
Diseño, Síntesis y Caracterización de Nanocavidades para la Construcción de Dispositivos Moleculares

Matías Ezequiel Carranza

2015



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Instituto de Investigaciones Físicoquímicas de Córdoba, INFIQC, CONICET

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Directora:

Dra. Alicia V. Veglia

Comisión Evaluadora:

Dra. María T. Baumgartner

Dra. Marcela R. Longhi

Dr. Fernando Garay

Evaluador Externo:

Dra. Liliana P. Fernández

(Universidad Nacional de San Luis)



A mis padres Lidia y Dardo, y mis hermanas...

Por su apoyo incondicional

A Verónica...

Por ser luz en mi vida

Un día salgo a la vereda muy entusiasmado a recibir un regalo. Es un precioso carruaje estacionado frente a la puerta de mi casa. Es de madera de nogal lustrada, tiene herrajes de bronce y lámparas de cerámica blanca, todo muy fino, muy elegante... Abro la portezuela de la cabina y subo. Un gran haciendo semicircular forrado en pana bordó y unos visillos de encaje blanco le dan un toque de realeza al cubículo. Me siento y me doy cuenta que todo está diseñado exclusivamente para mí, está calculado el largo de mis piernas, el ancho del asiento, la altura del techo... Todo es muy cómodo y no hay lugar para nadie más.

Miro la ventana y veo "el paisaje": de un lado el frente de mi casa, del otro el frente de la casa de mi vecino... y digo: "¡Qué bárbaro este regalo! ¡Qué bien qué lindo!" Y me quedo un rato disfrutando de esa sensación. Al rato empiezo a aburrirme; lo que se ve por la ventana es siempre lo mismo. Me pregunto: "¿Cuánto tiempo uno puede ver las mismas cosas?" Y empiezo a convencerme de que el regalo que me hicieron no sirve para nada...

De eso me ando quejando en voz alta cuando pasa mi vecino que me dice, como adivinando:

-¿No te das cuenta que a este carruaje le falta algo?

Yo pongo cara de `qué-le-falta´ mientras miro las alfombras y los tapizados.

-Le faltan los caballos -me dice antes de que llegue a preguntarle.

Por eso veo siempre lo mismo -pienso- por eso me parece aburrido.

-Cierto, -digo yo.

Entonces voy al corralón de la estación y le ato dos caballos al carruaje. Me subo otra vez y desde adentro les grito: -¡Eaaaaa!!

El paisaje se vuelve maravilloso, extraordinario, cambia permanentemente y eso me sorprende. Sin embargo, al poco tiempo empiezo a sentir cierta vibración en el carruaje y a ver el comienzo de una rajadura en uno de los laterales. Son los caballos que me conducen por caminos terribles; agarran todos los pozos, se suben a las veredas, me llevan por barrios peligrosos.

Me doy cuenta que yo no tengo ningún control de nada; los caballos me arrastran a donde ellos quieren. Al principio, ese derrotero era muy lindo, pero al final siento que es muy peligroso. Comienzo a asustarme y a darme cuenta que esto tampoco sirve.

En ese momento veo a mi vecino que pasa por ahí cerca en su auto. Lo insulto: -¡Qué me hizo!

Me grita: ¡Te falta el cochero!

-¡Ha! -digo yo.

Con gran dificultad y con *su ayuda*, sofreno los caballos y decido contratar un cochero. A los pocos días asume funciones. Es un hombre formal y circunspecto con cara de poco humor y mucho conocimiento. Me parece que ahora sí estoy preparado para disfrutar verdaderamente del regalo que me hicieron. Me subo, me acomodo, asomo la cabeza y le indico al cochero a donde ir. Él conduce, él controla la situación; él decide la velocidad adecuada y elige la mejor ruta.

Yo... yo disfruto el viaje.

La Alegoría del Carruaje

Jorge Bucay

Índice Temático

<i>Índice Temático</i>	IX
<i>Lista de Figuras</i>	XV
<i>Lista de Tablas</i>	XIX
<i>Agradecimientos</i>	XXI
<i>Prefacio</i>	XXIII

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1. Hacia la Química Supramolecular	1
1.1.2. Química Analítica	2
1.1.2.1. Química Analítica vs Análisis Químico	2
1.1.2.2. Sensores Macrocíclicos y Química Analítica Supramolecular	3
1.2. OBJETIVOS	4
1.2.1. Objetivo General	4
1.2.2. Objetivos Específicos	4
1.3. BIBLIOGRAFÍA	5

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

2.1. INTRODUCCIÓN	9
2.1.1. Química Supramolecular	9
2.1.2. Interacciones Supramoleculares	12
2.1.2.1. Interacciones iónicas y dipolares	12
2.1.2.2. Interacciones puente hidrógeno	13
2.1.2.3. Interacciones π	14
2.1.2.4. Efecto Hidrofóbico	14

2.1.3. Conceptos Básicos en Química Supramolecular.....	15
2.1.3.1. <i>Selectividad.....</i>	15
2.1.3.2. <i>Preorganización</i>	16
2.1.3.3. <i>Cooperatividad.....</i>	17
2.1.4. Receptores Macrocíclicos: Cavitando.....	17
2.1.4.1. <i>Ciclodextrinas.....</i>	17
2.1.4.2. <i>Calixarenos</i>	20
2.1.4.3. <i>Cucurbiturilos.....</i>	25
2.1.5. Efecto de receptores macrocíclicos sobre las propiedades de compuestos orgánicos.....	26
2.1.6. Propiedades de reconocimiento molecular y aplicaciones analíticas de receptores macrocíclicos.....	27
2.1.6.1. <i>Empleo de receptores macrocíclicos en procesos catalíticos</i>	28
2.1.6.2. <i>Formación de complejos ternarios.....</i>	31
2.1.6.3. <i>Aplicaciones Farmacéuticas</i>	35
2.1.6.4. <i>Aplicaciones Analíticas</i>	36
2.2. BIBLIOGRAFÍA.....	42

CAPÍTULO 3

EFFECTO DE RECEPTORES MACROCÍCLICOS SOBRE LAS PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE CARBAZOL Y QUINOLINA

3.1. INTRODUCCIÓN.....	51
3.1.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados	51
3.1.2. Técnicas Espectroscópicas.....	54
3.1.2.1. <i>Espectroscopia UV-Vis</i>	55
3.1.2.2. <i>Espectroscopia de Fluorescencia</i>	55
3.2. OBJETIVOS.....	56
3.3. SECCIÓN EXPERIMENTAL	56
3.3.1. Instrumentación	56
3.3.2. Reactivos y Procedimiento	57
3.3.2.1. <i>Reactivos</i>	57
3.3.2.2. <i>Preparación de soluciones para la determinación de espectros UV-Vis</i>	58

3.3.2.2.1.	<i>Preparación de soluciones de CZL</i>	58
3.3.2.2.2.	<i>Preparación de soluciones de QUI</i>	59
3.3.2.3.	<i>Preparación de soluciones para la determinación de espectros de fluorescencia</i>	60
3.3.2.4.	<i>Determinación de espectros de emisión de fluorescencia</i>	60
3.3.2.4.1.	<i>Método para la determinación de espectros de emisión de fluorescencia de CZL</i>	60
3.3.2.4.2.	<i>Método para la determinación de espectros de emisión de fluorescencia de QUI</i>	61
3.4.	RESULTADOS	62
3.4.1.	Estudio por espectroscopia UV-Vis	62
3.4.1.1.	<i>Estudio por espectroscopia UV-Vis de CZL, QUI y derivados p-sulfonatocalix[n]arenos</i>	62
3.4.1.2.	<i>Determinación de absortividades molares</i>	64
3.4.1.3.	<i>Efecto de receptores macrocíclicos en la absorción de CZL y QUI</i>	67
3.4.1.3.1.	<i>Efecto de ciclodextrinas</i>	67
3.4.1.3.2.	<i>Efecto de p-sulfonatcalix[n]arenos</i>	68
3.4.1.3.3.	<i>Efecto macrocíclico por UV-Vis</i>	70
3.4.1.4.	<i>Determinación de K_A por espectroscopia UV-Vis</i>	71
3.4.1.5.	<i>Relación estequiométrica de los complejos huésped-receptor por UV-Vis</i>	76
3.4.2.	Estudio por espectroscopia de fluorescencia	77
3.4.2.1.	<i>Espectros de emisión de fluorescencia de CZL y QUI</i>	77
3.4.2.2.	<i>Efecto de receptores macrocíclicos sobre la fluorescencia de CZL y QUI</i>	78
3.4.2.2.1.	<i>Efecto de ciclodextrinas</i>	79
3.4.2.2.2.	<i>Efecto de p-sulfonatocalix[n]arenos</i>	81
3.4.2.3.	<i>Determinación de K_A por espectroscopia de fluorescencia</i>	82
3.4.2.4.	<i>Relación estequiométrica de los complejos huésped-receptor por fluorescencia</i>	88
3.5.	DISCUSIÓN	90
3.5.1.	Propiedades espectroscópicas de los compuestos estudiados	90
3.5.2.	Efecto de receptores macrocíclicos sobre las propiedades espectroscópicas de CZL y QUI	92
3.5.2.1.	<i>Efecto de ciclodextrinas</i>	92
3.5.2.2.	<i>Efecto de receptores CA[6]S y CA[8]S</i>	96
3.5.3.	Mecanismo de quenching involucrado	97
3.5.4.	Valores de K_A y estequiometría de los complejos sustrato-receptor	98
3.6.	CONCLUSIONES	99
3.7.	BIBLIOGRAFÍA	100

CAPÍTULO 4

SISTEMA SUPRAMOLECULAR MIXTO FORMADO POR CARBAZOL, HP β -CD Y CA[n]S

4.1. INTRODUCCIÓN	109
4.2. OBJETIVOS	110
4.3. SECCIÓN EXPERIMENTAL	111
4.3.1. Instrumentación	111
4.3.2. Reactivos y Procedimiento	111
4.3.2.1. Reactivos	111
4.3.2.2. Preparación de soluciones de CZL en ausencia y en presencia de receptores macrocíclicos	111
4.3.2.3. Preparación de soluciones para la determinación de espectros UV-Vis y de emisión de fluorescencia	113
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	113
4.4.1. Análisis espectroscópico de un sistema de tres componentes formado por CZL y dos receptores macrocíclicos diferentes (HPβ-CD)	113
4.4.1.1. Estudio por espectroscopia UV-Vis de sistemas CZL/HPβ-CD/CA[n]S	115
4.4.1.2. Estudio por espectroscopia de fluorescencia de sistemas CZL/HPβ-CD/CA[n]S	115
4.4.1.2.1. Sistema CZL/HPβ-CD/CA[6]S	115
4.4.1.2.1i. Sistema CZL-HPβ-CD + CA[6]S	117
4.4.1.2.1ii. Sistema CZL- CA[6]S + HPβ-CD	119
4.4.1.2.2. Sistema CZL/HPβ-CD/CA[8]S	121
4.4.1.2.2i. Sistema CZL-CA[8]S + HPβ-CD	122
4.4.1.2.2ii. Sistema CZL-HPβ-CD + CA[8]S	123
4.5. CONCLUSIONES	129
4.6. BIBLIOGRAFÍA	130

CAPÍTULO 5

DETERMINACIÓN ANALÍTICA SUPRAMOLECULAR DE CARBAZOL

5.1. INTRODUCCIÓN	135
5.1.1. Determinación analítica de hidrocarburos aromáticos policíclicos	135
5.1.2. Validación de un método analítico	137
5.1.2.1. Parámetros de validación	137

5.1.2.2.	<i>Calibración y Linealidad</i>	139
5.1.2.3.	<i>Límite de detección y de cuantificación</i>	143
5.1.2.4.	<i>Selectividad e interferencia</i>	146
5.1.2.5.	<i>Precisión</i>	147
5.1.2.6.	<i>Exactitud</i>	147
5.1.2.6.1.	<i>Ensayos de recuperación</i>	148
5.2.	OBJETIVOS	149
5.3.	SECCIÓN EXPERIMENTAL	150
5.3.1.	Instrumentación	150
5.3.2.	Reactivos y procedimiento	150
5.3.2.1.	<i>Reactivos</i>	150
5.3.2.2.	<i>Procedimiento general</i>	150
5.3.2.3.	<i>Determinación de los parámetros analíticos</i>	151
5.3.2.4.	<i>Recolección de muestras de agua</i>	152
5.3.2.5.	<i>Ensayos de recuperaciones aparentes</i>	153
5.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	154
5.4.1.	Intervalo de trabajo y linealidad	154
5.4.2.	Desarrollo de un método analítico para la detección de CZL	159
5.4.2.1.	<i>Selectividad</i>	159
5.4.2.2.	<i>Ensayos de recuperaciones aparentes</i>	161
5.4.2.3.	<i>Comparación con otros métodos para la detección de CZL</i>	169
5.5.	CONCLUSIONES	171
5.6.	BIBLIOGRAFÍA	172

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

6.1.	CONCLUSIONES GENERALES	179
------	-------------------------------------	-----

APÉNDICE A

TEORÍA DE FLUORESCENCIA

A.1.	Conceptos básicos de Fluorescencia	183
A.2.	Efectos de la estructura molecular sobre la fluorescencia	188
A.3.	Efectos del medio sobre la fluorescencia	189

A.3.1.	Efecto de la temperatura	189
A.3.2.	Efecto del solvente	189
A.3.3.	Efecto de la concentración y de filtro interno	190
A.4.	Efectos debido al arreglo geométrico en la disposición de la muestra	191
A.5.	Inhibición de la Fluorescencia: Quenching.....	193
A.5.1.	Quenching Dinámico	193
A.5.2.	Quenching Estático	196
A.5.3.	Diferenciación y combinación de Quenching Dinámico y Estático.....	197
A.6.	Bibliografía.....	198

APÉNDICE B

SÍNTESIS DE CALIXARENOS

B.1.	Síntesis de Calixarenos	199
B.2.	Síntesis de derivados calixarenos sulfonados	201
B.2.1.	Procedimiento.....	201
B.2.1.a)	<i>Síntesis y purificación de p-tert-butilcalix[4]areno</i>	<i>201</i>
B.2.1.b)	<i>Síntesis y purificación de p-Hcalix[4]areno</i>	<i>201</i>
B.2.1.c)	<i>Síntesis y purificación de p-alquiloicalix[4]areno</i>	<i>202</i>
B.3.	Bibliografía.....	205

APÉNDICE C

DESARROLLO DE ECUACIONES DEL SISTEMA TERNARIO

C.1.	Desarrollo de ecuaciones del sistema ternario	206
------	---	-----

Lista de figuras

2-1. Construcción de sistemas Supramoleculares	10
2-2. Algunos receptores macrocíclicos típicos.....	11
2-3. Ejemplos de interacciones electrostáticas.....	13
2-4. Ejemplos de interacciones puente hidrógeno	13
2-5. Tipos de interacciones que involucran al sistema π	14
2-6. Representación de la formación de un complejo de inclusión	15
2-7. Dos receptores macrocíclicos con diferente grado de preorganización.....	16
2-8. Estructura de ciclodextrinas (CDs).....	19
2-9. Equilibrios de inclusión de un grupo lateral triptófano en un derivado β -CD.....	20
2-10. Estructura de calix[n]arenos (CA[n]S).....	21
2-11. Los cuatro conformeros del calix[4]areno	22
2-12. Estructura de cucurbit[n]urilos (CB[n]).....	25
2-13. Principio de catálisis organometálica en medio bifásico acuoso:orgánico mediada por receptores ciclodextrinas.....	29
2-14. Principio de catálisis supramolecular	30
2-15. Reacción de Suzuki-Miyaura en presencia de CDs y CA[n]S.....	31
2-16. Ejemplos de cooperación y competencia en la formación de complejos sustrato-receptor	32
2-17. Sistemas de equilibrios múltiples direccionado hacia la formación de un complejo ternario	33
2-18. Equilibrios en etapas para la formación para la formación de un complejo ternario β -CD-Dihexilamina-CB[6] (β -CD-DHA-CB[6]).....	34
2-19. Estructura probable del complejo ternario β -CD-DHA-CB[6]	35
2-20. Nanoesponjas de ciclodextrinas carbonatadas y carboxiladas.....	36
2-21. Estructura molecular de la nanoesponja de ciclodextrinas carbonatadas.....	37
2-22. Representación de ciclodextrinas involucradas en la detección de una sal biliar .	38
2-23. Método de detección fluorescente por reacción de desplazamiento.....	40

3-1. Carbazol (CZL) y Quinolina (QUI) y algunos compuestos naturales que poseen en su estructura tales núcleos	52
3-2. Espectros UV-Vis de CZL y QUI	63
3-3. Espectros UV-Vis de CA[n]S a dos valores de pH diferentes	63
3-4. Absorción de luz. Ley de Lambert-Beer	64
3-5. Cusrvas de calibración por UV-Vis de CZL y QUI	65
3-6. Espectros de absorción UV-Vis de CZL en presencia de una ciclodextrina	67
3-7. Espectros de absorción UV-Vis de CZL en presencia del receptor CA[6]S	69
3-8. Espectros de absorción UV-Vis de QUI en presencia del receptor CA[6]S	69
3-9. Efecto del monómero y efecto macrocíclico por espectroscopia UV-Vis	70
3-10. Efecto de CDs en la absorbancia de CZL y QUI	75
3-11. Gráfico de doble recíproca con medidas de absorbancia para confirmación de estequiometría 1:1	76
3-12. Espectros de emisión de fluorescencia de CZL y QUI a dos valores de pH	77
3-13. Espectros UV-Vis y espectros de emisión de fluorescencia de CZL y QUI	78
3-14. Espectros de emisión de fluorescencia de CZL y QUI en presencia de cantidades crecientes de un receptor CD	79
3-15. Estudio del efecto del monómero y macrocíclico por emisión de fluorescencia de CZL y QUI	80
3-16. Espectros de emisión de fluorescencia de CZL, QUI y QUIH⁺ en ausencia y en presencia de CA[n]S	82
3-17. Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia de CZL en función de la concentración de CDs	86
3-18. Ajustes del modelo de Stern-Volmer y variación de la señal de fluorescencia de CZL y QUI en presencia de receptores macrocíclicos	87
3-19. Gráfico de doble recíproca con medidas espectrofluorimétricas para confirmación de estequiometría 1:1 del complejo CZL-HPβ-CD	89
3-20. Posibles disposiciones de CZL en los complejos con α-CD y β-CD	95
3-21. Equilibrio de formación del complejo no fluorescente QUI-R	99

4-1. Esquema del procedimiento experimental de preparación de muestras del sistema ternario CZL/HPβ-CD/CA[n]S	112
4-2. Equilibrios que pueden darse en un sistema de tres componentes CZL/HPβ-CD/CA[n]S.....	114
4-3. Valores de fluorescencia del sistema CZL/HPβ-CD/CA[6]S al variar la concentración de uno de los receptores macrocíclicos.....	116
4-4. Equilibrios en el sistema ternario CZL/CA[6]S/HPβ-CD	120
4-5. Valores de fluorescencia del sistema mixto CZL/HPβ-CD/CA[8]S al variar la concentración de uno de los receptores macrocíclicos	121
4-6. Estructura hipotética de un complejo ternario formado por CZL, HPβ-CD y CA[8]S	128
5-1. Definición de intervalo dinámico e intervalo lineal	138
5-2. Residuales de y de una regresión lineal.....	141
5-3. Diferentes distribuciones para las desviaciones de los residuales de la regresión	143
5-4. Prueba de significación empleada para estimar el límite de detección.....	145
5-5. Zonas de recolección de muestras de agua de río Tercero (Calamuchita).....	153
5-6. Curvas de calibración de CZL en presencia de CDs	155
5-7. Gráficos de residuales en función de la concentración de CZL en ausencia y en presencia de CDs.....	156
A-1. Diagrama de Perrin-Jablonski. Posiciones relativas de los espectros de absorción, fluorescencia y fosforescencia	184
A-2. Representación esquemática de la formación de una especie en estado localmente excitado (LE) su pasaje a un estado de transferencia intramolecular de carga (ICT). Espectro de fluorescencia dual formado por la emisión desde los estados LE e ICT	186
A-3. Posibles procesos que puede llevar a cabo una molécula excitada para liberar el exceso de energía	187
A-4. Posibles procesos que puede llevar a cabo una molécula excitada para liberar el exceso de energía	192
A-5. Empleo de la orientación de la rendija para cambiar el volumen desde el que se mide la fluorescencia	192

A-6. Esquema de diferentes tipos de quenching experimentados por un fluoróforo S ..	194
B-1. Vías de síntesis para la obtención de calixarenos.....	200
B-2. Vías de síntesis para la obtención de calixarenos.....	203
B-3. Espectro Infrarrojo del derivado propilado de CA[4]S	204

Lista de tablas

2-1. Resumen de las interacciones supramoleculares	12
2-2. Log K_A de cationes del grupo I y los receptores 18-crown-6 y CA[6]S.....	16
2-3. Propiedades fisicoquímicas de CDs nativas	18
2-4. Comparación de propiedades de CA[n]S y CDs.....	23
2-5. Valores de pKa para ácidos de diferentes derivados CA[n]S.....	24
3-1. Punto de fusión de los compuestos empleados.....	57
3-2. Coeficientes de absorptividad molar a longitudes de onda de máxima absorción para CZL y QUI.....	66
3-3. Coeficientes de absorptividad molar a longitudes de onda de máxima absorción para los derivados CA[n]S empleados	66
3-4. Cambios en el espectro UV-Vis de CZL y QUI en presencia de receptores CDs	68
3-5. Constantes de asociación obtenidas por UV-Vis de complejos de CZL y QUI con algunas CDs.....	75
3-6. Valores de las constantes de asociación entre CZL y derivados β -CD y de algunas relaciones de rendimientos cuánticos de fluorescencia	88
4-1. Concentración porcentual de especies en el equilibrio para el sistema CZL-HP β -CD + CA[6]S.....	119
4-2. Concentración porcentual de especies en el equilibrio para el sistema CZL-CA[8]S + HP β -CD	122
4-3. Concentración porcentual de especies en el equilibrio para el sistema CZL-HP β -CD + CA[8]S.....	124
4-4. Concentración porcentual de especies en el equilibrio para el sistema CZL-HP β -CD + CA[8]S, considerando formación de un complejo ternario (CT)	128
5-1. Análisis de la varianza en las regresiones lineales obtenidas con CDs.....	157
5-2. Límites de confianza de las sensibilidades de calibración.....	157

5-3. Parámetros analíticos de validación.....	158
5-4. Interferencia de QUI en la determinación de CZL	160
5-5. Evaluación del incremento en la fuerza iónica del medio	161
5-6. Evaluación de la variación del % del buffer fosfato pH = 6,994	161
5-7. Sensibilidad de calibración en 10,0 % v/v de matriz (agua corriente de red) con diferentes tratamientos de las muestras	162
5-8. Sensibilidades de calibración para cada nivel de matriz y recuperación porcentual promedio de los tres niveles de matriz empleados.....	163
5-9. Recuperaciones porcentuales determinadas para CZL en agua corriente	164
5-10. Recuperaciones porcentuales determinadas para CZL en agua de tanque	165
5-11. Recuperaciones porcentuales determinadas para CZL en agua del río Tercero en el pto. 1 (ver figura 5-5).....	166
5-12. Recuperaciones porcentuales determinadas para CZL en agua del río Tercero en el pto. 2 (ver figura 5-5).....	167
5-13. Parámetros determinados para establecer la exactitud del método analítico para la detección de CZL en matrices de agua	169
5-14. Límites de detección de CZL obtenidos por diferentes métodos.....	170
A-1. Desviación de la linealidad en la relación entre F y [S] para varias A	191
B-1. Rendimientos obtenidos en cada una de las etapas del esquema sintético de la figura B-2	204

Agradecimientos

Llego el final de una etapa importante en mi vida, donde he conocido a personas muy significativas y a las que quisiera agradecer en estas líneas.

Por su apoyo, seguimiento y constancia agradezco a mi directora de tesis, la Dra. Alicia V. Veglia, para mí sencillamente Alicia. Siempre voy a llevar en mi corazón todo el esfuerzo y dedicación que puso en mi trabajo y el aporte que me brindó. Además de darme la oportunidad de realizar mi doctorado en su línea de investigación. También les doy las gracias al tribunal de tesis, quienes en su mayoría, estuvieron siempre predispuestos al consejo para mejorar este trabajo.

Agradezco a Dios por mis compañeros de laboratorio: Santiago, Guadalupe, Eugenia, Hugo, Natalia, quienes fueron en este tiempo una gran compañía, compartiendo el trabajo y hermosos momentos de esparcimiento. Ellos contribuyeron a mi crecimiento tanto académico como humano. Gracias chicos!

No quisiera dejar de mencionar y agradecer a una persona que me ayudo en mi formación, desde antes de comenzar mi carrera doctoral, a Guillermo Bracamonte quien me apporto principios de docencia y consejos muy valederos.

Agradezco también a la colectividad de Colombia en el Dpto. de Química Orgánica por la inquebrantable alegría que transmiten. En especial a Diana, Catalina, John, Patricia y Liliana. Que de manera transparente han compartido, con su forma de ser, divertidos momentos de charlas. Aprovecho aquí, para agradecer a Noel su compañía, los mates y las charlas en la biblioteca durante la escritura de esta tesis.

A mis amigos queridos Ángel, Enrique, Rodolfo y Teo por todo lo vivido, sus enseñanzas y alegrías compartidas fuera de la facultad. Gracias Verónica por acompañarme en mis locuras, mis penas, mis glorias, mis debilidades y mis fortalezas, con mucho amor. Muy agradecido estoy también de la comunidad Misioneros de Cristo en donde compartí tantos momentos que llenaron mi ser plenamente.

Gracias de nuevo, por todo esto a Dios.

Matías E. Carranza

Prefacio

Este trabajo de tesis doctoral implica el desarrollo y mejoramiento de métodos analíticos con detección fluorescente dentro del campo de la química supramolecular analítica en base a estudios espectroscópicos. Este tópico surge como necesidad de proponer metodologías alternativas cada vez más rápidas y sensibles en la detección de contaminantes en muestras reales.

La contaminación que comienza desde el suelo y llega a napas de agua subterráneas, debido al uso de agroquímicos, combustibles y derivados del petróleo, es preocupante y, en consecuencia, hay que reaccionar y contribuir ante esta problemática. Es por esto se eligió estudiar sistemas supramoleculares que actúen como dispositivos sensores de compuestos aromáticos heterocíclicos nitrogenados.

Esta tesis está organizada con un índice temático general, listas de figuras y de tablas, seis capítulos y tres apéndices que extienden algunos temas teóricos y el desarrollo de ecuaciones.

El capítulo 1 comienza con una breve introducción sobre la química supramolecular y su influencia en la química analítica mediante el empleo de receptores macrocíclicos. Luego, en base a lo descrito se enuncian los objetivos generales y específicos propuestos en este trabajo de tesis.

El capítulo 2 trata sobre conceptos fundamentales dentro de la química supramolecular, tales como las interacciones que conducen a la formación de supramoléculas y los requerimientos de complementariedad estructural y electrónica que deben existir para su existencia. Se describen las características estructurales y propiedades fisicoquímicas de algunos de los receptores macrocíclicos más estudiados en la actualidad. Además, en base a los antecedentes bibliográficos se brindan ejemplos de aplicaciones de receptores macrocíclicos en diversas áreas de estudio.

En los capítulos 3, 4 y 5 se presentan y se discuten los resultados experimentales obtenidos en este trabajo. En cada uno de estos capítulos se plantea: una introducción referente al tema específico que se va a tratar; una sección experimental en donde se describen los materiales, las técnicas y procedimientos que se emplearon; luego los resultados y su discusión; por último, conclusiones específicas del capítulo en cuestión seguida de la bibliografía (que se hace referencia en el texto con superíndices numéricos), la cual amplia y respalda los temas tratados.

El capítulo 3 presenta el estudio del efecto de receptores macrocíclicos sobre las propiedades espectroscópicas de dos moléculas representativas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados: el carbazol y la quinolina. Se analizan a partir de las espectroscopias UV-Visible y de fluorescencia, las posibles interacciones y estructuras de los complejos formados.

El capítulo 4 describe un estudio espectroscópico de dos sistemas mixtos de tres componentes, formado por dos receptores macrocíclicos diferentes y carbazol como sustrato orgánico. Con los resultados de mediciones de la emisión de fluorescencia del sistema y considerando equilibrios de formación de complejos de diferente composición, se llega a explicar la existencia de un complejo supramolecular ternario.

El capítulo 5 muestra el desarrollo de una metodología analítica supramolecular en donde se utiliza como sensor químico el receptor macrocíclico hidroxipropil- β -CD. Se describe el proceso de validación necesario para asegurar que el método es confiable en la detección de carbazol.

El capítulo 6 resume las conclusiones generales obtenidas en esta tesis doctoral.

Se sugiere, para una mejor comprensión de este trabajo, consultar el apéndice A sobre conceptos básicos de fluorescencia. Además consultar la listas de figuras y de tablas.

CAPÍTULO 1

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Hacia la Química Supramolecular

El área de la *química supramolecular* abarca la síntesis, caracterización y estudio de la funcionalidad de ensamblajes moleculares constituidos por la asociación no covalente de dos o más unidades moleculares.^{1,2} La química supramolecular es un área multidisciplinaria que ha surgido en medio de muchas otras disciplinas. Por ejemplo: son fundamentales los conocimientos desarrollados desde la química orgánica e inorgánica para la síntesis de las moléculas constructoras; la química física sirve de soporte para comprender propiedades de sistemas supramoleculares; los modelos matemáticos permiten predecir su comportamiento; de la biología surge la inspiración y el conocimiento para el desarrollo de sistemas supramoleculares artificiales capaces de imitar el funcionamiento de biosistemas; etc.³

En los últimos años, muchos grupos de investigación de todo el mundo han demostrado que la química supramolecular puede desempeñar un importante rol en el ámbito de la química analítica.⁴ Este campo involucra aplicaciones en química analítica de estructuras orgánicas e inorgánicas que se someten al reconocimiento molecular y el auto-ensamblaje. En este contexto de ideas nace la *química analítica supramolecular* (QAS). El empleo de sistemas organizados supramoleculares presenta varias ventajas, como el incremento de la selectividad y de la sensibilidad.^{5,6} Por lo que el desarrollo de estos sistemas se encuentra en pleno auge, presagiando un futuro prometedor para la QAS.

El estudio de la QAS involucra, en gran medida, el uso de receptores sintéticos.⁷ Es de interés en química analítica el uso de receptores solubles en medios acuosos, para

aplicaciones en ciencias del medio ambiente y de la vida.⁸ Los receptores macrocíclicos como los éteres corona, ciclodextrinas, calixarenos y cucurbiturilos han sido ampliamente estudiados en el ámbito de la química supramolecular para formar complejos del tipo huésped-receptor con múltiples aplicaciones analíticas.^{9,10,11} Para que un receptor actúe como un *sensor químico* es necesario que cuente con funcionalidades que reconozcan la estructura del analito de interés y, por medio de esta interacción, se produzca un cambio detectable en una señal analítica.

Las técnicas luminiscentes estáticas (fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia) y las resueltas en el tiempo (cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia, etc.), se han aplicado en combinación con sistemas supramoleculares, para determinar y estudiar compuestos orgánicos de interés en diversas disciplinas, como la agroquímica, biología, química ambiental, de alimentos y farmacéutica, entre otras áreas.^{6,11,12}

1.1.2. Química Analítica

1.1.2.1. Química Analítica vs Análisis Químico

Como primera aproximación a la comprensión de esta gran área dentro de la química, esta disciplina se responsabiliza de la caracterización de la materia de una forma cualitativa (qué está presente) y cuantitativa (cuánto está presente).¹³

La química analítica no se ocupa solamente de la realización de un análisis diario de una muestra de rutina, es decir del análisis químico propiamente dicho. Más bien la química analítica va más allá, busca mejorar los métodos establecidos, extender la aplicabilidad de los métodos ya existentes y desarrollar nuevas metodologías para medir fenómenos químicos. El desafío de desarrollar y validar un método analítico para proporcionar cierta información de un sistema es el trabajo del químico analítico. Una vez desarrollada la técnica se convierte en el trabajo de medición rutinaria del analista químico.

Una descripción más apropiada de la definición de química analítica es “*la ciencia de investigar y aplicar los conceptos, principios y estrategias para medir las características de especies y sistemas químicos*”.¹⁴ A lo largo de su historia la química analítica ha proporcionado muchas herramientas y métodos necesarios para la investigación

multidisciplinaria en diversos campos, por ejemplo, medicina, química clínica, toxicología, química forense, ciencia de los materiales, geoquímica y química ambiental.¹³

1.1.2.2. Sensores Macrocíclicos y Química Analítica Supramolecular.

Los receptores macrocíclicos como ciclodextrinas (CD) y calixarenos (CA) pueden asociarse con diversas moléculas orgánicas y formar complejos huésped-receptor. Estos sistemas supramoleculares han sido utilizados con diferentes funciones tales como: transporte molecular, catálisis de reacciones, reconocimiento molecular, empleo en metodologías analíticas como sensores químicos, etc.¹⁵ Una contribución cooperativa de interacciones no covalentes es responsable de la formación de estos complejos, y el factor principal que dirige el reconocimiento molecular es la relación forma-tamaño entre el receptor y el sustrato interactuante y la complementariedad electrónica entre los grupos presentes en ambas estructuras moleculares.

En la actualidad una parte de la química supramolecular se ha focalizado en el estudio y uso de receptores sintéticos en aplicaciones analíticas. Estas estructuras receptoras tienen cada vez más aplicaciones dentro del campo de la QAS, término ya definido que se emplea para describir procesos en donde ensamblados moleculares experimentan cambios que llevan a modular la señal analítica del sustrato a determinar.⁴ De esta manera, los receptores macrocíclicos pueden actuar como sensores químicos supramoleculares interactuando de forma no covalente con los analitos sensados. A esta clase de sensores moleculares se los puede considerar como un tipo de *dispositivos moleculares*, término que hace referencia a un ensamblado supramolecular que cumple una función determinada, por ejemplo, el incremento en la detección espectroscópica con fines analíticos.

Un campo de gran interés para la investigación en QAS lo constituyen los sensores químicos. La palabra sensor dentro de este contexto, es *“un receptor que interactúa en forma no covalente con un analito produciendo un cambio detectable en una señal analítica”*.⁴

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue estudiar mediante técnicas espectroscópicas complejos del tipo sustrato-receptor con el fin de caracterizar los sistemas supramoleculares e implementar su funcionalidad como sensores químicos para el desarrollo de métodos analíticos.

1.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Adquirir experiencia en metodologías sintéticas de receptores calixarenos y realizar la síntesis de derivados *p*-sulfonatocalix[4]arenos alquilados.
- ✓ Estudiar la influencia de macrociclos ciclodextrinas y calixarenos sobre el comportamiento espectroscópico de heterociclos nitrogenados.
- ✓ Evaluar los tipos de interacción que se establecen en la asociación de los componentes moleculares para formar los distintos complejos sustrato-receptor.
- ✓ Estudiar sistemas mixtos con la finalidad de evaluar el mecanismo de la asociación y su posible empleo con un fin analítico.
- ✓ Proponer un método analítico supramolecular para la detección de hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados.
- ✓ Validar el método propuesto mediante la determinación de parámetros analíticos y la aplicación del mismo en muestras reales.

1.3. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. M. Lehn. *"Perspectives in Supramolecular Chemistry-From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-Organization"*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 29 (1990) 1304 – 1319.
- [2] J. W. Steed, J. L. Atwood. *"Supramolecular chemistry"*. 2^{da} Ed. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester (2009).
- [3] J. W. Steed, D. R. Turner, K. J. Wallece. *"Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry"*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, England (2007).
- [4] E. V. Anslyn. *"Supramolecular Analytical Chemistry"*. J. Org. Chem., 72 (2007) 687 – 699.
- [5] J. J. Lavigne, E. V. Anslyn. *"Sensing a paradigm shift in the field of molecular recognition: From selective to differential receptors"*. Angew. Chem. Int. Ed., 40 (2001) 3118 – 3130.
- [6] J. J. Santana Rodríguez, R. Halko, J. R. BetancortRodríguez, J. J. Aaron. *"Environmental analysis based on luminescence in organized supramolecular systems"*. Anal. Bioanal. Chem., 385 (2006) 525 – 545.
- [7] T. Schrader, A. Hamilton. *"Functional Synthetic Receptors"*. John Wiley & Sons: New York, (2005).
- [8] R. N. Dsouza, U. Pischel, and W. M. Nau. *"Fluorescent Dyes and Their Supramolecular Host/Guest Complexes with Macrocycles in Aqueous Solution"*. Chem. Rev., 111 (2011) 7941 – 7980.
- [9] G. Zhang, D. Gao, J. Chao, S. Shuang, C. Dong. *"The interaction of C.I. Basic Red 5 with complementary negatively charged hosts: 4-Sulfonatocalix[4]arene and carboxymethyl- β -cyclodextrin"*. Dyes Pigm., 82 (2009) 40 – 46.
- [10] H. Jiang, L. Tongxin, H. Zhide. *"The fluorescence study of the inclusion coordinated compound of β -cyclodextrin and p-hydroxyphenolacetamide and its analytical applications"*. Spectrochim. Acta, Part A, 58 (2002) 2659 – 2668.
- [11] X. P. Ding, D. B. Tang, T. Li, S. F. Wang, Y. Y. Zhou. *"A novel spectrofluorometric method for the determination of methiocarb using an amphiphilic p-sulfonatocalix[4]arene"*. Spectrochim. Acta, Part A, 81 (2011) 44 – 47.
- [12] L. Pu. *"Fluorescence of Organic Molecules in Chiral Recognition"*. Chem. Rev., 104 (2004) 16 – 1716.
-

[13] D. Harvey. *“Modern Analytical Chemistry”*. McGraw-Hill Higher Companies, Inc. USA (2000).

[14] R. W. Murray. *“Analytical Chemistry: the science of chemical measurement”*. Anal. Chem., 63 (1991) 271A.

[15] H. J. Scheneider, A. Yatsimirsky. *“Principles and Methods in Supramolecular Chemistry”*. John Wiley & Sons Ltd., England (2000)

CAPÍTULO 2

CAPITULO 2

INTRODUCCIÓN TEMÁTICA

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1. Química Supramolecular

La *química supramolecular* involucra un campo de estudio interdisciplinario que analiza las organizaciones de especies químicas unidas fundamentalmente por fuerzas no covalentes, formando así una *supramolécula* o *supermolécula*. Las subunidades moleculares que forman la supramolécula deben experimentar un *reconocimiento molecular* que implica cierta selectividad en la unión. Para esto, las moléculas que forman parte de la estructura supramolecular deben tener cierta *complementariedad* tanto estructural como electrónica.¹

Las interacciones que se establecen en una especie supramolecular son, por ejemplo, del tipo electrostático (ión-ión, ión-dipolo, dipolo-dipolo, ión- π), interacciones hidrofóbicas, enlaces puente hidrógeno, π - π stacking, y Van der Waals.² A diferencia del enlace covalente, estas interacciones son más débiles y usualmente reversibles. Su naturaleza dinámica las hace partícipes de muchos procesos biológicos como el reconocimiento celular, el ensamble de proteínas complejas, la formación de complejos antígeno-anticuerpo, la catálisis enzimática altamente selectiva, el reconocimiento de pares de bases complementarias que conduce a la formación de la doble hélice auto-ensamblada en el ADN, etc.²⁻⁴

La química supramolecular puede dividirse en dos grandes categorías, según la característica estructural de las especies estudiadas: la *química sustrato-receptor* y la química de los *auto-ensamblados* (en inglés se refiere a *host-guest chemistry* y *self-assembly*, respectivamente).¹ La química sustrato-receptor se basa en la interacción de una molécula o receptor con otra especie más pequeña (sustrato). En esta categoría se

encuentran los complejos sustrato-receptor o huésped-anfitrión, constituidos por una molécula receptora, que presenta *sitios de unión* que convergen en el complejo, y un sustrato cuyos grupos de unión divergen hacia el receptor en la entidad supramolecular.¹ Por otra parte, en los auto-ensamblados, no se distingue un receptor y un sustrato con grupos convergentes y divergentes, sino que existe una asociación espontánea y reversible de dos o más moléculas complementarias para producir un agregado termodinámicamente estable.¹ En la figura 2-1 se muestra una representación simbólica de estos tipos de estructuras supramoleculares.

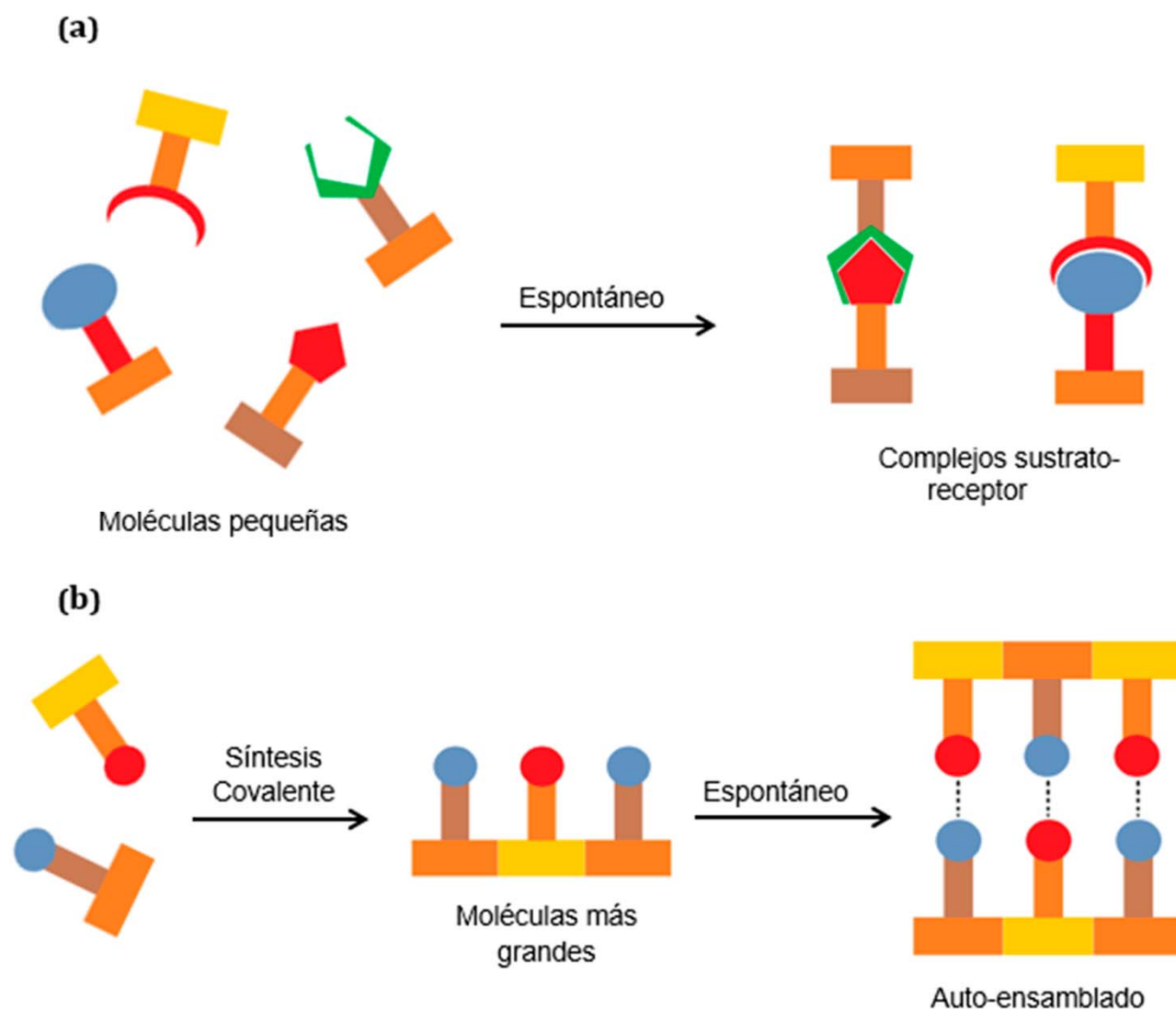


Figura 2-1. Construcción de sistemas supramoleculares (a) complejo sustrato-receptor y (b) auto-ensamblado entre moléculas complementarias.

Uno de los principales intereses de la química supramolecular es mimetizar interacciones no covalentes y fenómenos de reconocimiento molecular en sistemas vivos. La idea principal, en este marco, es diseñar un receptor artificial (R) capaz de reconocer a moléculas de sustrato (S), para formar una supramolécula de estructura y función bien definida a través de interacciones no covalentes. Desde el descubrimiento, por Pederson en 1967, de los éteres corona y su habilidad para unir iones metálicos, la química de los complejos sustrato-receptor ha evolucionado enormemente y contribuido a la aparición de diversos tipos de receptores supramoleculares, como por ejemplo, éteres corona, ciclodextrinas, calixarenos, resorcarenos, cucurbiturilos, dendrímeros, entre otros.⁵ En la figura 2-2 se muestran las estructuras cíclicas de algunos tipos de receptores macrocíclicos.

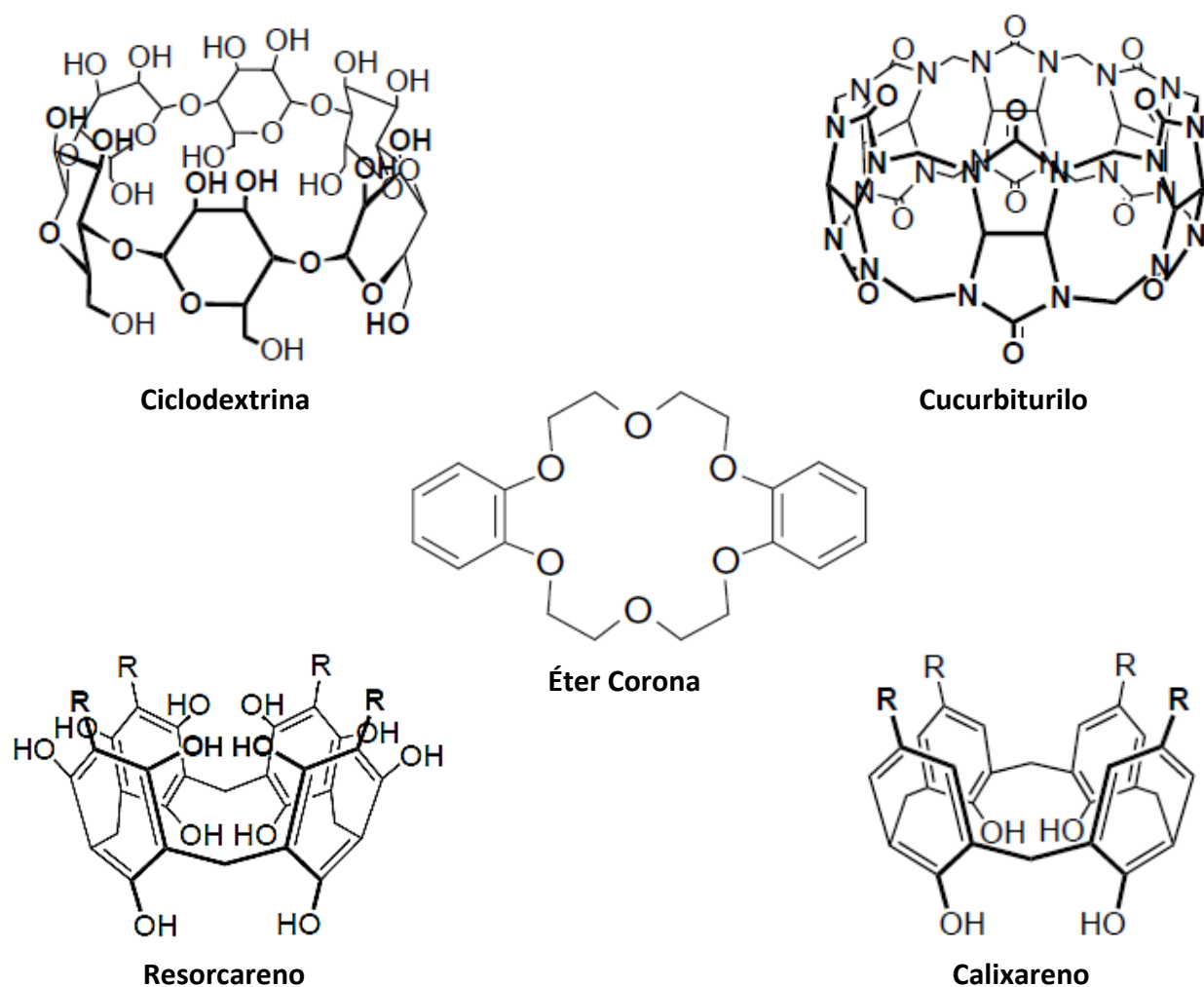


Figura 2-2. Algunos receptores macrocíclicos típicos.

2.1.2. Interacciones Supramoleculares

Como ya se ha mencionado las subunidades moleculares que forman una supramolécula se mantienen unidas por fuerzas de naturaleza no covalente. El término no covalente incluye una amplia variedad de atracciones y repulsiones que se resumen en la tabla 2-1.¹ Algunas de las interacciones no covalentes que más interesan quizás para entender algunos de los resultados obtenidos en esta tesis se detallan en las siguientes subsecciones.

2.1.2.1. Interacciones iónicas y dipolares

Estas interacciones se dividen en tres categorías: ión-ión, ión-dipolo y dipolo-dipolo. Estas clases de interacciones se basan en la atracción coulombica entre cargas opuestas próximas entre sí. Las interacciones ión-ión son las más fuertes de las tres (ver tabla 2-1) y son no direccionales, es decir que las especies interactuantes pueden estar situadas en cualquier dirección. En cambio, tanto las interacciones ión-dipolo como las dipolo-dipolo, requieren de cierta orientación entre las entidades para establecerse óptimamente (figura 2-3).¹

Tabla 2-1. Resumen de las interacciones supramoleculares.^a

Interacción	Fuerza de enlace (kJmol^{-1})	Ejemplo
ión-ión	200 – 300	En cloruro de tetrabutilamonio
ión-dipolo	50 – 200	Na^+ y 15-Crown-5
Dipolo-dipolo	5 – 50	Acetona
Enlace de H	4 – 120	Entre guanina y citosina
Catión-π	5 – 80	K^+ en benceno
π-π	0 – 50	Benceno y grafito
Van der Waals	< 5 KJ.mol^{-1} pero variable en función de la superficie	Argón; empaquetamiento en cristales moleculares
Efecto Hidrofóbico	Relacionado con la energía de interacción solvente-solvente	Complejos de inclusión con ciclodextrinas

^(a) Ref. 1

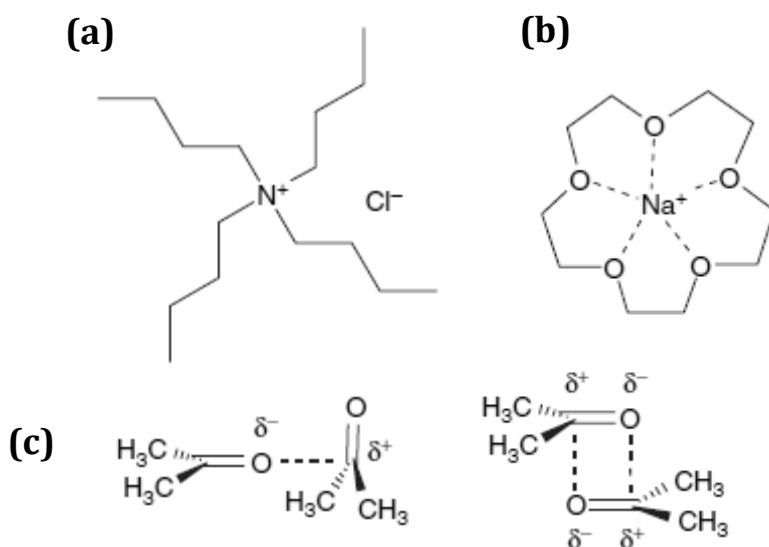


Figura 2-3. Ejemplos de Interacciones electrostáticas (a) interacción ión-ión entre tetrabutilamonio y cloruro, (b) interacción ión-dipolo entre sodio y el éter corona 15-crown-5 y (c) interacciones dipolo-dipolo en acetona.¹

2.1.2.2. Interacciones puente hidrógeno

El enlace de hidrógeno (H) es posiblemente la interacción no covalente más importante en el diseño de estructuras supramoleculares, debido a su fuerza y alto grado de direccionalidad. Esta clase de interacción representa un tipo especial de fuerza dipolo-dipolo entre un donador de H (D) y un aceptor de H (A).¹ En la figura 2-4 se muestra un ejemplo de enlace de hidrógeno, que se establece entre las bases nitrogenadas guanina y citosina componentes de la doble hélice del ADN.

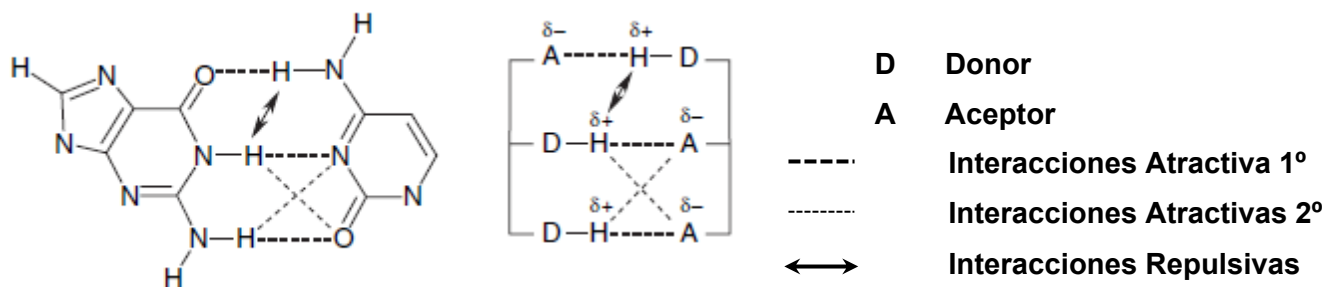


Figura 2-4. Ejemplos de Interacciones puente hidrogeno (a) entre guanina y citosina pares de base del ADN, (b) representación esquemática.¹

2.1.2.3. Interacciones π

Hay dos tipos de interacciones π que se pueden encontrar: catión- π y π - π . Las primeras se dan entre cationes y sistemas de enlace dobles; por ejemplo, la interacción entre K^+ y benceno, como se muestra en la figura 2-5a. Las segundas, surgen de la atracción entre la nube electrónica π de un sistema conjugado y el fragmento σ cargado positivamente de una molécula cercana (figura 2-5b).¹

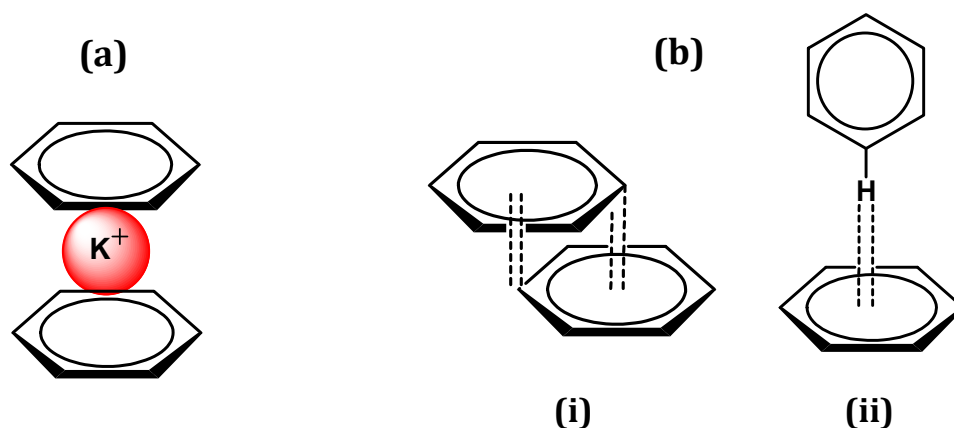


Figura 2-5. Tipos de interacción que involucran al sistema π : (a) interacción catión- π entre K^+ y benceno, (b) interacción π - π (i) cara-cara y (ii) borde-cara.¹

2.1.2.4. Efecto Hidrofóbico

El efecto hidrofóbico surge de la exclusión de especies no polares desde un medio acuoso. Esto es favorecido por la interacción entre moléculas de agua o del agua con otras moléculas polares afines. Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en química supramolecular; por ejemplo en la asociación de un sustrato orgánico (poco polar) con calixarenos y ciclodextrinas en medio acuoso.¹ En la figura 2-6 se representa tal efecto en la asociación entre un sustrato y una ciclodextrina. En solución acuosa, la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina está ocupada por algunas moléculas de agua (interacción polar-apolar poco favorable), éstas pueden ser sustituidas por sustratos orgánicos menos polares.^{6,7}

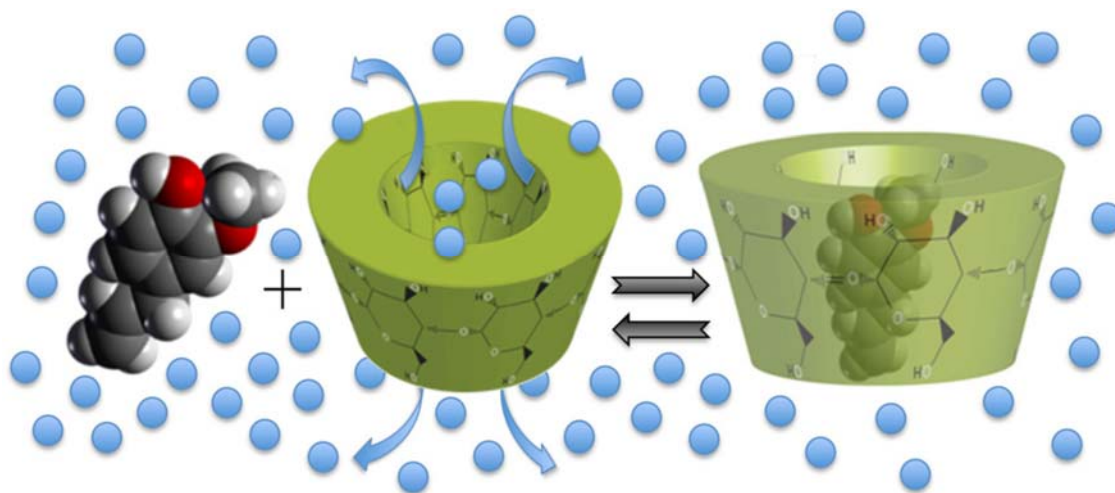


Figura 2-6. Representación de la formación de un complejo de inclusión. Se aprecia el efecto hidrofóbico por el desalojo de moléculas de agua del interior de la cavidad de la CD.⁷

2.1.3. Conceptos Básicos en Química Supramolecular

Para poder entender la acción de biomoléculas, la funcionalidad de una especie supramolecular (por ejemplo como sensor químico, transportador molecular, catalizador, etc.), es necesario tener en cuenta nociones sobre el reconocimiento molecular entre especies químicas.

La comprensión de los factores que influyen en el reconocimiento molecular es importante para la elección de moléculas pequeñas que se utilizan como bloques para la formación de supramoléculas. En el contexto de esta tesis se hará especial énfasis hacia complejos del tipo sustrato-receptor.

2.1.3.1. Selectividad

Cuando un receptor se asocia con un sustrato orgánico particular o tiene preferencia por una familia de compuestos, se dice que es selectivo hacia esas especies. Para que se puedan formar interacciones del tipo sustrato-receptor, las moléculas interactuantes deben poseer sitios de unión que se complementen tanto espacialmente (forma y tamaño) como químicamente.¹ Por ejemplo, si el receptor presenta grupos donantes de enlace de hidrógeno (como grupos amino primarios y secundarios, hidroxilos, etc.), el sustrato deberá tener en su estructura sitios aceptores de hidrógeno (como grupos carboxilato, fenolato, halógenos, etc.). Alternativamente, si el receptor presenta sitios ácidos de Lewis

entonces la molécula orgánica deberá poseer sitios que sean bases de Lewis para que se establezcan interacciones favorables.¹

2.1.3.2. Preorganización

Un receptor que presente múltiples sitios de interacción con una geometría bien definida se unirá más fuertemente, a un ion o molécula complementaria, que un receptor con grupos de unión en una estructura más flexible. El hecho de que los sitios de unión estén ubicados en una estructura macrocíclica hace que se requiera un menor cambio conformacional de la estructura, por lo que el complejo resultante se ve favorecido termodinámicamente. Este incremento en la estabilidad de las supramoléculas que se forman recibe el nombre de *efecto macrocíclico*. En la figura 2-7 se comparan las estructuras de dos receptores macrocíclicos diferentes y en la tabla 2-2 la fuerza de asociación (representada como con el logaritmo de la constante de asociación K_A) con iones metálicos.

Figura 2-7. Dos receptores macrocíclicos con diferente grado de preorganización. **(i)** el éter corona 18-crown-6 y **(ii)** el *p*-sulfonatocalix[6]areno (CA[6]S).¹

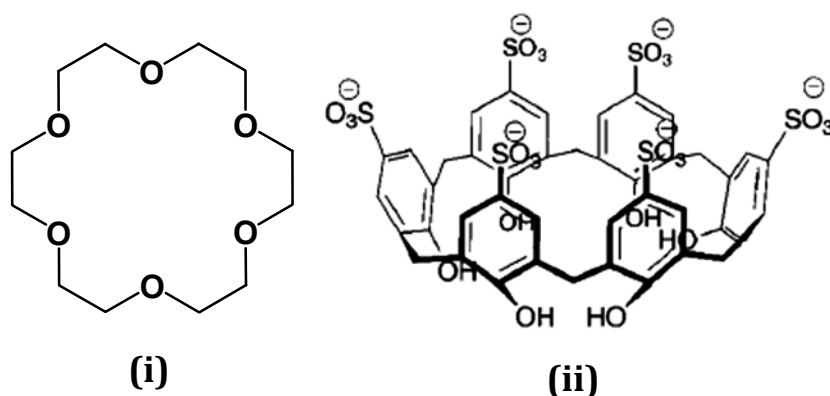


Tabla 2-2. Log K_A de cationes del grupo I y los receptores 18-crown-6 y *p*-sulfonatocalix[6]areno.^a

Ion	Log K_A	
	18-crown-6	CA[6]S
Na ⁺	0,80	2,72
K ⁺	2,03	2,55
Rb ⁺	1,56	2,29
Cs ⁺	0,99	2,64

^(a) Ref. 8

2.1.3.3. Cooperatividad

La cooperatividad surge del reconocimiento molecular de un receptor, con más de un sitio de unión, con un sustrato. La cooperatividad hace referencia a la influencia que tiene la unión de un sitio de interacción α en la asociación de un segundo sitio β . La cooperatividad puede ser positiva, cuando la interacción de un grupo favorece la asociación del otro, y negativo si la primera unión disminuye la fuerza de asociación de un segundo grupo.

El efecto cooperativo puede darse en sistemas de más de dos componentes (por ejemplo, un receptor con dos sustratos orgánicos, o dos receptores con una molécula orgánica).

2.1.4. Receptores Macrocíclicos: Cavitandos

En este trabajo de tesis se emplearon receptores macrocíclicos del tipo cavitando, como son las ciclodextrinas y los calixarenos. Estos receptores poseen como característica común una cavidad hidrofóbica capaz de incluir una gran variedad de especies orgánicas e inorgánicas. Y presentan una inmensa variedad de aplicaciones en diversas áreas: en síntesis orgánica como sistemas catalíticos, en la innovación de nuevos materiales con propiedades de interés en química farmacéutica, medicina, agronomía, entre otras disciplinas como la química analítica.

A continuación se describen las principales características y propiedades de estos receptores.

2.1.4.1. Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) son oligómeros cíclicos constituidos por unidades de α -D-(+)-glucopiranosas unidas mediante enlaces α -(1-4)-glicosídicos.⁶ Estos macrociclos presentan una estructura ligeramente cónica con una cavidad relativamente hidrofóbica. En la figura 2-8a se muestra la estructura química de CDs nativas. En el exterior del borde mayor se ubican grupos hidroxilos secundarios, y sobre el borde menor grupos hidroxilos primarios (ver figura 2-8b). La estructura macrocíclica se estabiliza por enlaces puente hidrógeno intramoleculares entre los grupos hidroxilo secundarios (C'2-OH- - -OH-C3) de dos unidades de glucopiranosas adyacentes. Debido a esta estabilización, las ciclodextrinas

nativas α -CD, γ -CD y en particular β -CD tienen limitada solubilidad en agua.⁷ En la tabla 2-3 se exponen las propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas nativas.

Tabla 2-3. Propiedades fisicoquímicas de ciclodextrinas nativas.^a

Propiedades	α-CD	β-CD	γ-CD
Nº de glucopiranosas	6	7	8
Masa Molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidad en agua (% p/v), 25 °C	14,5	1,85	23,2
Diámetro Cavity Interna (nm)	0,47 – 0,53	0,60 – 0,65	0,75 – 0,83
Diámetro Cavity Externa (nm)	1,46	1,54	1,75
Altura de la cavidad (nm)	0,79	0,79	0,79
Volumen de la cavidad (nm³)	0,174	0,262	0,472
Contenido de agua en el cristal (%p/p)	10,2	13,2 – 14,5	8,13 – 17,7
Moléculas de agua en la cavidad	6	11	17

^(a) Ref. 7

La capacidad para formar complejos sustrato-receptor con una amplia variedad de moléculas orgánicas es una de las propiedades más interesantes de las ciclodextrinas y ha sido la base para la mayoría de sus aplicaciones en el desarrollo de sensores químicos fluorescentes,^{9,10,11} en catálisis,^{12,13} en química analítica,¹⁴ así como en la industria farmacéutica, agroquímica, de alimentos y de cosméticos. En particular, en el área farmacéutica, la complejación con CDs se usa principalmente para aumentar la solubilidad y velocidad de disolución en medios acuosos de fármacos poco solubles, y para mejorar la biodisponibilidad y estabilidad de drogas.¹⁵

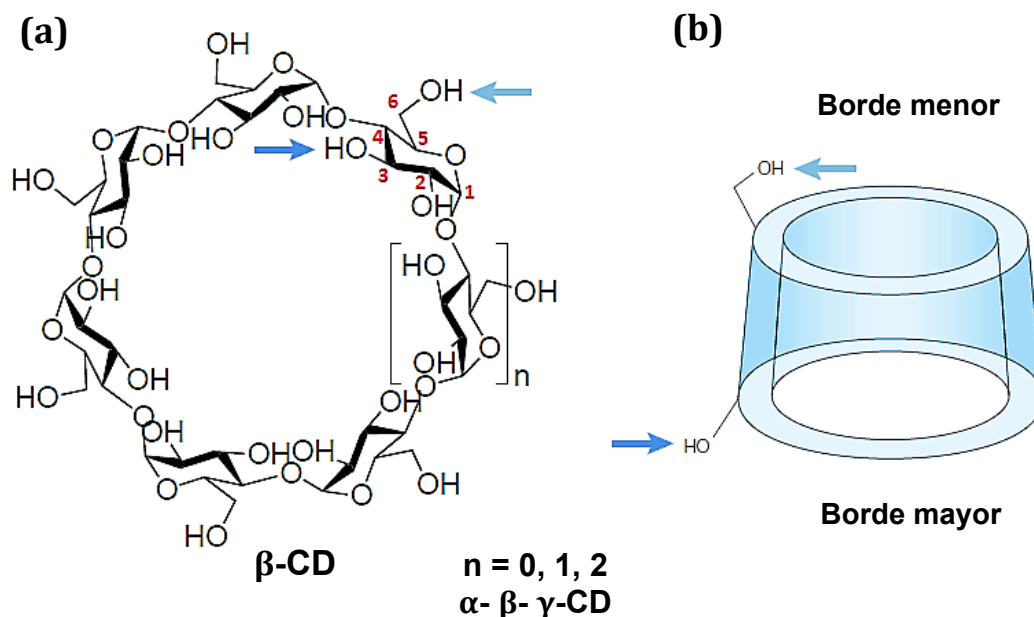


Figura 2-8. Estructura de ciclodextrinas (CDs). **(a)** α - β - γ -CD **(b)** representación esquemática de la estructura en forma de cono de las ciclodextrinas. Se indica con flechas los grupos hidroxilos que forman el borde menor y mayor.

Se ha sintetizado una enorme cantidad de derivados de ciclodextrinas para el estudio de complejos sustrato-receptor.^{16,17} Por ejemplo, el uso de ciclodextrinas en donde todos sus grupos hidroxilos son derivatizados por grupos metiloxilos ($-\text{OCH}_3$), las cuales son llamadas ciclodextrinas permetiladas (PMCDs), no solamente se ve alterado el tamaño y forma de la cavidad, sino que también aumenta el carácter hidrofóbico.^{11,18}

Una variación que se ha empleado y se sigue utilizando es la adición de una cadena lateral funcional. En la figura 2-9 se ejemplifica el uso de un grupo indol fluorescente del residuo lateral L-triptófano (Tryp) en la β -CD.¹ El grupo lateral se incluye dentro de la β -CD en solución acuosa por efecto hidrofóbico. Cuando un sustrato complementario a la cavidad del macrociclo es adicionado, desplaza al brazo lateral fuera de ella ocupando su lugar. Este desplazamiento se ha utilizado como sensor fluorescente para controlar la formación de complejos sustrato-receptor. Se ha demostrado que la ciclodextrina Tryp- β -CD es capaz de diferenciar entre alcoholes químicamente distintos y también entre isómeros geométricos y enantiómeros.¹

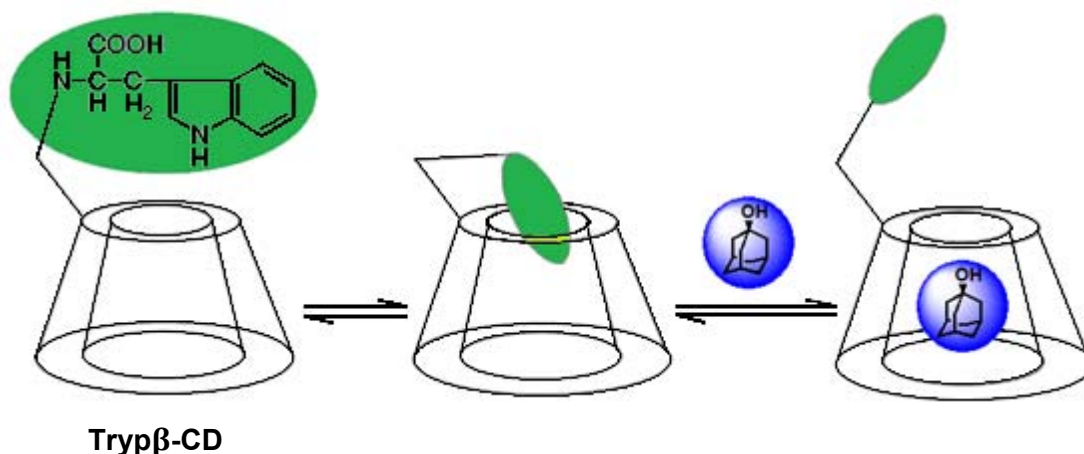


Figura 2-9. Equilibrios de inclusión de un grupo lateral triptófano (Tryp) unido covalentemente a β -CD, y el subsecuente desplazamiento por la adición de 2-adamantanol.

2.1.4.2. Calixarenos

Los calix[n]arenos (CA[n]) son oligómeros cíclicos constituidos por unidades de fenol *p*-sustituidas, unidas entre sí por puentes metilenos.¹⁹ Su nombre deriva de su semejanza estructural con la copa griega llamada *calix*, y el término *areno* se refiere a los grupos arilos. Entre corchetes se indica el número de unidades fenólicas que forman la estructura cíclica ($n = 4 - 16$), los derivados más comunes son el tetrámero, el hexámero y el octámero, con $n = 4, 6$ y 8 (figura 2-10).

Estos receptores macrocíclicos son sintetizados por condensación entre un fenol *p*-sustituido y formaldehído. La reacción transcurre en un paso y puede ser catalizada tanto en medio ácido como en medio básico.¹⁹ Son receptores muy versátiles debido a la posibilidad de derivatizar tanto la cadena R como los grupos hidroxilos (ver figura 2-10), con lo que se consiguen calixarenos con diferentes propiedades fisicoquímicas y de reconocimiento molecular (para una descripción más detallada sobre la síntesis de calixarenos consultar el Apéndice B). Dependiendo de la naturaleza de su funcionalización, pueden complejar cationes, aniones y moléculas neutras.

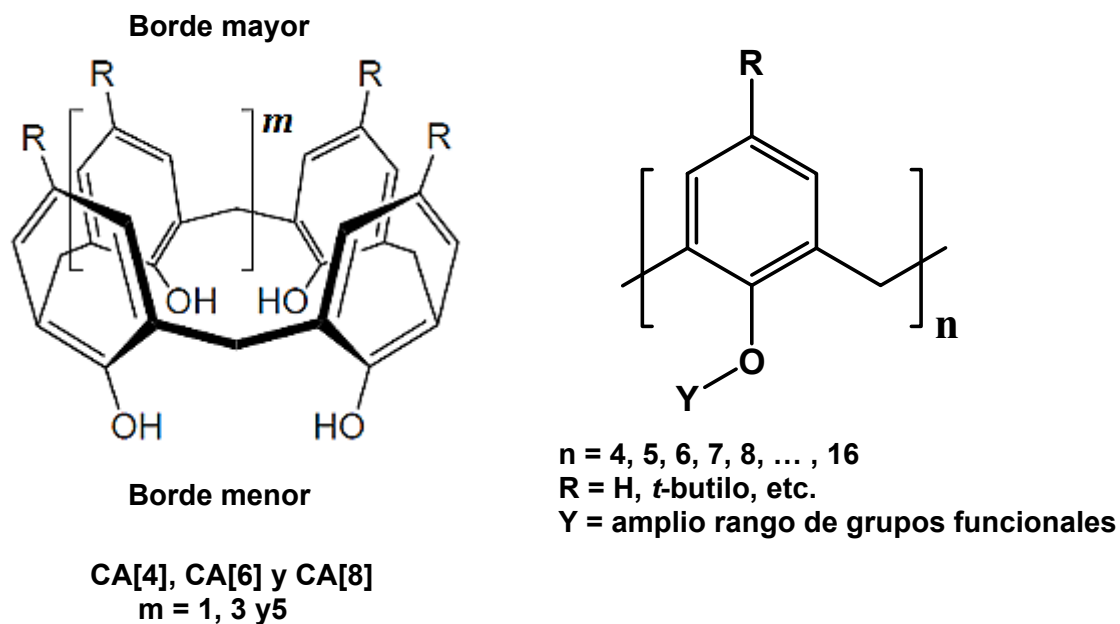


Figura 2-10. Estructura de calix[n]arenos (CA[n]).

Los calixarenos (de 4, 6 y 8 miembros) pueden adoptar al menos cuatro conformaciones, a causa de la libre rotación de los grupos metileno. Por esto, en solución, los grupos arilo rotan respecto a los grupos metilenos orientándose *syn* o *anti* unos en relación a otros generando los distintos conformeros.¹⁹ En la figura 2-11 se esquematizan las cuatro conformaciones básicas: cono, cono parcial, 1,2-alternado y 1,3-alternado. La cantidad de conformeros se incrementa con el número de unidades monoméricas y la estabilidad de los mismos depende de diversos factores, como el tamaño de los sustituyentes, la naturaleza del disolvente y del huésped.⁵

La alta flexibilidad conformacional de derivados CA[6] y CA[8] ha dificultado su utilización como reactores químicos, debido a la incapacidad de mantener un orden estructural y forzar la preorganización requerida de las moléculas reactantes en su cavidad.^{20,21} A pesar de ello, su flexibilidad puede ser controlada por funcionalización de los bordes menor y mayor con grupos voluminosos adecuados a fin de bloquear la libre rotación de los grupos metileno.²² Además, es posible favorecer un único conformero mediante la utilización de un sustrato adecuado que interaccione con la cavidad del macrociclo. Por ejemplo, se conoce que el derivado CA[8] puede presentar, en principio,

16 conformaciones diferentes.²³ Por otra parte, se ha demostrado que el empleo de 4-bispiridiletileno reduce el número de conformaciones adoptadas por el derivado *p*-sulfonatocalix[8]areno a 5 conformaciones posibles.²⁰

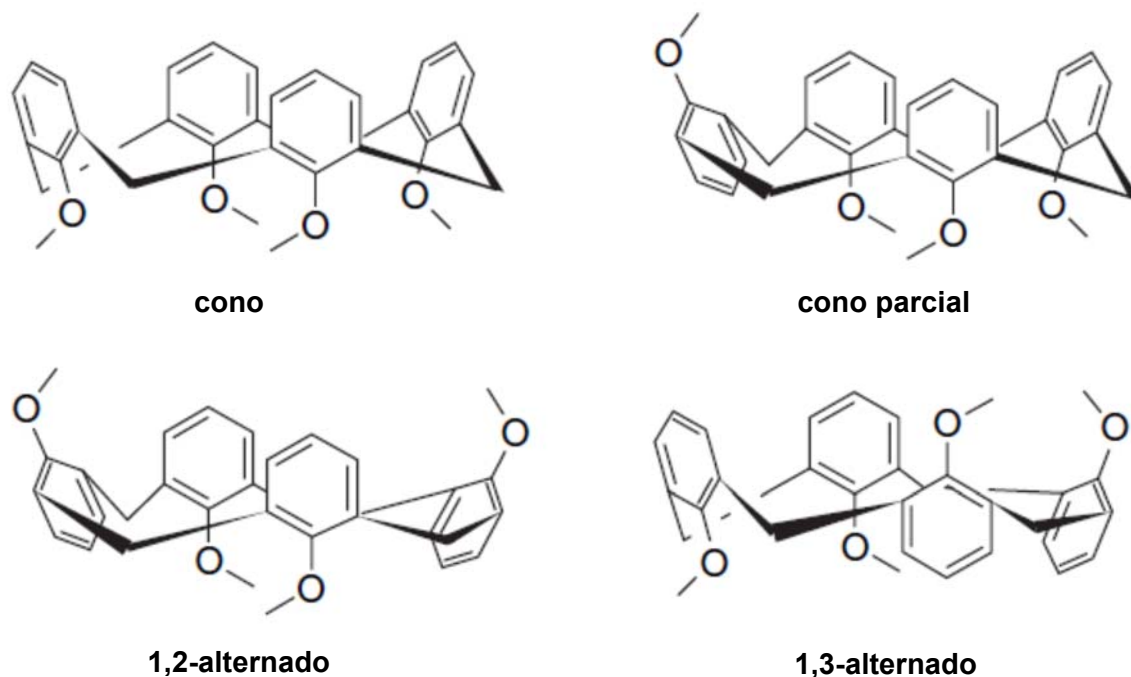


Figura 2-11. Los cuatro confórmeros del calix[4]areno.¹

Las investigaciones teóricas y experimentales sobre calix[*n*]arenos han contribuido al desarrollo de potenciales aplicaciones en diversas áreas, tales como diseño mimético de enzimas, extracción líquido-líquido de metales, transporte selectivo de iones, catálisis y sensores.^{24,25,26} Una aplicación ambiental relevante de CA[*n*] fue en el tratamiento de residuos nucleares, donde un derivado del *p*-sulfonatocalix[6]areno fue extensamente usado como receptor para extraer uranio del agua de mar a través de métodos de extracción cromatográficos.²⁷

El rasgo característico de los CA[*n*] es su baja solubilidad en agua, debido a su carácter apolar dominante. En los últimos años, se han conseguido sintetizar derivados solubles en agua entre los que se destacan los *p*-sulfonatocalix[*n*]arenos (CA[*n*]S). Los CA[*n*]S han sido los más ampliamente estudiados, debido a que poseen una alta solubilidad en medio acuoso (> 0,1 M), y además su síntesis es sencilla (ver Apéndice B).^{28,29} Estos derivados sulfonados se comparan a menudo con las ciclodextrinas, en la

tabla 2-4 se muestran algunas diferencias y similitudes entre estos macrociclos. De este modo, los CA[n]S proporcionan tanto una cavidad como un entorno hidrofóbico (por los anillos bencénicos), y poseen en el borde superior grupos $-SO_3^-$ que les otorgan un fuerte carácter hidrofílico. Se conoce también que estos receptores macrocíclicos tienen baja toxicidad y que son inocuos respecto a efectos hemolíticos en concentraciones menores a 50,0 mM, por arriba de la cual dichos efectos aumentan con el tamaño del anillo.³⁰

A diferencia de las CDs, la estructura simétrica de los CA[n]S los hace aquirales. Sin embargo, la quiralidad puede ser inducida por la introducción de sustituyentes quirales.^{31,32} Los derivados quirales son efectivos en fases estacionarias para técnicas de separación analíticas.³³

El interés en los CA[n]S en la química sustrato-receptor es, en gran parte, debido a su tendencia a formar complejos en medio acuoso con una amplia gama de iones metálicos, moléculas orgánicas neutras y iónicas. La contribución de las interacciones hidrofóbicas, electrostáticas e interacciones π (catión- π , π - π stacking y CH- π) son importantes en la unión de sustratos y fundamentales para el reconocimiento molecular.

Tabla 2-4. Comparación de propiedades de CA[n]S y CDs.^a

Propiedades	<i>p</i>-sulfonatocalix[n]arenos	Ciclodextrinas
Monómero	<i>p</i> -sulfonatofenol	α -D-glucopiranososa
Diámetro de la cavidad interna (Å)	3,0 (n = 4)	5,7 (α)
	7,6 (n = 6)	7,8 (β)
	11,7 (n = 8)	9,5 (γ)
Propiedades de la cavidad	Flexible Heterogénea	Rígida Homogénea
Propiedades Espectroscópicas	Fuerte absorción en UV	Transparente en UV
Interacciones	Hidrofóbica y Electrostática	Hidrofóbica
Derivatización	Fácil	Difícil
Quiralidad Inherente	No posee	Posee

^(a) Ref. 34

La primer disociación de los fenoles de los CA[n]S tienen una constante ácida mayor que las respectivas unidades monoméricas, y su acidez se incrementa conforme disminuye el tamaño del anillo (ver tabla 2-5). La disociación del primer protón es relativamente fácil debido a la estabilización de la especie monoaniónica por formación de puentes hidrógenos con los grupos hidroxilos restantes. Por ejemplo, para el *p*-sulfonatocalix[4]areno la primera disociación ocurre a pH ácido ($pK_{a1} = 3,26$), mientras que las otras tres disociaciones se observan a valores de pH bastante altos ($pK_{a2} = 11,80$; $pK_{a3} = 12,80$ y $pK_{a4} = 14,00$, ver tabla 2-5).³⁵

Tabla 2-5. Valores de pK_a para ácidos de diferentes derivados CA[n]S.^a

Compuesto	pK_a de grupos $-SO_3H$	pK_a de grupos $-OH$
Ácido 4-hidroxibencenosulfónico	muy ácido	$pK_a = 8,68$
Ácido del <i>p</i>-sulfonatocalix[4]areno	todos muy ácidos	$pK_{a1} = 3,26$, $pK_{a2} = 11,80$, $pK_{a3} = 12,8$ y $pK_{a4} = 14,0$
Ácido del <i>p</i>-sulfonatocalix[6]areno	todos muy ácidos	$pK_{a1} = 3,45$; $pK_{a2} = 5,02$; $pK_{a3} > 11$
Ácido del <i>p</i>-sulfonatocalix[8]areno	6 grupos muy ácidos; $pK_{a7} = 4,10$; $pK_{a8} = 4,84$	$pK_{a1} = 7,70$; $pK_{a2} = 9,10$; $pK_{a3} > 11$

^(a) Ref. 35 y 36

2.1.4.3. Cucurbiturilos

Aunque en este trabajo no se han empleado cucurbiturilos, resulta interesante hacer una breve presentación de estas estructuras receptoras ya que aportan al conocimiento en el campo de la química sustrato-receptor.

Comparados con las CDs y los CA[n], los cucurbit[n]urilos (CB[n]) son receptores macrocíclicos relativamente nuevos. Se trata de oligómeros cíclicos compuestos por un número variable de unidades glicolurilo (ver figura 2-12a). Poseen una forma semejante a una calabaza como se muestra en la figura 2-12b. Estos macrociclos tienen una cavidad hidrofóbica capaz de albergar huéspedes o residuos moleculares neutros y especies catiónicas a través de enlaces ión-dipolo con sus grupos carbonilo expuestos en sus bordes.³⁷

La síntesis general se basa en la condensación de glicolurilo con formaldehído catalizada por ácido y en condiciones controladas.^{38,39} Se han obtenido los derivados con $n = 5, 6, 7, 8$ y 10 , y sus propiedades fisicoquímicas y de reconocimiento molecular fueron investigadas con diversos sustratos orgánicos e inorgánicos.^{40,41}

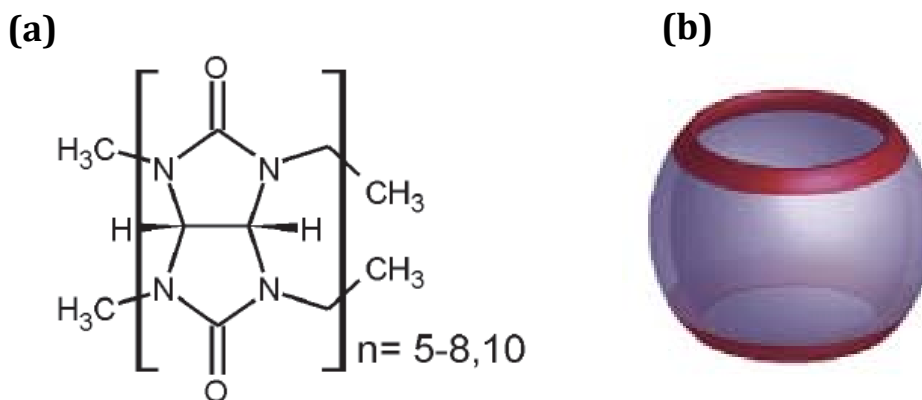


Figura 2-12. Estructura de cucurbit[n]urilos (CB[n]) (a) Estructura química de la unidad monomérica glicolurilo de cucurbit[n]urilos (b) representación de la forma de barril que adquieren los CB[n].³⁷

2.1.5. Efecto de receptores macrocíclicos sobre las propiedades de compuestos orgánicos

Las propiedades fisicoquímicas de un compuesto orgánico pueden verse alteradas mediante su asociación con un receptor macrocíclico. Estos cambios pueden emplearse con diferentes intereses en varias áreas, incluyendo la industria farmacéutica (para mejorar la solubilidad, la estabilidad y la biodisponibilidad de fármacos, así como el transporte de moléculas activas en sistemas biológicos y para retardar la liberación de sustancias activas desde la matriz farmacéutica), y diversas ramas de la química analítica.⁴²

La complejación de un compuesto orgánico luminiscente con un macrociclo receptor involucra interacciones no covalentes que son relativamente débiles, pero que en conjunto actúan en forma cooperativa resultando una unión bastante fuerte del luminóforo con la cavidad receptora. Esta fuerte interacción es la responsable de llamativos cambios en ciertas propiedades de moléculas orgánicas.⁴³ En relación a esto, se ha encontrado: aumento en el rendimiento cuántico de fluorescencia, Φ_F , y en tiempos de vida, τ , de la especie emisora, desplazamiento de las longitudes de onda de máxima emisión de fluorescencia, λ_{max}^{em} , mejora en la solubilidad y fotoestabilidad, cambios en las propiedades ácido-base, etc.^{44,45,46,47} Como ejemplo se puede mencionar la interacción de berberina (un alcaloide isoquinolínico con importancia clínica), con el receptor 4-sulfonatocalix[8]areno, que lleva a un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia de este sustrato, lo que puede ser aplicado para detectar cantidades trazas del mismo.⁴⁸

Mediante el uso de receptores ciclodextrina se han desarrollado con éxito técnicas de extracción para la evaluación de la biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en suelo, imitando mecanismos de transferencia de masa que gobiernan la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos no polares en suelo (ej. transferencia de sólido a fase acuosa).⁴⁴ Por ejemplo, el receptor hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β -CD) se ha empleado para detectar pireno y benzo[a]pireno, por incremento de la señal de fluorescencia al formar complejos de inclusión, en extracto de suelo contaminado conteniendo cuatro HPA (benzo[a]pireno, antraceno, pireno y fenantreno).⁴⁹ También se ha publicado que al interactuar con acridina las ciclodextrinas, β -CD y γ -CD, produjeron

un decaimiento de la señal de fluorescencia junto con un pequeño corrimiento hipsocrómico (~ 3,0 nm) de la banda de emisión.⁴³

Las interacciones no covalentes en complejos sustrato-receptor, son las responsables de que una molécula orgánica cambie la respuesta esperada en el sistema supramolecular frente a estímulos externos como luz, temperatura, pH, agente desplazante, etc. Se busca encontrar las condiciones óptimas en las que se pueda aprovechar las propiedades del sustrato en presencia del receptor macrocíclico.⁴³

En el marco de la química analítica supramolecular, el primer sistema de detección fluorescente, mediante el empleo de un complejo de inclusión, se ha desarrollado por Inouye *et al.*, quien usó el complejo entre un resorcinareno y el catión pireno N-alquilpiridinio (NAP) en una solución alcalina-alcohólica para la *detección selectiva* de acetilcolina.⁵⁰ Luego Shinkai y colaboradores mejoraron este sistema usando la misma sonda fluorescente (NAP) pero con otro receptor, el derivado *p*-sulfonatocalix[6]areno, en medio alcohólico obteniendo una respuesta fluorescente mayor tras la unión de acetilcolina.⁵¹

El uso de sensores macrocíclicos solubles en medio acuoso es de gran interés, debido a que muchas de las aplicaciones en analítica involucran este medio. Además, el empleo de receptores capaces de aumentar la solubilidad de compuestos poco solubles en agua con un objetivo analítico es de importancia.⁸ El uso combinado de diferentes macrociclos para obtener mayores rendimientos en la solubilización de drogas se ha estudiado poco.³¹ En literatura se describe un sistema mixto formado por 4-sulfonatocalix[6]areno e hidroxipropil β -CD (HP β -CD) que incrementa marcadamente la solubilidad en medio acuoso de niclosamida, un fármaco antihelmíntico.³⁴

2.1.6. Propiedades de reconocimiento molecular y aplicaciones de receptores macrocíclicos.

Uno de los principales intereses en química supramolecular es crear condiciones adecuadas para obtener estructuras supramoleculares estables a partir de moléculas pequeñas enlazadas de forma no covalente. Es conveniente para el fin que se busque, contar con moléculas que presenten alguna compatibilidad de unión.

Para ejemplificar algunas aplicaciones y procedimientos en esta área, a continuación se presentan algunos sistemas supramoleculares relativamente simples descritos en bibliografía.

2.1.6.1. Empleo de receptores macrocíclicos en procesos catalíticos

Las CDs han contribuido en gran medida al desarrollo de procesos catalíticos en medio acuoso. Se han empleado como agentes de transferencia de masa (ATM) en sistemas bifásicos, acuoso:orgánico, y en el diseño de nuevos catalizadores.^{52,53} En la figura 2-13 se muestra un esquema general del uso de CDs como ATM en reacciones catalizadas por un compuesto organometálico soluble en agua. El mecanismo de acción del macrociclo depende de la naturaleza del sustrato. Cuando el reactante es parcialmente soluble en agua, se ha propuesto un mecanismo como muestra la figura 2-13a, en donde la CD se compleja con el sustrato en la interfase líquido-líquido, lo lleva hacia la fase acuosa donde, en presencia del catalizador organometálico, se lleva a cabo la reacción.⁵⁴ Luego, el producto se transfiere a la fase orgánica. Si el sustrato es muy poco soluble en medio acuoso se propuso un mecanismo a nivel de la interfase, como el esquematizado en la figura 2-13b.

Se han estudiado diferentes reacciones químicas en presencia de ciclodextrinas. Por ejemplo, han sido empleadas como vehículos para transportar reactantes en reacciones de oxidación de alquenos a cetonas, catalizadas por complejos de metales de transición.^{55,56} También resultaron ser buenas promotoras para transferir sustratos orgánicos en reacciones de desoxigenación de alcoholes alílicos,⁵⁷ reducción de ácidos α,β -insaturados,⁵⁸ α -cetoésteres,⁵⁹ y dienos conjugados.⁶⁰ Algunas CDs modificadas, mostraron tener mejor actividad catalítica que las CDs nativas en numerosas reacciones como la hidroxilación de compuestos aromáticos,^{61,62} hidrogenación de aldehídos,^{63,64} reacción de Suzuki de acoplamiento cruzada,⁶⁵ escisión de compuestos alílicos.⁶⁶

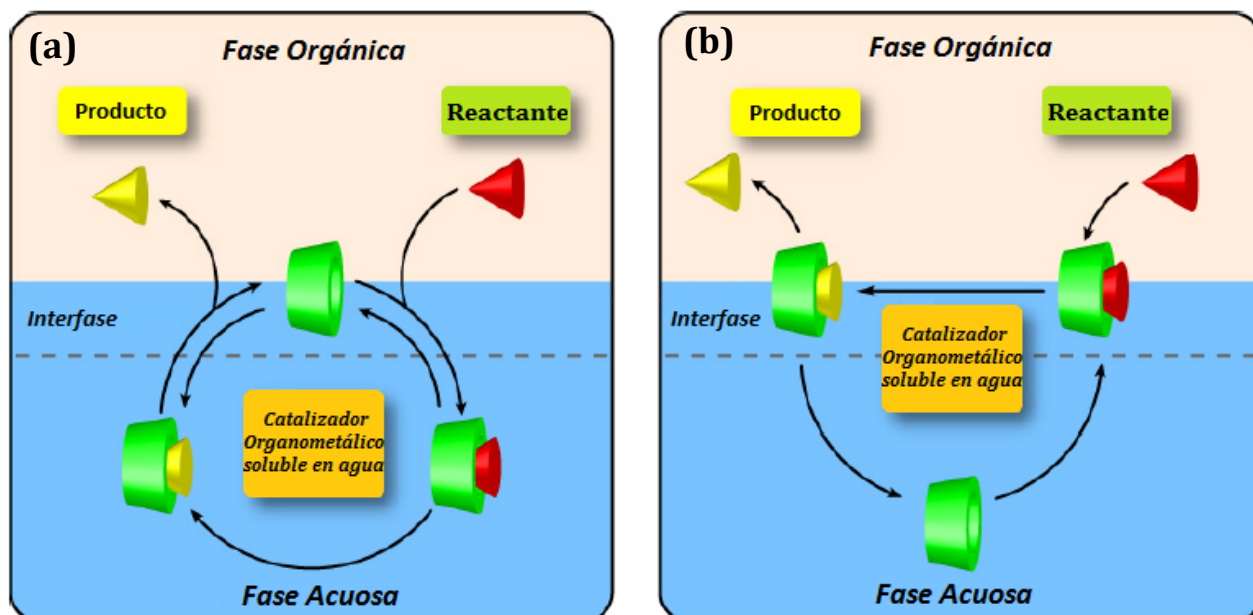


Figura 2-13. Principio de catálisis organometálica en medio bifásico acuoso-orgánico mediada por receptores ciclodextrinas. (a) Catálisis por transferencia de fase inversa (b) Catálisis interfásial.

Además, se han logrado reacciones selectivas que son difíciles de realizar con catalizadores convencionales de metales de transición.⁵⁴ Se han empleado receptores ciclodextrina para discriminar selectivamente un isómero en una mezcla. El isómero que mejor interactúa con la cavidad del receptor es el que sufre la modificación. Este tipo de sistema catalítico exhibe un comportamiento similar al del sitio activo de una enzima.^{12,13}

Una aplicación interesante que se ha reportado es la utilización de un derivado mono-(2-hidroxi-3-trimetilamoniopropil)- α -CD como un eficiente agente de transferencia de masa que además se une por interacción iónica a un grupo sulfonato del ligando trifenilfosfina trisulfonada (TPPTS), que se coordina con el catalizador metálico (rodio, Rh), originando un ensamble supramolecular que actúa como un eficiente sistema catalítico en la reacción de hidroformilación de olefinas superiores (figura 2-14a), en un sistema bifásico (orgánico:acuoso). Este sistema catalítico, además de aumentar la velocidad de la reacción de hidroformilación, favorece la formación del isómero lineal por protección de la estructura del alqueno dentro de la cavidad de la ciclodextrina (ver figura 2-14b).

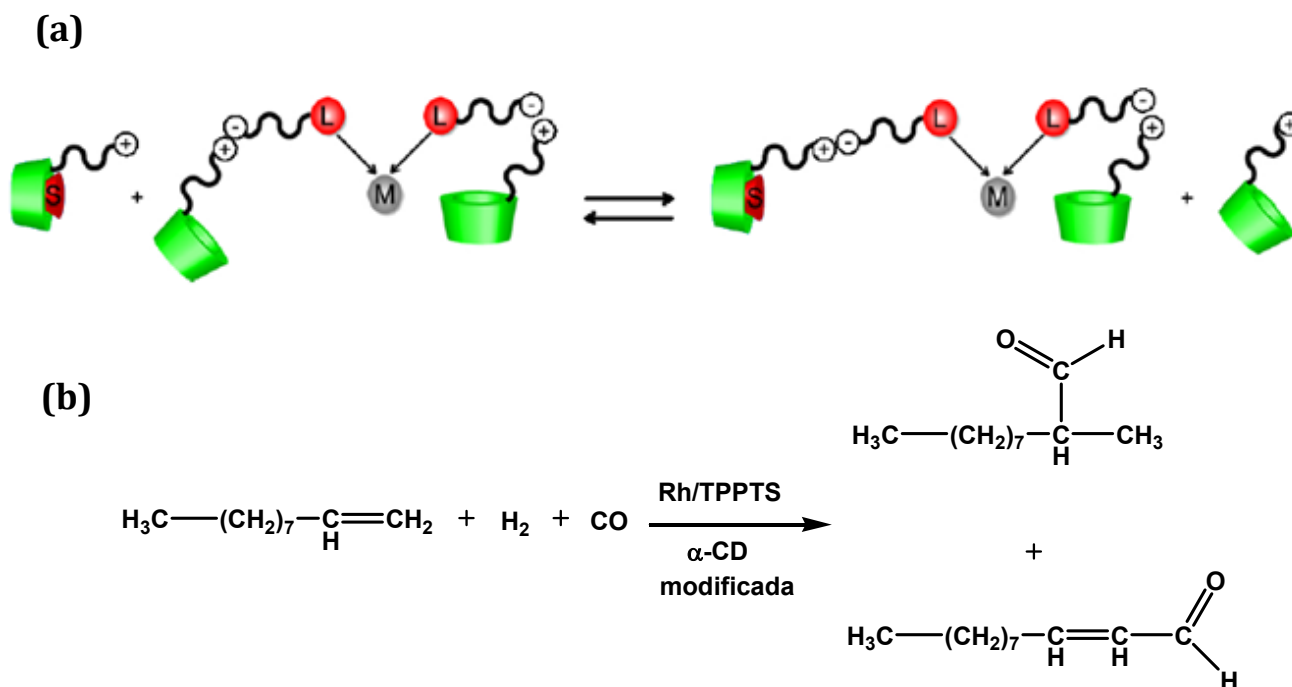


Figura 2-14. Principio de catálisis supramolecular (a) catálisis supramolecular conducida en la presencia de un exceso de CD unida no covalentemente al catalizador. (b) Reacción de hidroformilación de 1-deceno catalizada por rodio (Rh) en presencia de α -CD.⁶⁵

Otro ejemplo en cuanto al empleo de macrociclos en sistemas catalíticos, se ha reportado en la reacción de Suzuki-Miyaura, de acoplamiento cruzado entre haluros orgánicos y compuestos organoboranos catalizada por paladio, para la formación de enlaces C-C (como se muestra en la figura 2-15a).⁶⁵ En este caso, se han utilizado calixarenos y ciclodextrinas como transportadores de sustratos reactivos poco solubles en medio acuoso (donde se encuentra el catalizador) en un sistema bifásico, en el cual el catalizador es un complejo organometálico de paladio con trifenilfosfina monosulfonada (Pd/TPPMS). La reacción de acoplamiento del 1-iodo-4-fenilbenceno con ácido fenilborónico se vio favorecida en presencia de CDs y derivados CA[n]S.⁶⁵

Los calixarenos que se muestran en la figura 2-15b con grupos sulfonatos hidrofílicos se han empleado como transportadores de masa para la reacción de Suzuki-Miyaura.⁶⁵ Estos derivados tienen además grupos *t*-butilo y fenilo en el borde mayor dando lugar, en este último caso, a que se establezcan interacciones π que son responsables, junto con las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, de la formación de complejos de inclusión.

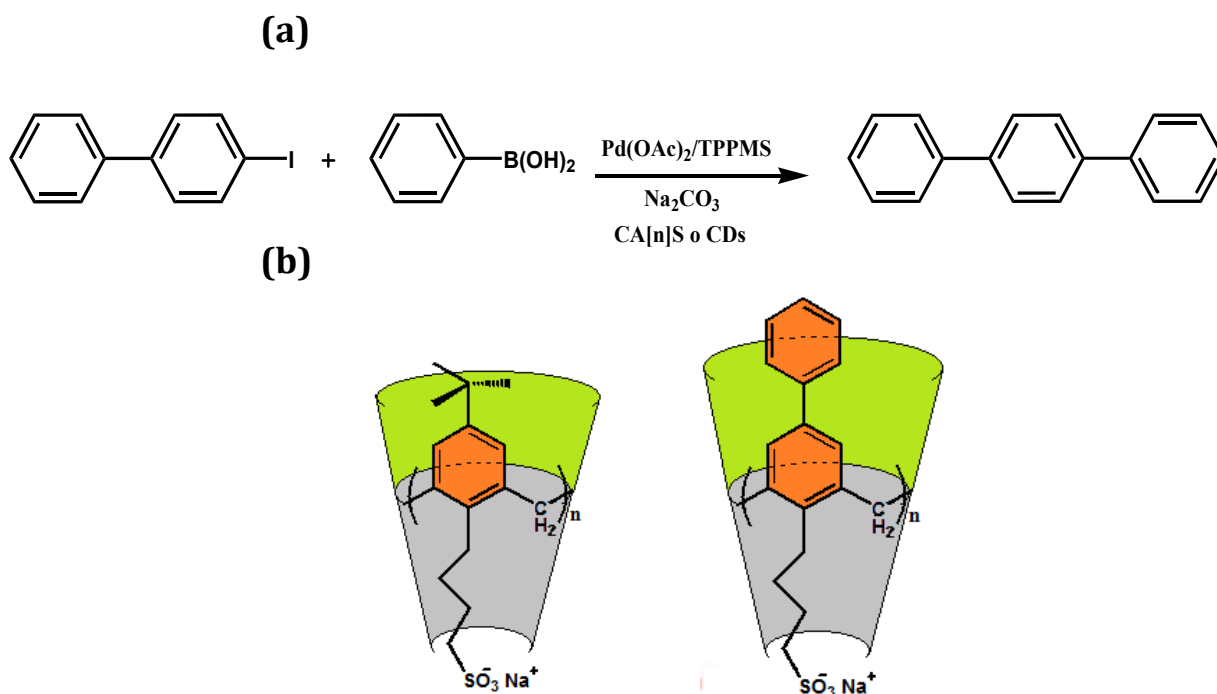


Figura 2-15. Reacción de Suzuki-Miyaura en presencia de CDs y CA[n] (a) Reacción de acoplamiento 1-iodo-4-fenilbenceno y ácido fenilborónico catalizada con paladio en solución acuosa de carbonato de sodio en presencia de CA[n]S o CDs. (b) Derivados calixarenos solubles en agua, con sustituyentes capaces de interactuar con sustratos orgánicos.⁶⁵

2.1.6.2. Formación de complejos ternarios

El efecto cooperativo se ha empleado para favorecer la formación de complejos en forma selectiva para separar y detectar un determinado sustrato. Se ha descrito el empleo de un sistema ternario formado entre el azoalcano bicíclico **1**, el derivado *p*-sulfonatocalix[4]areno y el catión divalente Zn^{2+} .⁶⁷ El sustrato orgánico se asocia a la cavidad del receptor por interacción hidrofóbica, mientras que el Zn^{2+} se une a través de interacciones coulombicas con los grupos sulfonatos del calixareno y mantiene una interacción débil con el grupo azo del biciclo (unión cooperativa), como se muestra en la figura 2-16. Por otro lado, el compuesto bicíclico **2** se asocia de una forma similar que **1** al receptor calixareno,⁶⁸ aunque en este caso por impedimento estérico del sustrato **2** el catión Zn^{2+} no puede acercarse a interactuar con ambas especies a la vez, por lo que el azoalcano **2** es desplazado y se forma el complejo Zn^{2+} -CA[4]S. Entonces se establece

una competencia entre el ion metálico y el biciclo **2** por ocupar la cavidad de CA[4]S, como se muestra en la figura 2-16.

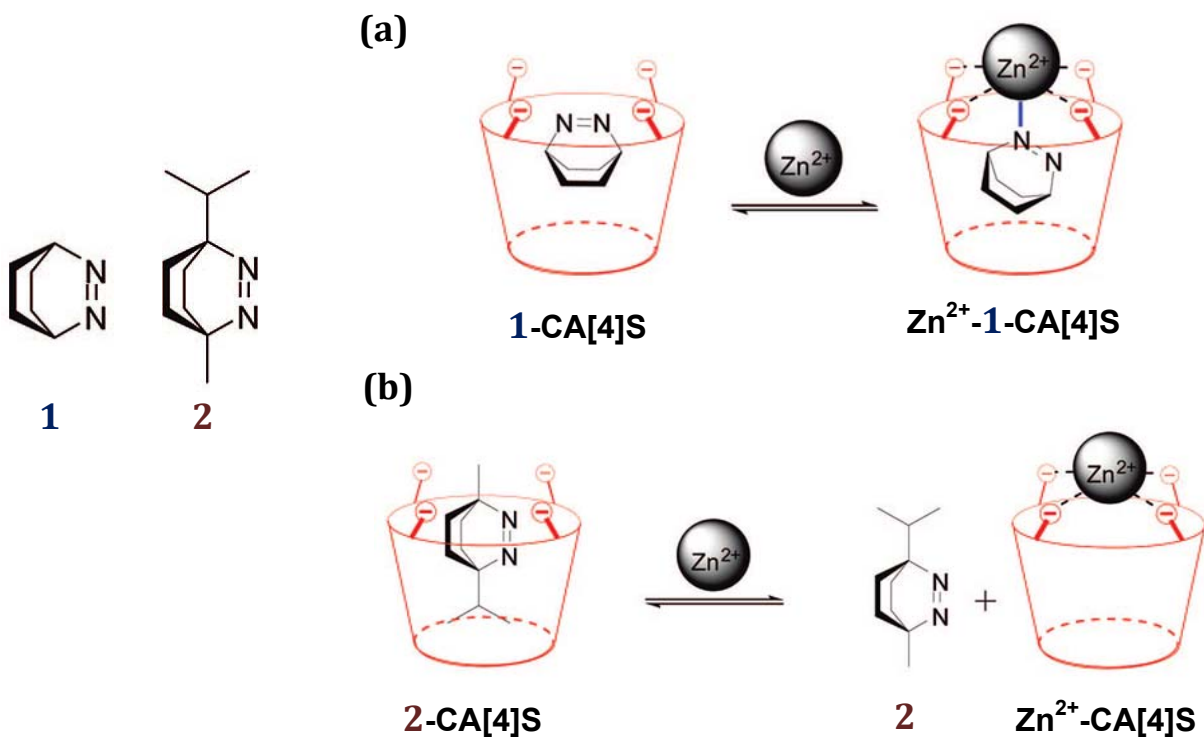


Figura 2-16. Ejemplos de Cooperación y competencia en la formación de complejos sustrato-receptor (a) Equilibrio cooperativo para la formación del complejo ternario Zn^{2+} -**1**-CA[4]S. (b) Equilibrio competitivo para la formación de Zn^{2+} -CA[4]S por desestabilización del complejo **2**-CA[4]S.

Mediante el reconocimiento molecular triple que se establece por la introducción del enlace catión-sustrato como un tercer motivo supramolecular, es posible aumentar la selectividad para la formación del complejo entre **1** y el CA[4]S bajo la forma del sistema ternario.

El agregado de β -CD al sistema (formado por **1**, **2** y CA[4]S en presencia de Zn^{2+}) introduce un equilibrio competitivo con el receptor CA[4]S por la formación de complejo con el biciclo **2** (β -CD-**2**). De esta forma, se favorece la formación del complejo ternario Zn^{2+} -**1**-CA[4]S, debido a la desestabilización del complejo **2**-CA[4]S, lo que deja libre al receptor CA[4]S para complejar al azocompuesto **1** y se estabiliza por efecto cooperativo con el catión Zn^{2+} . Este sistema de receptores macrociclos permite entonces seleccionar

selectivamente el azoalcano bicíclico **1**, y la presencia del catión Zn^{2+} direcciona el sistema de equilibrios múltiples hacia la formación del complejo ternario. Esto se resume en la figura 2-17.

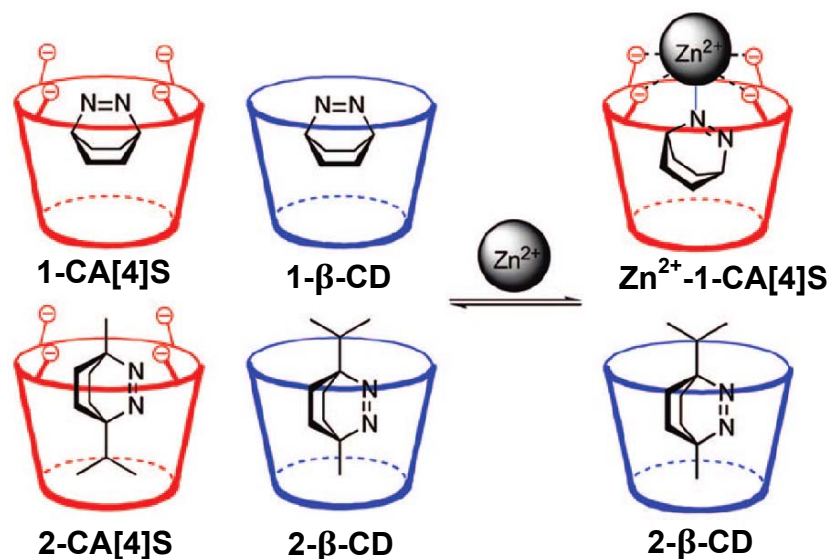


Figura 2-17. Sistema de equilibrios múltiples direccionado hacia la formación del complejo ternario Zn^{2+} -1-CA[4]S por la adición de Zn^{2+} .

Para muchas aplicaciones resulta útil contar con un conjunto de moléculas huésped simples que actúen como “clip” o “pegamento” molecular para mantener unidos diferentes macrociclos en una estructura compleja. Un ejemplo atractivo es la formación de un complejo ternario entre una dialquilamina (dihexilamina, DHA) y dos receptores macrocíclicos diferentes (β -CD y CB[6]). Este complejo se forma en dos etapas: primero se formó el complejo DHA-CB[6] y luego, con la adición de la ciclodextrina, resultó el complejo ternario β -CD-DHA-CB[6]. Este proceso se muestra en la figura 2-18.⁶⁹

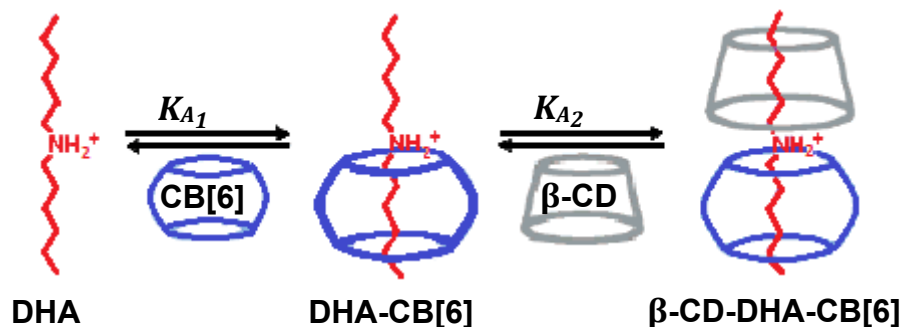
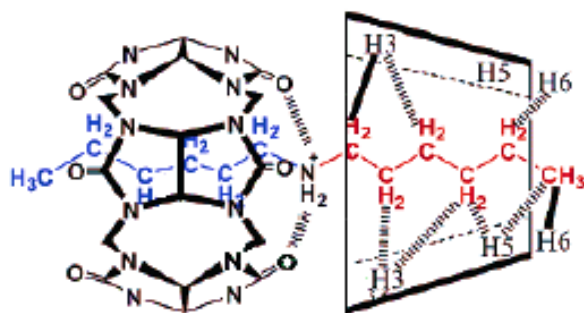


Figura 2-18. Equilibrio en etapas para la formación de un complejo ternario CB[6]-Dihexilamina-β-CD (CB[6]-DHA-β-CD).⁶⁹

En la primer etapa, la inclusión de una de las cadenas hexilo en la cavidad del cucurbiturilo CB[6] se ve favorecida debido a la complementariedad estructural y a las interacciones de Van der Waals con las paredes internas del macrociclo, y a la vez que se establecen interacciones del tipo ion-dipolo entre el grupo amonio secundario ($-NH_2^+$) y los oxígenos carbonílicos del borde del receptor (ver figura 2-19). Luego, en la segunda etapa, la formación del complejo ternario se ve especialmente favorecida debido a un efecto sinérgico que se dispara con la formación del primer complejo DHA-CB[6]. La fuerza de la asociación de CD a la cadena hexilo libre, del primer complejo, es 33 veces mayor que para la misma cadena en la hexilamina.⁶⁹ Esto se debe al efecto cooperativo supramolecular por la formación del complejo DHA-CB[6] que facilita fuertemente la entrada del segundo receptor.

El efecto cooperativo supramolecular que se observa en el ejemplo anterior, es análogo al concepto de efecto alostérico que se da en la unión de un sustrato al sitio activo de una enzima, en la cual, la asociación de una molécula en un lugar lejano a la zona de unión del sustrato, desencadena una serie de cambios estructurales en la proteína, que influyen en la unión del mismo.



β -CD-DHA-CB[6]

Figura 2-19. Estructura probable del complejo ternario CB[6]-DHA- β -CD.⁶⁹

2.1.6.3. Aplicaciones Farmacéuticas

Se han reportado interesantes aplicaciones de macrociclos receptores en el área farmacéutica, fundamentalmente en el transporte y liberación controlada de fármacos.

El uso de ciclodextrinas en el desarrollo de nuevos materiales, en el marco de la química supramolecular y la nanotecnología es un tema de investigación actual. Un ejemplo, es el desarrollo de polímeros multifuncionales constituidos por unidades de ciclodextrinas entrecruzadas. Estos materiales pueden obtenerse por reacción directa de las ciclodextrinas nativas con un agente entrecruzante (carbonildiimidazol, trifosgeno, carbonato de difenilo, dianhídridos orgánicos, etc),⁷⁰ que luego de la reacción deja una funcionalidad que le da al polímero un comportamiento químico particular.⁷⁰ A estos materiales poliméricos se los llama nanoesponjas por su capacidad de retención de una gran variedad de moléculas. En la figura 2-20 se muestran las estructuras de dos de estos polímeros, obtenidos por reacción de β -CD y dos reactivos entrecruzantes con grupo carbonilo activo.

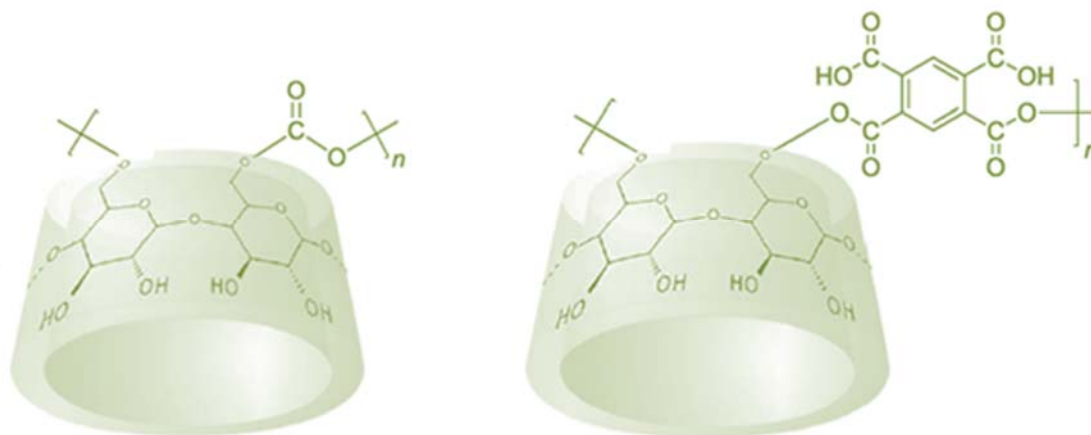


Figura 2-20. Nanoesponja de ciclodextrinas carbonatadas y carboxiladas.⁷⁰

La estructura nanoporosa de estos materiales provee cambios en las propiedades respecto a las ciclodextrinas nativas. Como característica general, presentan mejor capacidad para formar complejos con sustratos orgánicos. Las moléculas incluidas son retenidas fuertemente o liberadas lentamente en forma controlada.⁷⁰

En virtud de su biocompatibilidad y versatilidad, las nanoesponjas resultan ser un sistema con aplicaciones potenciales en el campo farmacéutico, particularmente para la administración de fármacos. Se pueden emplear para la preparación de comprimidos, cápsulas, suspensiones o en sólidos cremosos para dosificación tópica.⁷¹ Estas estructuras poliméricas tienen la capacidad de incorporar fármacos ya sea como complejos de inclusión dentro de la cavidad hidrofóbica de las ciclodextrinas, como también dentro de los intersticios polares que quedan entre ciclodextrinas contiguas. Esto le permite al material interactuar con moléculas de diferentes polaridades y estructuras. En la figura 2-21 se muestra la estructura molecular simulada de una nanoesponja de ciclodextrinas carbonatadas.

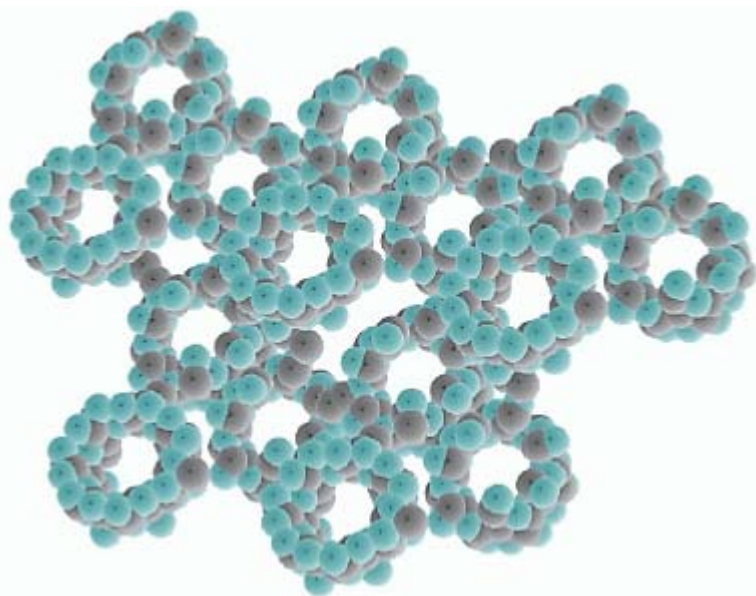


Figura 2-21. Estructura molecular de la nanoesponja de ciclodextrinas carbonatadas.⁷⁰

2.1.6.4. Aplicaciones Analíticas

La formación de un complejo sustrato-receptor afecta marcadamente las propiedades fisicoquímicas de la molécula huésped, como la solubilidad, reactividad química, las propiedades espectroscópicas y electroquímicas, entre otras. Estos efectos pueden ser usados en muchos campos, algunos de los cuales se mencionaron anteriormente. Desde el punto de vista analítico, la formación de tales complejos permite, en ciertos casos, mejorar la eficiencia del método analítico para la determinación de diferentes especies químicas.⁷²

En los últimos años se ha obtenido una gran variedad de sensores químicos fluorescentes con receptores macrocíclicos basados en la formación de complejos de inclusión. Se han sintetizado una amplia gama de ciclodextrinas y calixarenos derivatizados para una diversidad de analitos vinculados a distintas áreas dentro de la química. Un ejemplo interesante, es el empleo de ciclodextrinas permetiladas derivatizadas en su borde menor con un grupo lateral cromóforo (naftaleno o quinolina) para la detección de sales biliares.¹¹ Las sales biliares son moléculas biológicas anfipáticas que se almacenan en la vesícula y juegan un papel significativo en el metabolismo y excreción del colesterol en animales.

Se empleó como sensor fluorescente una β -CD permitilada derivatizada en uno de sus grupos hidroxilo primarios con un grupo naftilo (PM β -CDNaf). El grupo cromóforo se acomoda en el interior de la cavidad como se muestra en la figura 2-22 (esto se evidenció por DCI y un experimento ROESY RMN 2D).¹¹ Cuando se adiciona la sal sódica del ácido cólico (SAC) al receptor PM β -CDNaf, la fluorescencia del sensor se vio incrementada. Lo que le da a este sistema la propiedad de reconocer este tipo de estructuras químicas y poder detectarlas.

El aumento de la señal fluorescente sucede debido a la inclusión de SAC en la cavidad del receptor, lo que produce un desplazamiento del grupo naftilo hacia el borde menor del macrociclo.¹¹ Es interesante recalcar que la formación del complejo fluorescente (PM β -CDNaf)-(SAC) se ve favorecida gracias a un efecto cooperativo entre el cromóforo, la cavidad y la molécula huésped.¹¹

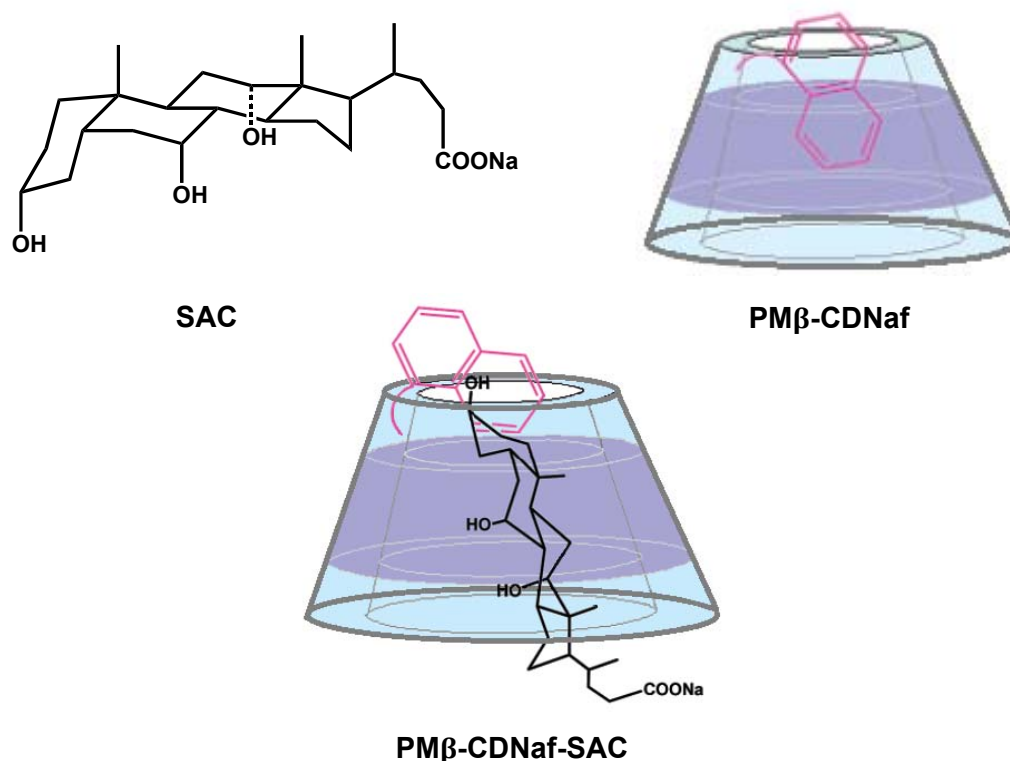


Figura 2-22. Representación de ciclodextrinas involucradas en la detección de una sal biliar. Sal sódica del ácido cólico (SAC) β -CD permitilada derivatizada con un grupo naftilo en uno de sus hidroxilos primarios (PM β -CDNaf) y complejo de inclusión PM β -CDNaf-SAC.

Los derivados calixarenos sulfonados tienen numerosas aplicaciones como sensores de moléculas orgánicas catiónicas en solución acuosa.^{73,74,75,76} Los complejos sustrato-receptor formados por CA[n]S funcionan como sensores fluorescentes para la detección de sustancias biológicas. Particularmente estos complejos se han aplicado para detectar neurotransmisores como acetilcolina y carnitina, así como también otros analitos orgánicos.^{77,78} El principio de la detección se esquematiza en la figura 2-20b. Consiste en el desplazamiento de una molécula fluorescente por el analito lo que resulta en la regeneración de la fluorescencia intrínseca del fluoróforo.

Como un ejemplo atractivo de un sensor fluorescente de este tipo, puede citarse el empleo de *p*-sulfonatocalix[4]areno (CA[4]S) en el seguimiento de una reacción enzimática de descarboxilación del aminoácido L-lisina. La enzima aminoácido descarboxilasa convierte aminoácidos (competidores débiles) a aminas biogénicas (competidores fuertes).⁷⁸ En particular, lisina descarboxilasa transforma L-lisina a cadaverina y CO₂ (ver figura 2-23a), y su estudio es importante en la investigación sobre el crecimiento y proliferación anormal de células cancerosas.⁷⁹

El sensor químico fue el complejo lucigenina-CA[4]S (LCG-CA[4]S). El producto diamina de la reacción enzimática de descarboxilación de la L-lisina desplaza al fluoróforo LCG y se compleja con CA[4]S ($K_A = 1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, en el buffer enzimático). De esta manera, se obtiene un aumento en la señal de fluorescencia del sistema debido a que se detecta, en tiempo real, la cadaverina que se va formando a medida que la reacción transcurre.²⁵

Una aplicación similar se le ha dado al complejo entre *p*-sulfonatocalix[8]areno y rodamina 800 (RDM) para la detección fluorescente de acetilcolina (Aco). El CA[8]S inhibe la fluorescencia de RDM, pero no de una forma total. Cuando se adicionó Aco la fluorescencia a 725 nm, correspondiente a RDM, se incrementó debido al desplazamiento del fluoróforo por la fuerte asociación de acetilcolina con la cavidad de CA[8]S. El método resultó específico para Aco frente a otros neurotransmisores como dopamina, GABA, glicina y ácido L-aspártico.⁷⁷

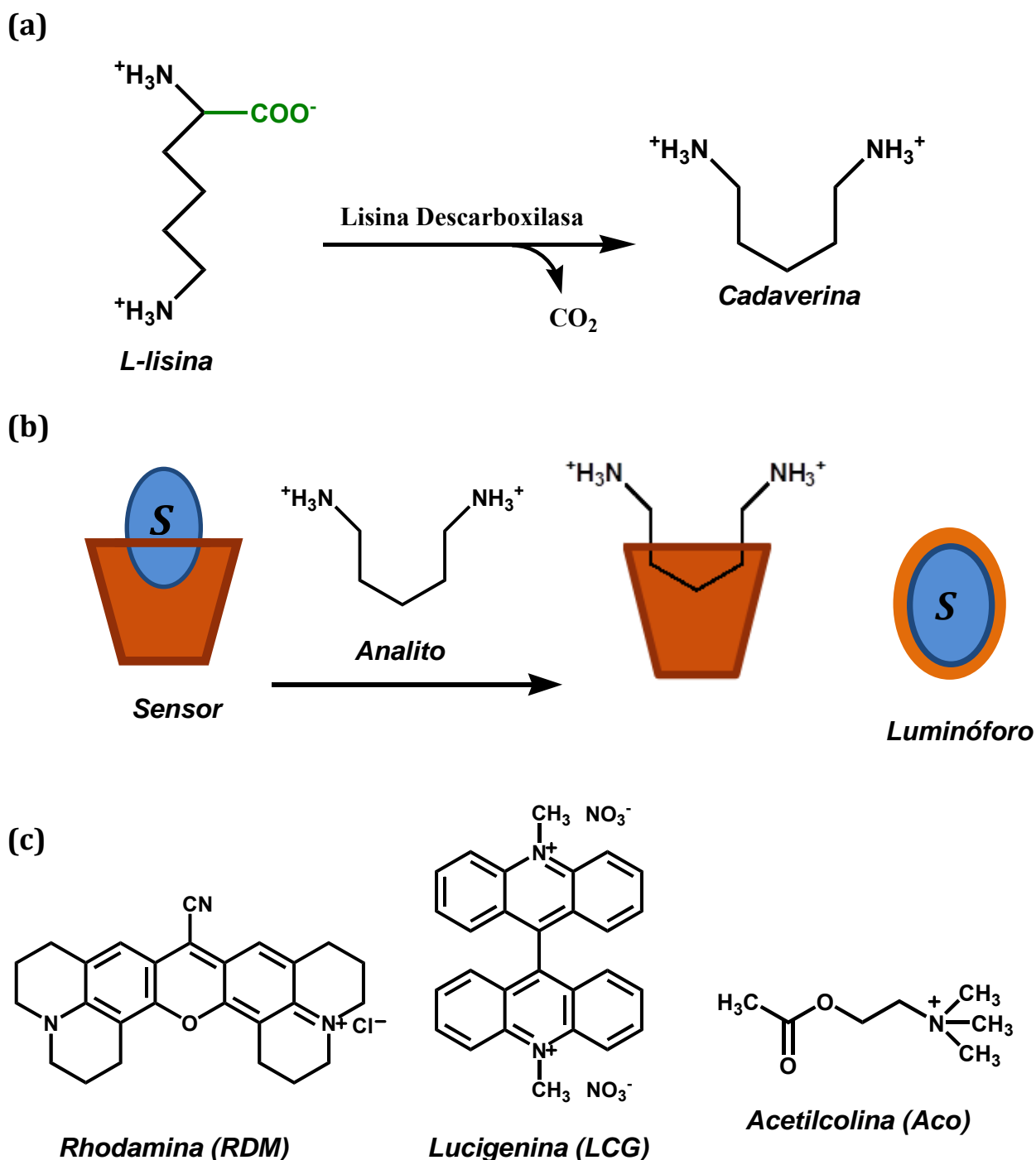


Figura 2-23. Método de detección fluorescente por reacción de desplazamiento. (a) Reacción catalizada por lisinadescarboxilasa, (b) principio de la detección fluorescente, y (c) rodamina (RDM) y lucigenina (LCG) dos sondas fluorescentes empleadas para formar los sensores y acetilcolina (Aco) un neurotransmisor detectado con un complejo RDM-CA[8]S

Existe una diversidad de técnicas para la determinación de gran variedad de analitos orgánicos presentes en diferentes matrices naturales, entre las que se pueden nombrar CG-MS, HPLC con detección quimioluminiscente, determinaciones colorimétricas, radioinmunoensayos, métodos electroquímicos con electrodos modificados, etc. Sin embargo, muchos de estos métodos presentan procedimientos extensos y complicados, y requieren además un costoso equipamiento.

El empleo de macrociclos orgánicos en el mejoramiento de técnicas analíticas basadas en el incremento (o disminución, o quenching) de emisión fluorescente, por formación de especies supramoleculares, es un campo de estudio importante en la actualidad dentro de la química analítica supramolecular.

En el presente trabajo de tesis se emplean procedimientos simples con detección fluorescente para el estudio de complejos del tipo sustrato-receptor y la utilización de una de estas especies en el marco de la química analítica. La espectroscopia de fluorescencia es una técnica simple, rápida y altamente sensible (con detección de concentraciones μM – nM);^{7,77,80} que a diferencia de otras técnicas como CG-MS, HPLC y radioinmunoensayos no requiere de complicados pretratamientos de la muestra.

2.2. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. W. Steed, D. R. Turner, K. J. Wallece. *“Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry”*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, England (2007).
- [2] J. M. Lehn. *“Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives”*. VCH: Weinheim, (1995).
- [3] D. Philp and J. F. Stoddart. *“Self-Assembly in Natural and Unnatural Systems”*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 35 (1996) 1154 – 1196.
- [4] C. A. Schalley. *“Analytical Methods in Supramolecular Chemistry”*. 2^{da} Ed. Willey-VCH Verlag& Co. KGaA, Germany (2012).
- [5] J. W. Steed; J. L. Atwood. *“Supramolecular Chemistry”*. John Wiley & Sons Ltd: Chichester, England, (2000).
- [6] J. Szejtli. *“Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry”*. Chem. Rev., 98 (1998) 1743 – 1753.
- [7] P. Mura. *“Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review”*. J. Pharm. Biomed. Anal., 101C (2014) 238 – 250.
- [8] K. Oshita, T. Takayanagi, M. Oshima, S. Motomizu. *“Complex formation analysis of wáter-soluble calixarenes by capillary zone electrophoresis”*. J. Chromatogr. A, 934 (2001) 113 – 122.
- [9] A. Prasanna de Silva, H. Q. NimalGunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, and T. E. Rice. *“Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches”*. Chem. Rev., 97 (1997) 1515 – 1566.
- [10] M. Becuwe, D. Landy, F. Delattre, F. Cazier, and S. Fourmentin. *“Fluorescent Indolizine- β -Cyclodextrin Derivatives for the Detection of Volatile Organic Compounds”*. Sensors, 8 (2008) 3689 – 3705.
- [11] Y. Liu, J. Shi, and D. S. Guo. *“Novel Permethylated β -Cyclodextrin Derivatives Appended with Chromophores as Efficient Fluorescent Sensors for the Molecular Recognition of Bile Salt”*. J. Org. Chem., 72 (2007) 8227 – 8234.
- [12] H. Bricout, F. Hapiot, A. Ponchel, S. Tilloy, and E. Monflier. *“Chemicalle Modified Cyclodextrins: An attractive Class of Supramolecular Hosts for the Development of Aqueous Biphasic Catalytic Prosesses”*. Sustainability, 1 (2009) 924 – 945.
- [13] R. Breslow and S. D. Dong. *“Biomimetic Reactions Catalyzed by Cyclodextrins and Their Derivatives”*. Chem. Rev., 98 (1998) 1997 – 2011.
-

- [14] a) S. Li, W. C. Purdi. *“Cyclodextrins and Their Applications in Analytical Chemistry”*. Chem. Rev., 92 (1992) 1457 – 1470. b) L. Szenté, and J. Szemán. *“Cyclodextrins in Analytical Chemistry: Utility of Host-Guest Type Molecular Recognition”*. Anal. Chem., 85 (2013) 8024 – 8030.
- [15] K. Uekama, F. Hirayama, and T. Irie. *“Cyclodextrin Drug Carrier Systems”*. Chem. Rev., 98 (1998) 2045 – 2076.
- [16] R. Mateen, T. Hoare. *“Carboxymethyl and hydrazide functionalized β -cyclodextrin derivatives: A systematic investigation of complexation behaviours with the model hydrophobic drug dexamethasone”*. Int. J. Pharm., 472 (2014) 315 – 326.
- [17] J. Garrido, F. Cagide, M. Melle-Franco, F. Borges, E. M. Garrido. *“Microencapsulation of herbicide MCPA with native β -cyclodextrin and its methyl and hydroxypropyl derivatives: An experimental and theoretical investigation”*. J. Mol. Struct., 1061 (2014) 76 – 81.
- [18] É. Fenyvesi, J. Szemán, K. Csabai, M. Malanga, L. Szenté. *“Methyl-Beta-Cyclodextrins: The Role of Number and Types of Substituents in Solubilizing Power”*. J. Pharm. Sci., 103 (2014) 1443 – 1452.
- [19] C. D. Gutsche. *“Calixarenes: An Introduction”*. 2^{da} Ed., RCS Publishing, Cambridge (2008).
- [20] R. Kaliappan, Y. Ling, A. E. Kaifer, and V. Ramamurthy. *“Sulfonatocalix[8]arene as a Potential Reaction Cavity: Photo- and Electro-active Dicationic Guests Arrest Conformational Equilibrium”*. Langmuir, 25 (2009) 8982 – 8992.
- [21] M. Giannetto, G. Mori, A. Notti, S. Pappalardo, and M. F. Parisi. *“Discrimination between Butylammonium Isomers by Calix[5]arene-Based ISEs”*. Anal. Chem., 70 (1998) 4631 – 4635.
- [22] M. Pitarch, J. K. Browne and M. A. McKerverey. *“Conformational Control in the Synthesis of Mixed Tetraethers of Calix[4]arene”*. Tetrahedron Lett., 53 (1997) 10503 – 10512.
- [23] C. D. Gutsche, L. J. Bauer. *“Calixarenes. 13. The conformational properties of calix[4]arenes, calix[6]arenes, calix[8]arenes, and oxacalixarenes”*. J. Am. Chem. Soc., 107 (1985) 6052 – 6059.
- [24] S. Shinkai, S. Mori, H. Koroshi, T. Tsubaki, and O. Manabe. *“HexasulfonatoCalix[6]arene Derivatives: A New Class of Catalysts, Surfactants, and Host Molecules”*. J. Am. Chem. Soc., 108 (1986) 2409 – 2416.

- [25] D. S. Guo, V. D. Uzunova, X. Su, Y. Liu, and W. M. Nau. “Operational calixarene-based fluorescent sensing systems for choline and acetylcholine and their application to enzymatic reactions”. *Chem. Sci.*, 2 (2011) 1722.
- [26] T. Grady, S. J. Harris, M. R. Smyth, and D. Diamond. “Determination of the Enantiomeric Composition of Chiral Amines Based on the Quenching of the Fluorescence of a Chiral Calixarene”. *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3775 – 3782.
- [27] S. Shinkai, H. Koreishi, K. Ueda, T. Arimura, and O. Manabe. “Molecular Design of Calixarene-Based Uranophiles Which Exhibit Remarkably High Stability and Selectivity”. *J. Am. Chem. Soc.*, 109 (1987) 6371 – 6376.
- [28] S. Shinkai, S. Mori, T. Tsubaki, T. Sone, O. Manabe. “New water-soluble host molecules derived from calix[6]arene”. *Tetrahedron Lett.*, 25 (1984) 5315-5318.
- [29] S. Shinkai, K. Araki, T. Tsubaki, T. Arimura, O. Manabe. “New syntheses of calixarene-*p*-sulphonates and *p*-nitrocalixarenes”. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1 (1987) 2297 – 2299.
- [30] E. Da Silva, P. Shahgaldian, A. W. Coleman. “Haemolytic properties of some water-soluble para-sulphonato-calix-[*n*]-arenes”. *Int. J. Pharm.*, 273 (2004) 57 – 62.
- [31] S. Shinkai, T. Arimura, H. Satoh, and O. Manabe. “Chiral Calixarene”. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 19 (1987) 1495 – 1496.
- [32] T. Arimura, H. Kawabata, T. Matsuda, T. Muramatsu, H. Satoh, K. Fujio, O. Manabe, S. Shinkai. “New water-soluble host calixarenes bearing chiral substituents”. *J. Org. Chem.*, 56 (1991) 301 – 306.
- [33] G. Gübitz, and M. G. Schimid. “Chiral Separation by Chromatographic and Electromigration Techniques. A Review”. *Biopharm. Drug. Dispos.*, 22 (2001) 291 – 336.
- [34] W. Yang, and M. M. de Villiers. “Effect of 4-Sulphonato-Calix[*n*]Arenes and Cyclodextrins on the Solubilization of Niclosamide, a Poorly Water Soluble Anthelmintic”. *The AAPS Journal*, 7 (2005) E241 – E248.
- [35] K. Araki, K. Iwamoto, S. Shinkai, T. Matsuda. “*pK_a* of calixarenes and analogs in nonaqueous solvents”. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 63 (1990) 3480 – 3485.
- [36] J. Scharff, M. Mahjoubi, R. Perrin. “Synthesis and acid-base properties of calix[4], calix[6] and calix[8]arene *p*-sulfonic acids”. *New J. Chem.*, 15 (1991) 883.
- [37] I. Ghosh, W. M. Nau. “The strategic use of supramolecular *pK_a* shifts to enhance the bioavailability of drugs”. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64 (2012) 764 – 783.
-

- [38] W. H. Huang, S. Liu, L. Isaacs. “*Cucurbit[n]urilos*”, in: F. Diederich, P. J. Stang, R. R. Tykwinski (Eds), “*Modern Supramolecular Chemistry*”. Wiley-VCH, Weinheim, (2008) 113 – 142.
- [39] D. Z. Jiao, N. Zhao, O. A. Scherman. “*A Green method for isolation of cucurbit[7]uril via a solid state metathesis reaction*”. Chem. Commun., 46 (2010) 2007 – 2009.
- [40] V. Saluja, and B. S. Sefhon. “*Calixarenes and cucurbiturils: Pharmaceutial and biomedical applications*”. J. Pharm. Educ. Res., 4 (2013) 16 – 25.
- [41] E. Masson, X. Ling, R. Joseph, L. Kyeremeh-Mensah, and X. Lu. “*Cucurbituril chemistry: a tale of supramolecular success*”. RSC Adv., 2 (2012) 1213 – 1247.
- [42] J. L. Manzoori, H. Abdolmohammad-Zadeh, M. Amjadi. “*Study on the inclusion complex between β -cyclodextrin and celecoxib by spectrofluorimetry and its analytical application*”. IL Farmaco, 60 (2005) 575 – 581.
- [43] M. Shaikh, Y. M. Swamy, H. Pal. “*Supramolecular host-guest interaction of acridina dye with cyclodextrinmacrocycles: Photophysical, pKa shift and quenching study*”. J. Photochem. Photobiol., A: Chemistry, 258 (2013) 41 – 50.
- [44] N. Kandoth, S. Dutta Choudhury, T. Mukherjee and H. Pal. “*Host-guest interaction of 1,4-dihydroxy-9,10-anthraquinone (quinizarin) with cyclodextrins*”. Photochem. Photobiol. Sci., 8 (2009) 82 – 90.
- [45] T. N. Burai, N. Bag, S. Agarwal, E. S. Subramaniamlyer, AnindyaDatta. “*Modulation of fluorescence properties of MMeAQ in micelles and cyclodextrins*”. Chem. Phys. Lett., 495 (2010) 208 – 211.
- [46] T. N. Burai, D. Panda, A. Datta. “*Fluorescence enhancement of epicocconone in its complexes with cyclodextrins*”. Chem. Phys. Lett., 455 (2008) 42 – 46.
- [47] K. N. Baglole, P. G. Boland, Brian D. Wagner. “*Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion into parent and midifiedcyclodextrins*”. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry, 173 (2005) 230 – 237.
- [48] M. Megyesi, L. Biczók. “*Considerable enhancement upon supramolecular complex formation between berberine and p-sulfonated calixareno*”. Chem. Phys. Lett., 424 (2006) 71 – 76.
- [49] G. Hua, J. Broderick, K. T. Semple, K. Killham, I. Singleton. “*Rapid quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in hydroxypropyl-b-cyclodextrin (HPCD) soil extracts by synchronous fluorescence spectroscopy (SFS)*”. Environ. Pollut., 148 (2007) 176 – 181.
-

- [50] M. Inouye, K. Hashimoto, K. Isagawa. “*Nondestructive Detection of Acetylcholine in Protic Media: Artificial-Signaling Acetylcholine Receptors*”. *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 5517 – 5518.
- [51] D. S. Guo, V. D. Uzunova, X. Su, Y. Liu, and W. M. Nau. “*Operational calixare-based fluorescent sensing systems for choline and acetylcholine and their application to enzymatic reactions*”. *Chem. Sci.*, 2 (2011) 1722 – 1734.
- [52] F. Hapiot, A. Ponchel, S. Tilloy, E. Monflier. “*Cyclodextrins and their applications in aqueous-phase metal-catalyzed reactions*”. *C. R. Chimie*, 14 (2011) 149 – 166.
- [53] J. Potier, A. Guerriero, S. Menuel, E. Monflier, M. Peruzzini, F. Hapiot, L. Gonsalvi. “*Cyclodextrins as first and second sphere ligands for Rh(I) complexes of lower-rim PTA derivatives for use as catalysts in aqueous*”. *Catal. Commun.*, (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.catcom.2014.11.030>.
- [54] H. Bricout, L. Caron, D. Bormann, E. Monflier. “*Substrate-selective catalysis in an aqueous biphasic system with per(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin*”. *Catal. Today*, 66 (2001) 355 – 361.
- [55] H. A. Zahalka, K. Januszkiewicz, and H. Alper. “*Olefin oxidation catalyzed by palladium chloride using cyclodextrins as phase transfer agents*”. *J. Mol. Catal.*, 35 (1986) 249 – 253.
- [56] A. Harada, Y. Hu, and S. Takahashi. “*Cyclodextrin-Palladium Chloride. New Catalytic System for Selective Oxidation of Olefins to Ketones*”. *Chem. Lett.*, 15 (1986) 2083 – 2084.
- [57] J. T. Lee, and H. Alper. “*The Hydridopentacyanocobaltate Anion Induced Deoxygenation of Allylic Alcohols using β -Cyclodextrin as a Phase Transfer Agent*”. *Tetrahedron Lett.*, 31 (1990) 4101 – 4104.
- [58] J. T. Lee, and H. Alper. “ *β -Cyclodextrin and Hydridopentacyanocobaltate Catalyzed Selective Hydrogenation of α,β -Unsaturated Acids and Their Derivatives*”. *Tetrahedron Lett.*, 31 (1990) 1941 – 1942.
- [59] C. Pinel, N. Gendreau-Diaz, A. Bréhéret, M. Lemaire. “*Asymmetric hydrogenation of α -keto ester with diamine-complexed metal*”. *J. Mol. Catal., A: Chemical*, 112 (1996) L157 – L161.
- [60] J. T. Lee, and H. Alper. “*Regioselective Hydrogenation of Conjugated Dienes Catalyzed by Hydridopentacyanocobaltate Anion Using β -Cyclodextrin as the Phase-*

Transfer Agent and Lanthanide Halides as Promoters". J. Org. Chem., 55 (1990) 1854 – 1856.

[61] E. A. Karakhanov, T. Y. Filippova, S. A. Martynova, A. L. Maximov, V. V. Predeina, I. N. Topchieva. "New catalytic systems for selective oxidation of aromatic compounds by hydrogen peroxide". Catal. Today, 44 (1998) 189 – 198.

[62] E. Karakhanov, Y. Kardasheva, A. Kirillov, A. Maximov, V. Predeina, E. Runova. "Surface Active Macromolecular and Supramolecular Complex: Design and Catalysis". Macromol. Symp., 156 (2000) 137 – 145.

[63] S. Tilloy, H. Bricout, and E. Monflier. "Cyclodextrins as inverse phase transfer catalysts for the biphasic catalytic hydrogenation of aldehydes: a green and easy alternative to conventional mass transfer promoters". Green Chem., 4 (2002) 188 – 193.

[64] E. Monflier, S. Tilloy, Y. Castanet, and A. Mortreux. "Chemically Modified β -Cyclodextrins: Efficient Supramolecular Carriers for the Biphasic Hydrogenation of Water-Insoluble Aldehydes". Tetrahedron Lett., 39 (1998) 2959 – 2960.

[65] F. Hapiot, J. Lyskawa, H. Bricout, S. Tilloy, E. Monflier. "Cyclodextrins or Calixarenes: What is the Best Mass Transfer Promoter for Suzuki Cross-Coupling Reactions in Water?". Adv. Synth. Catal., 346 (2004) 83 – 89.

[66] T. Lacroix, H. Bricout, S. Tilloy, and E. Monflier. "Chemically Modified β -Cyclodextrins as Supramolecular Carriers in the Biphasic Palladium-Catalyzed Cleavage of Allylic Carbonates: Activity Enhancement and Substrate-Selective Catalysis". Eur. J. Org. Chem., 11 (1999) 3127 – 3129.

[67] R. N. Dsouza, and W. M. Nau. "Triple Molecular Recognition as a Directing Element in the Formation of Host-Guest Complexes with *p*-Sulfonatocalix[4]arene and β -Cyclodextrin". J. Org. Chem., 73 (2008) 5305 – 5310.

[68] H. Bakirci, A. L. Koner, and W. M. Nau. "Spherical Shape Complementarity as an Overriding Motif in the Molecular Recognition of Noncharged of Bicyclic Azoalkanes". J. Org. Chem., 70 (2005) 9960 – 9966.

[69] M. V. Rekharsky, H. Yamamura, M. Kawai, I. Osaka, R. Arakawa, A. Sato, Y. H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim, and Y. Inoue. "Sequential Formation of a Ternary Complex among Dihexylammonium, Cucurbit[6]uril, and Cyclodextrin with Positive Cooperativity". Org. Lett., 8 (2006) 815 – 818.

- [70] F. Trotta, M. Zanetti, and R. Cavalli. “Cyclodextrin-based nanosponges as drug carriers”. *Beilsteins J. Org. Chem.*, 8 (2012) 2091 – 2099.
- [71] M. D. Moya-Ortega, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, T. Loftsson. “Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications”. *Int. J. Pharm.*, 428 (2012) 152 – 163.
- [72] J. L. Manzoori, H. Abdolmohammad-Zadeh, M. Amjadi. “Study on the inclusion complex between β -cyclodextrin and celecoxib by spectrofluorimetry and its analytical application”. *IFarmaco*, 60 (2005) 575 – 581.
- [73] Y. J. Zhang, W. X. Cao, J. Xu. “Interaction of Sulfonated Calix[n]erenes with Rhodamina B and Its Application to Determine Acetylcholine in a Real Neutral Aqueous Medium”. *Chin. J. Chem.*, 20 (2002) 322 – 326.
- [74] Ü. Ocak, M. Ocak, R. Bartsch. “Calixarenes with dansyl groups as potential chemosensors”. *Review. Inorg. Chim. Acta*, 381 (2012) 44 – 57.
- [75] T. Horiuchi, N. Iki, H. Hoshino. “Detection of cationic guest molecules by quenching of luminescence of a self-assembled host molecule consisting of terbium(III) and calix[4]arene-*p*-tetrasulfonates”. *Anal. Chim. Acta*, 650 (2009) 258 – 263.
- [76] V. Wintgens, C. Amiel, L. Biczók, Z. Miskolczy, M. Megyesi. “Host-guest interactions between 4-sulfonatocalix[8]arene and 1-alkyl-3-methylimidazolium type ionic liquids”. *Thermochim. Acta*, 548 (2012) 76 – 80.
- [77] T. Jin. “Near-Infrared Fluorescence Detection of Acetylcholine in Aqueous Solution Using a Complex of Rhodamine 800 and *p*-Sulfonatocalix[n]arene”. *Sensors*, 10 (2010) 2438 – 2449.
- [78] A. Hennig, H. Bakirci, and W. M. Nau. “Label-free continuous enzyme assays with macrocycle-fluorescent dye complexes”. *Nat. Methods*, 4 (2007) 629 – 632.
- [79] E. W. Gerner, and F. L. Jr. Meyskens. “Polyamines and cancer old molecules, new understanding”. *Nat. Rev. Cancer*, 4 (2004) 781 – 792.
- [80] L. Pu. “Fluorescence of Organic Molecules in Chiral Recognition”. *Chem. Rev.*, 104 (2004) 1687 – 1716.

CAPÍTULO 3

CAPITULO 3

EFECTO DE RECEPTORES MACROCÍCLICOS SOBRE LAS PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE CARBAZOL Y QUINOLINA

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados (HAPN) son una clase de compuestos orgánicos constituidos por dos o más anillos fusionados en donde además de átomos de carbono e hidrógeno tienen unos pocos átomos de nitrógeno formando parte de la estructura. Los HAPN forman parte de la gran familia de compuestos denominados hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Estos compuestos proceden tanto de fuentes naturales como antropogénicas, y se encuentran en forma de mezclas complejas en el agua, el aire y el suelo.¹

Los HAPN son en gran medida agentes contaminantes. Gran cantidad de HAPN se liberan al medio ambiente durante la combustión incompleta o la pirólisis de materia orgánica. Las principales fuentes de emisión de estos contaminantes se producen a partir de incendios forestales, quema de maderas en hogares, tubos de escape de vehículos, humo de cigarrillo, carbón, petróleo, incineración de desechos industriales, municipales y peligrosos, descargas de plantas industriales y de tratamiento de aguas residuales, etc.¹

Por otro lado, ciertos núcleos de HAPN se han encontrado en algunos alcaloides biológicamente relevantes.^{2,3,4} Por ejemplo, el carbazol (CZL, **1**) se encuentra en compuestos naturales como la olivacina y la elipticina (figura 3-1)⁵ que actúan como intercaladores del ADN inhibiendo la replicación del mismo y la transcripción del ARN, por lo que han sido empleados como agentes antitumorales.^{5,6} También constituye el núcleo base de alcaloides β -carbolínicos que presentan propiedades alucinógenas, actividad farmacológica y antiviral.^{7,8} Otro ejemplo, es la quinolina (QUI, **2**), este núcleo heterocíclico

se encuentra presente en alcaloides derivados de la cinchona⁹ y en una gran cantidad de sustancias farmacológicamente activas, con importante actividad biológica, antimalarial, antibacterial, antifúngica, antihelmíntica, cardiotónica, anticonvulsiva, antiinflamatoria y analgésica.^{10,11} En la figura 3-1 se muestran dos compuestos que continen el núcleo QUI, la quinina y la cloroquina, la primera se utiliza como antimalárico, y la segunda posee propiedades antipiréticas, antipalúdicas y analgésicas. Además, la QUI y algunos de sus derivados se emplean principalmente para la preparación de agroquímicos y colorantes.¹² Por otra parte, la oxidación de QUI proporciona ácido quinolínico (piridina-2,3-dicarboxílico), un precursor para la obtención de herbicidas; y se utiliza para la síntesis de 8-hidroxiquinolina que es un importante precursor de pesticidas.¹³

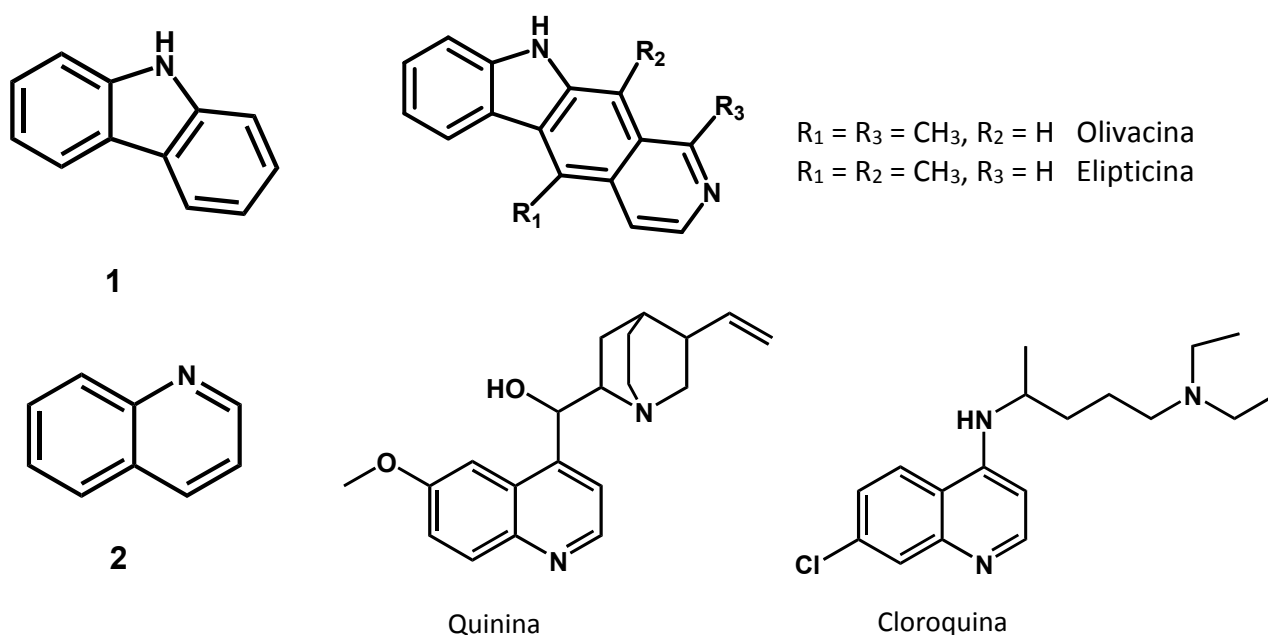


Figura 3-1. Carbazol (CZL) y Quinolina (QUI) y algunos compuestos naturales que poseen en su estructura tales núcleos.

Existe una gran cantidad de HAPN en corrientes de líquidos hidrocarbonados derivados del petróleo, tal como el gasoil de destilación directa, aceite de ciclo ligero (fracción de hidrocarburos con pto. eb. 205 – 345 °C), y gasoil de coquización, que se utilizan habitualmente para la reserva diesel en refinerías.¹³ Estos compuestos desactivan a los catalizadores empleados para los procesos de refinamiento de combustibles.^{14,15} Además, la presencia de HAPN en el combustible final reduce la estabilidad térmica y

oxidativa, además de afectar el color y aroma del producto.^{14,15} Por último, la aparición de esta clase de compuestos en combustibles incrementa la emisión de óxidos de nitrógeno cuando el combustible se quema.¹⁴

Los procesos de transporte, distribución y persistencia de HAPN en el medio ambiente, sistemas vivos y alimentos dependen de las propiedades físicas y químicas (solubilidad en agua, volatilidad, reactividad química, degradación biótica y abiótica), de cada compuesto en particular. En el agua, se encuentran generalmente disueltos en algún contaminante oleoso o adsorbidos sobre partículas húmicas debido a la baja solubilidad en este medio.¹⁶ En el aire están presentes como vapores o adsorbidos sobre la superficie de partículas sólidas dependiendo de las características individuales de cada hidrocarburo.¹³ En el ambiente, se degradan por la acción de microorganismos y/o mediante reacciones fotoquímicas y de oxidación con la luz solar y otros compuestos químicos.¹³

Las principales vías de exposición de HAPN son mediante inhalación, contacto cutáneo e ingestión.¹⁷ La exposición por inhalación varía según el grado de urbanización, tráfico e industrialización. Las vías de ingreso en la población no fumadora son fundamentalmente a través del aire respirado y el consumo de alimentos y bebidas contaminados. Mientras que la exposición relacionada a las actividades laborales en refinerías de petróleo, industria minera, metalúrgica y de transporte, entre otras, es principalmente por inhalación y adsorción dérmica.¹³

En general, los HAP absorbidos por el organismo de humanos y animales ingresan a todos los tejidos pero tienden a almacenarse en los tejidos adiposos. En los sistemas biológicos los hidrocarburos aromáticos policíclicos se transforman en una mezcla de quininas, epóxidos, fenoles, dioles, trioles y tetraoles por diferentes vías metabólicas.¹³ La mayoría de los metabolitos se eliminan en las heces y en menor proporción en la orina.¹⁸ Sin embargo, algunos HAP se transforman en sustancias involucradas en procesos mutagénicos, cancerígenos y de disrupción hormonal.¹³

El efecto causado en la salud depende de cada HAPN y es determinado por diferentes factores, como tipo y gravedad del efecto, dosis dañina, vía y tiempo de exposición, características y hábitos del individuo (edad, sexo, estado nutricional, etc.), presencia de otras sustancias químicas, etc. La exposición prolongada de humanos a mezclas

complejas de HAP y otros compuestos químicos a través de la respiración o el contacto dérmico puede producir cáncer.¹³ Basándose en los efectos adversos que estos compuestos causan sobre la salud, algunos HAPN se incluyeron en las listas de contaminantes prioritarios de diferentes entidades, como: US EPA (siglas en inglés correspondientes a la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos), ATSDR (siglas en inglés correspondientes a la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de los Estados Unidos),¹⁹ IARC (siglas en inglés correspondiente a la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer),²⁰ EFSA (siglas en inglés correspondientes a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria),¹³ entre otras.

En base a la problemática que representa la exposición a los HAPN, es importante la detección y cuantificación de estos contaminantes. Las técnicas analíticas empleadas para tal fin son principalmente cromatográficas. Además, ciertos organismos y metabolitos son usados como biomarcadores, por ejemplo, algunos moluscos bivalvos son buenos indicadores del nivel de polución en aguas contaminadas con HAP debido a que presentan la habilidad de filtrar agua pero no metabolizan eficientemente todos los HAP.²¹

3.1.2. Técnicas Espectroscópicas

En el análisis de especies supramoleculares como los complejos huésped-receptor, las técnicas espectroscópicas constituyen un importante recurso para la caracterización de tales estructuras. Todos los métodos espectroscópicos se basan en la medición de la variación de una señal (en absorbancia, corrimiento químico en RMN, intensidad de fluorescencia, etc.) del sistema en estudio.²² Por lo tanto, para la aplicabilidad de alguna de estas técnicas es necesario que dicha variación pueda ser detectada con suficiente precisión.^{22,23}

La mayoría de estas metodologías consisten en trabajar a una concentración fija del sustrato o huésped, variando la concentración del receptor macrocíclico o viceversa. Por lo que se requiere de la preparación de un gran número de soluciones de muestra.

3.1.2.1. Espectroscopia UV-Visible

La espectroscopia UV-Visible es una técnica simple y útil para analizar la formación de complejos huésped-receptor en solución. La formación de complejo suele dar lugar a una modificación en el espectro de absorción de la molécula huésped y de esta forma evidenciar la formación de la especie supramolecular.

La modificación del espectro de absorción del cromóforo puede deberse a un cambio de polaridad en su entorno. La inclusión, desde un medio polar, hacia el interior de una cavidad hidrofóbica, es la causa de la variación observada en la señal espectroscópica de muchos sistemas supramoleculares de este tipo.^{22,23}

Como resultado de la formación de complejo huésped-receptor se pueden observar cambios batocrómico e hipsocrómico del máximo de absorción y/o aumento o disminución de la intensidad de absorción.²² Se han publicado numerosos trabajos sobre el incremento en la intensidad de absorción, por la formación de complejos (fundamentalmente con ciclodextrinas), con o sin cambios en su longitud de onda de máxima absorción, λ_{max} .^{24,25,26}

3.1.2.2. Espectroscopia de Fluorescencia

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica instrumental sencilla, rápida y altamente sensible. Es una técnica particularmente útil para investigar la formación de complejos huésped-receptor entre sustratos fluorescentes y receptores macrocíclicos.^{22,27,28,29} Su aplicación precisa de un fluoróforo, pero esto no limita los alcances de la técnica para su aplicación en la detección de especies no fluorescentes.^{30,31,32,33} En la práctica, se requiere de cuidados rigurosos en la preparación de las muestras (ej. empleo de reactivos puros, limpieza de los materiales utilizados, etc.), para evitar interferencias.²²

La inclusión dentro de la cavidad de CDs produce generalmente un aumento de la intensidad de fluorescencia del huésped orgánico debido a la protección hacia procesos de quenching y de procesos de decaimiento no radiactivo.³⁴ Por ejemplo, la fluorescencia del naproxeno (un analgésico de uso general) y la benzocaína (un anestésico de uso local), fue incrementada en presencia de β -CD y derivados metilados e hidroxipropilados proporcionando evidencia de la formación de complejos de inclusión; la emisión de

fluorescencia del gemfibrozil (derivado del ácido fíbrico, que se utiliza para disminuir niveles de triglicéridos en sangre), fue exaltada en presencia de γ -CD, y aún más en presencia del derivado hidroxipropil- γ -CD, debido a que la inclusión de su anillo aromático dentro de la cavidad tuvo un efecto de protección del estado excitado.³⁵

3.2. OBJETIVOS

En esta parte del trabajo de tesis se propuso estudiar si se producen interacciones que permitan la formación de complejos del tipo sustrato-receptor entre los sustratos orgánicos carbazol (CZL) y quinolina (QUI), con diferentes receptores macrocíclicos (ciclodextrinas y calixarenos).

Como objetivos específicos se planteó realizar la caracterización espectroscópica de las aminas heterocíclicas CZL y QUI en ausencia y en presencia de los receptores ciclodextrinas α -CD, β -CD, Me β -CD, HP β -CD y γ -CD, y de los receptores *p*-sulfonatocalix[n]arenos CA[6]S y CA[8]S.

3.3 SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.3.1. Instrumentación

El control de la pureza de los reactivos se realizó midiendo el punto de fusión, empleando un fusiómetro electrotérmico Thermo Scientific 9100. La homogenización de las soluciones de cada uno de los reactivos se realizó con un sonicador Arcano modelo PS-10A. Se emplearon baños termostáticos con circulación Haake para el control de la temperatura de las muestras a determinar.

Las mediciones de pH se realizaron con un pHmetro Orion 720^a equipado con electrodo combinado Orion sistema Ross. Este equipo se calibró usando soluciones buffer estándar de pH = 4,008, pH = 6,994 y pH = 9,155 preparadas según la metodología descrita en la literatura.³⁶ Esta calibración se verificó periódicamente.

Los espectros de absorción UV-Visible se obtuvieron en espectrofotómetros Shimadzu UV-2101 PC y/o Shimadzu UV-1800. Los espectros de emisión de fluorescencia se determinaron en espectrofluorímetros JASCO modelo FP-777 y Perkin Elmer modelo LS 55.

Los datos se analizaron con los siguientes programas: Sigma Plot versión 8.0, OriginPro 8 y Conversion Program for ASCII (FP-777) versión 1.03.

3.3.2. Reactivos y Procedimiento

3.3.2.1. Reactivos

Las aminas heterocíclicas carbazol CZL (sólido) y QUI (líquida 99+% de pureza), fueron reactivos de grado analítico Sigma-Aldrich.

Los receptores ciclodextrinas empleados fueron reactivos de grado estándar de laboratorios Roquete y Cerestar. En particular la hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β -CD) empleada tiene un grado de sustitución por unidad de glucosa de 0,61, en cuanto a la metil- β -ciclodextrina (Me β -CD) la fracción de grupos metilo fue de 0,50 por unidad de glucosa

Los derivados *p*-sulfonatocalix[n]arenos, CA[6]S y CA[8]S, fueron sintetizados en colaboración con un laboratorio especializado en síntesis de calixarenos en la universidad de Río Grande del Sur, Brasil.³⁷

La pureza de los mismos se corroboró determinando los puntos de fusión. Los valores obtenidos experimentalmente concuerdan con los valores de referencia (tabla 3.1)

Tabla 3-1. Punto de fusión de los compuestos empleados

Compuesto	Pto. de fusión experimental, °C	Pto. de fusión de referencia, °C
CZL	243,5-246	243-246 ^a
α-CD	278-279	>278 ^b
β-CD	300-301	298-300 ^b
HPβ-CD	278-280	278 ^b
Meβ-CD	283-285	280-282 ^b
γ-CD	>285	267 ^b
CA[6]S	285 – 290 (Descompone)	>320 ^c
CA[8]S	285 – 290 (Descompone)	>300 ^c

(a) Informado por el fabricante código de producto C5132

(b) Informados en <http://www.chemnet.com>

(c) Ref. 38

Los solventes empleados fueron: agua deionizada calidad Milli-Q obtenida de un purificador Millipore, metanol (CH₃OH) grado HPLC Sintorgan y ácido clorhídrico (36 % p/v) de grado analítico (Cicarelli).

3.3.2.2. Preparación de soluciones para la determinación de espectros UV-Visible

Los espectros de absorción (*A*) se determinaron entre 200,0 nm y 400,0 nm usando cubetas de cuarzo de 1,0 cm y de 4,0 cm de paso óptico (*b*). Las mediciones se realizaron a una temperatura controlada de (25,0 ± 0,1) °C.

Se obtuvieron las curvas de calibración de CZL, QUI y de algunos receptores macrocíclicos (CDs y CA[n]S) para establecer un valor de coeficiente de absortividad molar, ϵ^λ , en el medio de trabajo a 25,0 °C.

En la calibración de receptores ciclodextrina (CDs), se prepararon soluciones de concentración entre 1,0 mM hasta 12,0 mM, y para los derivados calixarenos sulfonados (CA[n]S) entre 15,0 μM hasta 120,0 μM. Todos los espectros se registraron descontando previamente la señal del correspondiente blanco.

3.3.2.2.1. Preparación de soluciones de CZL

Las soluciones de CZL en ausencia de receptores macrocíclicos se prepararon partiendo de una solución de CZL, solubilizando 25,0 mg de cristales en un volumen final de metanol igual a 5,0 mL; la concentración de esta solución fue 0,030 M. Empleando la solución anterior se preparó una segunda solución de concentración 3×10^{-4} M, en CH₃OH (estas soluciones se conservaron en heladera, protegidas de la luz y se emplearon durante un tiempo no superior a dos semanas). Esta última solución se utilizó para preparar las restantes soluciones para determinar por UV-Vis, cuyas concentraciones estuvieron comprendidas entre 0,5 μM y 7,5 μM.

Para reducir al mínimo el error en las concentraciones finales de las soluciones, en la determinación de las constantes de asociación, se prepararon dos soluciones, una de ellas manteniendo una concentración fija del sustrato orgánico ([CZL] = 5,6 μM), y la otra con la misma concentración de CZL (5,6 μM) y la máxima concentración del receptor macrocíclico ([CA[n]S] ≈ 100,0 μM, [CD] ≈ 12,0 mM). Luego las soluciones a determinar se

prepararon mezclando estas dos soluciones, variando la concentración del macrociclo receptor entre 0 y 10,0 mM.

Las soluciones a estudiar por espectroscopia fueron preparadas en medio acuoso bufferizado, utilizando un 95,0 % v/v de buffer (pH = 1,00 y pH = 6,994). Se utilizó un 2,0 % v/v de CH₃OH como cosolvente para favorecer la solubilidad de CZL en medio acuoso.

Las soluciones reguladoras de pH = 1,00 (con [HCl] = 0,2 M y [KCl] = 0,2 M),³⁶ pH = 2,101 (con [HCl] = 0,01 M y [NaCl] = 0,09 M)³⁹ y de pH = 6,994 (con [NaH₂PO₄] = 0,02 M; [Na₂HPO₄] = 0,03 M y [NaCl] = 0,02 M),³⁹ se prepararon según el procedimiento descrito en la literatura citada, empleando reactivos de grado analítico. Las soluciones buffer se controlaron por medición experimental.

El efecto de los receptores CDs sobre las propiedades espectroscópicas de CZL se analizó determinando los espectros del sustrato orgánico en presencia de distintas concentraciones del macrociclo, entre 0 y 12,0 mM. Por otro lado, el efecto de receptores CA[n]S se estudio variando la concentración entre 0 y 100,0 μM. Siempre se mantuvo una concentración constante de CZL (alrededor de 6,0 μM).

3.3.2.2.2. Preparación de soluciones de QUI

Las soluciones de QUI en ausencia de receptores macrociclicos se prepararon partiendo de una solución preparada solubilizando 18,5 μL de QUI pura en un volumen final 5,0 mL con metanol; la concentración de esta solución fue 0,031 M. Empleando esta solución se preparó una segunda solución de concentración 5,0 x10⁻⁴ M, en metanol. Estas soluciones se conservaron protegidas de la luz con papel aluminio.

A partir de la solución 5,0 x10⁻⁴ M se prepararon soluciones de QUI, en un intervalo de concentraciones desde 0 μM hasta 36,0 μM en medio acuoso empleando un 95,0 % v/v de buffer pH = 2,101, y desde 0 μM hasta 96,7 μM pH = 6,994. Siempre se utilizó un 2,0 % v/v de CH₃OH como cosolvente para favorecer la solubilidad de QUI.

El efecto de los receptores CDs sobre las propiedades espectroscópicas de QUI se analizó determinando los espectros del sustrato orgánico en presencia de distintas concentraciones del macrociclo, entre 0 mM y 12,0 mM. Por otro lado, el efecto de receptores CA[n]S se estudio variando la concentración entre 0 μM y 100,0 μM. La

concentración de QUI a pH neutro se mantuvo constante en 20,4 μM y a pH ácido en 5,0 μM . Siempre se utilizó un 2,0 % v/v de CH_3OH como cosolvente. En el procesamiento de datos se descontó la señal de A asociada al *blanco* para cada concentración de receptor macrocíclico.

3.3.2.3. Preparación de soluciones para la determinación de espectros de fluorescencia

Para la determinación de espectros de emisión de fluorescencia de las sondas fluorescentes, CZL y QUI, se trabajó con soluciones cuyas concentraciones se encontraron dentro del rango lineal de respuesta del espectrofluorímetro (para CZL entre 0,5 μM y 7,5 μM , y para QUI a pH neutro entre 1,5 μM y 26,0 μM). En todo momento se aseguró que la concentración del sustrato fuera tal que $2,3 \times A < 0,05$ (con un $b = 1,0$ cm). Las muestras preparadas se determinaron dentro de las 24 horas después de prepararse y se procuró protegerlas de la luz cubriendo los matraces con papel aluminio. Los espectros se obtuvieron descontando el blanco correspondiente.

3.3.2.4. Determinación de espectros de emisión de fluorescencia

Las mediciones de fluorescencia se realizaron usando cubetas de cuarzo (con $b = 1,0$ cm). Los espectros se registraron a partir una longitud de onda mayor a la longitud de onda de excitación, λ_{exc} , del fluoróforo hasta una longitud de onda en la que la intensidad de emisión fuera nula. En todos los casos se obtuvieron las áreas absolutas de los espectros de emisión de fluorescencia.

En el estudio por fluorescencia se trabajó con valores de áreas relativas para minimizar errores por causas instrumentales. Utilizando como referencia una solución del fluoróforo de concentración conocida y constante.

3.3.2.4.1. Método para la determinación de espectros de emisión de fluorescencia de CZL

El método utilizado para adquirir los espectros de emisión de fluorescencia de CZL (en equipo JASCO P777), se obtuvo de acuerdo a los siguientes parámetros instrumentales:

- Longitud de Onda de excitación: 290 nm y 322 nm
- Ancho de rendijas de excitación y emisión: 10,0 nm

- Ganancia del fotomultiplicador = Muy baja (very low)
- Velocidad de barrido = 500,0 nm/min

En el estudio utilizando receptores CA[n]S, la λ_{exc} se eligió tal que corresponda a un máximo de A del sustrato, en donde no absorba el receptor macrocíclico o su absorción sea no significativa respecto al fluoróforo ($\lambda_{exc} = 322,0$ nm para CA[n]S ver figura 3-2). Las concentraciones empleadas de receptores CA[n]S fueron desde los 5,0 μ M hasta los 185,6 μ M.

Cuando se trabajó con CDs la λ_{exc} coincidió con un punto isobéptico entre el espectro del sustrato y el correspondiente para el receptor ($\lambda_{exc} = 290,0$ nm). Las concentraciones empleadas de receptores CDs estuvieron en el rango entre 0,005 mM y 0,012 mM.

Se empleo como referencia la señal obtenida de una solución de [CZL] = 5,0 μ M (en equipo JASCO), y [CZL] = 2,0 μ M (en equipo Perquin Elmer LS 55).

3.3.2.4.2. Método para la determinación de espectros de emisión de fluorescencia de QUI

El método utilizado para adquirir los espectros de emisión de fluorescencia de QUI (en equipo Perkin Elmer LS 55), se consiguió eligiendo los siguientes parámetros instrumentales:

- Longitud de Onda De excitación: 312,5 nm
- Ancho de rendijas de excitación y emisión: 10,0 nm
- Potencia del fotomultiplicador = 650 – 700
- Velocidad de barrido = 500,0 nm/min

Tanto para la especie QUI como para la especie QUIH⁺ se excito a 312,5 nm. Solo para la determinación del núcleo neutro QUI fue necesario descontar el blanco con el receptor macrocíclico (CDs y CA[n]S).

Se empleo como referencia la señal obtenida de una solución de [QUI] = 6,0 μ M (en equipo Perquin Elmer LS 55).

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Estudio por espectroscopia UV-Visible

3.4.1.1. Estudio por espectroscopia UV-Visible de CZL, QUI y derivados *p*-sulfonatocalix[n]arenos

En primer lugar, con el fin de realizar una evaluación de la absorción de los sistemas aromáticos de CZL, QUI y los derivados CA[6]S y CA[8]S se determinaron los respectivos espectros de absorción UV-Visible de estos compuestos policíclicos.

Los espectros de absorción experimentales de CZL y de QUI (a dos valores de pH, 2,101 y 6,994), se muestran en la figura 3-2. Las longitudes de onda de máxima absorción para CZL son: 334,6 nm; 322,0 nm; 290,4 nm; 254,8 nm y 232,6 nm. Mientras que para QUI las longitudes de onda de máxima absorción aparecen a: 312,5 nm; 233,0 nm para la especie protonada, QUIH⁺, y 312,5 nm; 299,5 nm; 280,0 nm; 229,5 nm y 224,5 nm para la especie neutra QUI.

El espectro UV-Visible de CZL no se modifica en todo el rango de pH, ya que presenta una única especie ácido base (pK_a del ácido conjugado ≈ -6 ⁴⁰ y de la especie neutra $\approx 19,9$ ⁴¹). En tanto que el núcleo QUI presenta un $pK_a \approx 4,92$ ⁴¹ por lo que, a los pH en que se determinaron los espectros de la figura 3-2b, se encuentra tan solo una de las dos especies ácido-base del núcleo de quinolina. Así, puede corroborarse que la absorción de la especie ácida QUIH⁺ es más intensa y algunas bandas de absorción sufren desplazamiento batocrómico

En la figura 3-3 se muestran los espectros individuales de los receptores *p*-sulfonatocalix[n]areno (CA[6]S y CA[8]S) a dos pH diferentes. Las longitudes de onda de máxima absorción para CA[6]S son: 274,6 nm y 282,6 nm a pH = 2,101 y 281,9 nm a pH = 6,994, a este último pH, presenta a 293,8 nm, un hombro en el espectro; y para CA[8]S son: 275,2 nm y 282,7 nm a pH = 2,101 y 283,5 nm a pH = 6,994, a este último pH presenta un hombro a 294,4 nm.

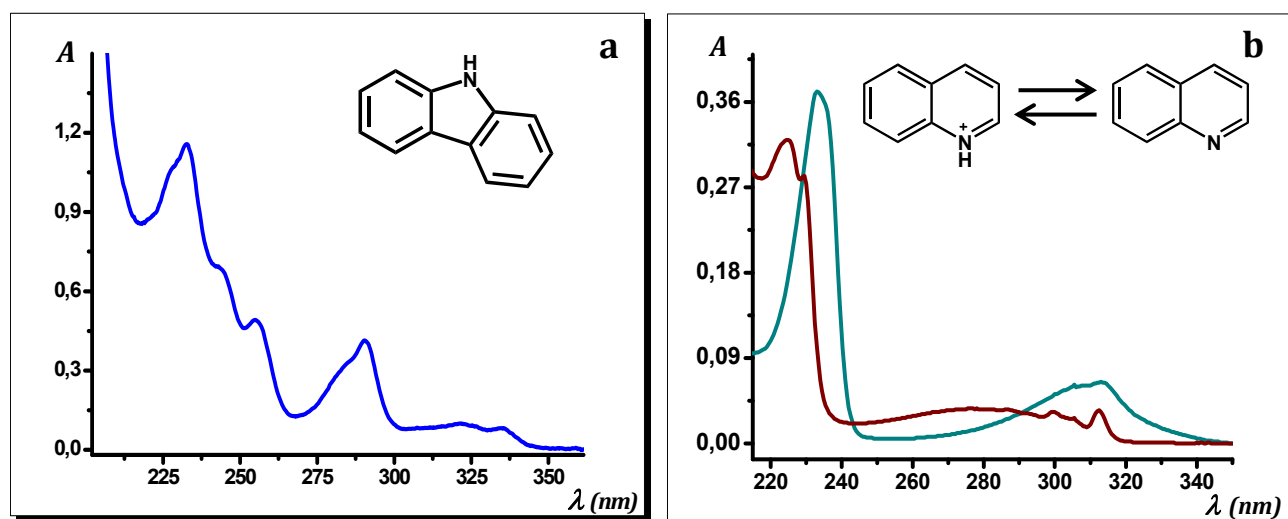


Figura 3-2. Espectros UV-Vis de CZL y QUI. (a) de CZL (—) con un 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994, y (b) QUI (—) con un 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994; y QUIH⁺ (—) con un 95% v/v de buffer HCl 0,01 M/NaCl 0,09 M de pH = 2,101. Las soluciones fueron preparadas con un 2,0 % v/v de CH₃OH y a 25,0 °C. Las concentraciones de los sustratos fueron: [CZL] = 6,02 μM; [QUI] = (8,89 – 9,34) μM.

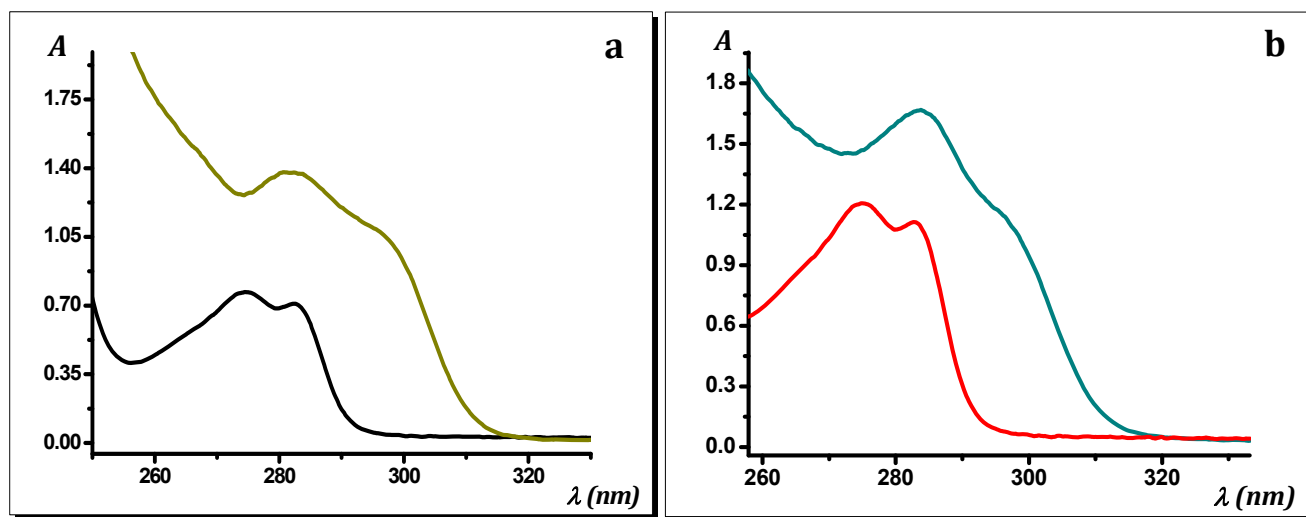


Figura 3-3. Espectros UV-Vis de CA[n]S a dos valores de pH diferentes: (a) [CA[6]S] = 109 μM a 95,0 % v/v HCl 0,01 M/NaCl 0,09 M de pH = 2,101 (—) a 95,0 % v/v buffer fosfato de pH = 6,994 (—), y (b) [CA[8]S] = 115 μM a 95,0 % v/v HCl 0,01 M/NaCl 0,09 M de pH = 2,101 (—), a 95,0 % v/v buffer fosfato de pH = 6,994 (—). CH₃OH 2,0 % v/v; 25,0 °C; en (a) $b = 4,0$ cm y en (b) $b = 1,0$ cm.

3.4.1.2. Determinación de absortividades molares.

Para determinar la concentración de las especies estudiadas por medio de su espectro de absorción se utiliza una curva de calibración y se emplea la ley de Lambert y Beer.²⁶ Esta ley enuncia que la cantidad de luz absorbida por un *cromóforo* es independiente de la potencia o intensidad inicial de luz, I_0 , y que la cantidad de luz absorbida es proporcional a la concentración de las moléculas absorbentes en el paso óptico, b , que el haz recorre a través de la solución.⁴² En la figura 3-4 se esquematiza la absorción de una muestra, dando la expresión para la absorción de luz, A , en función de I_0 y la intensidad del haz de luz transmitido I .

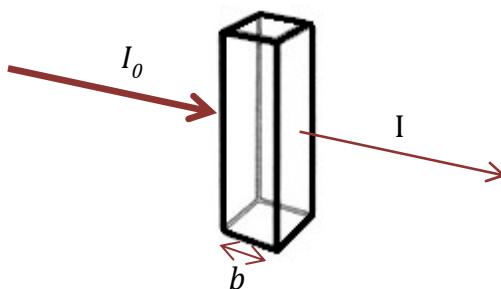


Figura 3-4. Absorción de luz. Ley de Lambert y Beer

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon b [S] = A \quad (3.01)$$

donde A representa la absorbancia, ϵ la constante de proporcionalidad denominada absortividad molar (con unidades $M^{-1}cm^{-1}$), b es la longitud del paso óptico del haz de luz a través de la solución (en cm) y $[S]$ es la concentración del sustrato (expresada en M).⁴² El coeficiente ϵ es una propiedad intrínseca del compuesto en el medio donde está disuelto a la temperatura en que se efectúa su determinación a una dada longitud de onda (λ).

Se registraron espectros UV-Visible de los sustratos orgánicos (S), CZL y QUI. Las soluciones de CZL se prepararon en seis niveles de concentración (1,75; 3,50; 4,38; 5,25;

6,12 y 7,00 μM) a $\text{pH} = 6,994$. En tanto que para QUI se realizaron medidas tanto a $\text{pH} = 2,101$ como a $\text{pH} = 6,994$, obteniendo espectros de absorción para los siguientes niveles de concentración: 6,00; 12,00; 18,00; 24,00; 30,00 y 36,00 μM para la especie ácida QUIH^+ , y 29,02; 38,70; 48,38; 58,05; 67,72; 77,40; 87,08 y 96,75 μM para la especie neutra QUI. En la figura 3-5 se muestran las curvas de calibración tanto para CZL como para QUI, graficando A (a la longitud de onda de máxima absorción, λ_{max}) en función de la $[S]$.

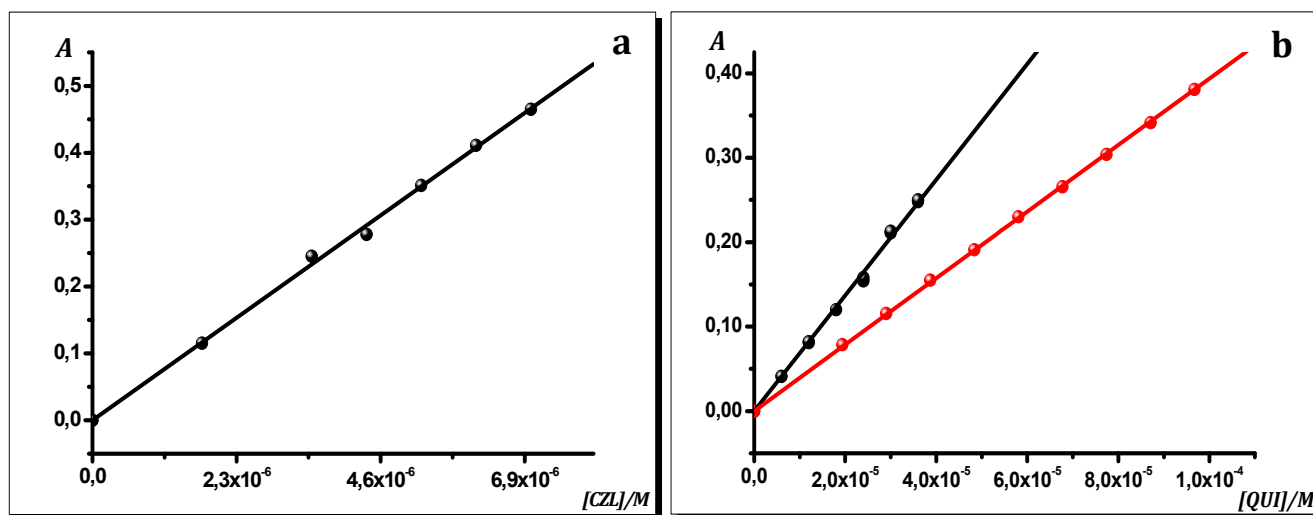


Figura 3-5. Curvas de calibración por UV-Vis de CZL y QUI. (a) CZL en 95,0 % v/v de buffer fosfato de $\text{pH} = 6,994$ a 290,4 nm (—); (b) de QUI en 95,0 % v/v de HCl 0,01 M/NaCl 0,09 M de $\text{pH} = 2,101$ a 312,5 nm (—) y QUI en 95,0 % v/v de buffer fosfato de $\text{pH} = 6,994$ a 312,5 nm (—). Las soluciones se prepararon con un 2,0 % v/v CH_3OH ; 25,0 °C; $b = 4,0$ cm.

A partir de las curvas de calibración en las condiciones mencionadas anteriormente, se obtuvieron los coeficientes de absortividad molar, ϵ , para ambos sustratos orgánicos, mediante el ajuste de la ecuación 3.01.

Los valores de ϵ a las diferentes λ_{max} se muestran en la tabla 3-2. Los ϵ de los receptores calixarenos también se obtuvieron para las condiciones experimentales estudiadas siguiendo el procedimiento detallado en la sección 3.3.2.2. En la tabla 3-3 se exponen los valores de ϵ determinados para los receptores CA[6]S y CA[8]S.

Todas las curvas de calibración presentaron buenos ajustes lineales con coeficientes de correlación entre 0,981 y 0,999 en el intervalo de concentraciones analizado.

Tabla 3-2. Coeficientes de absorptividad molar a longitudes de onda de máxima absorción para CZL y QUI. ^a

CZL		QUI	
λ_{max} , nm	ϵ , $10^3 M^{-1}.cm^{-1}$	λ_{max} , nm	ϵ , $10^3 M^{-1}.cm^{-1}$
232,6	$48,4 \pm 0,9^b$	233,0	$39,2 \pm 0,3^c$
290,4	$16,6 \pm 0,3^b$	312,5	$6,85 \pm 0,06^c$
322,0	$4,2 \pm 0,2^b$	224,8	$33,5 \pm 0,2^b$
334,6	$3,4 \pm 0,2^b$	312,5	$3,938 \pm 0,008^b$

^(a) Los coeficientes de absorptividad molar se expresan con sus desviaciones estándares.

^(b) 95,0 % v/v Buffer fosfato (pH = 6,994), 2,0 % v/v CH₃OH, 25,0 °C.

^(c) 95,0 % v/v HCl 0,01M/NaCl 0,09 M (pH = 2,101), 2,0 % v/v CH₃OH, 25,0 °C.

Tabla 3-3. Coeficientes de absorptividad molar a longitudes de onda de máxima absorción para los derivados CA[n]S empleados. ^a

CA[6]S		CA[8]S	
λ_{max} , nm	ϵ , $10^3 M^{-1}.cm^{-1}$	λ_{max} , nm	ϵ , $10^3 M^{-1}.cm^{-1}$
274,6	$7,20 \pm 0,07^b$	275	$10,2 \pm 0,3$
282,6	$6,48 \pm 0,08^b$	282	$9,7 \pm 3$
281,9	$18,0 \pm 0,1^c$	283	$14,1 \pm 0,3$

^(a) Los coeficientes de absorptividad molar se expresan con sus desviaciones estándares.

^(b) 95,0 % v/v HCl 0,01 M/NaCl 0,09 M (pH = 2,101), 2,0 % v/v CH₃OH, 25,0 °C.

^(c) 95,0 % v/v de Buffer fosfato (pH = 6,994), 2,0 % v/v CH₃OH, 25,0 °C.

3.4.1.3. Efecto de receptores macrocíclicos en la absorción de CZL y QUI

3.4.1.3.1. Efecto de Ciclodextrinas

Para evaluar el efecto de los receptores macrocíclicos sobre las propiedades espectroscópicas de absorción de los heterociclos nitrogenados CZL y QUI, se obtuvieron los espectros UV-Visible en ausencia y en presencia de receptores macrocíclicos.

En la figura 3-6 se muestra el cambio en las curvas espectrales de CZL y QUI cuando están en presencia de un receptor ciclodextrina. Se observan dos comportamientos diferentes: por un lado, la A de CZL se ve incrementada cuando se encuentra presente el receptor β -CD; por otro lado, se observa que la A de QUI en presencia de γ -CD se ve disminuida, en medio acuoso a pH = 6,994. En medio ácido, la absorbancia de CZL y de QUI no se vió afectada de manera significativa en presencia de receptores ciclodextrina.

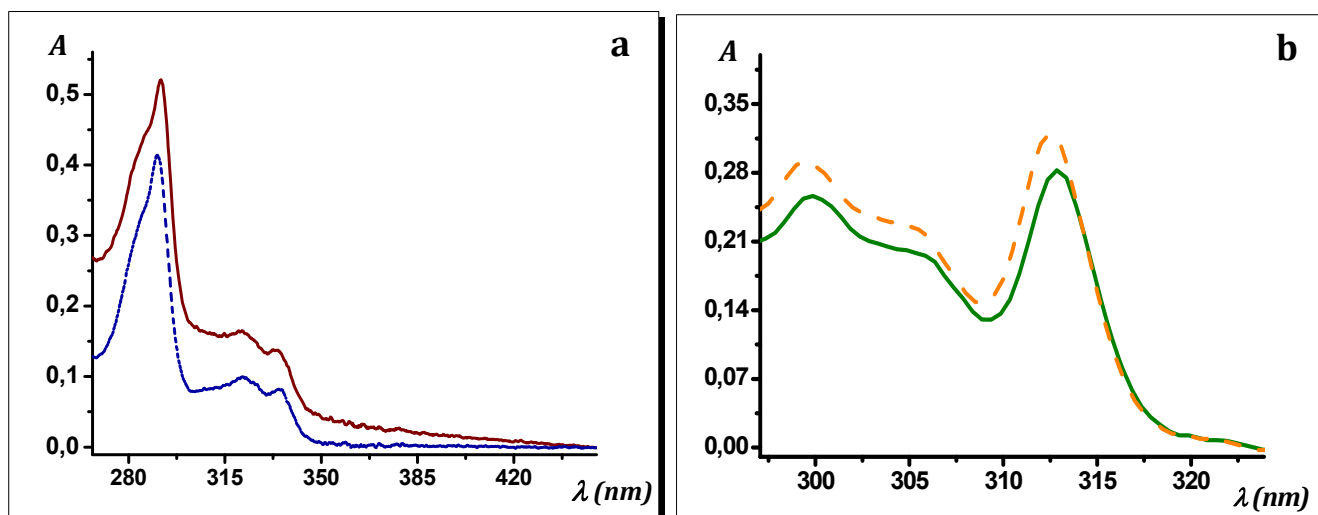


Figura 3-6. Espectros de absorción UV-Visible de CZL y QUI en presencia de una ciclodextrina. (a) de CZL (— — —) en ausencia y (—) en presencia de β -CD ([CZL] = 6,0 μ M; [β -CD] = 10,0 mM); y (b) de QUI (— — —) en ausencia y (—) en presencia de γ -CD ([QUI] = 20,0 μ M; [γ -CD] = 10,0 mM). En 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994; 2,0 % v/v CH_3OH ; 25,0 $^\circ\text{C}$; $b = 4,0$ cm.

Este efecto en el CZL se observó también para los receptores α -CD, HP β -CD y Me β -CD. En tanto que, para QUI se evidenció un cambio similar con los receptores HP β -CD,

Me β -CD y γ -CD. Los cambios espectrales en la A de CZL y QUI, en presencia de CDs, se muestran detallados en la tabla 3-4.

Tabla 3-4. Cambios en el espectro UV-Vis de CZL y QUI en presencia de receptores ciclodextrinas.^a

Receptor	CZL		QUI	
	$\Delta A_{max}^{294,5nm}$	$\Delta\lambda_{max}$, nm	$\Delta A_{max}^{312,5nm}$	$\Delta\lambda_{max}$, nm
α -CD	0,110	0,00	-0,005	-
β -CD	0,106	1,20	-0,031	0,25
HP β -CD	0,126	1,80	-0,024	0,5
Me β -CD	0,040	1,40	-0,037	0,1
γ -CD	-	-	-0,044	0,36

^(a) [CZL] = 6,0 μ M; [QUI] = 20,4 μ M; [CDs] = 10,0 mM; 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994; 2,0 % v/v de CH₃OH; 25,0 °C; b = 4,0 cm.

3.4.1.3.2. Efecto de *p*-sulfonatocalix[n]arenos

En la figura 3-7 se muestra el cambio espectral que sufre el núcleo CZL cuando está en presencia del derivado calixareno CA[6]S a dos valores de pH diferentes (6,994 y 1,00). Se exponen los espectros UV-Visible de las moléculas individuales, la suma de estos espectros y el correspondiente a la mezcla experimental de CZL y CA[6]S. La máxima variación en la absorbancia del sistema es mayor en medio neutro que en condiciones ácidas ($\Delta A_{max}^{272,4} = -0,232$ y $\Delta A_{max}^{274,0} = -0,089$, a pH = 6,994 y pH = 1,00, respectivamente), como puede apreciarse claramente en la figura 3-7. La presencia del derivado CA[8]S también produjo cambios en la absorbancia de CZL en medio neutro ($\Delta A_{max}^{285,9} = 0,162$).

La absorción del núcleo QUI en su forma neutra no sufrió cambios significativos ($\Delta A_{max}^{312,5} = -0,012$ para la especie QUI $\Delta A_{max}^{212,5} = -0,004$ para la especie QUIH⁺) en presencia de los calixarenos sulfonados CA[6]S y CA[8]S. En la figura 3-8 se exponen los espectros de QUI en ausencia y en presencia de CA[6]S a dos valores de pH diferentes (6,994 y 2,101).

Todos los espectros obtenidos en presencia de receptores macrocíclicos se les han descontado las absorbancias asociadas a cada macrociclo (blanco).

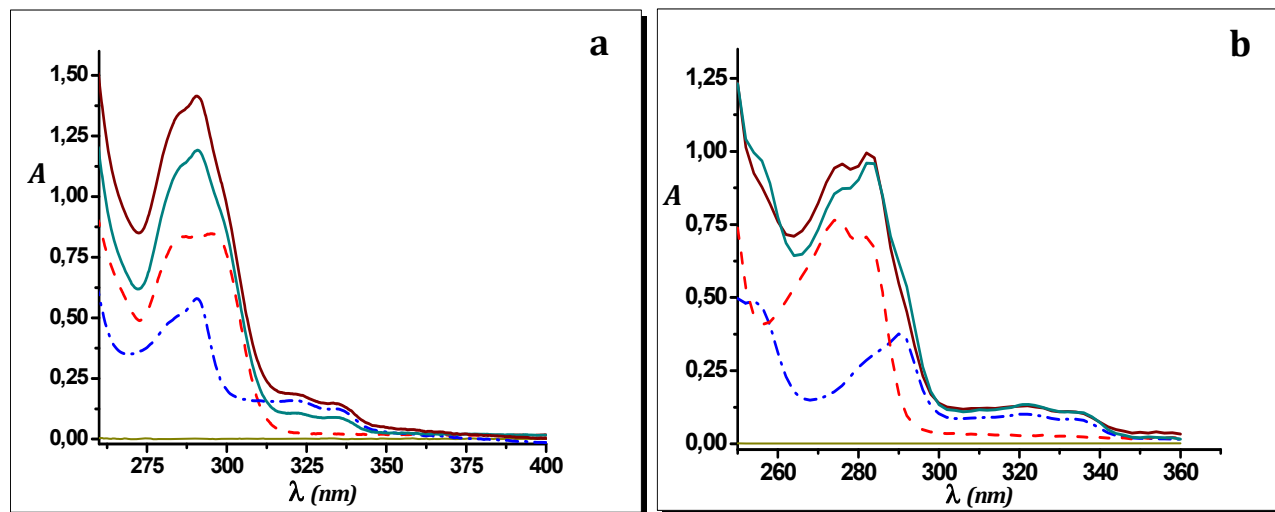


Figura 3-7. Espectros de absorción UV-Vis de CZL en presencia del receptor CA[6]S. Se observa una disminución de la A respecto a la suma aritmética de los espectros de las moléculas por separado. Espectros UV-Visible de (— · —) CZL, (---) CA[6]S, (—) mezcla experimental y (—) suma aritmética de espectros individuales. Condiciones: (a) 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994; (b) 95,0 % v/v de HCl 0,1 M. [CZL] = 8,6 μ M; [CA[6]S] = 30 μ M; 2,0% v/v CH₃OH; 25,0 °C; b = 4,0 cm.

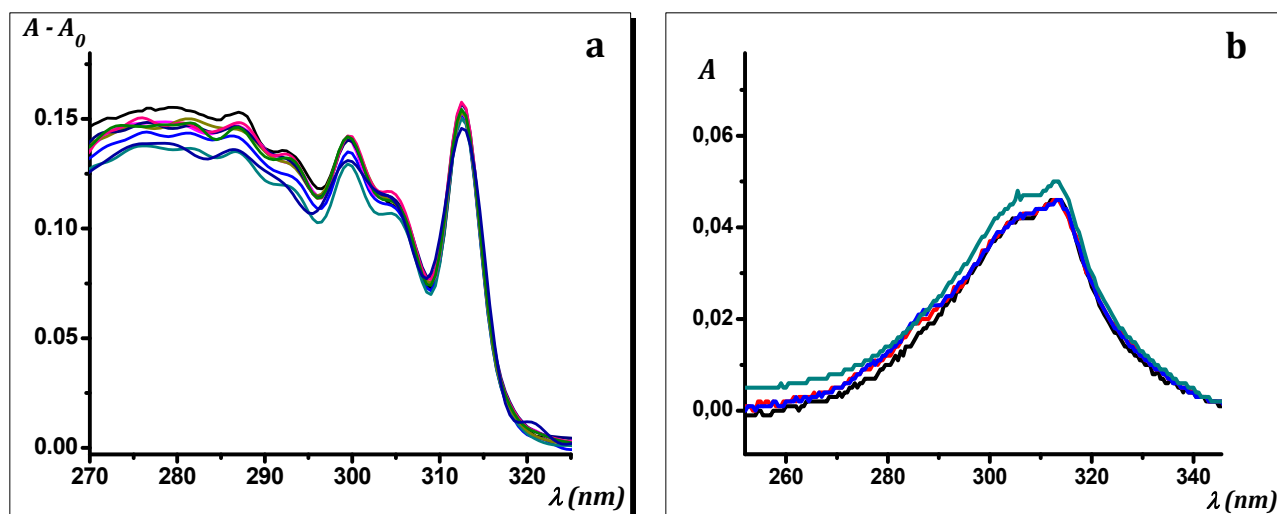


Figura 3-8. Espectros de absorción UV-Vis de QUI en presencia de CA[6]S. (a) [QUI] = 10 μ M en ausencia del macrociclo (—) con un 95,0 % v/v de buffer fosfato pH = 6,994 y a distintas concentraciones del macrociclo: [CA[6]S] = 8,5 μ M (—) hasta [CA[6]S] = 78,0 μ M (—); (b) [QUI] = 10 μ M en ausencia del macrociclo (—) con un 95,0 % v/v de HCl 0,01 M y a distintas concentraciones del macrociclo: [CA[6]S] = 10,0 μ M (—), [CA[6]S] = 30,0 μ M (—) y [CA[6]S] = 50,0 μ M (—). Todas las soluciones con un 2,0 % v/v de CH₃OH; 25,0 °C; b = 4,0 cm.

3.4.1.3.3. Efecto Macrocíclico por UV-Visible

Para evidenciar el efecto macrocíclico, sobre las características espectroscópicas de los sustratos CZL y QUI, y que los cambios observados no se deban a un efecto del medio, se registraron espectros UV-Visible utilizando una cantidad del monómero equivalente en masa a la concentración empleada de receptor macrocíclico. En la figura 3-9a se muestra el espectro de absorción de CZL en ausencia y en presencia de glucosa y β -CD y en la figura 3-9b espectros de QUI en ausencia y en presencia de glucosa y algunos receptores CDs.

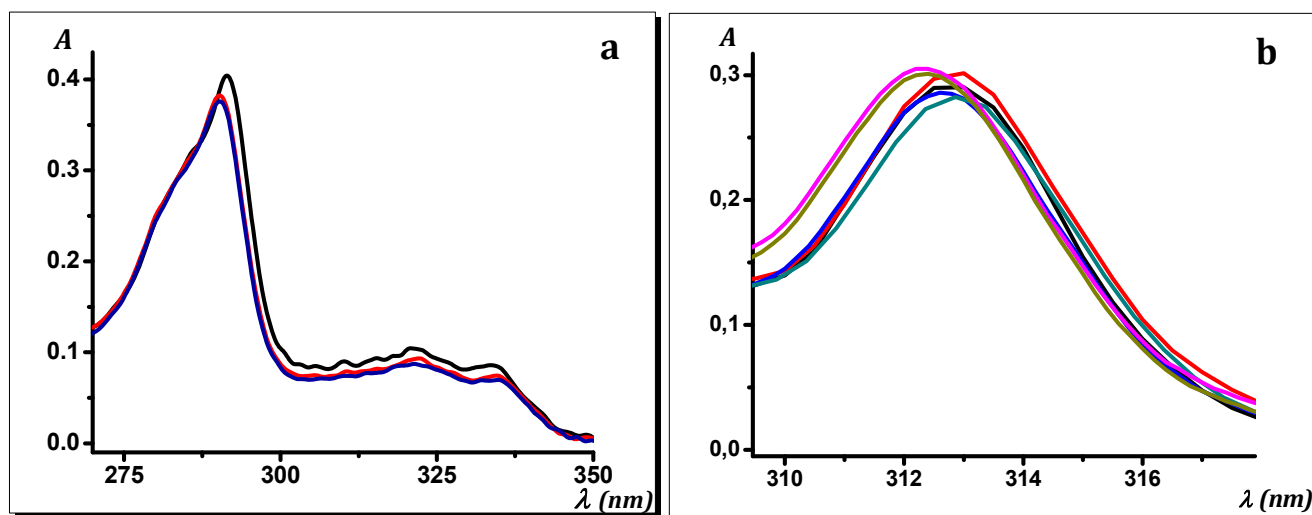
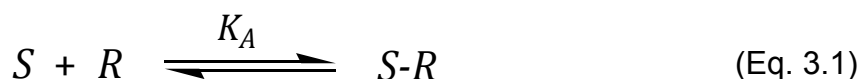


Figura 3-9. Efecto del monómero y efecto macrocíclico por espectroscopia UV-Vis. Espectros UV-Vis de **(a)** (—) [CZL] = 6,2 μM, (—) CZL + glucosa y (—) CZL + β -CD, y **(b)** (—) [QUI] = 20,4 μM, (—) QUI + glucosa, (—) QUI + HP β -CD (—) QUI + β -CD, (—) QUI + Me β -CD, (—) QUI + γ -CD. Condiciones: [CD] = 10 mM, cantidad de glucosa equivalente en masa a la concentración de CD, 95,0 % v/v de buffer fosfato pH = 6,994, 2,0 % v/v CH₃OH; 25,0 °C; b = 4,0 cm.

3.4.1.4. Determinación de K_A por espectroscopia UV-Visible

La constante de asociación, K_A , de un complejo entre un sustrato orgánico, S , y un dado receptor macrocíclico, R , puede ser determinada mediante la medición de una propiedad espectroscópica afectada por la interacción huésped-receptor, variando la concentración de uno de los componentes mientras se mantiene constante la concentración del otro.

En principio, se considera que en la reacción de complejación se forma un complejo de estequiometría 1:1, estableciéndose el siguiente equilibrio (Eq. 3.1):



Para explicar la variación de la A (ΔA) del sistema a una longitud de onda determinada (ej. λ_{max}) en función de la concentración del R , se derivó la expresión que describe tal comportamiento por medio del planteo de ecuaciones simples de equilibrio químico y basadas en la ley de Lambert-Beer. A continuación se describen las consideraciones empleadas y los pasos seguidos para obtener dicha función (A vs $[R]$).

La constante de equilibrio de la ecuación química de formación de complejo es la constante de asociación, K_A , del sustrato y del receptor y se define como sigue:

$$K_A = \frac{[S-R]}{[S].[R]} \quad (3.02)$$

donde $[S-R]$, $[S]$ y $[R]$ se refieren a las concentraciones en equilibrio del complejo, del sustrato y del receptor, respectivamente.

Considerando que los espectros de absorción de S libre y complejado presentan diferencias significativas y que todas las especies cumplen la ley de Lambert-Beer, se elige una longitud de onda a la cual los coeficientes de absortividad molar de S y $S-R$ son diferentes.

Según la ley de Lambert-Beer (ecuación 3.01), la A de la solución en ausencia de R es proporcional a la concentración analítica del sustrato, $[S]_0$.

$$A = \varepsilon_S \cdot b \cdot [S]_0 \quad (3.03)$$

Cuando se adiciona el macrociclo, la absorbancia del sistema en el equilibrio es la sumatoria de las contribuciones del S , del R y del $S-R$ obteniéndose la ecuación 3.04.

$$A = b \cdot (\varepsilon_S \cdot [S] + \varepsilon_R \cdot [R] + \varepsilon_{S-R} \cdot [S - R]) \quad (3.04)$$

Incorporando en la ecuación 3.04 los balances de masa del sustrato ($[S]_0 = [S] + [S-R]$) y del receptor ($[R]_0 = [R] + [S-R]$), surge la ecuación 3.05 que se da a continuación:

$$A = b \cdot (\varepsilon_S \cdot [S]_0 - \varepsilon_S \cdot [S - R] + \varepsilon_R \cdot [R]_0 - \varepsilon_R \cdot [S - R] + \varepsilon_{S-R} \cdot [S - R]) \quad (3.05)$$

Agrupando los términos relacionados a $[S-R]$ y considerando que $\Delta\varepsilon_{S-R} = \varepsilon_{S-R} - (\varepsilon_S - \varepsilon_R)$ se deriva la ecuación 3.06.

$$A = b \cdot (\varepsilon_S \cdot [S]_0 + \varepsilon_R \cdot [R]_0 + \Delta\varepsilon_{S-R} \cdot [S - R]) \quad (3.06)$$

Si la A del S es mucho mayor que la que presenta el receptor (ya que la A de R es despreciable) se puede considerar $\varepsilon_S \cdot [S]_0 \gg \varepsilon_R \cdot [R]_0$ y la ecuación 3.06 se simplifica a la ecuación siguiente

$$A = b \cdot (\varepsilon_S \cdot [S]_0 + \Delta\varepsilon_{S-R} \cdot [S - R]) \quad (3.07)$$

Combinando las expresiones de la K_A (ecuación 3.02) y del balance de masas para el S se obtiene:

$$[S] = \frac{[S]_0}{1 + K_A[R]} \quad (3.08)$$

Si desde la expresión de K_A se despeja la $[S-R]$ y se sustituye la $[S]$ por su equivalente dado por la ecuación 3.08, se deriva la ecuación 3.09.

$$[S - R] = \frac{K_A[S]_0[R]}{1+K_A[R]} \quad (3.09)$$

Ahora reemplazando en la ecuación 3.07 la $[S-R]$ por la expresión anterior se obtiene la siguiente expresión:

$$A = b \left(\varepsilon_S[S]_0 + \frac{\Delta\varepsilon_{S-R}[S]_0K_A[R]}{1+K_A[R]} \right) \quad (3.10)$$

Finalmente, si se trabaja en condiciones de pseudo primer orden ($[R]_0 \gg [S]_0$)⁴³ se puede plantear la aproximación $[R] \approx [R]_0$ y, en consecuencia, se obtiene la ecuación 3.11 que relaciona la variación de la A , a una dada longitud de onda, con la concentración total del receptor, $[R]_0$.

$$A = A_0 + \frac{b\Delta\varepsilon_{S-R}[S]_0K_A[R]_0}{1+K_A[R]_0} \quad (3.11)$$

Esta ecuación se empleó para determinar los valores de las constantes de asociación de los complejos sustrato-receptor entre los sustratos, CZL y QUI, y los receptores macrocíclicos CDs.

La máxima diferencia de A (ΔA_{\max}) entre los espectros de las soluciones de CZL y QUI en ausencia y en presencia de CDs se presenta a 294,5 nm y 312,5 nm, respectivamente (ver tabla 3-4). A estas longitudes de onda de ΔA_{\max} se determinaron los valores de A variando la concentración del receptor macrocíclico (descontando la señal del blanco correspondiente).

En la figura 3-10 se muestran los valores experimentales de A , para los sistemas CZL- β -CD y QUI- γ -CD. La figura 3-10a muestra un incremento de A de CZL a medida que aumenta la concentración del receptor β -CD. En la figura 3-10b se expone un decaimiento de A de QUI a medida que aumenta la concentración de γ -CD. Ambos perfiles de A vs $[R]$ presentan la curva de ajuste usando como modelo la ecuación 3.11. Nótese que en el caso del CZL, el $\Delta\epsilon_{S-R}$ es positivo indicando que el complejo CZL- β -CD presenta una mayor absorptividad que el CZL libre. También se observó esta característica en la absorbancia de los complejos CZL- α -CD, CZL-HP β -CD y CZL-Me β -CD. Por otro lado, para el núcleo QUI el $\Delta\epsilon_{S-R}$ es negativo y el complejo QUI- γ -CD absorbe en menor medida que el núcleo QUI libre. Este mismo comportamiento se registró para el complejo QUI- β -CD, y una tendencia similar pero en menor medida para los complejos QUI-HP β -CD y QUI-Me β -CD.

De esta manera, se puede atribuir que la variación de la A se debe a la formación de un complejo huésped-receptor entre el sustrato orgánico (CZL o QUI) y el receptor CD. Los valores de constantes de asociación, K_A , obtenidos a partir del ajuste con la ecuación 3.11 se especifican en la tabla 3-5. La K_A obtenida para el complejo CZL-HP β -CD fue la de mayor magnitud con un valor de $(11 \pm 1) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. De esta forma, se han obtenido K_A para las ciclodextrinas α -CD, β -CD, HP β -CD y Me β -CD. Con γ -CD no se pudo establecer un valor para K_A ya que los valores experimentales mostraron cambios muy pequeños con dispersiones significativas. Por otro lado, las constantes de asociación determinadas para los complejos QUI- β -CD y QUI- γ -CD son semejantes.

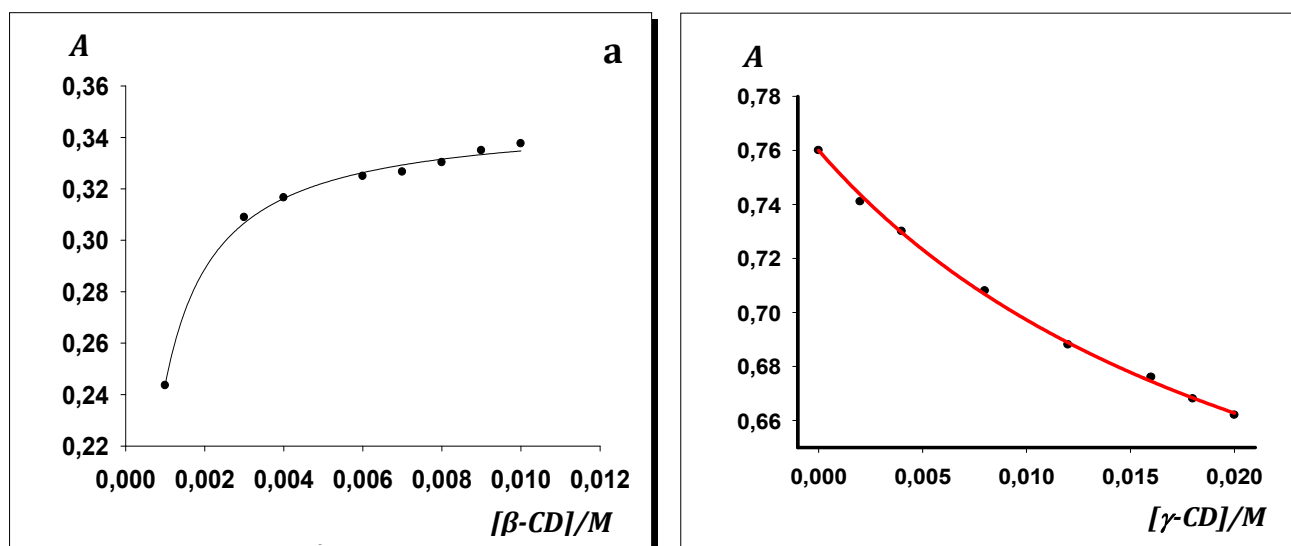


Figura 3-10. Efecto de CDs en la absorbancia de CZL y QUI. **(a)** CZL ($[CZL] = 6,0 \mu M$; $\lambda_{max} = 294,5 \text{ nm}$) en función de la concentración del receptor $\beta\text{-CD}$ y **(b)** QUI ($[QUI] = 20,5 \mu M$; $\lambda_{max} = 312,5 \text{ nm}$) en función de la concentración del receptor $\gamma\text{-CD}$. Condiciones: 95 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994; 2 % de v/v CH_3OH ; 25,0 °C.

Tabla 3-5. Constantes de asociación obtenidas por UV-Visible de complejos de CZL y QUI con algunas CDs ^a

CZL		QUI	
Receptor	$K_A, 10^2 M^{-1}$	Receptor	$K_A, 10^1 M^{-1}$
$\alpha\text{-CD}$	9 ± 3	$\beta\text{-CD}$	$3,6 \pm 0,7$
$\beta\text{-CD}$	4 ± 1	$\gamma\text{-CD}$	$4,1 \pm 0,4$
HP$\beta\text{-CD}$	11 ± 1		-
Me$\beta\text{-CD}$	$0,9 \pm 0,4$		-

^(a) Los valores de Constantes de asociación se expresan con sus respectivos desviaciones estándares. Medio: 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994; 2,0 % v/v de CH_3OH ; 25,0 °C; $b = 4,0 \text{ cm}$.

3.4.1.5. Relación estequiométrica de los complejos huésped-receptor por UV-Vis

El método de doble recíproca permite establecer si la estequiometría 1:1 inicialmente supuesta es correcta.⁴³ Por este método, la ecuación que se emplea, utilizando medidas de A , se presenta a continuación:

$$\frac{[R]_0}{\Delta A} = \frac{1}{b\Delta\epsilon_{S-R}[S]_0K_A} + \frac{[R]_0}{b\Delta\epsilon_{S-R}[S]_0} \quad (3.12)$$

Considerando la ecuación 3.12, cuando se grafica $[R]_0/\Delta A$ en función de la concentración del receptor macrocíclico y se obtiene una relación lineal, la estequiometría del complejo huésped-receptor es 1:1. La figura 3-11 muestra un comportamiento lineal evidenciando una relación estequiométrica 1:1 para los complejos CZL- β -CD y QUI- β -CD.

Para los complejos formados con las CDs estudiadas se observó un comportamiento lineal en los gráficos de doble recíproca obtenidos.

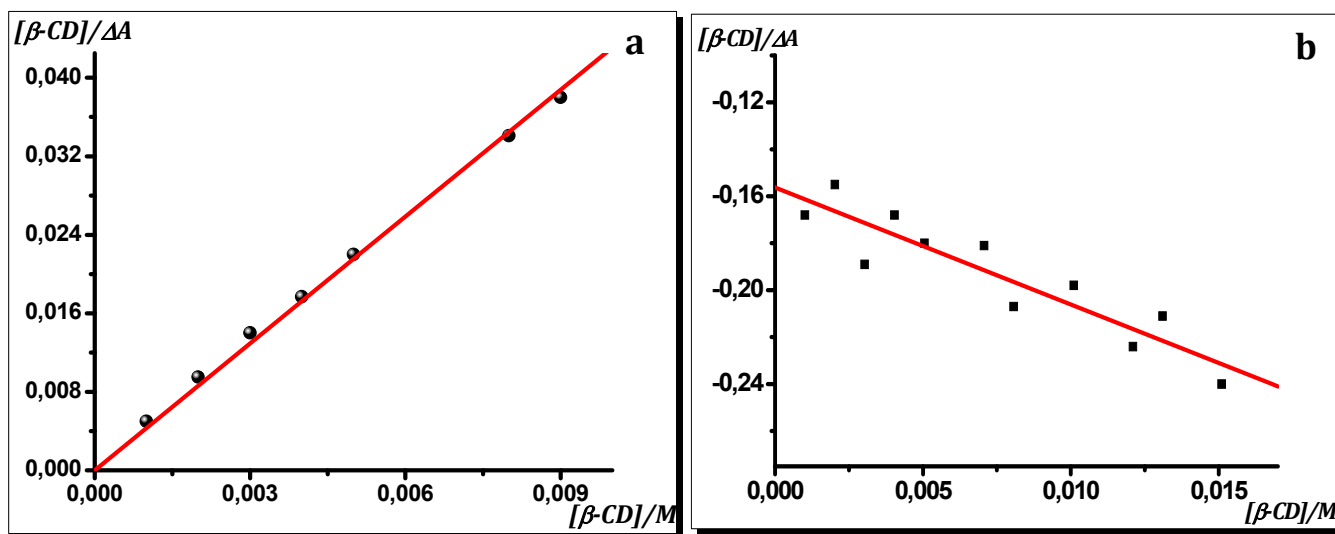


Figura 3-11. Gráfico de doble recíproca con medidas de absorbancia para confirmación de estequiometría 1:1. **(a)** [CZL] = 6,4 μM y $[\beta\text{-CD}]$ = variable entre 0 – 10 mM. **(b)** [QUI] = 20,4 μM y $[\beta\text{-CD}]$ = variable entre 0 – 10 mM. Condiciones: 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994; 2,0 % v/v de CH_3OH ; 25,0 $^\circ\text{C}$.

3.4.2. Estudio por espectroscopia de fluorescencia

3.4.2.1. Espectros de emisión de fluorescencia de CZL y QUI

En busca de las condiciones apropiadas para el estudio de la interacción de hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados con receptores macrocíclicos, CDs y CA[n]S, se prepararon soluciones de las sondas fluorescentes CZL y QUI bajo distintas condiciones experimentales.

Los espectros de emisión de CZL y QUI a dos valores de pH diferentes se presentan en la figura 3-12. El espectro de emisión de fluorescencia de CZL presenta una longitud de onda de máxima emisión $\Delta\lambda_{max}^{em} = 361,5$ nm, que no se ve afectada por el cambio de pH del medio (figura 3-12a). En tanto que el espectro de emisión de fluorescencia del núcleo quinoleínico presenta una estructura ancha con un máximo de intensidad para la especie neutra QUI a 406,8 nm y la especie ácida QUIH⁺ a 409,9 nm, ambos espectros presentan una diferencia en longitud de onda de máxima emisión $\Delta\lambda_{max}^{em} = 3,1$ nm. Puede apreciarse en figura 3-12b que la especie QUIH⁺ presenta un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia que la especie neutra QUI (ϕ_{QUIH^+}/ϕ_{QUI}).^{44,45}

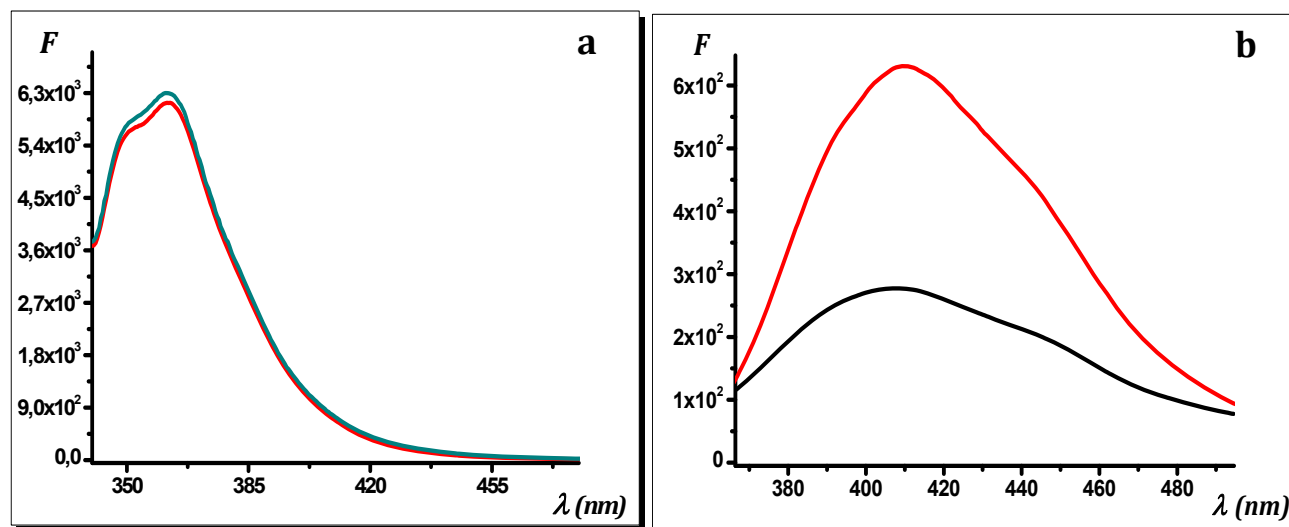


Figura 3-12. Espectros de emisión de fluorescencia de CZL y QUI a dos pH. **(a)** (—) [CZL] = 4,8 μ M, 95,0 % v/v HCl 0,01 M/NaCl 0,09 M de pH = 2,101, 2,0 % v/v de CH₃OH y (—) [CZL] = 5,0 μ M, 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994, 2,0 % v/v de CH₃OH; y **(b)** (—) [QUIH⁺] = 8,0 μ M, 95,0 % v/v HCl 0,01 M/NaCl 0,09M de pH = 2,101, 2,0 % v/v CH₃OH y (—) [QUI] = 26,0 μ M, 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994, 2,0 % v/v de CH₃OH. $\lambda_{exc} = 322,0$ nm para CZL y $\lambda_{exc} = 313,0$ nm para QUI en ambas condiciones de pH y una temperatura de 25,0 °C.

En la figura 3-13 se presenta el espectro de absorción UV-Vis junto con el de emisión de fluorescencia (obtenidos ambos en las mismas condiciones) para CZL, QUI y QUIH⁺. Se informan los corrimientos de Stokes ($\Delta\lambda_{\text{Stokes}}$) para cada caso. El valor de $\Delta\lambda_{\text{Stokes}}$ para las especies ácido-base de QUI son similares entre sí y superiores al correspondiente valor para CZL.

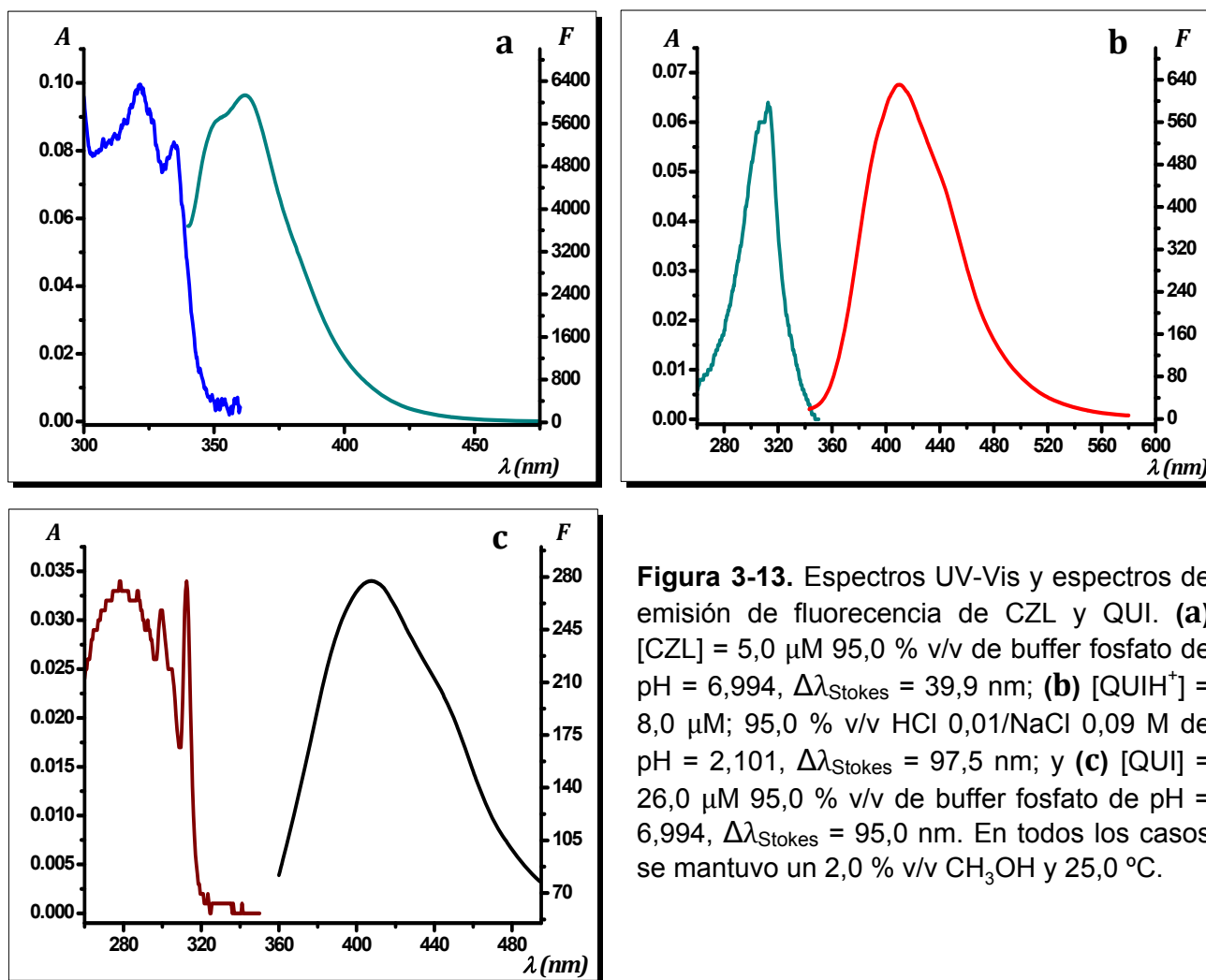


Figura 3-13. Espectros UV-Vis y espectros de emisión de fluorescencia de CZL y QUI. **(a)** [CZL] = 5,0 μM 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994, $\Delta\lambda_{\text{Stokes}}$ = 39,9 nm; **(b)** [QUIH⁺] = 8,0 μM ; 95,0 % v/v HCl 0,01/NaCl 0,09 M de pH = 2,101, $\Delta\lambda_{\text{Stokes}}$ = 97,5 nm; y **(c)** [QUI] = 26,0 μM 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994, $\Delta\lambda_{\text{Stokes}}$ = 95,0 nm. En todos los casos se mantuvo un 2,0 % v/v CH₃OH y 25,0 °C.

3.4.2.2. Efecto de receptores macrocíclicos sobre la fluorescencia de CZL y QUI

Teniendo en cuenta las condiciones experimentales y los parámetros instrumentales establecidos para el estudio por espectroscopia de fluorescencia, se llevó a cabo el estudio del efecto de diferentes receptores macrocíclicos sobre las propiedades fotoluminiscentes de CZL y QUI. Se emplearon las CDs: α -CD, β -CD, HP β -CD, Me β -CD y γ -CD, y los calixarenos sulfonados CA[6]S y CA[8]S.

Se analizó, para el caso de la quinolina, el comportamiento de las especies ácido-base $QUIH^+$ y QUI frente a la presencia de receptores ciclodextrinas y calixarenos.

En esta sección primero se expondrán los resultados obtenidos con receptores ciclodextrinas sobre las propiedades espectroscópicas de CZL y de QUI. Luego se mostrarán los resultados obtenidos con los derivados calixarenos sulfonados.

3.4.2.2.1. Efecto de ciclodextrinas

Se encontraron efectos diferentes en los espectros de emisión de los sustratos orgánicos estudiados. A continuación, en la figura 3-14 se muestran espectros de CZL y QUI en presencia de un receptor CD dado.

La emisión de fluorescencia de CZL fue exaltada en presencia de cantidades crecientes del receptor $HP\beta$ -CD (figura 3-14a), siendo el porcentaje de aumento de la señal espectral igual a 34,0 %. Resultados similares se obtuvieron cuando se adicionaron las ciclodextrinas β -CD y $Me\beta$ -CD a una solución de carbazol en buffer fosfato (pH = 6,994), mientras que en presencia de α -CD y γ -CD no se observaron cambios significativos.

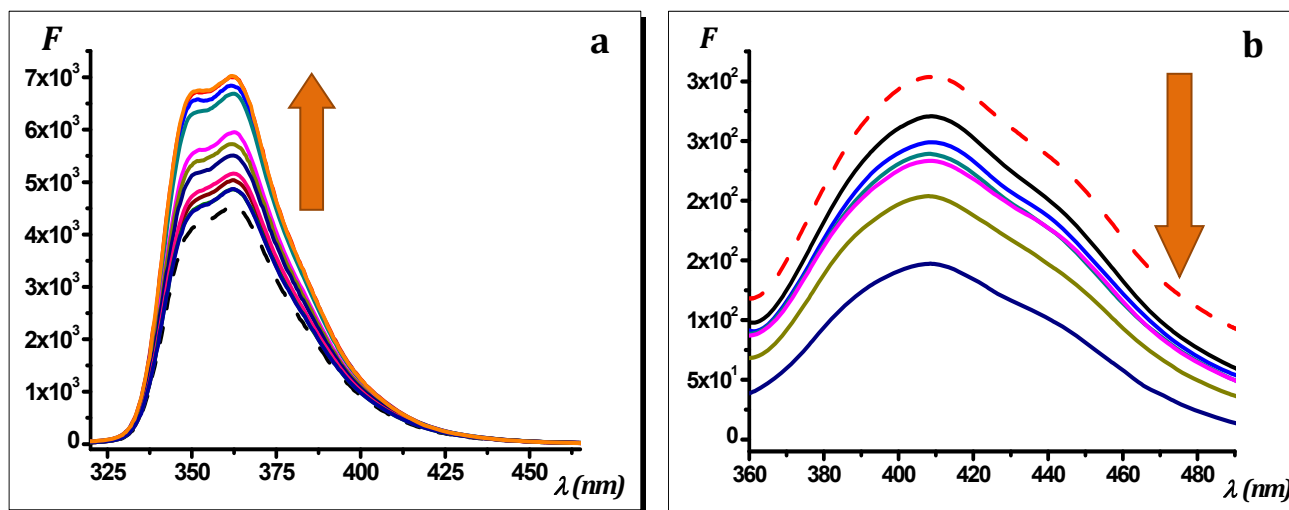


Figura 3-14. Espectros de emisión de fluorescencia de CZL y QUI en presencia de cantidades crecientes de un receptor CD. **(a)** (---) [CZL] = 5,7 μ M y (—) [CZL] = 5,7 μ M + [HP β -CD] = 0,010 M; **(b)** (- - -) [QUI] = 26,0 μ M y (—) [QUI] = 26,0 μ M + [γ -CD] = 0,012 M, las concentraciones intermedias de γ -CD son: 1, 2, 4, 5 y 7 mM. Condiciones: 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994; 2,0 % v/v de CH_3OH ; 25,0 $^{\circ}C$; λ_{exc}^{CZL} = 292,5 nm, λ_{exc}^{QUI} = 313,0 nm; b = 1,0 cm.

En la figura 3-14b se muestran los espectros de fluorescencia del núcleo QUI en presencia de cantidades crecientes de γ -CD. El núcleo quinoleínico sufre una inhibición de la fluorescencia (*quenching*, ver apéndice A), la cual se produjo en un 58,5 %. Un comportamiento similar también se observó con β -CD, HP β -CD y Me β -CD. La emisión de fluorescencia de la especie QUIH⁺ no experimentó cambio en presencia de cualquiera de las CDs estudiadas.

Para ambos sistemas fluorescentes (CZL y QUI), las longitudes de onda de máxima emisión mantienen sus valores inalterados en presencia de los receptores ciclodextrina empleados.

El efecto macrocíclico sobre las propiedades espectroscópicas de los sustratos CZL y QUI se demostró registrando espectros de emisión de cada sustrato orgánico en presencia de una cantidad de monómero equivalente a la concentración empleada de receptor macrocíclico. En la figura 3-15 se muestran los espectros de fluorescencia de CZL y QUI individuales, y en presencia de glucosa y de un receptor ciclodextrina.

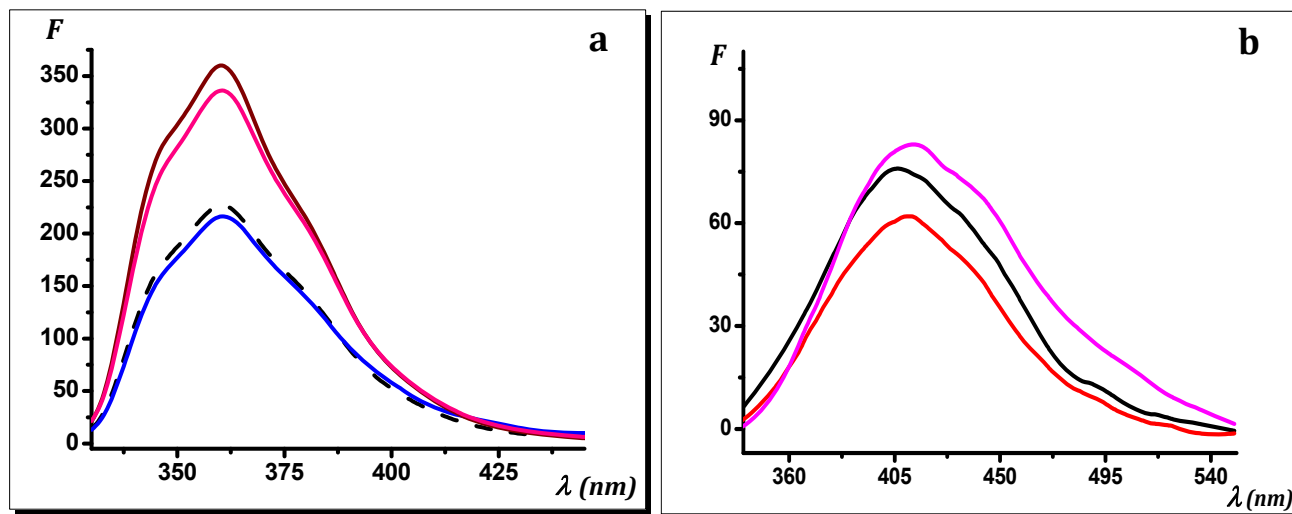


Figura 3-15. Estudio del efecto del monómero y macrocíclico por emisión de F de CZL y QUI (**a**) CZL (— — —) en ausencia de β -CD, (—) en presencia de glucosa, (—) en presencia de $[\beta\text{-CD}] = 10,0$ mM y (—) en presencia de $[\text{HP}\beta\text{-CD}] = 10,0$ mM; (**b**) QUI (—) en ausencia del receptor γ -CD, (—) en presencia de glucosa, (—) en presencia de $[\gamma\text{-CD}] = 5,0$ mM. Condiciones: 95,0 % v/v de buffer fosfato pH = 6,994; 2,0 % v/v CH_3OH ; 25,0 °C; $\lambda_{\text{exc}} = 290,0$ nm; ancho de rendijas de excitación y emisión = 10,0 nm; voltaje del fotomultiplicador 650; $b = 1,0$ cm.

3.4.2.2.2. Efecto de *p*-sulfonatocalix[*n*]arenos

El efecto del derivado CA[6]S sobre la emisión de fluorescencia de CZL y QUI se muestra en la figura 3-16. La interacción de los sustratos fluorescentes con los derivados calixarenos sulfonados se refleja a través de un quenching de fluorescencia de los núcleos aromáticos nitrogenados. Con CZL, en buffer fosfato de pH = 6,994, la disminución de fluorescencia fue del 44,6 % (figura 3-16a). Se produjo una inhibición de la fluorescencia todavía más acentuada cuando se utilizó el derivado calixareno sulfonado de ocho miembros, CA[8]S, produciendo un porcentaje de disminución de la fluorescencia del CZL del 66,3 % (figura 3-16b).

La influencia de CA[6]S sobre la fluorescencia del núcleo quinoleínico se ensayó tanto en medio ácido (QUIH⁺) como en medio neutro (QUI), como se muestra en la figura 3-16c y d. Para la especie QUIH⁺ la intensidad del quenching fue del 29,3 % (empleando [CA[6]S]/[QUIH⁺] = 21,25), en tanto que para la especie QUI fue del 76,9 % (empleando [CA[6]S]/[QUI] = 3,46). Por otra parte, el derivado CA[8]S produjo sobre la especie neutra de QUI un quenching del 32,2 % (empleando [CA[8]S]/[QUI] = 1,06).

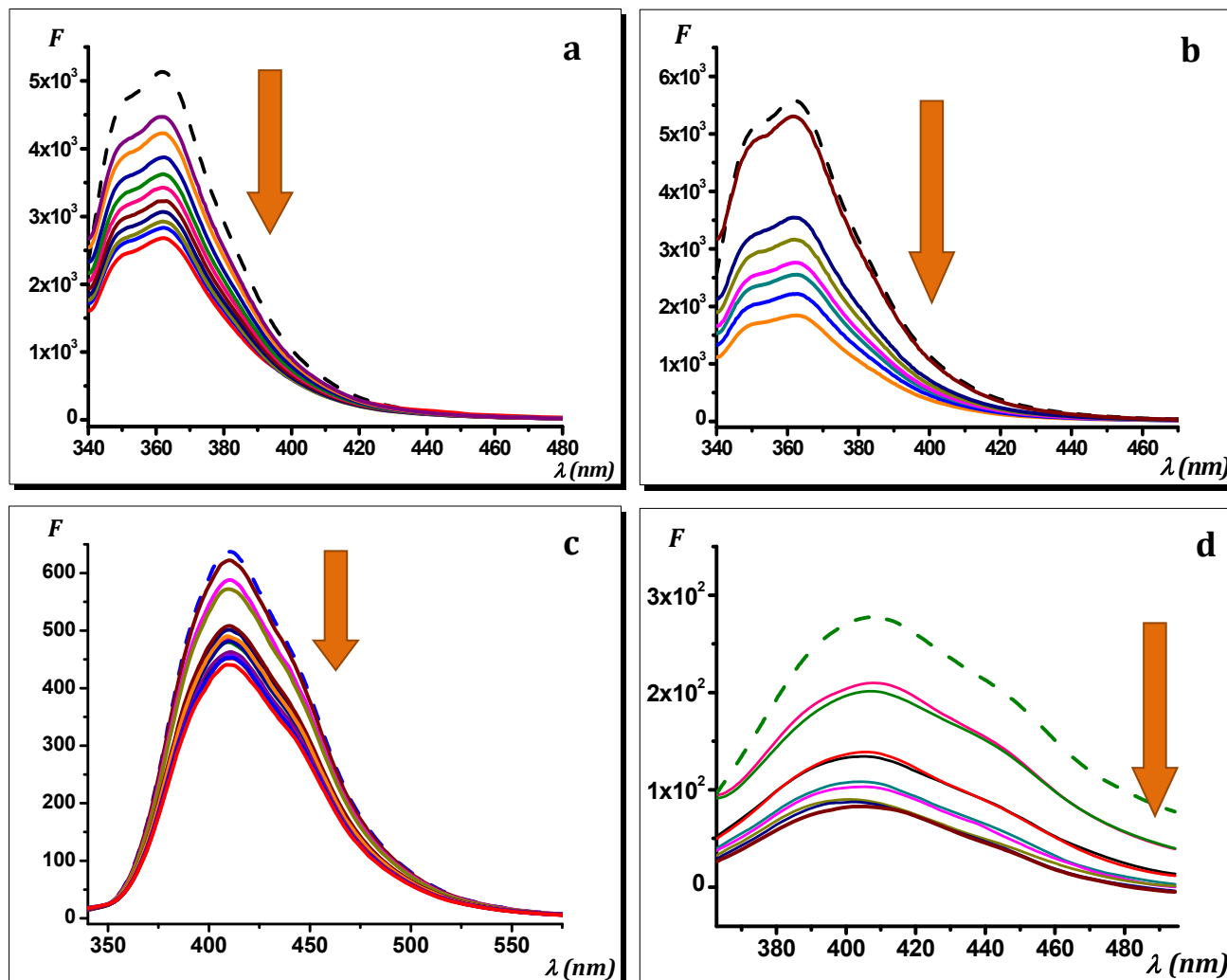


Figura 3-16. Espectros de emisión de fluorescencia de CZL, QUI en 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y QUIH⁺ en 95,0 % v/v de buffer HCl 0,01M/NaCl 0,09 M de pH = 2,101, en ausencia y en presencia de CA[n]S. **(a)** (---) [CZL] = 5,23 μM; (—) [CZL] = 5,23 μM + [CA[6]S] = 185,6 μM; **(b)** (---) [CZL] = 5,50 μM; (—) [CZL] = 5,50 μM + [CA[8]S] = 180,0 μM; **(c)** (---) [QUIH⁺] = 8,0 μM; (—) [QUIH⁺] = 8,0 μM + [CA[6]S] = 170,0 μM y **(d)** (---) [QUI] = 26,0 μM; (—) [QUI] = 26,0 μM + [CA[6]S] = 90,0 μM. Todas las soluciones con un 2,0 % v/v de CH₃OH; 25,0 °C. $\lambda_{exc}^{CZL} = 322,0 \text{ nm}$, $\lambda_{exc}^{QUI} = 313,0 \text{ nm}$.

3.4.2.3. Determinación de K_A por espectroscopia de fluorescencia

En esta sección se plantearán las ecuaciones para llegar a obtener la expresión matemática que relaciona la emisión de fluorescencia del sustrato orgánico S con la concentración del receptor macrocíclico R en un sistema de estequiometría 1:1 (figura

3.08).⁴⁶ La intensidad de emisión de fluorescencia (expresada en área) de un fluoróforo, cuya concentración cumple con la relación $2,303xA < 0,05$, se define como:

$$F = 2,303BI_0b\phi\varepsilon[S] \quad (3.13)$$

Donde B es una constante asociada a varios parámetros instrumentales; I_0 representa la intensidad de la fuente de excitación; b es el paso óptico; ϕ es el rendimiento cuántico de fluorescencia; ε es la absorptividad molar a la longitud de onda de excitación (λ_{exc}) y $[S]$ la concentración molar del fluoróforo. La ecuación 3.13 se puede reescribir definiendo la constante ξ que incluye todas las constantes de proporcionalidad que relacionan F con la concentración de S en ausencia del receptor, como sigue:

$$F_0 = \xi[S]_0 \quad (3.14)$$

con el subíndice "0" se indica el sistema en ausencia de receptor macrocíclico.

Si se considera la presencia de un receptor macrocíclico R , la fluorescencia F corresponde a la sumatoria de las contribuciones de las distintas especies presentes en el equilibrio:

$$F = \xi_S[S] + \xi_R[R] + \xi_{S-R}[S - R] \quad (3.15)$$

Considerando que el receptor no absorbe luz a la λ_{exc} y por lo tanto no emite fluorescencia ($\xi_R \cdot [R] = 0$), la ecuación 3.15 se simplifica a la siguiente expresión:

$$F = \xi_S[S] + \xi_{S-R}[S - R] \quad (3.16)$$

Combinando la ecuación 3.16 con la ecuación 3.02 se deriva la ecuación 3.17

$$F = [S](\xi_S + \xi_{S-R}K_A[R]) \quad (3.17)$$

Estableciendo el cociente entre la intensidad de emisión de fluorescencia del sustrato en presencia (F) y en ausencia (F_0) de receptor macrocíclico (ecuaciones 3.17 y 3.15, respectivamente), F_R , se obtiene:

$$F_R = \frac{F}{F_0} = \frac{1 + \left(\frac{\xi_{S-R}}{\xi_S}\right) K_A [R]}{1 + K_A [R]} \quad (3.18)$$

Nótese que el cociente $\xi_{S-R}/\xi_S = \varepsilon_{S-R}\phi_{S-R}/\varepsilon_S\phi_S$, representa la relación de rendimientos cuánticos de fluorescencia del sustrato complejado respecto al sustrato libre ($\Phi = \phi_{S-R}/\phi_S$), siempre que se cumpla la igualdad $\varepsilon_{S-R} = \varepsilon_S$ a la longitud de onda de excitación (λ_{exc}). La ecuación 3.18 se puede reescribir para cuando $[R]_0 \gg [S]_0$ aproximando entonces que $[R] \approx [R]_0$, dando lugar a la ecuación que sigue:

$$F_R = \frac{1 + \Phi K_A [R]_0}{1 + K_A [R]_0} \quad (3.19)$$

La ecuación 3.19 es llamada *isoterma de asociación*⁴³ y relaciona la variación de las intensidades de emisión de fluorescencia con el cambio de la concentración del receptor $[R]_0$. Pueden ocurrir gran variedad de efectos sobre las propiedades de fluorescencia del sistema huésped-receptor, y la ecuación 3.19 engloba varios comportamientos posibles. Por ejemplo, en el caso que el rendimiento cuántico del complejo formado sea igual a cero ($\xi_{S-R} = 0$), la relación de rendimientos cuánticos Φ es nula y la ecuación 3.19 se puede reescribir de la siguiente manera

$$\frac{1}{F_R} = \frac{F_0}{F} = 1 + K_A \cdot [R]_0 \quad (3.20)$$

La ecuación 3.20 es la ecuación de Stern-Volmer para un quenching del tipo estático (ver Apéndice A, sección A.5.2), y supone la formación de un complejo no fluorescente en

el estado basal con una estequiometría 1:1. Por otra parte, para un proceso dinámico, la dependencia de la señal fluorescente con la concentración del receptor se expresa mediante la ecuación 3.21 como se muestra a continuación:

$$\frac{1}{F_R} = \frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q]_0 \quad (3.21)$$

Donde se ha reemplazado $[R]_0$ por la concentración inicial del quencher $[Q]_0$, k_q es la constante de velocidad del proceso de quenching bimolecular, τ_0 es el tiempo de vida del fluoróforo en el estado excitado en ausencia de quencher (ver Apéndice A, sección A.5.1 para una mayor descripción del tema).

Con las ecuaciones 3.19 y 3.20 se determinaron los valores de constantes de asociación, K_A , de los complejos huésped-receptor entre los fluoróforos orgánicos CZL y QUI, y varios receptores CDs y CA[n]S.

De la misma forma en que se llevaron a cabo los experimentos mediante espectroscopia UV-Vis (sección 3.4.1.1), se midieron las áreas de espectros de emisión de fluorescencia de CZL, F_R , variando la concentración del receptor macrocíclico R (figura 3-17). La igualdad $\varepsilon_{S-R} = \varepsilon_S$ se cumple a la λ_{exc} , y las intensidades se corrigieron descontando las señales correspondientes a los blancos (trabajando siempre con áreas).

Las constantes de asociación entre CZL y receptores CA[n]S se obtuvieron utilizando la ecuación 3.20, ajustando los valores experimentales de área de fluorescencia de CZL. Como se mencionó antes, el núcleo QUI experimentó quenching en presencia tanto de receptores CA[n]S como con receptores CDs. Las correspondientes K_A para los complejos de QUI y los receptores macrocíclicos fueron determinadas mediante la ecuación 3.20.

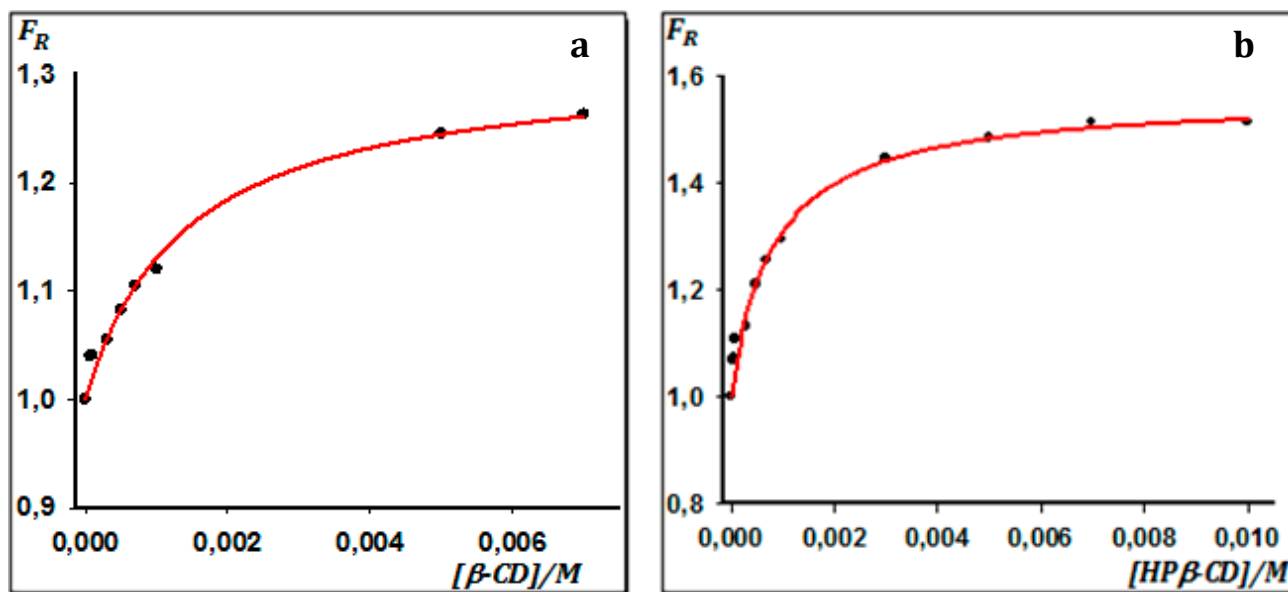
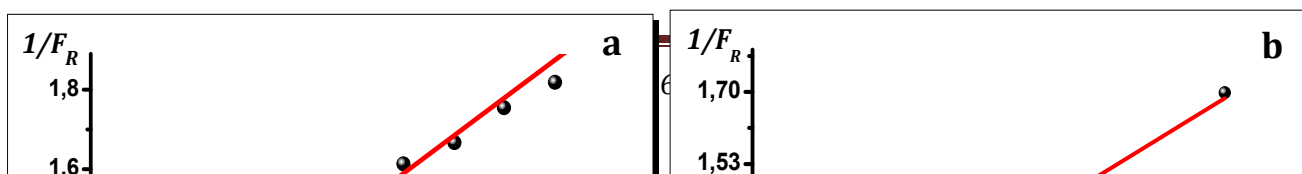


Figura 3-17. Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia de CZL en función de la concentración de CDs. **(a)** $[\text{CZL}] = 5,6 \mu\text{M} + \beta\text{-CD}$ y **(b)** $[\text{CZL}] = 5,6 \mu\text{M} + \text{HP}\beta\text{-CD}$. Condiciones 95,0 % v/v de buffer fosfato de $\text{pH} = 6,994$; 2,0 % v/v de CH_3OH ; 25,0 °C; $\lambda_{\text{exc}} = 291,0 \text{ nm}$ con $\beta\text{-CD}$ y $\lambda_{\text{exc}} = 292,5 \text{ nm}$ con $\text{HP}\beta\text{-CD}$; ancho de rendija de emisión y excitación = 10,0 nm; ganancia del fotomultiplicador = muy baja; $b = 1,0 \text{ cm}$). En línea continua se muestra el ajuste no lineal de los datos empleando como modelo la ecuación 3.19.

En la figura 3-18 se muestran algunas de las variaciones de fluorescencia (como $1/F_R$), de los sustratos orgánicos empleados, en función de la variación de la concentración del receptor macrocíclico, junto con la función de ajuste (ecuación 3.20).

Las constantes de complejación de los sustratos, CZL y QUI, con los receptores CDs y CA[n]S se muestran en la tabla 3-6. También se especifican en dicha tabla las relaciones de rendimientos cuánticos de fluorescencia entre S complejoado y S libre (Φ), de aquellos sistemas en que la señal de fluorescencia fue exaltada por la formación de complejos huésped-receptor. Estos parámetros se establecieron empleando las ecuaciones 3.19 y 3.20, las cuales suponen la formación de un complejo de estequiometría 1:1.



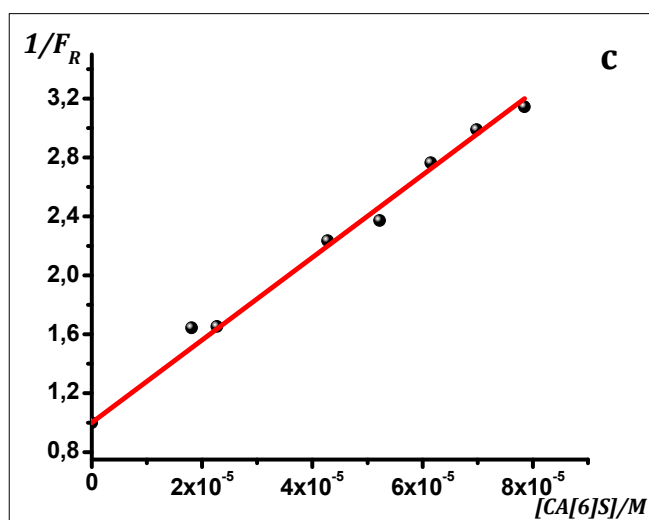


Figura 3-18. (—) Ajustes del modelo de Stern-Volmer (ecuación 3.20) a la variación de la señal de fluorescencia de CZL y QUI en presencia de receptores macrocíclicos. (a) de CZL ($[CZL] = 5,2 \mu M$) en función de $[CA[6]S]$, (b) de QUI ($[QUI] = 26,0 \mu M$) en función de $[\gamma-CD]$; y (c) de QUI ($[QUI] = 26,0 \mu M$) en función de $[CA[6]S]$. Se grafica la fluorescencia como $1/F_R = F_0/F$. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994; 2,0 % v/v de CH_3OH ; 25,0 °C; $\lambda_{exc} = 322,0$ nm; ancho de rendijas de excitación y de emisión = 10,0 nm; ganancia del fotomultiplicador = muy baja; $b = 1,0$ cm.

Los valores de las constantes de asociación entre CZL y las CDs (a 25,0 °C), obtenidas a partir de mediciones por espectroscopia UV-Visible (Sección 3.4.1.4) y espectrofluorimetría (tabla 3-6) concuerdan bastante bien dentro del error experimental. Esto concuerda con el modelo estequiométrico 1:1 ya planteado para el sistema estudiado.⁴³

Tabla 3-6. Valores de las constantes de asociación entre CZL y derivados β -CD, y de las relaciones de rendimientos cuánticos de fluorescencia.^a

<i>Receptor</i>	<i>QUI</i>	<i>CZL</i>	
	$K_A, 10^2 M^{-1}{}^b$	$K_A, 10^2 M^{-1}{}^b$	Φ
β -CD	0,50 ± 0,04	7 ± 1	1,32 ± 0,01
HP β -CD	-	12 ± 1	1,56 ± 0,02
Me β -CD	-	1,7 ± 0,6	1,54 ± 0,09
γ -CD	0,57 ± 0,01	-	-
CA[6]S	23,9 ± 0,4* 280 ± 5	47 ± 1	-
CA[8]S	201 ± 5	89 ± 5	-

^(a) [CZL] = 5,0 μ M; CH₃OH 2,0 % v/v. La fluorescencia relativa F_R se corrigió descontando los blancos correspondientes. Desviaciones estándares calculados por Sigma Plot 8.0.

^(b) Constantes obtenidas a 25,0°C y en 95,0 % v/v buffer fosfato pH = 6,994, el dato con asterisco (*) fue determinado en 95,0 % v/v de buffer HCl 0,01/NaCl 0,09 M de pH = 2,101.

Para los complejos entre CZL y los derivados de β -CD estudiados, las relaciones de rendimientos cuánticos de fluorescencia son superiores a la unidad, reflejando la intensificación de la señal analítica por adición del macrociclo.

Por la técnica fluorimétrica no se pudo determinar una constante de asociación entre CZL y α -CD ya que los cambios en la emisión de fluorescencia fueron poco significativos con la adición de concentraciones crecientes de este receptor macrocíclico.

3.4.2.4. Relación estequiométrica de los complejos huésped-receptor por fluorescencia

La ecuación de doble recíproca, utilizando medidas de fluorescencia, se presenta a continuación:

$$\frac{[R]_0}{F_R - 1} = \frac{1}{K_A(\Phi - 1)} + \frac{[R]_0}{(\Phi - 1)} \quad (3.22)$$

Esta ecuación se deriva de la isoterma (ecuación 3.19) empleada para determinar las K_A por espectroscopia de fluorescencia.

Considerando la ecuación 3.22, si al graficar $[R]_0/(F_R - 1)$ en función de la concentración del macrociclo se obtiene una relación lineal, la estequiometría del complejo huésped-receptor es 1:1. Una curvatura en dicho gráfico significaría que la relación estequiométrica entre el *S* y el *R* es distinta a 1:1. En la figura 3-19 se muestra el gráfico de doble recíproca para la respuesta de fluorescencia del sistema CZL-HP β -CD.

Los gráficos de doble recíproca correspondientes a los complejos formados entre los sustratos orgánicos, CZL y QUI, y los receptores macrocíclicos CDs muestran en todas las curvas comportamiento lineal con coeficientes de correlación aceptables ($> 0,93$).

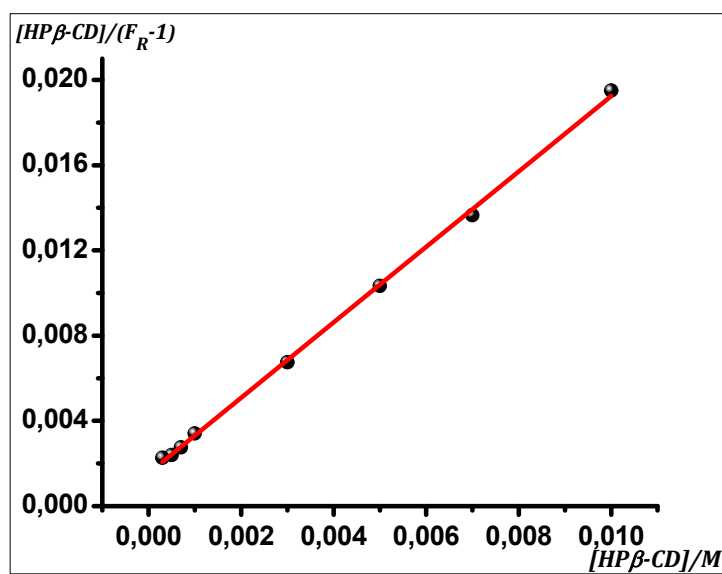


Figura 3-19. Gráfico de doble recíproca con medidas espectrofluorimétricas para confirmación de estequiometría 1:1 del complejo CZL-HP β -CD.

3.5. DISCUSIÓN

3.5.1. Propiedades espectroscópicas de los compuestos estudiados

Las propiedades espectroscópicas de absorción y de emisión de fluorescencia de una molécula proveen información asociada a la estructura, energía y dinámica de los distintos estados electrónicos de la misma molécula^{47,48}

Los espectros de emisión de fluorescencia de diferentes fluoróforos presentan características generales.⁴⁹ Por ejemplo, se sabe que la banda de emisión de una determinada transición electrónica se desplaza hacia longitudes de onda mayores respecto a la banda de absorción ($\lambda_{max}^{em} > \lambda_{exc}$). La diferencia entre ambas bandas se denomina corrimiento de Stokes⁴⁹ (ver Apéndice A, sección A.1), y en general el perfil del espectro de emisión de fluorescencia corresponde a la imagen especular de la banda de absorción (o excitación) de la transición $S_0 \rightarrow S_1$ (Regla de Kasha) y no varía con la longitud de onda de excitación (Regla de Vavilov).⁴⁹ El cambio de estas características en un dado luminóforo se asocia a cambios en el medio circundante (polaridad, presencia de especies químicas interactuantes, etc.).^{49,50}

Aunque la λ_{em} de la banda de emisión de fluorescencia puede cambiar con diferentes solventes, su posición es característica del medio en que se encuentre la especie emisora. Esta constancia en la ubicación de la banda de emisión ha llevado a relacionar que la fluorescencia ocurre desde el nivel más bajo del estado electrónico singlete excitado (S_1) contiguo al estado basal (S_0).^{49,50,51} Esto se explica sobre la base de que las transiciones electrónicas entre estados electrónicos excitados de la misma multiplicidad de spin son mucho más rápidas que la transición desde el estado electrónico más bajo hacia el estado fundamental.

Los espectros de absorción de CZL y QUI expuestos en la figura 3-2 (a y b, respectivamente) son moderadamente estructurados y presentan valores de coeficientes de absorptividad molar relativamente altos respecto a otros HAP.⁴⁷ Las bandas de absorción en estos espectros involucran transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$.^{52,53}

En el espectro de absorción de CZL la banda observada a 322,0 nm se le asigna la transición típica $\pi \rightarrow \pi^*$ al estado localmente excitado.⁵² En adición, el pequeño máximo que se observa a 334,6 nm posiblemente se deba a transiciones electrónicas desde el estado basal a estados de transferencia de carga intramolecular.⁵⁴ Las bandas a 322,0 nm

y 290,0 nm se asignaron a las transiciones electrónicas $S_0 \rightarrow S_1$ y $S_0 \rightarrow S_2$, respectivamente (ver apéndice A). Las posiciones de dichas bandas fueron verificadas con datos espectroscópicos obtenidos por cálculos químico cuánticos (ZINDO/S) ya publicados para carbazoles en diferentes medios orgánicos (acetonitrilo, etanol y ciclohexano).⁵⁵ En el origen de la banda con máximo a 290,0 nm, se encuentra la *transición adiabática* a una longitud de onda de 277,0 nm (calculado por TD-B3P86).⁵⁶

Con respecto a la especie neutra QUI, la transición de más baja energía presenta carácter $n \rightarrow \pi^*$ (a 318 nm con un $\epsilon = 80 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).⁵⁷ La banda correspondiente a dicha transición queda solapada con la banda de absorción intensa a 280,0 nm de carácter $\pi \rightarrow \pi^*$. Esta banda a 280,0 nm ha sido asignado a la transición $S_0 \rightarrow S_2$, cuya degeneración da origen a dos bandas de absorción: una débil a 312,5 nm (transición $S_0 \rightarrow S_1$) y una intensa a 229,5 nm (transición $S_0 \rightarrow S_3$),⁵⁷ como se puede apreciar en los espectros experimentales de QUI de la figura 3-2b.

La especie protonada, QUIH^+ , muestra una variación importante en la absorción UV-Vis respecto de la especie neutra QUI. La banda correspondiente a la transición $S_0 \rightarrow S_2$ se desplaza desde los 280,0 nm hacia una mayor longitud de onda de absorción (aproximadamente a 307,4 nm se observa en forma de hombro en el espectro, ver figura 3-2b), mientras que el máximo de absorción debido a la transición $S_0 \rightarrow S_1$ solo se corre ligeramente. La intensificación de la absorción de QUIH^+ , observada en la región entre 290,0 y 340,0 nm, puede deberse en parte al aumento del carácter polar debido al enlace N-H.⁵⁸

Los espectros de emisión de fluorescencia de CZL y QUI muestran una estructura amplia que responde a las condiciones a las que se obtuvieron dichos espectros (ancho de rendijas de excitación de 10,0 nm). La banda de emisión del núcleo carbazólico se relaciona con la correspondiente transición $S_1 \rightarrow S_0$ (el espectro de emisión es imagen especular de la banda de absorción asociada con la transición $S_0 \rightarrow S_1$), con un $\Delta\lambda_{\text{Stokes}} = 39,9 \text{ nm}$. En tanto que el espectro de emisión de quinolina en medio ácido (QUIH^+) como en neutro (QUI) presenta la misma estructura y el mismo $\Delta\lambda_{\text{Stokes}} = 96,2 \text{ nm}$ (ver figuras 3-12b y 3-13). Solamente se aprecia una marcada disminución en intensidad en el medio

neutro, debido al menor valor del coeficiente de absorción y a una disminución del rendimiento cuántico de la especie emisora (ver figura 3-12). Realizando la relación de áreas de los espectros de fluorescencia de QUIH⁺ y QUI, F_{QUIH^+}/F_{QUI} , obtenidas de los espectros expuestos en la figura 3-12b, y utilizando la ecuación 3-13 se obtiene una relación de rendimientos cuánticos de fluorescencia de la especie protonada y la especie neutra, ϕ_{QUIH^+}/ϕ_{QUI} , igual a 3,75.

3.5.2. Efecto de receptores macrocíclicos sobre las propiedades espectroscópicas de CZL y QUI

El efecto de complejación entre un dado luminóforo y un receptor macrocíclico depende de la identidad del sistema supramolecular y puede atribuirse a diferentes factores.⁴⁶ Por ejemplo, el entorno menos polar en la cavidad hidrofóbica del receptor en relación al seno de la solución acuosa puede inducir a corrimientos batocrómicos de las señales de absorción en el UV-Vis. En muchos casos, la complejación restringe el movimiento rotacional del sustrato y/o protege al luminóforo excitado de otras especies desactivadoras (*quencher*s). Estos efectos disminuyen los mecanismos de decaimiento no radiativos, intensificando la señal de fluorescencia.⁴⁶

Se ha observado que la naturaleza de unión de los receptores macrocíclicos empleados conduce a resultados bien diferentes para los núcleos heterocíclicos estudiados. Esta sección se divide de acuerdo a la clase de receptores macrocíclicos estudiados.

3.5.2.1. Efecto de ciclodextrinas

Los cambios espectrales observados en solución acuosa en presencia de receptores macrocíclicos CDs pueden relacionarse al proceso de formación de complejos de inclusión, dependiendo del tamaño de la cavidad del macrociclo.

Con ciclodextrinas se obtuvieron efectos contrarios para CZL y QUI. En presencia de CDs la intensidad de absorción de CZL se vió incrementada como consecuencia de la interacción fundamentalmente del tipo hidrofóbica, entre el macrociclo y el núcleo carbazólico. El incremento observado podría atribuirse a la formación del complejo CZL-β-

CD que, por un lado, rigidiza la estructura molecular del sustrato.⁵⁹ Si bien el incremento en la intensidad de absorción es similar para α -CD y β -CD (tabla 3-4), el efecto es aún mayor en presencia de HP β -CD, con lo que se puede predecir que los grupos hidroxilos intervienen en las fuerzas atractivas que conducen a la formación del complejo CZL-HP β -CD (ver tabla 3-4). Estas fuerzas pueden ser del tipo puente hidrógeno (-OH---N-) o interacciones entre los hidrógenos de los grupos hidroxilos de la CD y el sistema π -electrónico del sustrato (interacciones del tipo π). La sustitución por grupos metilo en el receptor Me β -CD conduce a un menor cambio en la intensidad de la absorción con respecto a lo obtenido para α -CD, β -CD y HP β -CD. Los grupos metilo sustituyentes no interaccionan con la misma fuerza que lo hacen los grupos hidroxilo, esto se ve reflejado de alguna manera en la intensidad del cambio espectral. Puede verse, que al aumentar el tamaño de la cavidad cuando se utiliza γ -CD, no se observa cambio en el espectro UV-Vis. Esto puede deberse a que el microambiente dentro de la cavidad de la γ -CD no difiere al del seno de la solución acuosa, ya que la cavidad más amplia de este receptor permitiría la entrada de moléculas de agua junto con el sustrato orgánico⁶⁰ o no hay una complementariedad de tamaño.

Se observa además un ligero *corrimiento batocrómico* en el espectro de CZL en presencia de las β -CDs estudiadas. Este comportamiento es característico de las transiciones electrónicas $n \rightarrow \pi^*$, cuando N-heterociclos actúan como aceptores de hidrógeno. Los grupos hidroxilos de las CDs actúan como donadores de H y se establecen interacciones puente hidrógeno cuyo efecto es un desplazamiento hacia mayores λ_{\max} .⁶¹ Además un cambio de polaridad en el microambiente cercano al núcleo sería responsable de un corrimiento del máximo de A .²² En la figura 3-20 se esquematizan de forma cualitativa posibles disposiciones que podrían adoptar el núcleo CZL y las CDs nativas α y β .

Por otro lado, se puede ver que con el receptor α -CD no se produce un cambio en la longitud de onda de absorción máxima ($\Delta\lambda_{\max} = 0,00$), lo que puede sugerir una interacción superficial (receptor-OH---sistema- π del sustrato, además de interacciones puente H secundarias) más que una inclusión del sustrato dentro de la cavidad de la α -CD

cuyo diámetro interno es de alrededor $5,3 \text{ \AA}$, menor al diámetro longitudinal de CZL de aproximadamente $6,0 \text{ \AA}$ (ver figura 3-20).

A diferencia de lo observado con CZL, el efecto en la absorción de la especie neutra QUI fue menor debido a la protección del sistema π -electrónico cuando se produce la encapsulación del núcleo quinoleínico. Además, el espectro sufre un ligero desplazamiento batocrómico del máximo de absorción debido a interacciones puente de hidrógeno que influyen sobre transiciones $n \rightarrow \pi^*$ como se mencionó anteriormente. Este efecto se observó con β -CD, HP β -CD, Me β -CD y γ -CD, mientras que con α -CD no se observaron cambios significativos en el espectro UV-Vis (ver tabla 3-4), con lo que no se evidenció interacción entre esta última ciclodextrina y el núcleo QUI. Este comportamiento no descarta la posibilidad que el complejo entre QUI y α -CD se forme, sino que por espectroscopia UV-Vis no obtienen indicios de la formación del mismo.

Por otro lado, la absorción de la especie protonada QUIH⁺ no sufrió ninguna modificación espectral en presencia de las CDs estudiadas. Este resultado indica que, si bien por espectroscopia UV-Vis no se identifican interacciones que evidencien la formación de algún complejo entre QUIH⁺ y el receptor macrocíclico, demuestra que las interacciones puente hidrógeno entre QUI y las CDs son las responsables de los cambios observados mediante espectroscopia UV-Vis.

Con respecto a la emisión de fluorescencia de CZL y QUI en presencia de CDs, se obtuvieron nuevamente efectos contrarios: una exaltación de la fluorescencia de carbazol (con derivados β -CDs) y una inhibición de la fluorescencia de quinolina (con las β -CDs y γ -CD). Comportamientos similares al obtenido para CZL en presencia de β -CDs se encuentran comúnmente.^{23,62,63} El incremento en el rendimiento cuántico de CZL complejoado se debe a la restricción de los grados de libertad de movimiento de este cromóforo (efecto “jaula”) que desfavorece los procesos de desactivación no radiativos (conversión interna, transferencia de energía intermolecular, etc.) favoreciendo así la desactivación radiativa por fluorescencia (ver Apéndice A, ecuación A.01 en sección A.1). Se puede predecir entonces, de forma cualitativa, que el núcleo está incluido dentro de la cavidad de la ciclodextrina (figura 3-20).

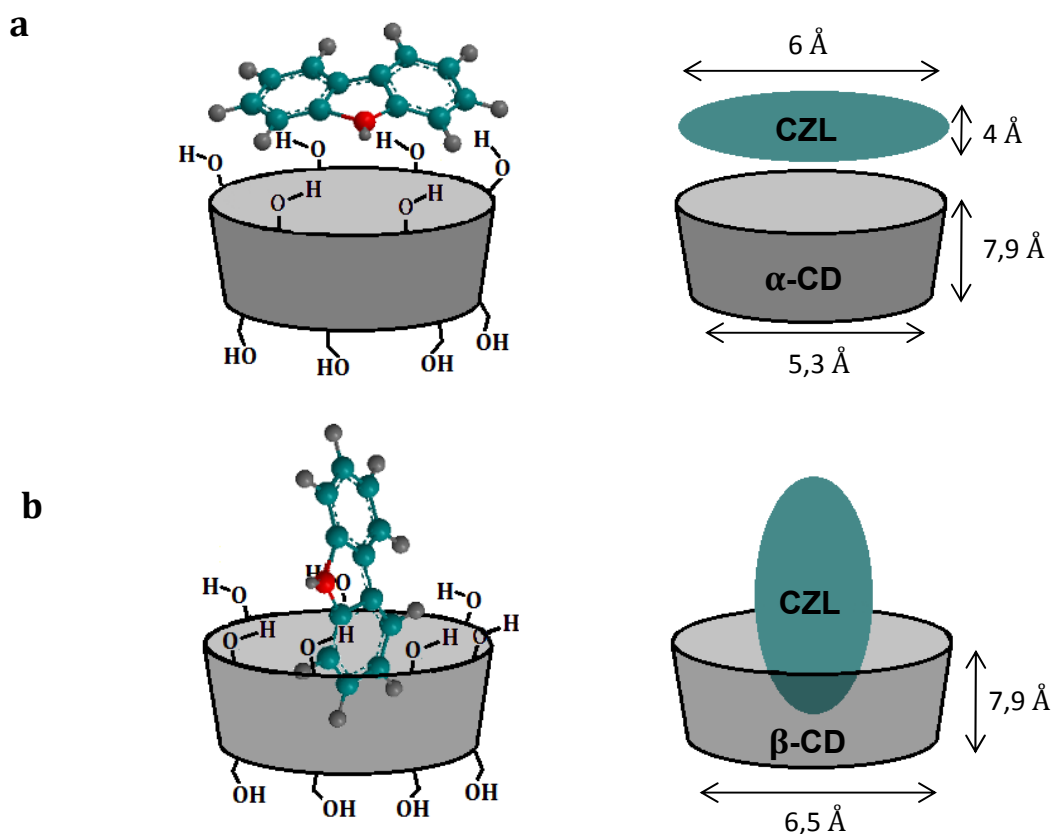


Figura 3-20. Posibles disposiciones de CZL en los complejos con α -CD y β -CD. **(a)** Interacción superficial entre CZL y α -CD **(b)** Inclusión de CZL en β -CD. (La orientación relativa de los componentes de los sistemas es ilustrativa).

Con respecto a la disminución en la emisión de fluorescencia de QUI al aumentar la concentración de los receptores CDs, este resultado es bastante menos frecuente entre los estudios de fluorescencia de complejos sustrato-receptor. En este sistema la extinción de fluorescencia se puede deber a interacciones puente H específicas entre los anillos quinoleínicos incluidos en la cavidad receptora y varios grupos hidroxilos de la CD.⁶⁴ Estas interacciones no covalentes específicas conducirían a la formación de un complejo no fluorescente o menos fluorescente que el fluoróforo libre.^{23,65}

3.5.2.2. Efecto de receptores CA[6]S y CA[8]S

El efecto de los receptores *p*-sulfnatocalix[6]areno y *p*-sulfnatocalix[8]areno (CA[6]S y CA[8]S) sobre la absorción del núcleo CZL se estudió a dos pH diferentes. Según los valores de pK_a informados en literatura (tabla 2-5), el derivado CA[6]S en el medio ácido

presenta sus grupos $-\text{SO}_3\text{H}$ deprotonados, mientras que en el medio neutro presenta además dos grupos $-\text{OH}$ deprotonados. El receptor CA[8]S por su parte en el medio ácido empleado presenta seis de sus grupos $-\text{SO}_3\text{H}$ deprotonados, y al pH neutro se produce la deprotonación de los dos grupos sulfónicos restantes (ver tabla 2-5).

El macrociclo CA[6]S influye en el espectro de absorción de CZL de forma tal que la absorbancia del sistema disminuye. Este efecto es más pronunciado a $\text{pH} = 6,994$ que a $\text{pH} = 1,00$ (ver figura 3-7). Quizás este comportamiento se deba a la mayor ionización de la estructura macrocíclica que posiblemente induzca a conformaciones más complementarias (con un mayor número de sitios de unión) con el cromóforo.

En cuanto a la acción de CA[8]S sobre la absorbancia de CZL, no se evidenció interacción por esta técnica espectroscópica. Este hecho no significa que las interacciones entre el sustrato orgánico y el receptor CA[8]S estén ausentes. Tampoco se registraron cambios significativos en la absorbancia de las especies QUI y QUIH⁺.

Con respecto a las posibles estructuras de los complejos, resulta más complicado que en el caso de receptores CDs, ya que al ser los CA[n]S moléculas muy flexibles, existen numerosos conformeros en equilibrio interconvirtiéndose unos con otros a gran velocidad.⁶⁶

El quenching observado para la formación de los complejos CZL-CA[n]S y QUI-CA[n]S se debe puramente a fuerzas electrostáticas (ión-dipolo, ión-ión y catión- π) que llevan a la formación de complejos del tipo sustrato-receptor.

Para demostrar la formación de los complejos de CZL y QUI con los receptores macrocíclicos empleados se verificó el efecto macrocíclico mediante el uso del monómero de cada receptor (glucosa (GLU) y ácido *p*-hidroxibencenosulfónico (ApHbS) para CDs y CA[n]S, respectivamente). La absorción del núcleo CZL no fue afectada y el espectro de emisión de fluorescencia no presentó corrimiento de λ_{em} ni se observó cambio en la intensidad de la emisión (ver figuras 3-9 y 3-15). Por otro lado, se observó una ligera variación en la emisión de fluorescencia de QUI en presencia de GLU y ApHbS (15 % de inhibición, en figura 3-15b se muestra dicho efecto con GLU), probablemente debido a un aumento en la polaridad del medio (ver apéndice A, sección A.3.2); no obstante, este decaimiento no llega a ser comparable al quenching existente en presencia de receptores CDs y CA[n]S. Con este estudio se pudo corroborar que los cambios espectroscópicos

observados tanto para el CZL como para la QUI se debieron realmente a un efecto macrocíclico y no a un efecto del medio por una alta concentración de los receptores.⁶⁷

3.5.3. Mecanismo de quenching involucrado

La complejación de CZL y QUI con CA[6]S y CA[8]S generalmente llevó a una fuerte inhibición de la fluorescencia de estas moléculas luminiscentes. Para corroborar el mecanismo de quenching que experimenta cada sistema se estimó la constante de quenching bimolecular (k_q), a partir de la ecuación 3.21 suponiendo un proceso dinámico. Los valores de estas constantes se determinaron a partir de las constantes de asociación de los complejos y considerando valores de tiempos de vida del estado excitado de 1,75 ns para QUI⁶⁸, y de 13,7 ns y 17,2 ns para CZL.^{69,70} Los valores estimados de k_q ($(3,43 \times 10^{11} - 1,6 \times 10^{13}) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) fueron superiores al máximo valor posible de constante de velocidad de difusión de especies moleculares en solución ($\sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^{49,71} Por lo tanto, la inhibición de la emisión de fluorescencia cuando se forman los complejos sustrato-receptor es debido a un mecanismo estático, el cual involucra la asociación del receptor CA[n]S (quencher, Q) y el fluoróforo en el estado basal, para formar un complejo no fluorescente (figura 3-21).

El quenching de fluorescencia obtenido para QUI en presencia de ciclodextrinas, también se puede proponer que transcurre vía un complejo no fluorescente entre QUI en el estado basal y el receptor ciclodextrina (figura 3-21). Las constantes k_q obtenidas superan al límite difusional ($(2,28 \times 10^{10} - 3,26 \times 10^{10}) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), con lo que se trata de un quenching estático de fluorescencia (ver apéndice A).

3.5.4. Valores de K_A y estequiometría de los complejos sustrato-receptor

Se evidenció la formación de complejos de estequiometría 1:1 entre los heterociclos nitrogenados CZL y QUI. Se emplearon modelos que asumen esta estequiometría y tanto por espectroscopia UV-Vis como de fluorescencia de estado estacionario, se obtuvieron buenos ajustes de constantes de asociación (K_A). La obtención de una dependencia lineal en el gráfico de doble recíproca (ecuación 3.12) justifica la formación de complejos con esta estequiometría. Además, el empleo del modelo de Stern-Volmer para el quenching estático de fluorescencia indica la presencia de esta estequiometría en los complejos formados con CZL y CA[n]S, y con QUI y los receptores β -CD, γ -CD y CA[n]S.

Con respecto a la magnitud de los valores de constantes de asociación obtenidas puede apreciarse la mayor estabilidad de los complejos de CZL y QUI con derivados CA[n]S (del orden de 10^3 - 10^4 M⁻¹, ver tabla 3-6). Esta diferencia se debe a las interacciones electrostáticas que mantienen la asociación del sustrato orgánico y el receptor CA[n]S, que son de naturaleza más fuertes que las que gobiernan la formación de los complejos con ciclodextrinas cuyas interacciones son de naturaleza hidrofóbicas, además de interacciones puentes H, fuerzas de Van der Waals y dipolares (ver tabla 2-1).

Los receptores ciclodextrinas, en especial las β -CDs, formaron complejos más estables con CZL (K_A del orden de $(10^2 - 10^3)$ M⁻¹) que con QUI (K_A del orden de 10^1 M⁻¹), probablemente debido a una mayor complementariedad estructural y electrónica del CZL con la cavidad de estos receptores. Con respecto a la complementariedad electrónica, en complejos QUI-CDs los puentes hidrógeno que se establecen (-N: --- HO-) estarían desestabilizados por fuerzas electrostáticas de repulsión entre el par de electrones solitario del átomo de N del heterociclo con los pares de electrones libres de los grupos hidroxilos de las ciclodextrinas (interacciones repulsivas, ver figura 2-4). En tanto que la formación de enlaces puente H en complejos CZL-CDs resulta ser favorecida por la ausencia de repulsiones electrostáticas secundarias como las mencionadas anteriormente.

Los valores de la relación de rendimiento cuántico de fluorescencia entre CZL complejo y libre ($\Phi = \phi_{CZLCD}/\phi_{CZL}$) fueron de 1,32 a 1,54, lo que indicaría la disminución de la velocidad de los procesos no radiativos, favoreciendo la fluorescencia.

Se obtuvo un mayor valor de K_A con HP β -CD entre las ciclodextrinas estudiadas, esta ciclodextrina aportaría una mayor interacción gracias a los grupos hidroxipropilos. El incremento obtenido en la señal de fluorescencia del carbazol por formación del complejo podría ser la base del desarrollo de metodologías analíticas para el sensado de este tipo de moléculas (ver capítulo 4).

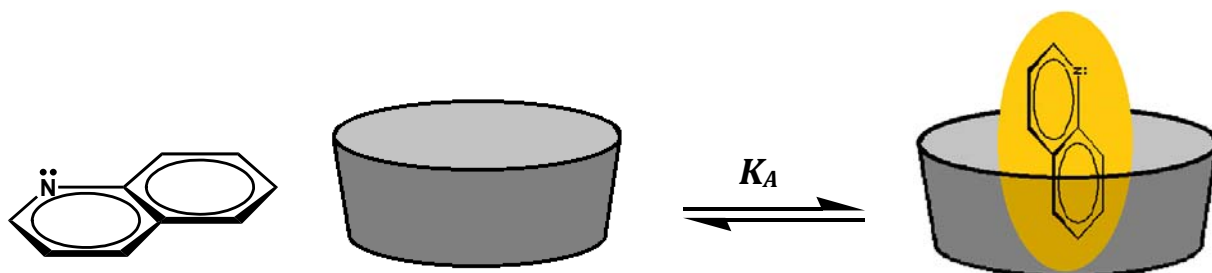


Figura 3-21. Formación del complejo no fluorescente QUI-R.
(La orientación relativa de los componentes del sistema es ilustrativa)

3.6. CONCLUSIONES

La variación observada en los espectros de absorción UV-Vis de CZL y QUI permitió evidenciar la interacción con CDs, y solamente para el primer heterociclo se observaron pequeños cambios en la absorción en presencia de CA[n]S.

Los receptores CDs provocaron una exaltación importante de la fluorescencia del CZL, mientras que causaron un decaimiento en la fluorescencia de QUI. Los derivados *p*-sulfonatocalix[n]arenos indujeron un fuerte quenching de la fluorescencia de ambos núcleos fluorescentes. El quenching de fluorescencia fue del tipo estático.

La naturaleza de las interacciones de estos sistemas supramoleculares es principalmente hidrofóbica para los complejos con ciclodextrinas y electrostática para cuando se utilizan los calixarenos sulfonados. Esta diferencia en las fuerzas de interacción se vio reflejada en los valores de K_A obtenidos para los diferentes complejos sustrato-receptor.

Los marcados cambios en las propiedades espectrofluorimétricas servirían de base para el desarrollo de métodos analíticos basados en la formación de complejos fluorescentes. Otro recurso, es el empleo de un complejo no fluorescente en un método indirecto que por desplazamiento del fluoróforo, debido al ingreso de un analito no fluorescente, este último puede ser determinado.

3.7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] “*Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic hydrocarbons in food*”. The EFSA Journal, 724 (2008) 1 – 114.
- [2] A. K. Chakravarty, T. Sarkar, K. Masuda, K. Shiojima. “*Carbazole alkaloids from roots of *Glycosmis arborea**”. Phytochemistry, 50 (1999) 1263 – 1266.
- [3] W. C. Evans. “*Pharmacognosy*”. Ed. 16^{ta} Elsevier Ltd., (2009).
- [4] S. Fetzner. “*Bacterial degradation of pyridine, indole, quinolone, and their derivatives under different redox conditions*”. Appl. Microbiol. Biotechnol., 49 (1998) 237 – 250.
- [5] D. Reyman, M. H. Viñas, J. J. Camacho. “*Steady-state and time-resolved study of the proton-transfer fluorescence of harmine and 2-methyl-harmine in organic solvents*”. J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 120 (1999) 85 – 91.
- [6] H. J. Knölker, and K. R. Reddy. “*Isolation and Synthesis of Biologically Active Carbazole Alkaloids*”. Chem. Rev., 102, (2002) 4303 – 4427.
- [7] M. Sbai, S. A. Lyazidi, D. A. Lerner, B. del Castillo, M. A. Martin. “*Modified β -cyclodextrins as enhancers of fluorescence emission of carbazole alkaloid derivatives*”. Anal. Chim. Acta, 303 (1995) 47 – 55.
- [8] C. L. Arteaga, D. L. Kisner, A. Goodman, D. D. von Hoff. “*Elliptinium, a DNA intercalating agent with broad antitumor activity in a human tumor cloning system*”. Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 23 (1987) 1621 – 1626.
- [9] C. Meléndez-Gómez, V. Kouznetsov. “*Alcaloides Quinolínicos: Importancia biológica y Esfuerzos Sintéticos*”. Univ. Sci., 10 (2005) 5 – 18.
- [10] X. Zhang, T. Yao, M. A. Campo, R. C. Larock. “*Synthesis of substituted quinolines by the electrophilic cyclization of *n*-(2-alkynyl)anilines*”. Tetrahedron, 66 (2010) 1177 – 1187.
- [11] D. Yang, K. Jiang, J. Li, and F. Xu. “*Synthesis and characterization of quinolone derivatives via the Friedländer reaction*”. Tetrahedron, 63 (2007) 7654 – 7658.
- [12] B. Chandrasekhar, A. S. R. Prasad, S. Eswaraiah, and A. Venkateswaralu. “*Development of an Efficient Process for 4, 5, 7-Trichloroquinoline, A key Intermediate for Agrochemical Synthesis*”. Org. Process Res. Dev., 6 (2002) 242 – 245.
- [13] S. N. Pandeya, A. Tyagi. “*Synthetic Approaches for Quinoline and Isoquinoline*”. Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 3 (2011) 53 – 61.

- [14] N. Li, X. Ma, Q. Zha, and C. Song. “*Analysis and Comparison of Nitrogen Compounds in Different Liquid Hydrocarbon Streams Derived from Petroleum and Coal*”. *Energy Fuels*, 24 (2010) 5539 – 5547.
- [15] X. Cheng, T. Zhao, X. Fu, Z. Hu. “*Identification of nitrogen compounds in RFCC diesel oil by mass spectrometry*”. *Fuel Process. Technol.*, 85 (2004) 1463 – 1472.
- [16] M. Arias Estévez, D. Fernandez Gándara, M. S. García Falcón, L. García Río, J. C. Mejuto, J Simal Gándara. “*Sorption of PAHs to colloid dispersions of humic substances in water*”. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 79 (2007) 251 – 254.
- [17] L. Zanieri, P. Galvan, L. Checchini, A. Cincinelli, L. Lepri, G. P. Donzelli, M. Del Bubba. “*Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: Influence of cigarette smoking and residential área*”. *Chemosphere*, 67 (2007) 1265 – 1274.
- [18] L. Rey Salgueiro, M. S. García Falcón, E. Martínez Carballo, C. Gonzáles Barreiro, J. Simal Gándara. “*The use of manures for detection and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons and 3-hydroxibenzo[a]pirene in animal husbandry*”. *Sci. Total Environ.*, 406 (2008) 279 – 286.
- [19] Agency for toxic Substances and Disease Registry; “*Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons*”. 1^{ra} Edición, Atlanta, (1995).
- [20] “*IARC Monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans: Some non-heterocyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures*”. 1^{ra} Edición, Lyon (2010).
- [21] L. Rey Salgueiro, E. Martinez Carballo, M. S. García Falcón, J. Simal Gándara. “*Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in canned bivalves and investigation of their potential sources*”. *Food Res. Int.*, 42 (2009) 983 – 988.
- [22] P. Mura. “*Analytical techniques for characterization of cyclodextrine complex in aqueous solution: A review*”. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 101C (2014) 238 – 250.
- [23] M. Shaikh, Y. M. Swamy, H. Pal. “*Supramolecular host-guest interaction of acridine dye with cyclodextrin macrocycles: Photophysical, pK_a shift and quenching study*”. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 258 (2013) 41 – 50.
- [24] S. Letellier, B. Maupas, J. P: Gramond, F. Guyon, P. Gareil. “*Determination of the formation constant for the inclusion complex between rutin and methyl-β-cyclodextrin*”. *Anal. Chim. Acta*, 315 (1995) 357 – 363.
-

- [25] N. Li, Y. H. Zhang, X. L. Xiong, Z. G. Li, X. H. Jin, Y. N. Wu. “*Study of the physicochemical properties of trimethoprim with β -cyclodextrin in solution*”. J. Pharm. Biomed. Anal., 38 (2005) 370 – 374.
- [26] G. S. Jadhav, P. R. Vavia. “*Physicochemical, in silico and in vivo evaluation of a danazol- β -cyclodextrin complex*”. Int. J. Pharm., 352 (2008) 5 – 16.
- [27] R. N. Dsouza, U. Pischel, and W. M. Nau. “*Fluorescence Dyes and Their Supramolecular Host/Guest Complexes with Macrocycles in Aqueous Solution*”. Chem. Rev., 111 (2011) 7941 – 7980.
- [28] L. Pu. “*Fluorescence of Organic Molecules in Chiral Recognition*”. Chem. Rev. 104 (2004) 1687 – 1716.
- [29] C. Ichimura, Y. Shiraishi, T. Hirai. “*Fluorescence properties of polyamines bearing two terminal quinolone fragments in water*”. Tetrahedron Lett., 66 (2010) 5594 – 5601.
- [30] H. Bakirci, A. L. Koner, and W. M. Nau. “*Binding of inorganic cations by p-sulfonatocalix[4]arene monitored through competitive fluorophore displacement in aqueous solution*”. Chem. Commun., (2005) 5411 – 5413.
- [31] H. Bakirci, and W. M. Nau. “*Fluorescence Regeneration as a Signaling Principle for Choline and Carnitine Binding: A Refined Supramolecular Sensor System Based on a Fluorescent Azoalkane*”. Adv. Funct. Mater., 16 (2006) 237 – 242.
- [32] M. Florea, and W. M. Nau. “*Implementation of anion-receptor macrocycles in supramolecular tandem assays for enzymes involving nucleotides as substrates, products, and cofactors*”. Org. Biomol. Chem., 8 (2010) 1033 – 1039.
- [33] D. S. Guo, and Y. Liu. “*Supramolecular Chemistry of p-Sulfonatocalix[4]arenes and Its Biological Applications*”. Acc. Chem. Res., 47 (2014) 1925 – 1934.
- [34] J. M. Madrid, M. Villafruela, R. Serrano, and F. Mendicuti. “*Experimental Thermodynamics and Molecular Mechanics Calculations of Inclusion Complexes of 9-Methyl Anthracenoate and 1-Methyl Pyrenoate with β -Cyclodextrin*”. J. Phys. Chem. B, 103 (1999) 4847 – 4853.
- [35] P. Mura, S. Furlanetto, M. Cirri, F. Maestrelli, G. Corti, S. Pinzauti. “*Interaction of naproxen with ionic cyclodextrins in aqueous solution and in the solid state*”. J. Pharm. Biomed. Anal., 37 (2005) 987 – 994.
- [36] C. N. Strouts, J. H. Gilfillan, H. N. Wilson. “*Analytical chemistry: The working tools*”. 1^{ra} Ed. Clarendon Press, Oxford (1955).
-

- [37] “Grupo de reconocimiento molecular y iónico” Instituto de Química Orgánica, URGS
- [38] M. Neagu, R. M. Ion, G. Manda, C. Constantin, E. Radu, Z. Cristu. “*Antitumoral effect of calixarenes in experimental photodynamic therapy with K562 tumor cell line*”. Rom. J. Biochem., 47 (2010) 17 – 35.
- [39] D. R. Lide. “*Handbook of chemistry and physics*”. CRC Press, Boca Raton, 85^{ta} Edición, (2005).
- [40] H. J. Chen, L. E. Hakka, R. L. Hinman, A. J. Kresge, and E. B. Whipple. “*The Basic Strength of Carbazole. An Estimate of the Nitrogen Basicity of Pyrrole and Indole*”. J. Am. Chem. Soc., 20 (1971) 5102 – 5107.
- [41] B. Richter. “*Essentials of Heterocyclic Chemistry-I*”. Heterocyclic Chemistry, (2009).
- [42] N. J. Turro, V. Ramamurthy, J. S. Scaiano. “*Principles of molecular photochemistry: An introduction*”. 1^{ra} Edición, University Science Books, Sausalito, (2009).
- [43] K. A. Connors. “*Binding constants: The measurement of molecular complex atability*”. 1^{ra} Edición, John Wiley & Sons, Ltd., New York, (1987).
- [44] N. A. Masoud. “*Determination of the Room Temperature Intersystem Crossing Quantum Yield of Quinoline in Alcoholic Solvents*”. J. Chem. Soc. Pak., 24 (2002) 171 – 175.
- [45] Y. Li, H. Chong, X. Meng, S. Wang, M. Zhu, and Q. Guo. “*A novel quinolone-based two-photon fluorescent probe for detecting Cd²⁺ in vitro and in vivo*”. Dalton Trans., 41 (2012) 6189 – 6194.
- [46] A. Douhal. “*Cyclodextrin materials: Photochemistry, photophysics and photobiology*”. 1^{ra} Edición, Elsevier, Kidlington, (2006).
- [47] I. B. Berlman. “*On an empirical correlation between nuclear conformation and certain fluorescence and adsorption characteristics of aromatic compounds*”. J. Phys. Chem., 74 (1970) 3085 – 3093.
- [48] N. J. Turro. “*Modern molecular photochemistry spectroscopy*”. 1^{ra} Ed. University Science Books, Sausalito, (1991).
- [49] J. R. Lakowicz. “*Principles of Fluorescence Spectroscopy*”. 3^{ra} Ed. Springer. Baltimore, Maryland, USA, (2006).
- [50] B. Valeur, and M. N. Berberan-Santos. “*Molecular Fluorescence. Principles and Applications*”. 2^{da} Ed. Wiley-VCH. Weinheim, Germany, (2012).

- [51] A. N. Fletcher. "Fluorescence Emission Band Shift with Wavelength of Excitation". *J. Phys. Chem.*, 72 (1968) 2742 – 2749.
- [52] L. Li, Y. Wu, Q. Zhou, and C. He. "Experimental and theoretical studies on the one-photon and two-photon properties of a series of carbazole derivatives containing styrene". *J. Phys. Org. Chem.*, 25 (2012) 362 – 372.
- [53] I. V. Zuika, Z. P. Bruvers, and A. Y. Yurgis. "MO Self-Consistent-Field Calculations of Quinoline and its Derivatives I. Calculation of the Electronic Spectra of Quinoline and 8-Hydroxyquinoline by the CNDO (Complete Neglect of Differential Overlap) Method". *Chem. Heterocycl. Compd.*, 12 (1976) 1255 – 1258.
- [54] Z. R. Grabowski, and K. Rotkiewicz. "Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures". *Chem. Rev.*, 103 (2003) 3899 – 4031.
- [55] S. M. Bonesi, R. Erra-Balsells. "Electronic spectroscopy of carbazole and N- and C-substituted carbazoles in homogeneous media and in solid matrix". *J. Lumin.*, 93 (2001) 51 – 74.
- [56] I. Ljubić, and A. Sabljic. "CASSCF/CASPT2 and TD-DFT Study of Valence and Rydberg Electronic Transitions in Fluorene, Carbazole, Dibenzofuran, and Dibenzothiophene". *J. Phys. Chem. A*, 115 (2011) 4840 – 4850.
- [57] J. V. Greenhill. "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Quinolines". John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester, England, (1990).
- [58] N. Mataga, Y. Kaifu, and M. Koizumi. "On the Base of Some Nitrogen Heterocycles in the Excited State". *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 29 (1956) 373 – 379.
- [59] C. A. Ventura, G. Puglisi, G. Giammona, and F. A. Bottino. "Comparative study on inclusion compounds of 4-biphenylacetic acid with β -cyclodextrin, hydroxypropylated- β -cyclodextrins, and methylated- β -cyclodextrins". *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 20 (1994) 2245 – 2265.
- [60] A. Mallick, B. Haldar, N. Chattopadhyay. "Encapsulation of norharmane in cyclodextrin: formation of 1:1 and 1:2 inclusion complexes". *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, 78 (2005) 215 – 221.
- [61] H. H. Perkampus. "UV-Vis Spectroscopy and Its Applications". 1^{ra} Ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, (1992).
-

- [62] I. Ghosh, W. M. Nau. “*The strategic use of supramolecular pKa shifts to enhance the bioavailability of drugs*”. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64 (2012) 764 – 783.
- [63] N. Kandoth, S. D. Choudhury, J. Mohanty, A. C. Bhasikuttan, and H. Pal. “*Inhibiting Intramolecular Electron Transfer in Flavin Adenine Dinucleotide by Host-Guest Interaction: A Fluorescence Study*”. *J. Phys. Chem. B.*, 114 (2010) 2617 – 2626.
- [64] M. Shaikh, J. Mohanty, M. Sundararajan, A. C. Bhasikuttan, and H. Pal. “*Supramolecular Host-Guest Interactions of Oxazine-1 Dye with β - and γ -Cyclodextrins: A Photophysical and Quantum Chemical Study*”. *J. Phys. Chem. B.*, 116 (2012) 12450 – 12459.
- [65] C. Sowrirajan, S. Yousuf, and Israel V. M. V. Enoch. “*The Unusual Fluorescence Quenching of Coumarin 314 by β -Cyclodextrin on its Binding with Calf Thymus DNA*”. *Aust. J. Chem.*, 67 (2013) 256 – 265.
- [66] M. Kubinyi, T. Vidóczy, O. Varga, K. Nagy, and I. Bitter. “*Absorption and Fluorescence Spectroscopic Study on Complexation of Oxazine 1 Dye by Calix[8]arenesulfonate*”. *Appl. Spectrosc.*, 59 (2005) 134 – 139.
- [67] X. Zhu, J. Sun, J. Wu. “*Study on the inclusion interactions of β -cyclodextrin and its derivative with dyes by spectrofluorimetry and its analytical application*”. *Talanta*, 72 (2007) 237 – 242.
- [68] L. R. Naik, H. M. Suresh Kumar, S. R. Inamdar, and N. N. Math. “*Steady-State and Time-Resolved Emission Studies of 6-Methoxy Quinoline*”. *Spectrosc. Lett.*, 38 (2005) 645 – 659.
- [69] G. E. Johnson. “*Fluorescence Quenching of Carbazoles*”. *J. Phys. Chem.*, 84, (1980) 2940 – 2946.
- [70] R. Roy, and S. Mukherjee. “*Fluorescence quenching of carbazole and indole by ethylenetrithiocarbonate*”. *Chem. Phys. Lett.*, 140 (1987) 210 – 214.
- [71] E. V. Anslyn, D. A. Dougherty. “*Modern physical organic chemistry*”. 1^{ra} Ed. University Science Books, Sausalito, (2006).

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4

SISTEMA SUPRAMOLECULAR MIXTO FORMADO POR CARBAZOL, HP β -CD Y CA[n]S

4.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo 2 se comentó sobre el empleo de ciclodextrinas y calixarenos como receptores de una gran variedad de especies químicas y algunas de las aplicaciones de los complejos resultantes en diversas áreas dentro de la química.

Estos compuestos macrocíclicos servirían para desarrollar nuevos sensores que sean selectivos y que permitan mejorar la detección de especies químicas de interés por técnicas espectroscópicas.^{1,2,3} Los complejos del tipo sustrato-receptor se suelen emplear en el diseño de sensores luminiscentes en el campo de la química supramolecular analítica.^{1,2,3} En este contexto, el estudio de sistemas ternarios formados por dos receptores macrocíclicos diferentes es interesante y aunque hay relativamente pocos casos descritos en literatura,^{4,5} se han logrado sensores con buenas selectividades para iones y moléculas neutras.^{6,7} Se han reportado por ejemplo, la inclusión de complejos de éteres corona con cationes metálicos dentro de cápsulas formadas por dímeros de *p*-sulfonatocalixarenos⁸ y la inclusión de un derivado calix[4]areno catiónico dentro de la cavidad de cucurbit[10]urilo.⁹

Conociendo los sitios o puntos de unión y la complementariedad entre las subunidades moleculares se pueden hacer predicciones sobre cómo influirá una determinada molécula (receptor) sobre las propiedades de otra o varias moléculas asociadas. En vista de formar una especie supramolecular mediante el reconocimiento molecular de las unidades constituyentes,^{10,11} a continuación se resumen algunas características a tener en cuenta:

- Las unidades moleculares que forman la supramolécula o complejo sustrato-receptor deben tener grupos funcionales que permitan interactuar reversiblemente con el analito. Por ejemplo, funciones polares, ácido base, grupos capaces de mantener uniones de hidrógeno.
- Los sitios de unión de las especies interactuantes deben estar preorganizados de tal manera que proporcionen la selectividad requerida.
- Para detectar y cuantificar un sustrato hay que buscar un cambio en una señal analítica debida a la interacción entre el receptor y el analito.

Respecto al último punto, hay disponible un grupo variado de métodos de señalización, entre los que se incluyen los electroquímicos (ej. potenciometría y amperometría), y espectroscópicos (ej. absorbancia y fluorescencia). En este trabajo de tesis se han utilizado técnicas espectroscópicas, en especial la de emisión de fluorescencia, debido a su gran sensibilidad y la variedad de opciones que se pueden emplear para el análisis de la señal (ej. exaltación y quenching de fluorescencia).¹²

Luego de estudiar el efecto individual de CDs y CA[n]S sobre las propiedades espectroscópicas de CZL, se propuso investigar como influye el agregado de un receptor macrocíclico en la señal espectroscópica de un complejo sustrato-receptor ya formado, operando con receptores de distinta estructura, naturaleza química y electrónica. Este capítulo avanza en el diseño de sistemas fluorescentes mixtos para la detección de hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados.

4.2. OBJETIVOS

En esta instancia se propuso estudiar el comportamiento espectroscópico de un sistema supramolecular mixto entre CZL y dos receptores macrocíclicos de diferente naturaleza química (un CA[n]S y una CD). Además, evaluar la posible formación de complejos ternarios y comparar sus estabildades con los correspondientes complejos binarios.

Se planteó analizar el tipo de mecanismo de complejación que gobierna la formación de complejos en este sistema de tres componentes mediante el estudio de la emisión de fluorescencia. Evaluar la posibilidad y viabilidad del empleo de un sistema ternario para la aplicación en química analítica.

4.3 SECCIÓN EXPERIMENTAL

4.3.1. Instrumentación

Los equipos empleados para la preparación de las muestras, el control de la temperatura, pH y la determinación de los espectros de absorción UV-Visible y de emisión de fluorescencia se describen en la sección 3.3.1 (capítulo 3) de esta tesis.

4.3.2. Reactivos y Procedimiento

4.3.2.1. Reactivos

El carbazol CZL (sólido) empleado fue un reactivo de grado analítico Sigma-Aldrich.

La hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β -CD) empleada fue un reactivo de grado estándar de laboratorios Roquete y Cerestar, con un grado de sustitución por unidad de glucosa de 0,61.

Los derivados *p*-sulfonatocalix[n]arenos, CA[6]S y CA[8]S, fueron sintetizados en colaboración con un laboratorio especializado en síntesis de calixarenos en la universidad de Río Grande del Sur, Brasil.

Las sales inorgánicas empleadas fueron reactivos comerciales de grado analítico. Los solventes que se utilizaron fueron: agua deionizada calidad Milli-Q obtenida de un purificador Millipore, y metanol grado HPLC (Sintorgan).

4.3.2.2. Preparación de soluciones de CZL en ausencia y en presencia de receptores macrocíclicos

Las soluciones concentradas de CZL (solución madre e intermedia) se prepararon mediante su solubilización en metanol (ver Sección 3.3.2.2).

Las soluciones de CZL en presencia de dos receptores macrocíclicos (HP β -CD y CA[n]S) se prepararon partiendo de: una solución de CZL en presencia de un receptor macrocíclico, R_1 , en su máxima concentración (solución A) y una solución del sustrato en presencia de R_1 y un segundo receptor macrocíclico, R_2 , ambos en su máxima concentración (solución B). La concentración de CZL se mantuvo constante ([CZL] = 5,6 μ M). Las muestras a medir se obtuvieron mezclando las soluciones A y B, de manera que

se fue variando la concentración de uno de los receptores (R_2), mientras la concentración de CZL y R_1 se mantuvieron constantes. Cuando el receptor R_2 fue HP β -CD las concentraciones elegidas fueron: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 y 10,0 mM, y cuando R_2 fue un CA[n]S las concentraciones empleadas fueron: 21,8; 43,6; 65,4; 87,2 y 109,0 μ M. En la figura 4-1 se esquematiza este procedimiento experimental.

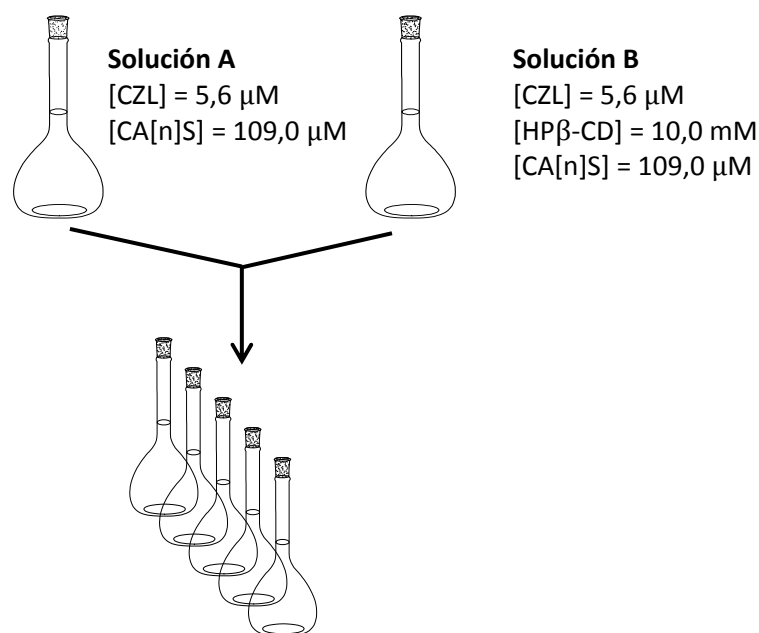


Figura 4-1. Esquema del procedimiento experimental de preparación de muestras del sistema ternario CZL/HP β -CD/CA[n]S.

Todas las soluciones empleadas para el estudio espectroscópico fueron preparadas con un 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y un 2,0 % v/v de CH₃OH como cosolvente. Y se mantuvieron protegidas de la luz recubiertas con papel de aluminio.

4.3.2.3. Preparación de soluciones para la determinación de espectros UV-Visible y de emisión de fluorescencia

Los espectros de absorción (A) se determinaron entre 200,0 nm y 400,0 nm usando cubetas de cuarzo de 1,0 cm y de 4,0 cm de paso óptico. Las mediciones se realizaron a una temperatura controlada de $(25,0 \pm 0,1)$ °C.

Las determinaciones de fluorescencia se realizaron usando cubetas de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico. Los espectros se registraron a partir de una longitud de onda mayor a la λ_{exc} (alrededor de 10,0 nm), hasta una λ en la cual la intensidad de emisión fue nula (340 – 600 nm). El método utilizado para adquirir los espectros de emisión de fluorescencia de CZL en cada sistema ternario se obtuvo de acuerdo a los siguientes parámetros instrumentales:

- Longitud de Onda de excitación (λ_{exc}) = 322,0 nm
- Ancho de rendijas de excitación y emisión = 10,0 nm
- Ganancia del fotomultiplicador = Muy baja
- Velocidad de barrido = 500 nm/min

En el estudio por fluorescencia se trabajó con valores de áreas relativas para minimizar errores por causas instrumentales. Se emplearon como referencia la señal obtenida de soluciones de [CZL] = 5,6 μ M. Además, la concentración de los receptores macrocíclicos fueron tales que, la $2,303A < 0,05$ (con un paso óptico de 1,0 cm). Los espectros se obtuvieron descontando el blanco correspondiente.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1. Análisis espectroscópico de un sistema de tres componentes formado por CZL y dos receptores macrocíclicos diferentes (HP β -CD y CA[n]S).

Ya evaluado los efectos individuales de distintos receptores macrocíclicos sobre la fluorescencia del núcleo carbazol (ver Sección 3.4.2), a continuación se estudia cómo se comporta este fluoróforo en presencia de dos receptores de distinta naturaleza (una CD y un CA[n]S). En este sistema de tres componentes (CZL/CD/CA[n]S), podrían plantearse diferentes situaciones de equilibrio que conllevan a la formación de complejos: coexistencia, competitividad y cooperatividad. En la figura 4-2 se muestra un esquema de los equilibrios que se podrían plantear para el sistema propuesto.

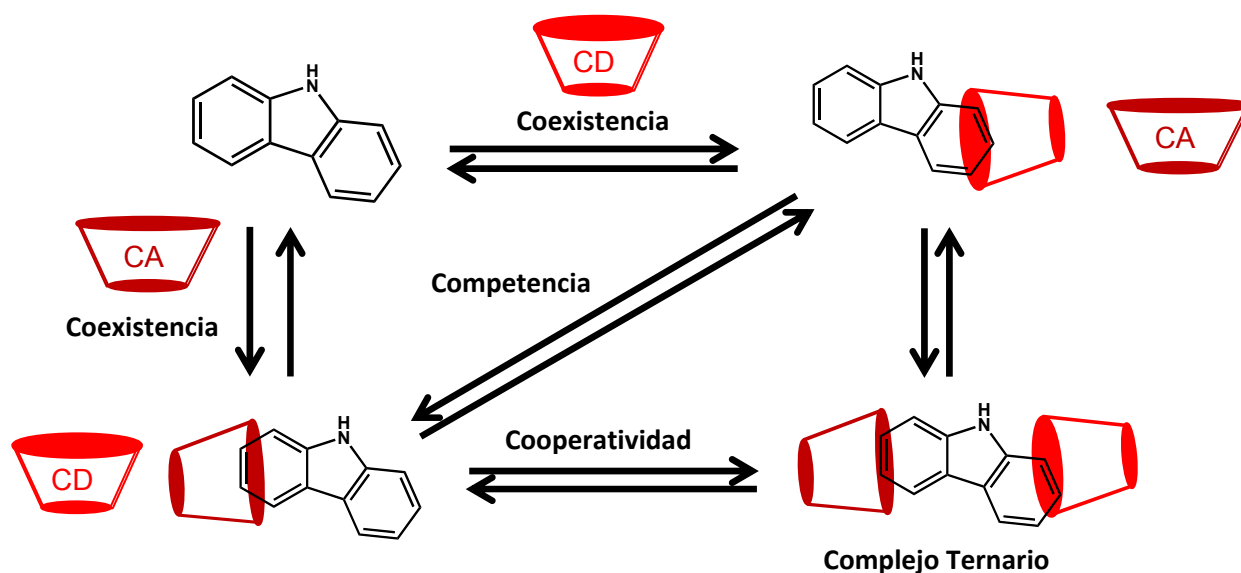


Figura 4-2. Equilibrios que pueden darse en un sistema de tres componentes CZL/CD/CA[n]S. (La orientación relativa de los componentes del sistema es ilustrativa).

El predominio de alguna de estas situaciones depende básicamente de la complementariedad existente entre el sustrato (CZL) y los receptores macrocíclicos CD y CA[n]S, y además, entre los mismos receptores. Por ejemplo, en el caso de la formación de un complejo ternario que surge por la formación, en una primera etapa, de un complejo sustrato-receptor binario, el cual favorece la unión de un segundo receptor en una segunda etapa como muestra la figura 4-2 (ver además Sección 2.1.6.2 en Capítulo 2).

En este trabajo se eligió la HP β -CD (el receptor CD que más fuertemente se asoció al CZL con una $K_A = 12 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$), y un receptor calixareno sulfonado (CA[6]S o CA[8]S cuyas K_A son $4,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y $8,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, respectivamente). Se estudiaron dos sistemas diferentes: CZL/HP β -CD/CA[6]S y CZL/HP β -CD/CA[8]S. Para formar estos sistemas mixtos, inicialmente se preparó uno de los complejos huésped-receptor, CZL- R_1 , y se agregaron cantidades crecientes del segundo receptor (R_2), como se muestra en el esquema experimental de la figura 4-1. Esto se realizó de dos maneras diferentes: partiendo del complejo CZL-HP β -CD y agregando concentraciones crecientes del derivado calixareno sulfonado CA[n]S; y por otro lado, partiendo del complejo CZL-CA[n]S y

adicionando luego el receptor macrocíclico HP β -CD. A continuación se presentan los resultados obtenidos para ambos sistemas por separado.

4.4.1.1. Estudio por espectroscopia UV-Visible de sistemas CZL/HP β -CD/CA[n]S

Se realizaron medidas por espectroscopia UV-Visible para evaluar cómo afecta la aparición de R_2 en la absorción del sistema binario (CZL- R_1). Si bien las mediciones de absorbancia ayudaron a verificar pequeños cambios en la absorción de los sistemas ternarios, no resultaron determinantes para obtener información relevante respecto a las fuerzas de las interacciones o para inferir el mecanismo de complejación.

4.4.1.2. Estudio por espectroscopia de fluorescencia de sistemas CZL/HP β -CD/CA[n]S

Para realizar una mejor interpretación y explicación de los resultados obtenidos por espectroscopia de fluorescencia, se dividirán los resultados de acuerdo al sistema mixto analizado (CZL/HP β -CD/CA[6]S y CZL/HP β -CD/CA[8]S), y dentro de cada sistema se distinguirá la condición inicial desde la que se partió: i) CZL-HP β -CD + CA[n]S y ii) CZL-CA[n]S + HP β -CD.

4.4.1.2.1. Sistema CZL/HP β -CD/CA[6]S

En la figura 4-3 se exponen los perfiles de fluorescencia para CZL/HP β -CD/CA[6]S bajo dos condiciones iniciales diferentes. En la figura 4-3a se muestra como varía la emisión de fluorescencia cuando al complejo CZL- HP β -CD inicialmente formado se le agregan cantidades crecientes del receptor CA[6]S. Por otra parte, en la figura 4-3b se exponen los valores de fluorescencia al variar la concentración del receptor HP β -CD cuando se tiene el complejo binario CZL-CA[6]S como condición inicial (en los gráficos la señal de fluorescencia se expresa como $F_R = F/F_0$, donde, en este caso, F_0 es la fluorescencia en el estado inicial y F indica la fluorescencia luego de agregar el segundo receptor).

Se puede ver claramente, en la figura 4-3a, que la pequeña concentración del receptor CA[6]S no es suficiente para producir un cambio en la fluorescencia. Esto puede resultar evidente por la diferencia de concentraciones entre los macrociclos. Por el contrario, cuando el sistema se estudia desde la formación del complejo CZL-CA[6]S (figura 4-3b), y se registra el cambio en F_R tras la adición de cantidades crecientes de HP β -CD, se puede observar una marcada variación en la emisión de fluorescencia del sistema.

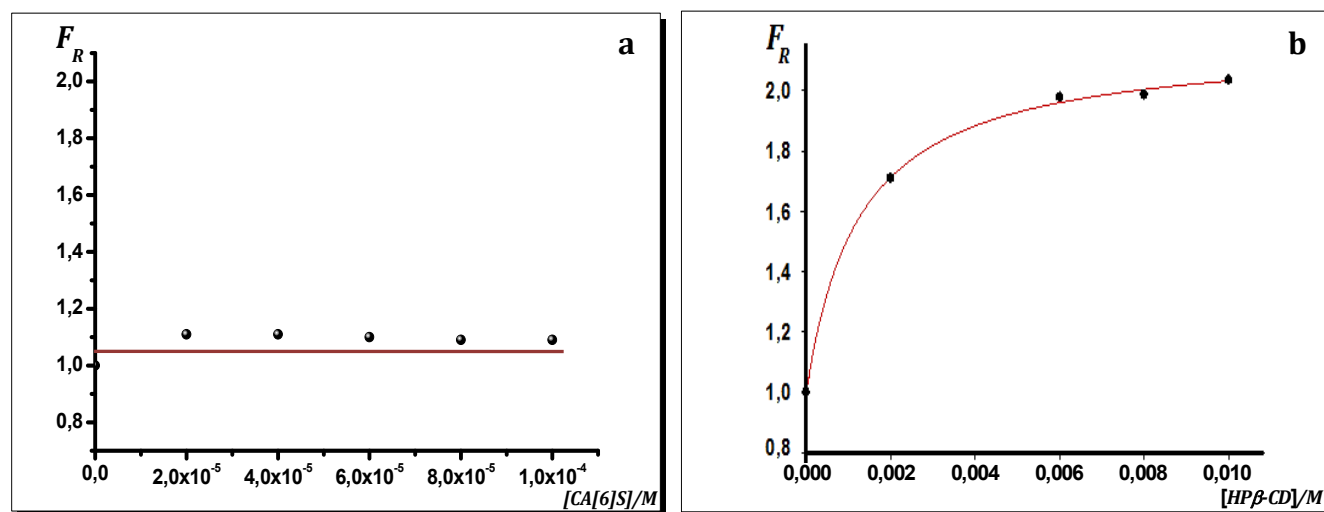


Figura 4-3. Valores de fluorescencia del sistema mixto CZL/HP β -CD/CA[6]S al variar uno de los receptores macrocíclicos. **(a)** partiendo del complejo CZL-HP β -CD variando CA[6]S. Se expone una línea constante indicando que no hay una variación significativa de la respuesta fluorescente del sistema; y **(b)** partiendo del complejo CZL-CA[6]S variando HP β -CD. Se ajusta una curva con la ecuación 4.10. $\lambda_{exc} = 322,0$ nm.

Para explicar el comportamiento fluorescente observado se plantearán diferentes modelos, basados en equilibrios de formación de complejos sustrato-receptor, teniendo en cuenta lo investigado acerca del efecto individual de receptores macrocíclicos sobre el CZL en el capítulo 3 de este trabajo. Se divide el análisis en las dos situaciones estudiadas según la condición inicial de la cual se parte: *i)* CZL-HP β -CD + CA[6]S y *ii)* CZL-CA[6]S + HP β -CD.

4.4.1.2.1i. CZL-HPβ-CD + CA[6]S

Inicialmente se tiene el complejo CZL-HPβ-CD y en el medio se establece simplemente el equilibrio de formación del complejo a partir de CZL e HPβ-CD. Cuando se comienza agregar el calixareno sulfonado el núcleo de CZL se encuentra ahora en presencia de dos receptores y se pueden plantear los siguientes equilibrios simultáneos:



A partir de las expresiones de las constantes de equilibrio K_{A_1} y K_{A_2} , y los balances de masa correspondientes se obtienen las siguientes expresiones para las especies en el equilibrio:

$$[\text{CZL}] = \frac{[\text{CZL}]_0}{1 + K_{A_1}[\text{HP}\beta\text{CD}] + K_{A_2}[\text{CA}[6]\text{S}]} \quad (4.01)$$

$$[\text{CZLHP}\beta\text{CD}] = \frac{[\text{CZL}]_0 K_{A_1} [\text{HP}\beta\text{CD}]}{1 + K_{A_1} [\text{HP}\beta\text{CD}] + K_{A_2} [\text{CA}[6]\text{S}]} \quad (4.02)$$

$$[\text{CZLCA}[6]\text{S}] = \frac{[\text{CZL}]_0 K_{A_2} [\text{CA}[6]\text{S}]}{1 + K_{A_1} [\text{HP}\beta\text{CD}] + K_{A_2} [\text{CA}[6]\text{S}]} \quad (4.03)$$

Al principio del experimento, se tiene solamente el equilibrio 4.1. La intensidad de fluorescencia inicial, F_0 , responderá entonces a la ecuación siguiente:

$$F_0 = F_{\text{CZLCD}} = \xi_{\text{CZL}} \cdot [\text{CZL}] + \xi_{\text{CZLHP}\beta\text{CD}} \cdot [\text{CZLHP}\beta\text{CD}] \quad (4.04)$$

Reemplazando en la ecuación 4.04 las correspondientes igualdades según las ecuaciones 3.08 y 3.09 (presentadas en el capítulo 3) para las concentraciones de las especies en el equilibrio (considerando solamente la formación de CZL-HPβ-CD), se

obtiene la expresión 4.05. Se ha identificado a F_0 como F_{CZLCD} para señalar que inicialmente (antes del agregado del segundo receptor) se tiene el complejo CZL-HPβ-CD.

$$F_0 = F_{CZLCD} = \frac{\xi_{CZL}[CZL]_0}{[HP\beta CD]K_{A_1} + 1} + \frac{\xi_{CZLHP\beta CD}[CZL]_0 K_{A_1} [HP\beta CD]}{[HP\beta CD]K_{A_1} + 1} \quad (4.05)$$

Suponiendo que al agregar CA[6]S, ambos equilibrios 4.1 y 4.2 coexisten, y que los complejos resultantes no interfieren entre sí, la fluorescencia del sistema mixto será la resultante de la emisión de las especies fluorescentes que integran el sistema y se plantea la siguiente ecuación:

$$F = F_{CZLCD+CA[6]S} = \xi_{CZL}[CZL] + \xi_{CZLHP\beta CD}[CZLHP\beta CD] + \xi_{CZLCA[n]S}[CZLCA[6]S] \quad (4.06)$$

Se utiliza el subíndice “CZLCD + CA[6]S” para indicar que se inicia con el complejo CZL-HPβ-CD y se adiciona el receptor CA[6]S.

La fluorescencia proveniente del receptor calixareno CA[6]S no se encuentra en la ecuación debido a que experimentalmente se resta la emisión correspondiente a una solución que sólo tenga presente al macrociclo en el medio de trabajo (blanco). Por otro lado, se considera que el complejo CZL-CA[6]S no aporta a la intensidad de fluorescencia observada ya que como se vio en el capítulo 3 dicho complejo es no fluorescente (quenching estático). De acuerdo a esto, en la ecuación 4.07 se debe anular el tercer término y la F global queda descrita por la siguiente ecuación:

$$F_{CZLCD + CA[6]S} = \xi_{CZL}[CZL] + \xi_{CZLHP\beta CD}[CZLHP\beta CD] \quad (4.07)$$

Si reemplazamos en la expresión anterior las concentraciones de CZL y CZL-HPβ-CD en el equilibrio, se obtiene la ecuación 4.08, la cual tiene en cuenta el equilibrio de formación del complejo CZL-CA[6]S (Eq. 4.2).

$$F_{CZLCD + CA[6]S} = \frac{\xi_{CZL}[CZL]_0}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD] + K_{A_2}[CA[n]S]} + \frac{\xi_{CZLCD}[CZL]_0 K_{A_1} [HP\beta CD]}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD] + K_{A_2}[CA[n]S]} \quad (4.08)$$

La tabla 4-1 muestra las concentraciones porcentuales de CZL y los complejos con ambos receptores junto a los valores de fluorescencia teóricos (como $1/F_{R(\text{teórico})}$) correspondientes a cada concentración de CA[6]S adicionada. Las concentraciones de las especies en el equilibrio, de acuerdo al modelo de coexistencia, indican que el CZL complejoado con HPβ-CD varía entre 89 – 92 %, y solo un porcentaje muy pequeño forma el complejo no fluorescente con CA[6]S (hasta un 3,5 %). Además, los valores $F_{R(\text{teórico})}$ no superan una variación del 10 % respecto a los obtenidos experimentalmente.

Tabla 4-1. Concentración porcentual de especies en el equilibrio para el sistema CZL-HPβ-CD + CA[6]S. Suponiendo coexistencia de equilibrios.

[CA[6]S] variable/μM	% [CZL-CD]_{eq}	% [CZL-CA[6]S]_{eq}	%[CZL]_{eq}	$F_{R(\text{teórico})}$
0	92,3	0	7,7	1,00
20	91,6	0,7	7,7	1,01
40	91,0	1,4	7,6	1,01
60	90,3	2,1	7,6	1,02
80	89,7	2,8	7,5	1,03
100	89,1	3,5	7,4	1,04

4.4.1.2.1ii. CZL-CA[6]S + HPβ-CD

Si se considera como condición inicial la formación del complejo CZL-CA[6]S, la intensidad de fluorescencia estará determinada por la emisión de la amina heterocíclica CZL libre sin formar complejo, según la expresión 4.09, y dependerá solamente de la concentración del núcleo CZL en el equilibrio.

$$F_0 = F_{CZL} = \xi_{CZL}[CZL] = \xi_{CZL}([CZL]_0 - [CZLCA[6]S]) \quad (4.09)$$

En esta situación, cuando se comienza a agregar el receptor HPβ-CD (R_2) la expresión para la relación F/F_0 queda representada por la ecuación 4.10 (ver desarrollo en anexo C)

$$\frac{F}{F_0} = \frac{F_{CZLCA[6]S+CD}}{F_{CZL}} = \frac{1 + \left(\frac{\xi_{CZLHP\beta CD}}{\xi_{CZL}} \right) K_{A1} [HP\beta CD]_0}{1 + \left(K_{A1} [HP\beta CD]_0 / (1 + K_{A2} [CA[6]S]_0) \right)} \quad (4.10)$$

Esta ecuación se empleó como modelo de ajuste de los puntos experimentales obtenidos al medir la emisión de fluorescencia del sistema mixto CZL/CA[6]S/HPβ-CD, al variar la concentración de HPβ-CD (ver figura 4-3b). De ese ajuste, se obtuvo un valor de la constante $K_{A1} = (1,2 \pm 0,1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, que es igual al obtenido para el sistema binario CZL/HPβ-CD. Esto solo puede darse en un sistema donde los equilibrios 4.1 y 4.2 conviven sin afectarse uno con el otro (figura 4-4). La ecuación 4.10 también predice el perfil de F_R en función de [CA[6]S] constante en el rango de concentraciones de CA[6]S empleadas (ver figura 4-3a y valores $1/F_{R(\text{teórico})}$ en tabla 4-1).

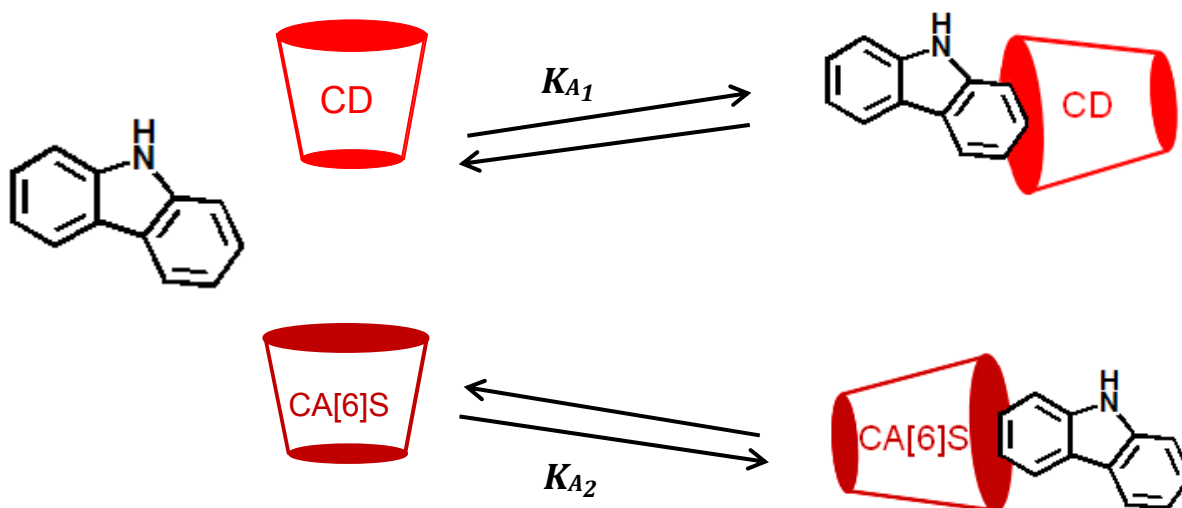


Figura 4-4. Equilibrios en el sistema ternario CZL/CA[6]S/HPβ-CD. (La orientación relativa de los componentes del sistema es ilustrativa).

4.4.1.2.2. Sistema CZL/HP β -CD/CA[8]S

En este sistema se empleó el derivado calixareno CA[8]S. Se ha encontrado una mayor interacción de CZL por el octámero cíclico que por el hexámero (ver capítulo 3). Por esto se quiso estudiar si un receptor con una mayor fuerza de asociación con el sustrato en estudio, y a la vez con una abertura más amplia (con la posibilidad de tener nuevos sitios de unión), da lugar, por un mecanismo cooperativo, a la formación de estructuras supramoleculares.

En la figura 4-5 se exponen las medidas de fluorescencia (como $1/F_R = F_0/F$) en función de la concentración del receptor variable R_2 . En la figura 4-5a se varía la concentración de HP β -CD mientras que la concentración del receptor CA[8]S se mantiene constante, en tanto que en la figura 4-5b la situación es inversa. En ambos casos se observa un quenching en la fluorescencia del sistema mixto.

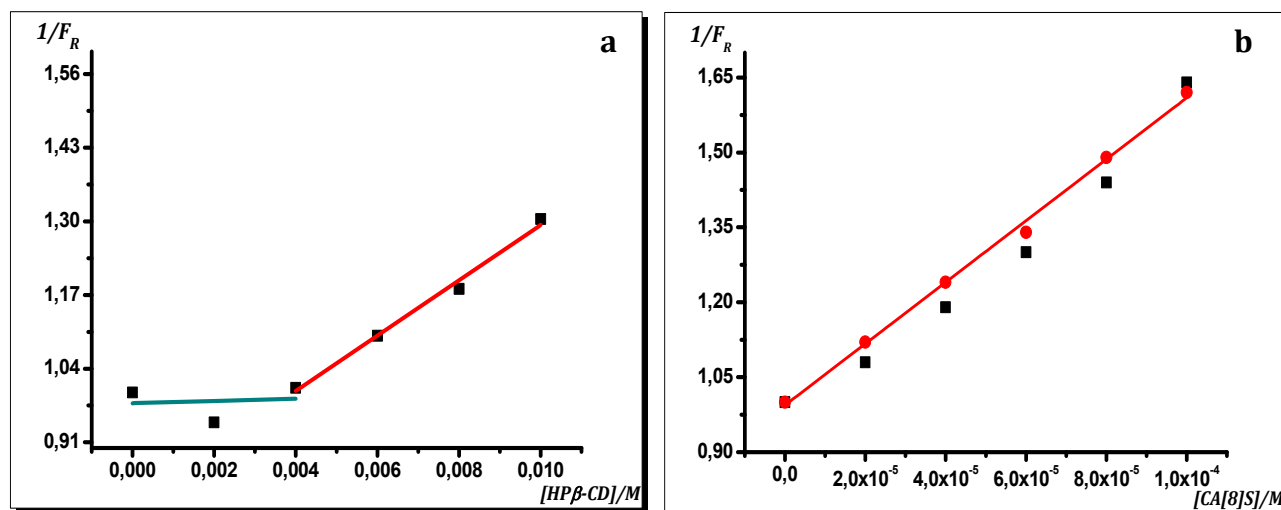


Figura 4-5. Valores de fluorescencia del sistema mixto CZL/HP β -CD/CA[8]S al variar la concentración de uno de los receptores macrocíclicos. En **(a)** se inicia con el complejo CZL-CA[8]S y varía la [HP β -CD] y en **(b)** se inicia con CZL-HP β -CD y se varía [CA[8]S], en (●) se indican los valores teóricos de $1/F_R$, en (■) se indican los valores de $1/F_R$ experimentales y en (---) el ajuste lineal de los puntos teóricos con la ecuación 4-17. $\lambda_{exc} = 322,0$ nm.

4.4.1.2.2i. CZL-CA[8]S + HP β -CD

Para el caso, en el cual se inicia con el complejo CZL-CA[8]S se puede apreciar un rango de concentraciones del receptor HP β -CD en donde la señal es aproximadamente constante (línea — en figura 4-5a), hasta llegar a un valor límite ($[HP\beta\text{-CD}] \approx 4,0 \times 10^{-3} \text{ M}$), a partir del cual se produce un cambio significativo en la emisión de fluorescencia (línea — en figura 4-5a).

Este cambio poco convencional que se observa en la emisión de fluorescencia al agregar HP β -CD, sorprende debido a que se esperaría un aumento en la intensidad de F de acuerdo con los resultados obtenidos en sistemas binarios CZL/CDs ya estudiados (ver capítulo 3). Este nuevo comportamiento espectroscópico del sistema debe responder a interacciones específicas que difieren y quizás se complementen a las establecidas en aquellos sistemas binarios.

Para explicar la variación en la emisión de fluorescencia en el sistema CZL/CA[8]S/HP β -CD, primeramente se propuso plantear nuevamente equilibrios de coexistencia, similares a los propuestos anteriormente (Eq. 4.1 y 4.2) para el sistema mixto CZL/CA[6]S/HP β -CD. Teniendo en cuenta este modelo, se obtuvieron las expresiones de concentración de las especies en el equilibrio (análogas a las ecuaciones 4.01, 4.02 y 4.03) y se calcularon las correspondientes concentraciones porcentuales. En la tabla 4-2 se exponen los porcentajes de las especies en el equilibrio para el caso que se describe, empleando como modelo la coexistencia de equilibrios.

Tabla 4-2. Concentración porcentual de especies en el equilibrio para el sistema CZL-CA[8]S + HP β -CD. Considerando coexistencia de equilibrios.

$[CD]$ variable/mM	% $[CZL\text{-}CD]_{eq}$	% $[CZL\text{-}CA[8]S]_{eq}$	% $[CZL]_{eq}$	$1/F_{R(teórico)}$
0	0	47	53	1,00
2	56	21	23	0,48
6	79	10	11	0,39
8	84	8	9	0,38
10	86	6	7	0,37

De acuerdo a estos resultados, la fluorescencia (F_R) del sistema CZL/CA[8]S debería aumentar desde 1,00 a 2,70 (o $1/F_R$ disminuir desde 1,00 hasta 0,37) aproximadamente, ya que, a medida que se incrementa la concentración de HP β -CD aumenta la concentración del complejo fluorescente CZL-HP β -CD (desde 0 a 86 %, a la máxima concentración de HP β -CD, ver tabla 4-3) cuya relación de rendimientos cuánticos de fluorescencia, Φ , es de 1,56. Esto no explica el comportamiento espectroscópico del sistema.

El período de inducción, en el cual el aumento de [HP β -CD] no tiene ningún efecto sobre la señal de fluorescencia, indica que el complejo CZL-CA[8]S no se ve desestabilizado pese a que el complejo CZL-HP β -CD presenta una K_A relativamente alta. Antes de buscar otra alternativa es conveniente analizar el sistema partiendo desde el complejo CZL- HP β -CD.

4.4.1.2.2ii. CZL-HP β -CD + CA[8]S

También puede llamar la atención que la adición de pequeñas cantidades del receptor CA[8]S al sistema binario CZL/HP β -CD, afecte la emisión de luz (ver figura 4-5b). Esto puede deberse a la fuerte complementariedad entre los bloques moleculares, lo que permite que se establezcan interacciones moleculares aun a bajas concentraciones de CA[8]S. Pero la pregunta que se presenta a continuación es: ¿A qué unidad molecular se asocia CA[8]S? ¿Al núcleo de CZL libre o al complejo CZL-HP β -CD? Para responder a estas preguntas se completará el análisis del sistema proponiendo un modelo de coexistencia, como se realizó anteriormente para la condición CZL-CA[8]S + HP β -CD, de manera de corroborar o no sólo la formación de los complejos binarios CZL-HP β -CD y CZL-CA[8]S.

En la tabla 4-3 se muestran los porcentajes de las especies en el equilibrio en esta última situación, suponiendo que los equilibrios 4.1 y 4.3 están presentes sin interferir uno con el otro.



Tabla 4-3. Concentraciones porcentuales de especies en el equilibrio para el sistema CZL-HPβ-CD + CA[8]S. Considerando coexistencia de equilibrios.

<i>[CA[8]S] variable/μM</i>	<i>% [CZL-CD]_{eq}</i>	<i>% [CZL-CA[8]S]_{eq}</i>	<i>%[CZL]_{eq}</i>	<i>1/F_{R(teórico)}</i>
0	92,4	0	7,6	1,00
20	91,1	1,4	7,5	1,01
40	89,8	2,6	7,6	1,03
60	88,7	3,4	7,9	1,04
80	87,5	5,2	7,3	1,06
100	86,4	6,4	7,2	1,07

En principio se sabe que la mayor parte del CZL está en su forma complejada (92,4 %), debido a la alta concentración de HPβ-CD que hace que el equilibrio del sistema se encuentre desplazado hacia la formación del complejo. De esta forma es permisible y lógico pensar que el CA[8]S pueda interaccionar con el complejo CZL-HPβ-CD, teniendo una cavidad amplia (~12 Å)¹³ capaz de interaccionar con estructuras de tamaño considerable.

Para poder respaldar la interacción de CA[8]S con el complejo CZL-HPβ-CD y explicar la respuesta en la emisión de fluorescencia del sistema, se propuso plantear un equilibrio adicional, que condujera a una estructura supramolecular de tres componentes. Es decir, además de los equilibrios de formación de los complejos binarios CZL-HPβ-CD y CZL-CA[8]S, se planteó la formación de un complejo ternario (*CT*), como se muestra en los siguientes equilibrios químicos:



Teniendo en cuenta estos tres equilibrios y los respectivos balances de masas, se obtuvieron las expresiones de las especies químicas en el equilibrio.

$$[CZL]_{eq} = \frac{[CZL]_0}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD] + K_{A_3}[CA[8]S] + K_{A_T}K_{A_3}[CA[8]S][HP\beta CD]} \quad (4.11)$$

$$[CZLHP\beta CD]_{eq} = \frac{[CZL]_0 K_{A_1}[HP\beta CD]}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD] + K_{A_3}[CA[8]S] + K_{A_T}K_{A_3}[CA[8]S][HP\beta CD]} \quad (4.12)$$

$$[CZLCA[8]S]_{eq} = \frac{[CZL]_0 K_{A_2}[CA[8]S]}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD] + K_{A_3}[CA[8]S] + K_{A_T}K_{A_3}[CA[8]S][HP\beta CD]} \quad (4.13)$$

$$[CT]_{eq} = \frac{[CZL]_0 K_{A_T}K_{A_2}[CA[8]S][HP\beta CD]}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD] + K_{A_3}[CA[8]S] + K_{A_T}K_{A_3}[CA[8]S][HP\beta CD]} \quad (4.14)$$

Para encontrar una ecuación que explique la fluorescencia del sistema, como se realizó anteriormente, hay que analizar las especies fluorescentes en cada etapa: al inicio y cuando se adiciona R_2 . Cuando se inicia con el complejo CZL-HPβ-CD, se tiene que la fluorescencia del sistema es la suma de la contribuciones del núcleo CZL y CZL-HPβ-CD como se expresa en la ecuación 4.04, que al sustituir por la concentración de las especies, teniendo en cuenta únicamente el equilibrio 1, ya que se trata de la condición inicial, se obtiene la ecuación 4.15.

$$F_0 = F_{CZLCD} = \frac{\xi_{CZL}[CZL]_0}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD]} + \frac{\xi_{CZLHP\beta CD}[CZL]_0 K_{A_1}[HP\beta CD]}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD]} \quad (4.15)$$

Luego de agregar el receptor CA[8]S, de acuerdo al modelo planteado, la fluorescencia del sistema ternario vendrá determinada nuevamente por CZL y CZL-HPβ-CD, pero ahora teniendo en cuenta las nuevas expresiones para las concentraciones de las especies en equilibrio, dada por las ecuaciones 4.11 y 4.12.

$$F = F_{CZLCD+CA} = \frac{\xi_{CZL}[CZL]_0}{D} \left(1 + \left(\frac{\xi_{CZLHP\beta CD}}{\xi_{CZL}} \right) K_{A_1}[HP\beta CD] \right) \quad (4.16)$$

Donde $D = 1 + K_{A_1}[HP\beta CD] + K_{A_3}[CA[8]S] + K_{A_T}K_{A_3}[CA[8]S][HP\beta CD]$. Para obtener la expresión para F_0/F ($1/F_R$) se hace la relación entre la ecuación 4.15 y la 4.16 y operando (ver desarrollo en Apéndice C) se obtiene la ecuación 4.17 que se da a continuación.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \frac{(1+K_{A_T}[HP\beta CD]_0)K_{A_3}[CA[8]S]}{1+K_{A_1}[HP\beta CD]_0} \quad (4.17)$$

La ecuación 4.17 muestra una relación lineal entre la recíproca de F_R y la concentración del receptor que se adiciona, es una expresión análoga a la ecuación de Stern-Volmer, donde el término fraccionario que multiplica a $[CA[8]S]$ es una constante global y en este trabajo se simboliza con la letra K como sigue en la ecuación 4.18.

$$K = \frac{(1+K_{A_T}[HP\beta CD]_0)K_{A_3}}{1+K_{A_1}[HP\beta CD]_0} \quad (4.18)$$

El ajuste de las medidas experimentales de fluorescencia en función de la concentración de CA[8]S (figura 4-5b) arrojó un valor de $K = (4,8 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Dicho ajuste se realizó con los datos experimentales cuyo error relativo, respecto a los correspondientes valores predichos por la ecuación 4.17 (ver capítulo 5), fue menor a un 10,0 %. Se pudo obtener la constante de asociación del sistema ternario, K_{A_T} , despejando desde la ecuación 4.18 y resolviendo la siguiente expresión:

$$K_{AT} = \frac{1}{[HP\beta CD]_0} \left(\frac{\kappa}{K_{A3}} + 1 \right) + \frac{\kappa \cdot K_{A1}}{K_{A3}} \quad (4.19)$$

La constante obtenida fue $K_{AT} = (8 \pm 1) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. Este valor de constante refleja una asociación moderadamente fuerte entre el receptor CA[8]S y el complejo CZL-HPβ-CD en la segunda etapa (equilibrio Eq 4.4) para formar el sistema supramolecular ternario planteado.

En la tabla 4-4 se exponen los valores de porcentajes de las especies en el equilibrio para el modelo que plantea la formación del *CT*. Las concentraciones de las especies fluorescentes decaen, a medida que se incrementa la concentración de CA[8]S, a la vez que se forman bajos niveles del complejo binario CZL-CA[8]S y una importante cantidad del complejo HPβ-CD-CZL-CA[8]S. De esta forma, puede explicarse la emisión de fluorescencia del sistema, debido a la formación del *CT* no fluorescente estabilizado por interacciones supramoleculares (fundamentalmente del tipo ión-dipolo). Se ha reportado la formación de complejos ternarios en los que HPβ-CD forma parte de la estructura supramolecular junto con un polímero (PVP).^{14,15}

La formación del *CT* no fluorescente estaría favorecida mediante un mecanismo por etapas, en donde en un primer paso se formaría uno de los complejos binarios, y en una segunda etapa se adicionaría un segundo receptor que daría lugar al ensamble del *CT* (equilibrio 4 cuya constante de asociación es K_{AT}).^{6,16,17} Mecanismos de formación de complejos ternarios por etapas ya se ha observado y descrito como ejemplo en el capítulo 2 de esta tesis.

Tabla 4-4. Concentraciones porcentuales de especies en el equilibrio para CZL-HP β -CD + CA[8]S. Considerando la formación de un complejo ternario (CT).

[CA[8]S] variable/μM	%[CZL]_{eq}	%[CZL-CD]_{eq}	%[CZL-CA[8]S]_{eq}	%[CT]_{eq}	$1/F_{R(\text{teórico})}$
0	7,7	92,3	0	0	1,00
20	6,8	82,2	1,2	9,8	1,12
40	6,2	74,1	2,2	17,6	1,24
60	5,6	67,4	3,0	24,0	1,34
80	5,2	61,8	3,7	29,4	1,49
100	4,8	57,1	4,2	33,9	1,62

En la figura 4-6 se muestra la estructura hipotética del complejo ternario, a modo ilustrativo para señalar las interacciones no covalentes que favorecerían su formación. Los grupos sulfonatos del calixareno son capaces de mantener uniones puente hidrógeno con los grupos hidroxilo de la HP β -CD. El interior de la cavidad del CA[8]S podría interactuar mediante fuerzas de atracción π - π stacking.

Para poder plantear una descripción estructural correcta se deberían realizar estudios por espectroscopia RMN en dos dimensiones para estudiar el entorno de los protones tanto del receptor HP β -CD como del sustrato orgánico. También estudios por dicroísmo circular inducido se emplean para analizar la orientación espacial de los componentes moleculares de complejos del tipo sustrato-receptor.^{18,19,20,21} Las bajas concentraciones empleadas, debido a la escasa solubilidad del CZL en medio acuoso, no permiten realizar los experimentos de RMN bajo condiciones comparables.

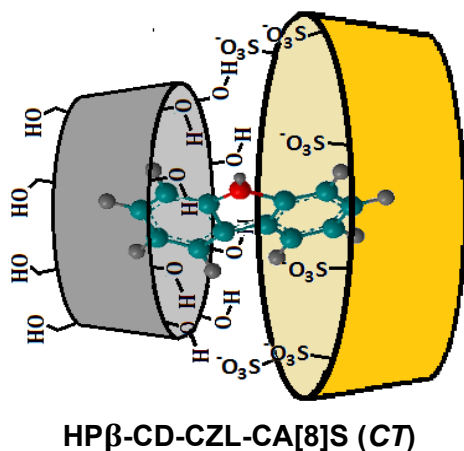


Figura 4-6. Estructura hipotética de un complejo ternario formado por CZL, HP β -CD y CA[8]S.

4.5. CONCLUSIONES

Se ha encontrado por mediciones espectrofluorimétricas del sistema mixto CZL/HP β -CD/CA[6]S, indicios de coexistencia entre los equilibrios de formación de los complejos binarios individuales CZL-HP β -CD y CZL-CA[6]S. Se obtuvo una dependencia entre la respuesta de fluorescencia y la variación de [HP β -CD], en presencia de CA[6]S, idéntica a la que se obtuvo en el sistema binario CZL-HP β -CD. Esto es interesante ya que el estudio de este sistema mixto podría extenderse en presencia de otro sustrato que pudiera interactuar con el calixareno, dando lugar a una determinación simultánea

Por otro lado, el estudio del sistema CZL/HP β -CD/CA[8]S por mediciones espectrofluorimétricas, dio lugar al planteamiento de la formación de un complejo ternario (CT) HP β -CD-CZL-CA[8]S además de los respectivos complejos binarios. Este CT es no fluorescente, dando una inhibición de la respuesta fluorescente del sistema aun cuando se incrementó la concentración del receptor HP β -CD. El cambio encontrado en la señal analítica es menor que el obtenido en presencia de los receptores macrocíclicos por separado, lo que no supone una mejora en cuando al sensado del CZL. No obstante, el hecho de que se pueda formar un sistema supramolecular de este tipo es sumamente interesante para investigaciones subsecuentes sobre complejos del tipo sustrato receptor.

4.6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. A. Lerner, and M. A. Martin. *“Luminescence in organized media and supramolecular interactions: physicochemical aspects and applications”*. *Analisis*, 28 (2000) 649 – 663.
- [2] A. Prasanna de Silva, H. Q. Nimal Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, and T. E. Rice. *“Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches”*. *Chem. Rev.* 97 (1997) 1515 – 1566.
- [3] L. Pu. *“Fluorescence of Organic Molecules in Chiral Recognition”*. *Chem. Rev.*, 104 (2004) 1687 – 1716.
- [4] N. Basilio, V. Francisco, and L. García-Río. *“Independent Pathway Formation of Guest-Host in Host Ternary Complexes Made of Ammonium Salt, Calixarene, and Cyclodextrin”*. *J. Org. Chem.*, 77 (2012) 10764 – 10772.
- [5] T. Ooya, D. Inoue, H. Choi, Y. Kobayashi, S. Loethen, D. H. Thompson, Y. H. Ko, K. Kim, and N. Yui. *“pH-Responsive Movement of Cucurbit[7]uril in a Diblock Polypseudorotaxane Containing Dimethyl β -Cyclodextrin and Cucurbit[7]uril”*. *Org. Lett.*, 8 (2006) 3159 – 3162.
- [6] H. Bakirci, W. M. Nau. *“Chiral discrimination in the complexation of heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin with 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene derivatives”*. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 173 (2005) 340 – 348.
- [7] R. N. Dsouza, and W. M. Nau. *“Triple Molecular Recognition as a Directing Element in the Formation of Host-Guest Complexes with p-Sulfonatocalix[4]arene and β -Cyclodextrin”*. *J. Org. Chem.*, 73 (2008) 5305 – 5310.
- [8] S. J. Dalgarno, J. L. Atwood, and C. L. Raston. *“Sulfonatocalixarenes: molecular capsule and ‘Russian doll’ arrays to structures mimicking viral geometry”*. *Chem. Commun.*, 44 (2006) 4567 – 4574.
- [9] S. Liu, P. Y. Zavalij, and L. Isaacs. *“Cucurbit[7]uril”*. *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 16798 – 16799.
- [10] W. Liu, Q. Q. Wang, Y. Wang, Z. T. Huang, and D. X. Wang. *“Designed self-assemblies based on cooperative noncovalent interactions including anion- π , lone-pair electron- π and hydrogen bonding”*. *RSC Adv.*, 4 (2014) 9339 -9342.

- [11] S. Sonzini, S. T. J. Ryan, and O. A. Scherman. “Supramolecular dimerisation of middle-chain Phe pentapeptides via CB[8] host-guest homoternary complex formation”. *Chem. Commun.*, 49 (2013) 8779 – 8781.
- [12] T. Grady, S. J. Harris, M. R. Smyth, and D. Diamond. “Chiral Amines Based on the Quenching of the Fluorescence of a Chiral Calixarene”. *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3775 – 3782.
- [13] R. Kaliappan, Y. Ling, A. E. Kaifer, and V. Ramamurthy. “Sulfonatocalix[8]arene as a Potential Reaction Cavity: Photo- and Electro-active Dicationic Guest Arrest Conformational Equilibrium”. *Langmuir*, 25 (2009) 8982 – 8992.
- [14] M. Valero, B. Esteban, R. Peláez, and L. J. Rodríguez. “Naproxen: Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin:Polyvinylpyrrolidone Ternary Complex Formation”. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 48 (2004) 157 – 163.
- [15] T. Zoeller, J. B. Dressman, S. Klein. “Application of a ternary HP- β -CD-complex approach to improve the dissolution performance of a poorly soluble weak acid under biorelevant conditions”. *Int. J. Pharm.*, 430 (2012) 176 – 183.
- [16] M. V. Rekharsky, H. Yamamura, M. Kawai, I. Osaka, R. Arakawa, A. Sato, Y. H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim, and Y. Inoue. “Sequential Formation of a Ternary Complex among Dihexammonium, Cucurbit[6]uril, and Cyclodextrin with Positive Cooperativity”. *Org. Lett.*, 8 (2006) 815 – 818.
- [17] Y. Yamada, N. Mihara, S. Shibano, K. Sugimoto, and K. Tanaka. “Triply Stacked Heterogeneous Array of Porphyrins and Phthalocyanine through Stepwise Formation of a Fourfold Rotaxane and an Ionic Complex”. *J. Am. Chem.*, 31 (2013) 11505 – 11508.
- [18] Y. Takenaka, M. Higashi, and N. Yoshida. “Fluorescent behavior in host-guest interactions. Part 3. Fluorescent sensing for organic guest using three types of amino- β -cyclodextrins”. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2 (2002) 615 – 620.
- [19] H. Bakirci, X. Zhang, and W. M. Nau. “Induced Circular Dichroism and Structural Assignment of the Cyclodextrin Inclusion Complexes of Bicyclic Azoalkanes”. *J. Org. Chem.*, 70 (2005) 39 – 46.
- [20] Y. Liu, J. Shi, and D. S. Guo. “Novel Permethylated β -Cyclodextrin Derivatives Appended with Chromophores as Efficient Fluorescent Sensors for the Molecular Recognition of Bile Salts”. *J. Org. Chem.*, 72 (2007) 8227 – 8234.
-

[21] R. Krishnan, A. M. Rakhi, and K. R. Gopidas. “*Study of β -Cyclodextrin-Pyromellitic Diimide Complexation. Conformational Analysis of Binary and Ternary Complex Structures by Induced Circular Dichroism and 2D NMR Spectroscopies*”. *J. Phys. Chem. C*, 116 (2012) 25004 – 25014.

CAPÍTULO 5

CAPITULO 5

DETERMINACIÓN ANALÍTICA SUPRAMOLECULAR DE CARBAZOL

5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1 Determinación analítica de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Para lograr determinar la concentración de uno o varios analitos en una muestra real, los químicos analíticos siguen una serie de procedimientos dedicados a la separación, identificación y cuantificación de dichos componentes. Este conjunto de procedimientos define lo que se conoce como *método analítico* y comienza desde que se receipta la muestra para analizar hasta la determinación final.¹

La detección y cuantificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y sus derivados heterocíclicos es de gran importancia, ya que estos compuestos orgánicos se presentan como contaminantes de suelos y aguas.² Además, constituyen una gran amenaza a la salud del hombre, constituyendo una alta gama de agentes cancerígenos, incluyendo aminas aromáticas policíclicas,^{3,4,5} derivados halogenados de HAP,⁶ etc.

La creosota es una mezcla que contiene carbazol, fenoles, piridina, y demás HAP, que se utiliza en el tratamiento de maderas para su protección ante el ataque de insectos, microorganismo y de las agresiones del medio ambiente.⁷ El empleo de esta sustancia se ha restringido bastante en los últimos años debido a la peligrosidad de sus componentes sobre la salud humana⁷ y su potencial fuente de contaminación. Por ejemplo, HAP nitrogenados como el CZL y la QUI se han encontrado como contaminantes en aguas subterráneas debido al uso de combustibles, creosota y agroquímicos.^{3,8,9,10} Esto resulta preocupante, ya que las aguas subterráneas constituyen el principal recurso hídrico para el consumo humano, correspondiendo el abastecimiento de una tercera parte de la población mundial.¹¹

Muchas de las regulaciones actualmente existentes sólo contemplan algunos HAP, como benzo[a]pireno, a pesar de que varios efectos nocivos se atribuirían a las mezclas de los mismos.¹² En consecuencia, en los últimos años se han organizado varios programas destinados a establecer regulaciones y recomendaciones respecto a los máximos niveles permisibles y a los métodos analíticos adecuados para analizar estos contaminantes. La comisión del *CODEX alimentarius*, establecida en conjunto por la FAO (Organización de las naciones unidas para la agricultura) y la OMS (Organización mundial de la salud), en su compendio de normas alimentarias, directrices y códigos de prácticas adoptados internacionalmente indica que para ciertas sustancias nocivas para la salud humana (como HAP y su derivados, plaguicidas y bifenilos clorados), el límite permitido debe ser el límite de cuantificación del método estándar empleado para la determinación.¹³

Se han desarrollado numerosos procedimientos analíticos para determinar la presencia de una gran cantidad de derivados HAP en diferentes matrices y cuantificar la concentración de los mismos.^{14,15} Los métodos analíticos principalmente usados para analizar estos compuestos orgánicos son: cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FDL) y la cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas (GC-MS).^{12,15,16} La primer técnica resulta más ventajosa que la segunda debido a que separa eficazmente estos contaminantes y no requiere de tratamientos complejos de las muestras reales ni el empleo de estándares internos para corregir recuperaciones bajas y/o errores instrumentales asociados al proceso de inyección de la muestra. Por otra parte, el método GC-MS se caracteriza por presentar buena resolución, selectividad y la posibilidad de emplear HAP marcados isotópicamente como estándares internos. Además, la espectrometría de masas permite la determinación de HAP no fluorescentes.^{12,15,16}

Otras técnicas cromatográficas empleadas para el análisis de HAP contaminantes son HPLC con detector UV-Visible y la GC con detección por ionización de llama (FID).^{12,15,16} En general, estas metodologías presentan selectividades y sensibilidades menores que las técnicas mencionadas anteriormente.

En casos en que los niveles de concentración del analito se encuentran por debajo del límite de detección de la técnica analítica empleada, se realizan etapas de pre-concentración que requieren su tiempo y dedicación para lograr buenos resultados.¹⁷

Entre las técnicas de pre-concentración desarrolladas para HAP pueden citarse extracciones líquido-líquido y en fase sólida, microextracciones en fase sólida y sistemas de extracción con membrana y extracción con agitación.^{17,18,19}

La regulación del Departamento de recursos naturales y medioambientales (división calidad del agua) de Carolina del Norte en su código administrativo (15A NCAC 02L .0202), basándose en los efectos de diferentes contaminantes sobre la salud humana, establece que la concentración máxima permisible de CZL en aguas de napas subterráneas es de 2,0 µg/L.²⁰ Por otro lado, un estudio realizado sobre las aguas superficiales y subterráneas del acuífero Cherry Lake ubicado en Dakota norte (EEUU), detectó CZL a una concentración de 72,6 µg/L.²¹

En este capítulo se presentan los principales parámetros de validación del método analítico propuesto para la determinación del núcleo carbazol, incluyendo la aplicación en matrices reales de agua corriente, de tanque y de río.

Seguidamente se introducen los conceptos necesarios a tener en cuenta en el proceso de validación.

5.1.2. Validación de un método analítico

Se conoce como *validación* al análisis que demuestra que un método analítico desarrollado es capaz de proveer suficiente especificidad, exactitud y precisión en la determinación de un analito en una dada muestra real. Este análisis proporciona evidencia básica para fundamentar la validez de los resultados obtenidos por el método propuesto.²²

La validación de un método analítico es necesaria para respaldar la acreditación o publicación del mismo, o defender resultados generados por su uso. Aunque hay poco acuerdo internacional sobre los requisitos de evaluación, se pone cada vez más énfasis sobre los estándares internacionales como parámetros de comparación.²²

5.1.2.1. Parámetros de validación

Los parámetros estadísticos que se deben evaluar para validar un método desarrollado son los siguientes:

- **Linealidad.** Aquel intervalo de concentraciones del analito donde la respuesta analítica se correlacione linealmente (figura 5.1). En general, se aconseja para el trabajo cuantitativo el empleo del intervalo lineal.
- **Especificidad.** Se debe corroborar que la respuesta analítica debe ser atribuible al analito.²³
- **Selectividad.** Establece en qué medida la señal correspondiente al analito de interés es afectada por la presencia de otras especies en la muestra.^{24,25,26}
- **Precisión.** Indica cuan cercanos son entre sí los valores obtenidos tras mediciones repetidas. Una medida de dispersión de los datos es la desviación estándar de la muestra (*s*).

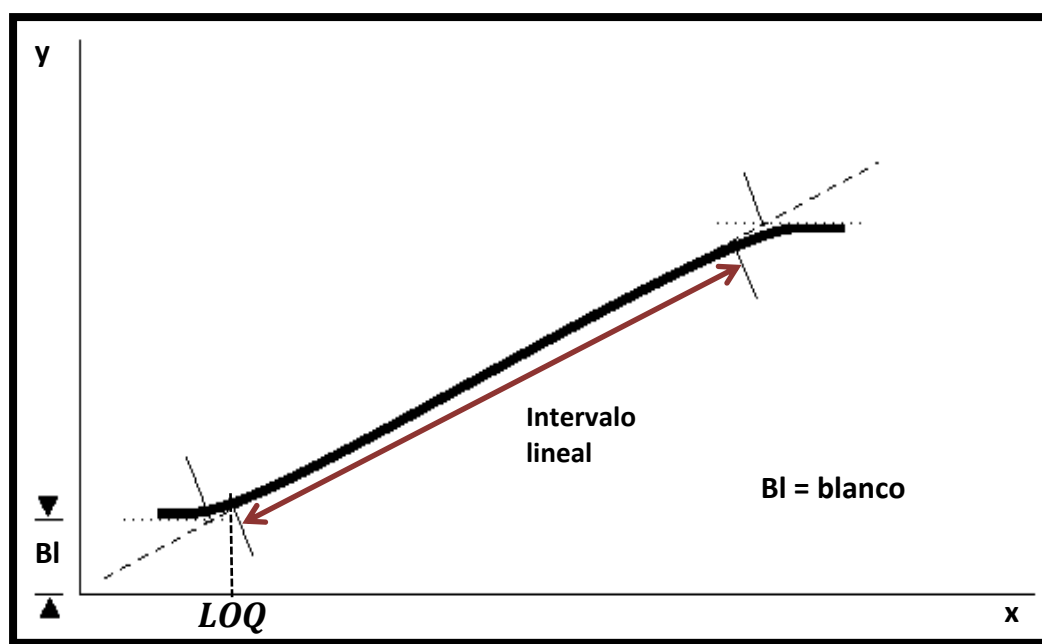


Figura 5-1. Definición de intervalo lineal.

- **Sensibilidad.** Es el cambio en la respuesta analítica inducida por un cambio en la concentración del analito en estudio. La sensibilidad de calibración de una técnica se define como la pendiente de la recta de calibrado.

- **Límite de Detección (LOD).** Se puede describir como límite de detección de un analito como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”.
- **Límite de Cuantificación (LOQ).** Es considerado como la mínima cantidad de analito cuantificable por un dado método.
- **Robustez.** Evalúa la insensibilidad del método a pequeñas variaciones en las condiciones y en el equipamiento (sustitución de alguna pieza), ambiental (temperatura, humedad), procesos de deterioro (columna CG HPLC, reactivos), y composición de la muestra. La robustez del método proporciona un indicio de su fiabilidad durante el uso normal.²⁷
- **Exactitud.** Describe el grado de concordancia (sesgo) entre el valor verdadero y el determinado por la aplicación del método analítico.

A continuación se brinda un detalle de las expresiones y modelos estadísticos que se emplearon para el tratamiento de los datos experimentales en el análisis de validación.

5.1.2.2. Calibración y Linealidad

La calibración es el procedimiento que se lleva a cabo para obtener la expresión matemática que relaciona la respuesta o señal analítica (y) con la concentración del analito en la muestra (x).²⁸

Las observaciones de la señal y varían según una función $f(x)$ que depende de la concentración x . Los valores y tienen asociado un error (ρ).²⁹ Teniendo en cuenta lo mencionado, la i -ésima observación de y_i puede representarse con la ecuación 5.01.

$$y_i = f(x_i) + \rho_i \quad (5.01)$$

Los errores ρ_i son perturbaciones aleatorias propias de cada observación y , consideradas normalmente distribuidas con media y desviación estándar iguales a cero ($\bar{x} = 0$ y $\sigma = 0$).^{24,28} La naturaleza de la función $f(x_i)$ depende de la relación entre las variables x e y , si es lineal entonces dicha función será:

$$f(x_i) = B + Ax_i \quad (5.02)$$

El primer coeficiente (B) corresponde a la ordenada al origen y el segundo (A) a la pendiente. La ecuación 5.02 se le llama curva de *calibración*. El valor de B es la señal del blanco y A representa la sensibilidad de calibración. Estos parámetros se estiman a partir de n pares de medidas experimentales (x_i, y_i) empleando el modelo de regresión lineal²⁷ (ecuación 5.03) mediante el método de cuadrados mínimos.^{24,30}

$$y_i = B + Ax + \varepsilon_i \quad (5.03)$$

Para que el modelo de regresión sea válido se deben cumplir con ciertas condiciones o supuestos:

- ◆ Los errores aleatorios ρ_i son despreciables en x y predominantes en y .
- ◆ La relación entre x e y es lineal en el intervalo evaluado.
- ◆ Los residuos son homocedásticos.
- ◆ La distribución de los residuales es normal con media igual a cero.

Esta última suposición es debido a que, como se mencionó anteriormente, se asumen los errores como perturbaciones no sistemáticas y por lo tanto su promedio es cero.²⁸

Cuando se busca la expresión de la curva de calibración se quiere encontrar aquella función que minimice las desviaciones de y (ver figura 5-2), entre los puntos experimentales, y_i , y los calculados por el modelo \hat{y}_i (valores *predichos*).

$$\hat{y}_i = \hat{B} + \hat{A} \cdot x_i \quad (5.04)$$

Estas variaciones se conocen técnicamente como *residuos* de y (w_{yi})

$$w_{yi} = y_i - \hat{y}_i \quad (5.05)$$

Un parámetro a tener en cuenta para evaluar si el modelo estadístico de regresión explica la variabilidad de los datos es el coeficiente de determinación R^2 , el cual se interpreta como la fracción de variación observada en la variable de respuesta y explicada

por las variaciones observadas en la variable independiente x en el experimento analizado.²⁹

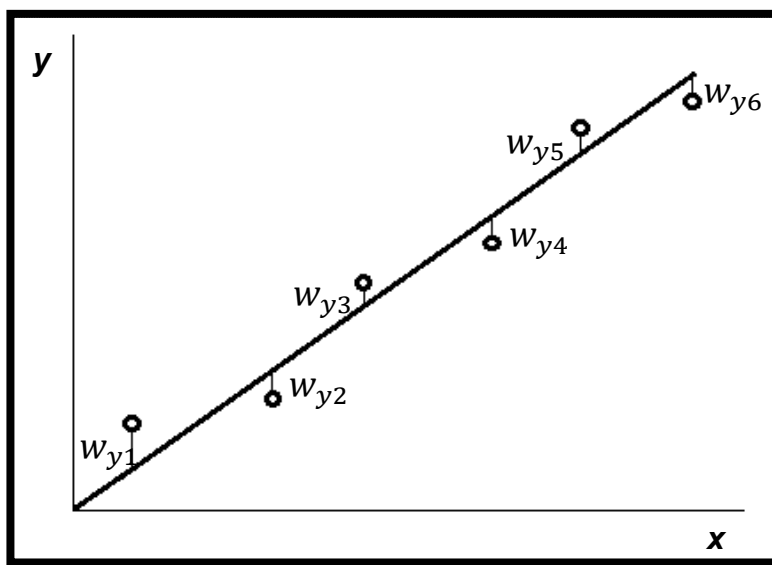


Figura 5-2. Residuales de y de una regresión lineal.

Para evaluar la presencia de puntos *anómalos* y verificar la linealidad es útil examinar visualmente la distribución de los w_{yi} de la regresión. En la figura 5-3 se muestran diferentes distribuciones para los residuos. Una gráfica de w_{yi} en función de x_i que tenga una distribución aleatoria de los residuos indica una relación lineal entre y y x (figuras 5-3, a y b). Mientras que si los valores de los w_{yi} presentan desviaciones sistemáticas o una tendencia definida, el modelo lineal es inadecuado (figuras 5-3, c y d). Por otra parte, si los w_{yi} muestran una variabilidad independiente de x se verifica *homocedasticidad* de los valores residuales (figura 5-3, a y c); por el contrario, si la variabilidad de los w_{yi} depende de x (ej. que aumenten con la concentración del analito), los residuos son *heterocedásticos* (figura 5-3, b y d). Se suele utilizar también los residuos estudentizados, w_{yi}^e , un tipo especial de residuo que se obtienen al dividir los residuos por sus errores estándares (ecuación 5.06).

$$w_{yi}^e = \frac{w_{yi}}{s_{y/x}} \quad (5.06)$$

El empleo de gráficos de w_{yi}^e vs x_i o w_{yi}^e vs predichos, trae como ventaja una lectura más clara de la distribución de los residuos, ya que presentan valores pequeños en torno a cero (para un 95,0 % de confianza los residuos estarán entre -2 y 2).

La desviación estándar de los residuales, $s_{y/x}$, se emplea para estimar el *LOD* del método analítico, y se calcula según la ecuación 5.07.

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (5.07)$$

donde y_i es la respuesta para cada valor de concentración medida e \hat{y}_i representa la *i*-ésima respuesta estimada por el modelo de regresión lineal.

Para verificar la validez estadística del modelo de regresión lineal se empleó un ANOVA, para evaluar las fuentes de error que afectan a la variable dependiente y .^{25,28} Cuando se dispone de observaciones replicadas, la varianza total se divide en dos componentes: la variación atribuida a la imprecisión experimental y la variación asociada a la regresión lineal. En consecuencia, la hipótesis nula plantea que la variación asociada al modelo propuesto (regresión lineal) es menor que la variación asociada al procedimiento experimental. El estadístico de contraste, *F*, corresponde a la relación entre la varianza atribuida a la regresión y la varianza asociada al error experimental.¹⁴ El valor de *F* obtenido desde el análisis de la varianza se compara con el *F* crítico tabulado para un contraste de dos colas ($F_{m-2, N-m}$, donde *N* representa el número total de medidas y *m* el número de niveles diferentes de *x*) al nivel de significación α para los correspondientes grados de libertad del numerador (*m* - 2) y del denominador (*N* - *m*). Entonces, si el valor de $F < F_{m-2, N-m}$ se acepta la hipótesis nula H_0 , concluyendo que el modelo lineal se ajusta a los datos experimentales y explica correctamente su variabilidad.¹⁴

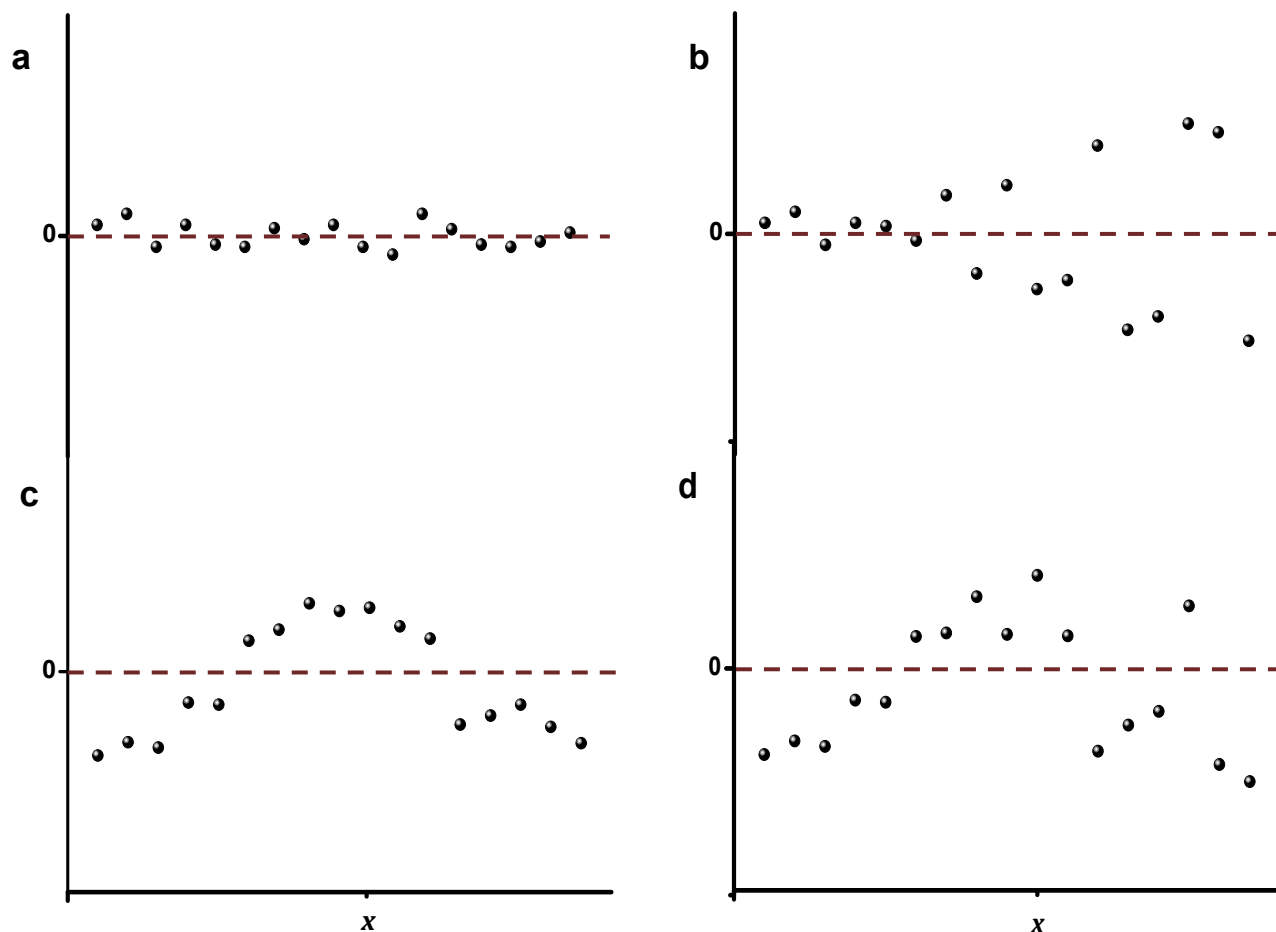


Figura 5-3. Diferentes distribuciones para las desviaciones de los residuales de la regresión. **(a)** distribución de w_{yi} sin patrón e independiente de la variable x indica relación lineal entre y y x y homocedasticidad, **(b)** distribución de w_{yi} sin patrón y con variabilidad dependiente de x indica relación lineal entre y y x y heterocedasticidad, **(c)** Distribución con una tendencia definida e independiente de x indica comportamiento no lineal y homocedasticidad, **(d)** Distribución con una tendencia definida y con variabilidad dependiente de x indica comportamiento no lineal y heterocedasticidad.

5.1.2.3. Límite de Detección y de Cuantificación

La definición moderna del límite de detección (LOD), que representa la mínima concentración detectable por el método analítico, se expresa mediante la ecuación 5.08.

$$LOD = \frac{3,29 \cdot \sigma_b}{A} \quad (5.08)$$

Donde σ_b es la desviación estándar poblacional de los blancos.^{30,31} En la práctica se estima σ_b con la desviación estándar de una muestra de blancos S_b obtenida mediante la medición de un conjunto de blancos químicos preparados independientemente (>20).^{24,25,32} Por lo que la ecuación 5.08 puede escribirse reemplazando σ_b por S_b .

El *LOD* se puede estimar en función de la desviación estándar de la concentración predicha para una muestra blanco (\hat{S}_b). Para calcular \hat{S}_b se recurre a la ecuación 5.09 para la desviación estándar de la concentración predicha por el modelo de regresión lineal ($S(\hat{x})$).

$$S(\hat{x}) = \frac{S_{y/x}}{A} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(\hat{x} - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2}} \quad (5.09)$$

Donde $S_{y/x}$ es la desviación estándar de los residuales (dados por la ecuación 5.07), A es la pendiente de la recta de regresión, n es el número de réplicas de la muestra incógnita, m es el número total de patrones de calibrado, x_i es la concentración de cada uno de los m patrones de calibrado, \bar{x} es el promedio de las concentraciones de calibrado.

Suponiendo que se analiza una muestra por triplicado (lo más usual es $n = 3$) donde el analito no esté presente ($\hat{x} = 0$), la ecuación 5.09 se modifica a la expresión 5.10.

$$S(\hat{x} = 0) = \hat{S}_b = \frac{S_{y/x}}{A} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2}} \quad (5.10)$$

El *LOD* se establece mediante una prueba de hipótesis estadística. En primer lugar se fija una concentración llamada *nivel crítico*, L_C (ver Figura 5-4). Para concentraciones superiores a L_C existe una probabilidad α de cometer el *error tipo I* o *falso positivo*. Esto implica rechazar erróneamente la hipótesis nula, H_0 , aceptando la presencia del analito cuando en realidad no está presente en la muestra. En tanto que por debajo de la concentración crítica L_C hay una probabilidad β de cometer un *error tipo II* o *falso negativo*,

en el que se acepta erróneamente la hipótesis nula, admitiendo que el analito está ausente cuando en realidad está presente.³²

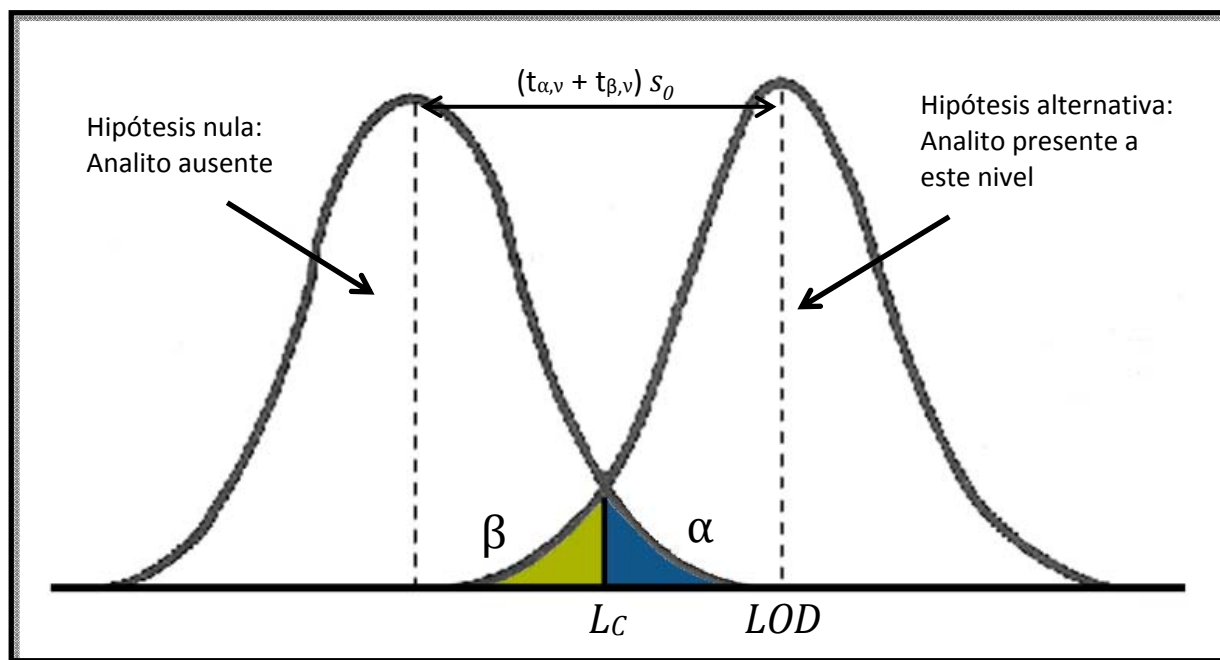


Figura 5-4. Prueba de significación empleada para estimar el límite de detección.

El valor de LOD depende de α y β y de las desviaciones estándares de las dos curvas gaussianas de la Figura 5-04. En general, ambas probabilidades se asignan iguales a 0,05 (sugerido por IUPAC, con el objetivo de facilitar la comparación entre diferentes métodos analíticos),^{24,25,26} mientras que las desviaciones estándares se suponen iguales a \hat{S}_b .³¹ De esta manera, el LOD se define por la siguiente ecuación

$$LOD = 2 \cdot t_{0,05, m-2} \cdot \hat{S}_b \quad (5.11)$$

La ecuación 5.11 ha sido adoptada por IUPAC²⁶ e ISO.³³ Dado que m es un número relativamente grande, el valor de $2 \cdot t_{0,05, m-2}$ tiende a 3,29 ($t_{0,05, m-2} = 1,64$, para una prueba de una cola y considerando un valor de m muy grande ∞). La ecuación 5.11 se aproxima entonces a la siguiente expresión:

$$LOD = 3,29. \hat{S}_b \quad (5.12)$$

De esta forma el calculo de \hat{S}_b permite conseguir una estimación del LOD para cuando se tiene un número bajo de muestras replicadas. Por esto, los valores de LOD determinados son superiores a los obtenidos mediante la ecuación 5.08 con lo cual se requiere la obtención experimental de S_b . Es importante informar el valor de n que se utiliza en el cálculo de \hat{S}_b y por lo tanto del LOD .

Por otra parte, el límite de cuantificación (LOQ) considerado la menor concentración cuantificable del analito de manera confiable, se determina mediante la ecuación siguiente

$$LOQ = \frac{10. \sigma_b}{A} \quad (5.13)$$

Esta ecuación al igual que la ecuación 5.08 puede escribirse reemplazando σ_b por S_b considerando una *muestra* de por los menos 25 blancos químicos.³¹

5.1.2.4. Selectividad e Interferencia

La *selectividad* indica hasta qué punto el método propuesto es capaz de detectar el analito inequívocamente de otros componentes presentes en la muestra. Aquellas especies que puedan llegar a interferir con la señal analítica del sustrato en estudio se le llaman *interferentes*.

Teniendo en cuenta la presencia de interferentes, los métodos analíticos pueden clasificarse según su selectividad como sigue.²⁴

∞ Método Universal: presenta sensibilidades comparables para un gran número de analitos con propiedades muy diversas.

∞ Método Selectivo: cuando la sensibilidad es alta para un determinado grupo de especies químicas.

∞ Método Específico: es sensible a una sola especie química.

5.1.2.5. Precisión

La precisión del método, aplicado en determinadas condiciones, se valida comparando la varianza de los resultados, S^2 , con la de la referencia, S_r^2 (que es la esperada o requerida para el método aplicado en condiciones similares). Si la primer varianza no es mayor que la segunda, la precisión del método queda validada.²⁴

Es conveniente hacer distinción de la precisión entre dos condiciones de trabajo extremas. Por un lado, las condiciones de *repetitividad* la cual se caracterizan por un grado de control a corto plazo sobre el método analítico (misma muestra, mismo operador, iguales condiciones). Por el otro, las condiciones de *reproducibilidad* en la cual se incluyen factores que influyen a largo plazo (diferentes condiciones: muestra, operador, instrumentos, laboratorio, etc.).^{23,24}

En general, los resultados obtenidos en las dos condiciones extremas suele dar una idea suficiente sobre la magnitud de las fuentes de varianza implicadas. Las varianzas pueden obtenerse a partir de los resultados analíticos de un ANOVA, y se deben incluir en las especificaciones del método.²⁴

5.1.2.6. Exactitud

Cuando se aplica un método analítico es necesario saber cuánto se aproxima la determinación de concentración al verdadero valor. Esto se expresa como la exactitud del método. ISO define la exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de la aplicación de un método analítico y el valor de referencia aceptado del analito.³⁰

Los principales métodos que se proponen para el estudio de la exactitud son:

- ∞ Verificación con un material de referencia certificado (MRC).
- ∞ Ensayos de *recuperación* sobre matrices o muestras reales.
- ∞ Comparación de los resultados del método propuesto con un método de referencia.
- ∞ Comparación entre ensayos inter-laboratorios.

A continuación se extiende la explicación sobre los ensayos de recuperación, ya que se emplearon como método analítico para evaluar la exactitud y selectividad de la metodología de análisis empleada para la detección de CZL.

5.1.2.6.1. Ensayos de Recuperación

Se entiende por recuperación, R , a la eficiencia del método analítico para recuperar y medir el analito adicionado en una matriz real.²⁵

El ensayo de recuperación consiste en agregar cantidades conocidas del analito a una matriz real, antes del procesamiento de la muestra, y luego se determina la correspondiente curva de calibración. Esta curva de calibración se compara con la calibración en ausencia de matriz. Si ambas curvas coinciden se concluye que la recuperación es 100,0 % y que la interferencia de la matriz es despreciable. Si las curvas no se superponen se asocia a un posible *efecto matriz*.²⁴ El *efecto matriz* produce errores sistemáticos por exceso o por defecto y, en consecuencia, aumenta proporcionalmente con la concentración del analito.²⁴

Se define el *factor de recuperación* o simplemente *recuperación*, R , como la cantidad de analito cuantificado por el método propuesto (Q^M) dividida la cantidad original presente en la muestra previa a un proceso de extracción y/o preconcentración (Q^R), como lo expresa la siguiente ecuación

$$R = \frac{Q^M}{Q^R} \quad (5.14)$$

Se distingue también la recuperación aparente, R_A , definida como el cociente entre la cantidad de analito determinada a partir de la curva de calibración del método propuesto (x^M) y el valor de referencia (x^R) como se expresa en la ecuación 5.15. El valor x^R es la cantidad de analito adicionada a la muestra antes del proceso de medición.^{34,35}

$$R_A = \frac{x^M}{x^R} \quad (5.15)$$

Para los distintos *niveles de fortificado* se obtienen los correspondientes valores de R_A y a partir de estos se puede obtener el promedio de las recuperaciones aparentes, $\overline{R_A}$, definido por la ecuación 5.16 siguiente

$$\overline{R_A} = \frac{\sum_i^n R_A^i}{n} \quad (5.16)$$

Para examinar la exactitud del método, se evalúa si el valor de $\overline{R_A}$ es significativamente diferente al 100,0 % de recuperación mediante una prueba de significación t bilateral a un dado *nivel de significación* planteando como hipótesis nula H_0 : % $\overline{R_A} = 100,0$ %. El valor del estadístico t se calcula mediante la ecuación 5.17.

$$t = \frac{\sqrt{n}(\overline{R_A} - 100)}{s} \quad (5.17)$$

Donde n representa el número de ensayos de recuperación considerados para calcular $\overline{R_A}$ y s , la *desviación estándar muestral*.

El valor obtenido de t se compara con un valor t crítico ($t_{\alpha, n-1}$) tabulado según el nivel de significación elegido y los grados de libertad ($n - 1$). Si el valor de t calculado es menor que $t_{\alpha, n-1}$ se dice que el método analítico utilizado es exacto.

5.2. OBJETIVOS

En esta etapa se propuso desarrollar un método analítico sencillo que pueda detectar CZL en presencia del receptor macrocíclico, que mejor respuesta analítica ha proporcionado, en un rango de concentraciones que incluya la concentración máxima admisible en matrices de agua para consumo humano.

Como objetivos específicos se planteó validar el método analítico propuesto mediante la obtención de los parámetros analíticos correspondientes aplicando herramientas

estadísticas adecuadas. Por último, evaluar la aplicabilidad del método para determinar CZL en matrices reales de agua.

5.3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.3.1. Instrumentación

Los equipos empleados para la preparación de las muestras, el control de la temperatura y la determinación de los espectros de fluorescencia se describen en la sección 3.3.1 (capítulo 3) de esta tesis.

5.3.2. Reactivos y procedimiento

5.3.2.1. Reactivos

Las especificaciones de los reactivos empleados para el desarrollo de los experimentos se describen en el capítulo 3. Las sales inorgánicas empleadas en el estudio de interferentes fueron reactivos comerciales de grado analítico.

Los solventes empleados fueron: agua deionizada calidad Milli-Q obtenida de un purificador Millipore y metanol grado HPLC Sintorgan.

5.3.2.2. Procedimiento general

Las soluciones concentradas de CZL se prepararon siguiendo la misma metodología detallada en la sección 3.3.2.2 (capítulo 3).

El método utilizado para adquirir los espectros de emisión de fluorescencia de CZL, se obtuvo de acuerdo a los siguientes parámetros instrumentales (en espectrofluorímetro JASCO) fueron:

- Ancho de rendijas de excitación y emisión: 10,0 nm
- Potencia del Detector = muy baja (very low)
- Velocidad de barrido = 500,0 nm/min

En todos los casos se registraron las áreas totales de los espectros de emisión. Y se utilizó una cubeta de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico. A las longitudes de onda de

excitación de CZL ($\lambda_{exc} = 290,0$ nm), la absorbancia de la concentración más alta de HP β -CD (10,0 mM) fue menor a 0,05.

En las mediciones espectrofluorimétricas siempre se utilizó como solución de referencia una concentración de CZL 5,0 μ M en un 95,0 % v/v de buffer fosfato pH = 6,994 y 2,0 % v/v de metanol y enrasando con agua Milli-Q. Los experimentos se realizaron a $(25,0 \pm 0,1)$ °C.

5.3.2.3. Determinación de los parámetros analíticos

Para realizar la calibración de CZL en ausencia y en presencia del receptor CD (10,0 mM), las soluciones se prepararon a 7 niveles de concentración diferentes ([CZL] = 1,0; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5; 8,0 μ M), procediendo de la siguiente forma: se agregó la cantidad de buffer fosfato necesario para un 95,0 % v/v, luego se agregó el volumen requerido de solución intermedia de CZL (preparada en CH₃OH) y se completó hasta el 2,0 % v/v con el cosolvente, por último se enrazó con agua Milli-Q. Las calibraciones de CZL en presencia de CD se prepararon por un procedimiento similar ya descrito (en la sección 3.3.2.2.) realizando mezclas de dos soluciones madres, una con CZL a la máxima concentración ([CZL] = 8,0 μ M) y con CD ([CD] = 10,0 mM), y la otra sólo con la misma concentración de CD. Los porcentajes de metanol y de buffer fosfato se mantuvieron constantes. Luego, para obtener las soluciones a medir, se varió la concentración de CZL mezclando ambas soluciones y variando la concentración de CZL. Para obtener la desviación estándar de los blancos, s_b , se midieron soluciones replicadas ($n = 25$).

El estudio de selectividad se realizó mediante la adición de una alícuota de los compuestos potencialmente interferentes a soluciones de CZL ([CZL] = 2,0 – 3,0 μ M) con HP β -CD ([HP β -CD] = 10,0 mM). Si la variación de las señales analíticas era superior al 5,0 %, la concentración del interferente se disminuyó gradualmente hasta que no se superara ese valor.

5.3.2.4. *Recolección de muestras de agua*

La recolección de muestras de agua fue realizada con los recaudos necesarios para evitar algún tipo de contaminación externa (impurezas humanas, polvillo del ambiente, resto de suciedad en canilla y material de recolección, etc.). A continuación se detalla el procedimiento que se empleó para recolectar las distintas muestras de agua.

- ❖ Limpieza de material de vidrio: las muestras se recolectaron en matraces de vidrio cuya limpieza consistió en remojar con mezcla sulfonítrica (1:2 de HNO_3 : H_2SO_4) durante 30 minutos y luego enjuagar exhaustivamente con agua destilada y por último con agua Milli-Q.
- ❖ Manipulación del Material: la manipulación del material siempre se realizó con guantes de látex y cuidando el contacto con agentes externos.
- ❖ Recolección del agua de tanque: la muestra de agua de tanque se recolectó desde la canilla de una casa en la ciudad de Río Tercero, donde el agua es provista de napas de agua subterránea. Antes del llenado del matraz recolector, se hizo circular el agua durante 10 minutos para lograr una depuración interna de las cañerías. El recipiente de recolección se enjuagó tres veces con la muestra de agua y luego se lo llenó por completo. Se tapó y se lo cubrió con papel aluminio para protegerlo de la luz.
- ❖ Recolección de agua corriente de red: la muestra de agua corriente se recolectó de la red que alimenta al edificio de Ciencias II de la Facultad de Ciencias Químicas. Antes del llenado del matraz recolector, se hizo circular el agua durante 10 minutos para lograr una depuración interna de las cañerías. El matraz recolector se enjuagó tres veces con el agua de red, se llenó, se tapó y se cubrió con papel aluminio para protegerlo de la luz.
- ❖ Recolección del agua de río: las muestras de agua de río se obtuvieron del río Tercero o Calamuchita, desde dos puntos de su curso (1 y 2 señalados con flecha roja en la figura 5-5). El matraz recolector se enjuagó varias veces con el agua de río antes de la recolección final. El matraz se sumergió unos 30 cm y se llenó por completo. Luego se tapó y se lo protegió de la luz con papel aluminio.



Figura 5-5. Zonas de recolección de muestras de agua del río Tercero (Calamuchita).

5.3.2.5. Ensayos de recuperaciones aparentes

Las soluciones de CZL ($[CZL] = (0,02 - 7,50) \mu M$) conteniendo HP β -CD ($[HP\beta\text{-}CD] = 10,0 \text{ mM}$) y un determinado % v/v de matriz real agua (5,0; 10,0; y 15,0 % v/v), se prepararon agregando primero la cantidad de matriz necesaria, luego se adicionó el volumen necesario de solución intermedia de CZL, se completó el 2,0 % v/v con metanol y por último se enrazó con buffer fosfato pH = 6,994.

Para eliminar restos de materia en suspensión se procedió a filtrar el buffer con filtro de muestra con membrana de nylon de $0,22 \mu m$ de diámetro de poro y empleando una jeringa hipodérmica con adaptador metálico para el filtro de muestra. Se filtraron también las muestras de matriz real para evaluar el efecto sobre las recuperaciones del analito obtenidas.

Las recuperaciones aparentes, R_A , se obtuvieron mediante el método de adiciones de estándar, se realizaron al menos entre 4 y 5 niveles de fortificación de CZL por triplicado.

5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1. Intervalo de Trabajo y Linealidad

Luego de estudiar el efecto de receptores ciclodextrinas (CDs) sobre la emisión de fluorescencia de CZL, se analizó que macrociclo actuaría como *sensor* para la detección de CZL con el menor *LOD* posible dado los cambios de relación de rendimientos cuánticos de fluorescencia observados ($\Phi = \phi_{S-R}/\phi_S$).

La emisión de fluorescencia de CZL, en presencia de distintos sensores macrocíclicos CD, se determinó variando la concentración del sustrato y empleando las mejores condiciones experimentales descritas en el capítulo 3.

Las áreas relativas de los espectros de emisión de fluorescencia ($F_R = F/F_0$) se graficaron en función de la concentración de CZL (al menos seis niveles de concentración por duplicado). En la Figura 5-6 se presentan curvas de calibración para CZL en ausencia y en presencia de tres receptores CDs. A partir de las curvas de calibración se determinaron los estimadores de la pendiente (*A*) y de la ordenada al origen (*B*) mediante el método de mínimos cuadrados. En todos los casos, los coeficientes de correlación, R^2 , entre las variables *x* e *y* fueron iguales o mayores a 0,997, interpretándose que las ecuaciones lineales de calibración obtenidas explican alrededor del 99,7 % de la variabilidad de *y* respecto *x*.

Es interesante resaltar que, en presencia del receptor ciclodextrina el rango o intervalo lineal de la curva de calibración se extiende (ver figura 5-6 y tabla 5-1). En ausencia de sensor macrocíclico, la concentración máxima que entra en el rango lineal es de 1003,2 ng/mL (6,0 μ M). Se observó que al aumentar la concentración del sustrato a 7,5 μ M la respuesta de fluorescencia se desvía del modelo lineal, ya que no se cumple la condición $2,303A < 0,05$.

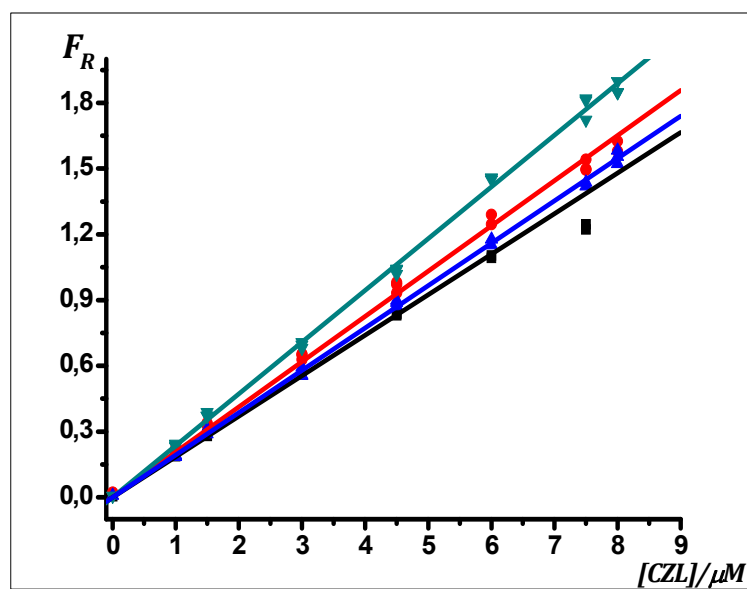


Figura 5-6. Curvas de calibración de CZL en presencia de CDs: HP β -CD (∇), Me β -CD (\bullet) β -CD (\blacktriangle) y en ausencia de receptor (\blacksquare). [CD] = 10,0 mM; CH₃OH 2,0 % v/v; 25,0 °C; λ_{exc} = 290,0 nm

La validez estadística del modelo de regresión lineal se verificó analizando los residuos estudentizados (w_{yi}^e) y mediante un ANOVA (análisis de la varianza) utilizando el método de comparación DGC.³⁶ También, se evaluó la diferencia en la respuesta analítica entre los sensores macrocíclicos empleando un ANOVA no paramétrico utilizando la prueba de Friedman.³⁶

En la figura 5-7 se muestran los gráficos de los w_{yi}^e en función de la concentración de CZL (x), obtenidos mediante la ecuación 5.06. Los residuales presentan una distribución aleatoria respecto de cero e independiente en relación a la variable x , comprobándose la validez de los supuestos de normalidad y homocedasticidad.^{29,30}

El análisis de la varianza (ANOVA) indica que los valores experimentales del estadístico F son menores que los valores críticos tabulados para los correspondientes grados de libertad (gl) y un nivel de confianza del 95,0 % ($\alpha = 0,05$), como se expone en la tabla 5-1. Esto implica que el modelo de regresión lineal es estadísticamente válido.

Las regresiones obtenidas con los diferentes receptores CDs son estadísticamente diferentes entre sí (con un $\alpha = 0,05$), como muestran los resultados de las pruebas estadísticas en la tabla 5-1.

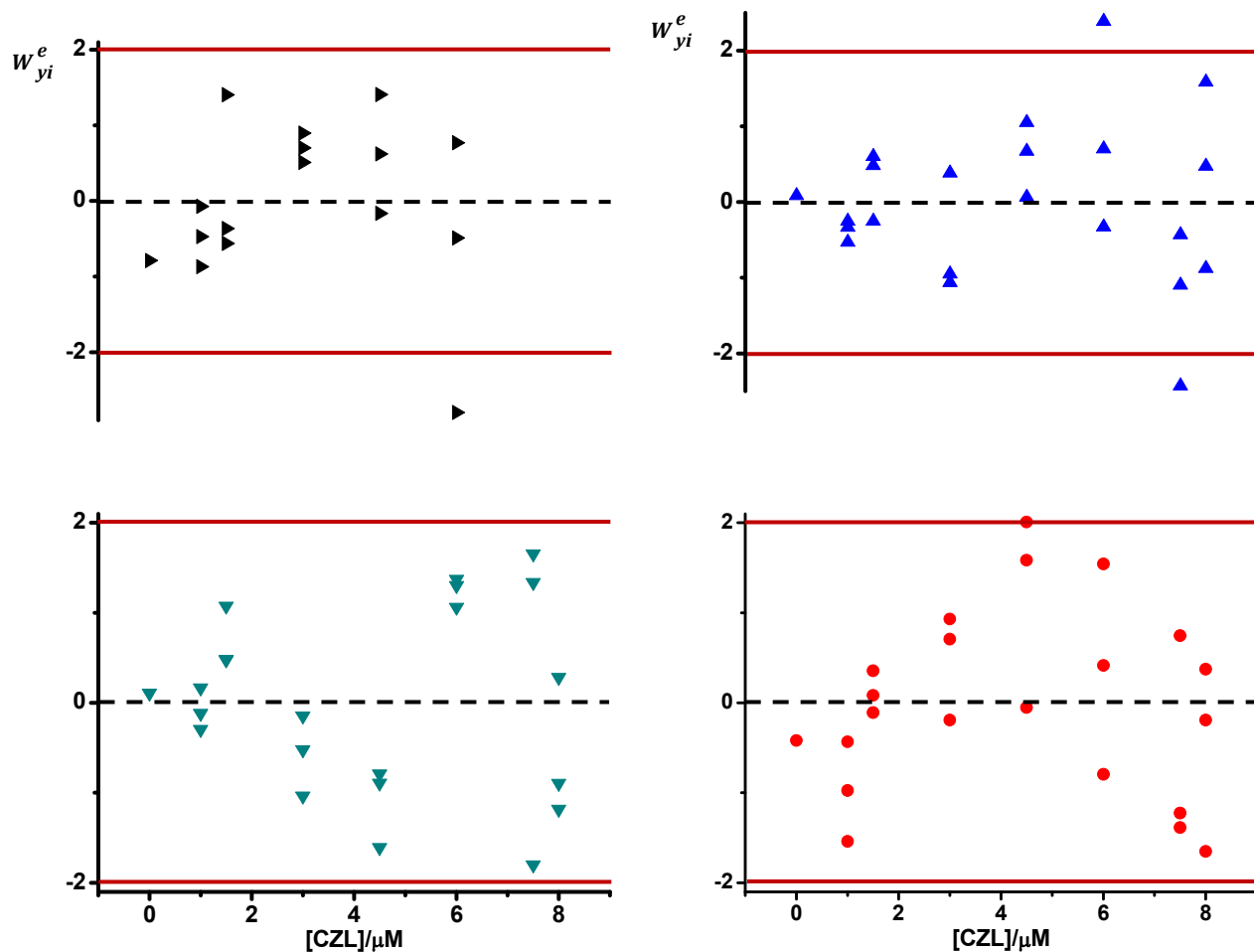


Figura 5-7. Gráficos de residuales en función de la concentración de CZL en ausencia de receptor (\blacktriangleright) y en presencia de: β -CD (\blacktriangle) HP β -CD (\blacktriangledown), Me β -CD (\bullet). $[CD] = 10,0$ mM; CH_3OH 2,0 % v/v; 25,0 °C; $\lambda_{exc} = 322,0$ nm).

Tabla 5-1. Análisis de varianza en las regresiones lineales obtenidas con CDs.

Especies	ANOVA^a			ANOVA no paramétrico^b	
	gl	F	F_{crítico}	Media (Ranks)	(*)
CZL	3	1,762	4,826	1,33	A
CZL-βCD	5	2,725	3,663	1,67	B
CZL-MeβCD	5	2,469	3,663	3,00	C
CZL-HPβCD	5	3,660	3,663	4,00	D

(a) Análisis de la variancia aplicado a cada regresión individual.

(b) Análisis de la variancia no paramétrico aplicado a todas la regresiones para comparar entre las distintas situaciones (ausencia y presencia de cada receptor). Se emplearon cinco niveles de concentración, los correspondientes al rango lineal de CZL en ausencia de receptor macrocíclico.

(*) Medias con una letra en común no son significativamente diferentes.

Para comparar las sensibilidades de calibración obtenidas en ausencia y en presencia de los sensores ciclodextrinas, se calcularon los límites de confianza al 95% de estos parámetros (límite inferior, *LI*, y límite superior, *LS*). En la tabla 5-3 se exponen las sensibilidades *A* y los valores de *LI* y *LS*, con lo que se puede corroborar que las sensibilidades de calibración en presencia del receptor macrocíclico son estadísticamente superiores a la sensibilidad que se obtiene en ausencia de cualquier receptor. Con los receptores β-CD y Meβ-CD se obtuvo un aumento ligero de la sensibilidad del método (5,0 y 9,5 %, respectivamente); en tanto que el empleo de HPβ-CD incrementó significativamente este parámetro (en un 28,6 %).

Tabla 5-2. Límites de confianza de las sensibilidades de calibración.^a

Especies	A, x10³ M⁻¹	LI al 95%	LS al 95%
CZL^b	182,8 ± 0,8	181,1	184,4
CZL-β-CD^c	192 ± 2	187,4	197,2
CZL-Meβ-CD^c	200 ± 2	196,8	204,6
CZL-HPβ-CD^c	235 ± 2	230,6	241,5

(a) Los límites de confianza fueron obtenidos mediante un ANOVA de los correspondientes modelos de regresión empleando InfoStat. Los valores de *A* se indican con su desviación estándar *s*. Los valores *LI* y *LS* se obtuvieron de la expresión ($x \pm st$).

(b) Se emplearon 5 niveles de concentración de CZL.

(c) Se emplearon 7 niveles de concentración de CZL.

La tabla 5-3 muestra los parámetros analíticos de validación para la detección de CZL en ausencia y en presencia de receptores CDs, empleando el método analítico propuesto. Con HP β -CD se obtuvieron los menores límites de detección y de cuantificación. Los valores de *LOD* se obtuvieron por medio de la ecuación 5.08. El límite inferior de cada rango lineal corresponde al *LOQ* (ver figura 5-1), fue obtenido aplicando la ecuación 5.13, y los valores correspondientes para CZL, CZL- β -CD, CZL-Me β -CD y CZL-HP β -CD son: $(0,0492 \pm 0,0002) \mu\text{M}$, $(0,0573 \pm 0,0006) \mu\text{M}$, $(0,100 \pm 0,001) \mu\text{M}$, $(0,0255 \pm 0,0002) \mu\text{M}$.

El método analítico propuesto para CZL permite el incremento de la señal espectroscópica por complejación con el sensor químico HP β -CD. El intervalo lineal conseguido fue [4,27 – 1337,60] ng/mL.

Los parámetros analíticos obtenidos con las ciclodextrinas β -CD y Me β -CD no mejoraron la sensibilidad del método espectrofluorimétrico en ausencia de receptor macrocíclico. Por lo que se descartó la posibilidad de emplear alguno de estos receptores como sensor químico para el desarrollo de un método analítico basado en la formación de un complejo con un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia que el CZL libre.

Tabla 5-3. Parámetros analíticos de validación.^a

<i>Especies</i>	<i>A, x10³ M⁻¹</i> ^b	<i>S_b, 10⁻³</i> ^c	<i>LOD [ng/mL]</i> ^d	<i>Intervalo lineal [ng/mL]</i> ^e
CZL	182,8 ± 0,8	0,9	2,71 ± 0,01	[8,23 - 1003]
CZL-β-CD	192 ± 2	1,1	3,16 ± 0,03	[9,58 – 1338]
CZL-Meβ-CD	200 ± 2	2,0	5,50 ± 0,08	[16,73 – 1338]
CZL-HPβ-CD	235 ± 2	0,6	1,41 ± 0,01	[4,27 – 1338]

(a) Las medidas de *F* se realizaron en fluorímetro JASCO, y las muestras se mantuvieron con un 95,0 % v/v buffer fosfato (pH = 6,994), un 2,0 % v/v CH₃OH y a 25,0 °C.

(b) Las desviaciones estándar se determinaron mediante Origin pro 8.

(c) Valor correspondiente a la desviación estándar del blanco determinado midiendo más de 25 soluciones.

(d) Los errores se calcularon por propagación de errores.

(e) El límite inferior del rango de trabajo corresponde al *LOQ*. Si el lector quisiera pasar de ng/mL a μM divida por 167,21.

La desviación estándar de los blancos, s_b , se calculó midiendo por lo menos 25 ($n \geq 25$) soluciones blanco preparadas de forma individual.

El mejoramiento del LOD , definido como porcentaje de disminución relativo al límite de detección en ausencia de sensor, $\%LOD_{\downarrow}$, se define en la ecuación 5.18

$$\% LOD_{\downarrow} = \frac{LOD_{>} - LOD_{<}}{LOD_{>}} \times 100 \quad (5.18)$$

Los $\%LOD_{\downarrow}$ para CZL en presencia de HP β -CD fue de 48 %.

5.4.2. Desarrollo de un método analítico para la detección de CZL

Considerando la disminución del LOD de CZL obtenida, por espectroscopia de emisión de fluorescencia, al adicionar el sensor HP β -CD, se eligió este receptor como sensor químico.

Se analizaron matrices de agua potable (de red y de tanque domiciliaria) y del río Tercero o Calamuchita, en dos puntos en su curso (ver figura 5.5). Esto se realizó como parte de la validación del método analítico para evaluar si el procedimiento puede ser aplicado en una muestra real.

5.4.2.1. Selectividad

La selectividad del método analítico se evaluó mediante un *estudio de interferentes*. Para lo cual, se adicionaron posibles interferentes en soluciones conteniendo CZL y el receptor macrocíclico HP β -CD.

Para decidir si en presencia del interferente hay una variación significativa en la señal de fluorescencia del analito, se consideró que hay *interferencia* cuando el cambio de la señal es superior al 5,0 %. En base a este criterio se definió el nivel de tolerancia, como la máxima concentración que causa un error relativo ($e_R\%$) menor o igual al 5,0 % en la señal analítica.

Debido a que el CZL y la QUI forman parte del conjunto hidrocarburos nitrogenados en matrices derivadas del petróleo y de otras fuentes contaminantes (ej. productos de la combustión del tabaco y combustibles de automóviles), se realizó un estudio de interferencia de la QUI en la determinación del CZL por espectroscopia de fluorescencia.

Se analizaron varias relaciones interferente/analito ($[Int]/[An]$). En la tabla 5-4 se muestra el efecto interferente de QUI en la determinación de CZL. Se puede ver que a medida que se aumenta la concentración de QUI la fluorescencia de CZL disminuye. Las concentraciones empleadas de QUI fueron: 0,0; 2,0; 6,0; 10,0; 40,0 y 60,0 μM . Mientras que el analito CZL se mantuvo a una concentración constante de 6,0 μM .

El nivel de tolerancia de QUI determinado fue de 7,8 μM empleando un gráfico de F_{Int}/F vs $e_R\%$ e interpolando el punto $F_{Int}/F_{(5,0\%)}$ en el perfil F_{Int}/F vs [QUI].

Además, se evaluó el efecto del incremento en la fuerza iónica dada por los iones Na^+ y Cl^- . Los experimentos se realizaron variando la concentración de NaCl entre 0,012 M a 0,3 M. En la tabla 5-5 se expone la señal de fluorescencia en presencia de las distintas [NaCl] indicándose también la relación de concentraciones de los iones interferentes y el analito. Se puede ver que un fuerte incremento en la fuerza iónica del medio no tiene efecto sobre la respuesta de fluorescencia medida. También se analizó la respuesta espectrofluorimétrica variando el porcentaje de buffer fosfato pH = 6,994 entre 50 % y 95 % v/v no observando diferencia significativa en la señal de fluorescencia F/F_0 (ver tabla 5-6). Estos ensayos demuestran robustez en el método planteado respecto a variaciones en un amplio rango de concentraciones de iones monovalentes (como el Na^+ y el Cl^-).

Tabla 5-4. Interferencia de QUI en la determinación de CZL.^a

$[QUI]/\mu\text{M}$	$[Int]/[An]$	F_{Int}/F_0 ^b
0,0	0,00	1,028
2,0	0,33	1,015 (1,3 %) ^c
6,0	1,00	0,998 (2,9 %) ^c
10,0	1,67	0,960 (6,6 %) ^c
40,0	6,67	0,749 (27,3 %) ^c
60,0	10,00	0,667 (35,1 %) ^c

^(a) Todas las medidas de F se realizaron excitando a $\lambda_{exc} = 290,0$ nm. [CZL] = 6,0 μM ; [HP β -CD] = 10,0 mM; 95,0 % v/v; 2,0 % v/v CH_3OH . Señal F_{Int}/F_0 promedio de dos replicas por cada [QUI].

^(b) F_0 es la fluorescencia de CZL-HP β -CD sin la presencia del interferente, F_{Int} es la fluorescencia en presencia del interferente.

^(c) Error relativo ($e_R\%$) de la medida respecto al valor en ausencia de Interferente.

Tabla 5-5. Evaluación del incremento en la fuerza iónica del medio.^a

[NaCl]/M	Int/An	F_{Int}/F_0
0	0,00	1,00
0,012	2000	1,07
0,03	5000	1,03
0,06	10000	1,06
0,18	30000	1,03
0,3	50000	1,02

^(a) Las medidas de fluorescencia se realizaron excitando a $\lambda_{exc} = 290,0$ nm. [CZL] = 6,0 μ M, [HP β -CD] = 10,0 mM; 95,0 % v/v; 2,0 % v/v CH₃OH. Señal F_{Int}/F_0 promedio de dos replicas por cada [QUI].

Tabla 5-6. Evaluación de la variación del % del buffer fosfato pH = 6,994.^a

Buffer fosfato, % v/v	F/F_0
50	1,07
70	1,05
80	1,02
95	1,00

^(a) Las medidas de fluorescencia se realizaron excitando a $\lambda_{exc} = 290,0$ nm. [CZL] = 6,5 μ M, [HP β -CD] = 10,0 mM.

5.4.2.2. Ensayos de recuperaciones aparentes

Para evaluar la exactitud y la eficiencia del método analítico propuesto, se realizaron ensayos de recuperación de CZL en las matrices reales de agua (agua de red, de tanque domiciliario y del río Tercero). Se empleó el *método de adiciones de estándar* para efectuar las determinaciones del analito. Este método se basa en agregar cantidades conocidas del analito a soluciones que contienen una cantidad constante de la matriz real y se diluyen al mismo volumen final.³⁰

Se emplearon diferentes niveles de concentración de la matriz real (5,0 %, 10,0 % y 15,0 % v/v). Para cada nivel de matriz se adicionaron seis niveles de CZL, por triplicado cada concentración. Las concentraciones empleadas de CZL se eligieron por arriba del *LOQ* y dentro del intervalo lineal establecido para la técnica. Se evaluó si el filtrado, tanto del buffer como de la matriz real, incide sobre los valores de recuperación obtenidos. En la tabla 5-7 se muestran los valores de sensibilidad de calibración, *A*. Analizando estos

resultados se verifica un ligero aumento en la sensibilidad de la técnica cuando se filtra el buffer y la matriz. El filtrado del buffer no tiene efecto significativo en la intensidad de la señal de fluorescencia (< 10 %), como reflejan los valores de sensibilidad en las entradas 3 y 4 de la tabla 5-7. Mientras que el filtrado de un 10 % v/v de matriz, aumenta un 24,0 % la sensibilidad de la técnica (entradas 7 y 8). Es por esto que en el procedimiento llevado a cabo, se optó por filtrar el medio (buffer) en el que se prepararon las muestras a analizar.

Tabla 5-7. Sensibilidad de calibración en 10,0 % v/v de matriz (agua corriente de red) con diferentes tratamientos de las muestras.^a

Matriz			$A, \times 10^3 M^{-1}$
1	En buffer^b	Matriz sin Filtrar	(182,8 ± 0,8)
2	En buffer^b	Matriz Filtrada	(200 ± 4)
3	Sin matriz con HPβ-CD	Buffer sin filtrar	(235 ± 2)
4	Sin matriz con HPβ-CD	Buffer filtrado	(243,3 ± 0,1)
5	Matriz sin HPβ-CD	Matriz sin filtrar	(209 ± 3)
6	Matriz sin HPβ-CD	Matriz filtrada	(235 ± 1)
7	Matriz con HPβ-CD^c	Matriz sin filtrar	(246 ± 2)
8	Matriz con HPβ-CD^d	Matriz filtrada	(305 ± 2)

(a) Sensibilidades determinadas a $\lambda_{exc} = 290,0$ nm.

(b) Ausencia de HPβ-CD.

(c) Se filtró el buffer.

(d) Se filtró tanto la matriz como el buffer; [HPβ-CD] = 0,010 M.

En la tabla 5-8 se exponen los valores de sensibilidad de calibración, A , de la técnica en presencia de los diferentes niveles de matrices empleados. Para un 10 % v/v de agua de red no se observa un incremento significativo en la sensibilidad del método. Por el contrario, los valores de A para las matrices agua de tanque y agua de río, se encuentran por arriba de la sensibilidad de calibración de la metodología en presencia del sensor HPβ-CD.

Se realizó el test de contraste de Dixon (contraste Q) para evaluar datos anómalos. Los valores de R_A para las concentraciones más bajas (0,10 μM) fueron descartados por ser magnitudes que se alejan del conjunto de *datos típicos* de la *muestra* (el valor del

estadístico Q experimental es mayor al valor crítico tabulado para un intervalo de confianza del 95,0 %, $\alpha = 0,05$).³⁰

Tabla 5-8 Sensibilidades de calibración para cada nivel de matriz y recuperaciones porcentuales promedio de los tres niveles de matriz empleados.

Matriz		$A, \times 10^3 M^{-1}$ ^a		
		5,0 %	10,0 %	15,0 %
1	Agua corriente	-	246 ± 2	-
2	Agua de tanque	296 ± 2	287 ± 6	289 ± 2
3	Agua de río (zona 1)	332 ± 3	362 ± 4	380 ± 3
4	Agua de río (zona 2)	281 ± 2	302 ± 2	288 ± 3

^(a) Las medidas de F se realizaron en fluorímetro JASCO. Las muestras se mantuvieron con un 2,0 % v/v CH_3OH y enrasando con buffer fosfato de pH = 6,994; $\lambda_{exc} = 290,0$ nm; $[HP\beta-CD] = 0,010$ M; $25,0^\circ C$. El valor de A con $HP\beta-CD$ y en ausencia de matriz real es $(235 \pm 2) \times 10^3 M^{-1}$.

Las recuperaciones aparentes (R_A) de CZL se obtuvieron midiendo la emisión de fluorescencia en soluciones que contenían matriz real y se calcularon como porcentajes, estableciendo el cociente entre la cantidad de analito determinada, a partir de los correspondientes espectros de emisión de fluorescencia, y la cantidad adicionada previo al proceso de medición (ver ecuación 5.15). En la tabla 5-9 se muestran, para cinco niveles de fortificación del analito, las cantidades determinadas y las recuperaciones obtenidas por el método propuesto para un 10,0 % v/v de agua corriente en ausencia y en presencia del receptor $HP\beta-CD$. Como se puede apreciar, sin el sensor químico se pudo recuperar la totalidad (99 ± 3) % de CZL a un nivel de matriz de 10,0 % v/v con una sensibilidad de $(235 \pm 2) \times 10^3 M^{-1}$, en tanto que en presencia del receptor macrocíclico también se determinó prácticamente la totalidad del sustrato (97 ± 2) % con una sensibilidad de $(246 \pm 2) \times 10^3 M^{-1}$. La metodología empleada permitió determinar concentraciones de carbazol de hasta $0,1 \mu M$.

Tabla 5-9. Recuperaciones porcentuales determinadas para CZL en agua corriente en presencia y en ausencia de HP β -CD.^{a,b}

Matriz real	Cantidad Adicionada/ μ M	Cantidad promedio determinada/ μ M ^c	% R_A ^d
Agua corriente (10,0 % v/v) sin HP β -CD	0,1	0,0936 \pm 0,0004	93,6 \pm 0,4
	0,2	0,2064 \pm 0,0009	103,2 \pm 0,4
	0,3	0,292 \pm 0,001	97,3 \pm 0,3
	0,6	0,613 \pm 0,003	100,5 \pm 0,5
	0,8	0,798 \pm 0,003	99,8 \pm 0,4
Agua corriente (10,0 % v/v) con HP β -CD	0,1	0,0885 \pm 0,0006	88,5 \pm 0,6
	0,2	0,203 \pm 0,001	101,5 \pm 0,5
	0,3	0,288 \pm 0,002	96 \pm 0,7
	0,6	0,608 \pm 0,004	101,3 \pm 0,7
	0,8	0,797 \pm 0,005	99,6 \pm 0,6

(a) Las muestras de agua corriente de red fueron recolectadas de las instalaciones del Dpto. de Química Orgánica de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.3.2.4.

(b) Las medidas de F se realizaron en fluorímetro JASCO; λ_{exc} = 290,0 nm; [HP β -CD] = 10,0 mM; 2,0 % v/v de CH₃OH; enrasando con buffer fosfato de pH = 6,994; a 25,0 °C.

(c) La cantidad promedio se ha determina empleando una sensibilidad de 209 x10³ M⁻¹ en ausencia de receptor y 246 x10³ M⁻¹ en presencia de HP β -CD. Las mismas se expresan con su desviación estándar.

(d) Los % R_A se calcularon de acuerdo a la ecuación 5.15, y se expresan con sus correspondientes desviaciones estándares.

Las tablas 5-10, 5-11 y 5-12 muestran las cantidades adicionadas, los valores determinados y los % R_A para los distintos niveles de las matrices estudiadas. En todos los casos se observó un efecto matriz positivo (% R_A > 100 %) que interfería con la detección correcta del analito. Esta interferencia puede ser debido a compuestos orgánicos provenientes de la propia contaminación (residuos patógenos, aguas residuales domésticas, compuestos químicos tóxicos como pesticidas, etc.) y aquellos que forman parte de la materia orgánica propia de la acción de algas y microorganismos (*producción primaria*).¹¹ Algunos de estos compuestos pueden ser débilmente fluorescentes pero al asociarse con el sensor macrocíclico incrementan su emisión y pueden interferir sobre la señal del analito.³⁷ No obstante, aplicando el método de adición de estándares como se ha realizado, se pudo eliminar el efecto matriz positivo utilizando la pendiente de calibración teniendo en cuenta la matriz real.

Tabla 5-10. Recuperaciones porcentuales determinadas para CZL en agua de tanque.^a

<i>Matriz real</i>	<i>Cantidad Adicionada/μM</i>	<i>Cantidad promedio determinada/μM</i>	<i>% R_A ^(b)</i>
Agua de tanque (5,0 % v/v)	0,101	0,135 \pm 0,001	134 \pm 1
	1,01	1,29 \pm 0,02	128 \pm 2
	2,02	2,51 \pm 0,04	124 \pm 2
	4,00	4,9 \pm 0,1	122 \pm 2
	7,50	9,45 \pm 0,08	126 \pm 1
	0,101	(0,108 \pm 0,001) ^c	(106 \pm 1) ^c
	1,01	(1,03 \pm 0,02) ^c	(101 \pm 2) ^c
	2,02	(2,00 \pm 0,03) ^c	(100 \pm 2) ^c
	4,00	(3,91 \pm 0,09) ^c	(98 \pm 2) ^c
	7,50	(7,54 \pm 0,06) ^c	(100,5 \pm 0,8) ^c
Agua de tanque (10 % v/v)	0,092	0,119 \pm 0,003	129 \pm 3
	1,01	1,35 \pm 0,03	132 \pm 3
	2,02	2,7 \pm 0,1	134 \pm 5
	4,00	4,8 \pm 0,2	120 \pm 5
	7,50	7,6 \pm 0,1	101 \pm 1
	0,092	(0,098 \pm 0,003) ^c	(106 \pm 3) ^c
	1,01	(1,11 \pm 0,03) ^c	(109 \pm 3) ^c
	2,02	(2,24 \pm 0,08) ^c	(111 \pm 4) ^c
	4,00	(4,0 \pm 0,1) ^c	(100 \pm 2) ^c
	7,50	(6,27 \pm 0,09) ^c	(84 \pm 1) ^c
Agua de tanque (15 % V/V)	1,01	1,27 \pm 0,02	124 \pm 2
	2,02	2,5 \pm 0,1	124 \pm 5
	4,00	4,83 \pm 0,01	120,8 \pm 0,2
	7,50	8,1 \pm 0,2	108 \pm 3
	1,01	(1,04 \pm 0,02) ^c	(102 \pm 2) ^c
	2,02	(2,1 \pm 0,1) ^c	(104 \pm 5) ^c
	4,00	(3,94 \pm 0,01) ^c	(98,5 \pm 0,2) ^c
	7,50	(6,6 \pm 0,1) ^c	(88 \pm 1) ^c

^(a) Mediciones realizadas en equipo JASCO; λ_{exc} = 290,0 nm; [HP β -CD] = 10,0 mM; 2,0 % v/v CH₃OH; % v/v de buffer variable según el porcentaje de matriz empleado (100 % – 2 % – % de matriz = % buffer); a 25,0 °C.

^(b) Recuperación porcentual promedio de tres replicas con su desviación estándar.

^(c) Valores obtenidos teniendo en cuenta la pendiente de calibración en presencia del porcentaje matriz real.

Tabla 5-11. Recuperaciones porcentuales determinadas para CZL en agua del río Tercero en el pto .1 (ver figura 5-5).^a

Matriz real	Cantidad Adicionada/ μM	Cantidad promedio determinada/ μM	% R_A ^b
Agua de río Tercero (pto. 1) (5 % V/V)	1,01	1,32 \pm 0,09	129 \pm 9
	2,02	2,7 \pm 0,1	133 \pm 5
	4,00	5,7 \pm 0,1	142 \pm 2
	7,50	10,1 \pm 0,4	135 \pm 5
	1,01	(0,97 \pm 0,07) ^c	(95 \pm 7) ^c
	2,02	(1,98 \pm 0,07) ^c	(98 \pm 4) ^c
	4,00	(4,2 \pm 0,1) ^c	(105 \pm 2) ^c
	7,50	(7,4 \pm 0,4) ^c	(99 \pm 5) ^c
Agua de río Tercero (pto. 1) (10 % V/V)	1,01	1,562 \pm 0,005	153,1 \pm 0,5
	2,02	3,25 \pm 0,02	161 \pm 1
	4,00	6,1 \pm 0,3	152 \pm 8
	7,50	10,3 \pm 0,6	137 \pm 8
	1,01	(1,02 \pm 0,01) ^c	(100 \pm 0,9) ^c
	2,02	(2,12 \pm 0,04) ^c	(105 \pm 2) ^c
	4,00	(4,0 \pm 0,2) ^c	(100 \pm 5) ^c
	7,50	(6,7 \pm 0,3) ^c	(89 \pm 4) ^c
Agua de río Tercero (pto. 1) (15 % V/V)	1,01	1,62 \pm 0,02	159 \pm 2
	2,02	3,19 \pm 0,08	158 \pm 4
	4,00	6,5 \pm 0,3	162 \pm 8
	7,50	10,8 \pm 0,3	144 \pm 4
	1,01	(1,00 \pm 0,02) ^c	(98 \pm 2) ^c
	2,02	(1,99 \pm 0,07) ^c	(98 \pm 4) ^c
	4,00	(4,0 \pm 0,2) ^c	(100 \pm 5) ^c
	7,50	(6,7 \pm 0,3) ^c	(89 \pm 4) ^c

(a) Mediciones realizadas en equipo JASCO; λ_{exc} = 290,0 nm; [HP β -CD] = 10,0 mM; 2,0 % v/v CH₃OH; % v/v de buffer variable según el porcentaje de matriz empleado (100 % – 2 % – % de matriz = % buffer); a 25,0 °C.

(b) Recuperación porcentual promedio de tres replicas con su desviación estándar.

(c) Valores obtenidos teniendo en cuenta la pendiente de calibración en presencia del porcentaje matriz real.

Tabla 5-12. Recuperaciones porcentuales determinadas para CZL en agua del río Tercero en el pto. 2 (ver figura 5-5).^a

Matriz real	Cantidad Adicionada/ μM	Cantidad promedio determinada/ μM	% R_A ^b
Agua de río Tercero (pto. 2) (5 % V/V)	1,01	1,27 \pm 0,02	124 \pm 2
	2,02	2,56 \pm 0,03	127 \pm 1
	4,00	4,9 \pm 0,1	122 \pm 2
	7,50	8,8 \pm 0,2	117 \pm 3
	1,01	(1,07 \pm 0,02) ^c	(105 \pm 2) ^c
	2,02	(2,15 \pm 0,04) ^c	(106 \pm 2) ^c
	4,00	(4,1 \pm 0,1) ^c	(102 \pm 2) ^c
	7,50	(7,4 \pm 0,3) ^c	(99 \pm 4) ^c
Agua de río Tercero (pto. 2) (10 % V/V)	1,01	1,31 \pm 0,02	128 \pm 2
	2,02	2,56 \pm 0,01	126,7 \pm 0,4
	4,00	5,40 \pm 0,04	135 \pm 1
	7,50	9,5 \pm 0,1	127 \pm 1
	1,01	(1,02 \pm 0,02) ^c	(100 \pm 2) ^c
	2,02	(1,998 \pm 0,005) ^c	(98,9 \pm 0,2) ^c
	4,00	(4,22 \pm 0,06) ^c	(106 \pm 1) ^c
	7,50	(7,4 \pm 0,1) ^c	(99 \pm 1) ^c
Agua de río Tercero (pto. 2) (15 % V/V)	1,01	1,24 \pm 0,02	122 \pm 2
	2,02	2,58 \pm 0,03	128 \pm 1
	4,00	5,2 \pm 0,3	130 \pm 8
	7,50	9,0 \pm 0,1	120 \pm 1
	1,01	(1,04 \pm 0,02) ^c	(102 \pm 2) ^c
	2,02	(2,14 \pm 0,02) ^c	(106 \pm 1) ^c
	4,00	(4,3 \pm 0,2) ^c	(108 \pm 5) ^c
	7,50	(7,5 \pm 0,1) ^c	(100 \pm 1) ^c

^(a) Mediciones realizadas en equipo JASCO; $\lambda_{\text{exc}} = 290,0 \text{ nm}$; $[\text{HP}\beta\text{-CD}] = 10,0 \text{ mM}$; 2,0 % v/v CH_3OH ; % v/v de buffer variable según el porcentaje de matriz empleado (100 % – 2 % – % de matriz = % buffer); a 25,0 °C.

^(b) Recuperación porcentual promedio de tres replicas con su desviación estándar.

^(c) Valores obtenidos teniendo en cuenta la pendiente de calibración en presencia del porcentaje matriz real.

Es de esperar que aguas de un río presenten mayores interferentes quizás que el agua de un tanque domiciliario. La aparición de un efecto matriz en agua de tanque no fue el resultado esperado y sorprendió. Hay antecedentes de contaminación de agua potable contenida en tanques debido a falta de limpieza en interiores y sistema de cañerías locales.³⁸ Se ha demostrado que especies *Enterobacter* y *Klebsiella* colonizan con frecuencia las superficies interiores de las cañerías de agua y tanques de almacenamiento y crecen formando una película cuando las condiciones son favorables (presencia de nutrientes, temperaturas cálidas, bajas concentraciones de desinfectantes y tiempos largos de almacenamiento).³⁸

Llama la atención el mayor efecto matriz obtenido en muestras de agua de río recolectadas en la zona 1 respecto a las recolectadas en la zona 2 (ver figura 5-05). Esto quizás se deba a que la primer región se encuentre más cerca del dique Piedras Moras en donde el agua se encuentra más expuesta a los desechos del hombre y a la acumulación de sedimentos³⁹ arrastrados por el agua de lluvia; además, la proliferación de algas es mayor en esa zona (1). Con el avance de su curso, es probable que las finas partículas de sedimentos se depositen en el fondo del río. Además, en diferentes regiones del curso de un río se presentan diferentes instancias de autodepuración,⁴⁰ con lo que la materia orgánica puede variar a lo largo del mismo.

En la tabla 5-13 se muestran las \overline{R}_A , los valores del estadístico t_{exp} para cada nivel de matriz real, y los valores t críticos según el número de niveles de R_A (n) empleados en el cálculo de \overline{R}_A .

Las recuperaciones porcentuales promedio, \overline{R}_A , se calcularon mediante la ecuación 5.13, para evaluar la exactitud del método analítico propuesto, aplicado a las matrices reales. A partir de los valores de \overline{R}_A se determinaron valores del estadístico t_{exp} (ecuación 5.17) para realizar una prueba de hipótesis y establecer si los valores de \overline{R}_A difieren significativamente de 100,0 % ($H_0: \overline{R}_A = 100$).

Se observa que las recuperaciones porcentuales a distintos niveles de fortificación de las matrices, están comprendidas entre (91-113) % para agua de tanque y entre (98-108) % para agua de río.

La hipótesis nula fue aceptada debido a que el valor del estadístico t calculado en cada caso fue menor que el valor del estadístico t tabulado bilateral, $t_{\alpha, n-1}$, a niveles de significación $\alpha = 0,10$ y $\alpha = 0,05$. Por lo tanto, se comprobó con este procedimiento que el método es estadísticamente exacto para la cuantificación de CZL en las muestras de agua de tanque domiciliaria y del río Tercero.

Tabla 5-13. Parámetros determinados para establecer la exactitud del método analítico para la detección de CZL en matrices de agua.

Matriz	% Matriz	$\overline{R}_A, \% ^a$	DS, %^b	t_{exp}^c
Agua corriente	10	99 (5)	3	0,74
Agua de tanque	5	101 (5)	3	0,74
	10	102 (5)	11	0,41
	15	98 (4)	7	0,57
Agua de río (zona 1)	5	96 (4)	5	2,12
	10	104 (5)	13	0,69
	15	102 (5)	13	0,34
Agua de río (zona 2)	5	103 (4)	3	2,00
	10	101 (4)	3	0,67
	15	104 (4)	4	2,00

^(a) Entre paréntesis se especifica el número de niveles de recuperación empleados para calcular la recuperación porcentual promedio.

^(b) DS (Desviación Estandar porcentual)

^(c) Se compara con los $t_{\alpha, n-1}$ siguientes: $t_{0,10; n-1} = 2,13$ y $2,35$ (para $n = 5$ y 4 respectivamente); y $t_{0,05; n-1} = 2,78$ y $3,18$ (para $n = 5$ y 4)

5.4.2.3. Comparación con otros métodos para la detección de CZL

En la tabla 5-14 se resumen algunos LOD de CZL determinados mediante el método propuesto en este trabajo de tesis y otros métodos descritos en literatura.

Los primeros métodos desarrollados para la detección de carbazol y sus derivados consistían en derivatización del analito soportado en una matriz sólida (placa de óxido de

aluminio, celulosa, sílica gel) en N,N-dimetilformamida y en presencia de hidróxido de tetraetilamonio en metanol.⁴¹

El método analítico que se propone en este trabajo de tesis presenta un *LOD* comparable y bastante más bajo que otros métodos luminiscentes ya publicados. Por ejemplo, mediante espectroscopia de fluorescencia sincrónica una muestra de carbazol en dibenzofurano fue determinado con un límite de detección de 2 µg/mL.⁴² Por otra parte, metodologías que describen la derivatización del analito con reactivos como el *p*-nitrofenol y la 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona,⁴³ junto al tratamiento en N,N-dimetilformamida con hidróxido de tetraetilamonio en metanol para dar la especie desprotonada de CZL (con un mayor ϵ que la especie neutra), dieron límites de determinación entre 20 y 100 µg/mL.⁴¹

Tabla 5-14. Límites de detección de CZL obtenidos mediante diferentes métodos.

<i>Método Analítico</i>	<i>LOD, ng/mL</i>
Espectroscopia de Fluorescencia en presencia de HPβ-CD	1,41
Espectroscopia de fosforescencia con preconcentración de CZL en papel de filtro modificado con β-CD ^c	0,015
Cloud point extraction (CPE) acoplada a HPLC ^d	10
Espectroscopia de fluorescencia sincrónica ^b	2 x10 ³
Espectroscopia de Fluorescencia en presencia de hidróxido de tetraetilamonio en metanol ^a	20 x10 ³
Detección fluorimétrica de CZL adsorbido en TLC y derivatizado con <i>p</i> -nitrofenol ^c	100 x10 ³

(a) Ref. 41

(b) Ref. 42

(c) Ref. 43

(d) Ref. 44

El *LOD* determinado por una técnica espectrofotométrica fue dos órdenes de magnitud inferior que el obtenido por el método analítico planteado en este trabajo de tesis. Sin embargo, dicho procedimiento requiere de una etapa previa de pre-

concentración del analito en una matriz sólida (papel de filtro modificado con β -CD) antes de efectuar la medición espectrofotométrica. De esta manera, se plantea un método más directo y sencillo para la detección de carbazol en muestras de agua. Y además, permitiría detectar dicho analito en niveles por debajo al límite permitido según la legislación del Departamento de Sanidad del Agua de Carolina del Norte en EEUU.²⁰

5.5. CONCLUSIONES

Mediante el empleo del sensor macrocíclico HP β -CD, fue posible el desarrollo de un método analítico basado en la exaltación de la emisión de fluorescencia de CZL por formación de un complejo fluorescente. Dicho método, es capaz de detectar pequeñas concentraciones de analito a partir de medidas espectrofluorimétricas directas.

Los parámetros analíticos obtenidos resultaron satisfactorios en vista de emplear este método con el objetivo de detectar niveles de concentración cercanos a los límites permitidos por ciertas legislaciones de países desarrollados. Con el procedimiento analítico desarrollado se pudo obtener un límite de detección incluso inferior al de otros métodos informados en bibliografía. Y se consiguió una buena sensibilidad analítica y una extensión del intervalo lineal de concentraciones de aplicabilidad de la técnica, respecto al método espectrofluorimétrico sin la presencia del sensor.

La metodología empleada es más simple, rápida y económica; y además, no requiere de etapas previas de pre-concentración del analito. Presenta también el beneficio de no requerir volúmenes importantes de solventes orgánicos.

Se pudieron determinar concentraciones del orden μ M del núcleo carbazol en muestras de agua corriente extraídas de las instalaciones del Dpto. de Química Orgánica (UNC), sin interferencia de la matriz. Por otra parte, el método es exacto para la determinación de CZL en muestras de agua de tanque domiciliario y del río Tercero, cuando se utiliza la pendiente de calibración teniendo en cuenta el porcentaje de matriz a analizar.

Los parámetros de validación obtenidos demostraron la eficiencia del sensor HP β -CD para la detección de CZL. El método quedó validado de acuerdo a los exámenes realizados de exactitud, precisión, selectividad y robustez.

5.6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Cámara, P. Fernández, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, M. Vidal. *“Toma y tratamiento de muestras”*. 1^{ra} Ed. Síntesis S.A., Madrid (2004).
- [2] R.R. Riddle, P.R. Gibbs, R.C. Willson, M.J. Benedik. *“Recombinant carbazol-degrading strains for enhanced petroleum processing”*. J. Ind. Microbiol. Biotech., 30 (2003) 6 – 12.
- [3] N. Ouchiyama, Y. Zhang, T. Omori, T. Kodama. *“Biodegradation of Carbazol by Pseudomonas spp. CA06 and CA10”*. Biosci. Biotech. Biochem., 57 (1993) 455 – 460.
- [4] E. Kriek. *“Carcinogenesis by aromatic amines”*. Biochim. Biophys. Acta, 355 (1974) 177 – 203.
- [5] M. J. Anand, K. B. Mithilesh. *“Mutagenic profiles of carbazole in the male germ cells of Swiss albino mice”*. Mutat. Res., 500 (2002) 97 – 101.
- [6] *“Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo”*. 3^{ra} Edición, Chantal Dufresne BA, Madrid (1998).
- [7] M. T. Fernández. *“Aproximación a la problemática de la Creosota”*. INSHT 34 (2004) 14 – 21.
- [8] S. E. Ragone. *“U.S. Geological Survey Program on Toxic Waste-Ground-Water Contamination: Proceedings of the second technical meeting”*. Cape Cod, Massachusetts, October (1985) 21-25.
- [9] A. Eisentraeger, C. Brinkmann, H. Hollert, A. Sagner, A. Tiehm, and J. Neuwoehner. *“Heterocyclic Compounds: Toxic Effects Using Algae, Daphnids, and the Salmonella/Microsome Test Taking Methodical Quantitative Aspects Into Account”*. Environ. Toxicol. Chem., 27 (2008) 1590 – 1596.
- [10] S. V. Hote, S. P. Bhoyar. *“Heterocyclic Compound – A Review”*. J. Appl. Chem., 2278-5736 (2014) 43 – 46.
- [11] N. T. Dang. *“Estado del Medio Ambiente y Medidas Normativas. Capítulo 2: Agua Dulce”*. PNUMA, Still Picture, Viet Nam, (2002) 150 – 177.
- [12] *“Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food”*. The EFSA Journal, 724 (2008) 1 – 114.
- [13] *“Codex Alimentarius. Aguas”*. 1^{ra} Ed. OMS/FAO, (2007).

- [14] J. J. Santana Rodríguez, R. Halko, J. R. Betancort Rodríguez, J. J. Aaron. “*Environmental analysis base don luminescence in organized supramolecular systems*”. Anal. Bioanal. Chem., 385 (2006) 525 – 545.
- [15] P. Plaza Bolaños, A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal. “*Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends*”. J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 6303 – 6326.
- [16] R. H. Stadler, D. R. Lineback. “*Process-induced food toxicants*”. 1^{ra} Ed., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, (2009).
- [17] S. A. Bortolato, J. A. Arancibia, G. M. Escandar. “*A novel application of nylon membranes to the luminescent determination of benzo[a]pyrene at ultra trace levels in water samples*”. Anal. Chim. Acta, 613 (2008) 218 – 227.
- [18] “*Water quality – Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) – Part 1: Determination of six PAH by high-performance thin-layer chromatography with fluorescence detection after liquid-liquid extraction*”. First Edition, International Standard ISO 7981-1, (2005).
- [19] J. J. Langenfeld, S. B. Hawthorne, and D. J. Miller. “*Quantitative Analysis of Fuel-Related Hydrocarbons in Surface Water and Wasterwater Samples by Solid-Phase Microextraction*”. Anal. Chem., 68 (1996) 144 – 155.
- [20] “*Classifications and Water Quality Standads Applicable to the Groundwaters of North Carolina*”. North Carolina Administrative Code. Department of Environment and Natural Resources Division of Water Quality. Last Amended on January 1, (2010).
- [21] “*Review of Water Quality Assessments for the North Dakota National Guard Camp Grafton (South Unit), Eddy County, North Dakota: 1986 through 2006*”. By W.M. Schuh. North Dakota State Water Commission in cooperation with the North Dakota Army National Guard, (2006).
- [22] A. R. C. Hill, S. L. Reynolds. “*Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds*”. Analyst, 124 (1999) 953 – 958.
- [23] P. Meier, R. Zünd. “*Statical methods in analytical chemistry*”. 2^{da} Ed. Vol. 153 en: J. Winefordner, Series Ed. Chemical Analysis: A series of monographs on analytical chemistry and its applications. John Willey & Sons Inc. USA, (2000).
- [24] G. Ramis Ramos, M. C. García Álvarez-Coque. “*Quimiometría*”. 1^{ra} Ed. Editorial Síntesis. Madrid, (2001).
-

- [25] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers Verdeke. *“Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A”*. 1^{ra} Ed. Elsevier Science B. V. Amsterdam, (1997).
- [26] L. A. Currie. *“Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities”*. Pure Appl. Chem., 70 (1995) 1699 – 1723.
- [27] K. Danzer. *“Analytical Chemistry. Theoretical and Metrological Fundamentals”*. Springer-Verlag Berlín Heidelberg, (2007).
- [28] K. Danzer, L. A. Currie. *“Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration”*. Pure Appl. Chem., 70 (1998) 993 – 1014.
- [29] M. Balzarini, J. Di Rienzo, M. Tablada, L. Gonzales, C. Bruno, M. Córdoba, W. Robledo, F. Casanoves. *“Introducción a la bioestadística. Aplicaciones con InfoStat en Agronomía”*. 1^{ra} Ed. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina, (2011).
- [30] J. N. Miller, J. C. Miller. *“Estadística y quimiometría para química analítica”*. 4ta Ed. Pearson Prentice Hall. Madrid, (2002).
- [31] A. O. Olivieri, H. C. Goicoechea. *“Calibración en Química Analítica”*. Universidad Nacional del Litoral, (2007).
- [32] L. A. Currie. *“Detection: International update, and some emerging di-lemmas involving calibration, the blank, and multiple detection decisions”*. Chemom. Intell. Lab., 37 (1997) 151 – 181.
- [33] P. Wilrich. *“Capability of Detection”*. ISO/TC69/SC6, ISO Standard. 1 (1977) 11843.
- [34] D. T. Burns, K. Danzer, A. Townshed. *“Use of the terms recovery and apparent recovery in analytical procedures”*. Pure Appl. Chem., 74 (2002) 2201 – 2205.
- [35] J. Huertas Pérez, A. García Campaña, L. Gámiz Gracia, A. Gonzáles Casado, M. O. Iruela. *“Sensitive determination of carbaryl in vegetal food and natural waters by flow-injection analysis bases on the luminol chemiluminescence reaction”*. Anal. Chim. Acta., 524 (2004) 161 – 166.
- [36] M. G. Balzarini, L. Gonzales, M. Tablada, F. Casanoves, J. A. Di Rienzo, C. W. Robledo. *“InfoStat Software Estadístico. Manual del Usuario”*. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina, (2008).

- [37] T. V. Morales, S. M. Esponda, J. J. Santana Rodríguez, S. E. Aaron, J. J. Aaron. *“Luminescence methods for study and determination of pollutants in the environment”*. Maced. J. Chem. Chem. Eng., 29 (2010) 1 – 42.
- [38] M. J. Allen, S. C. Edberg. *“La importancia para la salud pública de los indicadores bacterianos que se encuentran en el agua potable”*. OPS/CEPIS/REULAB, (1996).
- [39] P. J. Wampler. *“Rivers and Streams – Water and Sediment in Motion”*. Nat. Edu. Know., 3 (2012) 1 – 6.
- [40] A. E. Cooper, E. A. Cooper, and J. A. Heward. *“On the self-purification of rivers and streams”*. Biochem. J., 13 (1919) 345 – 367.
- [41] D. F. Bender, E. Sawicki, and R. M. Wilson, Jr. *“Fluorescent Detection and Spectrophotofluorometric Characterization and Estimation of Carbazoles and Polynuclear Carbazoles Separated by Thin-Layer Chromatography”*. Anal. Chem., 36 (1964) 1011 – 1017.
- [42] M. Tachibana and M. Furusawa. *“Simultaneous Determination of Trace Amounts of Carbazole and Anthracene in Dibenzofuran by Synchronous Fluorescence Spectrometry after Zone-melting Separation”*. Bull. Chem. Soc. Jpn., 56 (1983) 2254 – 2257.
- [43] R. Zhu, P. Wang, X. Wang, X. Su. *“ β -Cyclodextrin modified filter based solid phase extraction-room temperature phosphorimetry for preconcentration and determination of nitrogen heterocyclic compounds in water samples”*. Talanta, 72 (2007) 1630 – 1636.
- [44] R. Heydari. *“Simultaneous Determination of Carbazoles in Water Samples by Cloud Point Extraction Coupled to HPLC”*. J. Appl. Chem Res., 2 (2013) 21 – 31.

CAPÍTULO 6

CAPITULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

6.1. CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo de tesis, abordó el desarrollo de un método analítico supramolecular en base al estudio espectroscópico de las interacciones entre sustratos orgánicos heterocíclicos (carbazol y quinolina, representativos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados, HAPN) y dos clases de receptores macrocíclicos: ciclodextrinas (CDs) y *p*-sulfonatocalix[n]arenos (CA[n]S).

Las principales conclusiones obtenidas se detallan a continuación:

- Tanto el núcleo carbazólico como el quinolínico interactúan con la cavidad de CDs y CA[n]S induciendo modificaciones en los espectros de absorción UV-Visible.
- Estas interacciones con CDs condujeron a una exaltación de la fluorescencia del carbazol; mientras que produjeron quenching en la fluorescencia de la quinolina.
- Por otra parte, las interacciones experimentadas con derivados CA[n]S provocaron un fuerte quenching de fluorescencia en ambos núcleos heterocíclicos.
- Además, estas interacciones no covalentes son responsables de la formación de complejos sustrato-receptor con estequiometría 1:1.
- La naturaleza de las interacciones en estos sistemas supramoleculares son principalmente electrostáticas para los complejos con CA[n]S. Mientras que, con CDs las fuerzas que conducen a la formación de los complejos son de naturaleza más débil como efectos hidrofóbicos y enlace puente hidrógeno.
- EL estudio espectroscópico de sistemas mixtos CZL/HPβ-CD/CA[n]S permitió establecer que los equilibrios de formación de los complejos CZL-HPβ-CD y

CZL-CA[6]S coexisten independientemente. En tanto que, además de la formación de los complejos binarios CZL-HP β -CD y CZL-CA[8]S, se forma un complejo ternario HP β -CD-CZL-CA[8]S mediante un mecanismo en etapas.

- Con el empleo del receptor HP β -CD, como sensor químico para carbazol, se desarrolló y validó un método analítico basado en la exaltación de la fluorescencia del analito. Se pudieron determinar concentraciones del orden de ng/mL de carbazol en muestras de agua.
- El método de intensificación de la fluorescencia de carbazol, en presencia de HP β -CD, presenta ventajas con respecto a otras metodologías analíticas tales como: rápido; económico; simple, pues no se necesitan reacciones de derivatización; no requiere de volúmenes importantes de solventes orgánicos; robusto frente a variaciones de la concentración de iones y posibles interferencias con quinolina.

APÉNDICES

Apéndice A.

Teoría de Fluorescencia

A.1 Conceptos básicos de Fluorescencia.

La luminiscencia es la emisión de luz de una dada sustancia, y ocurre a partir de los estados electrónicos excitados. La excitación de los electrones puede ocurrir mediante absorción de luz, y en ese caso se define como *fotoluminiscencia*. La fotoluminiscencia se divide en dos categorías: la *fluorescencia* y la *fosforescencia*, dependiendo de la naturaleza del estado excitado.¹ Una manera conveniente de representar estos fenómenos es mediante un diagrama de Perrin-Jablonski, como muestra la figura A-1. En el gráfico, los estados electrónicos son denotados como S_0 el estado basal o fundamental (de menor energía), S_1 y T_1 corresponden al primer estado excitado singlete y triplete, respectivamente.² La fluorescencia tiene lugar cuando una molécula en un nivel de energía electrónico excitado retorna al estado electrónico fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$) sin cambio de la multiplicidad de espín, por la emisión de un fotón. Dado que las moléculas se relajan hacia el estado basal muy rápidamente, la fluorescencia se observa cuando es un mecanismo de relajación más eficiente que la combinación de las desactivaciones por *conversión interna* (CI), *externa* (CE) y *relajación vibracional* (rv), ver figura A-1a.

Se entiende por conversión interna a la transición no radiativa entre dos estados electrónicos de la misma multiplicidad de espín. En solución, este proceso es seguido por una relajación vibracional (rv) hacia el nivel vibracional más bajo del estado electrónico final.² El exceso de energía vibracional puede ser transferida al disolvente por colisiones moleculares. El término relajación vibracional define a la desactivación sin radiación que ocurre cuando una molécula en un nivel vibracional de mayor energía de un estado excitado se mueve a un nivel vibracional de menor energía del mismo estado electrónico. Por combinación de estos tipos de procesos de desactivación, la molécula puede retornar al estado fundamental sin la emisión de un fotón.³

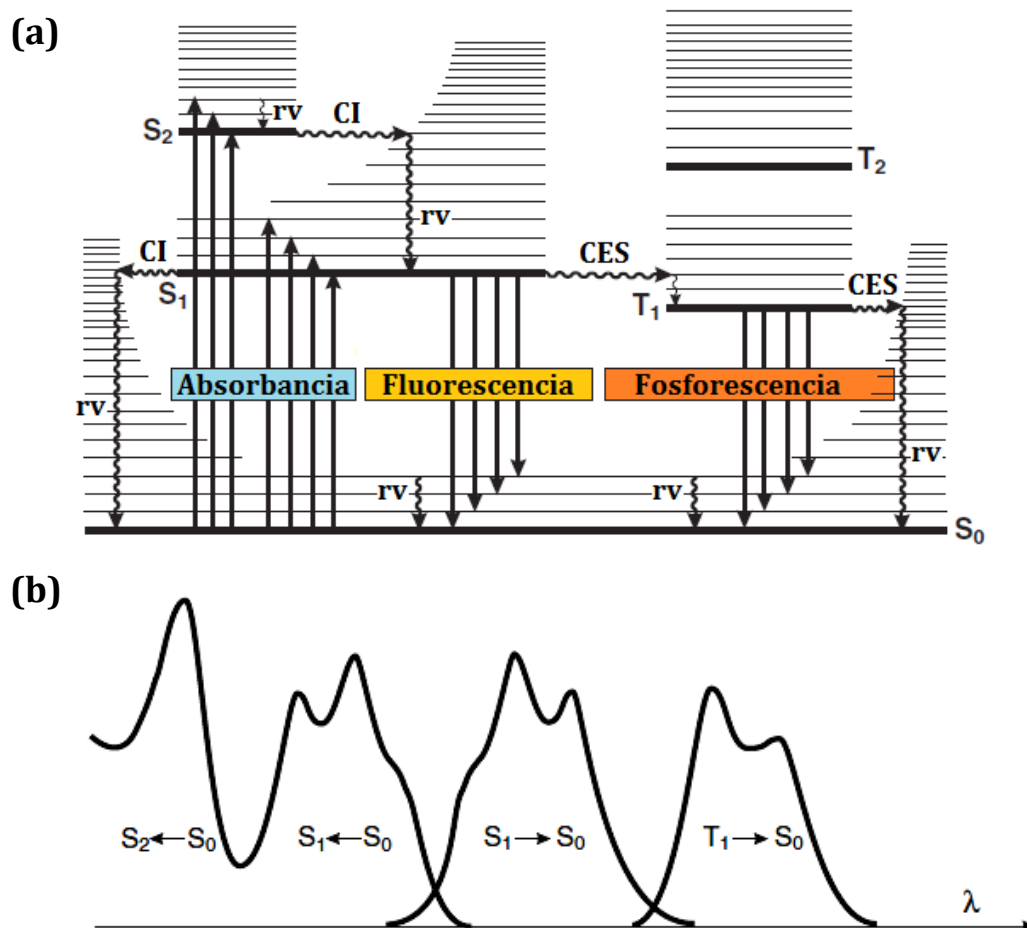


Figura A-1. (a) Diagrama de Perrin-Jablonski. Se representa la fluorescencia desde el primer estado singlete excitado, S_1 , alcanzado por la absorción de luz y la fosforescencia por emisión desde el estado triplete, T_1 , hasta el estado fundamental S_0 . rv = relajación vibracional, CI = conversión interna, CE = conversión externa y CES = cruce entre sistemas. (b) Posiciones relativas de los espectros de absorción, fluorescencia y fosforescencia.

El cruce entre sistemas (CES) es una transición no radiactiva entre dos niveles de vibración isoenergéticos de dos estados electrónicos de diferentes multiplicidades de espín. Por ejemplo, una molécula en el estado de menor energía vibracional del nivel S_1 puede pasar al nivel vibracional isoelectrónico del estado triplete T_1 ($S_1 \rightarrow T_1$) luego la relajación vibracional lo lleva al nivel más bajo de T_1 . Por otra parte, la fosforescencia se observa cuando la relajación ocurre por la emisión de un fotón desde un estado electrónico triplete (T_n) al estado basal ($T_n \rightarrow S_0$) por lo que conlleva un cambio en la multiplicidad de espín.

En la figura A-1b se muestran las posiciones relativas de los *espectros* de absorción, fluorescencia y fosforescencia. Luego de la excitación a niveles electrónicos y vibracionales excitados, el exceso de energía es rápidamente disipado dejando al *fluoróforo* en el nivel vibracional más bajo, ν_0 , de S_1 . Por esto, excepto algunas excepciones, la fluorescencia tiene lugar desde el nivel ν_0 y, en consecuencia, sus características no dependen de la longitud de onda de excitación (λ_{exc}).¹ Y es debido a esa relajación vibracional, que lleva a la especie al nivel ν_0 , que se observa el espectro de fluorescencia a longitudes de onda mayores (menor energía) que el espectro de absorción. Acorde a esto, la longitud de onda de emisión de fluorescencia, λ_{em} , debería ser siempre mayor que la longitud de onda de absorción. Sin embargo, en la mayoría de los casos el espectro de absorción se superpone ligeramente con el de fluorescencia a temperatura ambiente. La diferencia entre el máximo de la banda de absorción, correspondiente a la transición $S_0 \rightarrow S_1$, y el máximo de fluorescencia es el denominado *corrimiento de Stokes* ($\Delta\bar{\nu}$ expresado en número de onda, cm^{-1}).² En general, las diferencias entre los niveles vibracionales de los estados fundamental y excitado son similares, por lo que el espectro de fluorescencia se suele parecer a la imagen especular de la banda de absorción (figura A-1b).

Las reacciones de transferencia electrónica son entre otros, uno de los procesos fotoquímicos elementales más importantes en química. El término transferencia de carga hace referencia a una excitación directa a un estado en el que un electrón se transfiere desde un grupo donador (D) a uno aceptor (A). Un caso particular son las denominadas reacciones de transferencia intramolecular de carga que se producen en moléculas con grupos donador-aceptor π unidos mediante un enlace simple (D-A). Cuando estas moléculas se excitan de forma radiactiva, se puede llegar a un estado localmente excitado (LE) de tipo $\pi-\pi^*$, y/o a un estado de transferencia intramolecular de carga (ICT, *Intramolecular Charge Transfer*) donde el grupo π -donor cede un electrón al grupo π -aceptor produciéndose un desacoplamiento de las dos subunidades y una separación de cargas, como se muestra en el esquema de la figura A-2a. Posteriormente el sistema puede emitir radiactivamente desde cualquiera de estos dos estados, traduciéndose en el espectro la

posible existencia de dos bandas de fluorescencia por lo que se habla de fluorescencia dual figura A-2b.

(a)



(b)

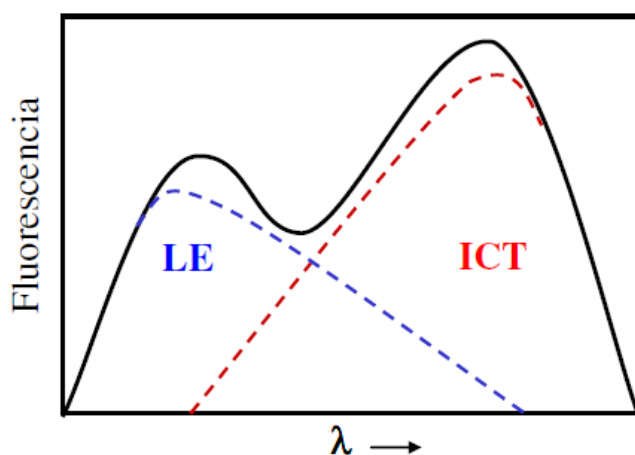


Figura A-2. (a) Representación esquemática de la formación de una especie en estado localmente excitado (LE) por absorción de luz y su posterior pasaje a un estado de transferencia intramolecular de carga (ICT). (b) Espectro de fluorescencia dual formado por la emisión desde los estados LE e ICT.

La figura A-3 resume los procesos que pueden darse cuando una molécula excitada (M^*) se relaja hacia el estado fundamental. La especie M^* posee una energía mayor a la que tendría en estado fundamental. Este exceso de energía es liberado cuando la especie retorna hacia el estado basal, y lo puede hacer de diferentes maneras, por ejemplo, por emisión de fluorescencia o fosforescencia luego de un cruce entre sistemas, puede también relajarse por transferencia de carga intramolecular o por cambios conformacionales. Puede también competir con los procesos de relajación mencionados la

interacción de M^* con otras moléculas: transferencia electrónica, transferencia de protones, transferencia de energía, o formación de *excímeros* o *exciplejos*.²

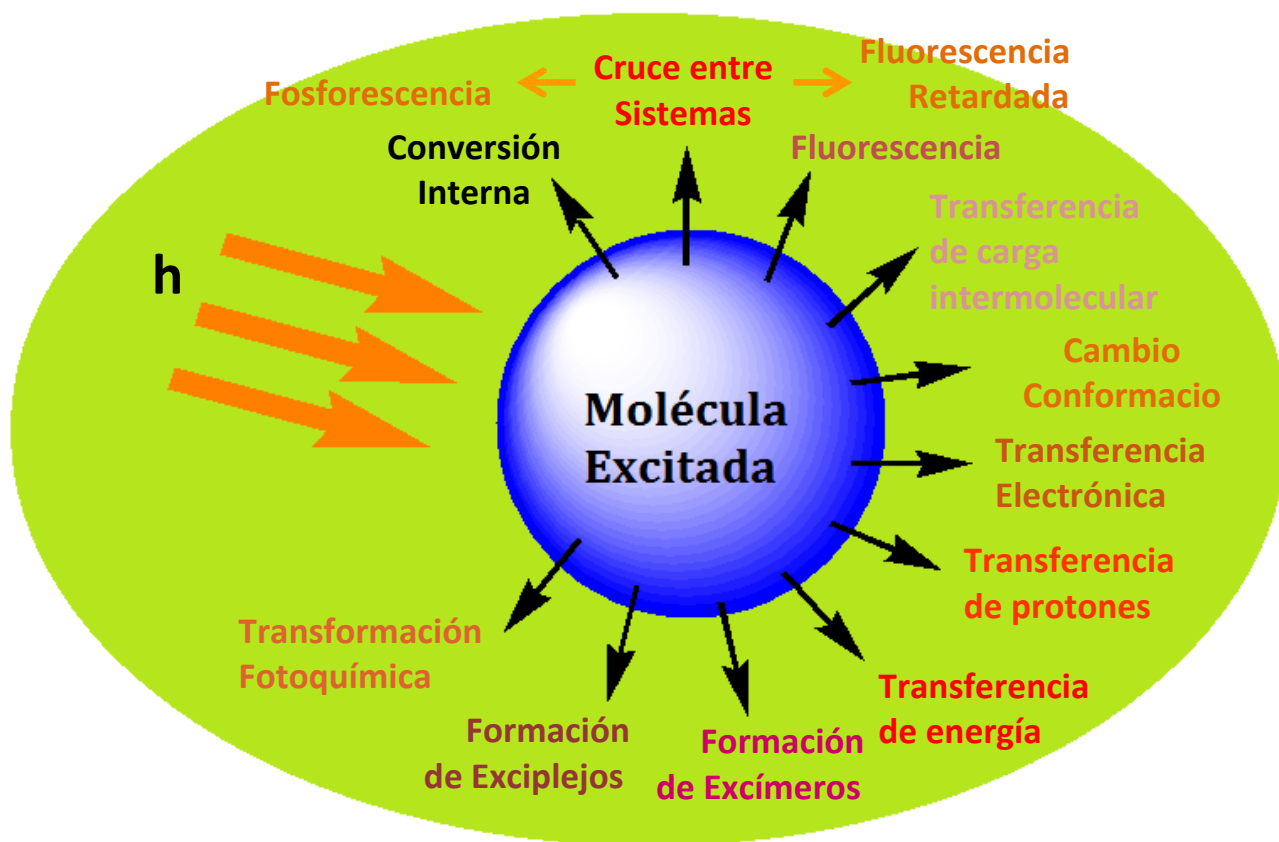


Figura A-3. Posibles procesos que puede llevar a cabo una molécula excitada para liberar el exceso de energía.

Una expresión cuantitativa de la eficiencia de la fluorescencia es el rendimiento cuántico de fluorescencia, ϕ_F , corresponde al número de fotones emitidos relativo al número de fotones absorbidos y representa la fracción de moléculas que retornan al estado fundamental mediante fluorescencia. La ecuación A.01 es una expresión para ϕ_F

$$\phi_F = \frac{k_F^e}{k_F^e + \sum k_l - k_F^t} \quad (\text{A.01})$$

Donde k_F es la constante de velocidad para la desactivación con emisión de fluorescencia, $\sum k_t$ es la suma de las constantes de velocidad de todos los procesos (sin incluir la fluorescencia) que desactivan el estado excitado, y τ es el tiempo de vida del estado excitado.

El tiempo de vida τ es definido por el tiempo promedio que la molécula pasa en estado excitado previo a retornar al estado basal. Generalmente, los tiempos de vida de fluorescencia se aproximan a los 10 ns. Desde la ecuación A.01 se desprende la ecuación A.02 para τ .

$$\tau = \frac{1}{k_F + \sum k_t} \quad (\text{A.02})$$

Los valores de φ_F oscilan entre 0, cuando la fluorescencia no ocurre y 1, cuando cada molécula en el estado excitado se desactiva únicamente por el proceso radiante de fluorescencia.

Tanto el rendimiento cuántico como el tiempo de vida dependen crucialmente del término $\sum k_t$, el cual es muy sensible a las condiciones experimentales.⁴

A.2 Efectos de la estructura molecular sobre la fluorescencia

La mayoría de los fluoróforos nativos son compuestos aromáticos. También algunos compuestos alifáticos con gran número de insaturaciones pueden fluorescer. En general, un incremento en la extensión del sistema electrónico π (mayor conjugación) producirá un corrimiento batocrómico en los espectros de absorción y de fluorescencia y un aumento de φ_F .²

Las transiciones más bajas en hidrocarburos aromáticos son del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, las cuales se caracterizan por altos coeficientes de absortividad molar, tiempos de vida moderadamente cortos (unos pocos nanosegundos) y rendimientos cuánticos relativamente cortos. Cuando un heteroátomo está involucrado en el sistema π , una

transición del tipo $n \rightarrow \pi^*$ es responsable del proceso. Estas transiciones se caracterizan por tener tiempos de vida al menos 100 veces mayores (alrededor de 10^{-6} s) que las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$. Este proceso es muy lento para competir efectivamente con las desactivaciones no radiactivas y, en consecuencia los ϕ_F son muy bajos. Este es el caso de la mayoría de los compuestos azo, algunos compuestos carbonílicos y heterocíclicos nitrogenados.²

Por otra parte, la presencia de átomos pesados (como I, Br) en moléculas aromáticas, resultará en una inhibición de la fluorescencia (efecto del átomo pesado interno) debido a que incrementa la probabilidad de que ocurra un cruce entre sistemas (ver figura A-1).

A.3. Efectos del medio sobre la fluorescencia

A.3.1. Efecto de la temperatura

En general, el incremento de la temperatura lleva a una disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia y del tiempo de vida debido a que los procesos no radiantes relacionados con la agitación térmica (colisiones con las moléculas de solvente, vibraciones y rotaciones intramoleculares, etc.) son más eficientes a mayores temperaturas.²

A.3.2. Efecto del solvente

En solventes polares el efecto sobre la fluorescencia resulta ser una atenuación de la intensidad de emisión debido a la estabilización del estado excitado por las moléculas del disolvente. Típicamente el fluoróforo tiene un momento dipolar mayor en el estado excitado (μ_E) que en el estado basal (μ_B). Luego de la excitación los dipolos del solvente se reorientan alrededor de μ_E produciendo una estabilización del estado excitado. El resultado de este efecto son emisiones a menores energías (a mayores longitudes de onda). A medida que se incrementa la polaridad del solvente este efecto se incrementa. En general, los fluoróforos que son de naturaleza polar son más sensibles a este efecto. Mientras que moléculas no polares, como hidrocarburos aromáticos no sustituidos son menos sensibles a los disolventes polares.

Debido a que los tiempos de vida de fluorescencia (1 – 10 ns) son usualmente mayores que los tiempos requeridos para la relajación de las moléculas de solvente (10 – 100 ps), los espectros de emisión de fluoróforos se obtienen cuando el solvente se encuentra ya relajado. En cambio, la absorción de luz es un proceso extremadamente rápido (10^{-15} s) para ambas especies, fluoróforo y disolvente. Por esto, el espectro de absorción es menos sensible a la polaridad del solvente.

A.3.3. Efecto de la concentración y de filtro interno

La intensidad de la fluorescencia (F) es proporcional a la cantidad de radiación que es absorbida ($I_0 - I$) de la fuente de radiación, y al valor de ϕ_F según la ecuación A.03.

$$F = B\phi_F(I_0 - I) \quad (\text{A.03})$$

Donde B es una constante relacionada a varios parámetros instrumentales.³ A partir de la ley de Beer se plantea la ecuación A.04

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon b[S]} \quad (\text{A.04})$$

Donde [S] es la concentración del sustrato fluorescente. Resolviendo la ecuación A.04 para I , sustituyendo en la ecuación A.03 y simplificando se obtiene la expresión siguiente

$$F = B\phi_F I_0 (1 - 10^{-\epsilon b[S]}) \quad (\text{A.05})$$

La ecuación A.05 muestra que la fluorescencia es proporcional a la concentración cuando la absorbancia es baja. Las desviaciones de la linealidad incrementan con el aumento en la absorbancia. La ecuación A.05 puede simplificarse para absorbancias pequeñas ($2,3\epsilon b[S] \approx 0,05$) a la siguiente expresión²

$$F = 2,303B\phi_F I_0 \epsilon b[S] \quad (\text{A.06})$$

De acuerdo a la ecuación A.06 la intensidad de fluorescencia aumenta con el rendimiento cuántico, la potencia incidente de la fuente de excitación, la absorptividad molar y la concentración del fluoróforo.

En la tabla A-1 se especifican las desviaciones al comportamiento lineal de la fluorescencia para valores crecientes de absorbancia.²

Tabla A-1. Desviación de la linealidad en la relación entre F y $[S]$ para varias A .

<i>Absorbancia</i>	<i>Desviación (%)</i>
0,001	0,1
0,01	1,1
0,05	5,5
0,1	10,6
0,2	19,9

A.4. Efectos debido al arreglo geométrico en la disposición de la muestra.

La intensidad de fluorescencia y la distribución espectral de la misma es dependiente de la geometría de incidencia del haz sobre la cubeta que contiene la solución del fluoróforo. La geometría más común utilizada en las determinaciones de fluorescencia es la iluminación frontal sobre una de las caras de la celda y la observación de la emisión de luz en ángulo recto (figura A-4a).¹ Otras disposiciones geométricas ofrecen iluminación fuera del centro (figura A-4b) que permite disminuir la longitud de la trayectoria del haz, este efecto también puede lograrse mediante el uso de cubetas con menores pasos ópticos (figura A-4c). Estos métodos se utilizan generalmente para disminuir los efectos de filtro interno debido a grandes absorbancias o turbidez de la muestra.

La iluminación frontal comúnmente se realiza empleando cubetas triangulares (figura A-4d) o cuadradas orientadas de 30° a 60° en relación al haz de luz incidente. Con la iluminación frontal se prefiere disponer la celdaa 30°. Este procedimiento tiene dos ventajas. En primer lugar, menos luz reflejada entra en el monocromador de emisión. En segundo lugar, la luz incidente se distribuye en una gran área superficial, decayendo la sensibilidad de la medición a la colocación precisa de la cubeta dentro del portamuestra.

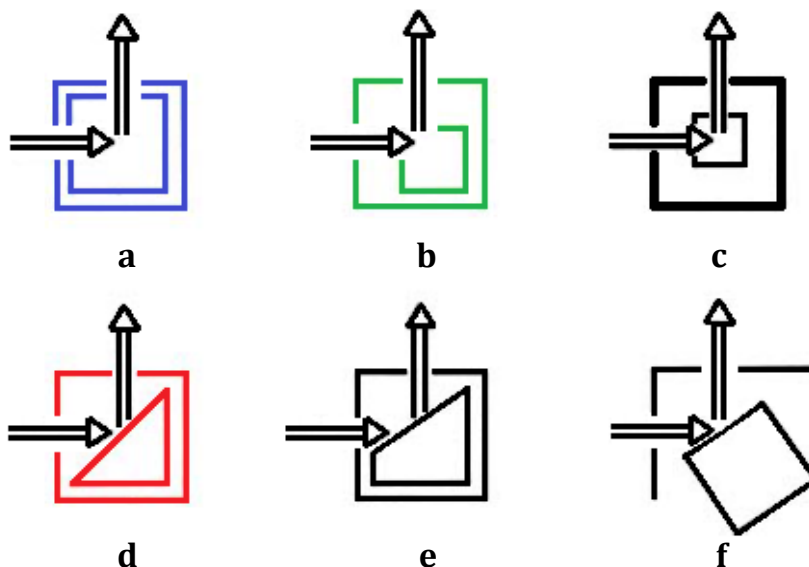


Figura A-4. Posibles procesos que puede llevar a cabo una molécula excitada para liberar el exceso de energía.

Por otra parte, para aumentar la sensibilidad se puede incrementar el volumen de muestra a la cual se controla la emisión. Esto puede lograrse rotando 90° las rendijas empleadas para enfocar el haz de luz sobre la muestra y para coleccionar la emisión (ver figura A-5). Esto produce que la señal incremente de 5 a 30 veces.³

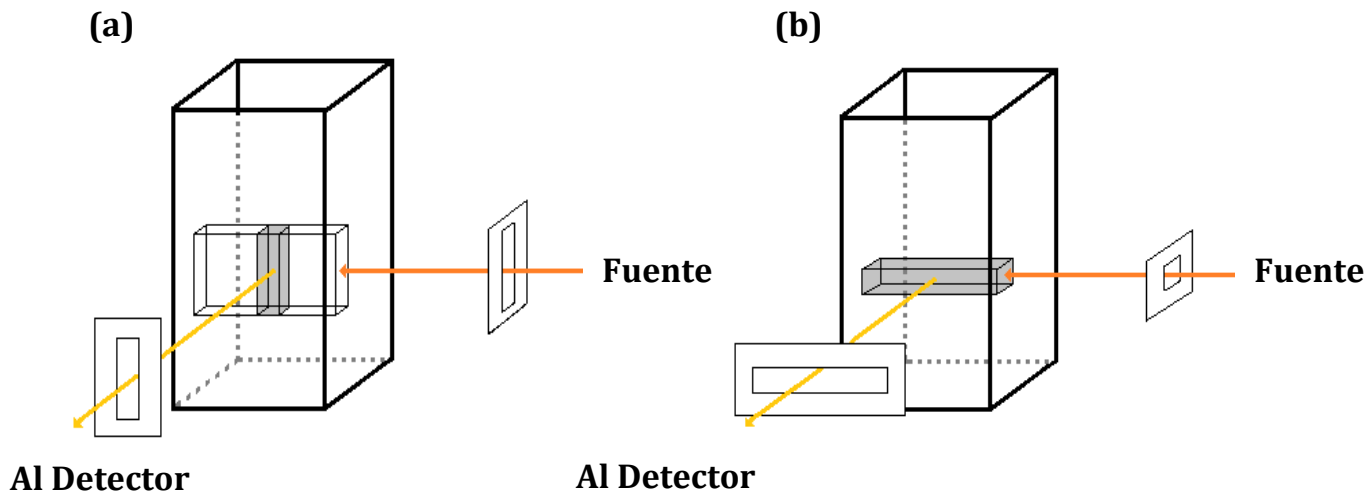


Figura A-5. Empleo de la orientación de la rendija para cambiar el volumen desde el que se mide la fluorescencia **(a)** Normal, **(b)** a 90°.

A.5. Inhibición de la Fluorescencia: Quenching.

El proceso de inhibición de la fluorescencia (*Quenching* de fluorescencia) hace referencia a los mecanismos que hacen disminuir la intensidad de la emisión fluorescente.¹ Esto incluye reacciones en el estado excitado, transferencia de energía, formación de complejos y procesos colisionales. Para que ocurra el fenómeno es necesaria la perturbación del estado excitado del fluoróforo con los niveles de energía de átomos o moléculas vecinas, lo que implica el contacto e interacción entre las especies con una determinada probabilidad de que ello ocurra.^{2,6}

Existen dos mecanismos de quenching: *estático* y *dinámico colisional*. El fenómeno de quenching estático implica la formación de un complejo no fluorescente entre el quencher y el fluoróforo en el estado basal. Mientras que en el quenching dinámico el quencher difunde hasta el fluoróforo, en el tiempo de vida en que éste se encuentra en estado excitado, y luego del contacto el fluoróforo retorna al estado excitado sin la emisión de luz.¹

El quenching de fluorescencia puede ser utilizado con numerosas aplicaciones. Por ejemplo, el estudio del quenching puede revelar la accesibilidad del quencher al fluoróforo y de esta manera hacer alguna inferencia con respecto a la localización de los fluoróforos en una proteína.¹

A.5.1 Quenching Dinámico

El quenching dinámico resulta del encuentro colisional entre el fluoróforo y la especie quencher durante el tiempo de vida del estado excitado.

El parámetro que en condiciones de estado estacionario responde a la adición de un quencher es el rendimiento cuántico de fluorescencia (φ),⁷ que es definido como la relación entre los valores de los fotones emitidos de fluorescencia con respecto a los fotones absorbidos. El rendimiento cuántico de fluorescencia en ausencia de quencher (φ_F) se puede definir mediante el mecanismo que se muestra a continuación en la figura

A-6. Donde S y S* es el fluoróforo en el estado basal y excitado, respectivamente; k_S , k_F y k_{nr} son las constantes de velocidad de absorción de un fotón, de emisión fluorescente y de decaimientos no radiativos de primer orden (interconversión interna y entrecruzamiento de sistemas). Los valores de n_S y n_{S^*} corresponden al número de fluoróforos en el estado basal y excitado.

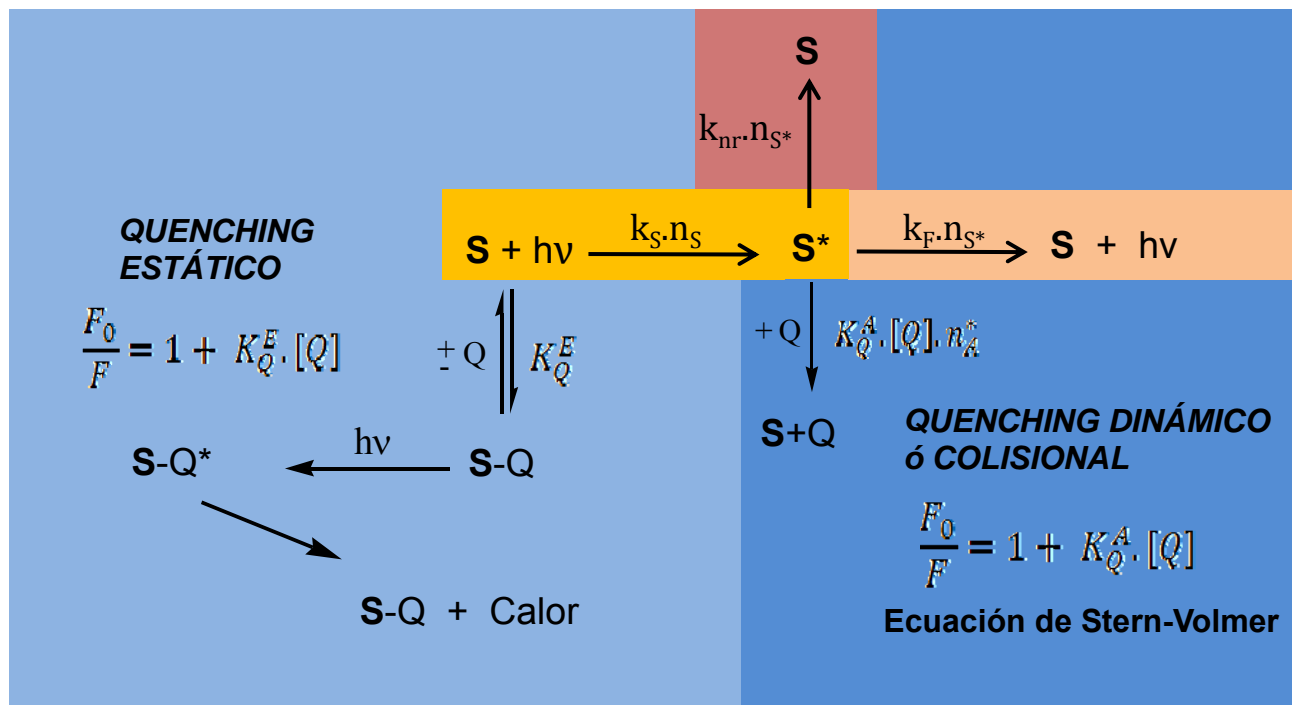


Figura A-6. Esquema de diferentes tipos de quenching de fluorescencia.

En condiciones de estado estacionario y en ausencia de amortiguadores se puede plantear la ecuación siguiente.

$$k_S n_S = k_F n_{S^*} + k_{nr} n_{S^*} \quad (A.07)$$

Resolviendo la ecuación A.08 para n_{S^*} se obtiene la ecuación que sigue

$$n_{S^*} = \frac{k_S n_S}{k_F + k_{nr}} \quad (\text{A.08})$$

De esta manera el rendimiento cuántico formalmente queda definido por la ecuación A.09, la cual es la relación entre los fotones emitidos con respecto a los absorbidos.

$$\phi_F = \frac{k_F n_{S^*}}{k_F n_S} \quad (\text{A.09})$$

Combinando las ecuaciones A.08 y A.09 se obtiene la expresión del rendimiento cuántico en ausencia de quencher (ecuación A.10).

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} \quad (\text{A.10})$$

Cuando se adiciona un quencher al sistema se suma otro mecanismo de decaimiento no radiactivo (ver figura A-5). En este caso, hay que tener en cuenta la constante de quenching bimolecular (k_Q). Esta constante es de segundo orden, pero el producto $k_Q \cdot [Q]$ es de pseudo primer orden. Adicionando este proceso a la ecuación 1.8A se obtiene la ecuación siguiente

$$k_S n_S = k_F n_{S^*} + k_{nr} n_{S^*} + k_Q [Q] n_{S^*} \quad (\text{A.11})$$

Resolviendo la ecuación A.11 para n_{S^*} se obtiene la ecuación A.12 que al combinarla con la ecuación A.08 se obtiene el rendimiento cuántico de fluorescencia en presencia de quencher (ϕ_F^Q) (ecuación A.13)

$$n_{S^*} = \frac{k_S n_S}{k_F + k_{nr} + k_Q [Q]} \quad (\text{1.13A})$$

$$\phi_F^Q = \frac{k_F}{k_F + k_{nr} + k_Q [Q]} \quad (\text{1.14A})$$

El quenching dinámico o colisional es descrito por la ecuación de Stern-Volmer (ecuación 1.15A)

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_Q \tau_0 [Q] = 1 + K_Q [Q] \quad (1.15A)$$

Dicha ecuación se obtiene de hacer el cociente de F_0 y F que son las fluorescencias en ausencia y en presencia de quencher, y teniendo en cuenta las expresiones para los rendimientos cuánticos correspondientes, ecuaciones 1.11A y 1.14A. En la ecuación 1.15A τ_0 es el tiempo de vida del fluoróforo en ausencia de quencher ($\tau_0 = 1/(k_F + k_{nr})$) y K_Q es el producto $k_Q \cdot \tau_0$ y es llamada constante de Quenching de Stern-Volmer.

A.5.2 Quenching Estático

El quenching estático resulta de la formación de un complejo sustrato-receptor no fluorescente entre el quencher y el fluoróforo en el estado basal. Si a este complejo se lo irradia con luz inmediatamente retorna al estado basal sin la emisión de un fotón, como se muestra en el esquema de la figura 2-5A.

La dependencia de la emisión de fluorescencia con la concentración del quencher deberá tener en cuenta a la constante de asociación del complejo (K_A^Q) formado.¹ Esta constante está dada por la ecuación 1.16A.

$$K_A^Q = \frac{[S-Q]}{[S][Q]} \quad (1.16A)$$

En donde $[S-Q]$ es la concentración del complejo entre el quencher Q y el fluoróforo S . La dependencia de (F_0/F) con la concentración de Q tiene una relación lineal, igual al observado en el quenching dinámico (ver figura 2-5A).

La expresión que explica el quenching estático se muestra en la figura 1.17A en donde la ahora la constante de quenching es la constante de asociación.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_A^Q [Q] \quad (1.17A)$$

A.5.3 Diferenciación y Combinación de Quenching Dinámico y Estático

Es importante destacar que sólo con la observación experimental de un comportamiento lineal no es posible distinguir entre el quenching dinámico y estático. En general se pueden diferenciar estos dos procesos observando el comportamiento con la temperatura, viscosidad y preferentemente con mediciones de tiempo de vida.

El quenching dinámico depende de la difusión de las especies. Por ello a altas temperaturas se observan grandes coeficientes de difusión e incrementos en los valores de las constantes de quenching bimoleculares de Stern-Volmer. Además se espera que la constante de quenching posea una dependencia inversamente proporcional con la viscosidad.

Por otra parte si el mecanismo de quenching que actúa fuera estático, la dependencia de la K_A^Q con el incremento de la temperatura provocaría un cambio en la estabilidad del complejo y afectaría al valor de la constante de quenching.

Cabe mencionar que también pueden ocurrir ambos mecanismos sobre un mismo fluróforo. En este caso los gráficos de Stern-Volmer mostrarán una desviación de la linealidad con una curvatura y el modelo que explica dicho comportamiento experimental se muestra en la ecuación 1.18A en la cual operando conduce a la ecuación 1.19A.²

$$\frac{F_0}{F} = \left(1 + K_A^Q [Q]\right) \left(1 + K_Q [Q]\right) \quad (1.18A)$$

$$F_0/F = 1 + (K_A^Q + K_Q)[Q] + K_A^Q K_Q [Q]^2 \quad (1.19A)$$

A.6. Bibliografía

- [1] J. R. Lakowicz. *“Principles of Fluorescence Spectroscopy”*. 3^{ra} Ed. Springer. Baltimore, Maryland, USA (2006).
- [2] B. Valeur, and M. N. Berberan-Santos. *“Molecular Fluorescence. Principles and Applications”*. 2^{da} Ed. Wiley-VCH. Weinheim, Germany (2012).
- [3] D. Harvey. *“Modern Analytical Chemistry”*. McGraw-Hill Higher Companies, Inc. USA (2000).
- [4] N. Turro. *“Modern Molecular Photochemistry”*. University Science Books, USA (1991).
- [5] A. Douhal. *“Cyclodextrin materials: Photochemistry, photophysics and photobiology”*. 1^{ra} Edición, Elsevier, Kidlington (2006).
- [6] P. Pringsheim. *“Fluorescence and Phosphorescence”*. Intersciences Publishers, Inc., New York (1949).
- [7] L. K. Fraiji, D. M. Hayes, T. C. Werner. *“Static and Dynamic Fluorescence Quenching Experiments for the: Physical Chemistry Laboratory”*. J. Chem. Educ., 69 (1992) 424.

Apéndice B

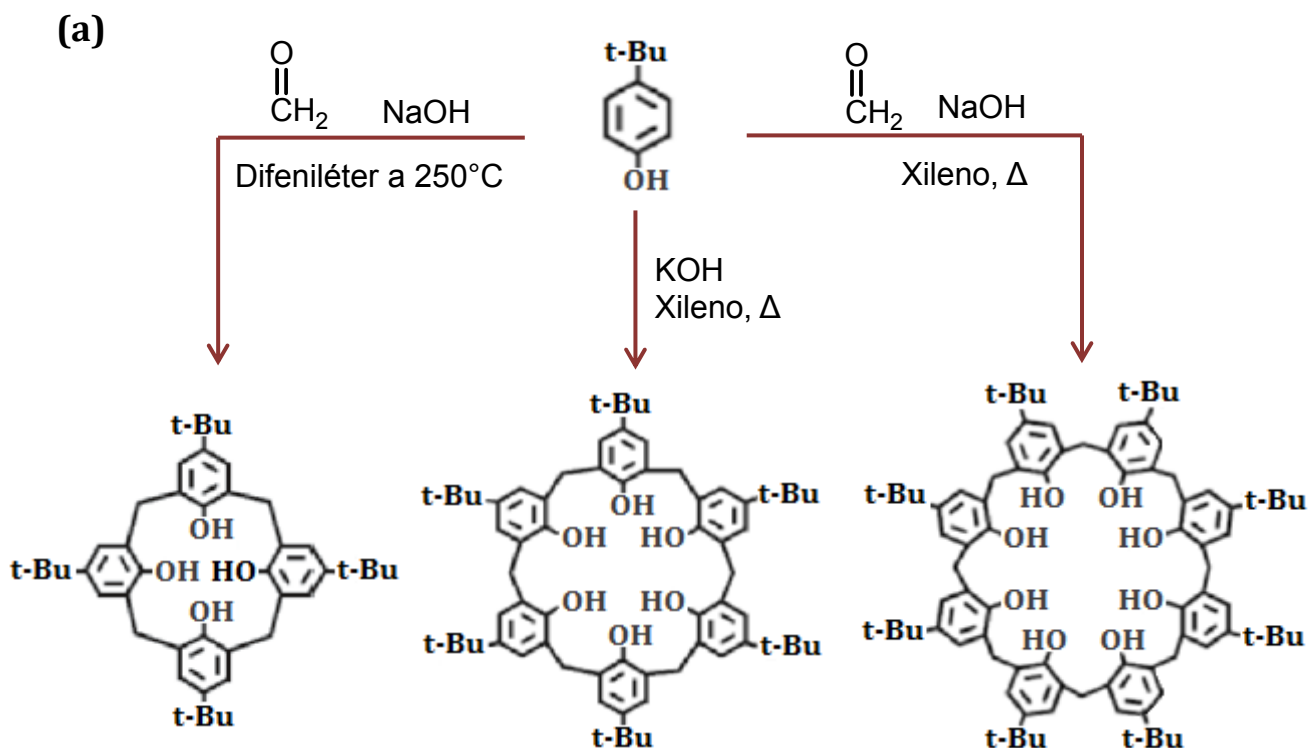
Síntesis de Calixarenos

B.1. Síntesis de Calixarenos

Como se mencionó en la sección 2.2.2, los calix[n]arenos se obtienen por reacción de condensación de un fenol para sustituido y formaldehído.¹ Hay dos vías sintéticas por las cuales pueden obtenerse: la síntesis en un paso catalizada por base o ácido, y la síntesis convergente en etapas (figura B-1a).² La primera estrategia permite la síntesis de macrociclos sustituidos simétricamente, y fue la que se empleó en este trabajo. Mientras que en la síntesis en etapas se obtienen calix[n]arenos constituidos por diferentes unidades fenólicas (figura B-1b).³

En la síntesis en un solo paso, la condensación entre fenoles *p*-sustituidos y formaldehído catalizada por base se inicia mediante la formación del fenóxido. Esta especie actúa como nucleófilo adicionándose al átomo de carbono carbonílico del formaldehído. Posteriormente, se forma el compuesto diarilmetil, presumiblemente mediante la reacción de Michael entre fenóxido y el intermediario metiluro de *o*-quinona.² Esta reacción catalizada por una base da una mezcla compleja de oligómeros lineales y cíclicos, y la reacción es difícil de controlar. Sin embargo, con derivados fenólicos con grupos R voluminosos la reacción puede ser direccionada a productos cíclicos con buenos rendimientos.^{1,4}

El derivado cíclico con cuatro unidades fenólicas (tetramero, *p*-*tert*-butilcalix[4]areno) resulta ser el producto de control termodinámico, mientras que el de ocho miembros (octámero, *p*-*tert*-butilcalix[8]areno) es el de control cinético.⁵ En condiciones de control cinético y en presencia de metales alcalinos con radios iónicos grandes que actúan como agentes template (K^+ , Rb^+ o Cs^+) se favorece la formación del hexámero cíclico *p*-*tert*-butilcalix[6]areno (figura B-1a). De esta forma, un catión metálico preorganiza a los oligómeros lineales a su alrededor para formar el producto cíclico (los grupos hidroxilos coordinan al catión metálico para luego ciclar fácilmente).¹ La formación de compuestos cíclicos, en reacciones donde la preferencia es la formación de cadenas lineales, a través de la utilización de una especie preorganizadora se conoce como *efecto template*.¹



(b)

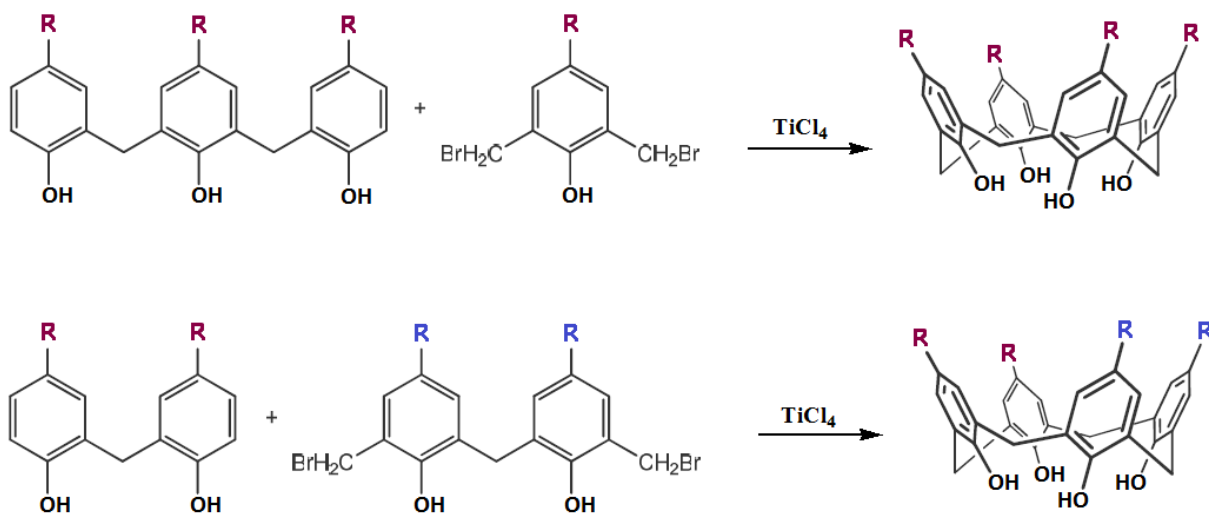


Figura B-1. Vías de síntesis para la obtención de calixarenos. (a) síntesis en un paso catalizada por base y (b) síntesis convergente en etapas.

B.2. Síntesis de derivados calixarenos sulfonados

B.2.1. Procedimiento

B.2.1.a) Síntesis y purificación de *p*-tert-butilcalix[4]areno

El esquema de síntesis llevado a cabo se detalla a continuación en la figura B-2. La primera etapa corresponde a la reacción de condensación catalizada por base del *p*-tert-butilfenol con formaldehído para obtener el *p*-tert-butilcalix[4]areno. En esta etapa se comienza con un proceso de polimerización exotérmica entre los reactantes en medio básico agitando y calentando la mezcla a 120 °C durante una hora. Luego el crudo de reacción (masa densa y viscosa) se redisolvió con 100 mL de xileno (p. eb. 144 °C), 50 mL de difenileter (p. eb. 257-259 °C) y 20 mL de tolueno (p. eb. 110,6 °C), y se trasvasó a un balón en un equipo de reflujo. Esta reacción, vía fenolato, transcurre a temperatura de reflujo del difenileter, eliminando agua al formar un azeótropo con tolueno (p.eb. agua/tolueno = 84,0 °C). Luego de 4 horas de reacción en reflujo, se dejó enfriar el crudo y se agregaron 150 mL de acetato de etilo se agitó alrededor de 1 hora y se filtró por succión. La masa del sólido obtenido se acidificó con 150 mL de ácido acético y luego se filtró el producto macrocíclico.

La obtención de *p*-tert-butilcalix[4]areno se comprobó mediante la realización de corridas cromatográficas en capa delgada (TLC) empleando como sistemas de solventes: hexano:acetato de etilo (1:1 v/v) y hexano:cloroformo (1:1 v/v y 2:1 v/v).

El *p*-tert-butilcalix[4]areno (sólido blanco) se secó al vacío. El rendimiento obtenido en esta reacción fue del 44 %. El macrociclo de 4 miembros resultante es el producto de control termodinámico, y se obtiene formando un complejo 1:1 con tolueno.⁵

B.2.1.b) Síntesis y purificación de *p*-Hcalix[4]areno

La reacción siguiente (etapa 2, figura B-2) es la eliminación del grupo tert-butilo, haciendo reaccionar el *p*-tert-butilcalix[4]areno (8,76 g; 13,5 mmol) con un exceso de tricloruro de aluminio anhidro (9,17 g; 68,8 mmol) en tolueno (100 mL) en presencia de fenol (0,95 g; 10,1 mmol) a temperatura ambiente. Al inicio, se coloca el calixareno de partida en la mezcla de solventes y se lo agita por 10 minutos. Luego se añade, sin frenar la agitación, el AlCl₃. La mezcla de reacción rápidamente se tornó de color rojo oscuro. Se

prosiguió la reacción agitando durante 3 horas. La reacción se siguió por TLC usando como sistema de solvente una mezcla de hexano:acetato de etilo (3:1 v/v).

Tras la finalización de la reacción se vertió la mezcla de reacción en un vaso de precipitado con hielo molido y se adicionó CH_2Cl_2 (100 mL). Se formó un precipitado blanco, y luego se trasvaso la mezcla a una ampolla de decantación, agregando un volumen de 150 mL de CH_2Cl_2 . Se formaron dos fases una acuosa (superior) y una orgánica (inferior). Se separó la fase orgánica y se la lavo con HCl 1 M (2 x 100 mL) y con H_2O (2 x 100 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro. Posteriormente, se filtró y se la dejó en congelador entre 0 – 5 °C por 24 horas. El producto macrocíclico se filtró por succión. Luego se cristalizó, a temperatura ambiente, adicionando CHCl_3 hasta disolver completamente el sólido, y luego CH_3OH gradualmente hasta que comenzó a precipitar. Se dejó reposar el recipiente en congelador por una hora entre 0 – 5 °C, se filtró y se secó al vacío. El rendimiento obtenido en esta etapa fue del 50 %. Este producto se caracterizó mediante TLC usando como solvente de corrida una mezcla de hexano:acetato de etilo (3:1 v).

El *p*-Hcalix[4]areno obtenido es un versátil intermediario para la síntesis de gran variedad de receptores macrocíclicos.⁵

B.2.1.c) Síntesis y purificación de *p*-alquiloicalix[4]areno

Posteriormente se llevó a cabo la alquilación de los grupos hidroxilos del borde inferior. Para ello se utilizó K_2CO_3 en acetona, calentando a reflujo en presencia de un halogenuro de alquilo. Esta reacción es lenta y dura entre 24 y 48 horas. Se obtuvieron los derivados propilado, hexilado y decilado ($n = 1, 4$ y 8 , ver figura B-2).

Por último, los derivados alquilados, fueron sulfonados tratándolos con H_2SO_4 concentrado, calentando entre 60 – 70°C y luego se utilizó BaCO_3 para eliminar el ácido remanente. El derivado calixareno se obtuvo y fue purificando variando el pH primero a 8 (con Na_2CO_3) y luego a 3 (con HNO_3). Después de neutralizar con NaOH a pH = 7, precipita el macrociclo en MeOH. Todas las reacciones se controlaron por cromatografía (TLC) y los productos caracterizados por IR.

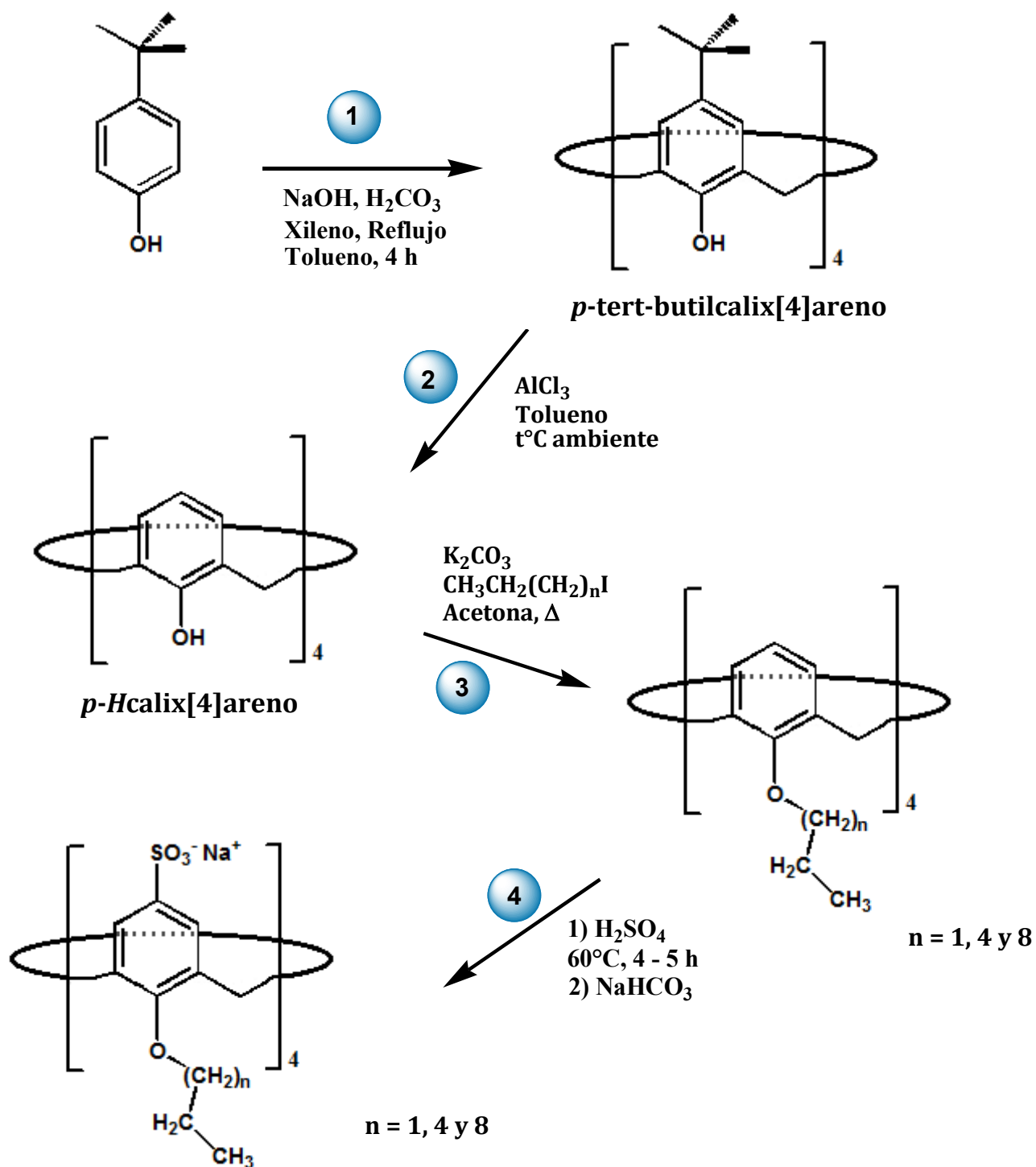


Figura B-2. Esquema de síntesis realizadas para a obtención de derivados *p*-sulfonatocalix[4]arenos alquilados.

En la tabla B-1 se muestran los porcentajes de rendimientos obtenidos en las diferentes etapas sintéticas en la obtención de los derivados *p*-sulfonatocalix[4]arenos. En la figura B-3 se muestra un espectro IR del derivado propilado del *p*-sulfonatocalix[4]areno.

Tabla B-1. Rendimientos obtenidos en cada una de las etapas del esquema sintético de la figura B-2.

<i>Etapas de Reacción</i>	<i>Caracterización</i>	<i>Rendimiento</i>		
		<i>Obtenido</i>	<i>Literatura</i>	
1) Síntesis de <i>p</i> -tert-butilcalix[4]areno	TLC y Espectroscopia IR	44%	55%	
2) Desalquilación	“	50%	80%	
3) Alquilación de -OH	“	CH ₃ CH ₂ CH ₂ I	38%	90-96%
		CH ₃ (CH ₂) ₅ Br	32%	
		CH ₃ (CH ₂) ₉ Br	-	
4) Sulfonación	“	Propilado	23%	-
		Hexilado	12%	
		Decilado	-	

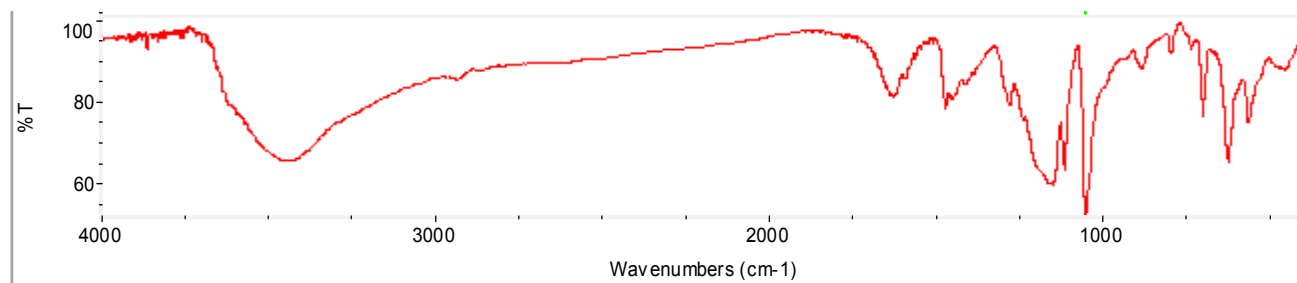


Figura B-3. Espectro Infrarrojo del derivado propilado de *p*-sulfonatocalix[4]arenos. La muestra se preparó en pastilla de KBr a 25,0 °C.

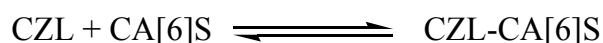
B.3. Bibliografía

- [1] J. W. Steed, D. R. Turner, K. J. Wallece. “*Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*”. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, England (**2007**).
- [2] C. D. Gustche. “*Calixarenes: An Introduction*”. 2da Ed. RCS Publishing, Cambridge, **2008**.
- [3] K. H. No, C. D. Gustche. “*Calixarenes. 8. Short, stepwise synthesis of p-phenilcalix[4]arene, p-phenil-p- tert-butylcalix[4]arene, and derived products*”. J. Or. Chem. 47 (**1982**) 2713 – 2719.
- [4] C. D. Gustche, R. Muthukrishnan. “*Calixarenes. 1. Analysis of the product mixtures produced by the base-catalyzed condensation of formaldehyde with para-substituted phenols*”. J. Org. Chem. 43 (**1978**) 4905 – 4906.
- [5] D. Parker. “*Macrocycle synthesis: A practical approach*”. 1^{ra} Ed. Oxford University Press, New York, **1996**.

Apéndice C

C.1. Desarrollo de ecuaciones del Sistema Ternario

Para obtener la expresión 4.10 de F_R para el sistema CZL/HP β -CD/CA[6]S considerando como condición inicial la existencia del complejo CZL-CA[6]S según el equilibrio siguiente



La fluorescencia del sistema en este estado viene dada por la ecuación siguiente

$$F_0 - F_{\text{CZL}} = \xi_{\text{CZL}}[\text{CZL}] \quad (4-1i)$$

Si se reemplaza [CZL] por su igualdad desde el balance de masa se tiene la ecuación 4-1ii

$$F_{\text{CZL}} = \xi_{\text{CZL}} ([\text{CZL}]_0 - [\text{CZLCA}[6]\text{S}]) \quad (4-1ii)$$

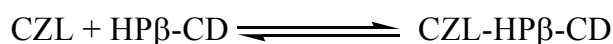
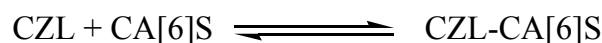
Reemplazando la concentración de CZL-CA[6]S en el equilibrio por la expresión 3.09 (sustituyendo S por CZL y R por CA[6]S) se obtiene la ecuación 4-iii

$$F_{\text{CZL}} = \xi_{\text{CZL}} \left([\text{CZL}]_0 - \frac{[\text{CZL}]_0 K_{A_2} [\text{CA}[6]\text{S}]}{1 + K_{A_2} [\text{CA}[6]\text{S}]} \right) \quad (4-1iii)$$

Sacando factor común $[\text{CZL}]_0$ se obtiene la siguiente expresión

$$F_{\text{CZL}} = \xi_{\text{CZL}} [\text{CZL}]_0 \left(1 - \frac{K_{A_2} [\text{CA}[6]\text{S}]}{1 + K_{A_2} [\text{CA}[6]\text{S}]} \right) \quad (4-1iv)$$

Por otro lado, cuando al sistema se le adiciona el segundo macrociclo HP β -CD, se establece el equilibrio de formación del complejo CZL-HP β -CD en simultáneo con el equilibrio anterior de formación de CZL-CA[6]S.



Entonces la fluorescencia en este estado viene dada por la ecuación siguiente

$$F = F_{\text{CZLCA}+\text{CD}} = \xi_{\text{CZL}}[\text{CZL}] + \xi_{\text{CZLCD}}[\text{CZLHP}\beta\text{CD}] \quad (4-1v)$$

Reemplazando en la ecuación 4-v las expresiones de concentración de las especies CZL y CZL-HP β -CD en el equilibrio (ecuaciones 4.01 y 4.02, respectivamente), se obtiene la ecuación 4-vi.

$$F_{\text{CZLCA}+\text{CD}} = \frac{\xi_{\text{CZL}}[\text{CZL}]_0}{1 + K_{A_1}[\text{HP}\beta\text{CD}] + K_{A_2}[\text{CA}[n]\text{S}]} + \frac{\xi_{\text{CZLCD}}[\text{CZL}]_0 K_{A_1}[\text{HP}\beta\text{CD}]}{1 + K_{A_1}[\text{HP}\beta\text{CD}] + K_{A_2}[\text{CA}[n]\text{S}]} \quad (4-1vi)$$

Sacando factor común el primer término se obtiene la ecuación 4-vii.

$$F_{\text{CZLCA}+\text{CD}} = \frac{\xi_{\text{CZL}}[\text{CZL}]_0}{1 + K_{A_1}[\text{HP}\beta\text{CD}] + K_{A_2}[\text{CA}[n]\text{S}]} \left(1 + \left(\frac{\xi_{\text{CZLCD}}}{\xi_{\text{CZL}}} \right) K_{A_1}[\text{HP}\beta\text{CD}] \right) \quad (4-1vii)$$

Para obtener la expresión para F_R se hace la relación de las expresiones 4-vii y 4-iv correspondientes para $F_{\text{CZLCA}+\text{CD}}$ y F_{CZL} , respectivamente. Surge la ecuación 4-viii de simplificar el término $\xi_{\text{CZL}}[\text{CZL}]_0$.

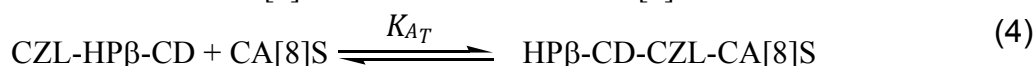
$$\frac{F_{\text{CZLCA}+\text{CD}}}{F_{\text{CZL}}} = \frac{\left(1 + \left(\frac{\xi_{\text{CZLCD}}}{\xi_{\text{CZL}}} \right) K_{A_1}[\text{HP}\beta\text{CD}] \right)}{\left(1 + K_{A_1}[\text{HP}\beta\text{CD}] + K_{A_2}[\text{CA}[n]\text{S}] \right) \left(1 - \frac{K_{A_2}[\text{CA}[6]\text{S}]}{1 + K_{A_2}[\text{CA}[6]\text{S}]} \right)} \quad (4-1viii)$$

Operando sobre el denominador de la ecuación 4-viii se llega a la ecuación 4-ix, en la cual una simple distribución en la fracción del denominador da lugar a la ecuación 4-10 que relaciona F_R con las concentraciones iniciales de los receptores macrocíclicos.

$$\frac{F_{CZLCA+CD}}{F_{CZL}} = \frac{1 + \left(\frac{\xi_{CZLCD}}{\xi_{CZL}}\right) K_{A_1} [HP\beta CD]}{\left(\frac{1 + K_{A_1} [HP\beta CD] + K_{A_2} [CA[m]S]}{1 + K_{A_2} [CA[6]S]}\right)} \quad (4-1ix)$$

$$\frac{F}{F_0} = \frac{F_{CZLCA+CD}}{F_{CZL}} = \frac{1 + \left(\frac{\xi_{CZLCD}}{\xi_{CZL}}\right) K_{A_1} [HP\beta CD]_0}{1 + \left(\frac{K_{A_1} [HP\beta CD]_0}{(1 + K_{A_2} [CA[m]S]_0)}\right)} \quad (4-10)$$

Para obtener la expresión de $1/F_R$ en función de la concentración del receptor R_2 cuya concentración se varía, en el sistema ternario CZL/HP β -CD/CA[8]S se tuvo en cuenta los siguientes equilibrios



Como se ha explicado en el transcurso de este capítulo, la fluorescencia del sistema binario inicial CZL/HP β -CD viene dada por la ecuación 4.2i

$$F_{CZLCD} = \xi_{CZL} \cdot [CZL] + \xi_{CZLHP\beta CD} \cdot [CZLHP\beta CD] \quad (4.2i)$$

Reemplazando las concentraciones en el equilibrio, teniendo en cuenta solamente el equilibrio 1 se obtiene la ecuación 4.2ii

$$F_0 - F_{CZLCD} = \frac{\xi_{CZL} [CZL]_0}{1 + K_{A_1} [HP\beta CD]} + \frac{\xi_{CZLHP\beta CD} [CZL]_0 K_{A_1} [HP\beta CD]}{1 + K_{A_1} [HP\beta CD]} \quad (4.2ii)$$

Sacando factor común el primer término de la suma se obtiene la ecuación siguiente

$$F_0 = F_{CZLCD} = \frac{\xi_{CZL} [CZL]_0}{1 + K_{A_1} [HP\beta CD]} \left(1 + \left(\frac{\xi_{CZLHP\beta CD}}{\xi_{CZL}} \right) K_{A_1} [HP\beta CD] \right) \quad (4.2iii)$$

Cuando al sistema se le adiciona el derivado CA[8]S se establecen los equilibrios de formación del complejo binario y ternario (equilibrios 3 y 4). Teniendo en cuenta estos equilibrios, la fluorescencia en esta instancia se expresa reemplazando en la ecuación 4.2i las concentraciones de CZL y CZL-HP β -CD en el sistema ternario de equilibrios, lo que origina la ecuación 4.2iv

$$F = F_{CZLCD+CA} = \frac{\xi_{CZL} [CZL]_0}{D} \left(1 + \left(\frac{\xi_{CZLHP\beta CD}}{\xi_{CZL}} \right) K_{A_1} [HP\beta CD] \right) \quad (4.2iv)$$

Donde $D = 1 + K_{A_1} [HP\beta CD] + K_{A_2} [CA[8]S] + K_{A_T} K_{A_2} [CA[8]S][HP\beta CD]$.

Haciendo la relación F_0/F al dividir la ecuación 4.2ii por la 4.2iii se obtiene la siguiente ecuación algo extensa

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\frac{\xi_{CZL} [CZL]_0}{1 + K_{A_1} [HP\beta CD]} \left(1 + \left(\frac{\xi_{CZLHP\beta CD}}{\xi_{CZL}} \right) K_{A_1} [HP\beta CD] \right)}{\frac{\xi_{CZL} [CZL]_0}{D} \left(1 + \left(\frac{\xi_{CZLHP\beta CD}}{\xi_{CZL}} \right) K_{A_1} [HP\beta CD] \right)} \quad (4.2iv)$$

Simplificando el término $\xi_{CZL} [CZL]_0$ y entre paréntesis del numerador y denominador

$$\frac{F_0}{F} = \frac{1}{\frac{1 + K_{A_1} [HP\beta CD]}{D}} = \frac{D}{1 + K_{A_1} [HP\beta CD]} \quad (4.2v)$$

Reemplazando D por su igualdad, dividiendo el numerador y el denominador por $1 + K_{A_1}[HP\beta CD]$ y distribuyendo este término en la suma del numerador, se obtiene

$$\frac{F_o}{F} = \frac{\frac{1 + K_{A_1}[HP\beta CD]}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD]} + \frac{K_{A_2}[CA[8]S] + K_{A_T}K_{A_2}[CA[8]S][HP\beta CD]}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD]}}{\frac{1 + K_{A_1}[HP\beta CD]}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD]}} \quad (4.2v)$$

Simplificando términos

$$\frac{F_o}{F} = 1 + \frac{K_{A_2}[CA[8]S] + K_{A_T}K_{A_2}[CA[8]S][HP\beta CD]}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD]} \quad (4.2vii)$$

Sacando factor común $K_{A_2}[CA[8]S]$ se llega a la expresión 4.17 del capítulo 4.

$$\frac{F_o}{F} = 1 + \frac{(1 + K_{A_T}[HP\beta CD]_o)K_{A_2}[CA[8]S]}{1 + K_{A_1}[HP\beta CD]_o} \quad (4.17)$$

Las siguientes presentaciones en reuniones científicas y trabajos en redacción surgen de resultados parciales presentados en este trabajo de tesis:

Presentaciones en Reuniones Científicas

◇ INTERACCIÓN SUPRAMOLECULAR DE CARBAZOL CON RECEPTORES MACROCÍCLICOS. Matías E. Carranza, Alicia V. Veglia. XVIII Congreso Argentino de Química. (AQA). Presentación de póster, QO-20A. Desde 13/09/2010 hasta 16/09/2010. Lanús, Buenos Aires, Argentina.

◇ DETERMINACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE CARBAZOL CON CICLODEXTRINAS Y CALIXARENOS. Matías E. Carranza y Alicia V. Veglia. XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Presentación de póster, PE-267. Desde 03/05/2011 hasta 06/05/2011. Córdoba, Argentina.

◇ CALIXARENOS Y CICLODEXTRINAS COMO SENSORES DE CARBAZOL. Matías E. Carranza, Santiago D. Salas y Alicia V. Veglia. 6to Congreso Argentino de Química Analítica. Presentación de póster P1-36. Desde 26/09/2011 hasta 29/09/2011. Santa Fe, Argentina.

◇ ESTUDIO DEL EFECTO INDIVIDUAL Y MIXTO DE CICLODEXTRINAS Y CALIXARENOS SOBRE LAS PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DEL CARBAZOL. Matías E. Carranza, Alicia V. Veglia. XVIII Simposio Nacional de Química Orgánica. Presentación de póster, FQO-24. Desde 13/11/2011 hasta 16/11/2011. Córdoba, Argentina.

◇ CALIXARENOS Y CICLODEXTRINAS COMO SENSORES DE CARBAZOL. Matías E. Carranza, Santiago D. Salas y Alicia V. Veglia. V Jornadas de Posgrado. Facultad de Ciencias Químicas. Presentación de póster QO-101. 30/11/2011 y 01/12/2011. Córdoba, Argentina.

◇ CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE SISTEMAS MIXTOS FORMADOS POR CARBAZOL, CICLODEXTRINAS Y CALIXARENOS. Matías E. Carranza y Alicia V. Veglia. XI Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología. Desde 01/10/2012 al 04/10/2012. Córdoba, Argentina. Poster 97.

◇ CALIXARENES AND RELATED COMPOUNDS AS POLYPROTIC ACIDS AND CONTAINERS. Guadalupe G. Miñambres, Matías E. Carranza, Santiago D. Salas, Marcio Lazzarotto, María T. Baumgartner, Alicia V. Veglia. 12^a Conferencia Latinoamericana de

Físico-Química Orgánica. A realizarse desde el 07/04/2013 al 12/04/2013. Foz de Iguazu, Brasil. Trabajo aceptado como presentación oral.

◇ SISTEMA TERNARIO: HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA - CARBAZOL - CALIXARENO[n]SULFONATO. ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO. Matías E. Carranza, Alicia V. Veglia. XVIII Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica. Realizado desde 09/04/2013 al 12/04/2013. Rosario, Argentina.

◇ ESTRATEGIAS SUPRAMOLECULARES PARA LA DETERMINACIÓN DE QUINOLINA. Matías E. Carranza, Alicia V. Veglia. VII Congreso Argentino de Química Analítica. Realizado desde 01/10/2013 al 04/10/2013. Mendoza, Argentina. Póster P-A-34.

◇ INTERACCIÓN DE CICLODEXTRINAS Y CALIXARENOS CON QUINOLINA. APLICACIONES ANALÍTICAS. Matías E. Carranza, Alicia V. Veglia. XIX Simposio Nacional de Química Orgánica. Realizado desde 16/11/2013 al 19/11/2013. Mar del Plata, Argentina. Póster FQO-29.

◇ ESTRATEGIAS SUPRAMOLECULARES PARA LA DETERMINACIÓN DE QUINOLINA. Matías E. Carranza, Alicia V. Veglia. XIX VI Jornadas de Posgrado. INFIQC, Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. Presentación de póster QO-030. 05/12/2013 y 06/12/2013. Córdoba, Argentina.

◇ INTERACCIÓN SUPRAMOLECULAR DE QUINOLINA CON RECEPTORES MACROCÍCLICOS. Matías E. Carranza, Sofía del Castillo, Hugo M. Helero, Alicia V. Veglia. XIX Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica. Trabajo aceptado. 12/04/2015 y 15/04/2015. Buenos Aires, Argentina.

◇ SPECTROSCOPIC PROPERTIES OF HYBRID SYSTEMS CARBAZOLE-HYDROXYPROPYL—CYCLODEXTRIN-SILVER NANOPARTICLES. Iuliana Mihalache, Matías E. Carranza, Natalia L. Pacioni, Antonio Radoi, Mihaela Kusko, and Alicia V. Veglia. XIII Conferencia Latinoamericana de Físico-Química Orgánica.

Trabajos en Redacción

◇ Calixarenes and Cyclodextrins as carbazole sensors. Analytical determination. Matías E. Carranza, Alicia V. Veglia.

◇ Photophysical studies of mixed systems of carbazole-cyclodextrins-calixarenes. Matías E. Carranza, Alicia V. Veglia.

◇ Macrocycles receptors as quinoline sensors. Matías E. Carranza, Alicia V. Veglia.

Durante el desarrollo de esta tesis se realizaron las siguientes misiones de trabajo al extranjero:

◇ Universidad Federal de Rio Grande del Sur. *“Síntesis de calixarenos”*. Director Brasileiro: Dr. Marcio Lazarotto, Director Argentino: Dra. Alicia V. Veglia. Proyecto de Investigación: *“Sensores basados en Calixarenos”*, en el marco del proyecto de colaboración internacional CAPES/SPU N° 046/10. Desde 04/07/2011 hasta 29/07/2011.

◇ Instituto de Microtecnología Bucarest (IMT-Bucarest). Práctica en la implementación de nanopartículas metálicas en métodos analíticos con detección espectroscópica, en el proyecto: *“Desarrollo de Métodos Analíticos basados en Sistemas Supramoleculares para la Detección y Cuantificación de Nanomateriales”*. Director Rumano: Dra. Mihaela Kusko, Director Argentino: Dra. Alicia V. Veglia. Presentado en el marco del Programa de Cooperación Científico-Tecnológica entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y el ministerio de Educación, Investigación, Juventud y Deportes de Rumania (MECTS). Desde 10/11/2014 hasta 10/12/2014.