
0.007491	0.000773	7.41433
0.007491	0.000642	7.51916
0.007491	0.000551	7.59779
0.007491	0.000482	7.67617
0.007491	0	8.00348

El valor resultante de K_a fue de $168.89 \text{ M}^{-1} \pm 43.23 \%$. Si bien no existe una comparación justa con otros valores de K_a debido a las diferencias entre sistemas, anteriormente se mencionaron dos estudios con PAMAM G5- NH_2 catiónico donde habían conseguido una $K_a = 240 \text{ M}^{-1} \pm 50 \%$ (Buczkowski et al., 2015) y por otra parte un valor de $K_a = 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Hu et al., 2010) podemos observar que aunque los valores obtenidos disten mucho uno de otro, en efecto todos se encuentran en el intervalo de valores confiables para titulación por RMN: $10\text{-}10^4 \text{ M}^{-1}$ (Steed & Atwood, 2022). Por lo que, el valor obtenido para nuestro sistema es interpretado como prueba de que el complejo supramolecular DyADP:PAMAM G3 es estable y demuestra la existencia de una afinidad electrostática desde bajas concentraciones del DyADP.

El valor de K_a obtenido fue sustituido en la ecuación 19 para calcular la concentración del complejo en cada punto de la titulación. Finalmente, estos valores de [HG] fueron utilizados para graficarse contra sus desplazamientos químicos (Fig. 27) y así poder conocer la diferencia máxima en el desplazamiento del protón de la supermolécula, el cual está dado por la pendiente de la recta, de acuerdo con la ecuación 21.

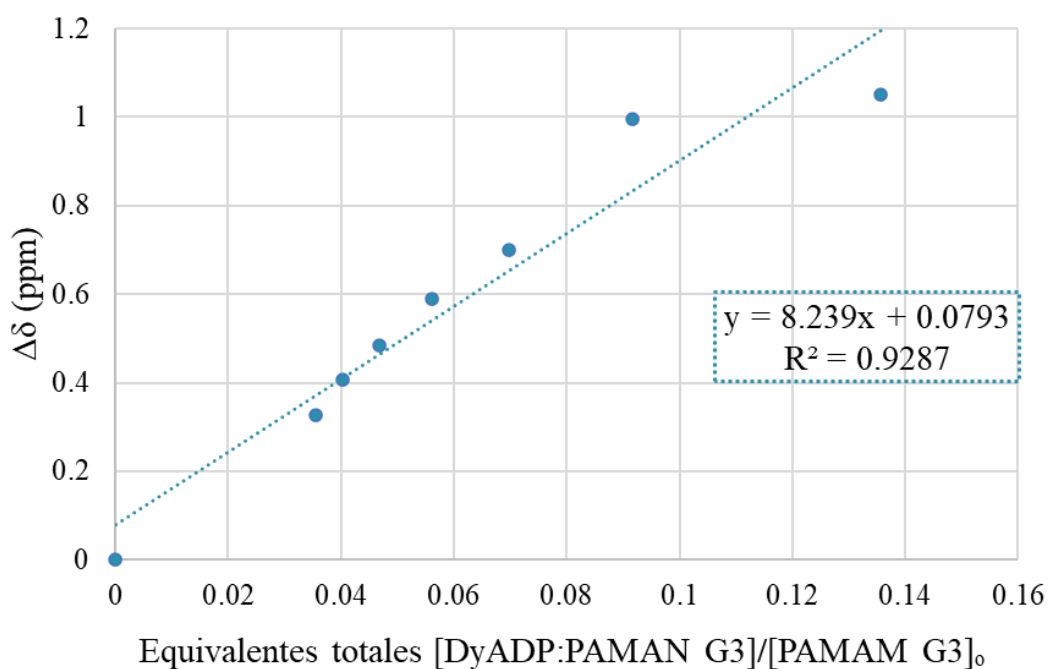


Figura 27. Regresión lineal de los desplazamientos químicos en función de la concentración del complejo.

El valor encontrado para $\Delta\delta_{\text{máx}}$ es de 8.239 ppm que corresponde al cambio máximo del desplazamiento químico de la señal monitoreada. Este escenario donde se alcanza la máxima saturación del compuesto DyADP:PAMAM G3 1:1 no puede ser generado por un exceso en la concentración del DyADP. Esto es debido a que aumentar la concentración del compuesto provoca que inicie el siguiente equilibrio DyADP:PAMAM G3 2:1.

La interrogante del valor de $\Delta\delta$ en el equilibrio 1:1 puede responderse repitiendo el procedimiento anterior tomando en cuenta los valores de K_a máximo y mínimo de acuerdo con el porcentaje de error. Así hallaremos dos nuevos $\Delta\delta_{\text{máx}}$ que pueden sustituirse en la ecuación 22. La tabla 4 resume los valores obtenidos.

Tabla 4. Cambio en los desplazamientos químicos en función del valor de K_a .

	K_a (M^{-1})	$\Delta\delta_{\text{máx}}$ (ppm)	$\Delta\delta$ 1:1 (ppm)
Mínima	95.88	10.971	3.578
Estimada	168.89	8.239	3.479
Máxima	241.90	7.1186	3.441

Si definimos que el valor inicial del desplazamiento químico de la NH_{amida} es de 8.003 ppm, la diferencia de este valor con los $\Delta\delta$ obtenidos nos arroja que entre 4.562 y 4.425 ppm es el intervalo dónde la señal emergente debería aparecer en el espectro 1:1, confirmando que la señal se encuentra dentro de la gaussiana que va desde -3 hasta 7 ppm (Fig. 28) como se había propuesto desde la caracterización por RMN.

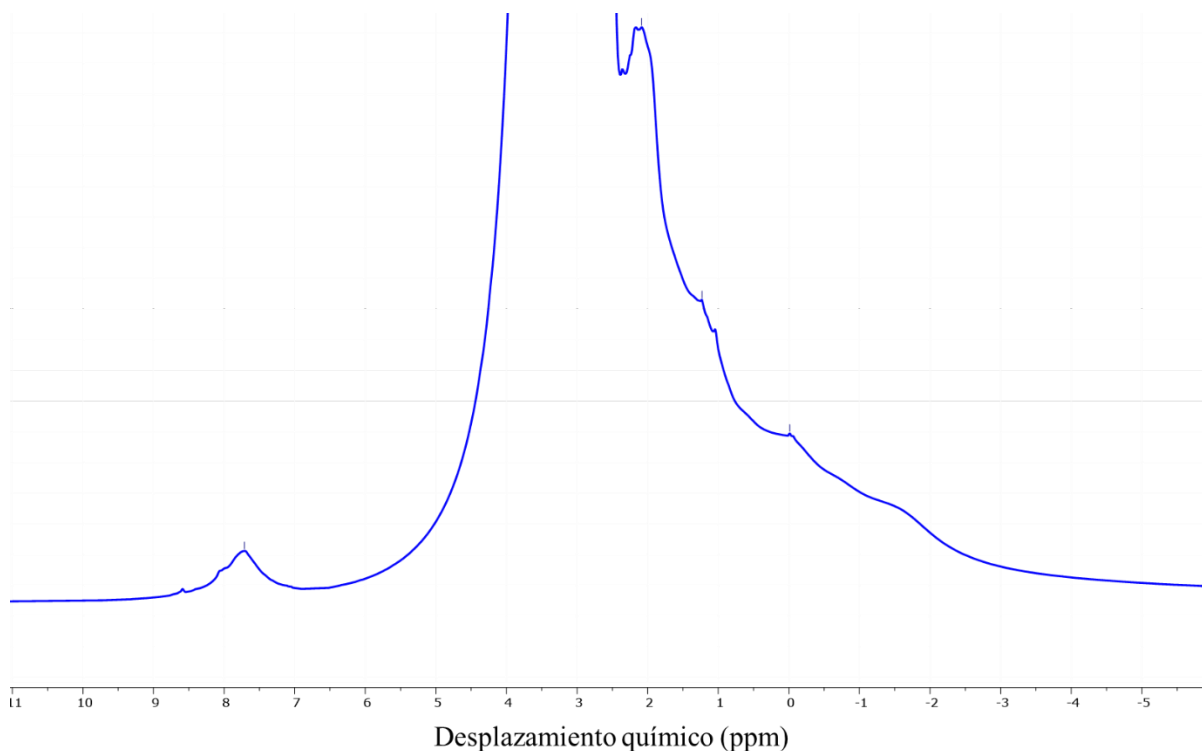


Figura 28. Espectro RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de DyADP:PAMAM G3 1:1.

La serie de procedimientos realizados hasta aquí concluyen la calibración de la metodología propuesta y se considera apropiada para aplicarse en otros sistemas supramoleculares a los cuales se pretenda evaluar su capacidad de encapsulamiento.

Sistema DyADP: Fructanos

Mediciones por RMN ^1H

Se obtuvieron los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de las muestras de fructanos (Apéndice B. Figs. B1, B11, B21) y pudimos clasificarlos de acuerdo con su grado de polimerización. Conforme a lo mencionado por López y colaboradores (Lopez et al., 2003), la señal que aparece en 92 ppm en los experimentos de ^{13}C , correspondiente a los carbonos C-1 de la fracción $\alpha\text{-D-Glc}$, desaparece a mayor grado de polimerización, como es el caso de la muestra 3, los fructanos ramificados, por lo que se clasificó como DP 20. Por otra parte, las muestras 1 y 2 presentan en sus espectros dicha señal, aunque bastante disminuida, por lo que se consideraron DP intermedio con un valor de 11.

Se realizaron las mediciones por RMN ^1H del compuesto DyADP con los tres tipos de muestras de fructanos, obteniendo los siguientes sistemas: 1) DyADP: Fructano, 2) DyADP: Inulina y 3) DyADP: Fructanos ramificados. Los experimentos de los sistemas anteriores comprenden las siguientes relaciones molares: 0.031:1, 0.063:1, 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 1:0.5, 1:0.25, 1:0.125 (Apéndice B. Figs. B1-B30).

En los espectros de los tres sistemas, en la región diamagnética (Figs. 29-31), podemos apreciar que las señales correspondientes a los protones de los fructanos se vuelven más anchas a medida que se aumenta la concentración del DyADP, sin embargo, el desplazamiento de las señales es casi nulo. Incluso en la mezcla con los fructanos ramificados que es una molécula más grande, si bien las señales muestran ensanchamientos más pronunciados, así como desplazamientos ligeramente más notorios, no se observa la aparición de señales nuevas que pudieran dar indicios de una interacción supramolecular entre los fructanos y el DyADP, como sucedió cuando se utilizó el PAMAM G3 y que con claridad se podía observar la generación de una señal correspondiente a la interacción de ambas sustancias.

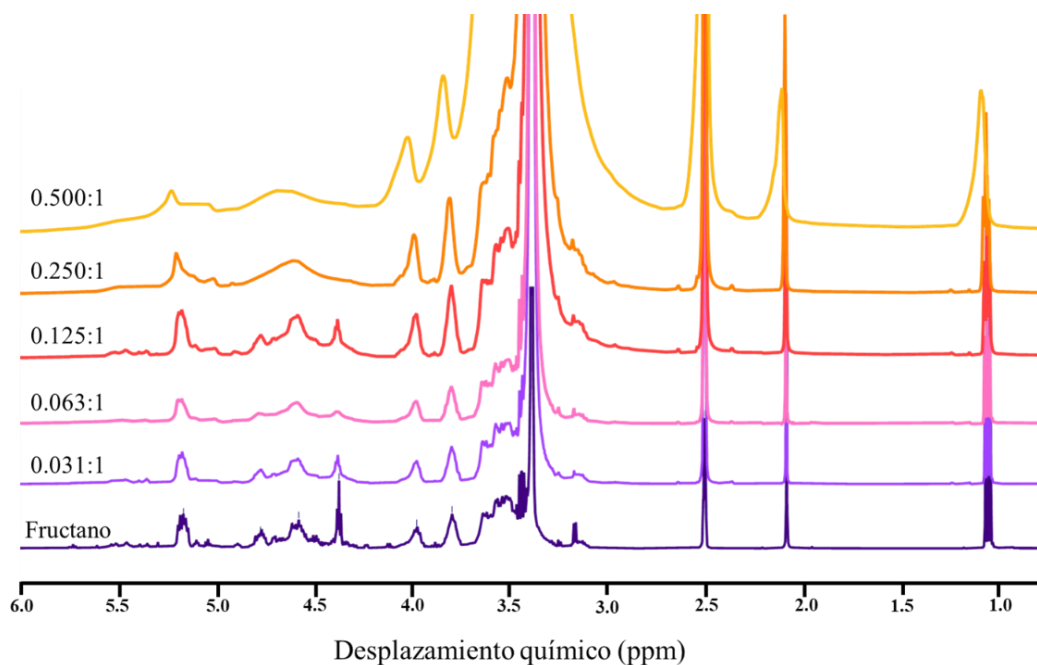


Figura 29. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) región diamagnética de la mezcla DyADP: Fructano de bajo DP a diferentes relaciones molares.

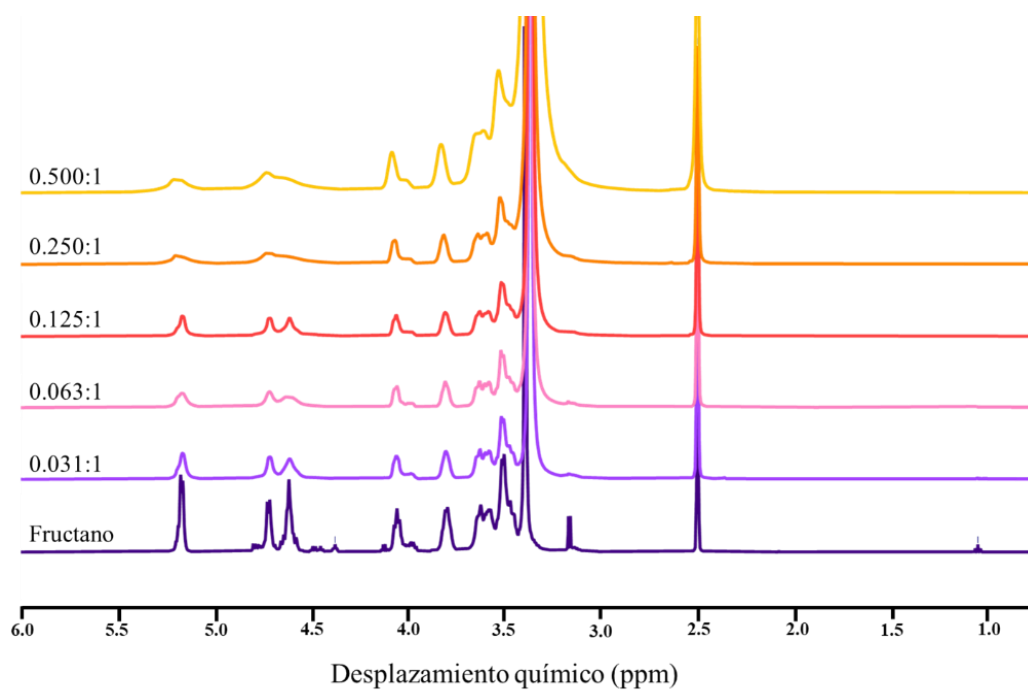


Figura 30. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) región diamagnética de la mezcla DyADP: Inulina a diferentes relaciones molares.

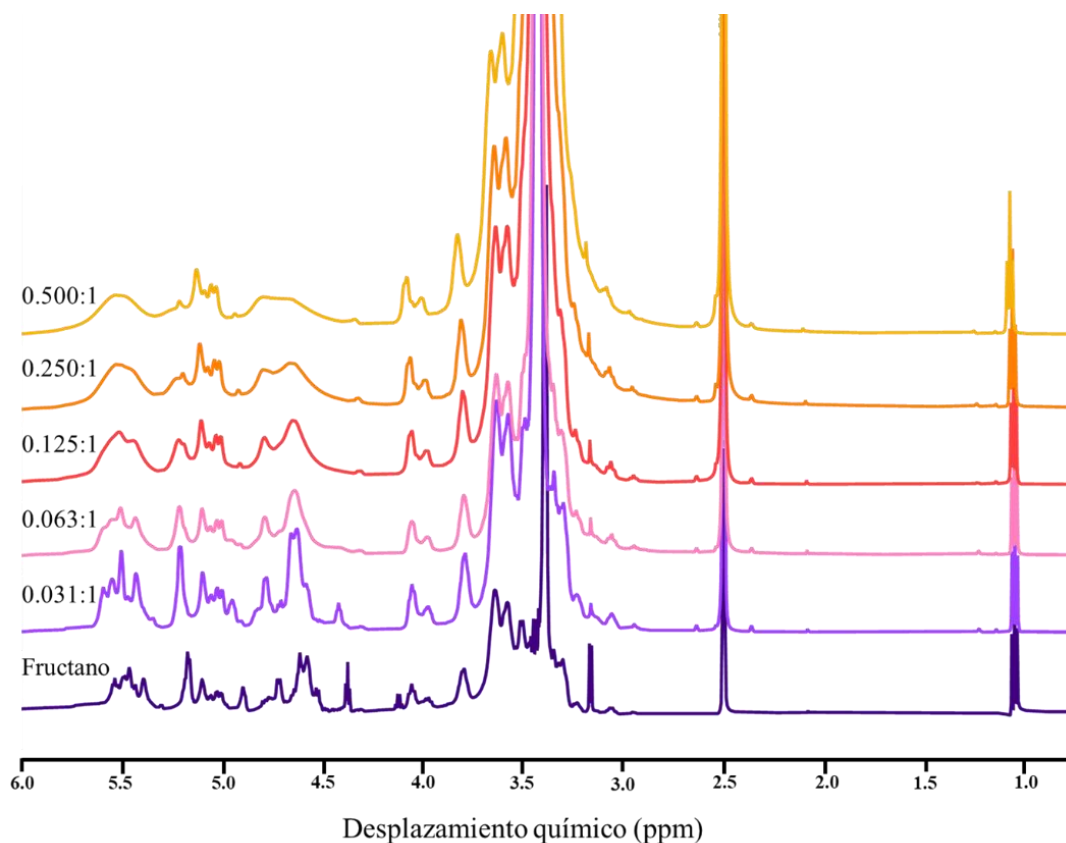


Figura 31. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) región paramagnética de la mezcla DyADP: Fructanos ramificados a diferentes relaciones molares.

Nuevamente, en la región paramagnética, los tres sistemas presentan un comportamiento similar. En el espectro del DyADP se presentan dos señales características en esta región, una en 64 ppm y otra en 93 ppm (Fig. 15). En todos los sistemas con fructanos, en las relaciones molares 0.125:1 a 1:0.125 ambas señales continúan apreciándose. En los sistemas con fructano y con inulina lineal se observan desplazamientos de estas señales menores a una ppm (Fig. 32 y 33). Además, se aprecia una señal alrededor de 68 ppm en la relación molar 0.125:1 la cual se va recorriendo hacia la derecha hasta la relación 1:0.250. Podemos considerar esta *nueva* señal como la señal de interacción entre el DyADP y los fructanos. Sin embargo, es importante subrayar que la señal en 64 ppm característica del DyADP se conserva a lo largo de toda la titulación en los tres experimentos, lo que nos lleva a sugerir que existe una cantidad de compuestos de DyADP que no están interactuando con los fructanos y que por tanto producen la señal propia de la molécula y al mismo tiempo hay una fracción de las moléculas que si tienen cierto grado de interacción con los fructanos. Es entonces que se produce la nueva señal que se va desplazando.

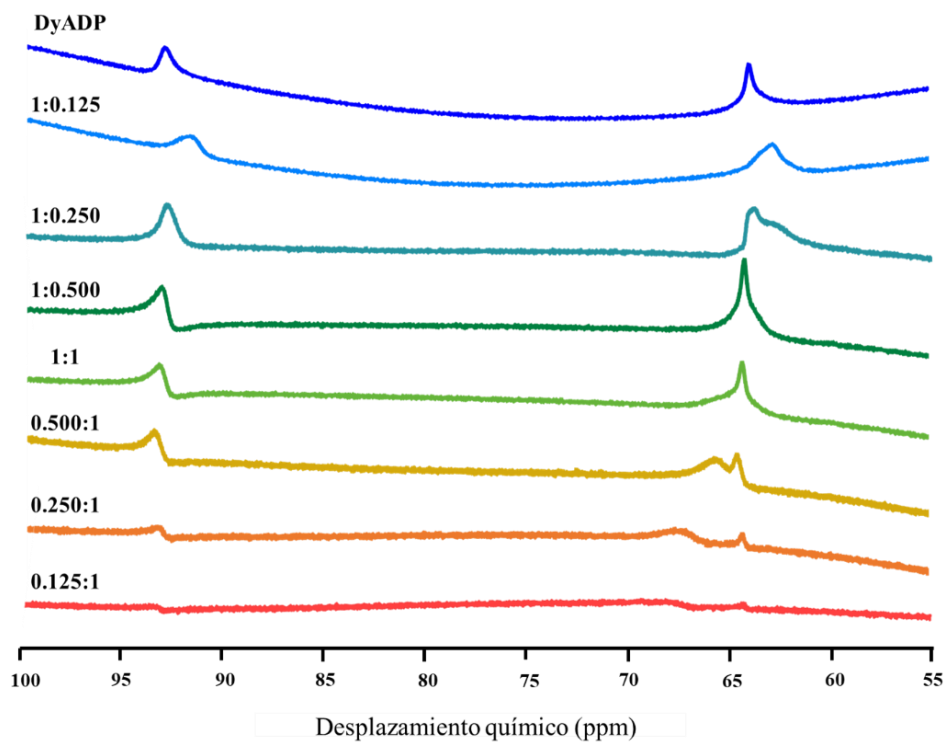


Figura 32. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) región paramagnética de la mezcla DyADP: Fructano, a diferentes relaciones molares.

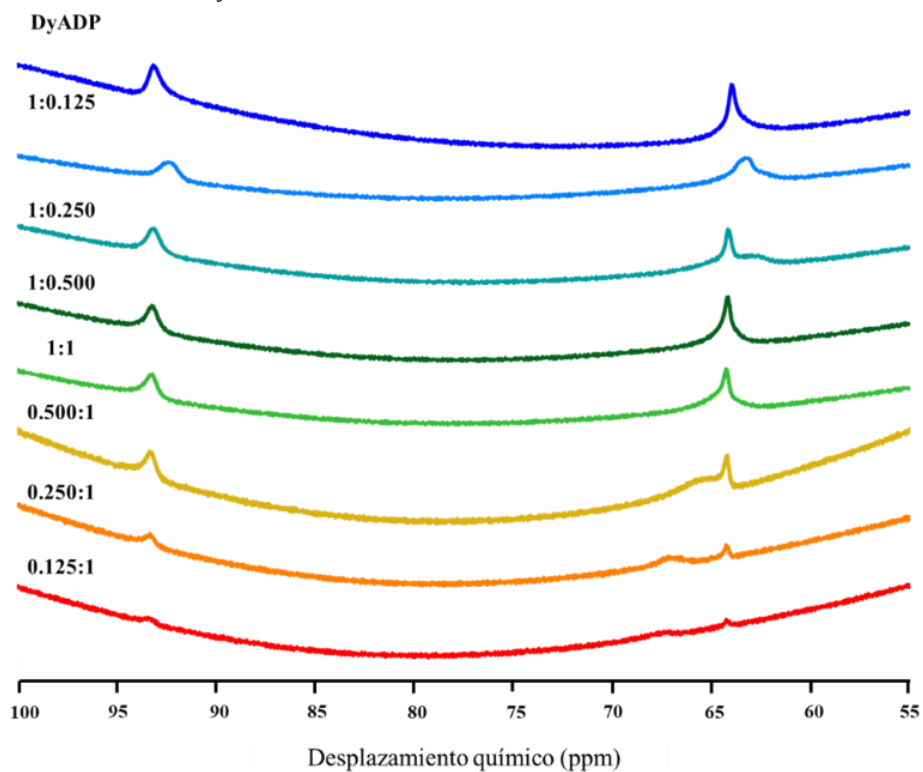


Figura 33. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) región paramagnética de la mezcla DyADP: Inulina, a diferentes relaciones molares.

En cuanto al sistema con fructanos ramificados podemos observar la generación de la nueva señal en la relación molar 1:0.125 y se mantiene hasta 1:1 (Fig. 34). A diferencia de los otros sistemas, es con los fructanos ramificados que se aprecia que la nueva señal se une a la señal particular del DyADP a partir de la relación molar 1:0.500, conforme va aumentando la concentración del compuesto se observa una mayor intensidad de una sola señal. Comparadas con el espectro de DyADP, las señales presentes en la relación molar 1:0.125 tienen un desplazamiento de más de dos ppm: la señal de 64 ppm aparece en 66.3 ppm y la de 93 ppm en 96.5 ppm, indicando que el ambiente químico del compuesto es diferente a cuando solo se encuentra rodeado por disolvente.

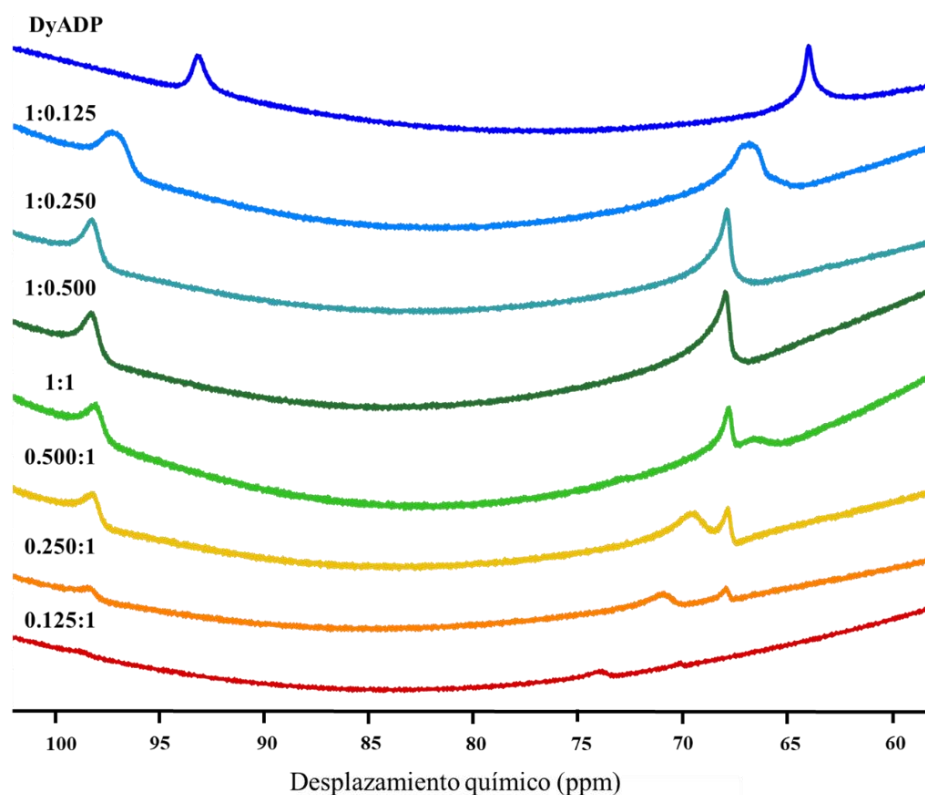


Figura 34. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) región paramagnética de la mezcla DyADP: Inulina ramificada, a diferentes relaciones molares.

Considerando que los fructanos ramificados son los de mayor tamaño, se propone que tiene una mayor capacidad para generar puentes de hidrógeno con los compuestos de coordinación, al agregar mayor concentración se provoca un mayor efecto de acoplamiento hiperfino en los protones cercanos al centro paramagnético generando que las señales no puedan resolverse, sino

que colapsan en una sola. Por tanto, el sistema DyADP: Fructanos ramificados es el que muestra la mayor afinidad de las tres muestras de fructanos.

Finalmente, debido a que jamás deja de percibirse la señal del DyADP podemos concluir que la interacción con los fructanos es mucho menor en comparación con el sistema de PAMAM G3.

A raíz de estas observaciones consideramos que el uso de una molécula anfitriona neutral como lo son los fructanos, es el principal factor para que las interacciones con el DyADP (únicamente por puentes de hidrógeno) sean significativamente más débiles y si bien el aumentar el tamaño de los fructanos conlleva a una mayor flexibilidad de la molécula para acercarse al DyADP no implica que el encapsulamiento sea más efectivo.

Dinámica molecular

Se realizaron simulaciones utilizando 1-kestosa, 6-kestosa, neokestosa, fructanos con DP 6 y DP 11; además con cada sistema se realizaron simulaciones sin restricción de distancia inicial entre el compuesto y el fructano o en cambio, se modificaban para iniciar cerca uno del otro, colocando dos o tres átomos ubicados en los extremos del fructano (de acuerdo con el tamaño del fructano) a una distancia de 3Å del centro metálico (Apéndice B. Figs. B31-B40). Esto con la intención de conocer si las estructuras se alejaban, se mantenían o se acercaban con otros átomos por medio de puentes de hidrógeno al DyADP, a lo largo de la simulación. En general, con las estructuras pequeñas, la tendencia es acercarse al compuesto y en los escenarios donde inician próximos al DyADP consiguen mantener la cercanía, pero no se observa la generación de nuevos puentes de hidrógeno. Los resultados más interesantes se obtuvieron al colocar DP 6 y DP 11 a 3Å de distancia desde tres de sus átomos hacia el DyADP (Fig. 35).

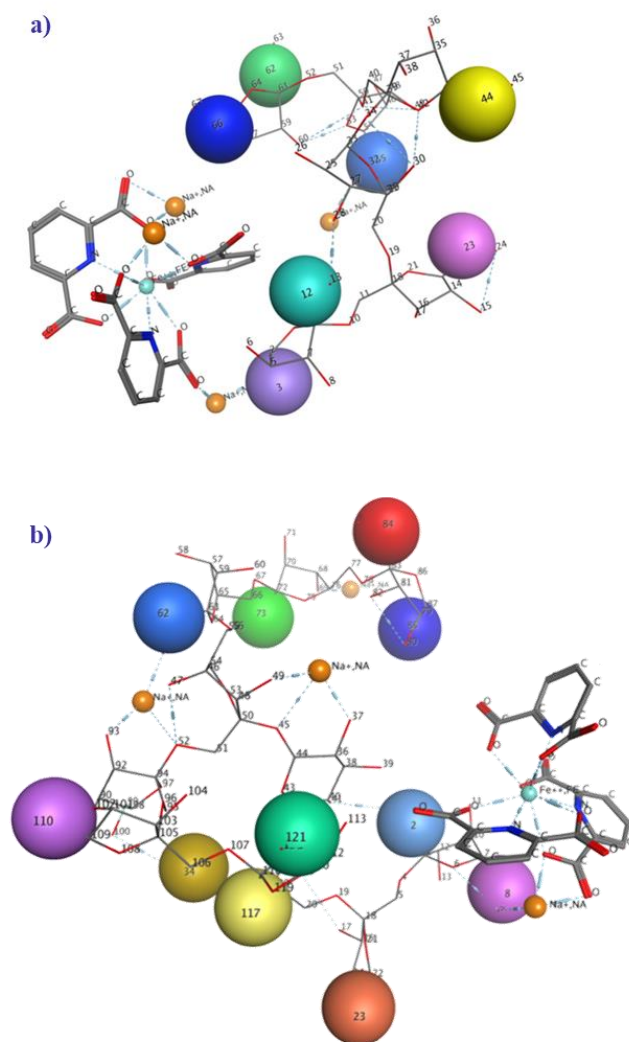


Figura 35. Dinámicas moleculares. I) DyADP y DP 6. II) DyADP y DP 11.

Se midieron las distancias de los grupos CH_2 al centro metálico en ambas simulaciones. El gráfico obtenido (Fig. 36) muestra en el caso de DP 6 cómo una de las terminales se aleja del compuesto al poco tiempo de iniciar la DM (línea azul), esto debido a que al ser una molécula pequeña no logra rodear al compuesto y la tensión generada impide mantener la cercanía al DyADP.

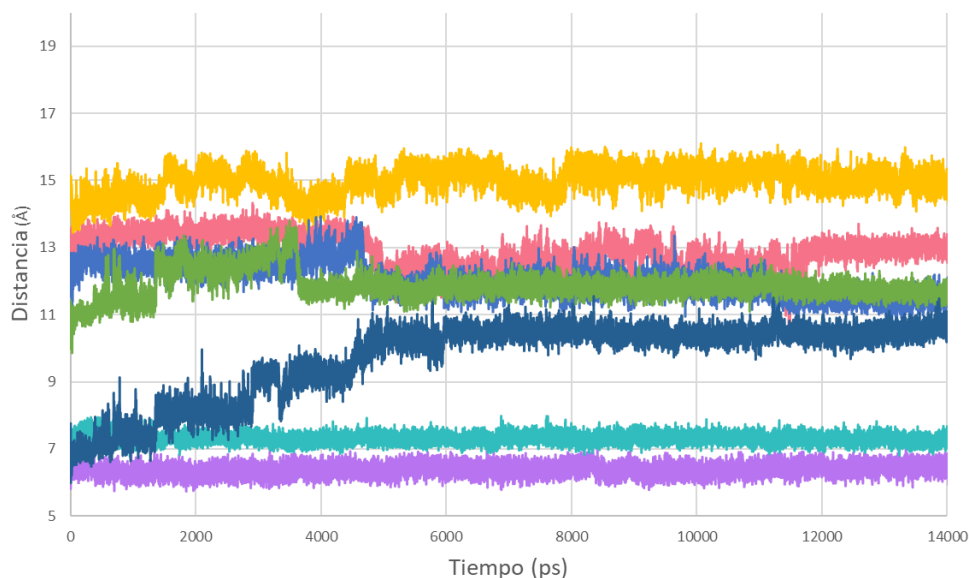


Figura 36. Gráfico de las distancias de los CH_2 de DP 6 al Dy^{3+} .

Por el contrario, para DP 11 (Fig. 37), se encontró que no sólo se mantiene un sistema estable a lo largo de la simulación, sino que dos grupos CH_2 se acercan más al DyADP (línea roja y azul). Esto significa que se están creando nuevos puentes de hidrógeno entre los grupos OH del DP 11 hacia los grupos carboxilos del ligante ADP demostrando una ligera atracción entre ambas sustancias.

Estos resultados coinciden con lo obtenido en la parte experimental: la interacción con el DyADP es poco significativa con fructanos de tamaño pequeño. Aumentar el grado de polimerización de los fructanos consigue que las moléculas al ser más grandes y de mayor flexibilidad puedan generar nuevos puentes de hidrógeno con el DyADP, no obstante, al ser interacciones de carácter más débil es difícil considerar que exista un encapsulamiento.

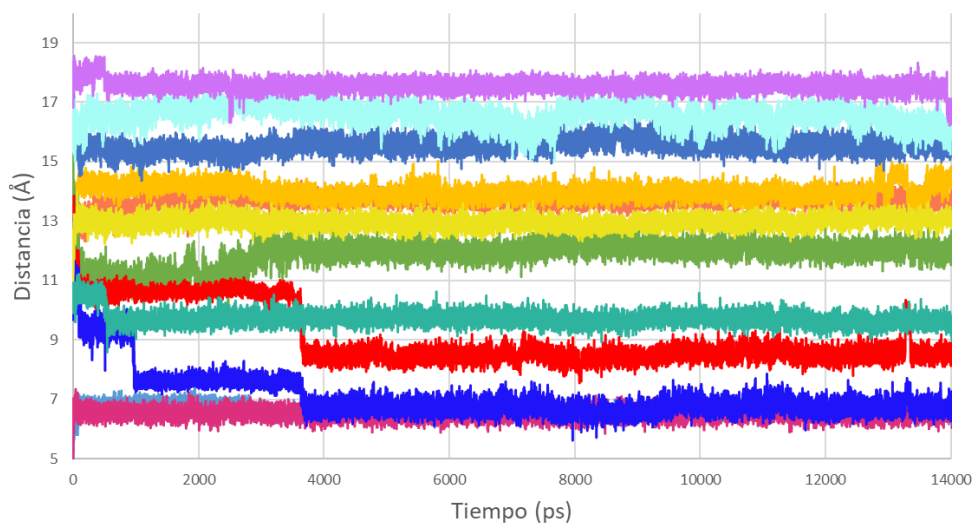


Figura 37. Gráfico de las distancias de los CH_2 de DP 11 al Dy^{3+} .

Bajo este planteamiento se decidió no realizar una simulación con DP 20 puesto que el comportamiento del sistema no presentaría características significativas distintas a las presentadas anteriormente.

Por último, al recabar los resultados obtenidos por RMN y no encontrar una señal adecuada de interacción a la cual dar seguimiento a su desplazamiento químico, fue imposible realizar el cálculo de la constante de asociación para los sistemas con fructanos. Se enfatiza que, aunque estos sistemas no exponen un encapsulamiento sobresaliente hacia el $DyADP$ siguen siendo una propuesta válida para seguirse estudiando como moléculas encapsuladoras, dado que no comprometen la salud humana como ocurre con los dendrímeros PAMAM y eso siempre será una cualidad que procurar.

Los resultados de los fructanos presentados en este trabajo aun cuando son de índole cualitativo han contribuido a un primer análisis exploratorio y consideramos que su funcionalización en futuras investigaciones dará lugar a un mejor encapsulamiento cuantificable por RMN y DM.

Conclusiones

Los datos recolectados tanto por RMN como por DM nos describen una fuerte interacción electrostática por parte del PAMAM G3 hacia el compuesto DyADP. Ambas técnicas indican que el dendrímero PAMAM G3 puede generar interacciones entre ocho y dieciséis compuestos de coordinación y posteriormente inicia la saturación del sistema con compuestos DyADP.

La titulación por RMN ^1H del sistema DyADP:PAMAM G3 permitió llevar a cabo una regresión no lineal multiparamétrica la cual cuantifica el encapsulamiento del DyADP por el PAMAM G3 con una constante de asociación con valor de $K_a = 168.89 \text{ M}^{-1} \pm 43.23 \%$.

Por último, el estudio de la interacción del compuesto DyADP con las moléculas de fructanos, por medio de RMN ^1H en combinación de dinámicas moleculares nos permitió identificar las interacciones supramoleculares. Nos demuestra que la interacción por puentes de hidrógeno entre los grupos alcohol de las moléculas de fructanos y el DyADP no son lo suficientemente fuertes para originar un encapsulamiento total del compuesto. No obstante, los resultados obtenidos nos informan que el sistema con mejor afinidad es el DyADP; Fructanos ramificados.

Bibliografia

- Abraham, R. J., Filippi, M., Petrillo, G., Piaggio, P., Vladiskovic, C., & Sancassan, F. (2017). A theoretical and NMR lanthanide-induced shift (LIS) investigation of the conformations of lactams. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 55(12), 1059–1072. <https://doi.org/10.1002/mrc.4643>
- Arshiya Ara, S., Katti, G., & Shireen, A. (2011). Magnetic resonance imaging (MRI)-A review. In *©INTERNATIONAL JOURNAL OF DENTAL CLINICS* (Vol. 2011, Issue 1). <https://www.researchgate.net/publication/279471369>
- Atkins, P., Overton, T., Rourke, J., Weller, M., Armstrong, F., & Hagerman, M. (2010). *Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry*.
- Babailov, S. P., Dubovskii, P. V., & Zapolotsky, E. N. (2014). Paramagnetic lanthanides as magnetic resonance thermo-sensors and probes of molecular dynamics: Holmium-DOTA complex. *Polyhedron*, 79, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2014.04.067>
- Baek, A., Kim, H. kyung, Yang, J. ung, Choi, G., Kim, M., Cho, A. E., Kim, Y. hee, Kim, S., Sung, B., Woo Yang, B., Seo, H., Lee, G. H., Ryeom, H. K., Jung, H., Lee, T., & Chang, Y. (2020). High-performance hepatobiliary dysprosium contrast agent for ultra-high-field magnetic resonance imaging. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 85, 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.02.015>
- Bayat, M., Taherpour, A. A., & Elahi, S. M. (2019). Molecular interactions between PAMAM dendrimer and some medicines that suppress the growth of hepatitis virus (Adefovir, Entecavir, Telbivudine, Lamivudine, Tenofovir): a theoretical study. *International Nano Letters*, 9(3), 231–244. <https://doi.org/10.1007/s40089-019-0277-3>
- Bertini, I., Luchinat, C. (Claudio), Parigi, G., & Ravera, E. (2015). *NMR of paramagnetic molecules : applications to metallobiomolecules and models* (Second edition).
- Bottrill, M., Kwok, L., & Long, N. J. (2006). Lanthanides in magnetic resonance imaging. *Chemical Society Reviews*, 35(6), 557–571. <https://doi.org/10.1039/b516376p>
- Buczkowski, A., Olesinski, T., Zbicinska, E., Urbaniak, P., & Palecz, B. (2015). Spectroscopic and calorimetric studies of formation of the supramolecular complexes of PAMAM G5-NH₂ and G5-OH dendrimers with 5-fluorouracil in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 490(1–2), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.033>
- Buczkowski, A., Urbaniak, P., & Palecz, B. (2012). Thermochemical and spectroscopic studies on the supramolecular complex of PAMAM-NH₂ G4 dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 428(1–2), 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.004>
- Burai, L., Tóth, E., Seibig, S., Scopelliti, R., & Merbach, A. E. (2000). Solution and solid-state characterization of Eu(II) chelates: a possible route towards redox responsive MRI contrast agents. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 6(20), 3761–3770. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20001016\)6:20<3761::aid-chem3761>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20001016)6:20<3761::aid-chem3761>3.0.co;2-6)
- Caminade, A. M., Hameau, A., Turrin, C. O., Laurent, R., & Majoral, J. P. (2021). Dendritic metal complexes for bioimaging. Recent advances. In *Coordination Chemistry Reviews* (Vol. 430). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213739>

- Carmona-Pérez, D., Vazquez-Lima, H., Pere, M., Pérez-Benítez, A., Reyes-Ortega, Y., & Hernández-Anzaldo, S. (2023). Use of magnetic spectroscopies to unveil an unexpected Dy-anionic radical coordination compound. *Polyhedron*, 244. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2023.116596>
- Caspani, S., Magalhães, R., Araújo, J. P., & Sousa, C. T. (2020). Magnetic nanomaterials as contrast agents for MRI. In *Materials* (Vol. 13, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma13112586>
- Chemical Computing Group ULC. (2022). Molecular Operating Environment (MOE).
- Cramer, C. J. (2004). *Essentials of Computational Chemistry Theories and Models* Second Edition.
- Delgadillo, E., Corona, R. I., Toriz, G., Contreras, H. J., Sadeghifar, H., Baobing, W., Yang, G., Lucia, L. A., & Delgado, E. (2015). Coacervated liposoluble fructan-based host-guest microspheres as unique drug delivery materials. *RSC Advances*, 5(83), 67759–67766. <https://doi.org/10.1039/c5ra10164f>
- Drago, R. S., & Drago, R. S. (1992). *Physical methods for chemists*. Saunders College Pub.
- Fielding, L. (2000). Determination of Association Constants (Ka) from Solution NMR Data.
- Geraldes, C. F. G. C., & Laurent, S. (2009). Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. In *Contrast Media and Molecular Imaging* (Vol. 4, Issue 1, pp. 1–23). <https://doi.org/10.1002/cmmi.265>
- Gómez-González, E., Caro, C., García-Martín, M. L., Becerro, A. I., & Ocaña, M. (2022). Outstanding MRI contrast with dysprosium phosphate nanoparticles of tuneable size. *Nanoscale*, 14(31), 11461–11470. <https://doi.org/10.1039/d2nr02630a>
- Gómez-González, E., Núñez, N. O., Caro, C., García-Martín, M. L., Fernández-Afonso, Y., De La Fuente, J. M., Balcerzyk, M., & Ocaña, M. (2021). Dysprosium and Holmium Vanadate Nanoprobes as High-Performance Contrast Agents for High-Field Magnetic Resonance and Computed Tomography Imaging. *Inorganic Chemistry*, 60(1), 152–160. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c02601>
- González, M. A. (2011). Force fields and molecular dynamics simulations. *École Thématique de La Société Française de La Neutronique*, 12, 169–200. <https://doi.org/10.1051/sfn/201112009>
- Gupta, N., Jangid, A. K., Pooja, D., & Kulhari, H. (2019). Inulin: A novel and stretchy polysaccharide tool for biomedical and nutritional applications. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 132, pp. 852–863). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.188>
- Halgren, T. A. (1996). Performance of MMFF94*. In *Scope, Parameterization, and Journal of Computational Chemistry* (Vol. 17). John Wiley & Sons, Inc. <http://journals.wiley.com/jcc>
- Hu, J., Fang, M., Cheng, Y., Zhang, J., Wu, Q., & Xu, T. (2010). Host-guest chemistry of dendrimer-drug complexes. 4. An in-depth look into the binding/encapsulation of guanosine monophosphate by dendrimers. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(21), 7148–7157. <https://doi.org/10.1021/jp1007889>
- Huang, Y., Coman, D., Hyder, F., & Ali, M. M. (2015). Dendrimer-Based Responsive MRI Contrast Agents (G1-G4) for Biosensor Imaging of Redundant Deviation in Shifts (BIRDS). *Bioconjugate Chemistry*, 26(12), 2315–2323. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00568>
- Hughes, R. L., Alvarado, D. A., Swanson, K. S., & Holscher, H. D. (2022). The Prebiotic Potential of Inulin-Type Fructans: A Systematic Review. *Advances in Nutrition* (Bethesda, Md.), 13(2), 492–529. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab119>

- Joseph, S., Jadav, M., Solanki, R., Patel, S., Pooja, D., & Kulhari, H. (2024). Synthesis, characterization, and application of honey stabilized inulin nanoparticles as colon targeting drug delivery carrier. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130274. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130274>
- Kadam, S. A., Haav, K., Toom, L., Haljasorg, T., & Leito, I. (2014). NMR method for simultaneous host-guest binding constant measurement. *Journal of Organic Chemistry*, 79(6), 2501–2513. <https://doi.org/10.1021/jo4027963>
- Klemm, P. J., Floyd, W. C., Andolina, C. M., Fréchet, J. M. J., & Raymond, K. N. (2012). Conjugation to biocompatible dendrimers increases lanthanide T2 relaxivity of hydroxypyridinone complexes for magnetic resonance imaging. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 12, 2108–2114. <https://doi.org/10.1002/ejic.201101167>
- Krishnan Namboori, P. K., Ranjini, U. P., Manakadan, A. A., Jose, A., Silvipriya, K. S., Belzik, N., & Deepak, O. M. (2013). Send Orders of Reprints at bpsaif@emirates.net.ae Computational Modeling of Environmentally Responsive Hydrogels (ERH) for Drug Delivery System. In *Current Computer-Aided Drug Design* (Issue 9).
- Lewis-Atwell, T., Townsend, P. A., & Grayson, M. N. (2022). Comparing the Performances of Force Fields in Conformational Searching of Hydrogen-Bond-Donating Catalysts. *Journal of Organic Chemistry*, 87(9), 5703–5712. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c00066>
- Lopez, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Diaz, G. (2003). Molecular Structures of Fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835–7840. <https://doi.org/10.1021/jf030383v>
- Maiti, P. K., Çağın, T., Wang, G., & Goddard, W. A. (2004). Structure of PAMAM dendrimers: Generations 1 through 11. *Macromolecules*, 37(16), 6236–6254. <https://doi.org/10.1021/ma035629b>
- Martinho, N., Florindo, H., Silva, L., Brocchini, S., Zloh, M., & Barata, T. (2014). Molecular modeling to study dendrimers for biomedical applications. In *Molecules* (Vol. 19, Issue 12, pp. 20424–20467). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules191220424>
- Mekuria, S. L., Debele, T. A., & Tsai, H. C. (2017a). Encapsulation of Gadolinium Oxide Nanoparticle (Gd₂O₃) Contrasting Agents in PAMAM Dendrimer Templates for Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Vivo. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(8), 6782–6795. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b14075>
- Mekuria, S. L., Debele, T. A., & Tsai, H. C. (2017b). Encapsulation of Gadolinium Oxide Nanoparticle (Gd₂O₃) Contrasting Agents in PAMAM Dendrimer Templates for Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Vivo. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(8), 6782–6795. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b14075>
- Moreno-Vilet, L., Espinosa-Andrews, H., Flores-Montaño, L., & Camacho-Ruiz, R. M. (2016). CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS DE AGAVE COMERCIALES POR HP-SEC, HPLC Y DSC.
- Ni, D., Xu, W., Zhu, Y., Zhang, W., Zhang, T., Guang, C., & Mu, W. (2019). Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: Characteristics, structural features, molecular modifications and applications. In *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Issue 2, pp. 306–318). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.01.002>
- Oliveira, A. C., Filipe, H. A. L., Ramalho, J. P. P., Salvador, A., Geraldês, C. F. G. C., Moreno, M. J., & Loura, L. M. S. (2022). Modeling Gd³⁺Complexes for Molecular Dynamics Simulations: Toward a Rational

- Optimization of MRI Contrast Agents. *Inorganic Chemistry*, 61(30), 11837–11858. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c01597>
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. (2013). INTRODUCTION TO SPECTROSCOPY.
- Pierre, V. C., Allen, M. J., & Caravan, P. (2014). Contrast agents for MRI: 30+ years and where are we going? Topical issue on metal-based MRI contrast agents. Guest editor: Valérie C. Pierre. In *Journal of Biological Inorganic Chemistry* (Vol. 19, Issue 2, pp. 127–131). <https://doi.org/10.1007/s00775-013-1074-5>
- Pintacuda, G., John, M., Su, X. C., & Otting, G. (2007). NMR structure determination of protein - Ligand complexes by lanthanide labeling. *Accounts of Chemical Research*, 40(3), 206–212. <https://doi.org/10.1021/ar050087z>
- Plascencia, A., Gutiérrez-Mora, A., Rodríguez-Domínguez, J. M., Castañeda-Nava, J. J., Gallardo-Valdez, J., Shimada, H., & Camacho-Ruíz, R. M. (2020). Molecular weight distribution of fructans extracted from Agave salmiana leaves Distribución de tamaños de fructanos extraídos a partir de hojas de Agave salmiana. *Botanical Sciences*, 1(1). <https://doi.org/10.17129/botsoci.2960>
- Pollet, R., & Marx, D. (2007). Ab initio simulation of a gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agent in aqueous solution. *Journal of Chemical Physics*, 126(18). <https://doi.org/10.1063/1.2736369>
- Rodríguez, A. O. (2004). Principles of magnetic resonance imaging (Vol. 50, Issue 3).
- Rogosnitzky, M., & Branch, S. (2016). Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. In *BioMetals* (Vol. 29, Issue 3, pp. 365–376). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9931-7>
- Sherry, A. D., Caravan, P., & Lenkinski, R. E. (2009). Primer on gadolinium chemistry. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 30(6), 1240–1248. <https://doi.org/10.1002/jmri.21966>
- Shokrollahi, H. (2013). Contrast agents for MRI. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 33, Issue 8, pp. 4485–4497). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.012>
- Soto-Castro, D., Pérez-Herrera, A., García-Sánchez, E., & Santiago-García, P. A. (2021). Identification and Quantification of Bioactive Compounds in Agave potatorum Zucc. Leaves at Different Stages of Development and a Preliminary Biological Assay. *Waste and Biomass Valorization*, 12(8), 4537–4547. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01329-2>
- Steed, J. L. A. (2022). *Supramolecular Chemistry* (John Wiley & Sons, Ed.; 3rd Edition).
- Telgmann, L., Sperling, M., & Karst, U. (2013). Determination of gadolinium-based MRI contrast agents in biological and environmental samples: A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 764, pp. 1–16). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.007>
- Thordarson, P. (2011). Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews*, 40(3), 1305–1323. <https://doi.org/10.1039/c0cs00062k>
- Tomalia, D. A., & Fréchet, J. M. J. (2002). Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 40(16), 2719–2728. <https://doi.org/10.1002/pola.10301>
- Tosco, P., Stiefl, N., & Landrum, G. (2014). Bringing the MMFF force field to the RDKit: Implementation and validation. *Journal of Cheminformatics*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13321-014-0037-3>

- Tripodo, G., & Mandracchia, D. (2019). Inulin as a multifaceted (active) substance and its chemical functionalization: From plant extraction to applications in pharmacy, cosmetics and food. In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Vol. 141, pp. 21–36). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.05.011>
- Van den Ende, W. (2013). Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 4, Issue JUL). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00247>
- Varshey, D. B., Sander, J. R. G., Friščić, T., & MacGillivray, L. R. (2012). *Supramolecular Interactions. In Supramolecular Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc003>
- Vásquez, A. (2021). Estudio de la interacción de compuestos de disprosio con PAMAM G3 mediante técnicas espectroscópicas y simulación computacional. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, BUAP.
- Wan, S., Cui, F., Li, B., Zhao, K., He, H., Zhang, Y., Liu, J., Zhang, L., & Liu, K. (2020). Dysprosium-Modified Gold Nanoparticles as T2exContrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *ACS Applied Nano Materials*, 3(9), 9433–9439. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c02044>
- Wolfram Research, I. (2024). *Mathematica*.
- Xu, P., Wang, J., Xu, Y., Chu, H., Liu, J., Zhao, M., Zhang, D., Mao, Y., Li, B., Ding, Y., & Li, G. (2015). Advancement of polarizable force field and its use for molecular modeling and design. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 827, 19–32. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9245-5_3
- Xu, R., Wang, Y., Wang, X., Jeong, E.-K., Parker, D. L., & Lu, Z.-R. (2007). In Vivo Evaluation of a PAMAM-Cystamine-(Gd-DO3A) Conjugate as a Biodegradable Macromolecular MRI Contrast Agent. *Experimental Biology and Medicine*, 232(8), 1081–1089. <https://doi.org/10.3181/0702-RM-33>
- Yousaf, T., Dervenoulas, G., & Politis, M. (2018). Advances in MRI Methodology. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 141, pp. 31–76). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2018.08.008>
- Zhou, Z., Bai, R., Munasinghe, J., Shen, Z., Nie, L., & Chen, X. (2017). T1-T2 Dual-Modal Magnetic Resonance Imaging: From Molecular Basis to Contrast Agents. In *ACS Nano* (Vol. 11, Issue 6, pp. 5227–5232). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b03075>

Apéndice A

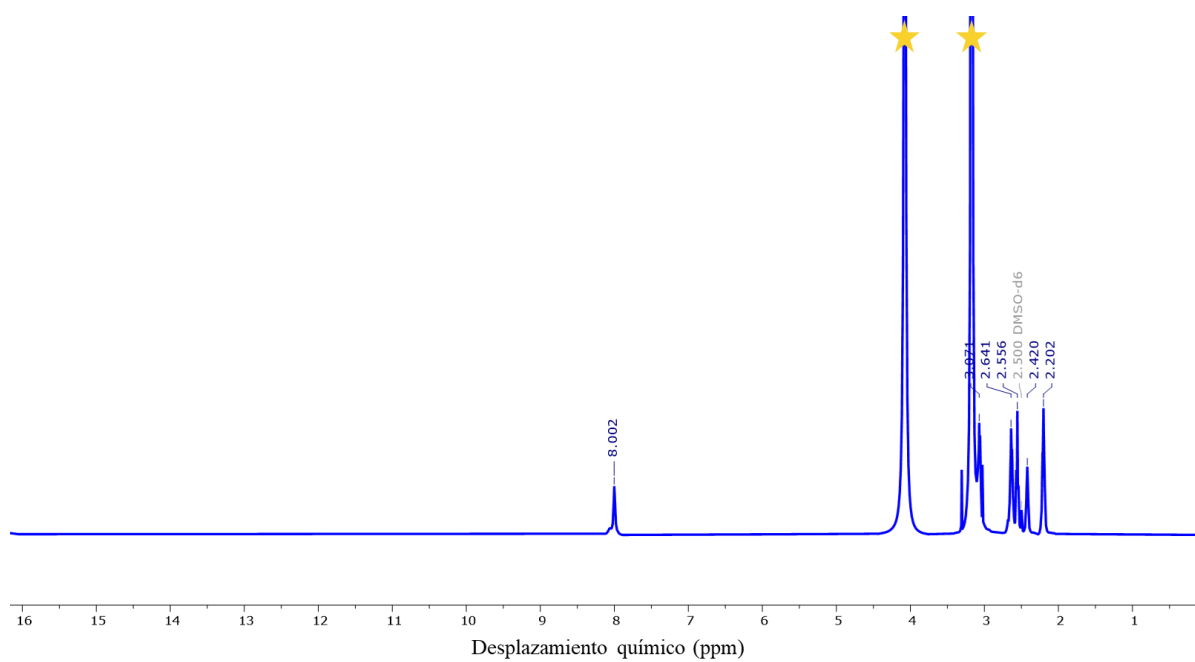


Figura A1. Espectros de RMN ^1H (DMSO- d_6) del PAMAM G3.

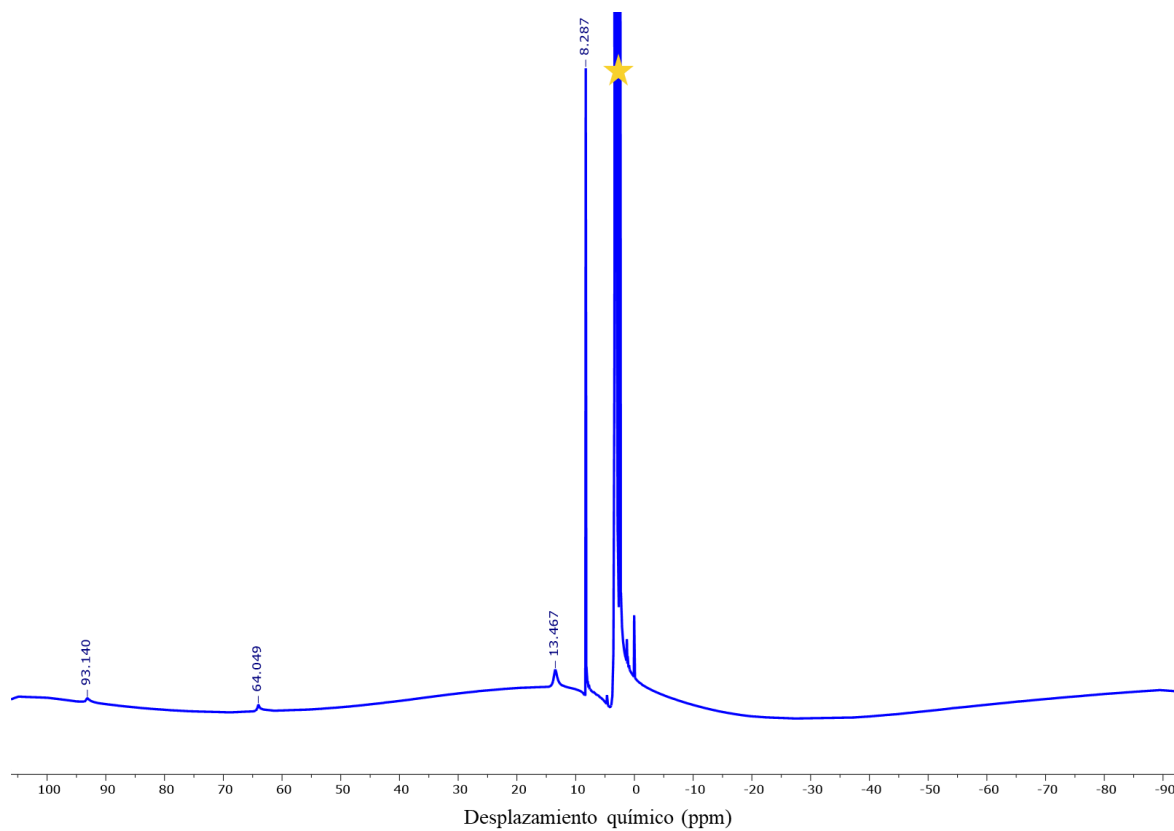


Figura A2. Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) del DyADP.

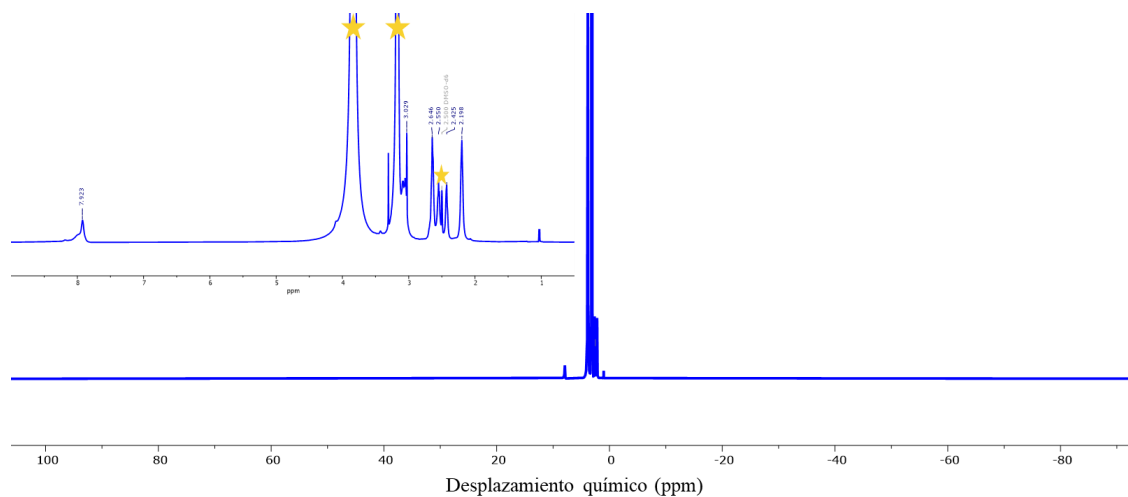


Figura A3. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 0.016:1.

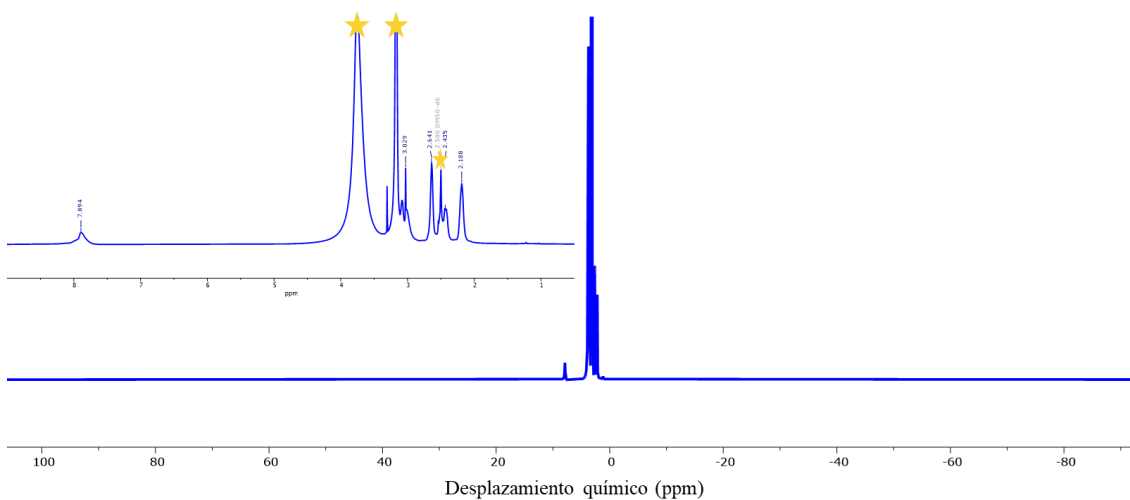


Figura A4. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 0.031:1.

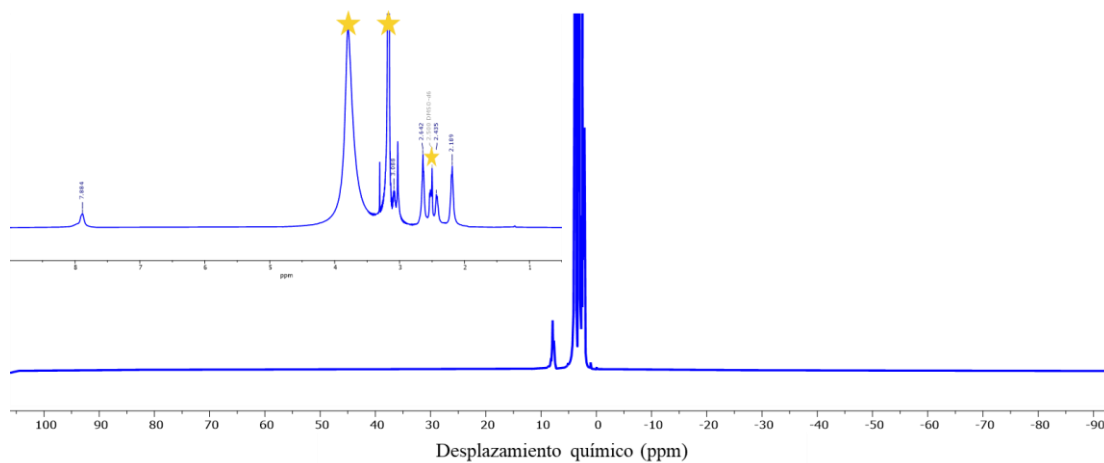


Figura A5. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 0.063:1.

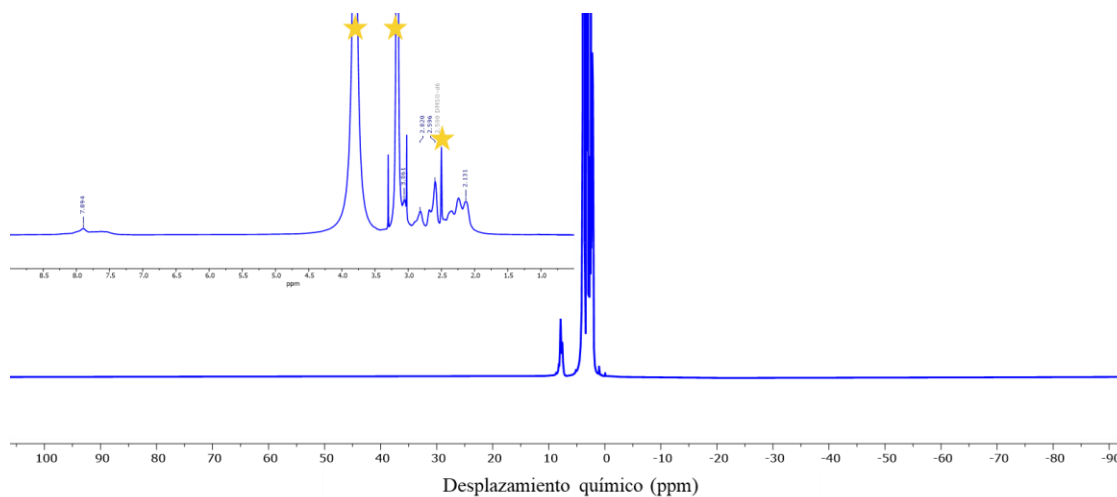


Figura A6. Espectros de RMN ^1H (DMSO- d_6) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 0.071:1.

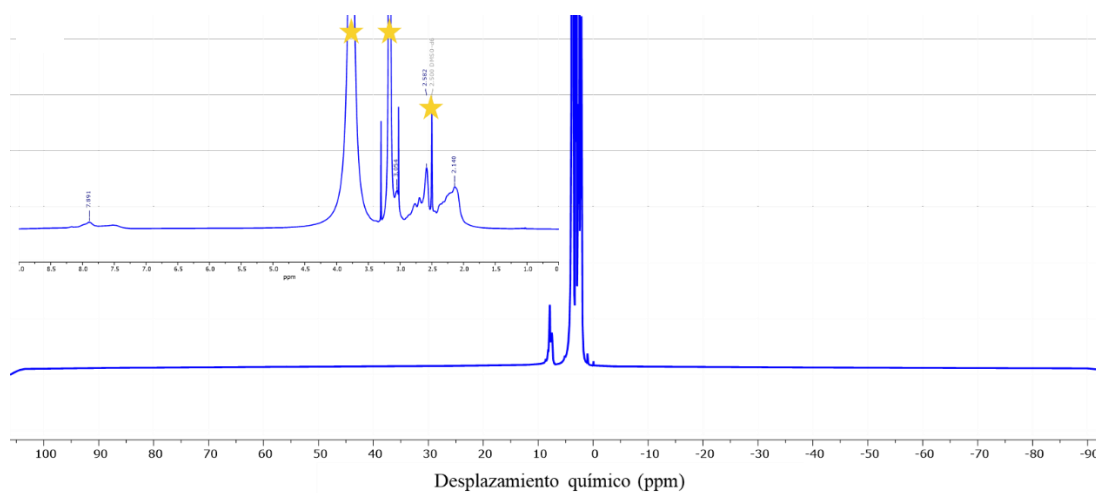


Figura A7. Espectros de RMN ^1H (DMSO- d_6) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 0.083:1.

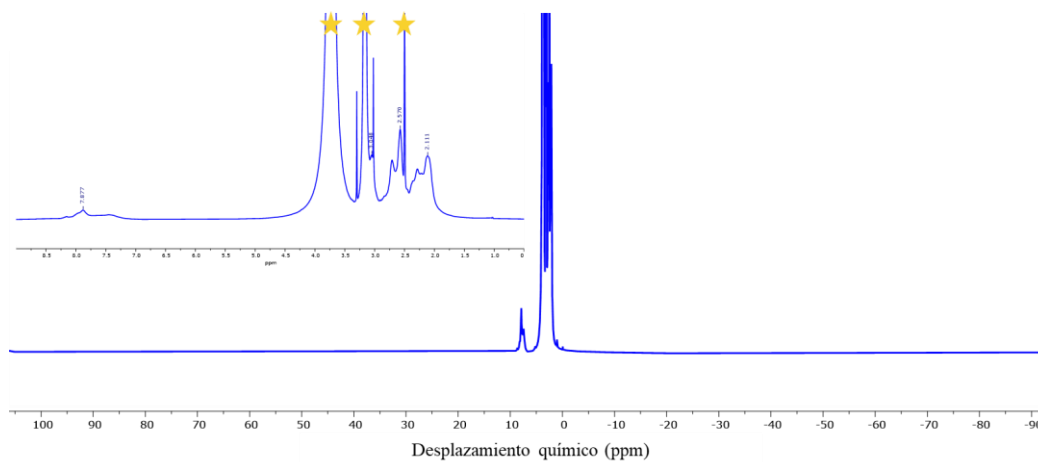


Figura A8. Espectros de RMN ^1H (DMSO- d_6) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 0.1:1.

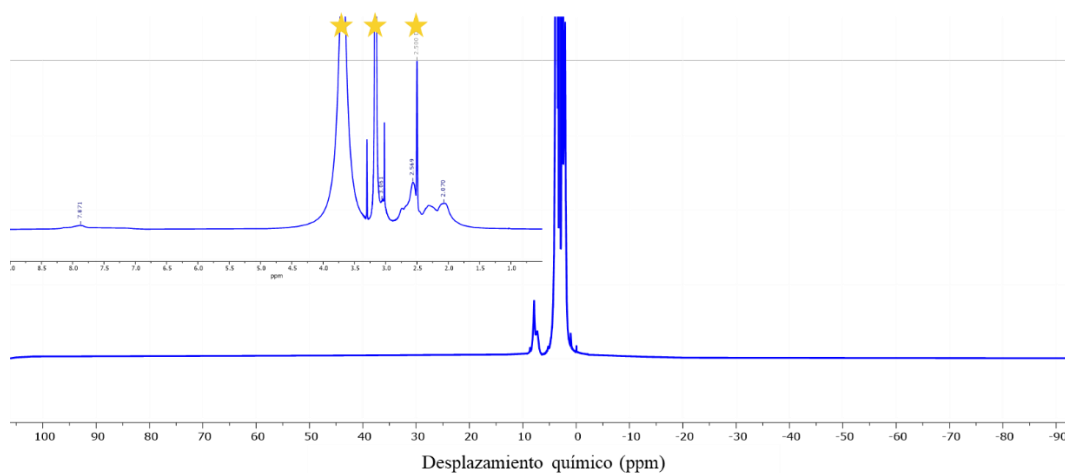


Figura A9. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 0.125:1.

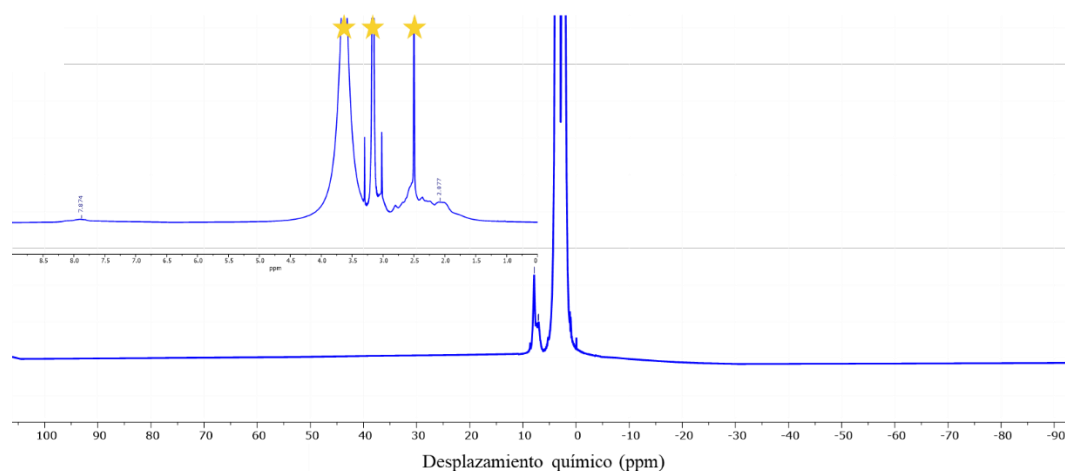


Figura A10. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 0.166:1.

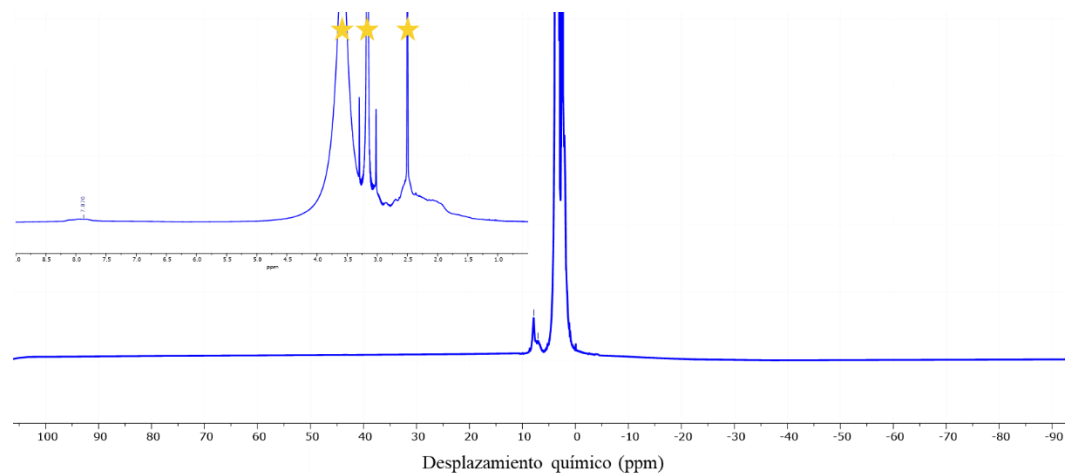


Figura A11. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 0.25:1.

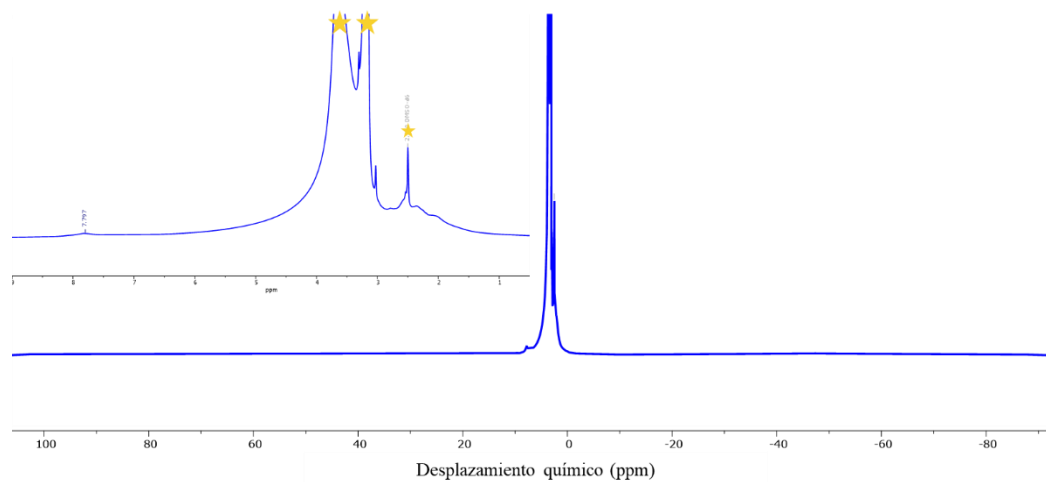


Figura A12. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 0.5:1.

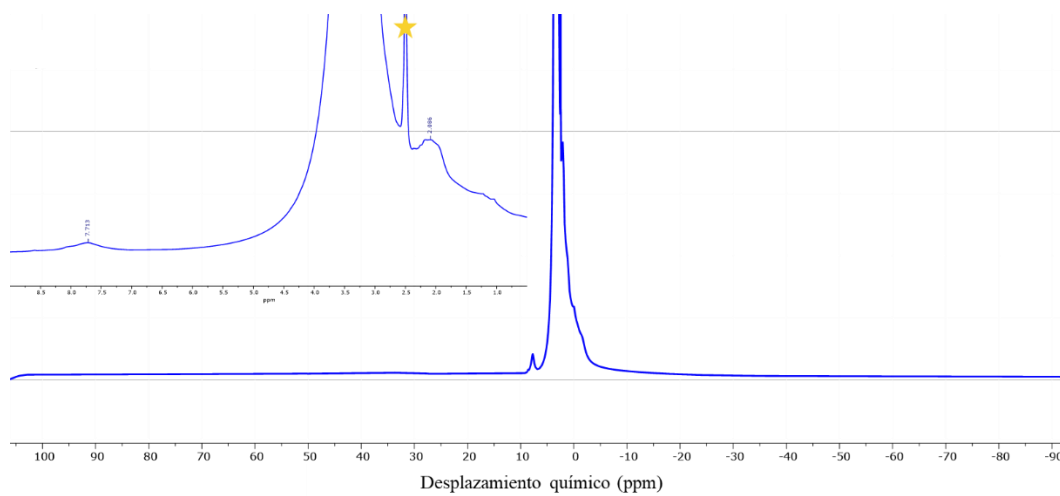


Figura A13. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 1:1.

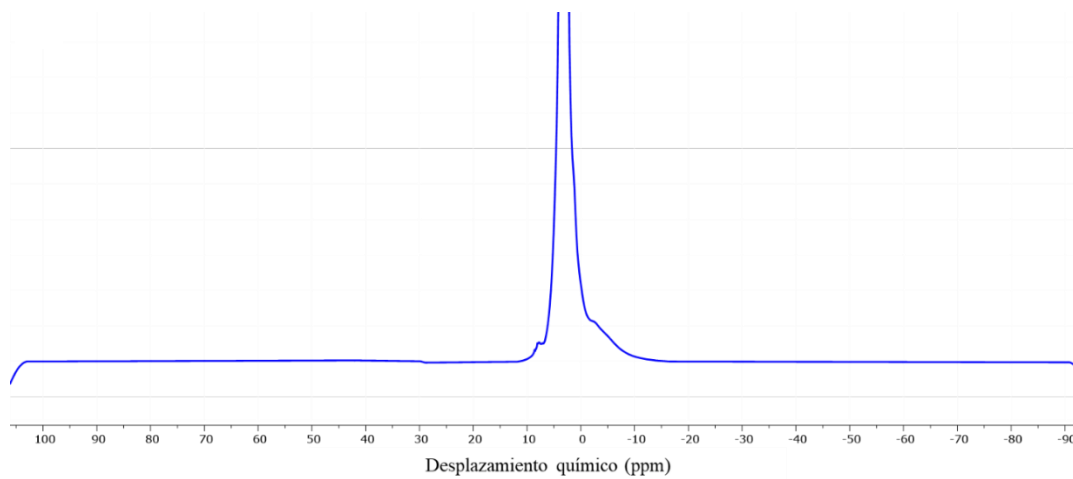


Figura A14. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 1:0.5.

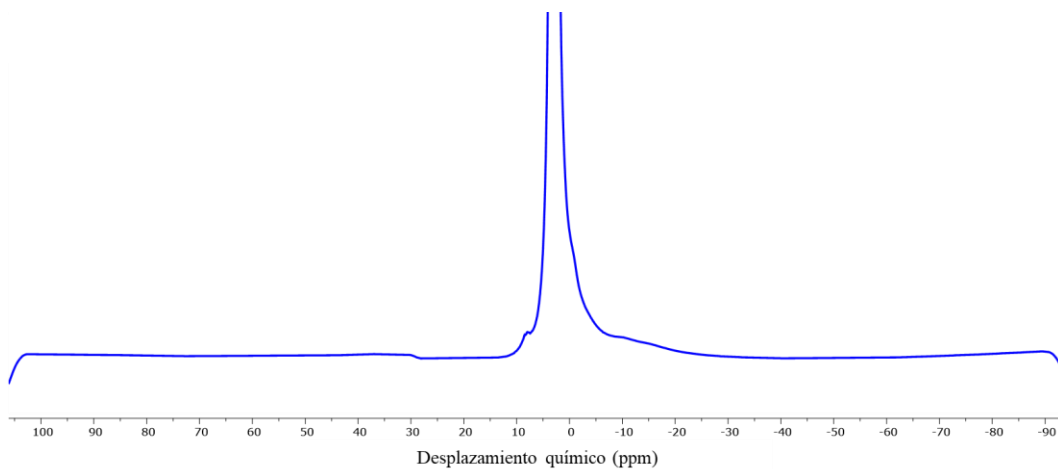


Figura A15. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 1:0.25.

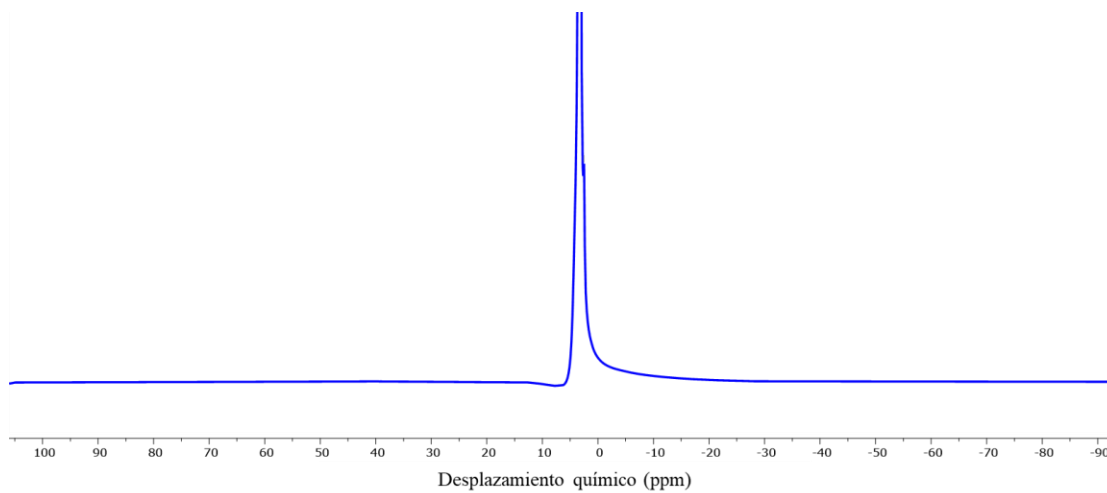


Figura A16. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 1:0.125.

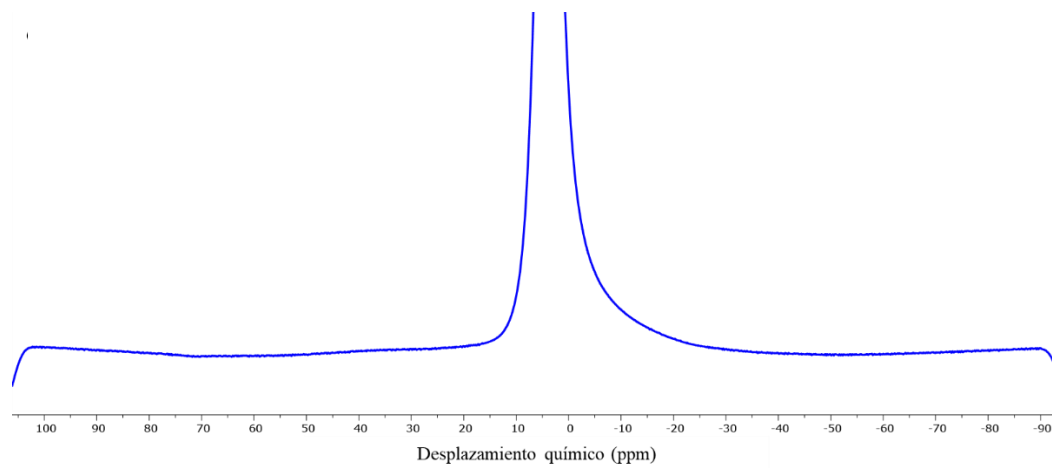


Figura A17. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 1:0.063.

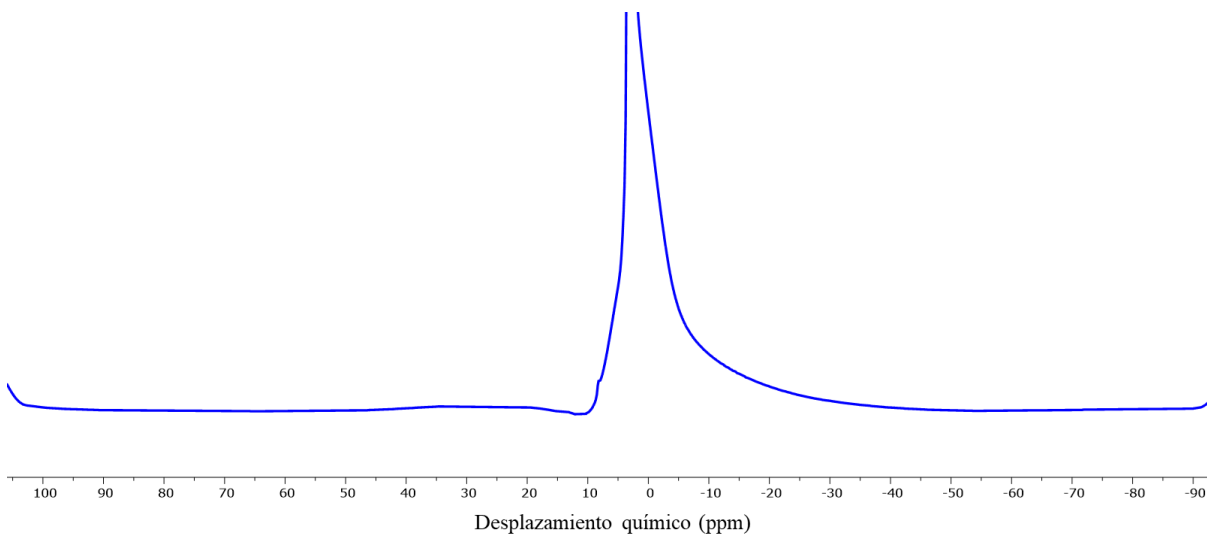


Figura A18. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: PAMAM G3 1:0.031.

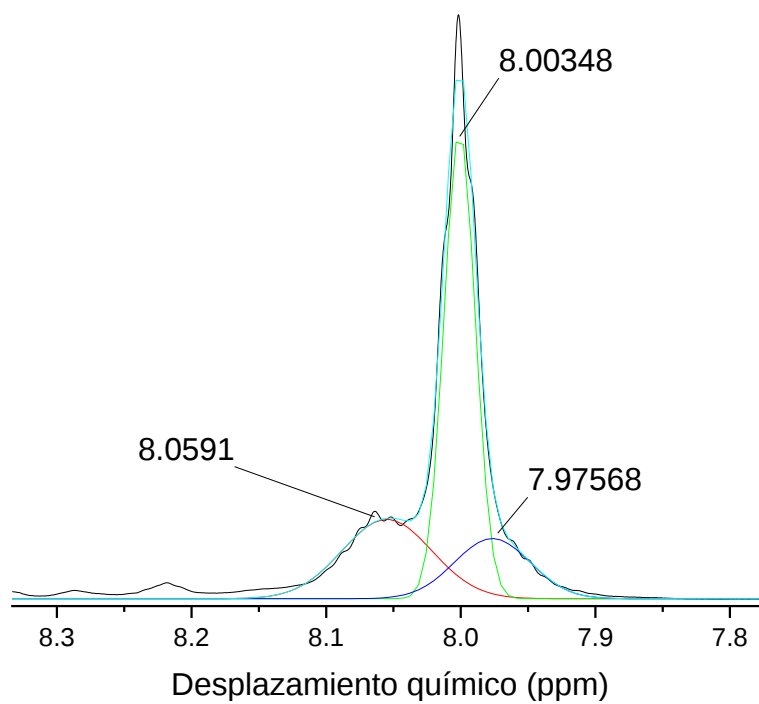


Figura A19. Deconvolución de la señal NH_{amida} del PAMAM G3.

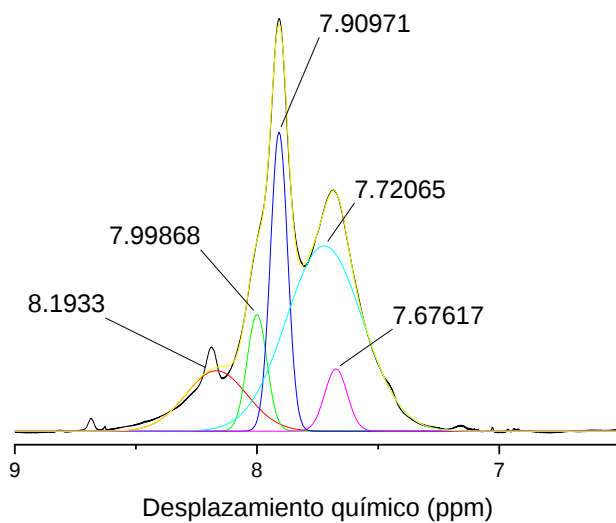


Figura A20. Deconvolución de la señal NH_{amida} del sistema DyADP:PAMAM G3 0.063:1.

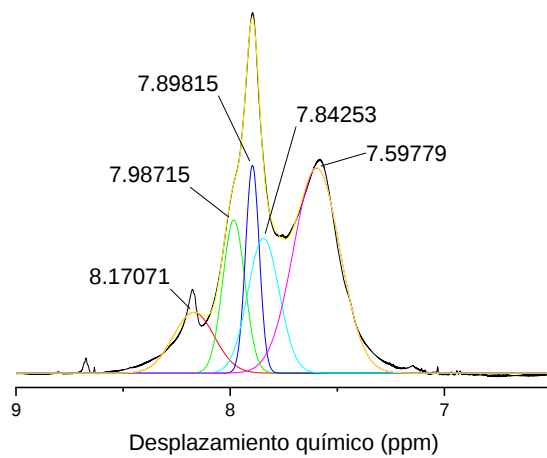


Figura A21. Deconvolución de la señal NH_{amida} del sistema DyADP:PAMAM G3 0.071:1.

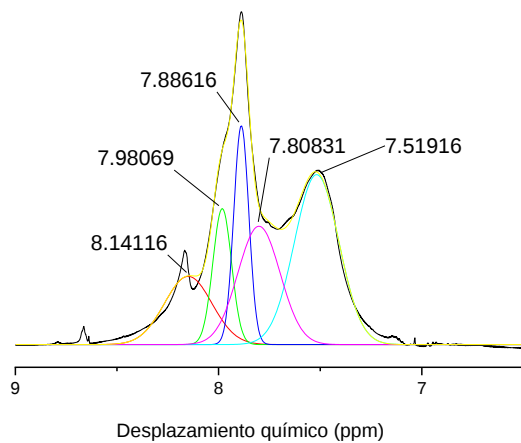


Figura A22. Deconvolución de la señal NH_{amida} del sistema DyADP:PAMAM G3 0.083:1.

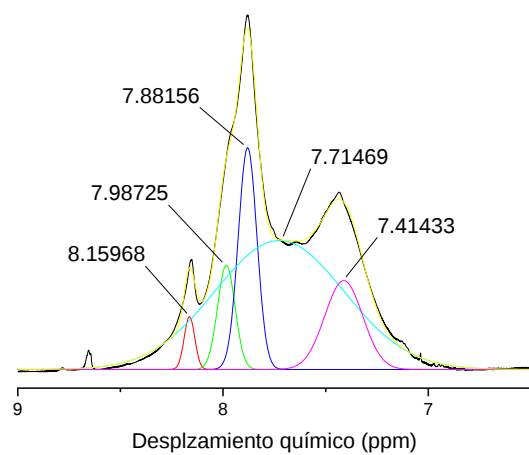


Figura A23. Deconvolución de la señal NH_{amida} del sistema DyADP:PAMAM G3 0.1:1.

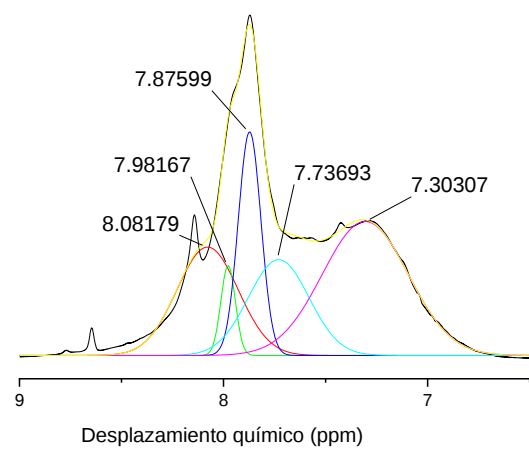


Figura A24. Deconvolución de la señal NH_{amida} del sistema DyADP:PAMAM G3 0.125:1.

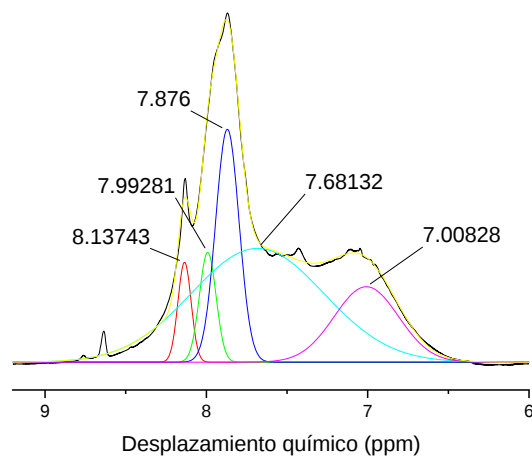


Figura A25. Deconvolución de la señal NH_{amida} del sistema DyADP:PAMAM G3 0.167:1.

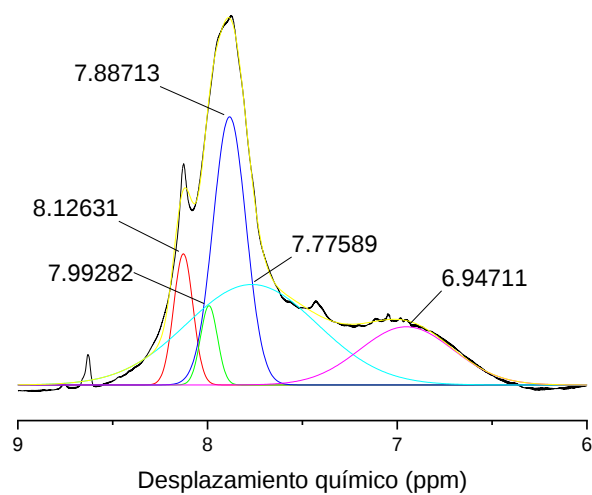


Figura A26. Deconvolución de la señal NH_{amida} del sistema DyADP:PAMAM G3 0.250:1.

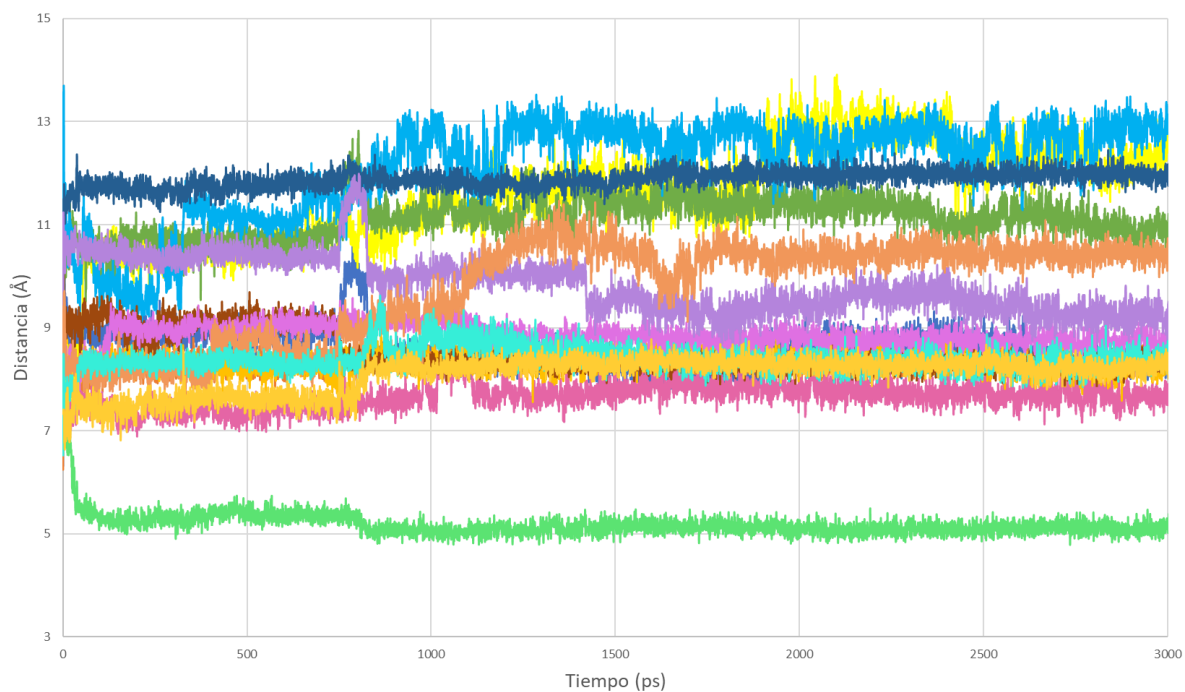


Figura A27. Gráfico de las distancias de 16 NH_{amida} de PAMAM G3 a Dy^{3+} .

Apéndice B

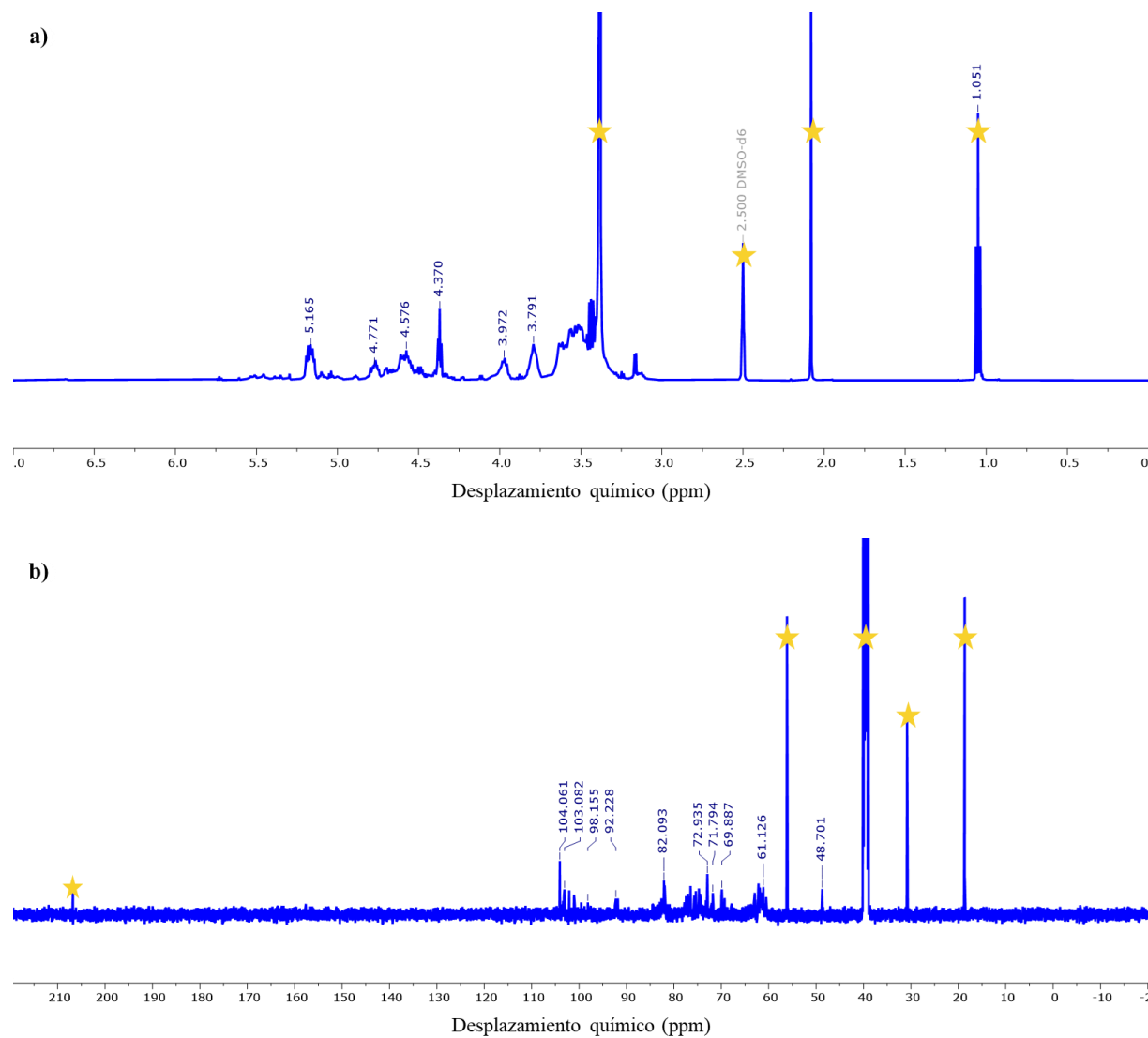


Figura B1. Espectros de RMN (DMSO- d^6) de la muestra 1: fructano a) RMN ^1H , b) RMN ^{13}C .

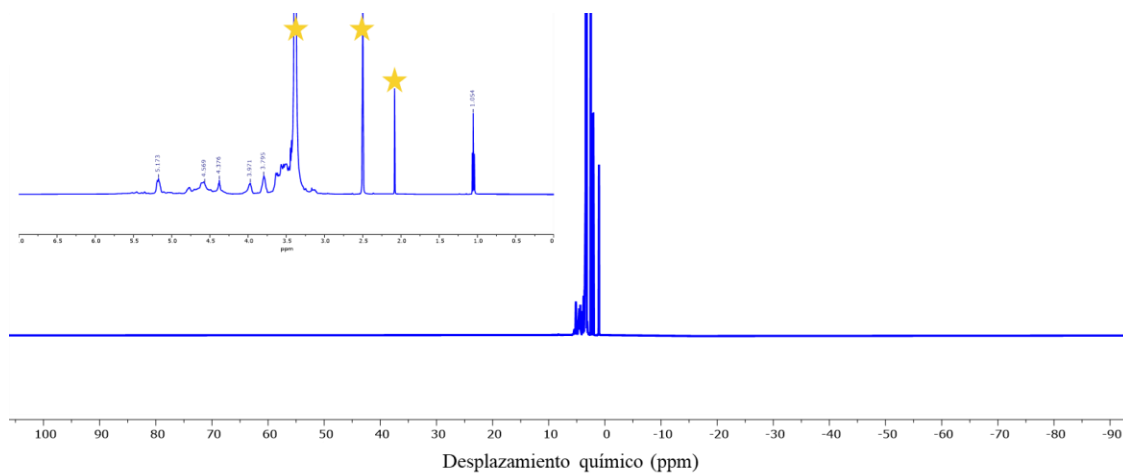


Figura B2. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Fructano 0.031:1.

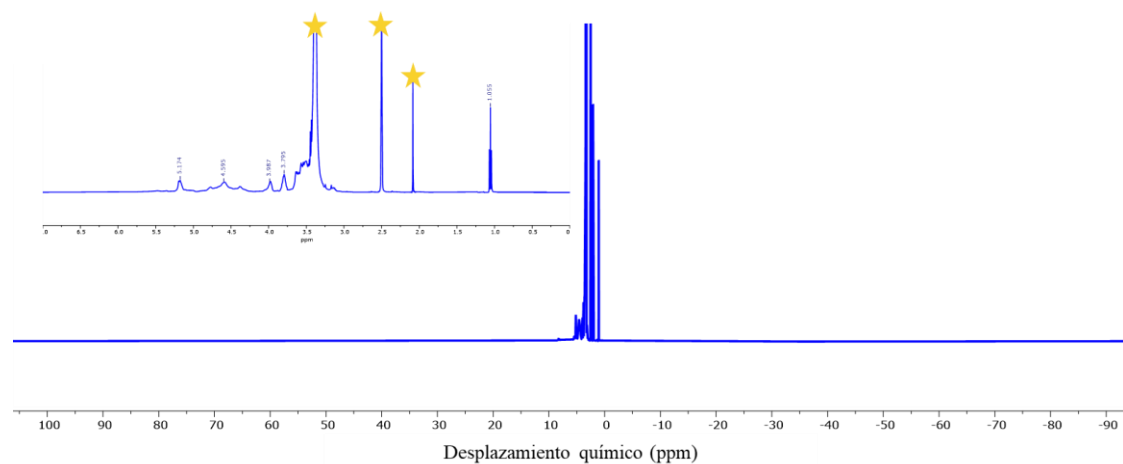


Figura B3. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Fructano 0.063:1.

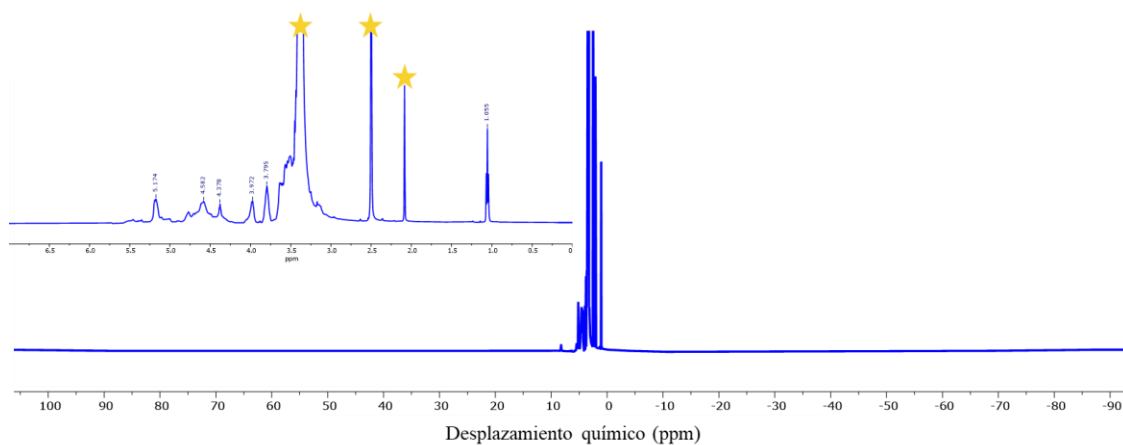


Figura B4. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Fructano 0.125:1.

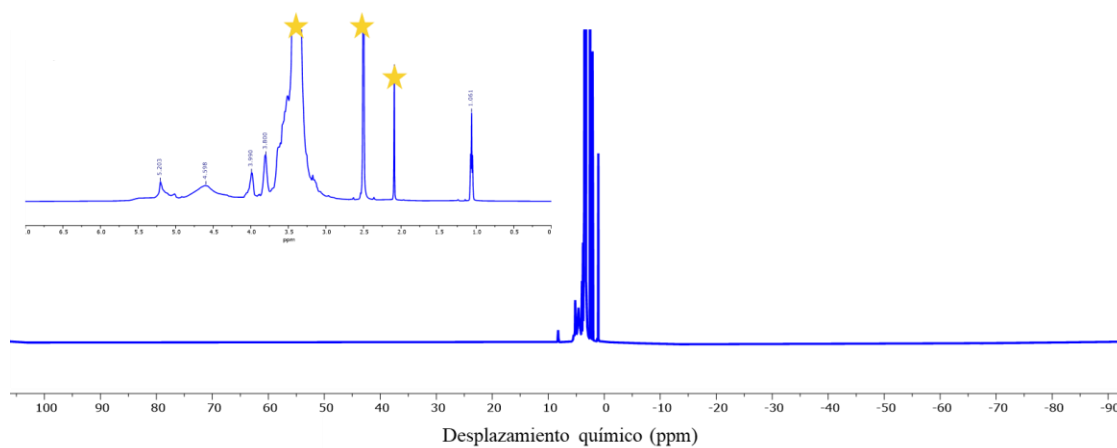


Figura B5. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Fructano 0.25:1

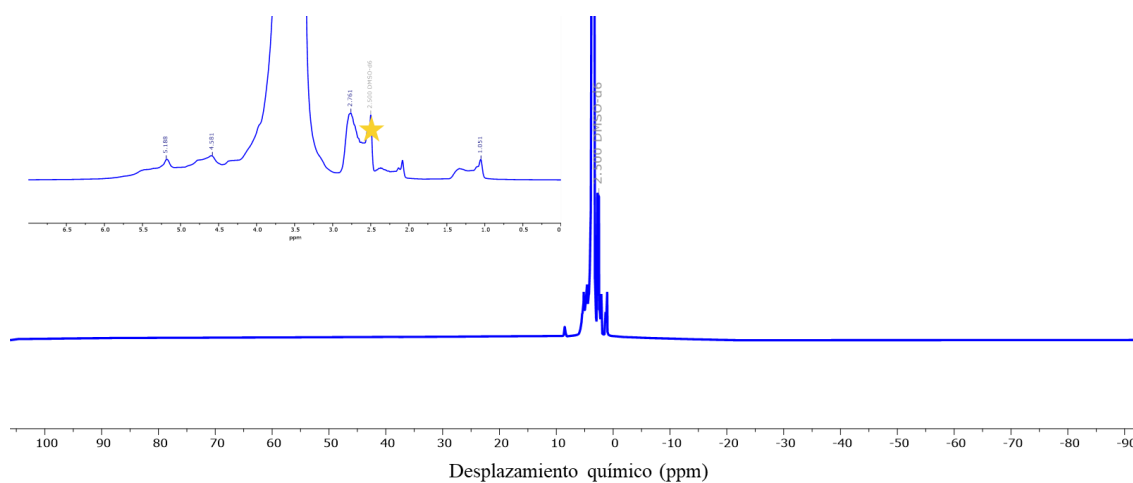


Figura B6. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Fructano 0.5:1

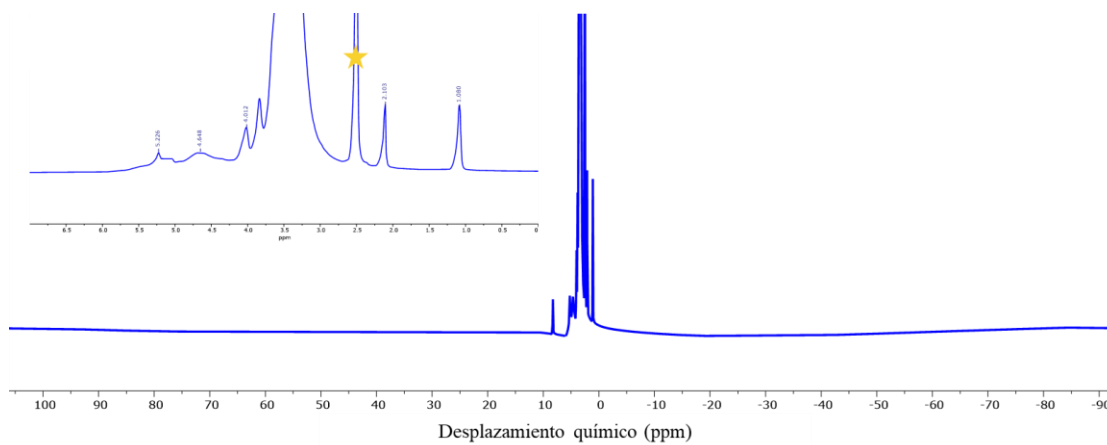


Figura B7. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Fructano 1:1.

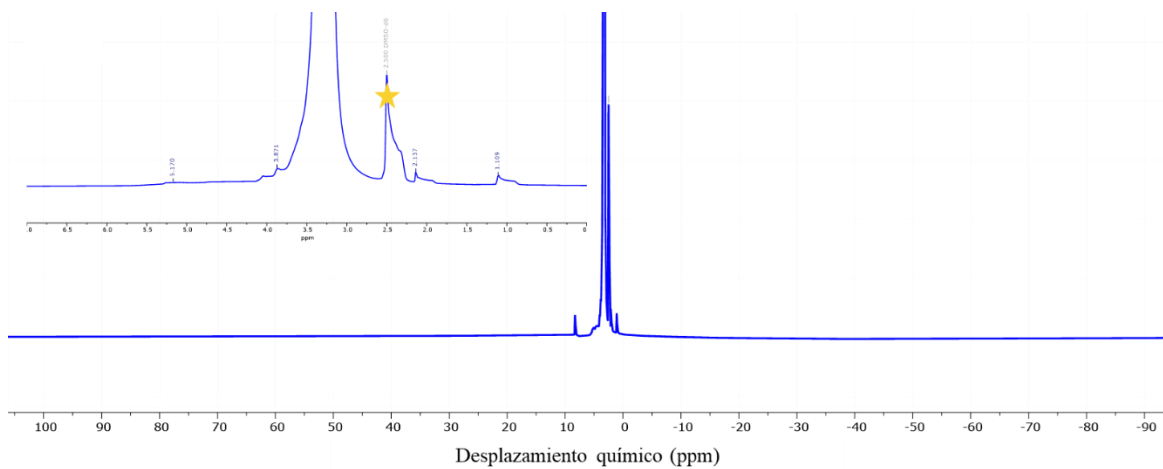


Figura B8. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: Fructano 1:0.5.

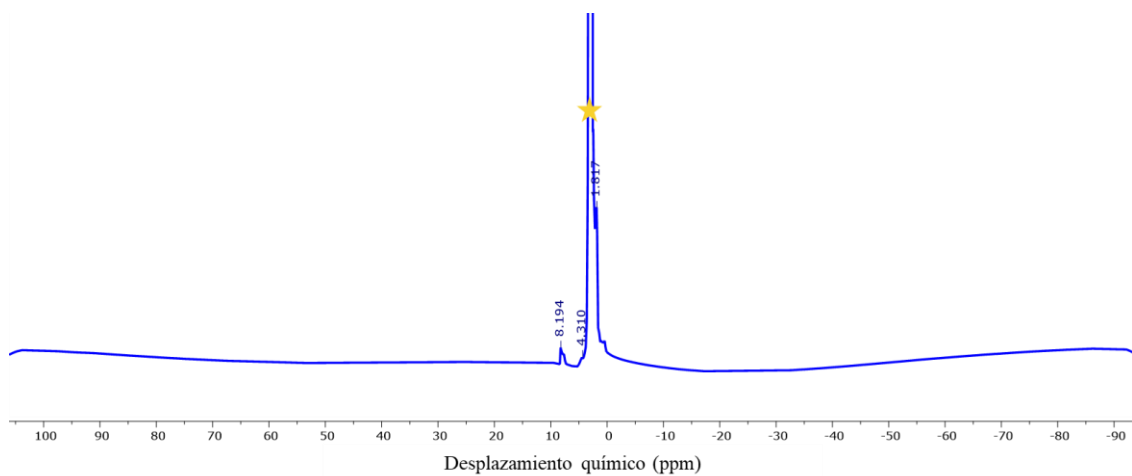


Figura B9. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: Fructano 1:0.25.

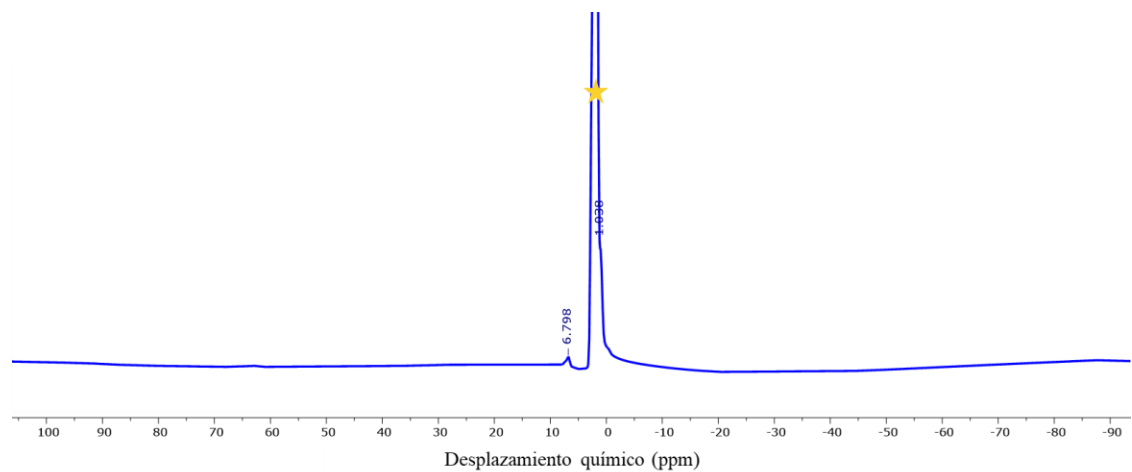


Figura B10. Espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: Fructano 1:0.125.

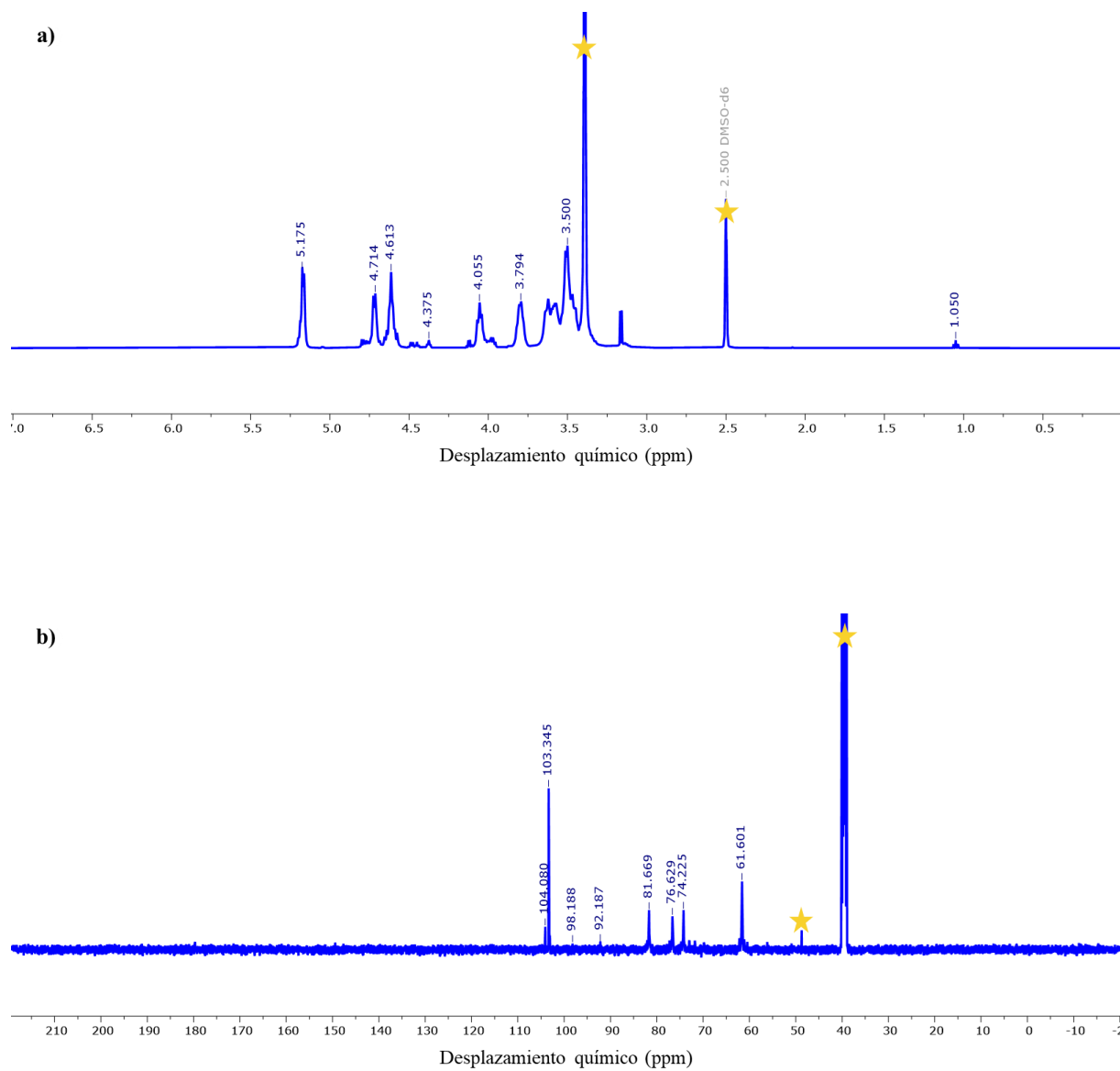


Figura B11. Espectros de RMN (DMSO- d^6) de la muestra 2: inulina lineal. a) RMN ^1H , b) RMN ^{13}C .

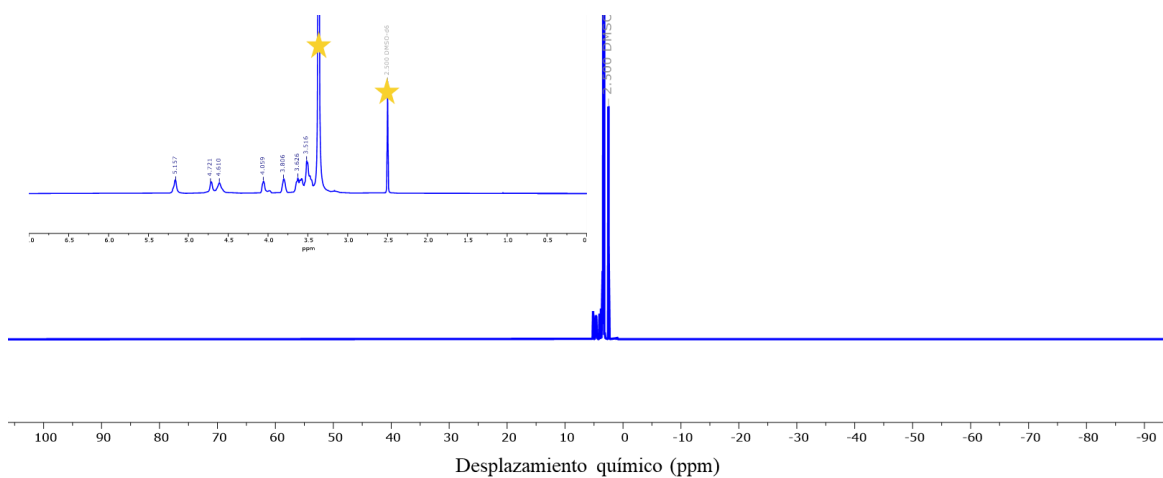


Figura B12. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina lineal 0.031:1.

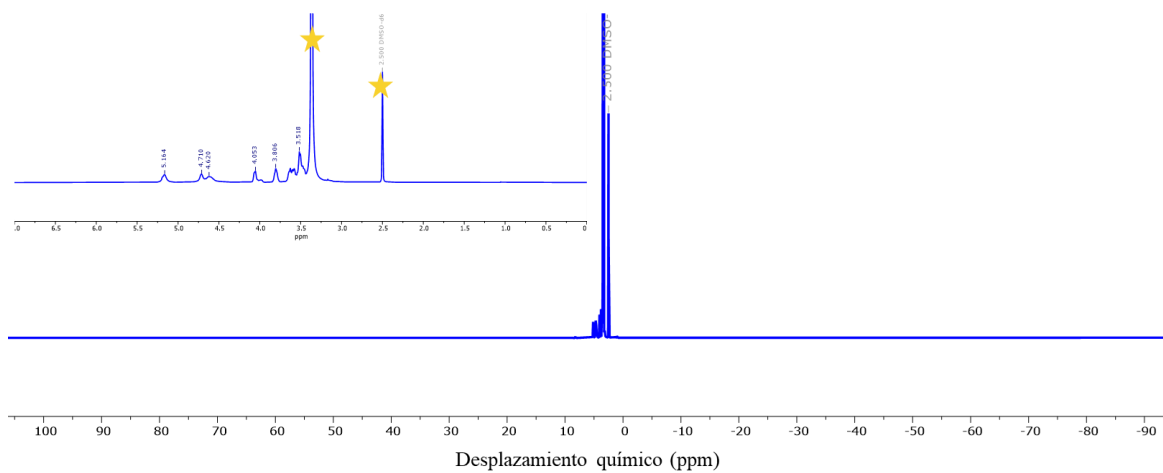


Figura B13. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina lineal 0.063:1.

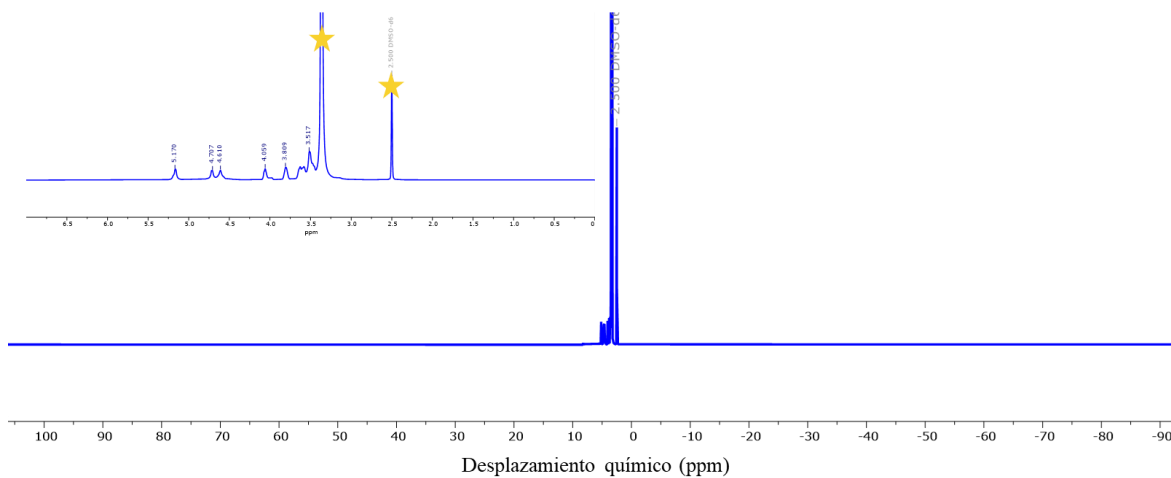


Figura B14. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina lineal 0.125:1

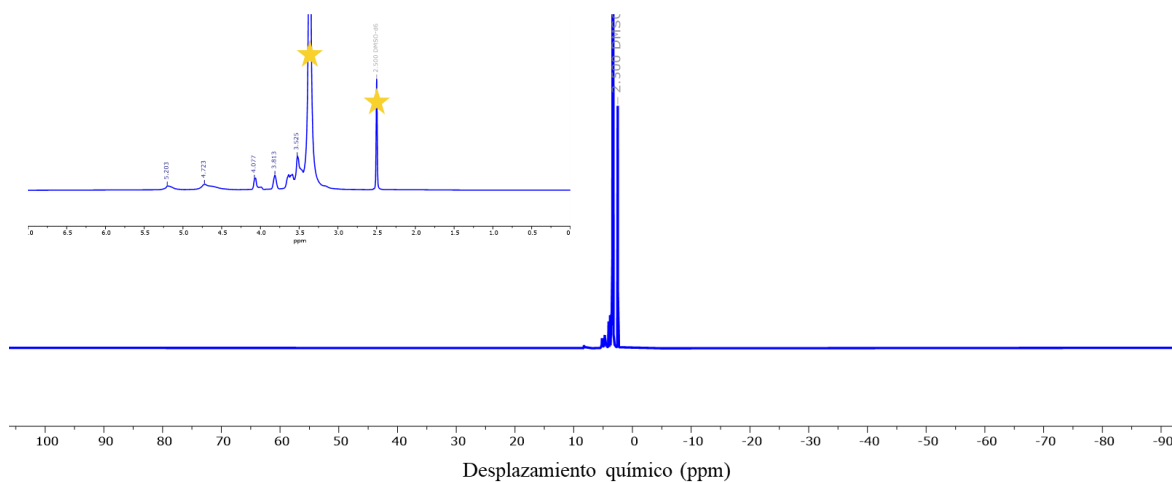


Figura B15. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina lineal 0.25:1.

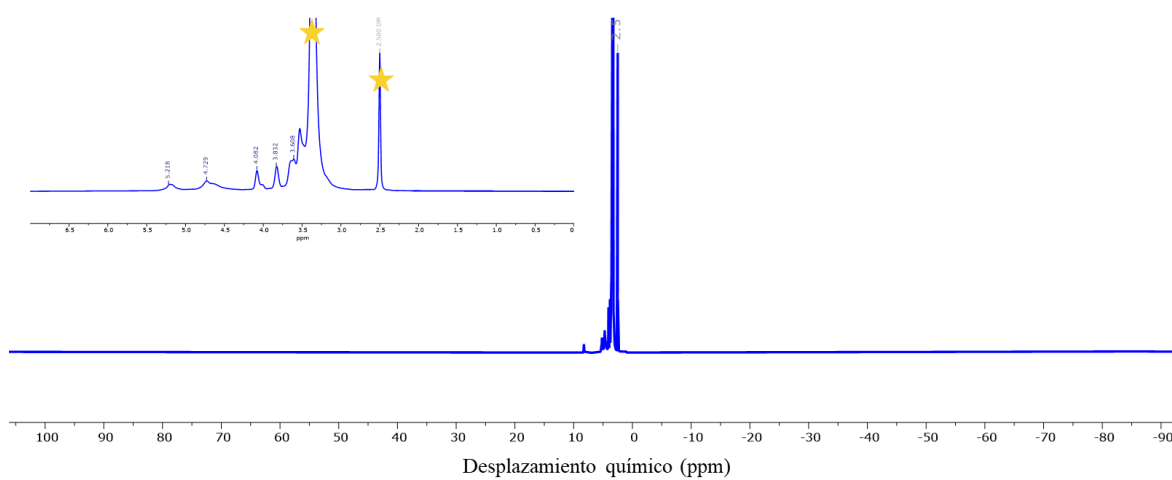


Figura B16. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina lineal 0.5:1.

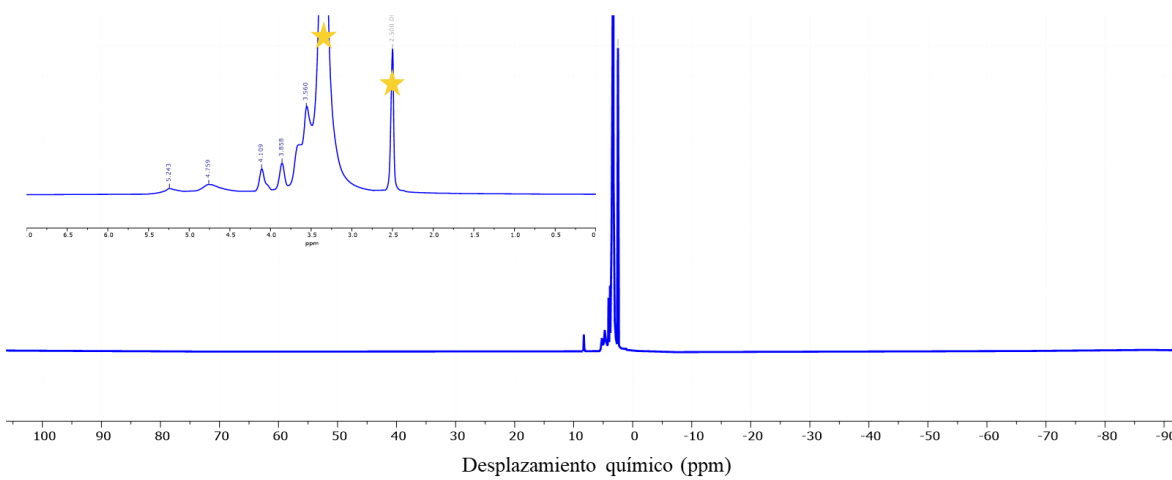


Figura B17. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina lineal 1:1

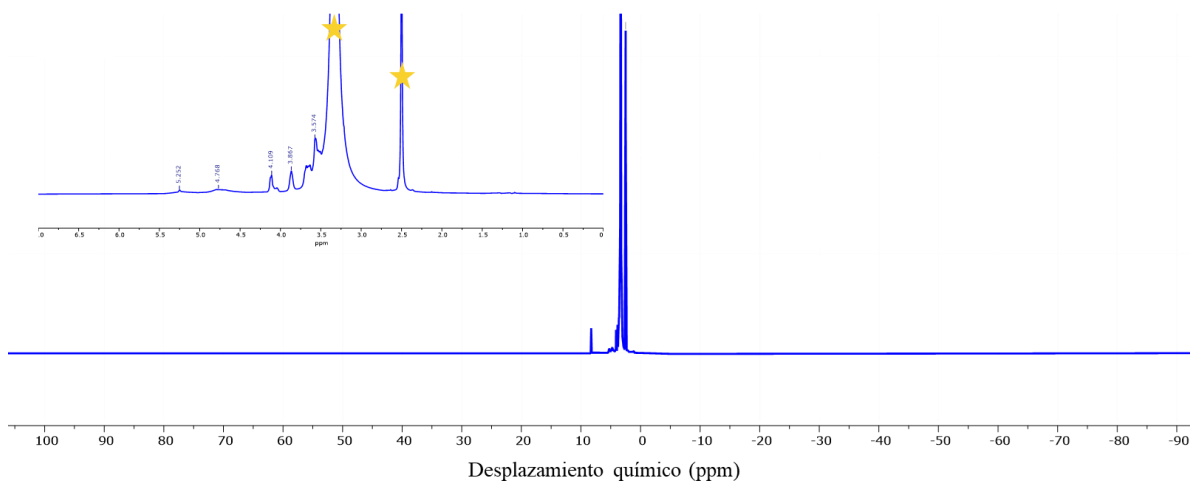


Figura B18. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina lineal 1:0.5.

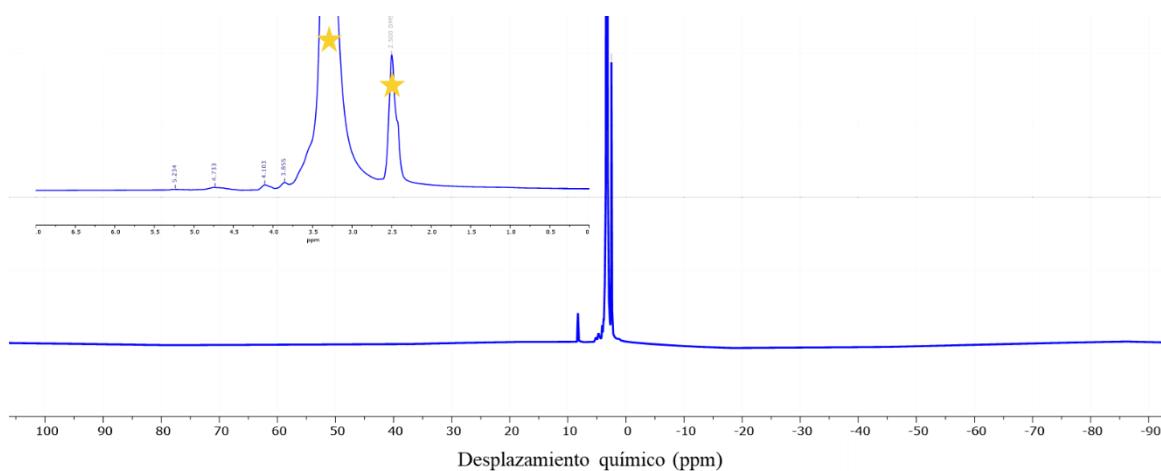


Figura B19. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina lineal. 1:0.25.

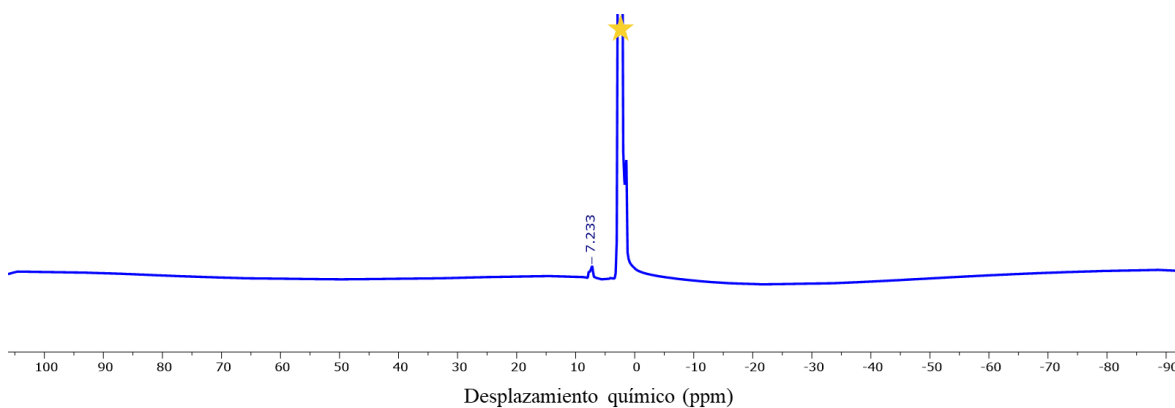


Figura B20. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina lineal 1:0.125.

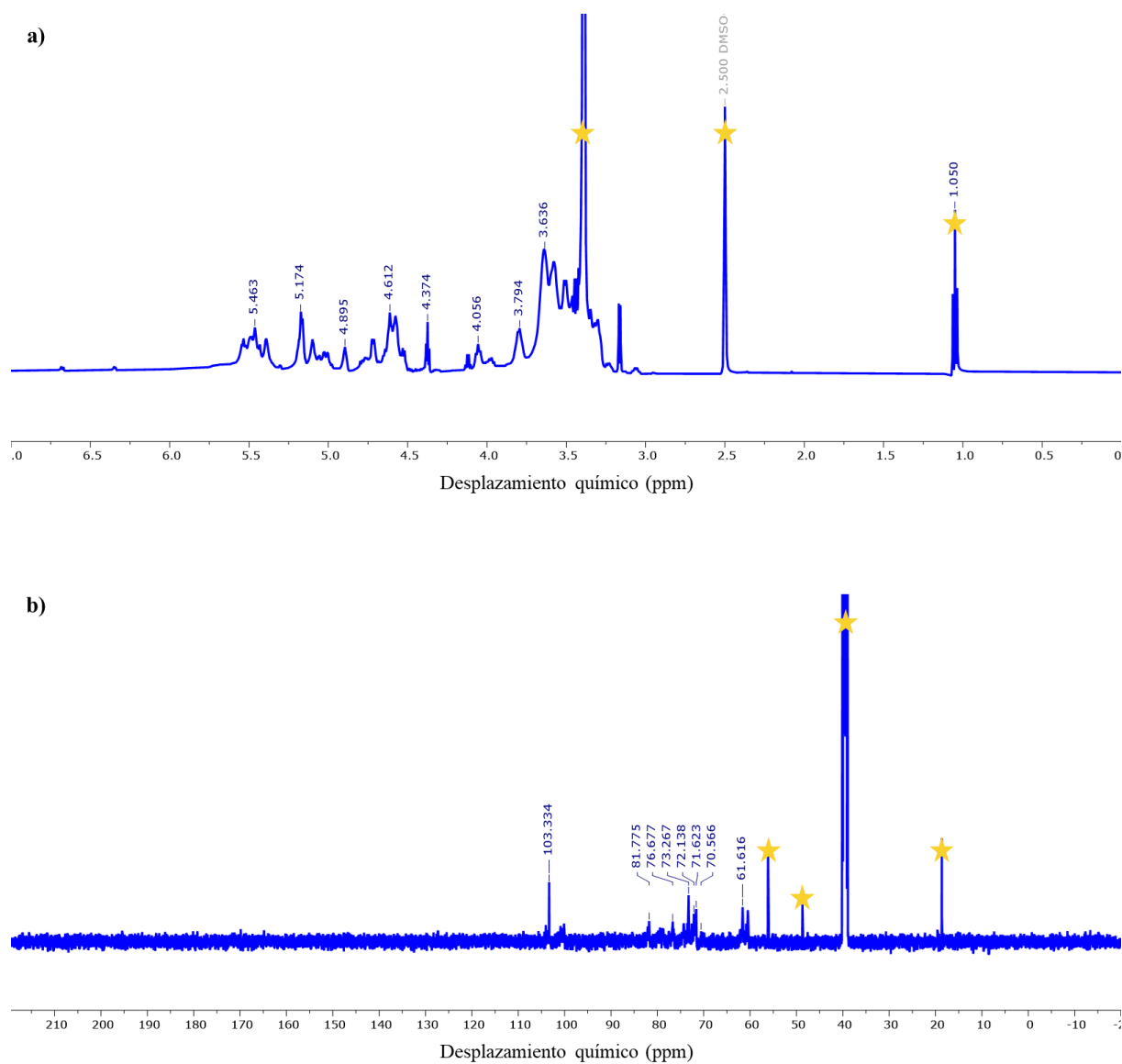


Figura B21. Espectros de RMN (DMSO- d^6) de la muestra 2: inulina ramificada. a) RMN ^1H , b) RMN ^{13}C .

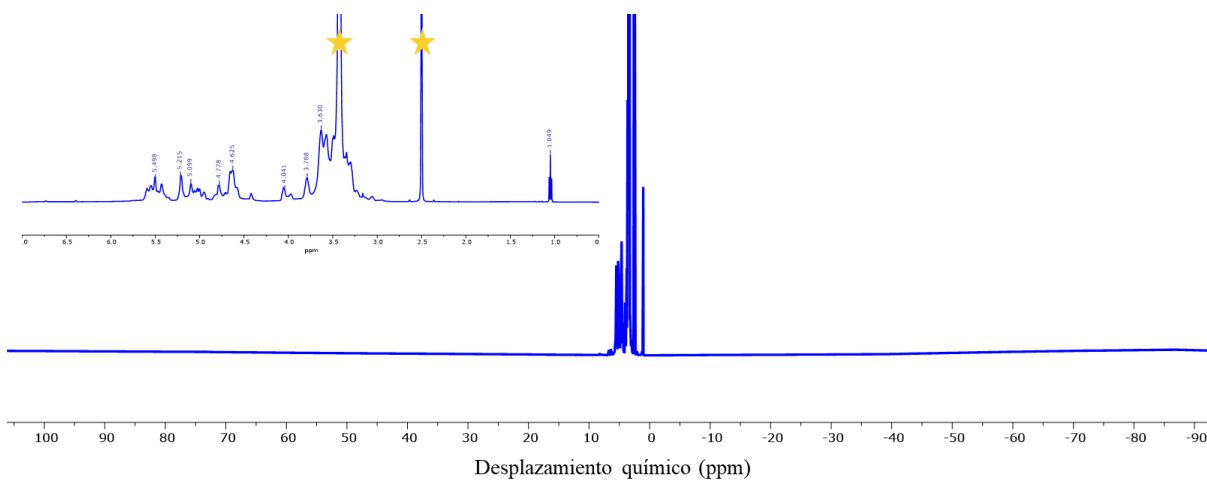


Figura B22. Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) de la mezcla DyADP: Inulina ramificada 0.031:1.

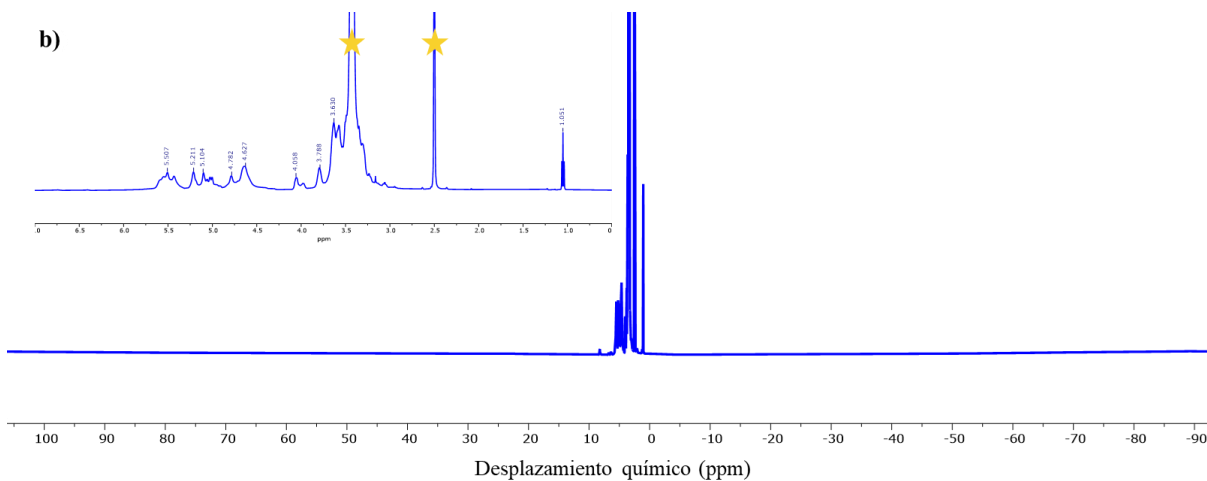


Figura B23. Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) de la mezcla DyADP: Inulina ramificada 0.063:1.

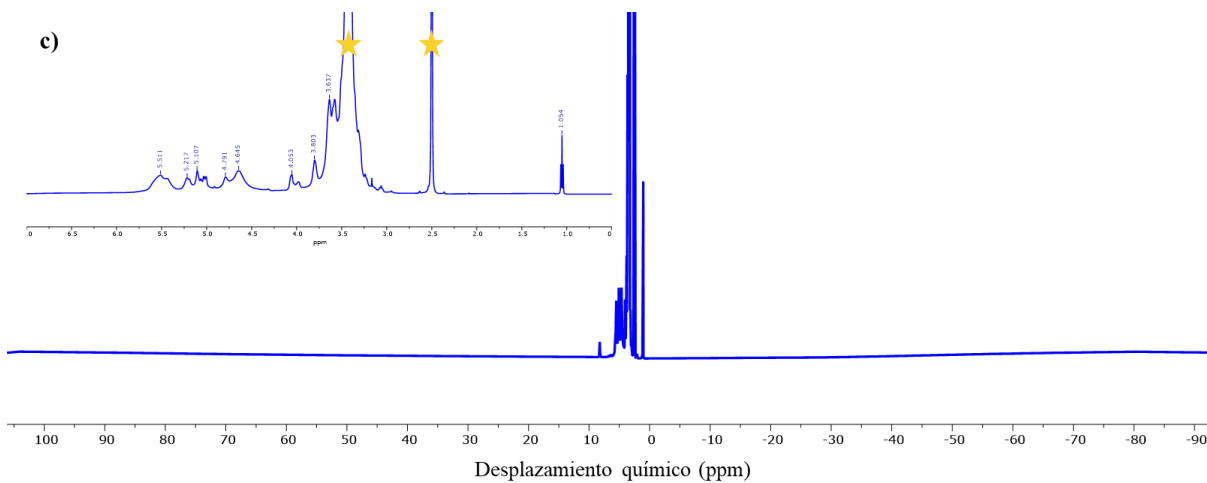


Figura B24. Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) de la mezcla DyADP: Inulina ramificada 0.125:1.

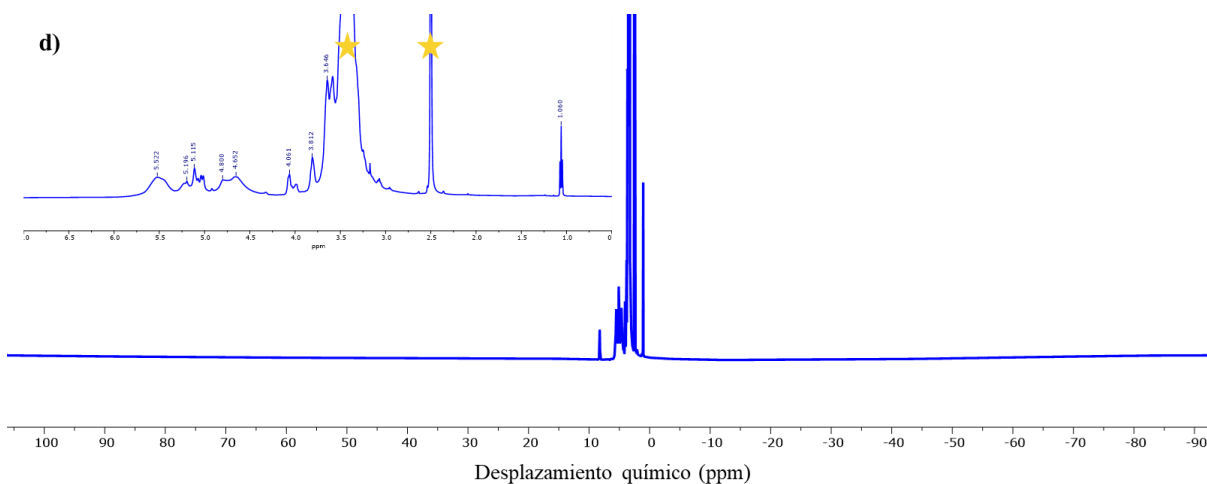


Figura B25. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina ramificada 0.25:1.

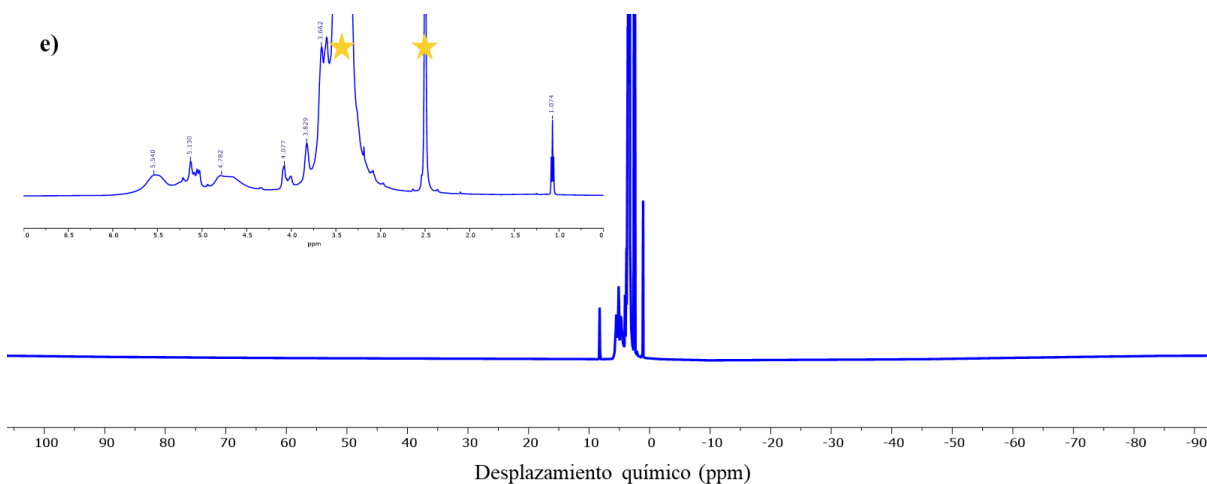


Figura B26. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina ramificada 0.5:1.

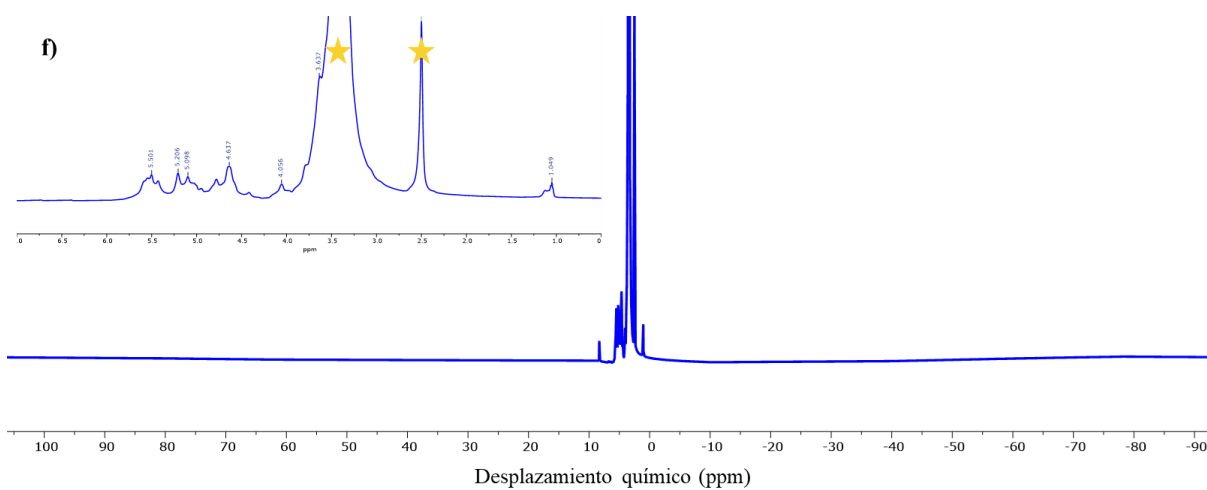


Figura B27. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina ramificada 1:1.

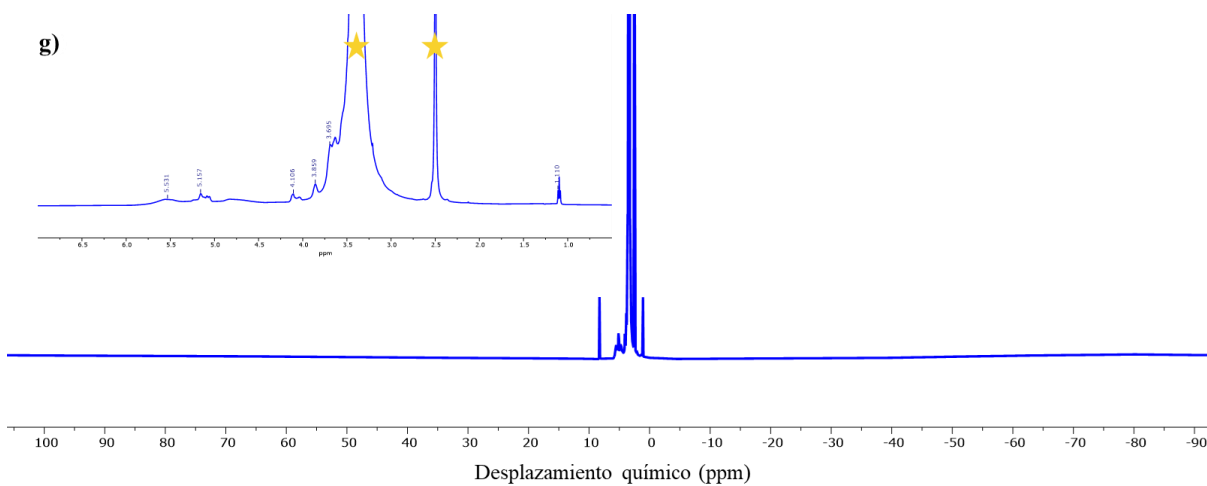


Figura B28. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina ramificada 1:0.5.

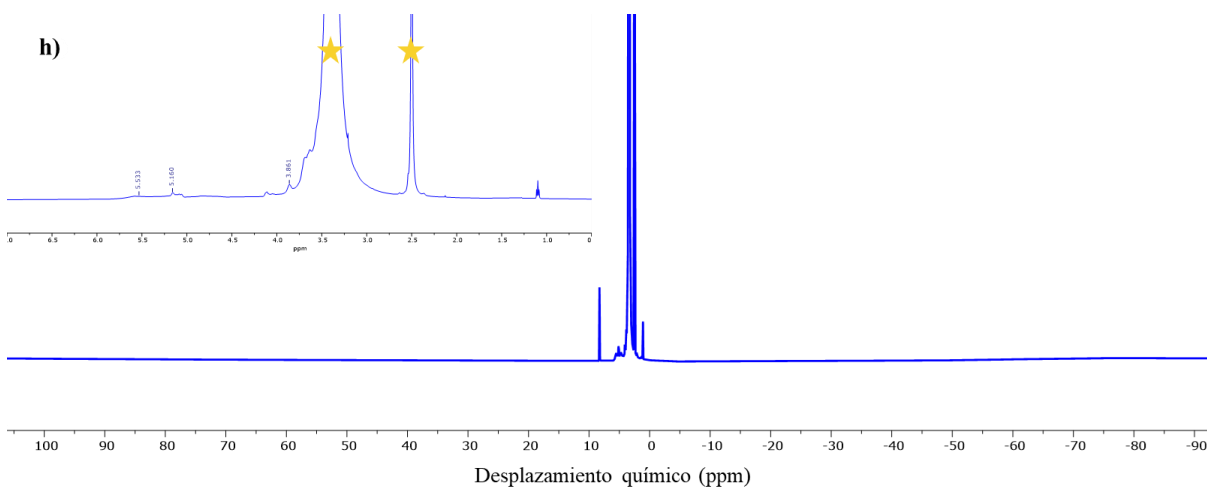


Figura B29. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina ramificada 1:0.25.

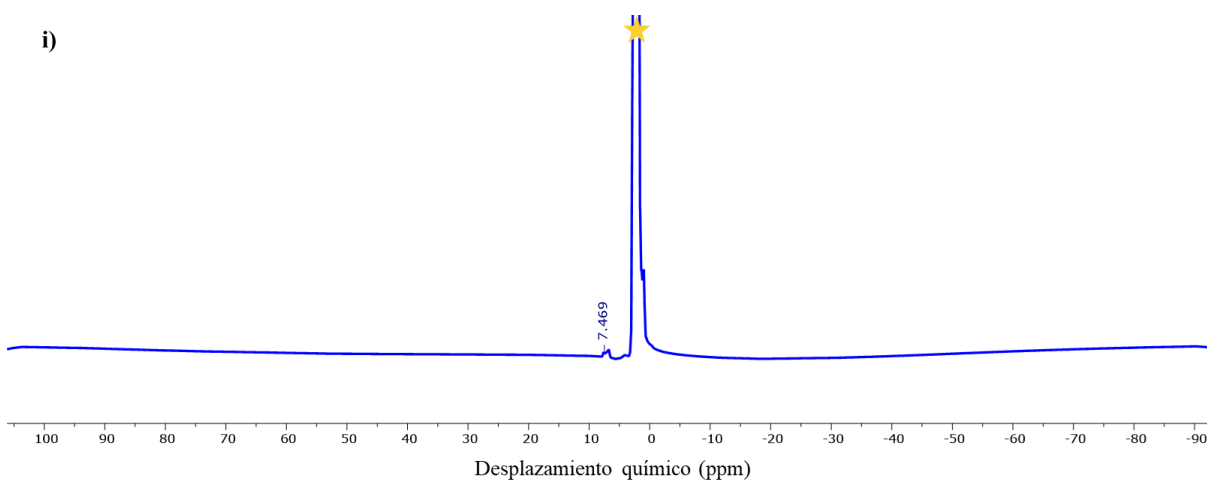


Figura B30. Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$) de la mezcla DyADP: Inulina ramificada 1:0.125.

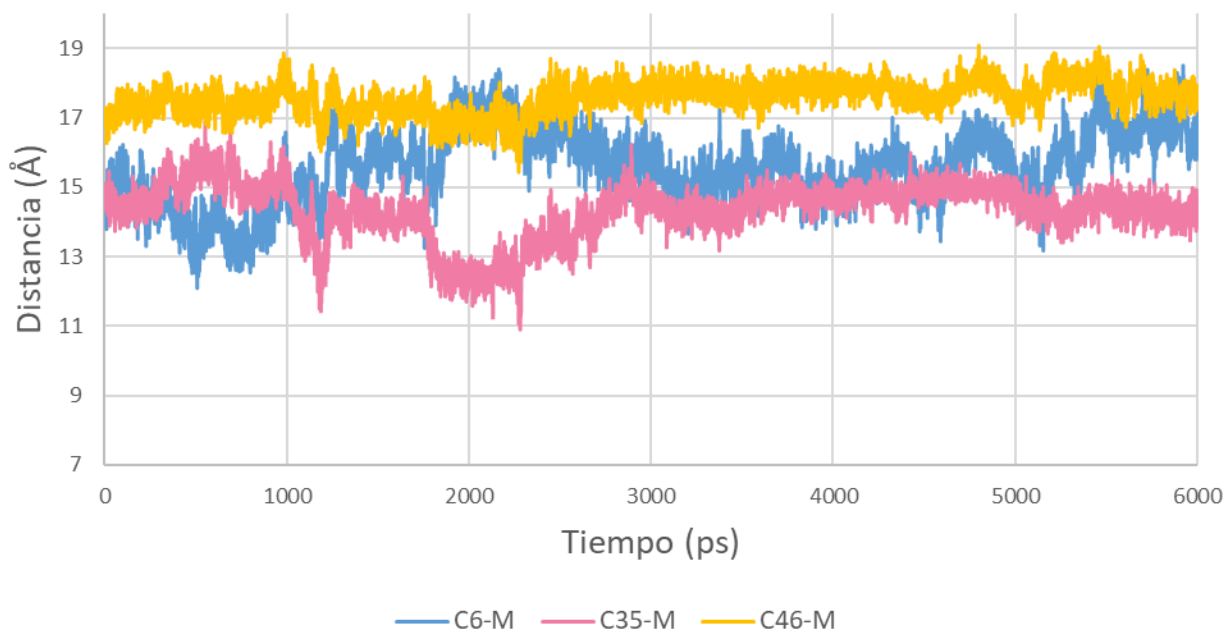


Figura B31. Gráfico de las distancias de los CH_2 de 1-kestosa al Dy^{3+} sin acercamiento inicial.

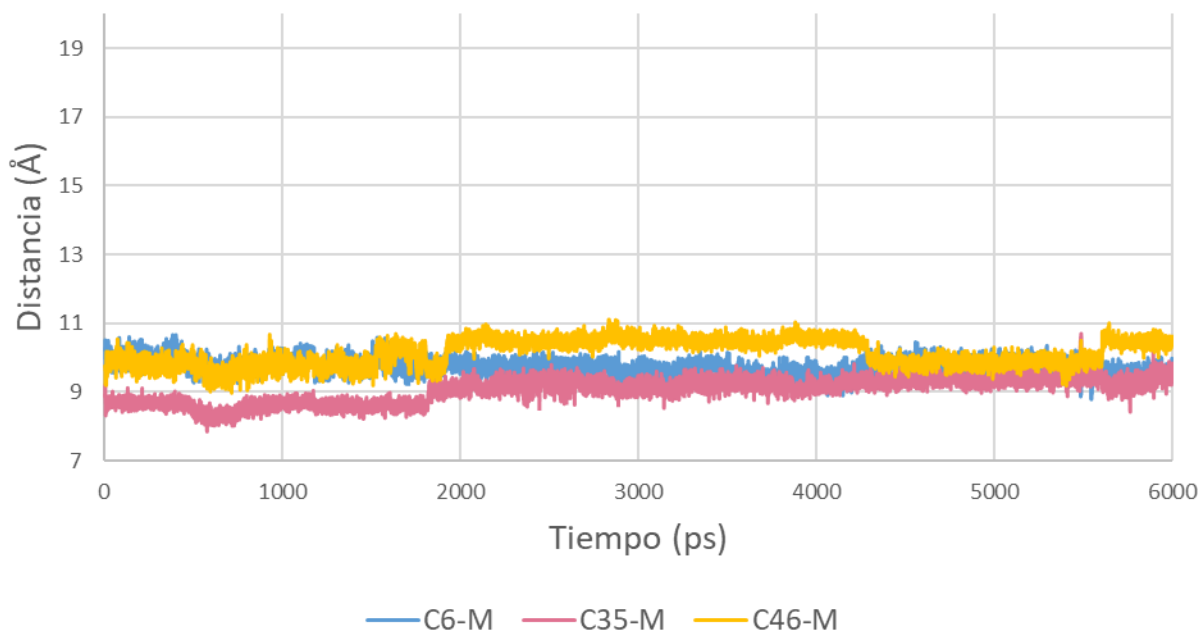


Figura B32. Gráfico de las distancias de los CH_2 de 1-kestosa al Dy^{3+} con acercamiento inicial de 3Å.

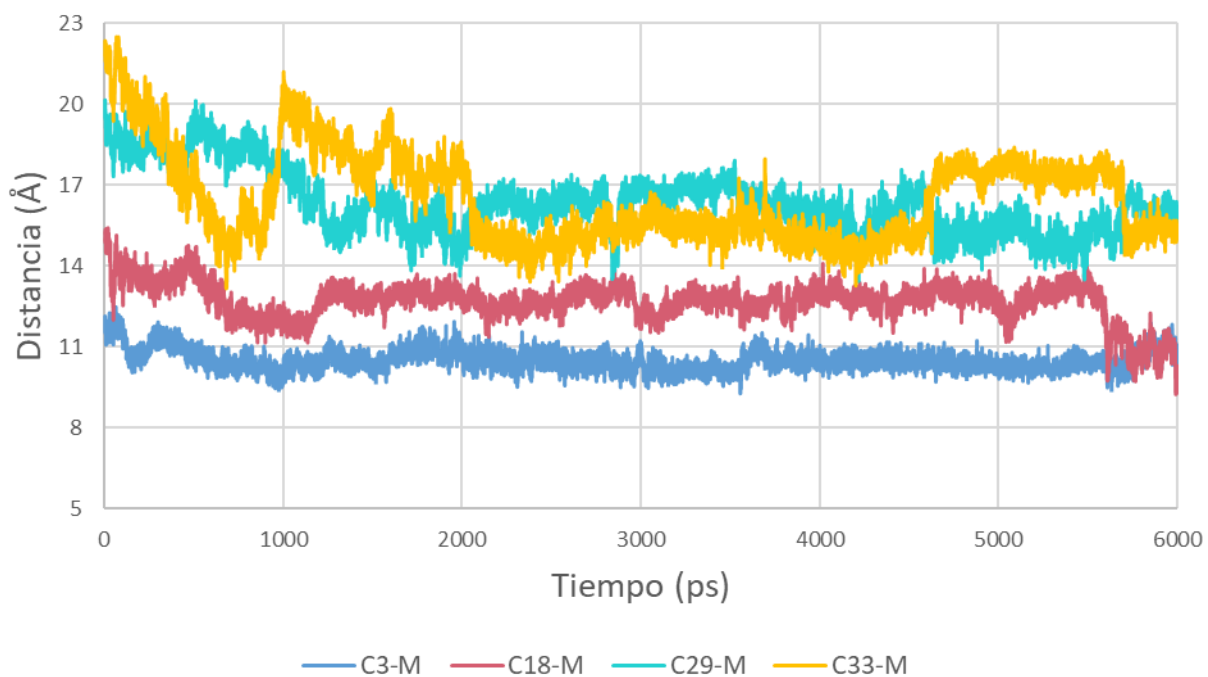


Figura B33. Gráfico de las distancias de los CH_2 de 6-kestosa al Dy^{3+} sin acercamiento inicial.

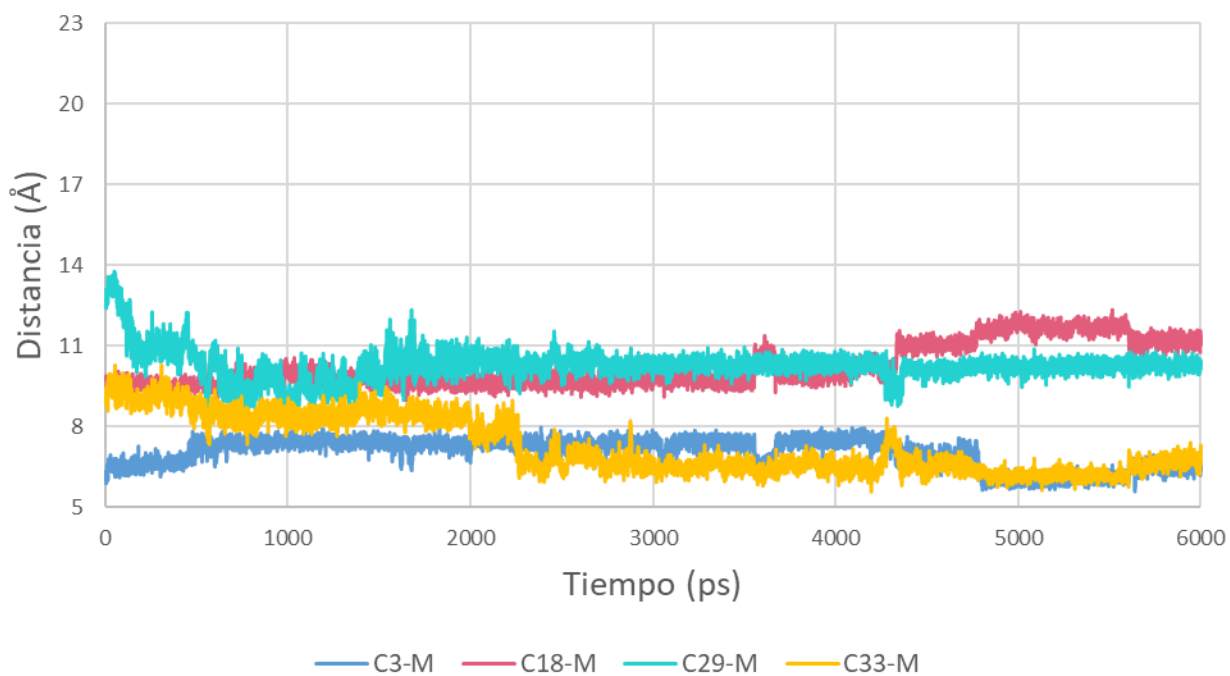


Figura B34. Gráfico de las distancias de los CH_2 de 6-kestosa al Dy^{3+} con acercamiento inicial de 3 Å

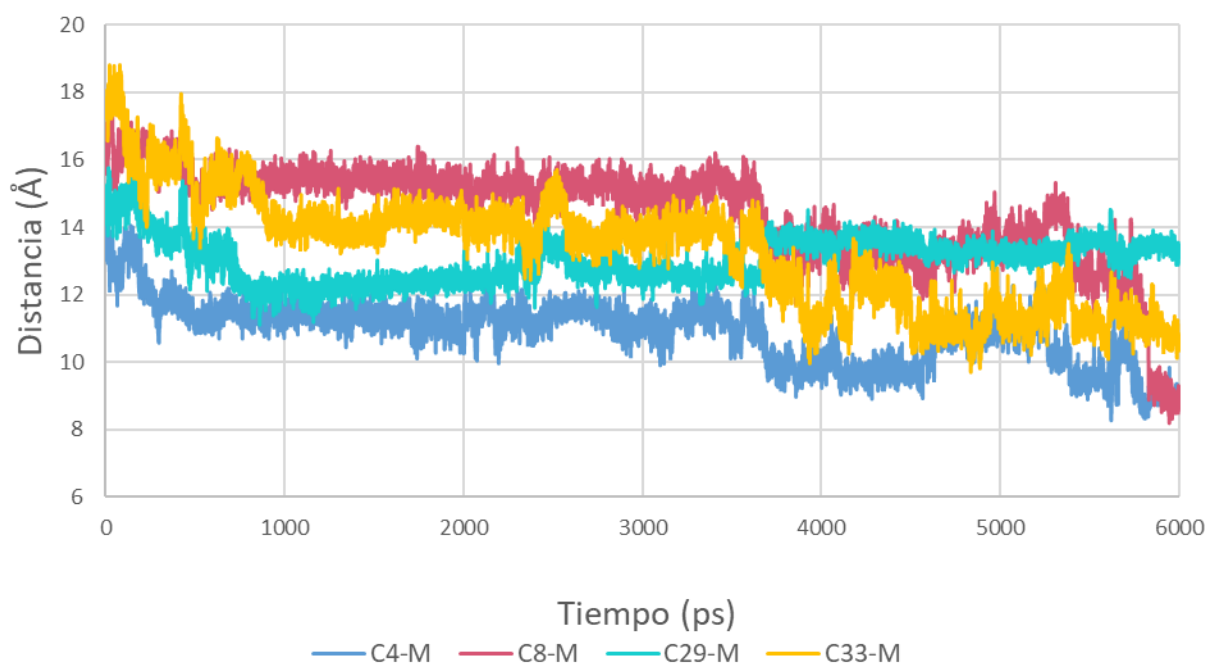


Figura B35. Gráfico de las distancias de los CH_2 de neokestosa al Dy^{3+} sin acercamiento inicial.

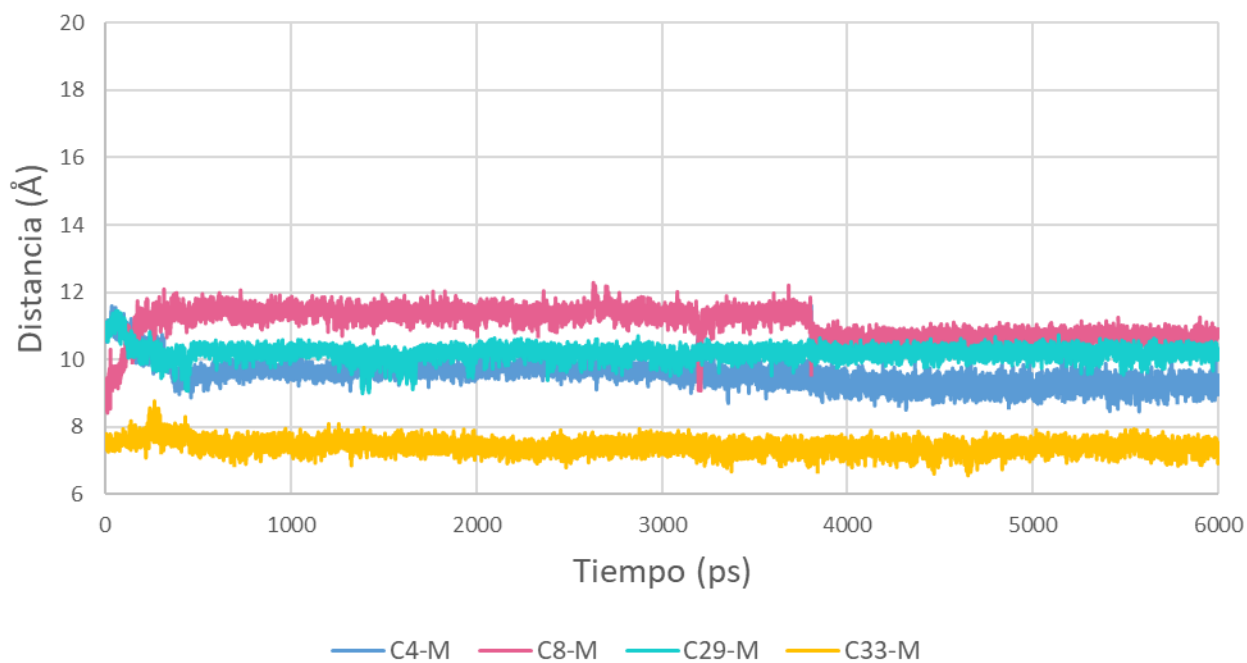


Figura B36. Gráfico de las distancias de los CH_2 de neokestosa al Dy^{3+} con acercamiento inicial de 3 Å

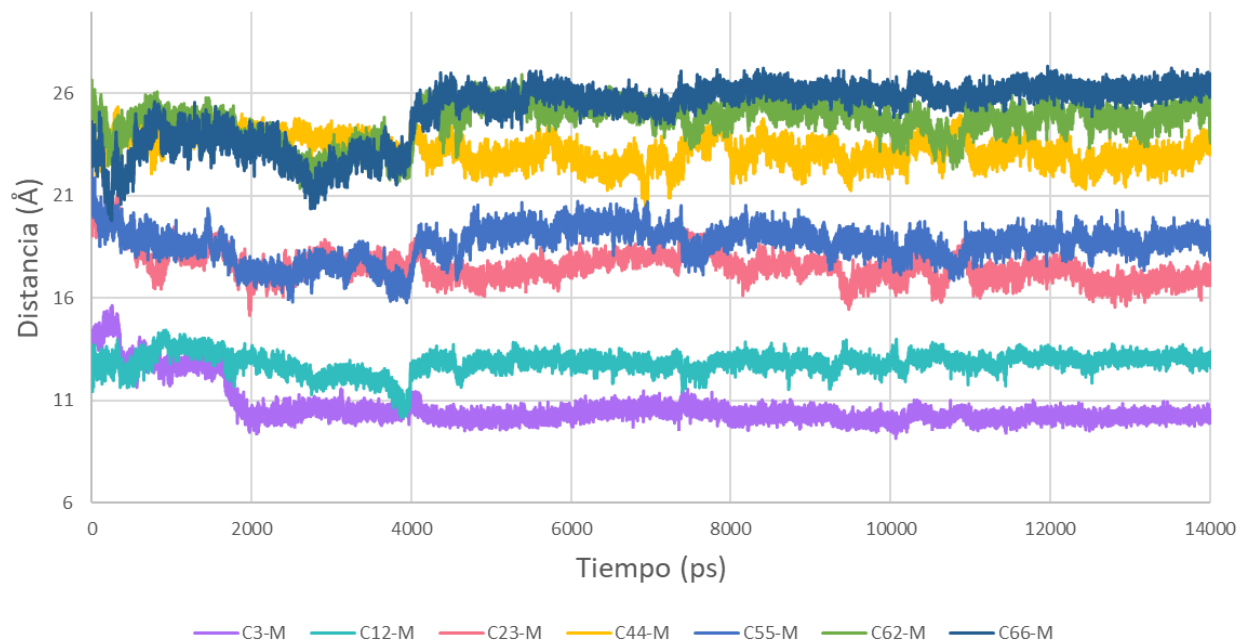


Figura B37. Gráfico de las distancias de los CH_2 de DP 6 al Dy^{3+} sin acercamiento inicial.

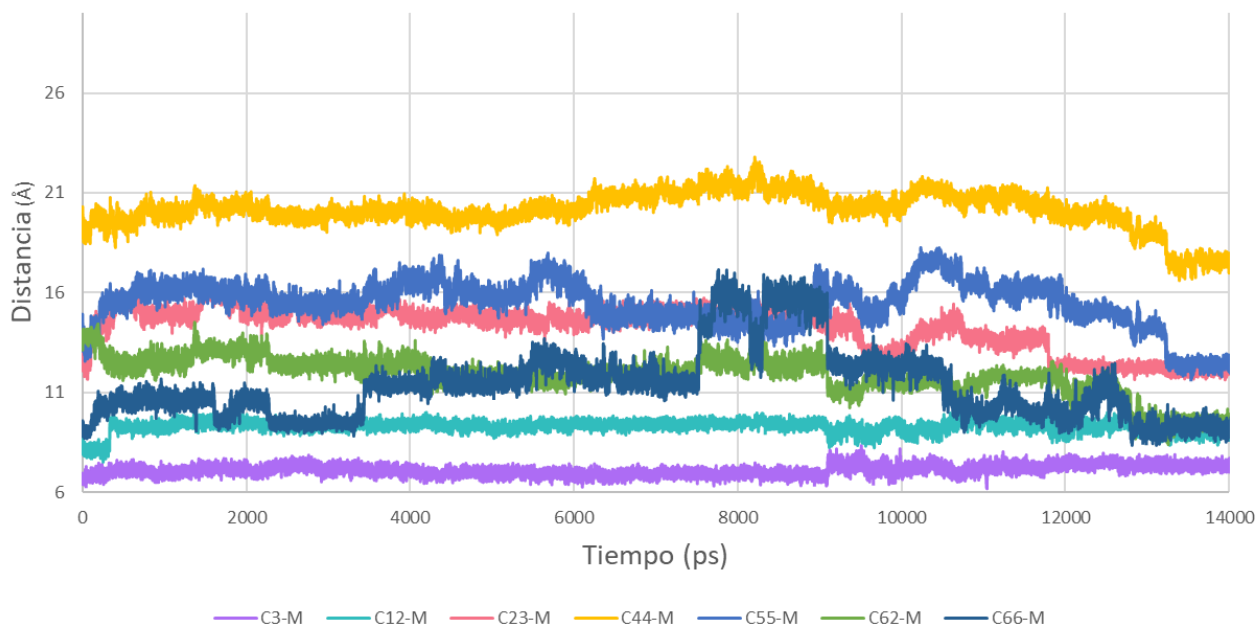


Figura B38. Gráfico de las distancias de los CH_2 de DP 6 al Dy^{3+} con acercamiento inicial de 3 $\text{\AA}$ desde dos extremos de la molécula de fructano.

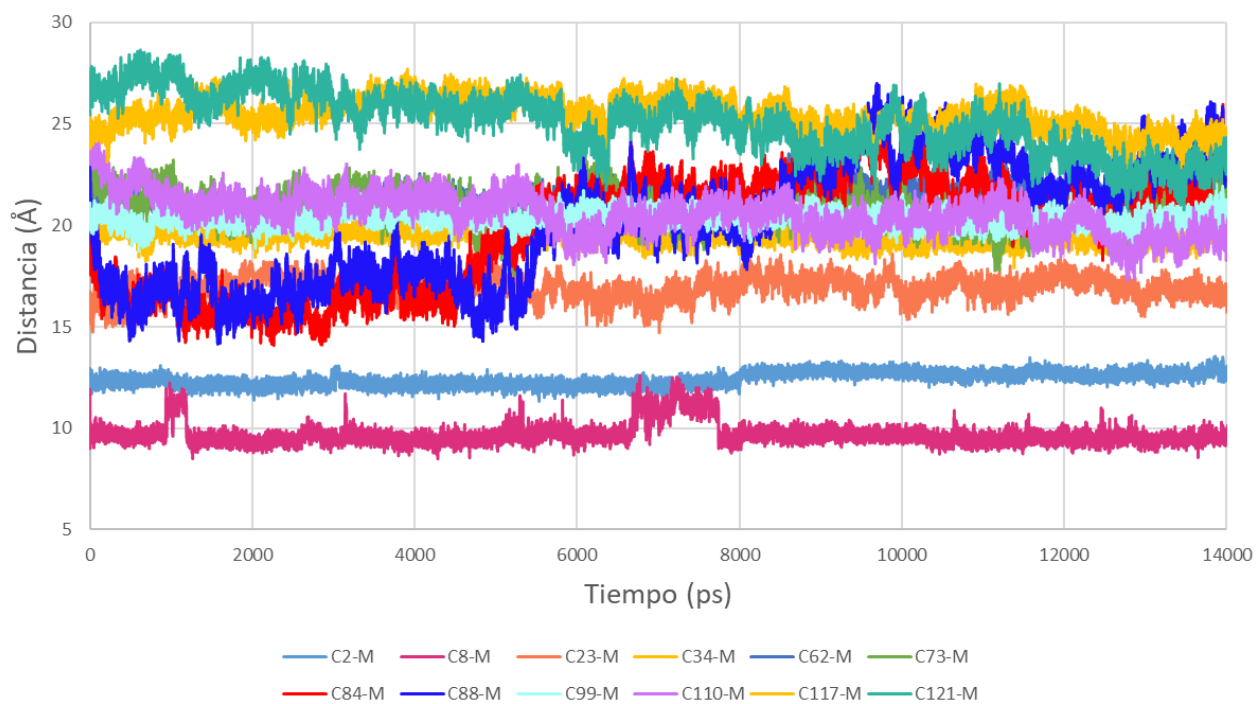


Figura B39. Gráfico de las distancias de los CH_2 de DP 11 al Dy^{3+} sin acercamiento inicial.

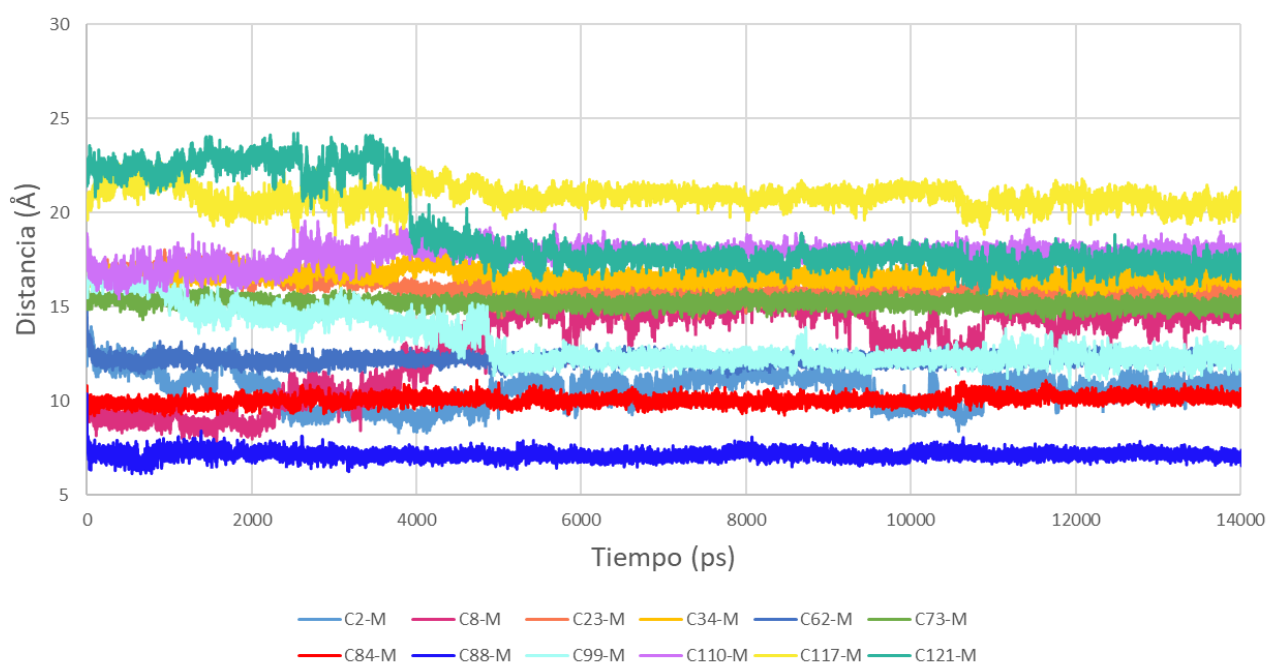


Figura B40. Gráfico de las distancias de los CH_2 de DP 11 al Dy^{3+} con acercamiento inicial de 3 Å desde dos extremos de la molécula de fructano.