



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Orgánica

Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica

de Córdoba (INFIQC), CONICET

Tesis doctoral

***Sensores basados en
nanocavidades de resorcinaresos***

Lic. Santiago Daniel Salas

2017



Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Directora:

Dra. Alicia V. Veglia

Comisión evaluadora:

Dra. Cristina S. Ortiz

Dra. Patricia I. Ortiz

Dra. Natalia L. Pacioni

Evaluador externo:

Dr. Luis Dante Martínez

(INQUISAL - Universidad Nacional de San Luis)



Dedicatoria...

Un ciclo más he acabado en esta carrera vertiginosa que llamamos *Vida...* En esta etapa, un camino que elegí tomar hace seis años, finalmente me lleva a la meta final, a recibirme de *Doctor en Ciencias Químicas*. Numerosas personas han formado parte de este recorrido y, antes de continuar mi viaje por otros senderos, quiero tomarme un momento para agradecerle a cada uno de ustedes.

En primer lugar, la fuerza que tanto cuido y que siempre llevo conmigo, mi auto-motivación y mi independencia son probablemente mis mayores virtudes heredadas de mi Mamá. Todo el tiempo que le podido dedicar a mi formación ha sido enteramente gracias a su apoyo incondicional, su presencia constante en mi vida, su aguante y su creencia en mí y en mis capacidades.

A mis hermanos, Diego y Graciela, les agradezco ser la fuente de mi admiración. Son para mí la evidencia absoluta de que todo lo que uno se proponga en esta vida, puede lograrlo. Todas las decisiones que he tomado y tomo son de manera más o menos consciente intentos de seguir sus pasos. A Graciela le admiro su avance feroz en la vida por alcanzar sus sueños y su valentía por tomar esas decisiones que la mayoría no se atreve. Mi motivación para alcanzar mis sueños más grandes y mis metas más imposibles surgen de tenerte de ejemplo en mi vida.

De mis sobrinos Marcos y Lorena, entendí que es posible superar los grandes golpes de la vida y prosperar en la Vida. Aprendí que todos esos problemas triviales del día a día de las personas son insignificantes comparado con lo que otras personas han tenido y tienen que vivir. Me volví más profundo en mi manera de pensar, en mi modo de concebirme y, agradecidamente, más intolerante hacia la “normalidad” de las personas.

De la Facu, las primeras personas que me ayudaron a adentrarme en el mundo del doctorado fueron Guada y Mati, allá en el 2011. Guada, no hay nada nuevo que pueda escribirte acá que no te lo haya dicho ya en persona. Sos una persona muy especial en mi vida. Mati, te agradezco las numerosas charlas que me ayudaron a tomar las decisiones más acertadas y tu presencia en los momentos que más necesité ayuda. Mati, sos un ejemplo de persona y un amigo de oro.

En la Facu hice amigos con los que da gusto compartir momentos más allá de los encuentros de pasillo. Así nació el “club del terror” con Guada, Cata y Willber. Momentos

compartidos que atesoraré por siempre y que espero ansiosamente que sigan ocurriendo. Tengo un cariño muy especial por ustedes.

Una personita que se destaca por lo indispensable que ha sido en mi vida estos años en la Facu es Diana. A la misma persona que le dije cuando la conocí “yo vine aquí a trabajar, no a hacer amigos”, hoy le digo que ¡LA AMO! Dianis, sos única, especial, difícil como yo, ternura pura como yo. Los caminos de la vida nos separarán, pero siempre esperaré ansiosamente un reencuentro, un *coffee*, ponernos al día y recordar con nostalgia cuánto hemos cambiado desde el momento que nos conocimos, cuánto hemos cambiado desde que nos dijimos “hasta luego”.

#Párrafo censurado# Voy a hablar de otra colombiana muy especial en mi vida, de la Paty! Lo de la censura es un chiste, jeje. Todo lo opuesto! Paty, sos la definición de lo que es vivir la vida al máximo, sin perder el tiempo, aprovechando al máximo cada momento. Lo que a algunos puede llevarle una vida aprender, vos lo tenés naturalmente. Y sobre todo ello, tenés una capacidad de sanación y de auto-aprendizaje increíbles. Paty, las virtudes que tenés son excepcionales. No las censures. La Paty *uncensored*, esa es tu versión que dejará huellas inolvidables en los demás.

Durante la escritura de esta Tesis, mi vida quedó resumida a dos cosas: escribir y correr. Quienes han pasado por esto, saben que es vital tener un cable a tierra eficiente que te permita re-comenzar cada día como nuevo. Si a esto le sumamos tener personas al lado que estés transitando lo mismo, las mismas sensaciones, las mismas urgencias, todo se torna increíblemente más fácil. Siempre nos toca compartir la escritura con alguien. En mi caso fue con Cande y con Caro Luciani, dos personas que fui conociendo página a página, mate a mate, recaída tras recaída, logro tras logro. Cande, es increíble como dos personas como nosotros que éramos simplemente conocidos durante toda nuestra licenciatura y un doctorado, pasamos a conocernos profundamente durante unos meses de escritura codo a codo. Te agradezco mucho Cande todas las charlas compartidas y la motivación que intercambiamos. A Caro le agradezco tu fortaleza inquebrantable, o por lo menos así siempre te vi yo, para cumplir sus objetivos. Fue muy loco y sumamente motivador ver en otra persona la transición completa desde que nos conocimos iniciando la escritura hasta verte con tu Tesis impresa, preparando la charla, recibíendote de Doctora y verte ahora como pos-doc. Caro, gracias a tu compañía en la biblio durante gran parte del 2016.

Durante todo este tiempo, muchas personas han pasado por el laboratorio donde realicé esta Tesis, el lab 004. Le agradezco a cada uno porque, quizás no se dieron cuenta, pero siempre estuve mirándolos y aprendiendo un poquito de cada uno de ustedes; sobre todo, a ser mejor persona. Un agradecimiento especial a mis compas de Tesis con los que comparto más de cerca la felicidad del cierre de esta etapa, Andre, Hugo, Rodri y Johannes.

A mi Directa de Tesis, la Dra. Alicia Veglia, le agradezco en primer lugar haberme abierto las puertas de su laboratorio. Su dedicación al seguimiento de esta Tesis y sus enseñanzas en todo este período permiten que finalmente me convierta en Doctor. Además, le agradezco su apoyo para que mis proyectos personales y los compartidos hayan avanzado y aún avancen.

A mi comisión de Tesis, a las Dras Natalia Pacioni, Cristina Ortiz y Patricia Ortiz, les agradezco las devoluciones en cada instancia de evaluación durante todo el doctorado, desde las charlas de Tesis hasta la lectura de este manuscrito. A la Dra. Natalia Pacioni, más conocida como la Naty por su cercanía y compañerismo en el lab, le agradezco el seguimiento que ha tenido de mi trabajo, sus aportes y sugerencias, su predisposición para resolver siempre mis dudas, su dedicación a la enseñanza y al trabajo que siempre he visto como ejemplos a seguir.

Finalmente, quiero agradecerle a mi mejor amigo, mi hermano, Nahuel. Nuestra amistad de 16 años define por sí misma lo que significás para mí. Siempre presente tanto en mis momentos de tristeza como en los acontecimientos más memorables de mi vida. Aunque no hay nada que pueda decirte aquí que ya no sepas, siempre quise dedicarte este fragmento de una gran película.

I'll always love you because we grew up together and you helped make me who I am. I just wanted you to know [...] I'm grateful for that. Whatever someone you become, and wherever you are in the world, I'm sending you love. You're my friend to the end. (Her, 2013)

*Esta Tesis está dedicada a todos
ustedes que han creído en mí...*

Prefacio

En este trabajo de Tesis titulado “Sensores basados en nanocavidades de resorcinarenos” inicialmente se presenta la caracterización de receptores macrocíclicos sintetizados C-alkilresorcín[4]arenos, enfatizando sus propiedades polipróticas en medios acuosos. Posteriormente se discuten las interacciones supramoleculares que los receptores establecen en medios acuosos con pesticidas N-metilcarbamatos como promecarb y aminocarb. Finalmente, se propone un método analítico basado en la aplicación de C-butilresorcín[4]areno como sensor químico para la determinación de promecarb con potenciales aplicaciones en muestras reales.

A continuación se detallan los aspectos más relevantes abordados a lo largo de los 5 capítulos que componen este trabajo de Tesis Doctoral.

El Capítulo 1 introduce el marco teórico que fundamenta esta Tesis. Se discuten los conceptos fundamentales de la Química Supramolecular, las propiedades de distintos receptores macrocíclicos, en particular los resorcinarenos, y sus aplicaciones en la química huésped-receptor frente a diversos sustratos de interés.

El Capítulo 2 presenta los resultados de la síntesis, purificación y caracterización de C-alkilresorcín[4]arenos sustituidos con cadenas alifáticas de distintas longitudes.

El Capítulo 3 incluye la evaluación del comportamiento poliprótico de los C-alkilresorcín[4]arenos mediante titulaciones potenciométricas y espectrofotométricas con distintos hidróxidos alcalinos. Se presentan las constantes de acidez determinadas en medios acuosos y se discuten los efectos del contra-ión de la base y de la longitud de los sustituyentes alquílicos sobre las propiedades ácidas de los receptores.

El Capítulo 4 presenta la descripción de las interacciones supramoleculares entre los C-alkilresorcín[4]arenos y los insecticidas N-metilcarbamatos promecarb y aminocarb mediante las técnicas espectroscópicas UV-Visible y de emisión de fluorescencia. Se presentan las constantes de asociación determinadas entre el sustrato y el receptor y se discute la naturaleza de las interacciones supramoleculares involucradas.

El Capítulo 5 concluye con la aplicación de la interacción de promecarb con C-butilresorcín[4]areno como un método fluorimétrico indirecto para la detección y cuantificación del analito en medios acuosos. La aplicabilidad del procedimiento se evaluó en muestras de agua corriente y pomelo rosado.

Índice

INTRODUCCIÓN

1.1. MARCO TEÓRICO	17
1.2. RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y SISTEMAS AUTO-ENSAMBLADOS EN LA NATURALEZA	18
1.3. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR.....	20
1.3.1. <i>Sistemas auto-ensamblados</i>	21
1.3.2. <i>Química huésped-receptor</i>	22
1.3.3. <i>Tipos de interacciones no covalentes</i>	22
1.4. RECONOCIMIENTO MOLECULAR.....	24
1.4.1. <i>Mecanismos de reconocimiento molecular</i>	25
1.4.2. <i>Tipos de complejos supramoleculares</i>	27
1.5. QUÍMICA MACROCÍCLICA.....	28
1.5.1. <i>Tipos de receptores macrocíclicos</i>	28
1.5.1.3. <i>Cavitandos</i>	30
1.6. QUÍMICA HUÉSPED-RECEPTOR EN SOLUCIÓN	33
1.6.1. <i>Efecto hidrofóbico</i>	33
1.6.2. <i>Aspectos termodinámicos y cinéticos</i>	33
1.6.3. <i>Métodos de determinación de constantes de asociación</i>	35
1.7. QUÍMICA ANALÍTICA SUPRAMOLECULAR.....	37
1.7.1. <i>Principios de la química analítica supramolecular</i>	37
1.7.2. <i>Determinaciones selectivas directa e indirecta de un único analito</i>	37
1.7.3. <i>Determinación de múltiples analitos con receptores diferenciales</i>	38
1.7.4. <i>Aplicaciones analíticas de receptores macrocíclicos</i>	39
1.8. RESORCINARENOS.....	40
1.8.1. <i>Comparación entre calixarenos y resorcinarenos</i>	40
1.8.2. <i>Ampliación de la cavidad y cápsulas moleculares</i>	43
1.8.3. <i>Resorcinarenos en estructuras auto-ensambladas</i>	43
1.8.4. <i>Complejos supramoleculares con resorcinarenos</i>	44
1.8.5. <i>Aplicaciones prácticas de resorcinarenos</i>	45
1.9. OBJETIVOS DE LA TESIS.....	46
1.9.1. <i>Objetivo general</i>	46
1.9.2. <i>Objetivos específicos</i>	46
1.10. BIBLIOGRAFÍA.....	47

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE C-ALQUILRESORCIN[4]ARENOS

2.1 SÍNTESIS MACROCÍCLICA.....	59
2.1.1. <i>Síntesis en alta dilución</i>	60
2.1.2. <i>Síntesis asistida por molde</i>	60
2.2. SÍNTESIS DE RESORCINARENOS	61
2.2.1. <i>Mecanismo de ciclocondensación entre resorcinol y aldehídos</i>	61
2.2.2. <i>Estereoquímica y propiedades conformacionales de resorcinarenos</i>	63
2.2.3. <i>Propiedades físicas y químicas de isómeros de resorcinarenos</i>	66
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	67
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67

2.4.1. Síntesis y purificación de C-alquilresorcín[4]arenos.....	67
2.4.2. Propiedades fisicoquímicas de C-alquilresorcín[4]arenos.....	70
2.4.2.1. Punto de fusión.....	70
2.4.2.2. Solubilidad y efecto de concentración salina.....	70
2.4.3. Caracterización espectroscópica.....	73
2.4.3.1. Resonancia magnética nuclear.....	73
2.4.3.2. Espectroscopia de absorción UV-visible.....	75
2.4.3.3. Espectroscopia de emisión de fluorescencia.....	77
2.5. CONCLUSIONES.....	79
2.6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	79
2.6.1. Instrumentos.....	79
2.6.2. Síntesis y purificación de C-alquilresorcín[4]arenos.....	80
2.6.2.1. C-butilresorcín[4]areno.....	80
2.6.2.2. C-heptilresorcín[4]areno.....	80
2.6.2.3. C-undecilresorcín[4]areno.....	81
2.7. BIBLIOGRAFÍA.....	82

PROPIEDADES ÁCIDO-BASE DE C-ALQUILRESORCIN[4]ARENOS

3.1. CARACTERIZACIÓN ÁCIDO-BASE DE SISTEMAS HUÉSPED-RECEPTOR.....	87
3.1.1. Efecto del solvente sobre las constantes de disociación de especies orgánicas.....	88
3.1.2. Efecto macrocíclico y de la compartimentalización sobre las constantes de disociación ácido-base de receptores y sustratos.....	88
3.1.3. Comportamiento poliprótico de calix[4]arenos.....	90
3.1.4. Comportamiento poliprótico de resorcín[4]arenos.....	96
3.2. OBJETIVOS.....	100
3.3. RESULTADOS.....	100
3.3.1. Titulaciones ácido-base de C-butilresorcín[4]areno.....	100
3.3.1.1. Titulación potenciométrica de C ₄ RAH ₈ con NaOH.....	100
3.3.1.2. Titulaciones espectrofotométricas de C ₄ RAH ₈ con NaOH.....	104
3.3.2. Titulaciones ácido-base de C-butilresorcín[4]areno con KOH.....	108
3.3.3. Titulaciones ácido-base de C-butilresorcín[4]areno con LiOH.....	113
3.3.4. Titulaciones ácido-base de C-metilresorcín[4]areno con NaOH.....	116
3.3.4.1. Titulación potenciométrica de C ₁ RAH ₈	116
3.3.4.2. Titulación espectrofotométrica de C ₁ RAH ₈	117
3.3.5. Titulaciones espectrofotométrica de C-heptilresorcín[4]areno con NaOH.....	119
3.4. DISCUSIÓN.....	122
3.4.1. Interpretación del comportamiento poliprótico de C ₄ RA en medio acuoso.....	122
3.4.2. Efecto del contra-ión de los hidróxidos alcalinos en los equilibrios ácido-base de C-butilresorcín[4]areno.....	126
3.4.3. Efecto de la longitud de la cadena alquílica sobre el comportamiento poliprótico de C-alquilresorcín[4]arenos.....	131
3.5. CONCLUSIONES.....	134
3.6. SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	135
3.6.1. Instrumentos.....	135
3.6.2. Reactivos.....	135
3.6.3. Procedimientos.....	136
3.6.3.1. Preparación de las soluciones.....	136
3.6.3.2. Titulaciones potenciométricas.....	136
3.6.3.3. Titulaciones espectrofotométricas.....	137
3.7. BIBLIOGRAFÍA.....	137

INTERACCIONES SUPRAMOLECULARES DE C-ALQUILRESORCIN[4]ARENOS CON PESTICIDAS N-METILCARBAMATOS

4.1. INTRODUCCIÓN.....	145
------------------------	-----

4.1.1. Efecto de resorcin[4]arenos sobre las propiedades químicas y espectroscópicas de compuestos orgánicos	146
4.1.2. Pesticidas carbamatos	147
4.1.2.1. Propiedades de los Pesticidas N-metilcarbamatos.....	149
4.2. OBJETIVOS.....	150
4.3. RESULTADOS.....	151
4.3.1. Caracterización por espectroscopia UV-visible de pesticidas N-metilcarbamatos	151
4.3.1.1. Espectros de absorción UV-visible de promecarb y minocarb.....	151
4.3.1.2. Efecto del pH sobre las absorciones UV-visible de promecarb y minocarb.....	152
4.3.1.3. Determinación de la constante de ionización de aminocarb.....	153
4.3.1.4. Determinación de las absortividades molares de promecarb y aminocarb.....	154
4.3.2. Influencia de N-metilcarbamatos sobre las propiedades espectroscópicas de C-alquilresorcin[4]arenos.....	155
4.3.2.1. Influencia de pesticidas sobre las absorciones de C1RAH ₈ y sus poli-aniones.....	155
4.3.2.2. Efecto de promecarb y minocarb sobre la absorción de C-butilresorcin[4]areno.....	157
4.3.3. Caracterización de pesticidas N-metilcarbamatos por espectroscopia de fluorescencia	159
4.3.4. Influencia de los N-metilcarbamatos sobre las propiedades de emisión de fluorescencia de C-alquilresorcin[4]arenos y efecto del pH.....	160
4.3.4.1. Espectros de emisión de C1RA.....	160
4.3.4.2. Espectros de emisión de C4RA.....	165
4.3.4.3. Emisión de fluorescencia de resorcinol e influencia de PC. Efecto de la pre-organización.....	170
4.3.5. Termodinámica de la asociación entre sustrato y receptor	172
4.3.5.1. Determinaciones de K_A mediante espectroscopia de absorción UV-visible.....	173
4.3.5.2. Determinaciones de las constantes de quenching o de Stern-Volmer (K_{SV}).....	176
4.4. DISCUSIÓN	186
4.4.1. Propiedades espectroscópicas de C-alquilresorcin[4]arenos.....	186
4.4.2. Interacciones entre C-alquilresorcin[4]arenos y pesticidas N-metilcarbamatos	188
4.5. CONCLUSIONES.....	190
4.6. SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	191
4.6.1. Instrumentos y reactivos.....	191
4.6.2. Procedimientos	192
4.6.2.1. Descripción del preparado de soluciones empleadas en espectroscopia UV-Visible.....	192
4.6.2.2. Descripción del preparado de soluciones empleadas en espectroscopia de emisión de fluorescencia.....	193
4.7. BIBLIOGRAFÍA.....	194

ATENUACIÓN DE LA EMISIÓN FLUORESCENTE DE C-BUTILRESORCIN[4]ARENO POR PROMECARB. APLICACIONES ANALÍTICAS

5.1. INTRODUCCIÓN.....	201
5.1.1. Determinación analítica de pesticidas.....	202
5.1.2. Análisis de carbamatos en agua y alimentos	204
5.1.3. Validación de un método analítico	205
5.1.3.1. Calibración y linealidad.....	207
5.1.3.2. Límites de detección y de cuantificación.....	207
5.1.3.3. Precisión.....	208
5.1.3.4. Selectividad.....	208
5.1.3.5. Exactitud.....	209
5.1.3.6. Ensayos de recuperación	209
5.2. OBJETIVOS.....	210
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	210
5.3.1. Función de calibración del método	210
5.3.2. Límites de detección y de cuantificación	211
5.3.2. Robustez del método	212
5.3.2.1. Efecto de la concentración de buffer.....	212
5.3.2.2. Efecto de la naturaleza del buffer y del pH.....	213
5.3.2.3. Efecto de la temperatura	213
5.3.3. Selectividad	213
5.3.4. Aplicabilidad del método en matrices reales	214

5.3.5. Otros métodos de determinación de PC.....	217
5.4. SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	218
5.4.1. Instrumentos y reactivos.....	218
5.4.2. Procedimientos.....	218
5.4.2.1. Preparación de las soluciones en presencia de agua corriente.....	218
5.4.2.2. Tratamiento de la pulpa pomelo rosado con partición líquida-líquida.....	218
5.4.2.3. Preparación de las soluciones en presencia de pulpa de pomelo rosado.....	219
5.5. Bibliografía.....	212
CONCLUSIONES GENERALES	227
LISTADO DE ACRÓNIMOS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	229

Capítulo 1

Introducción

1.1. MARCO TEÓRICO

La Química Analítica se enfoca esencialmente en la detección, cuantificación y determinación de la composición y naturaleza de una sustancia de interés (usualmente denominada *analito*) mediante la aplicación de sensores. En términos generales, un sensor puede ser un instrumento electrónico, o incluso una molécula simple, capaz de transformar la información química en una señal de utilidad analítica.¹ Dado su potencial, el uso de sensores ha encontrado innumerables aplicaciones prácticas que abarcan un amplio y diverso panorama como los análisis clínicos, las determinaciones forenses, el control de la calidad de fármacos y alimentos, y las determinaciones de contaminantes ambientales.² En este contexto es crucial un enfoque multidisciplinario y holístico de las problemáticas analíticas que comprenden áreas tan diversas, particularmente de aquellas que requieren la elaboración de normas y regulaciones de las prácticas antropogénicas vigentes y emergentes con potencial impacto ambiental.³⁻⁵

El mayor desafío de la Química Analítica contemporánea consiste en el desarrollo de métodos que permitan determinar de manera sensible, precisa y selectiva los analitos presentes en muestras complejas mediante un procedimiento sencillo, rápido, eficiente y de bajo costo. En los últimos años, la Química Analítica ha experimentado importantes cambios junto al avance tecnológico y ello ha permitido afrontar las demandas actuales como la necesidad de realizar mediciones de componentes en concentraciones cada vez más bajas.⁶ Por ejemplo, diversas regulaciones exigen el cumplimiento de los niveles máximos permitidos de ciertos contaminantes en espacios ambientales o las dosis máximas toleradas por sistemas vivos. El análisis rutinario de analitos en cantidades trazas es una tarea desafiante debido a la baja sensibilidad analítica de las técnicas usuales como la espectroscopia infrarroja (IR) o resonancia magnética nuclear (RMN). El uso de técnicas más sensibles como las espectroscopias UV-visible y de fluorescencia en muchos casos se ve dificultado por el efecto matriz producido en el análisis de muestras complejas o por pérdida de la selectividad debido a la superposición de bandas.⁷ En este contexto, la sensibilidad y la selectividad de las metodologías analíticas desarrolladas para satisfacer las necesidades actuales son aspectos cruciales.⁶

En la incesante búsqueda de nuevos sensores de dimensiones moleculares, en los últimos años se han diseñado diversos sistemas orgánicos, inorgánicos e híbridos tales como polímeros, nanopartículas metálicas recubiertas de ligandos orgánicos, óxidos como las zeolitas y oligómeros orgánicos cíclicos, usualmente denominados macrociclos. La interacción que ocurre por reconocimiento molecular o auto-organización cuando el sensor se asocia a un analito específico da lugar a la formación de una nueva especie, una “supermolécula”, cuya señal analítica difiere de la de sus componentes.⁸ El reconocimiento

molecular o la selección de un sustrato específico por una molécula receptora determinada se basa en la capacidad que tienen las especies de reconocerse mutuamente, y el grado de afinidad entre ellas depende de la naturaleza de las fuerzas “a distancia” que las mantienen asociadas. La eficiencia de un receptor para reconocer a un dado sustrato tiene su origen en la especificidad entre ambos, la cual depende de factores geométricos tales como la forma, el tamaño, la conformación, y en la afinidad química dada por la hidrofobicidad e hidrofiliidad de las moléculas, interacciones dipolares y electrostáticas, formación de puentes de hidrógeno, entre otros.⁹ En otras palabras, la afinidad entre las moléculas es una traducción de la complementariedad espacial y química existente entre ellas. Esta interacción de naturaleza no covalente denominada *supramolecular* puede ser intensificada mediante modificaciones sintéticas sobre el sensor que favorezcan, por ejemplo, la complementariedad química con el analito. De esta manera, el aumento de la fuerza con la que la interacción supramolecular ocurre puede traducirse en un mayor cambio de la señal analítica del analito y, consecuentemente, en una determinación analítica más selectiva del mismo.¹⁰

La conjunción de la Química Analítica y la Química Supramolecular ha dado origen a la recientemente definida Química Analítica Supramolecular.¹¹ El desarrollo de esta área depende en gran medida del diseño estratégico de sensores que sean complementarios a los analitos o sustratos que se quieren determinar con el fin de mejorar la selectividad de la determinación. Una propuesta en auge se basa en el empleo de sistemas organizados basados en estructuras que presentan una cavidad de dimensiones nanométricas generalmente denominados receptores macrocíclicos.¹ Esta estructura particular permite que ciertos analitos con el tamaño, forma y funcionalidad química adecuada sean guiados por reconocimiento molecular hacia la cavidad del receptor actuando como huéspedes de la misma.⁹ Entre las ventajas de la aplicación de receptores macrocíclicos para la determinación analítica de sustratos se pueden mencionar el aumento de la sensibilidad, mejoras en la selectividad a través de la disminución del efecto de interferentes y un menor tratamiento de muestras reales incrementando la rapidez de los análisis.¹²

1.2. RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y SISTEMAS AUTO-ENSAMBLADOS EN LA NATURALEZA

La naturaleza, con sus diseños eficientes, mecanismos multifuncionales y sistemas altamente organizados, ha servido para el Hombre como fuente de inspiración de innumerables desarrollos científicos y tecnológicos. El estudio de las propiedades funcionales de los sistemas biológicos aporta los conocimientos que posteriormente pueden ser trasladados a un diseño molecular racional y eficiente que sirvan para el desarrollo de soluciones e innovaciones.

Desde el descubrimiento de la estructura del ADN, esta macromolécula ha pasado a ser uno de los mejores ejemplos que demuestra la relevancia de los sistemas auto-ensamblados en la Naturaleza. Los bloques constructores de las cadenas poliméricas son los nucleótidos compuestos por una base nitrogenada, una molécula del azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato. La uniones covalentes entre los grupos fosfato y las moléculas de azúcar permite que los nucleótidos se encuentren unidos para formar una cadena de polinucleótidos. El reconocimiento molecular entre bases nitrogenadas complementarias presentes en cadenas distintas permite el auto-ensamblado espontáneo entre dos cadenas de polinucleótidos para formar la doble hélice. La formación de puentes de hidrógeno entre los átomos de hidrógeno, oxígeno y nitrógeno presentes en las bases nitrogenadas es indispensable para que se establezca el reconocimiento molecular de manera selectiva y precede la formación del auto-ensamblado. La adopción estructural en forma de bucle permite una menor exposición de las bases más hidrofóbicas al medio acuoso del núcleo celular, mientras que las unidades formadas por desoxirribosa y fosfato más polares permanecen expuestas al medio circundante.

La interacción reversible entre pares de bases por su naturaleza no covalente y específica debido a la complementariedad química requerida demuestra cómo las interacciones supramoleculares, el reconocimiento molecular y el auto-ensamblado resultan críticos para todas las funciones del ADN en los organismos vivos.¹³

La gran mayoría de los procesos celulares que ocurren en los sistemas biológicos desde la replicación del ADN, el metabolismo de los alimentos ingeridos, la contracción muscular hasta la infección celular por HIV, ocurren mediados por la actividad de complejos sistemas enzimáticos. Incluso son explotadas en innumerables procesos biotecnológicos para la producción de alimentos, fármacos, etc. Estas biomoléculas de naturaleza proteica proveen las condiciones para que reacciones bioquímicas elementales, que tendrían lugar a una velocidad muy baja, ocurran de manera cinéticamente favorable. Las moléculas blanco que desencadenan los procesos mencionados y sobre las cuales actúan las enzimas son sus sustratos, y la capacidad de reconocimiento molecular y selectividad de las enzimas hacia estas moléculas es excepcional.¹⁴

La extrema especificidad de las enzimas por sus sustratos fue explicada en 1894 por Emil Fischer mediante una analogía ejemplificada por el encaje de una llave con su correspondiente cerradura. Así como cada cerradura puede ser abierta por una llave específica, el sitio activo presente en una enzima actúa como un receptor con la complementariedad geométrica y química adecuada para que un sustrato específico pueda reconocerlo. Este principio fue suficiente en su momento para racionalizar la actividad biológica de las enzimas para realizar procesos específicos. El reconocimiento molecular entre sustrato y receptor en realidad no posee la naturaleza estática y rígida enunciada por

Fischer.¹⁵ Las geometrías del sustrato y del sitio activo de la enzima analizadas separadamente pueden no cumplir inicialmente con el requisito de la complementariedad necesaria para que tenga lugar el reconocimiento molecular. Sin embargo, conforme las moléculas se aproximan, pueden manifestarse a partir de cierta distancia modificaciones estructurales y/o químicas (polaridad, cambios conformacionales, interacciones electrostáticas, etc.) para alcanzar finalmente la complementariedad geométrica requerida. El proceso dinámico y reversible mediante el cual el receptor modifica su estructura o conformación ante la proximidad o presencia del sustrato se denomina *pre-organización*.^{15,16} La inversión de energía del receptor en su pre-organización le permite adoptar la estructura más adecuada que le permita recibir al huésped. Finalmente, la energía invertida por la molécula receptora es retribuida por la ganancia de estabilidad del complejo huésped-receptor formado.¹⁴

Existen muchos otros ejemplos de asociaciones no covalentes, reversibles y dinámicas entre moléculas en los sistemas biológicos: la clorofila en las plantas y la hemoglobina en animales son macrociclos porfirínicos que albergan específicamente un ion magnesio y Fe^{2+} , respectivamente; la bicapa celular es una estructura auto-ensamblada altamente organizada de lípidos anfifílicos. El transporte de materia a través de la membrana celular puede ser realizado de manera selectiva por ciertas proteínas, el reconocimiento molecular altamente específico de un antígeno por un anticuerpo, y como éstos existen innumerables ejemplos.

Los sistemas biológicos siempre han sido para los químicos una fuente de inspiración para el diseño de arquitecturas moleculares complejas que se mantienen ensambladas por interacciones reversibles no covalentes. En este contexto, surge la química supramolecular a partir de la imitación que ha realizado el Hombre durante siglos de los fenómenos que observa y comprende en la naturaleza.¹⁷ Los sistemas supramoleculares sintéticos han encontrado una amplia variedad de aplicaciones prácticas como el atrapamiento de moléculas en matrices sólidas, la extracción y remediación de especies en solución, e incluso han permitido la construcción de “motores moleculares” y sistemas nano-híbridos con propiedades únicas.^{18,19}

1.3. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

La química supramolecular, concepto introducido por Jean-Marie Lehn, se enfoca en el estudio de los fenómenos relacionados con las interacciones entre moléculas, más allá de los enlaces covalentes, y cómo se combinan para dar lugar a nuevas entidades “supramoleculares” con funciones diferenciadas a las de sus constituyentes.²⁰ En química supramolecular habitualmente se utilizan los términos *receptor* y *huésped* o *sustrato*, dada la similitud de los sistemas sintéticos con los biológicos, para referirse a las moléculas que

se asocian entre sí para formar una nueva especie y en general se asume que el receptor posee las dimensiones adecuadas como para envolver parcial o totalmente al sustrato de menor tamaño.²¹

Los sistemas que cumplen con estas condiciones de tamaño relativo se agrupan en la denominada *química huésped-receptor*, terminología acuñada por Cram.^{22,23} En cambio, si el sistema involucra moléculas lineales o poliméricas con características estructurales similares, la *química de los sistemas auto-ensamblados* o de los *agregados moleculares* engloba los fundamentos que explican estos procesos.^{8,24}

1.3.1. Sistemas auto-ensamblados

Los sistemas auto-ensamblados implican la asociación supramolecular entre dos o más especies para formar un agregado estable de mayor tamaño y, generalmente, de una arquitectura más compleja. Cada bloque constructor que compone el auto-ensamblado es producto de la química molecular en la que moléculas precursoras más simples se encuentran unidas covalentemente (Figura 1.1). Algunas o todas las unidades componentes del bloque constructor pueden cumplir la función de *sitios de unión*, es decir, presentan el tamaño, geometría y/o funcionalidad química necesaria para actuar como puntos de anclaje para la interacción no covalente con los sitios de unión complementarios de otro bloque con dimensiones similares. De esta manera, el proceso de reconocimiento molecular repetitivo entre los sitios de unión de dos o más bloques constructores es posible gracias a la pre-organización de los precursores unidos covalentemente en posiciones que favorecen sus interacciones. La auto-organización espontánea, dinámica y reversible, da lugar a la formación de agregados auto-ensamblados con estructuras tridimensionales definidas y estabilizadas por las interacciones supramoleculares entre los sitios de unión.^{24,25}

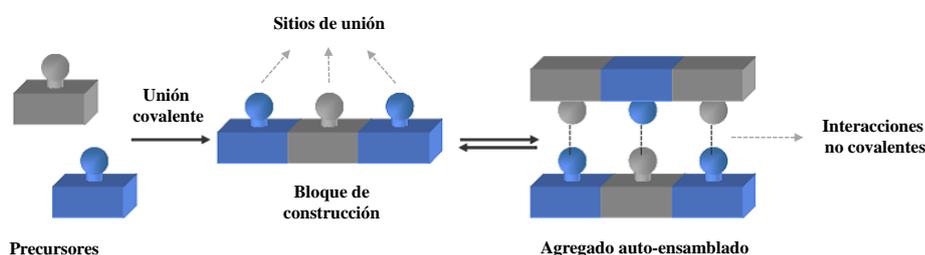


Figura 1.1. Formación de un agregado auto-ensamblado a partir de bloques de construcción complementarios.

1.3.2. Química huésped-receptor

La interacción huésped-receptor requiere, además de la complementariedad química entre los sitios de unión, que el tamaño y forma del espacio receptor sean compatibles con las dimensiones de la molécula huésped, tal como ocurre entre una enzima y su sustrato.²¹ La evolución del fenómeno de reconocimiento molecular exige una mayor pre-organización de los sitios de unión de manera que su disposición espacial favorezca la eficiencia del proceso de reconocimiento.⁸ En la química huésped-receptor, el receptor se caracteriza por presentar una estructura abierta o cíclica compuesta por la unión covalente de los precursores y los sitios de unión se encuentran pre-organizados en una disposición convergente (Figura 1.2).²⁶ La convergencia del receptor sobre una molécula huésped implica una diferencia de tamaño relativo entre las especies de manera que la especie menor pueda ser albergada por la entidad mayor.^{21,26}

La naturaleza de los sitios de unión del receptor y la manera en la que se disponen espacialmente determina la complementariedad requerida por parte del huésped para que el reconocimiento molecular tenga lugar.⁸ Es decir, ocurre una reducción del número de huéspedes con la posibilidad de ocupar el espacio definido por el receptor, lo cual se traduce en un reconocimiento más selectivo. Por esta razón, los receptores más usuales se caracterizan por la unión covalente de moléculas precursoras en un formato cíclico que delimitan un portal bidimensional o una cavidad tridimensional. La entidad supramolecular resultante de la interacción no covalente de un sustrato con la cavidad de un receptor macrocíclico se denomina *complejo huésped-receptor* (Figura 1.2).^{16,27,28}

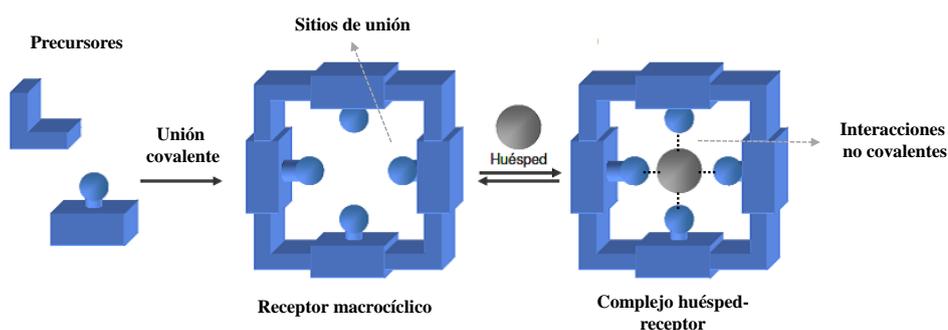


Figura 1.2. Formación de un complejo huésped-receptor por interacciones no covalentes entre un receptor macrocíclico y un huésped.

1.3.3. Tipos de interacciones no covalentes

La energía de las interacciones no covalentes que mantienen asociados los componentes de los agregados auto-ensamblados y los complejos huésped-receptor varían

entre 2 y 300 kJ/mol y son menores comparadas con las energías de los enlaces covalentes que oscilan entre 150 y 450 kJ/mol.^{29,30} La magnitud de las interacciones no covalentes depende de la naturaleza química de los sitios de unión de las especies involucradas.³⁰ Por ejemplo, las interacciones electrostáticas son las más fuertes, mientras que las asociaciones mediadas por fuerzas de van der Waals son las más lábiles.^{28,31}

Las interacciones coulombicas entre especies cargadas se manifiestan en numerosos sistemas supramoleculares naturales y sintéticos dado que pueden presentar energías similares e incluso superiores a las de un enlace covalente. Se trata de interacciones de naturaleza no direccional que favorecen el acercamiento.³² No obstante, la aproximación entre los sitios de unión de las especies en solución ocurre si la energía de formación del par iónico supera la energía invertida en el proceso de desolvatación.^{8,33}

Las demás interacciones dipolares que no involucran dos especies iónicas requieren una alineación de un dipolo con un ion o entre dipolos, de manera que existe una disminución de los grados de libertad para favorecer una interacción óptima.¹⁵

En las interacciones ion-dipolo la eficiencia de la interacción depende de la polarizabilidad de las densidades electrónicas de las especies involucradas.³¹ Por lo general, el ion y el dipolo se comportan como un ácido y una base de Lewis dado que el ácido posee orbitales electrónicos con carga deficiente y es químicamente compatible con un donador de electrones como la base de Lewis. Como regla general, una base de Lewis blanda, con una densidad electrónica altamente polarizable, presentará una mayor afinidad por un ácido de Lewis blando; mientras que ácidos y bases de Lewis duros tendrán una mayor afinidad entre sí dada la complementariedad de sus densidades electrónicas poco polarizables.

Las asociaciones entre dipolos se posicionan entre las de menor energía. Los dipolos se deben hallar cercanos y orientados de manera perpendicular o paralela entre sí de manera que las interacciones entre densidades electrónicas de carga opuesta sean óptimas.¹⁵

El puente de hidrógeno es un tipo especial de interacción dipolar entre un átomo de hidrógeno electropositivo con un átomo electronegativo de otra especie dipolar. La fuerza de la interacción depende de la distancia entre los átomos y del ángulo que conforman el dipolo donador que contiene hidrógeno con el dipolo aceptor. El puente de hidrógeno es de carácter más covalente cuando la orientación de los dipolos es lineal y los átomos involucrados se encuentran entre sí a 1,2 – 1,5 Å.⁸ La elevada versatilidad direccional y de distancia entre los dipolos sin una pérdida apreciable de la fuerza de

interacción convierte al enlace puente de hidrógeno en uno de los más relevantes en los sistemas supramoleculares.³⁴

Los compuestos aromáticos o que presentan sistemas conjugados de electrones π en ocasiones cumplen el rol de sitios de unión para diversas especies. La asociación entre sí de especies aromáticas por sus nubes electrónicas da origen a un tipo de interacción no covalente denominada π -stacking.³⁵ Por ejemplo, la fuerza principal que mantiene los planos de anillos bencénicos condensados asociados entre sí en el grafito es de tipo π -stacking. Los electrones π pueden establecer asociaciones con cationes orgánicos o inorgánicos (cación- π)³⁶ como en el caso del ferroceno. En ciertas ocasiones, el enlace σ C-H se comporta como un dipolo que interacciona con moléculas aromáticas (C-H- π).³⁷

Entre las interacciones de naturaleza no covalente de menor fuerza se encuentran las de van der Waals que consisten en la interacción no direccional entre dipolos momentáneos originados por oscilaciones de una densidad electrónica polarizable.⁸ En ciertos agregados auto-ensamblados tales como la formación de una monocapa lipídica en una interfase o la bicapa lipídica celular, la extensión del contacto entre las especies favorece las interacciones de van der Waals incrementando la energía de la asociación.¹⁶

1.4. RECONOCIMIENTO MOLECULAR

El reconocimiento molecular constituye la piedra basal de la química supramolecular dado que todos los sistemas supramoleculares, sean de menor o mayor complejidad, involucran la asociación selectiva entre especies. El balance entre la rigidez y la flexibilidad de un receptor juega un rol fundamental en su capacidad de reconocimiento molecular.^{15,28} La rigidez del receptor afecta su selectividad, mientras que la flexibilidad influye sobre la estabilidad de la interacción huésped-receptor. Una mayor flexibilidad le permite al receptor ajustar su forma a la del sustrato y, de esta manera, formar un sistema supramolecular más estable. La selectividad es la resultante de tres factores fundamentales que afectan la eficiencia con que ocurre el reconocimiento molecular: la complementariedad electrónica y espacial entre los sitios de unión del huésped y del receptor, la pre-organización conformacional del receptor para recibir al sustrato, y la cooperatividad entre los sitios de unión.^{27,38,39} La integración de estos factores es crucial para el diseño estratégico de receptores selectivos de diversos sustratos, los cuales han encontrado numerosas aplicaciones en el desarrollo de sensores con gran practicidad desde la determinación de aditivos en la industria alimenticia, el transporte y direccionamiento de fármacos administradas en pacientes hasta aplicaciones en diagnóstico por imágenes.⁴⁰

1.4.1. Mecanismos de reconocimiento molecular

La distribución espacial y la movilidad conformacional de los sitios de unión del receptor son características que determinan la eficiencia con que la interacción supramolecular ocurre y por lo tanto, son decisivas en el proceso de reconocimiento molecular de un huésped.^{20,41}

En general, los precursores de entidades moleculares más complejas pueden actuar por sí mismos como sitios de unión. En este caso se comportan como ligandos monodentados y ante la presencia de un sustrato complementario, tienden a organizarse a su alrededor ocupando la mayor superficie posible aislándolo del entorno (Figura 1.3, A). En principio, mientras mayor sea el número de ligandos que interactúan con el sustrato con entalpía favorable, mayor será la estabilización del complejo formado. Sin embargo, el número de entidades formadas luego de la asociación es menor, lo cual es entrópicamente desfavorable. Este balance termodinámico puede ser salvaguardado si dos precursores simples están unidos covalentemente como es el caso de los ligandos bidentados (Figura 1.3, B). En la química de coordinación, el desplazamiento de ligandos monodentados que interactúan con un sustrato, por ejemplo un ion metálico, por ligandos multidentados es acompañado por un aumento de la entropía del sistema, el cual es un fenómeno conocido como *efecto quelato*.^{8,16} Además, la unión covalente de los sitios de unión puede permitir que la interacción del primer sitio aumente la cinética de las interacciones de los sitios subsiguientes. De esta manera, la afinidad del ligando por el sustrato y la estabilidad del complejo formado aumentan conforme se incrementa el orden en el que los sitios de unión se encuentran distribuidos en el espacio, principalmente por contribuciones termodinámicas resultantes de la cooperatividad entre los sitios de unión.

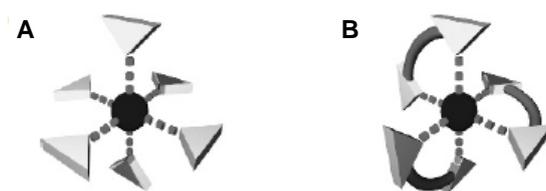


Figura 1.3. Complejos formados por efecto quelato entre un sustrato y ligandos monodentados (A) y bidentados (B).

Los complejos huésped-receptor más simples están compuestos por receptores con sus sitios de unión unidos covalentemente y con una distribución espacial que converge hacia el huésped. Los receptores más simples son de estructura acíclica y se denominan *podandos*. Si bien las interacciones posteriores de los sitios de unión de un podando con

un sustrato están cinéticamente favorecidas luego de que se han establecido las primeras, aun así deben ocurrir cambios conformacionales que acerquen estas posiciones al sustrato (Figura 1.4, A). La movilidad conformacional puede ser minimizada si las posiciones de los sitios de unión se fijan espacialmente mediante enlaces covalentes. Un receptor cuyos sitios de unión se disponen espacialmente en un formato cíclico predefinido se clasifica como *endo-receptor* o *macrociclo*. De esta manera, la termodinámica de complejación de un macrociclo con un huésped se traduce en la formación del complejo más estable debido a que el cambio conformacional requerido es mínimo (Figura 1.4, B). Este fenómeno, más eficiente que el efecto quelato, es conocido como *efecto macrocíclico*.^{8,16}

La unión covalente de fragmentos moleculares lineales como los podandos a estructuras macrocíclicas bidimensionales permite el diseño de receptores tridimensionales. Los receptores con estas cualidades pueden presentar geometrías semi-esféricas o esféricas (Figura 1.4, C y D).

La evolución del mecanismo de reconocimiento molecular desde el efecto quelato hasta el efecto macrocíclico se basa principalmente en la reducción de los grados de libertad de los sitios de unión, lo cual es posible mediante la unión covalente de los precursores. La *pre-organización*, en alusión a la localización espacial de los sitios de unión en estructuras predefinidas, en general favorece la selectividad del reconocimiento molecular y conduce a la formación de complejos más estables debido a que la estructura tridimensional provee una geometría que aísla al huésped del entorno de manera más efectiva. Por esta razón, la *pre-organización* es un factor determinante en el diseño de receptores selectivos.⁴²⁻⁴⁴

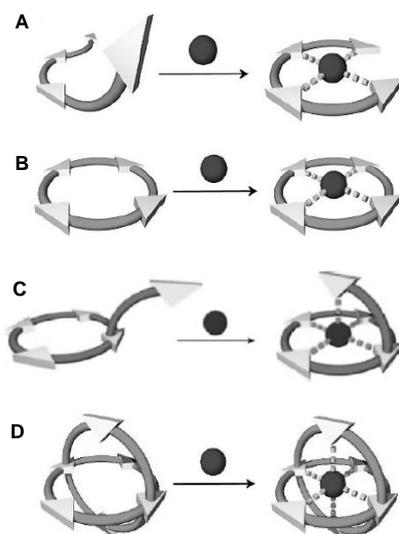


Figura 1.4. Efecto de la pre-organización de los sitios de unión en distintos receptores. A) Podando; B) macrociclo bidimensional; C) y D) macrociclos tridimensionales.

1.4.2. Tipos de complejos supramoleculares

Los complejos supramoleculares pueden ser de tipo auto-ensamblado o huésped-receptor. No obstante, la naturaleza del reconocimiento químico y la complementariedad espacial y química permite la asociación de un receptor con un huésped o en algunos casos intervienen dos o más moléculas receptoras y/o sustratos obteniéndose complejos con una estequiometría superior.¹⁵

Los complejos huésped-receptor pueden presentar el sustrato de menor tamaño incluido en una cavidad tridimensional formando un *endo-complejos* (Figura 1.5: A y B); o bien, próximo a estos micro-entornos como en el caso de los *exo-complejos* (Figura 1.5: C y D).¹⁶ El sustrato puede estar total o parcialmente incluido en la cavidad o permanecer fuera de ella coronando uno de los puertos. El grado de inclusión depende del tipo de interacciones no covalentes que ocurren entre las especies, así como de la complementariedad en forma y tamaño entre la cavidad y el huésped.¹⁶

Tanto los receptores con cavidades como los receptores que presentan sitios de unión con una disposición divergente pueden formar complejos auto-ensamblados en presencia de un huésped (Figura 1.5: E-G y i-iii). El sustrato puede estar entre dos receptores formando un complejo tipo sándwich (E, i), o puede estar incluido en una cavidad auto-ensamblada envolvente (F, ii) o tubular (G, iii).^{16,24}

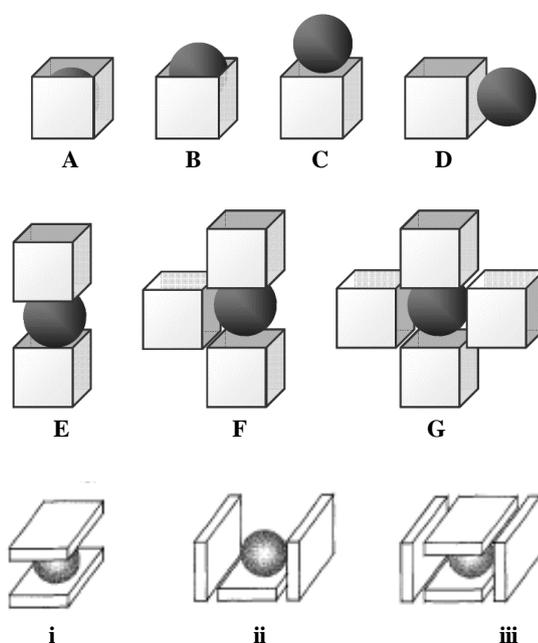


Figura 1.5. Clasificación de los complejos huésped-receptor (A-G) y auto-ensamblados (i-iii) según la relación espacial entre el huésped y el receptor. (A) encapsulado; (B) anidado; (C) suspendido; (D) interacción apolar superficial; (E, i) tipo *sandwich*; (F, ii) envolvente; (G, iii) tubular.

En química huésped-receptor, los sistemas más estudiados son aquellos que involucran receptores con cavidades tridimensionales puesto que la inclusión del huésped en la cavidad y su exclusión del entorno generalmente se traduce en un aumento de la estabilidad del complejo supramolecular formado.^{8,45}

1.5. QUÍMICA MACROCÍCLICA

El ímpetu con el que ha avanzado en los últimos años la Química Macrocíclica⁴⁶ se basa en mimetizar la elevada selectividad de los sistemas biológicos basados en el efecto macrocíclico.^{17,47} Por ejemplo, la clorofila, complejo de magnesio con el macrociclo porfirina, permite que la planta sintetice carbohidratos a partir del CO₂ del aire, mientras que una porfirina complejada con el ion Fe²⁺ genera el grupo hemo que es capaz de transportar el oxígeno en la sangre. Estos casos demuestran que la función biológica de los macrociclos naturales radica en su capacidad de complejar selectivamente sustratos específicos. La química macrocíclica contemporánea reúne la aplicación práctica de la química supramolecular y la química huésped-receptor en pos del diseño racional de receptores macrocíclicos sintéticos que funcionen como sensores altamente selectivos y sensibles.^{40,46}

1.5.1. Tipos de receptores macrocíclicos

Los receptores macrocíclicos pueden consistir en la ciclación de una cadena alifática o un oligómero compuesto por unidades aromáticas, de manera que interacciones adicionales no covalentes pueden actuar cooperativamente en la estabilización del complejo.^{26,29}

La química de macrociclos surge como consecuencia de las mejores propiedades de complejación de los receptores de cadena cerrada con respecto a los acíclicos. Dadas las ventajas de la pre-organización de los sitios de unión, el camino de la química macrocíclica se orientó hacia la obtención de receptores sintéticos más rígidos, con cavidades tridimensionales definidas de mayor volumen y sitios de unión complementarios a los sustratos que se desean complejar de manera de aumentar la estabilidad de los complejos obtenidos.^{40,48}

1.5.1.1. Poli-éteres

Los receptores sintéticos más primitivos, estudiados por Cram, fueron los éteres corona. Este tipo de macrociclos consiste en poli-éteres cíclicos y sus diámetros dependen de la longitud de poli-éter pudiendo precursor (Figura 1.6).⁴⁶ El podando también puede establecer asociaciones con los mismos sustratos que los éteres corona, pero con una

afinidad mucho menor debido a la ausencia de la contribución termodinámica provista por el efecto macrocíclico.^{15,46}

Posteriormente, comenzó a explotarse el diseño de estructuras tridimensionales basadas en éteres corona. La introducción de grupos amino secundarios en los éteres corona permite la unión covalente de poli-éteres lineales dando lugar a receptores *lariat*¹.¹⁶ En este caso, la complejación de sustratos compatibles se traduce en un incremento de la afinidad, la cual es incluso mayor si el brazo libre del éter *lariat* se une al macrociclo para generar un criptando.¹⁶ La tridimensionalidad de estas estructuras permite maximizar la afinidad y estabilidad de los complejos de inclusión con sustratos afines tales como los metales alcalinos.¹⁰

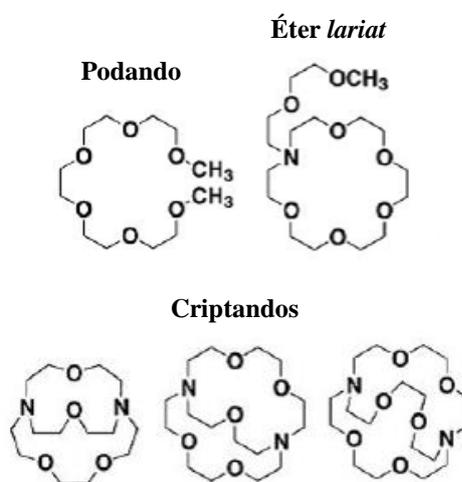


Figura 1.6. Receptores basados en poli-éteres.

1.5.1.2. Esferandos

Este tipo de macrociclo consiste en la unión covalente de anillos aromáticos por las posiciones 1 y 3 delimitando una cavidad esférica altamente rígida.¹⁶ De esta manera, es posible la incorporación de sustratos de distinta naturaleza química y tamaño dado que los electrones π pueden actuar como base de Lewis, establecer interacciones π - π o catión- π , y además existe la versatilidad sintética de incorporar distintos grupos funcionales en la posición 2 de los anillos aromáticos (Figura 1.7). Sin embargo, la rigidez de la cavidad puede conducir a que las velocidades de inclusión y de exclusión del sustrato sean muy

¹ Lazo, en inglés. La estructura de un receptor *lariat* que consiste en un macrociclo con una cadena lateral se asemeja a una cuerda con un lazo en su extremo.

lentas.¹⁶ Cierta movilidad conformacional del receptor favorece el proceso de reconocimiento.¹⁵

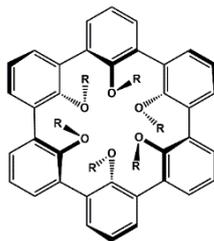


Figura 1.7. Esferando

1.5.1.3. Cavitandos

Los cavitandos comprenden a receptores macrocíclicos naturales como las ciclodextrinas (CD),³⁸ y sintéticos como los cucurbiturilos⁴⁸ y los calixarenos (CA)⁴⁹ (Figura 1.8). Este tipo de macrociclo posee la ventaja estructural de los esferandos en el sentido que delimitan nanocavidades tridimensionales bien estructuradas. Las ciclodextrinas presentan cavidades definidas en forma de cono truncado; el espacio definido por los CA se asemeja a una copa; mientras que la cavidad más globular definida por los cucurbiturilos presenta una forma de barril.^{8,9,50} Además, los cavitandos presentan una flexibilidad mayor permitiendo que el huésped se acomode en la cavidad. Como resultado, la estabilización del complejo huésped-receptor es mayor.^{28,49} A diferencia de los receptores macrocíclicos de generaciones anteriores, los cavitandos incorporan otras características que les permiten mimetizar con mayor fidelidad los mecanismos de reconocimiento naturales.¹⁷ Los principios de llave-cerradura y de encaje inducido que explican el reconocimiento de sustratos por las enzimas también se reflejan en la química huésped-receptor de macrociclos sintéticos.¹⁷

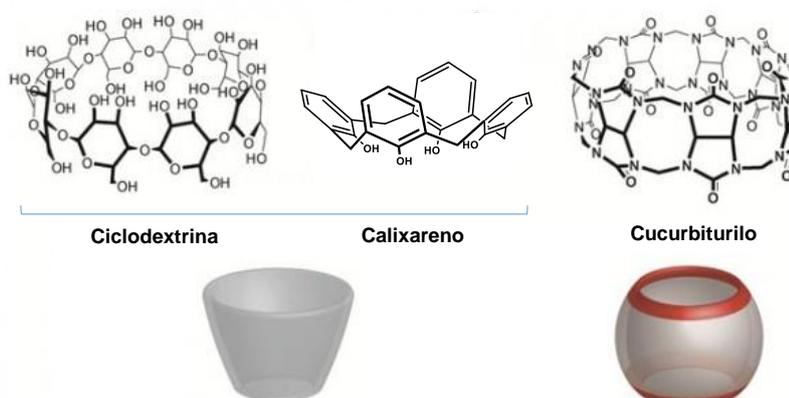


Figura 1.8. Algunos receptores macrocíclicos cavitandos.

Ciclodextrinas

Las CD, comúnmente usadas en la formación de complejos con moléculas orgánicas, son oligómeros cíclicos constituidos por unidades de α -D-(+)-glucopiranosas unidas mediante enlaces α -(1,4')-glicosídicos. Las CD nativas denominadas α CD, β CD y γ CD presentan 6, 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente.¹⁶ Estos macrociclos presentan una estructura ligeramente cónica con una cavidad hidrofóbica y dos aberturas de diferentes dimensiones: la mayor rodeada por grupos hidroxilos secundarios, y la menor, por grupos primarios (Figura 1.9).⁸ Estos receptores naturales presentan afinidades y selectividades excepcionales frente a ciertos huéspedes por lo que actualmente muchos sensores los incorporan en combinación con receptores sintéticos.³⁸

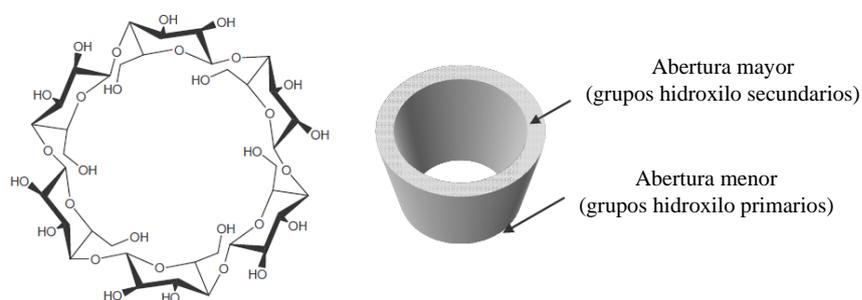


Figura 1.9. Estructura química de β CD (izquierda) y representación de la forma de la cavidad definida (derecha).

Calixarenos

Los CA son macrociclos constituidos por anillos fenólicos unidos por grupos metileno (Figura 1.10). En relación al nombre trivial calix[n]areno, el prefijo *calix* denota la semejanza entre la forma de la cavidad y un cáliz; el sufijo *areno* se refiere a los grupos arilos y, entre estos términos, se especifica el número (n) de unidades monoméricas que forman la estructura macrocíclica. Los CA más comunes son C4A, C6A y C8A con 4; 6 y 8 unidades monoméricas, respectivamente. Los CA presentan dos aberturas o portales de dimensiones y polaridades distintas: una mayor rodeada por los *para*-sustituyentes de los grupos arilos (por ej., SO_3^- , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) y otra menor que presenta grupos hidroxilo (OH).^{49,51,52}

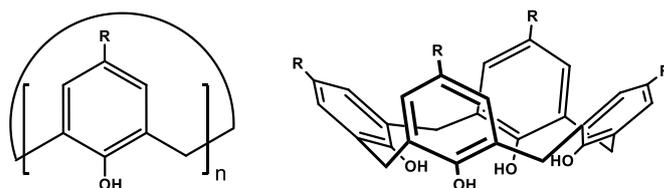


Figura 1.10. Estructuras químicas de la unidad monomérica de CnA (izquierda) y de C4A (derecha).

Los CA actúan como receptores macrocíclicos formando complejos y estructuras auto-ensambladas con una amplia variedad de sustratos neutros e iónicos mediante diversos tipos de interacciones.⁵³ Los grupos arilos de los CA favorecen las interacciones π - π , catión- π y anión- π , mientras que los grupos OH permiten interacciones ion-ion, ion-dipolo y puente hidrógeno.^{54,55} Los calixarenos se han empleado para el reconocimiento, la cuantificación analítica y la separación de iones alcalinos, alcalinos térreos, amonios, metales de transición, de algunos aniones inorgánicos y moléculas orgánicas, entre otras.⁵⁶⁻⁵⁸

Cucurbiturilos

Los cucurbit[n]urilos (CBn, n representa el número de unidades monoméricas) constituyen una familia de macrociclos sintéticos formados por unidades dimetanoglicolurilo (Figura 1.11). Los receptores más comunes presentan 5 a 7 unidades monoméricas (CB5 – CB7).⁴⁸ Estos compuestos presentan un esqueleto de átomos de carbono y nitrógeno que define una estructura altamente rígida y simétrica con una cavidad. La parte interior de la cavidad es hidrofóbica, mientras que los portales están rodeados por grupos carbonilos que permiten interacciones ion-dipolo y puente hidrógeno.¹⁶ Estas notables propiedades confieren a los CBn la capacidad de actuar como receptores para formar complejos estables con diversas especies químicas, tales como moléculas neutras, catiónicas e inclusive radicales cationes, y como bloques de construcción de arquitecturas supramoleculares más complejas.⁴⁸

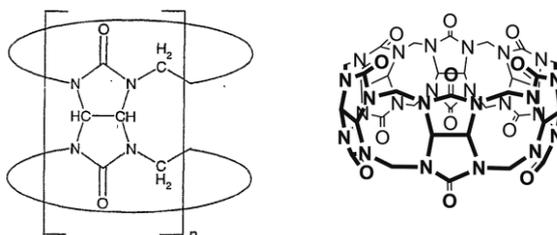


Figura 1.11. Estructuras químicas de la unidad monomérica de CBn (izquierda) y de CB6 (derecha).

1.6. QUÍMICA HUÉSPED-RECEPTOR EN SOLUCIÓN

1.6.1. Efecto hidrofóbico

El equilibrio de complejación en el que un sustrato se incluye en la cavidad de un macrociclo resulta en la formación de un complejo que se comporta como una especie independiente. Sin embargo, la combinación de dos especies para generar una sola es un proceso entrópicamente desfavorable. En la química huésped-receptor en solución, los receptores cavitandos se caracterizan por presentar cavidades con una polaridad inferior a la del medio circundante y ocupada por moléculas de solvente. La inclusión de una molécula huésped de polaridad adecuada requiere la expulsión del solvente de la cavidad y la desolvatación del sustrato, de manera que la entropía del sistema aumenta favoreciendo la formación del complejo (Figura 1.12). El *efecto hidrofóbico* que favorece al sustrato incluido con respecto al sustrato libre generalmente se engloba dentro de las fuerzas no covalentes que posibilitan la formación de complejos supramoleculares. La selección del solvente puede jugar un rol crucial dado que si su polaridad es mayor que la del sustrato puede favorecer su inclusión dentro de la cavidad hidrofóbica cuya polaridad es inferior.^{27,59,60}

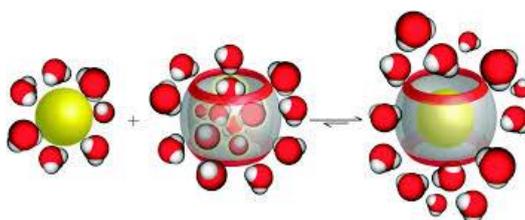


Figura 1.12. Representación del efecto hidrofóbico en la formación de un complejo huésped-receptor.

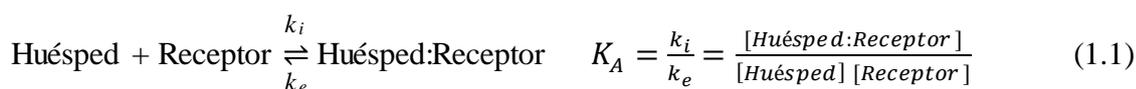
1.6.2. Aspectos termodinámicos y cinéticos

Los sistemas auto-ensamblados y los complejos huésped-receptor son estructuras independientes y dinámicas debido al carácter supramolecular de las fuerzas de unión involucradas. Las interacciones no covalentes permiten que los componentes de los sistemas se encuentren en un equilibrio de asociación-disociación gobernado por una constante termodinámica, la *constante de asociación, de afinidad o de complejación* (K_A) (Ec. 1.1).³⁰ El parámetro K_A también resulta del cociente entre las constantes de velocidad de las reacciones de inclusión (k_i) y de exclusión (k_e) de un huésped (Ec. 1.1).⁸ Muchos equilibrios supramoleculares son dependientes del tiempo. Los más lentos generalmente

involucran receptores altamente rígidos (ej., esferandos) que ocasionan que las velocidades de complejación k_i y k_e sean muy bajas dado que la rigidez estructural no permite que el receptor se adapte a la forma y tamaño del huésped.³⁰ Por otra parte, los receptores macrocíclicos con mayor movilidad conformacional (ej., ciclofanos) presentan velocidades k_i y k_e mayores en presencia de un huésped, y el equilibrio de complejación se alcanza más rápido.³⁴

La constante K_A indica la estabilidad del agregado o complejo y está relacionado con la energía libre de complejación (ΔG) mediante la Ec. 1.2.^{15,30} La formación de una entidad supramolecular puede estar gobernada principalmente por factores entálpicos (ΔH), entrópicos (ΔS), o bien, una combinación de ambos (Ec. 1.3).^{55,61,62}

Los efectos entrópicos y entálpicos entre huésped y receptor y de estas especies con el medio circundante determinan la magnitud con la que la asociación ocurre y la estabilidad del complejo supramolecular. El aporte entálpico depende principalmente de la complementariedad química entre los sitios de unión de las especies, el número de interacciones establecidas, su cooperatividad y de la energía invertida en el desplazamiento de otras moléculas (solvente) que ocupan los sitios de unión.^{15,29,31} La contribución entálpica puede estar maximizada o minimizada según los efectos entrópicos que tengan lugar conforme ocurren el proceso de reconocimiento molecular. La pre-organización es un factor determinante en este aspecto.⁴² Los receptores acíclicos presentan un mayor número de grados de libertad en su estado libre que disminuyen debido al ordenamiento de los sitios de unión en torno al sustrato.⁸ Los receptores diseñados con un mayor grado de organización estructural como los macrociclos poseen sus sitios de unión en posiciones fijas y el movimiento conformacional es mínimo, lo que favorece la asociación molecular.¹⁵



$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (1.2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.3)$$

T , temperatura; R , constante de gases ideales.

Las actividades de las especies en solución (a) están relacionadas con sus concentraciones molares mediante $a \approx \gamma[c]$, donde γ es el coeficiente de actividad de la especie.¹⁵ Las soluciones de sistemas supramoleculares se consideran ideales (especies involucradas con $\gamma \approx 1$), de manera que el análisis en términos de las concentraciones químicas de las especies es válido.⁶³

Entre los factores que pueden favorecer el aumento de concentración del complejo se pueden mencionar la derivatización del macrociclo de manera de incorporar en forma racional los sitios de unión químicamente compatibles con los del sustrato específico que se pretende complejar.^{9,46} Por ejemplo, la afinidad por cationes puede ser incrementada incorporando grupos aniónicos al macrociclo como sulfonatos;⁶⁴ o bien, grupos amonio para favorecer la complejación de aniones.^{65,66} También se pueden explotar las propiedades químicas del monómero que delimita la cavidad. Si éstos presentan grupos sensibles al pH, la generación de distintas especies ácido-base puede ser útil para modular la complejación con distintos sustratos.^{67,68} El mismo principio aplica para modificar la afinidad química del huésped por el receptor. Además, la magnitud de la interacción puede ser manipulada por otras variables tales como la polaridad del medio, la temperatura, la fuerza iónica, etc.^{32,59,69}

En la química huésped-receptor, la selectividad de un receptor frente a dos o más sustratos distintos se expresa como el valor relativo entre las constantes termodinámicas o los valores de ΔG del receptor con cada sustrato en las mismas condiciones.^{16,28,70} La selectividad hacia un determinado sustrato o hacia una familia de sustratos puede ser incrementada mediante el diseño racional de receptores o modificando las condiciones del medio químico.⁷⁰

1.6.3. Métodos de determinación de constantes de asociación

Distintas técnicas instrumentales permiten determinar la concentración de complejo formado en función de la concentración del huésped mientras que la del receptor se mantiene constante, o viceversa. Mediante este procedimiento de *titulación supramolecular* es posible determinar el valor de K_A a partir de los cambios fisicoquímicos resultantes de la formación de nuevas especies (liberación/absorción de calor, propiedades espectroscópicas, tiempo de retención cromatográfico, etc.).^{30,63}

En general, la interacción supramolecular por formación de complejos entre determinados sustratos y receptores macrocíclicos puede afectar las propiedades espectroscópicas de uno o ambos componentes y traducirse así en una determinación selectiva debido al reconocimiento molecular que se establece.^{1,30,63} La representación gráfica de cualquier señal analítica en función de la concentración de huésped (o receptor) en presencia de un receptor (o huésped) permite la determinación de K_A asociada al equilibrio supramolecular.³⁰ Algunas técnicas presentan ventajas notables debido a su elevada sensibilidad tales como la espectroscopias UV-visible y de fluorescencia.^{43,71} Sin embargo, en muchas ocasiones la selectividad analítica es baja debido a la superposición de bandas que impiden asociar el cambio de señal a una única especie.¹⁸ Otras técnicas más selectivas como RMN e IR permiten registrar los cambios ocurridos en torno a ciertos sitios

de unión involucrados en el proceso de reconocimiento molecular y obtener información no solo termodinámica, sino además estructural acerca del complejo formado.^{30,72}

La formación de un complejo huésped-receptor puede ser evaluada variando la concentración del sustrato a una concentración constante del receptor, o viceversa. Conforme el sustrato y el receptor se complejan, las señales correspondientes a las especies libres disminuyen; mientras que otras señales pueden aparecer indicando la formación de nuevas especies, los complejos con distintas estequiometrías 1:1; 1:2; 2:1, etc. La representación gráfica de la variación de la señal analítica del sustrato en función de la concentración del receptor, o viceversa, describe una tendencia hiperbólica donde el cambio de la señal es máximo a bajas concentraciones y disminuye gradualmente hacia concentraciones mayores hasta volverse constante. En esta situación, la concentración total de la especie limitante se encuentra complejada y el cambio registrado de la señal analítica es máximo. Sin embargo, en la práctica a veces ciertas limitaciones instrumentales (ej., intervalo de lectura) o fisicoquímicas (ej., solubilidad) no permiten alcanzar la concentración de sustrato o receptor a la cual la señal analítica permanece constante.³⁰

La selección de la técnica más conveniente depende de las propiedades intrínsecas de las especies en solución.⁶³ Por ejemplo, si el complejo formado es fluorescente, la espectroscopia de fluorescencia será la técnica fundamental para evaluar su formación. De esta manera, la señal analítica obtenida resulta sensible a la variación de la concentración del complejo. No obstante, en ocasiones la afinidad termodinámica entre sustrato y receptor es grande, pero el cambio analítico asociado resulta pequeño debido a que los sitios de unión involucrados en el proceso de reconocimiento no son sensibles a la técnica empleada.¹⁵ En este sentido, los receptores pueden ser diseñados para que una o múltiples respuestas específicas (óptica, electroquímica, mecánica, etc.) resulten del proceso de reconocimiento molecular, explotando así las ventajas analíticas de una o varias técnicas.¹

Las aplicaciones de la química huésped-receptor en solución para el reconocimiento molecular de analitos diversos se ha enfocado en el desarrollo de metodologías simples, rápidas y de bajo costo que permitan realizar análisis sensibles y confiables.^{10,44,73} Los aportes de la química macrocíclica son indispensables para el desarrollo racional de receptores que incluyan sub-estructuras sensibles según las técnicas analíticas.^{11,19} Además, la funcionalización de receptores para incluir sitios de unión complementarios a los sustratos que se pretenden analizar puede mejorar drásticamente su aplicabilidad aumentando la sensibilidad y la selectividad.^{46,64}

1.7. QUÍMICA ANALÍTICA SUPRAMOLECULAR

La Química Supramolecular se ha basado en el estudio y en el uso de receptores sintéticos como una manera de mimetizar la capacidad de reconocimiento molecular de los receptores naturales.^{17,74,75} El creciente desarrollo de receptores que permiten alcanzar niveles de detección en concentraciones cada vez más bajas, reconocimientos cada vez más inequívocos, incluso en presencia de interferentes, ha encontrado numerosas aplicaciones en el campo de la Química Analítica.^{30,38,51,57,76} En 2007, Eric Anslyn bautizó un nuevo campo de la Química Supramolecular con el nombre de Química Analítica Supramolecular dado el notable aumento en los últimos años de aplicaciones analíticas basadas en interacciones o sistemas supramoleculares.¹¹ La química analítica supramolecular como campo multidisciplinario reúne las áreas de la química macrocíclica con su desarrollo de receptores sintéticos novedosos, la química huésped-receptor y de los sistemas auto-ensamblados que engloban al reconocimiento molecular, y la química analítica.¹

1.7.1. Principios de la química analítica supramolecular

Las señales químicas que generan los receptores sintéticos están relacionadas con las propiedades químicas de sus precursores unidos covalentemente.^{19,40,77} Por ejemplo, el pre-diseño de sistemas organizados produce notables efectos sobre las propiedades termodinámicas y cinéticas respecto a las especies menos organizadas.¹⁵ Además, las propiedades espectroscópicas y químicas, como el potencial redox y la actividad ácido-base, varían y el cambio se asocia al efecto macrocíclico.^{78,79} Los cambios en las señales químicas de los receptores con respecto a las de sus precursores indican que las propiedades químicas y estructurales de las nuevas especies son sustancialmente diferentes.⁵⁴ Un receptor cuya señal analítica cambia de manera sensible ante la adición de un analito cumple con el requisito principal para funcionar como quimiosensor.^{1,18} La transducción de una señal química generada por el reconocimiento molecular en una señal instrumental sensible es el fundamento de la química analítica supramolecular.^{1,73,80} El uso analítico de receptores macrocíclicos como quimiosensores permite una determinación selectiva de especies químicas con un menor efecto de los interferentes debido al reconocimiento molecular requerido, un tratamiento menos exhaustivo de la muestra que contiene el analito y una mejora en la sensibilidad de la detección.^{48,57,58}

1.7.2. Determinaciones selectivas directa e indirecta de un único analito

La señal analítica producida por un evento de reconocimiento molecular en el caso más simple dependerá de la afinidad entre los sitios de unión del huésped y del receptor. No obstante, a través de la funcionalización del receptor es posible incorporar subestructuras que funcionan como indicadores capaces de tornar más sensible y selectiva la

determinación de un determinado analito.^{40,81} El ensamble entre un receptor y un indicador unidos covalentemente entre sí por un espaciador permite una transducción más sensible de la señal química debido a la capacidad de reconocimiento del indicador de la interacción analito-receptor (Figura 1.13).¹¹ El desarrollo de receptores tipo receptor-espaciador-indicador según los analitos que se pretenden detectar ha motivado el “arte químico” que caracteriza a la química macrocíclica debido a la complejidad de las estructuras sintetizadas.

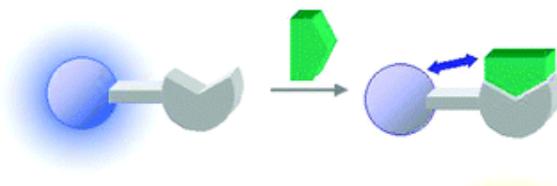


Figura 1.13. Representación de la determinación directa de un analito con un receptor-espaciador-indicador.

Una alternativa para los sensores tipo receptor-espaciador-indicador consiste en la ausencia del espaciador y en su lugar se emplea la asociación no covalente entre el receptor y el indicador. Cuando el indicador se encuentra complejado, no se observa una señal analítica; mientras que en presencia de un analito con una afinidad mayor por el receptor, el indicador es desplazado y se registra una señal analítica originada por la especie libre (Figura 1.14). El proceso de desplazamiento del indicador por el analito ocurre mediante un mecanismo de unión competitiva en el que ambos sustratos presentan afinidad por el receptor, pero la selectividad hacia el analito es mayor.^{1,47,82}

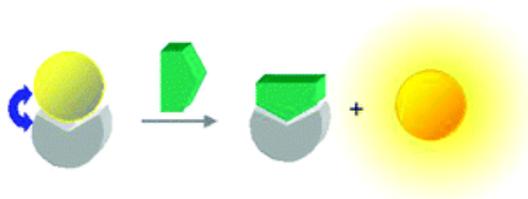


Figura 1.14. Representación de la determinación indirecta de un analito mediante desplazamiento de un indicador complejado con el receptor.

1.7.3. Determinación de múltiples analitos con receptores diferenciales

En la química de detección tradicional, un receptor se diseña y optimiza con el objeto de reconocer un analito en particular, por lo que la especificidad del receptor es

crucial. Sin embargo, la detección de múltiples analitos en matrices complejas donde distintas moléculas pueden presentar afinidades similares por un mismo receptor dificulta una determinación específica. Una alternativa consiste en empleo de múltiples receptores con los cuales los analitos establecen interacciones con distintas afinidades (Figura 1.15). En este tipo de estudio se evalúan las respuestas de las afinidades de un dado analito con los distintos receptores, obteniéndose un patrón de señales característica para cada analito evaluado. Distintos patrones de señales generados por analitos diferentes permiten que la discriminación e identificación de los analitos presentes en una muestra compleja de multi-componentes sea posible.^{1,11}

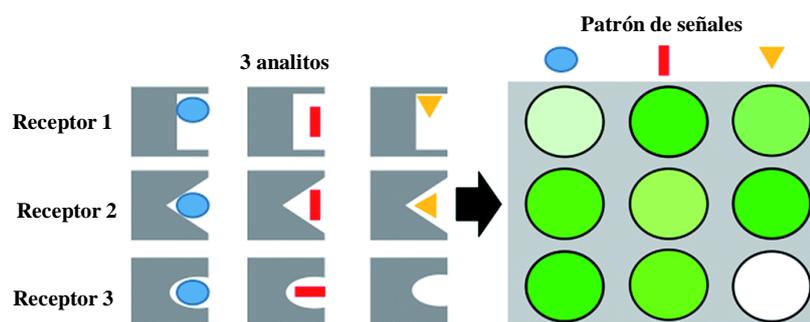


Figura 1.15. Representación de la detección diferencial de tres analitos en presencia de tres receptores diferentes.

1.7.4. Aplicaciones analíticas de receptores macrocíclicos

La química analítica supramolecular ofrece una manera novedosa y eficiente para el monitoreo, detección, cuantificación y remoción de sustancias procedentes de procesos tecnológicos, agropecuarios, residuos urbanos, e incluso, contaminantes emergentes como los nanomateriales.^{6,83} En general, los contaminantes incluyen especies químicas de distinta naturaleza como iones orgánicos e inorgánicos, metales, herbicidas, pesticidas, fármacos y sus productos de degradación natural, que pueden presentar diversos efectos negativos sobre la vida del Hombre, los animales y los reservorios ambientales (agua, suelo y aire).^{18,84} Frente a este panorama, la combinación entre sistemas organizados supramoleculares y métodos altamente sensibles ofrece una alternativa práctica para el estudio y la determinación de estos compuestos de relevancia en diversas disciplinas, como la agronomía, la biología, la farmacia, la química ambiental, química de los alimentos, etc.^{18,44,81,85,86}

En el grupo de investigación en el cual se desarrolló este trabajo de tesis doctoral, anteriormente se evaluó el rol de receptores macrocíclicos como ciclodextrinas, calixarenos y cucurbiturilos como quimiosensores de diferentes analitos. La incorporación de grupos

cromóforos y/o fluoróforos en las estructuras de los analitos o de los receptores estudiados permite detectar cambios en sus espectros de absorción UV-visible y de emisión de fluorescencia debido al reconocimiento molecular que se establece. Los cambios espectroscópicos observados permitieron el desarrollo de métodos analíticos simples, rápidos, de bajo costo para la determinación analítica y la cuantificación en matrices reales de estos sustratos. Se ha estudiado la interacción de ciclodextrinas con compuestos indólicos⁸⁷⁻⁸⁹ y con pesticidas carbamatos,^{90,91} y de HAPs con cucurbiturilos.^{69,92} En función de la intensificación fluorescente producida por el receptor se han desarrollado métodos analíticos con muy buenos límites de detección del orden de 0,3-0,5 ng/mL para los indoles y los HAP, y de 2-15 ng/mL para los pesticidas. Por otra parte, se ha reportado la ventaja medioambiental que significa el uso de ciclodextrinas en reemplazo de solventes orgánicos. Se ha estudiado la interacción de p-sulfonatocalix[8]areno con sondas fluorescentes en busca de establecer el mecanismo del proceso y su aplicación analítica. Si bien estos estudios han sido realizados en medios acuosos, también se han estudiado las aplicaciones de p-t-butilcalixarenos y p-t-butiltiacalixarenos en medios acuoso-orgánicos como sensores de moléculas orgánicas e inorgánicas.⁹³

1.8. RESORCINARENOS

1.8.1. Comparación entre calixarenos y resorcinarenos

Los CA son receptores macrocíclicos pertenecientes a la familia de los ciclofanos. Las estructuras de los ciclofanos comprenden anillos aromáticos unidos por puentes alifáticos y delimitan una endocavidad.^{94,95} En el caso de los CA, la cavidad es delimitada por unidades de fenol unidas entre sí por puentes metileno en las posiciones *meta*. Cuando el monómero fenólico es un 3-hidroxifenol (resorcinol), se origina una nueva familia de ciclofanos denominados *calixresorcinarenos*, o simplemente *resorcinarenos* (RA),^{II} y en este caso los arilos están unidos por puentes metileno en las posiciones 4 y 6 (Figura 1.16).⁵³

La síntesis convencional de CA involucra la condensación catalizada por bases entre fenol y formaldehído en condiciones de alta dilución para favorecer la ciclización. El número de unidades fenólicas que componen el macrociclo puede ser manipulado durante el proceso de síntesis. De esta manera, es posible obtener CA compuestos por unidades monoméricas que van desde cuatro hasta ocho. Los RA se obtienen mediante la ciclocondensación catalizada por ácidos entre resorcinol y un aldehído alifático o aromático, y la relación de reactivos en el producto obtenido es 4:4 con la pérdida de cuatro moléculas

^{II} La nomenclatura IUPAC de los resorcin[4]arenos es 2,8,14,20-tetraalquilpentaciclo [19.3.1.1^{3,7}.1^{9,3}.1^{15,19}] octacos-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaeno-4,6,10,12,16,18,22,24-octol.

de agua.^{96,97} El mecanismo químico que conduce la reacción genera como único producto termodinámico el tetrámero cíclico. Los macrociclos formados por cuatro unidades de resorcinol se identifican con el nombre *resorcin[4]areno* (Figura 1.16).^{96,98-100} En la literatura se han descrito los procedimientos para obtener otros resorcin[n]arenos con $n = 5$ y 6 aunque con bajos rendimientos.^{101,102} El empleo de aldehídos de variada naturaleza permite la incorporación de nuevas funcionalidades químicas en la estructura del RA que sustituyen un átomo de hidrógeno de cada puente metileno. La identidad del grupo funcional se denota en el nombre *resorcin[4]areno* anteponiendo *C-alkil* o *C-aril* según la naturaleza química del sustituyente.¹⁰⁰ Las cavidades delimitadas por ambos ciclofanos poseen formas similares muchas veces comparada con una canasta de básquet con dos portales o bocas de distintos diámetros. Sin embargo, para un mismo número de unidades monoméricas, la cavidad de los RA es más ancha y de menor profundidad que la de los CA.⁸ La incorporación de puentes alifáticos entre los grupos arilo aporta una flexibilidad estructural superior, comparado con otros macrociclos como los esferandos, de manera que diferentes conformaciones de CA y RA coexisten en equilibrio.^{103,104} La movilidad conformacional de los RA es significativamente mayor que la de los CA dada la menor barrera de energía libre de activación conformacional medida para macrociclos de unidades equivalentes ($\Delta G^{\#}_{CA} / \Delta G^{\#}_{RA} = 3,6$).¹⁰⁵

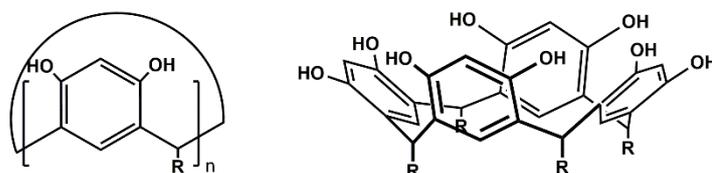


Figura 1.16. Estructuras químicas de la unidad monomérica de resorcin[n]arenos (izquierda) y de C-resorcin[4]areno (derecha, R=alquilo o arilo).

Los RA poseen 8 grupos hidroxilo sobre el portal superior de mayor diámetro y cuatro sustituyentes derivados del aldehído precursor unidos a la abertura inferior de menor diámetro. En los C4A la situación es opuesta: 4 grupos hidroxilo están posicionados sobre el portal inferior de menor diámetro y las posiciones *para* de los arilos sobre la abertura superior de mayor diámetro pueden ser sustituidas por grupos funcionales tales como *t*-butilo o $-SO_3H$ (Figura 1.10). La presencia de los grupos hidroxilo convierte a estos macrociclos en ácidos polipróticos y sus solubilidades en medios acuosos es mayor en condiciones básicas. La acidez en medio acuoso de CA y RA es mayor con respecto al fenol y al resorcinol, respectivamente, y este comportamiento se atribuye al efecto macrocíclico que modifica el comportamiento químico del monómero cuando forma parte del arreglo cíclico.^{78,105-108} Las modificaciones de las propiedades de los sitios de unión

tienen efectos notorios en la capacidad de reconocimiento molecular de los RA (Figura 1.17).¹⁰⁹

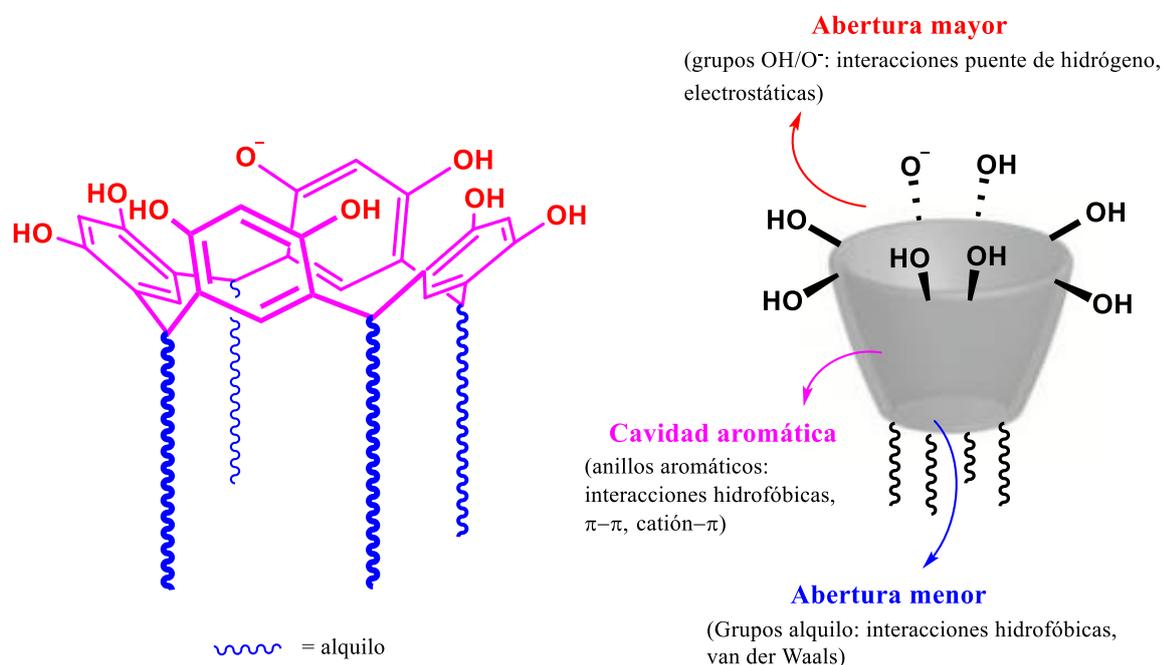


Figura 1.17. Representaciones de un C-alquilresorcin[4]areno (izquierda) y de la cavidad definida con sus posibles sitios de unión (derecha).

La capacidad de reconocimiento molecular de los RA puede ser modificada mediante la funcionalización de los macrociclos. Las derivatizaciones de los RA se llevan a cabo principalmente con el objetivo de modificar el tamaño de la cavidad, alterar el número y naturaleza de los sitios de unión y para incrementar la rigidez de los macrociclos originalmente más flexibles. Las posibilidades de derivatización y funcionalización de los RA son muy amplias, lo cual permite a menudo que sus propiedades de reconocimiento sean mejoradas.¹¹⁰ La incorporación de sitios de unión o sub-estructuras que funcionen como indicadores ópticos permite mejorar la afinidad y selectividad de los RA frente a ciertos sustratos,¹⁰⁹ o bien, generar señales analíticas más sensibles (Sección 1.7.2.2).¹¹¹⁻¹¹³ Además, la versatilidad sintética de estos macrociclos ofrece variadas alternativas para la modificación de sus características fisicoquímicas tales como la solubilidad,^{107,114,115} comportamiento ácido-base y propiedades espectroscópicas.¹¹² Las posiciones disponibles en las estructuras de RA que pueden ser funcionalizadas se muestran en la Figura 1.18.^{53,116-118}

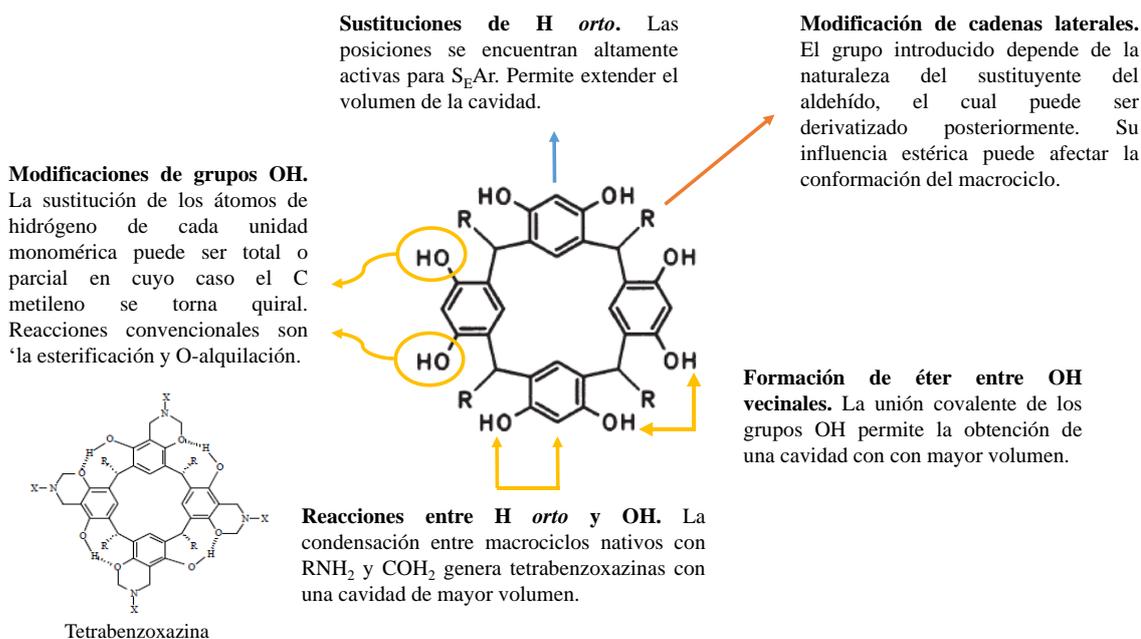


Figura 1.18. Modificaciones sintéticas posibles de resorcinarenos.

1.8.2. Ampliación de la cavidad y cápsulas moleculares

La cavidad de RA provee un sitio para la interacción con especies orgánicas y la selectividad para un analito particular puede controlarse alterando el volumen de la cavidad o los grupos sustituyentes periféricos. La unión covalente entre grupos hidroxilo vecinos de los RA (RA puenteados) permite ampliar el volumen de la cavidad a su vez que se reducen los grados de libertad de la movilidad estructural. Además, nuevos sitios de unión pueden ser introducidos mejorando la afinidad hacia ciertos analitos.^{27,27,119} La unión covalente entre los RA puenteados permite la síntesis de cápsulas moleculares cuyas cavidades presentan grandes volúmenes con la capacidad de albergar sustratos voluminosos.^{119,120} Se han reportado aplicaciones de estas cápsulas como nano-reactores que catalizan las reacciones de las moléculas encapsuladas.⁵⁶

1.8.3. Resorcinarenos en estructuras auto-ensambladas

La síntesis de RA empleando aldehídos de cadena larga permite la obtención de macrociclos anfífilicos que forman monocapas, bicapas y films de Lagmuir-Blodgett (LB).¹²¹⁻¹²³ La formación de monocapas auto-ensambladas en la interfase agua-aire ocurre en forma espontánea debido a las interacciones de van del Waals favorables entre las cadenas alifáticas lipofílicas. La cavidad de los macrociclos organizados en la interfase permite el reconocimiento molecular selectivo de sustratos que se encuentren disueltos en la fase acuosa. Recientemente se han fabricado films de espesores controlados de

determinados RA usando la técnica de LB y se han demostrado sus aplicaciones para el estudio de diversos analitos.^{122,124}

1.8.4. Complejos supramoleculares con resorcinarenos

La nanocavidad de los RA permite la inclusión de sustratos de variada naturaleza química por interacciones huésped-receptor. Estudios reportados en la literatura demuestran sus aplicaciones como sensores químicos de iones metálicos,¹²⁵ cationes orgánicos⁶⁰ e inorgánicos,¹²⁶ aniones¹²⁷ y aminoácidos.^{74,112} Las interacciones han sido evidenciadas por diversas técnicas como IR,¹²⁸ RMN,^{74,129} UV-visible,¹³⁰ dicroísmo circular,³⁷ emisión de fluorescencia,^{131,132} ITC,^{74,75} resonancia del plasmón superficial¹³³ y microbalanza de cristal de cuarzo,¹³⁴ entre otras.

La incorporación de grupos polares como carboxilatos, ésteres, aminas, amidas y tioles unidos covalentemente a los grupos OH permite establecer fuertes interacciones con iones metálicos.^{65,116,135,136} En varias publicaciones se informan sus aplicaciones en experimentos de extracción líquido-líquido,¹³⁷ separaciones de cationes metálicos^{125,138} y preconcentración. Los RA derivatizados con ácido hidroxámico han demostrado excelente selectividad por vanadio y ciertos lantánidos y actínidos. La funcionalización de C-tetranonil resorcin[4]areno con acetilhidrazona permitió la extracción líquido-líquido de metales alcalinos, alcalino-térreos, de transición y algunos lantánidos. La incorporación de grupos etilmetilo en la posición orto demostró afinidad altamente selectiva frente Ag^+ y Pb^{2+} en acetonitrilo, mientras que en metanol la interacción ocurre con Ag^+ y Cu^{2+} .

Las inclusiones de aniones como sulfato, PF_6^- , borato y tetrasulfonato de pirrol en la cavidad de C-pentilresorcin[4]areno y su derivado puenteado de variada funcionalidad fueron evidenciadas mediante ESI-FTICR-MS. Las interacciones anión-cavitando es mediada por interacciones entre los protones del puente acetal y el anión.¹³⁹

La posibilidad de modificación de la carga formal del RA por desprotonación de los grupos hidroxilo permite la generación de mono-fenolatos hasta tetra-fenolatos. El tetra-fenolato de resorcin[4]areno presenta una afinidad excepcional frente a metil-trialquilamonios en medio básico con constantes de asociación que superan a la de los sistemas biológicos. El aumento de la longitud de cadena de los grupos alquilo del amonio produce una disminución de la constante de asociación. La dependencia de la interacción con la distancia que separa las cargas del receptor y el sustrato es indicativa de que la asociación es predominantemente electrostática. La posibilidad de desprotonación de los RA les otorga una alta selectividad hacia cationes orgánicos, principalmente alquil-trimetilamonios, y esta afinidad en muchos casos aumenta debido a la cooperatividad entre distintos sitios de unión entre sustrato y receptor.^{98,105} La acetil colina es un

neurotransmisor que interacciona fuertemente con el tetrafenolato de C-metilresorcin[4]areno. El mecanismo de hidrólisis del grupo acilo de la acetil colina involucra la estabilización del estado de transición por interacción electrostática intramolecular con el grupo trimetilamonio. En presencia del macrociclo, el grupo amonio de la acetil colina establece una asociación electrostática con el tetrafenolato inhibiendo de esta manera la hidrólisis del éster.¹⁴⁰

La complejación con moléculas neutras polares ha sido demostrada mediante experimentos de extracción de poli-alcoholes como la D-ribosa desde medio acuoso hacia CCl₄ que contienen disuelto un resorcinareno anfifílico como C-undecil resorcin[4]areno. La D-ribosa existe en solución principalmente como α y β -piranosa (anillo de 6 miembros) o como α y β -furanosa (anillo de 5 miembros), donde α y β indican la configuración relativa cis o trans del OH unido a C1. La complejación evidenciada por RMN indica que C-undecilresorcin[4]areno sólo extrae α -piranosa debido a la orientación cis de los OH sobre C1 y C4. Este resultado indica que las interacciones puente de hidrógeno entre grupos OH de la ribosa y el resorcinareno contribuyen principalmente al reconocimiento molecular.^{105,141} Las interacciones azúcar-resorcinareno también se estudiaron en medio acuoso empleando macrociclos solubles derivatizados con grupos alquil-sulfonatos.^{142,143} En este caso, la complejación es conducida principalmente por el efecto hidrofóbico y la estabilización de los azúcares aumenta conforme se incrementa la basicidad π del macrociclo por funcionalización con grupos donadores de carga debido a interacciones CH- π . Las mismas interacciones cumplen un rol fundamental en la interacción de resorcinarenos solubles con aminoácidos donde la afinidad es mayor por aquellos con cadena lateral apolar alifática o aromática y menor con los aminoácidos que presentan una cadena polar.¹⁴⁴

1.8.5. Aplicaciones prácticas de resorcinarenos

El potencial de la inclusión selectiva que ofrecen los resorcinarenos ha sido explotado, por ejemplo, en la derivatización de columnas cromatográficas de HPLC, como agente de extracción en fase sólida y en el recubrimiento de electrodos para el desarrollo de análisis electroquímicos.⁷⁶

El tetrametilensulfonato-resorcin[4]areno y el tetraaminometil-resorcin[4]areno presentan elevada actividad catalítica en la hidrólisis de ésteres del ácido fosfórico, mientras que los RA derivatizados con ácido sulfónico catalizan en forma eficiente la aminación por deshidratación de alcoholes en agua.¹⁰⁰

Existen otras aplicaciones de RA que involucran su comportamiento como cristales líquidos, la formación de canales ionóforos,¹⁴⁵ vidrios moleculares resistentes,

agentes antirradicalarios y antioxidantes multifuncionales y materiales fotorresistentes.^{76,100}

La utilización de RA y sus derivados estructurales brinda una amplia gama de aplicaciones que actualmente son explotadas en diversos campos tales como la medicina, la biología, la química, la tecnología, entre otros. En particular, la química de los resorcinarenos vislumbra un futuro prometedor en el marco de la química analítica supramolecular. Sin embargo, en la actualidad el estudio de las aplicaciones analíticas de RA son escasos comparado con otros macrociclos como los CA y las ciclodextrinas.

En base a los antecedentes mencionados, se establecieron los objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral.

1.9. OBJETIVOS DE LA TESIS

1.9.1. Objetivo general

La aplicación de los RA en el área de la Química Analítica Supramolecular no ha sido tan explotada como la de los CA. Por esta razón, resulta novedoso desarrollar nuevos métodos analíticos basados en la interacción supramolecular de RA con diversos sustratos orgánicos e inorgánicos.

El objetivo general propuesto para esta tesis doctoral fue la síntesis y caracterización de distintos C-alkilresorcinarenos como receptores de cationes metálicos y de pesticidas N-metilcarbamatos.

1.9.2. Objetivos específicos

- ✚ Sintetizar C-alkilresorcinarenos con cadenas alifáticas de distinta longitud.
- ✚ Investigar el comportamiento poliprótico de C-alkilresorcinarenos en medio acuoso frente a hidróxidos alcalinos (LiOH, NaOH y KOH).
- ✚ Evaluar la interacción de C-alkilresorcinarenos con los pesticidas N-metilcarbamatos promecarb y aminocarb mediante espectroscopias UV-Visible y de fluorescencia.
- ✚ Analizar el efecto del pH sobre el comportamiento de C-alkilresorcinarenos como sensores de los pesticidas en medios acuosos.
- ✚ Evaluar la aplicabilidad de los C-alkilresorcinarenos para la detección y cuantificación de los contaminantes en muestras reales como agua y alimentos.

1.10. BIBLIOGRAFÍA

- (1) You, L.; Zha, D.; Anslyn, E. V. Recent Advances in Supramolecular Analytical Chemistry Using Optical Sensing. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7840.
- (2) Valcarcel, M. *Principles of Analytical Chemistry: A Textbook*, 1st ed.; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: Germany, 2000.
- (3) *Social Protection and Agriculture: Breaking the Cycle of Rural Poverty*; FAO, 2015.
- (4) *Innovation in Family Farming*; FAO, 2014.
- (5) Greenhalgh, R.; Miyamoto, J. *Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment*; Pergamon Press, 1983; Vol. 4.
- (6) Valcarcel, M. Analytical Chemistry Today and Tomorrow. In *Analytical Chemistry*; Krull, I. S., Ed.; InTech, 2012.
- (7) Das, S.; Powe, A. M.; Baker, G. A.; Valle, B.; El-Zahab, B.; Sintim, H. O.; Lowry, M.; Fakayode, S. O.; McCarroll, M. E.; Patonay, G.; et al. Molecular Fluorescence, Phosphorescence, and Chemiluminescence Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 597.
- (8) Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, K. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry: From Supramolecules to Nanotechnology*; John Wiley & Sons, 2007.
- (9) Yudin, A. K. Macrocycles: Lessons from the Distant Past, Recent Developments, and Future Directions. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 30.
- (10) Hewage, H. S. *Studies of Applying Supramolecular Chemistry to Analytical Chemistry*; ProQuest, 2008.
- (11) Anslyn, E. V. Supramolecular Analytical Chemistry. *J Org Chem* **2007**, *72*, 687.
- (12) Ariga, K.; Kunitake, T. *Supramolecular Chemistry - Fundamentals and Applications: Advanced Textbook*; Springer, 2006.
- (13) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed.; Garland Science, 2015.
- (14) Suckling, C. J.; Gibson, C.; Pitt, A. *Enzyme Chemistry: Impact and applications*, 1st ed.; Springer, 1998.
- (15) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, 2009.
- (16) Atwood, J. L.; Steed, J. W. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, 1st ed.; CRC Press, 2004.
- (17) Rebilly, J.-N.; Reinaud, O. Calixarenes and Resorcinarenes as Scaffolds for Supramolecular Metallo-Enzyme Mimicry. *Supramol. Chem.* **2014**, *26*, 454.
- (18) Albelda, J. C.; García-España, E.; Schneider, H.-J. Supramolecular Complexation for Environmental Control. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3859.
- (19) Bell, T. W.; Hext, N. M. Supramolecular Optical Chemosensors for Organic Analytes. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 589.
- (20) Lehn, J.-M. Perspectives in Supramolecular Chemistry—From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-Organization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1304.

- (21) Cram, D. J. The Design of Molecular Hosts, Guests, and Their Complexes (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1009.
- (22) Cram, D. J.; Cram, J. M. *Container Molecules and Their Guests*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1994.
- (23) D. J. Cram; J. M. Cram. Host-Guest Chemistry. *Science* **1974**, *183*, 803.
- (24) Lindoy, L. F.; Atkinson, I. M. *Self-Assembly in Supramolecular Systems*; Royal Society of Chemistry, 2000.
- (25) Stupp, S. I.; Palmer, L. C. Supramolecular Chemistry and Self-Assembly in Organic Materials Design. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 507.
- (26) Weinelt, F.; Schneider, H. J. Host-Guest Chemistry. Mechanisms of Macrocyclic Genesis. The Condensation of Resorcinol with Aldehydes. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5527.
- (27) Lledó R. J.; Rebek, A.; Hooley, R. J.; Rebek, J., Jr. Recognition of Guests by Water-Stabilized Cavitand Hosts. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3669.
- (28) Schneider, H.-J.; Yatsimirsky, A. K. Selectivity in Supramolecular Host-guest Complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 263.
- (29) Mahadevi, A. S.; Sastry, G. N. Cooperativity in Noncovalent Interactions. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2775.
- (30) Schalley, C. A. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Wiley-VCH, 2007.
- (31) Varshey, D. B.; Sander, J. R. G.; Frišćić, T.; MacGillivray, L. R. Supramolecular Interactions. In *Supramolecular Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2012.
- (32) Sirish, M.; Schneider, H.-J. Electrostatic Interactions between Positively Charged Porphyrins and Nucleotides or Amides: Buffer-Dependent Dramatic Changes of Binding Affinities and Modes. *Chem. Commun.* **2000**, No. 1, 23.
- (33) Motomura, T.; Aoyama, Y. Accumulation of Hydrogen-Bonding and Electrostatic Binding Sites: Stabilization of Salts in Hydroxylic Media via Intramolecular Hydrogen Bonding. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 7224.
- (34) Rebek, J. *Hydrogen-Bonded Capsules: Molecular Behavior in Small Spaces*; World Scientific, 2015.
- (35) Vijay, D.; Sastry, G. N. The Cooperativity of Cation- π and Π - π Interactions. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *485*, 235.
- (36) Atwood, J. L.; Szumna, A. Cation- π Interactions in Neutral calix[4]resorcinarenes. *J. Supramol. Chem.* **2002**, *2*, 479.
- (37) Kobayashi, K.; Asakawa, Y.; Kikuchi, Y.; Toi, H.; Aoyama, Y. CH- π Interaction as an Important Driving Force of Host-Guest Complexation in Apolar Organic Media. Binding of Monools and Acetylated Compounds to Resorcinol Cyclic Tetramer As Studied by ^1H NMR and Circular Dichroism Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2648.
- (38) Szenté, L.; Szemán, J. Cyclodextrins in Analytical Chemistry: Host-Guest Type Molecular Recognition. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8024.

- (39) Takeshita, M.; Shinkai, S. Recent Topics of Functionalization and Recognition Ability of Calixarenes: The “Third Host Molecule.” *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *4*, 1088.
- (40) *Artificial Receptors for Chemical Sensors*; Mirsky, V. M., Yatsimirsky, A. K., Eds.; Wiley-VCH-Verlag, 2011.
- (41) J.-M. Lehn. Chapter 2: Molecular Recognition. In *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*; VCH-Verlag, 1995.
- (42) Arduini, A.; McGregor, W. M.; Paganuzzi, D.; Pochini, A.; Secchi, A.; Ugozzoli, F.; Ungaro, R. Rigid Cone calix[4]arenes as π -Donor Systems: Complexation of Organic Molecules and Ammonium Ions in Organic Media. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1996**, No. 5, 839.
- (43) Memon, N.; Baluch, A.; Hinze, W. L. Fluorescence in Organized Assemblies. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R. A., Ed.; John Wiley & Sons, 2008.
- (44) Santana Rodríguez, J. J.; Halko, R.; Betancort Rodríguez, J. R.; Aaron, J. J. Environmental Analysis Based on Luminescence in Organized Supramolecular Systems. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 385, 525.
- (45) Renslo, A. R.; Tucci, F. C.; Rudkevich, D. M.; Rebek, J., Jr. Synthesis and Assembly of Self-Complementary Cavitands. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4573.
- (46) *Macrocyclic Chemistry New Research Developments*; Fitzpatrick, D. W., Ulrich, H. J., Eds.; Nova Science Publishers, 2010.
- (47) Guo, D.-S.; Uzunova, V. D.; Su, X.; Liu, Y.; Nau, W. M. Operational Calixarene-Based Fluorescent Sensing Systems for Choline and Acetylcholine and Their Application to Enzymatic Reactions. *Chem. Sci.* **2011**, 2, 1722.
- (48) Elbashir, A. A.; Aboul-Enein, H. Y. Supramolecular Analytical Application of Cucurbit[n]urils Using Fluorescence Spectroscopy. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2015**, 45, 52.
- (49) Gutsche, C. D. *Calixarenes: An Introduction*, 2nd ed.; Royal Society of Chemistry, 2008.
- (50) Sueldo Ocello, V. N. Efecto de Cucurbiturilos En Las Propiedades Físicoquímicas de Compuestos Orgánicos. Aplicaciones Analíticas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba: Argentina, 2011.
- (51) Böhmer, V. Calixarenes, Macrocycles with (Almost) Unlimited Possibilities. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 713.
- (52) *Calixarenes: A Versatile Class of Macrocyclic Compounds*; Vicens, J., Böhmer, V., Davies, J. E. D., Eds.; Topics in Inclusion Science; Springer Netherlands, 1990; Vol. 3.
- (53) Sliwa, W.; Kozłowski, C. *Calixarenes and Resorcinarenes: Synthesis, Properties and Applications*; Wiley-VCH Verlag, 2009.
- (54) Gutsche, C. D. Chapter 3. Proving the Baskets: The Characterization and Properties of Calixarenes. In *Calixarenes: An Introduction*; Royal Society of Chemistry, 2008; pp 61–76.
- (55) Danil de Namor, A. F.; Cleverley, R. M.; Zapata-Ormachea, M. L. Thermodynamics of Calixarene Chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2495.

- (56) *Calixarenes in the Nanoworld*, 1st ed.; Vicens, J., Harrowfield, J., Eds.; Springer, 2007.
- (57) Agrawal, Y. K.; Pancholi, J. P. Analytical Applications of Thiocalixarenes: A Review. *Indian J. Chem.* **2007**, *46A*, 1373.
- (58) Mokhtari, B.; Pourabdollah, K.; Dalali, N. Analytical Applications of Calixarenes from 2005 up-to-Date. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2011**, *69*, 1.
- (59) Schneider, H.-J.; Kramer, R.; Simova, S.; Schneider, U. Solvent and Salt Effects on Binding Constants of Organic Substrates in Macrocyclic Host Compounds. A General Equation Measuring Hydrophobic Binding Contributions. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6442.
- (60) Morikawa, O.; Yamaguchi, H.; Katsube, Y.; Abe, K.; Kobayashi, K.; Konishi, H. Host-Guest Complexation Behavior of Resorcinarenes with Tetraalkylammonium Ions and N-Methylpyridinium Ions in Methanol: The Effect of Bulky Hydrophobic Substituents at the Extra-Annular Positions. *Phosphorus Sulfur Silicon* **2006**, *181*, 2877.
- (61) Riveros, D. C.; Martínez, F.; Vargas, E. F. Enthalpies of Solution of methylcalix[4]resorcinarene in Non-Aqueous Solvents as a Function of Concentration and Temperature. *Thermochim. Acta* **2012**, *548*, 13.
- (62) Arena, G.; Casnati, A.; Contino, A.; Gulino, F. G.; Sciotto, D.; Ungaro, R. Entropic Origin of the Sulfonate Groups' Electrostatic Assistance in the Complexation of Quaternary Ammonium Cations by Water Soluble calix[4]arenes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, No. 3, 419.
- (63) Thordarson, P. Determining Association Constants from Titration Experiments in Supramolecular Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305.
- (64) Bonal, C.; Israëli, Y.; Morel, J.-P.; Morel-Desrosiers, N. Binding of Inorganic and Organic Cations by P-sulfonatocalix[4]arene in Water: A Thermodynamic Study. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, No. 7, 1075.
- (65) B. Botta; M. Pierini; G. D. Monache; D. Subissati; F. Subrizi; G. Zappia. Synthesis of Amino and Ammonium Resorcin[4]arenes as Potential Receptors. *Synthesis* **2008**, *13*, 2110.
- (66) Schnatwinkel, B.; Rekharsky, M. V.; Brodbeck, R.; Borovkov, V. V.; Inoue, Y.; Mattay, J. Thermodynamic Aspects of the Host-guest Chemistry of pyrogallol[4]arenes and Peralkylated Ammonium Cations. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2711.
- (67) Bakirci, H.; Koner, A. L.; Schwarzlose, T.; Nau, W. M. Analysis of Host-Assisted Guest Protonation Exemplified for P-Sulfonatocalix[4]arene—Towards Enzyme-Mimetic pKa Shifts. *Chem. – Eur. J.* **2006**, *12*, 4799.
- (68) Saleh, N.; Koner, A. L.; Nau, W. M. Activation and Stabilization of Drugs by Supramolecular pKa Shifts: Drug-Delivery Applications Tailored for Cucurbiturils. *Angew. Chem.* **2008**, *47*, 5398.
- (69) Sueldo Ocello, V. N.; de Rossi, R. H.; Veglia, A. V. Complexation (cucurbit[6]uril-Pyrene): Thermodynamic and Spectroscopic Properties. *J. Lumin.* **2015**, *158*, 435.

- (70) Shinkai, S.; Araki, K.; Manabe, O. Does the Calixarene Cavity Recognise the Size of Guest Molecules? On the “hole-Size Selectivity” in Water-Soluble Calixarenes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, No. 3, 187.
- (71) Czarnik, A. W. Chapter 1: Supramolecular Chemistry, Fluorescence, and Sensing. In *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*; American Chemical Society, 1993; Vol. 538, pp 1–9.
- (72) Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Rüdiger, V.; Ikeda, H. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1755.
- (73) Bhadekar, R. Developments in Analytical Methods for Detection of Pesticides in Environmental Samples. *Am. J. Anal. Chem.* **2011**, 2, 1.
- (74) Arena, G.; Casnati, A.; Contino, A.; Magrì, A.; Sansone, F.; Sciotto, D.; Ungaro, R. Inclusion of Naturally Occurring Amino Acids in Water Soluble calix[4]arenes: A Microcalorimetric and ¹H NMR Investigation Supported by Molecular Modeling. *Org Biomol Chem* **2006**, 4, 243.
- (75) Hof, F.; Trembleau, L.; Ullrich, E. C.; Rebek, Jr., J. Acetylcholine Recognition by a Deep, Biomimetic Pocket. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3150.
- (76) M. Pietraszkiewicz; M. Pietraszkiewicz; E. Uzig; P. Prus; Z. Brzózka; K. Woźniak; R. Bilewicz; T. Borowiak; M. Mączyński. Recent Advances in Calix[4]resorcinarene Chemistry. *Chem. Comput. Simul. Butlerov Commun.* **2000**, 3, 55.
- (77) De Silva, A. P.; Gunaratne, H. N.; Gunlaugsson, T.; Huxley, A. J.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1515.
- (78) Araki, K.; Iwamoto, K.; Shinkai, S.; Matsuda, T. “pKa” of Calixarenes and Analogs in Nonaqueous Solvents. *Bull Chem Soc Jpn* **1990**, No. 63, 3480.
- (79) Ocicka, K.; Radecka, H.; Radecki, J.; Pietraszkiewicz, M.; Pietraszkiewicz, O. Potentiometric Response of Amino-calix[4]resorcinarenes Modified Membranes towards Neutral Nitrophenols. *Sens. Actuators B* **2003**, 89, 217.
- (80) Ramaiah, D.; Neelakandan, P. P.; Nair, A. K.; Avirah, R. R. Functional Cyclophanes: Promising Hosts for Optical Biomolecular Recognition. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4158.
- (81) Kataev, E. a.; Müller, C. Recent Advances in Molecular Recognition in Water: Artificial Receptors and Supramolecular Catalysis. *Tetrahedron* **2014**, 70, 137.
- (82) Dsouza, R. N.; Pischel, U.; Nau, W. M. Fluorescent Dyes and Their Supramolecular Host/guest Complexes with Macrocycles in Aqueous Solution. *Chem. Rev.* **2011**, 111, 7941.
- (83) Ahmed, F. E. Analyses of Pesticides and Their Metabolites in Foods and Drinks. *Trends Anal. Chem.* **2001**, 20, 649.
- (84) Edwards, C. A. *Environmental Pollution by Pesticides*; Springer US, 1973.
- (85) Czarnik, A. W. Chemical Communication in Water Using Fluorescent Chemosensors. *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 302.
- (86) Aaron, J.-J.; Coly, A. Luminescence Methods in Pesticide Analysis. Applications to the Environment. *Analisis* **2000**, 28, 699.

- (87) Galian, R. E.; Veglia, A. V. Fluorescence Quenching Inhibition of Substituted Indoles by Neutral and Ionized Cyclodextrins Nanocavities. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2007**, *187*, 356.
- (88) Galian, R. E.; Bracamonte, A. G.; Veglia, A. V. Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Effect on the Fluorescence of Auxin and Skatole and on the Simultaneous Determination of Binary Mixtures of Indole Compounds in Urine by First Derivative Spectrofluorimetry. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *540*, 393.
- (89) Bracamonte, A. G.; Veglia, A. V. Spectrofluorimetric Determination of Serotonin and 5-Hydroxyindoleacetic Acid in Urine with Different Cyclodextrin Media. *Talanta* **2011**, *83*, 1006.
- (90) Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. Determination of Carbaryl and Carbofuran in Fruits and Tap Water by Beta-Cyclodextrin Enhanced Fluorimetric Method. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *488*, 193.
- (91) Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. Determination of Poorly Fluorescent Carbamate Pesticides in Water, Bendiocarb and Promecarb, Using Cyclodextrin Nanocavities and Related Media. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 63.
- (92) Sueldo Ocello, V. N.; Veglia, A. V. Cucurbit[6]uril Nanocavity as an Enhanced Spectrofluorimetric Method for the Determination of Pyrene. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *689*, 97.
- (93) Pacioni, N. L.; Sueldo Ocello, V. N.; Lazzarotto, M.; Veglia, A. V. Spectrofluorimetric Determination of Benzoimidazolic Pesticides: Effect of P-sulfonatocalix[6]arene and Cyclodextrins. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *624*, 133.
- (94) Shinkai, S. Calixarenes-The Third Generation of Supramolecules. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 8933.
- (95) *Calixarenes 2001*, Softcover reprint of the original 1st ed. 2001 edition.; Asfari, M.-Z., Böhmer, V., Harrowfield, J., Vicens, J., Eds.; Springer: Dordrecht; London, 2001.
- (96) Abis, L.; Dalcanale, E.; Du vosel, A.; Spera, S. Structurally New Macrocycles from the Resorcinol-Aldehyde Condensation. Configurational and Conformational Analyses by Means of Dynamic NMR, NOE, and T1 Experiments. *J Org Chem* **1988**, *53*, 5475.
- (97) Niederl, J. B.; Vogel, H. J. Aldehyde-Resorcinol Condensations. *J Am Chem Soc* **1940**, No. 62, 2512.
- (98) H.-J. Schneider; U. Schneider. The Host-Guest Chemistry of Resorcinarenes. In *Calixarenes 50th Anniversary: Commemorative Issue*; Springer Netherlands, 1994; pp 67–83.
- (99) Schneider, H.-J.; Güttes, D.; Schneider, U. Host-Guest Complexes with Water-Soluble Macrocyclic Polyphenolates Including Induced Fit and Simple Elements of a Proton Pump. *J Am Chem Soc* **1988**, *110*, 6449.
- (100) V.K. Jain; P.H. Kanaiya. Chemistry of calix[4]resorcinarenes. *Russ. Chem. Rev.* **2011**, *80*, 75.
- (101) Konishi, H.; Ohata, K.; Morikawa, O.; Kobayashi, K. Calix[6]resorcinarenes: The First Examples of Metacyclophanes Derived from Resorcinols. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, No. 3, 309.

- (102) H. Konishi; T. Nakamura; K. Ohata; K. Kobayashi; O. Morikawa. The Acid-Catalyzed Condensation of 2-Propylresorcinol with Formaldehyde Diethyl Acetal. The Formation and Isomerization of Calix[4]resorcinarene, Calix[5]resorcinarene, and Calix[6]resorcinarene. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37 (41), 7383.
- (103) Lukin, O.; Shivanyuk, A.; Pirozhenko, V. V.; Tsymbal, I. F.; Kalchenko, V. I. Synthesis, Conformation, and Binding Properties of Resorcarene Tetrasulfonates. Asymmetric Reorganization of Pendant Sulfonyl Groups via Intramolecular S=O - H-O Hydrogen Bonds. *J Org Chem* **1998**, 63, 9510.
- (104) Gutsche, D. C.; Bauer, L. J. Calixarenes. 13. The Conformational Properties of Calix[4]arenes, Calix[6]arenes, Calix[8]arenes, and Oxacalixarenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 6052.
- (105) Timmerman, P.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. Resorcinarenes. *Tetrahedron* **1996**, 52, 2663.
- (106) Shinkai, S.; Araki, K.; Grootenhuys, P. D. J.; Reinhoudt, D. N. pKa Determination of Water-Soluble Calix[4]arenes. *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1991**, 2, 1883.
- (107) Mustafina, A. R.; Amirov, R. R.; Elistratova, Y. G.; Skripacheva, V. V.; Nugaeva, Z. T.; Kazakova, E. K. Solubility, Acid-Base and Complexation Properties of Calix[4]resorcinarene in Aqueous Solutions of Nonionic Surfactants. *Colloid J.* **2002**, 64, 734.
- (108) Miñambres, G. G.; Jaques, T. S.; Veglia, A. V.; Lazzarotto, M.; Nachtigall, F. F. Counter-Ion and Solvent Effects on the Acidity of calix[4]arene and Para-Tert-butylcalix[6]arene. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2015**, 81, 311.
- (109) Tan, S.-D.; Chen, W.-H.; Satake, A.; Wang, B.; Xu, Z.-L.; Kobuke, Y. Tetracyanoresorcin[4]arene as a pH Dependent Artificial Acetylcholine Receptor. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2719.
- (110) Botta, B.; Cassani, M.; D'Acquarica, I.; Misiti, D.; Subissati, D.; Monache, G. D. Resorcarenes: Emerging Class of Macrocyclic Receptors. *Curr. Org. Chem.* **2005**, 9, 337.
- (111) Sebo, L.; Diederich, F. Tetrakis(phenylamidinium)-Substituted Resorcin[4]arene Receptors for the Complexation of Dicarboxylates and Phosphates in Protic Solvents. *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 93.
- (112) Richard, G. I.; Marwani, H. M.; Jiang, S.; Fakayode, S. O.; Lowry, M.; Strongin, R. M.; Warner, I. M. Chiral Recognition of Amino Acids by Use of a Fluorescent Resorcinarene. *Appl. Spectrosc.* **2008**, 62, 476.
- (113) Hayashi, Y.; Maruyama, T.; Yachi, T.; Kudo, K.; Ichimura, K. Synthesis and Fluorescence Behavior of calix[4]resorcinarenes Possessing Pyrenyl Group(s). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, No. 4, 981.
- (114) Casnati, A.; Sciotto, D.; Arena, G. Water-Soluble Calixarenes. In *Calixarenes 2001*; Springer, 2001; pp 440-456.
- (115) Franco, L. S.; Salamanca, Y. P.; Maldonado, M.; Vargas, E. F. Solubility of Calix[4]resorcinarene in Water from (278.15 to 308.15) K. *J. Chem. Eng. Data* **2010**, 55, 1042.
- (116) Fransen, J. R.; Dutton, P. J. Cation Binding and Conformation of Octafunctionalized calix[4]resorcinarenes. *Can. J. Chem.* **1995**, 73, 2217.

- (117) Elistratova, Y. G.; Mustafina, A. R.; Amirov, R. R.; Nugaeva, Z. T.; Burirov, A. R.; Kononov, A. I. Influence of the Structure of Nonionic Surfactants and the Length of Alkyl Substituents of Calix[4]resorcinarenes on Their Solubility, Acid-Base, and Complexation Properties. *2004*, *66*, 326.
- (118) Hauke, F.; Myles, A. J.; Rebek, J., Jr. Lower Rim Mono-Functionalization of Resorcinarenes. *Chem Commun* **2005**, No. 33, 4164.
- (119) Tunstad, L. M.; Tucker, J. A.; Dalcanale, E.; Weiser, J.; Bryant, J. A.; Sherman, J. C.; Helgeson, R. C.; Knobler, C. B.; Cram, D. J. Host-Guest Complexation. 48. Octol Building Blocks for Cavitands and Carcerands. *J Org Chem* **1989**, *54*, 1305.
- (120) Shvanyuk, A.; Friese, J. C.; Döring, S.; Rebek, J., Jr. Solvent-Stabilized Molecular Capsules. *J Org Chem* **2003**, *68*, 6489.
- (121) K. Sugiyama; K. Esumi; Y. Koide. Aqueous Properties of Resorcinol-Type Calix[4]arenes Bearing Four Alkyl Side Chains. *Langmuir* **1996**, No. 12, 6006.
- (122) Sugden, M. W.; Richardson, T. H.; Davis, F.; Higson, S. P. J.; Faul, C. F. J. Langmuir and LB Properties of Two Calix[4]resorcinarenes: Interactions With Various Analytes. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *321*, 43.
- (123) Demura, M.; Yoshida, T.; Hirokawa, T.; Kumaki, Y.; Aizawa, T.; Nitta, K.; Bitter, I.; Tóth, K. Interaction of Dopamine and Acetylcholine with an Amphiphilic Resorcinarene Receptor in Aqueous Micelle System. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1367.
- (124) Partridge, M.; Davis, F.; James, S. W.; Tatam, R. P.; Faul, C. F. J.; Higson, S. P. J. Monolayer Behavior of Calix-4-Resorcinarenes and Their Surfactant Complexes. *Thin Solid Films* **2012**, *520*, 6989.
- (125) Benosmane, N.; Hamdi, S. M.; Hamdi, M.; Boutemur, B. Selective Transport of Metal Ions across Polymer Inclusion Membranes (PIMs) Containing calix[4]resorcinarenes. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, *65*, 211.
- (126) Osouledini, N.; Gharib, F.; Zare, K. Complexation of Alkali Metal Cations by P-Sulfonato calix(4)arene in Aqueous Solution. *J. Sci. Islam. AZAD Univ.* **2009**, *19*, 109.
- (127) Wong, W. W. H.; Vickers, M. S.; Cowley, A. R.; Paul, R. L.; Beer, P. D. Tetrakis(imidazolium) Macrocyclic Receptors for Anion Binding. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4201.
- (128) Shevchuk, S. V.; Rusakova, N. V.; Turianskaya, A. M.; Korovin, Y. V.; Nazarenko, N. A.; Gren, A. I. Infrared Luminescence of Ytterbium Ion in Complexes with Calix[4]resorcinarenes. *J. Fluoresc.* **1998**, *8*, 225.
- (129) Kharlamov, S. V.; Ziganshina, A. Y.; Aganov, A. V.; Kononov, A. I.; Latypov, S. K. Solution Structure and Equilibrium of New calix[4]resorcinarene Complexes—prototype of Molecular Machines. NMR Data. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *58*, 389.
- (130) Kubinyi, M.; Brátán, J.; Grofcsik, A.; Biczók, L.; Poór, B.; Bitter, I.; Grün, A.; Bogáti, B.; Tóth, K. Proton Transfer and Supramolecular Complex Formation between Nile Blue and tetraundecylcalix[4]resorcinarene - a Fluorescence Spectroscopic Study. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2002**, *2*, 1784.

- (131) Yang, Q.; Yan, C.; Zhu, X. A Fluorescent Chemosensor for Paeonol Based on Tetramethoxy Resorcinarene Tetraoxyacetic Acid. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *191*, 53.
- (132) Helttunen, K.; Prus, P.; Luostarinen, M.; Nissinen, M. Interaction of Aminomethylated Resorcinarenes with Rhodamine B. *New J Chem* **2009**, *33*, 1148.
- (133) Hassan, A. K.; Nabok, A. V.; Ray, A. K.; Lucke, A.; Smith, K.; Stirling, C. J. M.; Davis, F. Thin Films of Calix-4-Resorcinarene Deposited by Spin Coating and Langmuir–Blodgett Techniques: Determination of Film Parameters by Surface Plasmon Resonance. *Mater. Sci. Eng. C* **1999**, *8–9*, 251.
- (134) Koshets, I. A.; Kazantseva, Z. I.; Shirshov, Y. M.; Cherenok, S. A.; Kalchenko, V. I. Calixarene Films as Sensitive Coatings for QCM-Based Gas Sensors. *Sens. Actuators B Chem.* **2005**, *106*, 177.
- (135) Vagapova, L. I.; Fakhertdinova, A. G.; Burirov, A. R.; Pudovik, M. A. Calix[4]resorcinols Modified with γ -Aminobutyric Acid Fragments. *Russ. J. Gen. Chem.* **2015**, *85*, 1783.
- (136) Kunsági-Máté, S.; Szabó, K.; Lemli, B.; Bitter, I.; Nagy, G.; Kollár, L. Increased Complexation Ability of Water-Soluble Calix[4]resorcinarene Octacarboxylate toward Phenol by the Assistance of Fe(II) Ions. *J Phys Chem B* **2004**, *108*, 15519.
- (137) Hooley, R. J.; Van Anda, H. J.; Rebek, J., Jr. Extraction of Hydrophobic Species into a Water-Soluble Synthetic Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13464.
- (138) Arora, V.; Chawla, H. M.; Singh, S. P. Calixarenes as Sensor Materials for Recognition and Separation of Metal Ion. *Arkivoc* **2007**, *2*, 172.
- (139) Zhu, S. S.; Staats, H.; Brandhorst, K.; Grunenberg, J.; Gruppi, F.; Dalcanele, E.; Lützen, A.; Rissanen, K.; Schalley, C. a. Anion Binding to Resorcinarene-Based Cavitands: The Importance of CH-Anion Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2008**, *47*, 788.
- (140) Schneider U., H.-J. S. Inhibition of Choline Acetate Hydrolysis in the Presence of a Macrocyclic Polyphenolate. *J Org Chem* **1987**, *52*, 1613.
- (141) Kikuchi, Y.; Tanaka, Y.; Sutarto, S.; Kobayashi, K.; Toi, H.; Aoyama, Y. Highly Cooperative Binding of Alkyl Glucopyranosides to the Resorcinol Cyclic Tetramer due to Intracomplex Guest-Guest Hydrogen-Bonding: Solvophobicity/solvophilicity Control by an Alkyl Group of the Geometry, Stoichiometry, Stereoselectivity, and Cooperativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10302.
- (142) Kobayashi, K.; Asakawa, Y.; Kato, Y.; Aoyama, Y. Complexation of Hydrophobic Sugars and Nucleosides in Water with Tetrasulfonate Derivatives of Resorcinol Cyclic Tetramer Having a Polyhydroxy Aromatic Cavity: Importance of Guest-Host CH- π Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10307.
- (143) Striegler, S. Selective Carbohydrate Recognition by Synthetic Receptors in Aqueous Solution. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 81.
- (144) Kazakova, E. K.; Ziganshina, A. U.; Muslinkina, L. A.; Morozova, J. E.; Makarova, N. A.; Mustafina, A. R.; Habicher, W. D. The Complexation Properties of the Water-Soluble Tetrasulfonatomethylcalix[4]resorcinarene toward α -Aminoacids. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *43*, 65.

- (145) Tanaka, Y.; Kobuke, Y.; Sokabe, M. A Non-Peptidic Ion Channel with K⁺ Selectivity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 693.

Capítulo 2

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE C-ALQUILRESORCIN[4]ARENOS

2.1 SÍNTESIS MACROCÍCLICA

Los receptores sintéticos se pueden clasificar en acíclicos como los *podandos*, o en cíclicos como los *macrociclos* (Sección 1.5.1.3.). Los procedimientos de síntesis empleados para la obtención de podandos son los mismos que los utilizados en síntesis orgánica convencional dado que las reacciones que permiten la unión covalente entre las moléculas precursoras son generalmente de polimerización e implican la formación de éteres, de amidas o reacciones de sustitución electrofílica aromática.¹ La reacción de polimerización (caracterizada por K_{inter}) involucra la unión covalente intermolecular entre dos precursores definidos como XY donde X e Y representan sus sitios reactivos, los cuales inicialmente serán monómeros que posteriormente progresarán a oligómeros lineales de distinta longitud (Figura 2.1). La velocidad de la reacción bimolecular (v_{inter}) depende del cuadrado de la concentración del precursor XY (Ec. 2.1). Los oligómeros lineales presentan sus sitios reactivos terminales X e Y disponibles de manera que la reacción intramolecular (gobernada por K_{intra}) que conlleva a la ciclización también es posible (Figura 2.1). La velocidad de la reacción intramolecular (v_{intra}) es directamente proporcional a la concentración de oligómeros lineales (Ec. 2.2). A partir de las ecuaciones de velocidad se concluye que la reacción de polimerización es más rápida que la de ciclización y la formación del macrociclo está precedida por la generación *in situ* del podando precursor.^{2,3}

$$v_{inter} = k_{inter} [XY]^2 \quad (2.1)$$

$$v_{intra} = k_{intra} [XY] \quad (2.2)$$

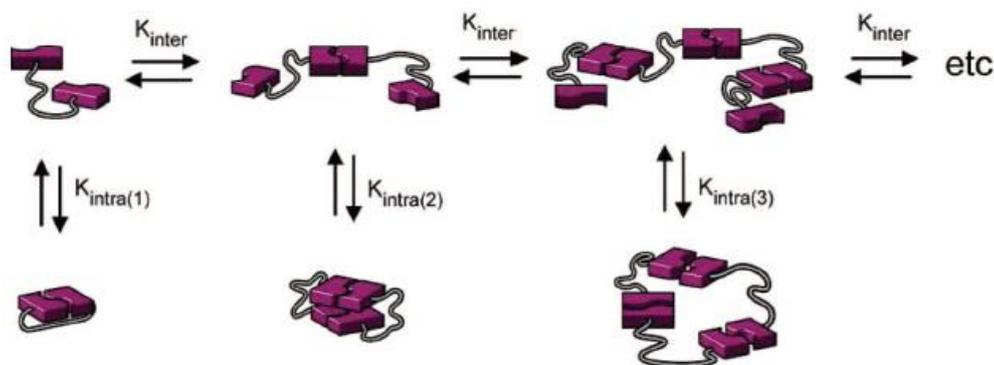


Figura 2.1. Representación esquemática de la coexistencia de los equilibrios de polimerización (K_{inter}) y de ciclización (K_{intra}) durante la síntesis macrocíclica.³

Ciertos factores pueden favorecer la ciclización del podando. Por ejemplo, la presencia de determinados grupos funcionales permite acercar espacialmente los sitios reactivos terminales posibilitando la unión covalente intramolecular. En otros casos, la aproximación de los sitios puede estar facilitada debido a la presencia de sustituyentes voluminosos, heteroátomos o anillos aromáticos. Otra alternativa viable es la interacción del podando con otra especie que induzca su pre-organización.³ Por ello, la síntesis macrocíclica suele ser una tarea desafiante puesto que es necesario implementar alternativas que permitan desplazar el equilibrio químico de polimerización hacia la ciclización.^{1,2}

2.1.1. Síntesis en alta dilución

Una alternativa usualmente empleada para la obtención de macrociclos es la síntesis en alta dilución. Este procedimiento se caracteriza por la adición lenta de los reactivos precursores acompañada de agitación, de manera que los oligómeros formados se encuentran diluidos en el medio de reacción. La practicidad de este procedimiento resulta evidente si se analiza el cociente resultante entre las ecuaciones de velocidad intramolecular e intermolecular (Ec. 2.3). La disminución de la concentración del podando precursor XY favorece la cinética de la reacción intramolecular con el consecuente aumento de la concentración del producto cíclico.

$$\frac{v_{intra}}{v_{inter}} = \frac{k_{intra} [XY]}{k_{inter} [XY]^2} = \frac{k_{intra}}{k_{inter} [XY]} \quad (2.3)$$

2.1.2. Síntesis asistida por molde

En química supramolecular, un molde o plantilla es una especie química que puede ser desde un ión metálico hasta una estructura muy compleja que induce la pre-organización de un podando en solución al producirse una interacción supramolecular entre ambos (Figura 2.2). De esta manera, la unión covalente entre los sitios reactivos terminales del podando está termodinámica y cinéticamente favorecida. El efecto pre-organizador del agente “plantilla” contribuye a la minimización de productos secundarios y a la obtención del producto con una estereoquímica determinada puesto que el reconocimiento molecular o auto-ensamblado con el podando conduce al producto con la conformación más estable. Una vez formado el macrociclo, los agentes “plantilla” pueden permanecer asociados al producto o pueden ser removidos, por ejemplo, por aumento de la temperatura o por auto-exclusión por el mismo macrociclo debido a las nuevas propiedades de reconocimiento molecular de la estructura cíclica (Figura 2.2). La síntesis macrocíclica asistida por agentes “plantilla” ha sido ampliamente utilizada para la obtención de receptores macrocíclicos tales como los calix[n]arenos,⁴ cucurbit[n]urilos y éteres corona.

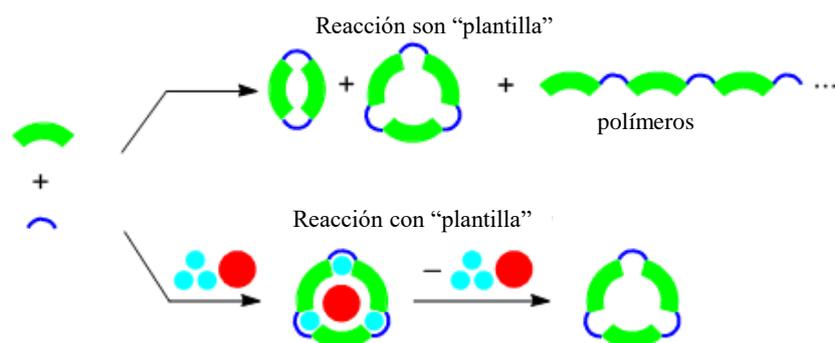


Figura 2.2. Representación esquemática de la comparación entre los métodos de síntesis macrocíclica en ausencia y en presencia de agentes “plantilla”.

2.2. SÍNTESIS DE RESORCINARENOS

2.2.1. Mecanismo de ciclocondensación entre resorcinol y aldehídos

Los productos de condensación entre fenoles y aldehídos, los ciclofanos, además de sus aplicaciones en química huésped-receptor también presentan un interés creciente por sus aplicaciones técnicas como su excelente capacidad antioxidante y su remarcable baja toxicidad.⁴

La condensación entre 4-alkilfenoles y formaldehído que conduce a la formación de los CA generalmente se lleva a cabo en solventes orgánicos en condiciones alcalinas (NaOH, KOH) y la dimensión de la cavidad del producto de ciclización está determinada fundamentalmente por el tamaño del metal alcalino que funciona como “plantilla” y por efectos de solubilidad.⁵ Cuando el derivado fenólico empleado es 1,3-dihidroxifenol (resorcinol), en presencia de aldehídos alifáticos o aromáticos en condiciones ácidas ocurre la ciclocondensación que generalmente conduce a la formación de metaciclofanos constituidos invariablemente por cuatro anillos con alto rendimiento (Figura 2.3).⁴ La pre-organización inducida por la presencia del catión metálico en el caso de los CA está ausente en la síntesis de los resorcina[4]arenos, de manera que otros factores deben prevalecer para favorecer la formación del tetrámero cíclico como único producto.

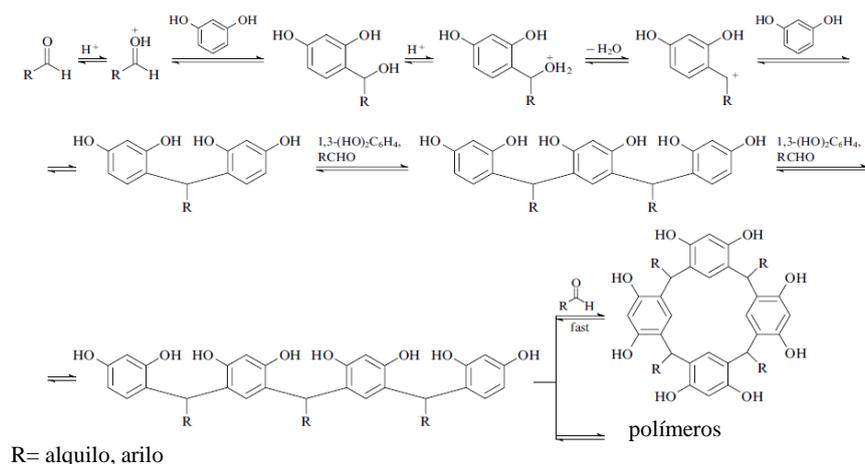


Figura 2.3. Mecanismo de ciclocondensación catalizada por ácido entre resorcinol y un aldehído alifático o aromático.

En condiciones ácidas, el aldehído protonado alifático o aromático puede reaccionar por sustitución electrofílica aromática (S_{EAr}) con las posiciones 4 o 6 de resorcinol, las cuales se encuentran activadas debido a la presencia de los dos grupos OH fenólicos (Figura 2.3). La protonación del grupo OH alquílico permite que pueda ser eliminado como agua generándose de esta manera un carbocatión estabilizado por resonancia. Esta especie resulta más reactiva que el aldehído activado frente a S_{EAr} con resorcinol y el producto de condensación generado es un dímero donde R es el sustituyente procedente del aldehído. La sustitución de las posiciones 6 del dímero con un nuevo carbocatión genera una mezcla epimérica de trímeros lineales los cuales se diferencian en la posición relativa de los dos sustituyentes R pudiéndose ubicar del mismo lado del plano definido por los anillos aromáticos (*cis*) o en lados opuestos (*trans*). La estereoquímica involucrada en cada paso de condensación determina que oligómeros lineales de distinta longitud coexistan con otros isómeros.^{4,6}

El mecanismo de condensación entre resorcinol y acetaldehído en CD_3OD/DCI concentrado ha sido estudiado cuantitativamente mediante 1H RMN y se determinaron las constantes de velocidad de ciertos pasos de reacción.⁴ Durante el transcurso de la reacción, se forman oligómeros lineales y cíclicos superiores a 4 unidades, pero rápidamente se consumen, debido a la reversibilidad de la reacción, para generar el tetrámero cíclico como único producto. Las reacciones de polimerización y de depolimerización ocurren a la misma velocidad y son más rápidas que las reacciones de ciclización que generan oligómeros cíclicos de orden mayor a 4. Sin embargo, la constante de velocidad de la reacción de ciclización del tetrámero lineal es la más alta y este producto constituye el pozo termodinámico de la reacción.⁴

La razón por la cual la ciclización para formar un tetrámero cíclico está tan favorecida radica en las conformaciones de las precursores de cadena abierta. Los cálculos de mecánica molecular contribuyeron a elucidar las interacciones involucradas que favorecen el cierre de anillo sobre la polimerización.⁴ La pre-organización juega un rol fundamental al permitir que los oligómeros con disposición plegada estén más estabilizados que aquellos conformeros estirados. La estabilidad del conformero plegado radica en la posibilidad de establecer interacciones de tipo puente de hidrógeno intramoleculares más eficientes. Las contribuciones calculadas por mecánica molecular en fase gaseosa son 1,3-2,0 kcal/mol por puente de hidrógeno. Las contribuciones de van der Waals y la tensión del ángulo de enlace son factores que también contribuyen a la ciclización. La conformación plegada permite una distancia O...H-O de 2,9 Å. Sin embargo, la localización del sustituyente R entre grupos OH de unidades de resorcinol adyacentes produce un efecto estérico e impide la formación de la red de puentes de hidrógenos. Estos efectos son minimizados sobre la estructura al extender la conformación hacia una forma más abierta, pero con los extremos reactivos alejados, favoreciendo la polimerización sobre la ciclización, o bien, por formación de un nuevo estereoisómero menos impedido de menor energía y que permita la formación de una red de puentes de hidrógenos más extendida.⁴

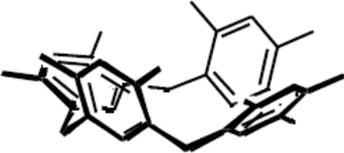
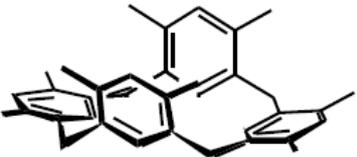
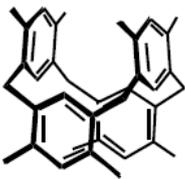
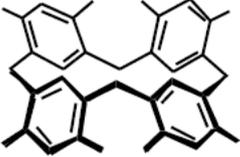
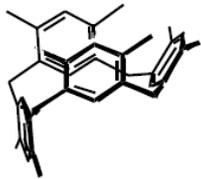
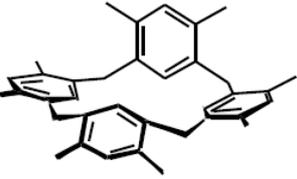
Ciertos factores estructurales tanto del resorcinol como del aldehído pueden afectar el rendimiento del producto termodinámico obtenido así como la estereoselectividad de la reacción.^{7,8} El efecto pre-organizador de la red de puentes de hidrógeno en los oligómeros precursores ha sido demostrado mediante el estudio del mecanismo de ciclocondensación empleando derivados de resorcinol sustituidos en ambos grupos OH por metilo. En este caso, el rendimiento del tetrámero cíclico es menor. Además, la estabilidad del conformero precursor lineal depende de la naturaleza de los sustituyentes sobre los puentes metileno. Por ejemplo, el rendimiento del producto de ciclización es menor si se emplea 2,4,6-trimetil-benzaldehído debido al efecto estérico introducido por el sustituyente voluminoso 2,4,6-trimetil-fenilo. La presencia de un grupo tomador de electrones en la posición C-2 de resorcinol (NO₂, Br, COOH) desactiva las posiciones C-4 y C-6 hacia la S_EAr y el rendimiento de la reacción disminuye.⁴

2.2.2. *Estereoquímica y propiedades conformacionales de resorcinarenos*

La estereoquímica de los resorcinarenos se define como una combinación de tres criterios (Tabla 2.1):⁹

- La conformación del macrociclo definida de acuerdo a los elementos de simetría.
- La configuración relativa cis/trans de los sustituyentes unidos a los puentes metileno.
- La configuración absoluta axial o ecuatorial de cada sustituyente.

Tabla 2.1. Isómeros estructurales de resorcin[4]arenos.

Estructura	Nombre	Elementos de simetría	Grupo puntual	Configuración relativa de sustituyentes
A 	Corona o cono	<ul style="list-style-type: none"> • 1 eje de simetría rotacional C_4 • 4 planos de simetría verticales ν 	C_{4v}	<i>rccc</i>
B 	Bote	<ul style="list-style-type: none"> • 1 eje de simetría rotacional C_2 • 2 planos de simetría verticales ν 	C_{2v}	<i>rccc</i>
C 	1,3-alternado o "silla de montar"	<ul style="list-style-type: none"> • 1 eje de rotación-reflexión S_4 • 1 eje de simetría rotacional C_2 • 2 planos de simetría verticales ν 	D_{2d}	<i>rccc</i>
D 	1,2-alternado o diamante	1 plano de simetría	C_s	<i>rctc</i>
E 	E) Silla	<ul style="list-style-type: none"> • 1 centro de inversión 	C_{2h}	<i>rctt</i>
F 	F) Silla aplanada	<ul style="list-style-type: none"> • 1 plano de simetría 		

Estudios exhaustivos de la configuración espacial de los RA mediante RMN estático y dinámico, NOE, tiempo de relajación, rayos X y modelado molecular han permitido evidenciar la existencia de cinco isómeros geométricos (Tabla 2.1). La configuración relativa de los sustituyentes sobre los puentes metileno (C-2, C-8, C-14 y C-20) se define asumiendo que los cuatro anillos aromáticos definen un plano aromático imaginario y que los sustituyentes pueden ubicarse por encima o por debajo del plano. La configuración de uno de los sustituyentes se emplea como referencia (*r*) para definir la posición relativa de los sustituyentes restantes como *cis* (*c*) o *trans* (*t*).⁸ De acuerdo a esta nomenclatura, la configuración relativa de los sustituyentes de un RA puede ser *rccc*, *rctc* o *rctt* (Tabla 2.1). Los isómeros corona, bote y 1,3-alternado presentan un patrón de sustitución *rccc* dado que los sustituyentes se encuentran del mismo lado del plano aromático y su interconversión es posible debido a movimientos conformacionales. La isomerización de tales estructuras hacia las conformaciones silla (*rctc*) y 1,2-alternado (*rctt*) no es posible sin la ruptura de enlaces covalentes. Por lo tanto, los isómeros *rccc*, *rctc* y *rctt* son diastereómeros entre sí.

Cada sustituyente además posee una configuración absoluta, la cual puede ser axial si su posición es perpendicular al plano aromático o ecuatorial si es paralela. Las configuraciones de los sustituyentes dependen de la simetría estructural adoptada por el resorcinareno durante su síntesis que resulta del balance de las interacciones intramoleculares favorables que generan la conformación de menor energía durante el proceso de formación del macrociclo.

La relación de isómeros tetraméricos durante el procedimiento de síntesis resulta dependiente del tiempo de reacción, de la temperatura y del solvente utilizado.^{4,7,8,10} A nivel molecular, la estereoselectividad de la reacción se atribuye a la combinación de tres factores:⁸

- las interacciones estéricas entre los sustituyentes sobre las posiciones metileno, las cuales serán más relevantes conforme el volumen estérico de los grupos sea mayor;
- la reversibilidad de la reacción de ciclización;
- las distintas solubilidades de los isómeros macrocíclicos.

Estos factores se ponen de manifiesto por ejemplo, en la reacción de ciclocondensación de resorcinol con benzaldehído cuyos productos se analizaron en función del tiempo de reacción (Figura 2.4).¹⁰ El isómero silla predomina a tiempos cortos de reacción (< 2 h), mientras que el rendimiento de la conformación bote es menor y el producto de la reacción es una mezcla de ambos isómeros. La ciclización rápida del tetrámero precursor lineal con una configuración *rctt* está favorecida debido al menor efecto estérico entre los sitios reactivos terminales (trifenilos, en este caso) por lo que el isómero silla es el producto cinético. A tiempos mayores, la isomerización de silla a bote y la solubilidad menor de este último favorecen la estereoselectividad de la reacción obteniéndose luego de 10 h únicamente el isómero bote como

el producto más estable (producto termodinámico). El equilibrio de isomerización entre los diastéromeros *rccc* y *rctc* demuestra que el producto cinético sufre una ruptura del ciclo para ser generado nuevamente en la configuración bote. Este proceso es promovido tanto por la catálisis ácida, la temperatura como por el solvente utilizado. La formación del isómero *rccc* en un solvente orgánico/acuoso ocurre por una reacción heterogénea favorecida por la solubilidad mayor de los precursores y la precipitación del producto termodinámico.^{4,7}

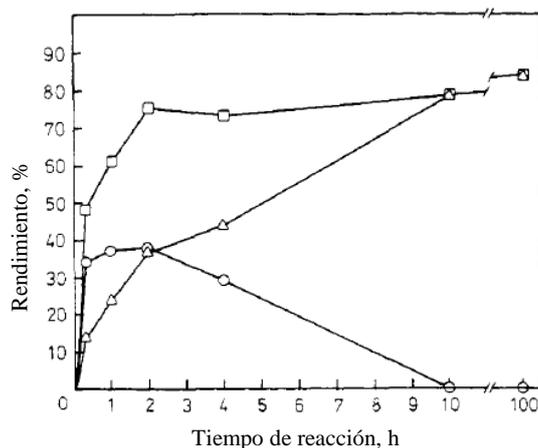


Figura 2.4. Rendimientos parciales de los isómeros silla (°) y bote (Δ), y total (□) de C-fenilresorcín[4]areno en función del tiempo de reacción.¹⁰

Los productos cinéticos de la reacción de ciclocondensación dependen del efecto estérico del sustituyente. Si son aromáticos, el producto que se forma con mayor velocidad es el isómero silla; mientras que los sustituyentes alifáticos (*n*-alquilos) conducen a estereoisómeros con configuración *rccc*. La reacción a reflujo con aldehídos alifáticos genera como único producto termodinámico el isómero bote con configuraciones absolutas axiales.⁷

2.2.3. Propiedades físicas y químicas de isómeros de resorcinarenos

Las propiedades físicas y espectroscópicas como punto de fusión, solubilidad, ¹H y ¹³C RMN, UV, IR y espectrometría de masas no permiten la discriminación sin ambigüedad de los distintos isómeros en equilibrio debido a la naturaleza rápida y reversible de los equilibrios de isomerización.⁸

La técnica de dicroísmo circular ha resultado útil para elucidar el equilibrio conformacional de las configuraciones corona y bote y el efecto que posee la naturaleza polar del solvente.¹¹ La quiralidad en los resorcinarenos puede ser introducida en forma indirecta empleando monómeros que contengan un centro quiral o en forma directa debido a la quiralidad

inherente debida a la no planaridad del sistema metaciclofano que genera elementos de simetría de tipo C_n , además de las configuraciones relativas y absolutas de los sustituyentes sobre los puentes metileno.^{11,12} El dicroísmo circular provee una alternativa para el estudio de los equilibrios conformacionales rápidos de resorcinarenos en solución, lo cual no está permitido por las escalas de tiempo de otras técnicas que reflejan los fenómenos conformacionales promedio. La distribución de conformeros quirales en solución admite un control con respuesta óptica mediado por la naturaleza del solvente, lo cual es útil en química supramolecular dado que la geometría de la cavidad del macrociclo puede ser modulada ante factores externos.¹¹

Mediante ^1H RMN a temperatura ambiente, en la escala de tiempo de la técnica, la interconversión de los conformeros bote es muy rápida y las señales correspondientes a los protones son consistentes con el isómero corona, altamente simétrico, con sus sustituyentes en posiciones axiales.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar y purificar resorcinarenos con sustituyentes alifáticos de distintas longitudes según procedimientos descritos en literatura y realizar las modificaciones procedimentales necesarias para la obtención de productos con alta pureza para sus posteriores aplicaciones analíticas. Los macrociclos estudiados en este trabajo de Tesis Doctoral fueron: C-metilresorcin[4]areno (C1RA)^{2a}, C-butilresorcin[4]areno (C4RA)^{2b}, C-heptilresorcin[4]areno (C7RA)^{2c} y C-undecilresorcin[4]areno (C11RA)^{2c} (Figura 2.5).

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los resorcinarenos obtenidos mediante determinaciones de punto de fusión y espectroscopias infrarroja, ^1H RMN, UV-visible y de fluorescencia.

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Síntesis y purificación de C-alquilresorcin[4]arenos

El procedimiento general empleado para la síntesis de los C-alquilresorcin[4]arenos 1; 2 y 3 se basó en las metodologías reportadas.^{7,8,10,13} Las síntesis de los metaciclofanos se llevaron a cabo mediante la reacción de ciclocondensación entre resorcinol y aldehídos alifáticos mediada por SEAr catalizada por ácidos (Figura 2.5).

^{2a} Producto comercial (Sigma).

^{2b} Sintetizado en colaboración con el Dr. Guillermo A. Blanco y la Dra. M. Teresa Baumgartner.

^{2c} Los resorcinarenos se sintetizaron durante misiones de trabajo en el Instituto de Química de la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil) bajo la supervisión del Dr. Márcio Lazzarotto en el marco del Programa de Centros Asociados de Posgrado Argentina/Brasil (CAPES SPU).

Durante la etapa de purificación de los macrociclos fue necesario introducir modificaciones que permitieran la obtención de productos de pureza adecuada. La metodología habitual involucra recristalizaciones sucesivas para eliminar los co-productos de polimerización. Sin embargo, el procedimiento más simple no permitió la obtención de macrociclos con el grado de pureza para posteriores estudios espectroscópicos. La incorporación de un paso adicional de purificación basado en cromatografía en columna permitió obtener los resorcin[4]arenos con la pureza necesaria para posteriores aplicaciones (Tabla 2.2).

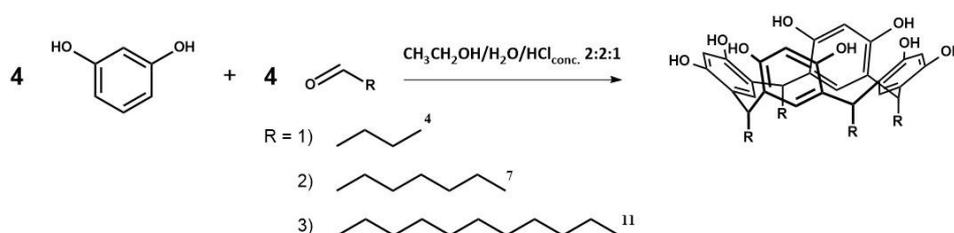


Figura 2.5. Síntesis de C-alkilresorcin[4]arenos mediante reacción de ciclocondensación entre resorcinol y aldehídos alifáticos. 1) C-butilresorcin[4]areno; 2) C-heptilresorcin[4]areno; y 3) C-undecilresorcin[4]areno.

Inicialmente se observó la precipitación de un sólido pálido a tiempos cortos de reacción, el cual se redisolvió a la temperatura de reflujo generando una solución naranja rojiza y finalmente un sólido pálido precipitó nuevamente. Las purificaciones de C4RA y C7RA no pudieron lograrse mediante procedimientos de recristalización como se describe en literatura puesto que un producto secundario de coloración naranja no permaneció disuelto en las aguas madres, sino que se obtenía junto con el producto recristalizado.

La disolución en etanol del producto así obtenido generó soluciones de un color rojo oscuro intenso indicando la presencia de impurezas absorbentes en la región visible. La caracterización por espectroscopia UV-visible del producto coloreado indicó que la solución diluida en etanol presenta el máximo de absorción característico del producto tetramérico a 286 nm. Sin embargo, una solución concentrada reveló la presencia de las impurezas con absorciones entre 400 y 500 nm.

La separación del producto mayoritario de la reacción del residuo polimérico fue efectiva mediante cromatografía en columna y el producto tetramérico se obtuvo en forma de polvo como un sólido de color amarillo muy claro. En el caso de C-undecilresorcin[4]areno, dos recristalizaciones en metanol fueron suficientes para obtener el producto cristalino.

Tabla 2.2. Procedimientos de síntesis y purificación de C-butilresorcín[4]areno (C4RA); C-heptilresorcín[4]areno (C7RA) y C-undecilresorcín[4]areno (C11RA).

Compuesto	Condiciones de reacción	Tratamiento del crudo de reacción	Purificación	Rendimiento
C4RA	Disolución de 50 mmoles de resorcínol en etanol/agua/HCl 37% 5:1,5:3,5 v/v	Enfriamiento en baño de hielo, 20 min	Cromatografía en columna (éter de petróleo/acetona, 1)70:30; 2) 60:40 v/v)	95,0% (8,4550 g)
	Adición directa de 50 mmoles de pentanal a 70 °C con agitación constante	Filtración y lavado con agua hasta pH neutro	Recristalización de éter de petróleo/acetona 90:10 v/v	
	Tiempo de reacción: 27 h		Secado al vacío a 95 °C por 10 h	
C7RA	Solución de 120 mmoles de resorcínol + 60 mmoles de octanal en etanol 95%/agua/HCl 37% 2:2:1 v/v	Filtración, lavado con agua hasta pH neutro, lavado con etanol frío	Cromatografía en columna (éter de petróleo/acetona 1)70:30 ; 2) 60:40; 3) 50:50; 4) 100:0 v/v)	47,0% (6,4000 g)
	Calentamiento a 50 °C durante 1 h, luego a T _{amb}		Secado al vacío a 60 °C por 7 h	
	Tiempo de reacción: 1 semana			
C11RA	Disolución de 82 mmoles de resorcínol en etanol 95%/ HCl 37% 3:1 v/v	Enfriamiento hasta T _{amb}	Dos	33,4% (7,4998 g)
	Adición gota a gota de 80 mmoles de dodecanal a 5 °C con agitación, seguido de reflujo a 80 °C	Filtración, lavado con agua hasta pH neutro, lavado con metanol frío	recristalizaciones de metanol	
	Tiempo de reacción: 24 h		Secado al vacío a 90 °C por 7 h	

La pureza de los productos fue verificada mediante TLC y el análisis de los espectros UV-visible de soluciones concentradas de los macrociclos. En la bibliografía se menciona que las moléculas de solvente no pueden ser eliminadas completamente dado que cumplen un rol fundamental en las estructuras de los resorcinarenos recristalizados.¹⁴ Por lo tanto, se considera que los RA sintetizados han sido obtenidos como solvatos, es decir, con moléculas de solvente complejadas.

2.4.2. Propiedades fisicoquímicas de C-alquilresorcin[4]arenos

2.4.2.1. Punto de fusión

Las determinaciones de los puntos de fusión de los resorcinarenos empleados en esta Tesis indicaron comportamientos similares con temperaturas de descomposición por encima de 300 °C sin exhibición de cambio de fase. A temperaturas cercanas a 100 °C se observó en todos los casos condensación en el extremo del tubo capilar debido posiblemente al solvente de recristalización empleado que permanece ocluido en la matriz del sólido. Los resultados del comportamiento térmico de los resorcinarenos sintetizados son consistentes con las características esperadas para macrociclos de esta naturaleza, con estructuras cristalinas organizadas, elevado peso molecular y presencia de interacciones intramoleculares.

2.4.2.2. Solubilidad y efecto de concentración salina

Las solubilidades de los macrociclos se evaluaron considerando el volumen de solvente necesario para disolver 10 mg de resorcinareno.^{2d} Si bien ninguno de los RA resultó soluble en agua pura, la evaluación de distintos solventes orgánicos (Tabla 2.4) condujo a la elección de CH₃OH como un solvente orgánico adecuado para las preparaciones de las soluciones madre de C1RA, C4RA y C7RA dada su accesibilidad, bajo costo y su baja interferencia en estudios por técnicas ópticas como UV y fluorescencia.¹⁵ La solubilidad de C1RA en CH₃OH a temperatura ambiente es parcial debido al mayor carácter polar de la molécula. La disolución completa del macrociclo requiere de mayor volumen de solvente y es posible con asistencia de sonicación.

La solubilidad de C4RA en medios acuosos con 2 y 10% v/v de CH₃OH fue evaluada mediante el aumento gradual de la concentración del macrociclo hasta observar una desviación de la respuesta lineal de absorbancia por espectroscopia UV. En presencia de *buffer* fosfato (PBS) a pH = 7,00 y CH₃OH 2% v/v es posible solubilizar hasta 20×10^{-6} M de C4RA. El incremento de la concentración de CH₃OH hasta 10% v/v no se tradujo en un aumento notable de la solubilidad de C4RA. La solubilidad de C4RA resultó independiente de la concentración salina en el intervalo de concentraciones (5,4 - 43,4) 10^{-3} M. No se registraron disminuciones

^{2d} (10,0 ± 0,2) mg es la mínima masa que puede ser pesada con error < 2% en las balanzas analíticas empleadas.

de las señales de absorción de C4RA en 2% CH₃OH y PBS a pH = 7,00 o en sus espectros de emisión de fluorescencia con PBS a pH = 5,80 en el mismo intervalo de concentraciones.

La máxima concentración evaluada por espectroscopia UV que permitió obtener soluciones de C1RA en PBS a pH = 7,00 y CH₃OH 10% v/v fue 7×10^{-6} M; en tanto en PBS a pH 5,80 y CH₃OH 2% v/v la máxima concentración de trabajo posible con respuesta lineal de emisión fluorescente fue 3×10^{-6} M. Las concentraciones máximas de trabajo de C1RA fueron menores con respecto a C4RA debido a la menor solubilidad de C1RA en CH₃OH. En bibliografía se ha informado que las concentraciones máximas de C1RA que pueden obtenerse en soluciones de CH₃OH/H₂O son 1,0 mM y 2,4 mM para las fracciones molares ($X_{\text{CH}_3\text{OH}}/X_{\text{H}_2\text{O}}$) 0,13:0,87 y 0,39:0,61, respectivamente.

En el caso de C11RA, la notable apolaridad molecular introducida por las extensiones de las cuatro cadenas de n-undecilo no permite obtener soluciones de este macrociclo en solventes orgánicos polares próticos como metanol y etanol; y apróticos como dioxano o ACN. En esta Tesis, la solubilización de 10 mg de C11RA sintetizado fue posible en 25 mL de CHCl₃ luego de 30 minutos de reposo. Otros autores han reportado la adquisición de espectros UV y de fluorescencia de soluciones 4×10^{-5} M de C11RA en CH₂Cl₂, clorobenceno y benceno.¹⁶

Tabla 2.3. Ensayos cualitativos de solubilidad de C-alkilresorcin[4]arenos.

C-alkilresorcin[4]areno	Solubilidad en solventes orgánicos, g/100 mL
C1RA	0,1 (CH ₃ OH con sonicación)
C4RA	0,2 (CH ₃ OH o C ₂ H ₅ OH)
C7RA	0,2 (CH ₃ OH o C ₂ H ₅ OH)
C11RA	0,04 (CHCl ₃)

La mayoría de los estudios reportados en bibliografía se han realizado en solventes orgánicos debido a las bajas solubilidades de los RA en medios acuosos.¹⁶⁻¹⁸ La presencia de grupos OH en las estructuras de los RA aumenta la solubilidad en medios acuosos muy básicos (pH > 12),^{19,20} en tanto que sus aplicaciones en medios neutros ha implicado la derivatización

de los macrociclos con grupos funcionales polares como sulfonato,^{21,22} carboxilato,^{23,24} aminas primarias y terciarias y con aldehídos glicosídicos. Además, el uso de tensioactivos como dodecilsulfato de sodio²⁵ y surfactantes no iónicos como Tritón X-100, Tritón X-405 y Brij-35^{26,27} han demostrado excelentes propiedades solubilizantes de resorcinarenos en medios acuosos. Sin embargo, las aplicaciones de técnicas sensibles como las espectroscopias UV-visible y de fluorescencia a menudo permiten el análisis de soluciones acuosas muy diluidas de compuestos poco solubles sin la necesidad de derivatización, de adición de agentes solubilizantes y del uso de proporciones elevadas de solventes orgánicos.

Los resorcinarenos exhiben en medios acuosos fenómenos de agregación cuyo origen radica en la estructura anfífila de los macrociclos.²⁰ El parámetro que define la tendencia de una molécula anfífila a agregarse es la concentración micelar crítica (CMC). Los valores de CMC reportados a partir de mediciones de tensión superficial en medio acuoso con NaOH a pH = 13 para C-alkilresorcin[4]arenos tetrafenolatos¹⁹ con 4; 6 y 8 átomos de carbono en sus cadenas alifáticas hidrocarbonadas son 2,8; 0,04 y 0,008 mM.²⁰ En este trabajo de Tesis, las concentraciones empleadas en medios acuosos con 2% v/v de CH₃OH en los estudios efectuados con C1RA, C4RA y C7RA mediante UV y fluorescencia se encuentran varios órdenes de magnitud por debajo ($10^2 - 10^3$) de los valores de CMC informados. Por lo tanto, los fenómenos que se describirán en los capítulos siguientes relativos al comportamiento ácido-base y a la química huésped-receptor de los C-alkilresorcin[4]arenos se atribuyen a un comportamiento de los macrociclos en estado monomérico y no a efectos de agregación.

La estabilidad de las soluciones madre de los resorcinarenos se evaluó mediante el control de sus espectros de absorción UV a una dada concentración del macrociclo. Las soluciones preparadas en metanol de C4RA resultaron estables por 24 h, mientras que C1RA y C7RA demostraron una estabilidad superior (48 h). En ambos casos se consideró que cambios en sus espectros de absorción UV superiores al 5% indicaban una alteración considerable de la naturaleza de la solución original. La descomposición de las soluciones orgánicas fue evidenciada por la aparición de una coloración rosada. Las soluciones de C11RA en CHCl₃ resultaron considerablemente más estables sin variación espectral hasta por un mes desde su preparación. Las soluciones acuosas de C1RA, C4RA y C7RA también demostraron tiempos de estabilidad cortos, similares a los obtenidos en metanol. Los tiempos de estabilidad más cortos se observaron en las soluciones preparadas en medios básicos diluidos empleando hidróxidos de metales alcalinos, las cuales se tornaron rosadas a las pocas horas desde su preparación. En condiciones ácidas, no se observó aparición de color en las soluciones. No obstante, como se ha descrito anteriormente, los equilibrios reversibles de ciclización y apertura de anillo de los macrociclos ocurren en soluciones ácidas diluidas de RA (Sección 2.2.2).

2.4.3. Caracterización espectroscópica

2.4.3.1. Resonancia magnética nuclear

Los espectros de ^1H RMN de los macrociclos C1RA, C4RA, C7RA y C11RA indican en todos los casos una distribución de las señales caracterizada por dos singletes asignados a los protones aromáticos H^{orto} y H^{meta} y un triplete (multiplete si $\text{R}=\text{CH}_3$) correspondiente a los protones alifáticos H^{metino} (Figura 2.6). Los protones aromáticos, H^{orto} y H^{meta} , poseen desplazamientos químicos característicos independientemente del sustituyente alquilo ($\sim 6,10$ ppm y $\sim 7,20$ ppm, respectivamente) (Tabla 2.5). Las asignaciones de los desplazamientos químicos de H^{orto} a $\sim 6,10$ y de H^{meta} a $\sim 7,20$ ppm ha sido previamente elucidada por otros autores mediante experimentos NOE y de tiempos de relajación espín-red, T_1 .⁷ Entre las señales alifáticas, las correspondientes a H^{metino} se localizan a campos más bajos con respecto a los protones de las cadenas hidrocarbonadas ($\sim 4,31$ ppm). El efecto tomador de densidad electrónica de los anillos aromáticos vecinos induce un efecto desapantallante de los núcleos magnéticos de H^{metino} dando origen a esta señal característica en los C-alquioresorcin[4]arenos. La multiplicidad de la señal de H^{metino} depende de la naturaleza del sustituyente alquilo. En el caso de C1RA, la señal de H^{metino} es un cuadruplete (vecino al sustituyente CH_3), pero su desdoblamiento es un triplete si el número de átomos de carbono de la cadena es ≥ 2 (vecino al sustituyente CH_2R) (Tabla 2.4). Las señales de H^{metino} de C7RA y C11RA en CDCl_3 poseen una menor resolución y la multiplicidad no pudo ser asignada (Figura 2.6).

Los espectros adquiridos se diferencian en las señales de los protones de las cadenas hidrocarbonadas dado que sus longitudes son distintas para cada macrociclo. Por lo tanto, la integración de las señales alifáticas por debajo de 1,5 ppm es útil en este caso para diferenciar la identidad de los C-alquioresorcin[4]arenos. El metilo terminal de las cadenas alifáticas se presenta como un triplete (doblete si $\text{R}=\text{CH}_3$) con el menor desplazamiento químico a $\sim 0,9$ ppm. En el caso de C1RA, esta señal aparece a campos más bajos (1,65 ppm) debido al desapantallamiento que experimentan los sustituyentes metilo por su cercanía a los anillos aromáticos. Este mismo fenómeno también ocurre con el grupo metileno inicial de cada sustituyente alifático (CH_2R) y la señal generada se distingue como un pico de menor intensidad y superpuesto a la señal aguda e intensa correspondiente a los protones alifáticos restantes (Figura 2.6).

La distribución de los átomos de hidrógeno observada es consistente con la conformación como (C_{4v}) totalmente simétrica, en la cual los protones H^{orto} , H^{meta} y H^{metino} de cada unidad monomérica son equivalentes a los de las unidades vecinas. La simetría C_{4v} es el resultado del equilibrio conformacional entre dos conformeros bote con simetría C_{2v} con configuraciones *recc* y *axiales*.^{8,10} Las relaciones 1:1 entre las integrales de una señal aromática y una señal alifática indican que los puentes metileno se encuentran tetra-sustituidos por los

sustituyentes alquilo en posiciones axiales y con configuración relativa *rccc*. La tetra-sustitución es consistente con la reacción de ciclocondensación equimolar entre 4 equivalentes de resorcinol con 4 equivalentes de un aldehído.

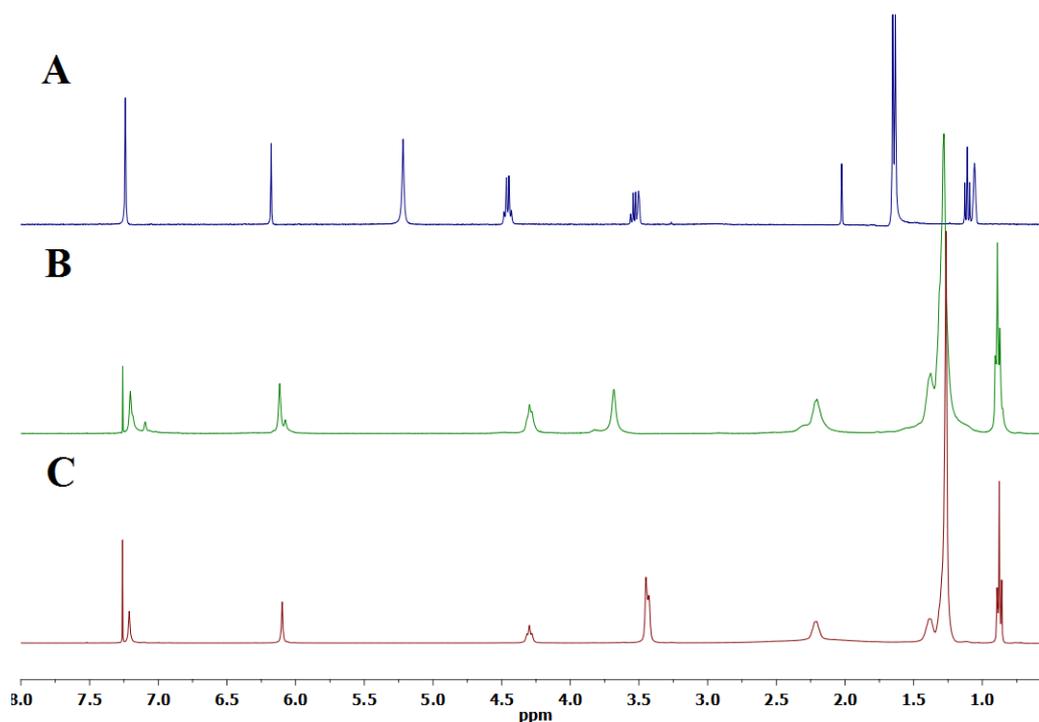


Figura 2.6. Espectros de ^1H -RMN de A) C-metilresorcin[4]areno (en etanol- d_6), B) C-n-heptilresorcin[4]areno (en CDCl_3) y C) C-n-undecilresorcin[4]areno (en CDCl_3).

Tabla 2.4. Desplazamientos químicos (ppm), integraciones y multiplicidad de las señales ^1H de C-alkilresorcin[4]arenos.

C-alkilresorcin[4]areno	H ^{orto}	H ^{meta}	H ^{metino}	Sustituyente alquilo	OH
C1RA ^a	6,18	7,24	4,48	CH_3 1,65	No observado
C4RA ^b	6,24	7,56	4,30	$-\text{CH}_2\text{C}_2\text{H}_4\text{CH}_3$ 2,30; 1,34; 0,89	8,43
C7RA ^c	6,12	7,20	4,31	$-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{CH}_3$ 1,28; 0,91	9,38; 9,62
C11RA ^c	6,10	7,21	4,32	$-\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{CH}_3$ 1,26; 0,89	9,50

^a etanol- d_6
^b $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$
^c CDCl_3

La técnica de RMN ha demostrado gran utilidad para corroborar la estereoselectividad del procedimiento de síntesis empleado. La identificación de las estructuras de los distintos estereoisómeros de RA es posible dado que el número de señales de protones aromáticos y metinos se asocia a un determinado isómero (Tabla 2.5). Los cambios en la disposición espacial del macrociclo altera el número de protones que se encuentran en entornos químicos no equivalentes.^{7,12}

Tabla 2.5. Número de señales de ¹H RMN según el estereoisómero de resorcin[4]areno.

Isómero	H ^{orto}	H ^{meta}	H ^{metino}
Cono	1	1	1
Bote	2	1	1
1,3-alternado	2	2	1
1,2-alternado	2	2	3
Silla	2	2	1

La comparación de los resultados obtenidos con las caracterizaciones reportadas en bibliografía permitió concluir que los productos tetraméricos C4RA, C7RA y C11RA presentan simetría C_{4v} (Figura 2.6 y Tabla 2.5). La ausencia de un mayor número de señales es indicativa de la igualdad de los entornos en los que cada protón se encuentra en la estructura tridimensional.

2.4.3.2. Espectroscopia de absorción UV-visible

Los espectros de absorción UV-visible de soluciones de C1RA, C4RA y C7RA en CH₃OH y de C11RA en CHCl₃ presentan valores máximos de absorción ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}}$) a 285,5; 287,0; 286,5 y 286,0 nm (Figura 2.7). El valor de $\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}}$ de C1RA determinado en PBS a pH = 7 con 10% v/v de CH₃OH es 282,5 nm, comparable con el valor de 283 nm informado en bibliografía para este macrociclo en agua.²⁸ Los corrimientos de $\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}}$ para los C-*n*-alquilresorcin[4]arenos con cadenas laterales alifáticas de distintas longitudes son pequeños ($\Delta\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}} = 4,5$ nm en Figura 2.7) dado que los sustituyentes *n*-alquilo presentan transiciones electrónicas de tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ con bandas de absorción en la región UV de alta energía del espectro electromagnético (<150 nm).

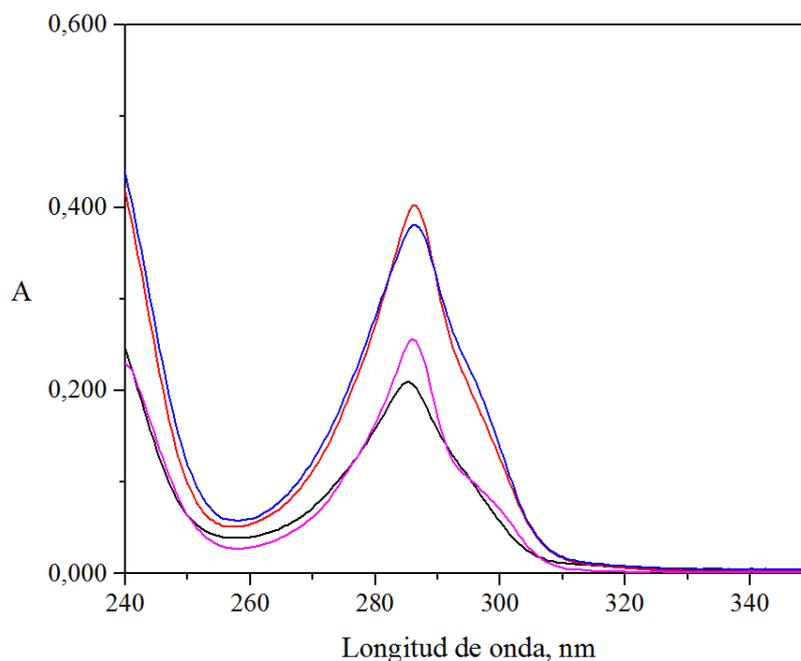


Figura 2.7. Espectros de absorción UV-visible de C1RA (—), C4RA (—), C7RA (—) y C11RA (—). [C1RA] = $1,50 \times 10^{-5}$ M, [C4RA] = $2,14 \times 10^{-5}$ M y [C7RA] = $2,34 \times 10^{-5}$ M en CH₃OH y [C11RA] = $1,44 \times 10^{-5}$ M en CHCl₃; 25,0 °C; b = 1 cm.

La determinación de la concentración de una dada especie a partir de la determinación experimental de sus espectros de absorción se basa en las leyes de Lambert y Beer. La ley de Lambert enuncia que la cantidad de luz absorbida es independiente de la potencia o intensidad inicial de luz y la ley de Beer establece que la cantidad de luz absorbida es proporcional a la concentración de las moléculas absorbentes en la trayectoria del haz a través de la solución. En consecuencia, la concentración de un analito responde linealmente con su absorbancia medida según la Ec. 2.4:

$$A = \varepsilon b [c] \quad (2.4)$$

A representa la absorbancia; ε es la constante de proporcionalidad denominada absorptividad molar (en M⁻¹ cm⁻¹); b es la longitud de la trayectoria del haz a través de la solución (en cm) y $[c]$ representa la concentración del analito (expresada en M). La absorptividad molar es una propiedad característica de un dado compuesto químico que indica la probabilidad de que ocurra una determinada transición electrónica entre dos estados electrónicos y depende de la longitud de onda, el solvente y la temperatura.

Los espectros de absorción correspondientes a C1RA, C4RA, C7RA y C11RA se registraron con concentraciones crecientes de los macrociclos en distintos solventes (Tabla 2.7) y se graficaron los valores de las absorbancias a cada $\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}}$ en función de las concentraciones.

Los gráficos de los datos presentaron respuestas lineales según la Ec. 2.4. Las constantes de absorptividad molar informadas en la Tabla 2.7 se determinaron a partir de las curvas obtenidas mediante regresiones lineales de mínimos cuadrados con excelentes coeficientes de regresión ($r > 0,99$).

Tabla 2.6. Valores de absorptividad molar de C-alkilresorcin[4]arenos determinados a las longitudes de onda de absorción máxima en distintos solventes.

C-alkilresorcin[4]areno	Solvente ^a	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}}$	$\epsilon (\times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
C1RA ^b	CH ₃ OH	285,5	131,5 ± 0,4
	PBS (pH=7) / CH ₃ OH 10% v/v	282,5	117 ± 3
C4RA	PBS (pH=7) / CH ₃ OH 10% v/v	286,0	191 ± 1
	CH ₃ OH	287,0	204 ± 4
C7RA	CH ₃ OH	286,5	158 ± 2
C11RA	CHCl ₃	286,0	179 ± 1

^a 25,0 °C

^b $\epsilon = (6772 \pm 40) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en agua.²⁸

Los valores de ϵ de C4RA, C7RA y C11RA determinados no presentan variaciones significativas de ϵ en el mismo y entre distintos solventes. Otros autores han informado resultados similares con *p*-alkilcalix[4]arenos disueltos en distintos solventes orgánicos.^{29,30} A partir de la Tabla 2.6 se concluye que la variación de la longitud de las cadenas laterales en los C-alkilresorcin[4]arenos analizados no produce cambios notables de $\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}}$ o de ϵ , lo cual es consistente con un comportamiento no auxocromo de los sustituyentes.

2.4.3.3. Espectroscopia de emisión de fluorescencia

En la Figura 2.8 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de C1RA y C4RA en medios acuosos (2% CH₃OH/PBS a pH = 5,80) empleando como longitud de onda de excitación (λ_{ex}) 287 nm. Las longitudes de onda de máxima emisión ($\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}}$) de C1RA y C4RA

son 316 nm y 323 nm, respectivamente, y la intensidad de fluorescencia de C1RA es menor respecto a la de C4RA.

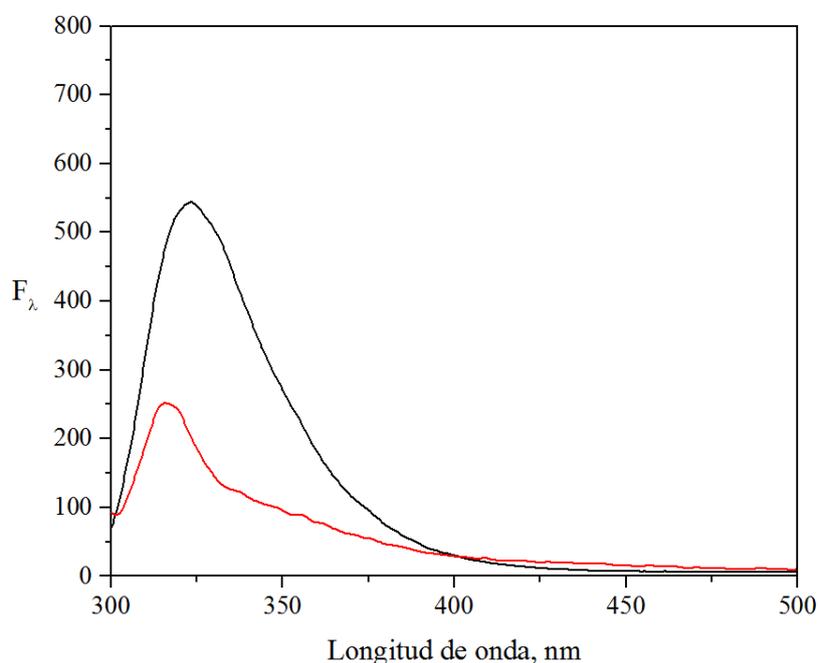


Figura 2.8. Espectros de emisión de fluorescencia de C1RA (—) y C4RA (—) a pH = 5,80 (PBS). [C1RA] = [C4RA] = $1,00 \times 10^{-6}$ M; 2% v/v CH₃OH; $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm; ganancia del fotomultiplicador (g.f.) = 800; 25,0 °C; b = 1 cm.

La intensidad de emisión de fluorescencia, F , de un fluoróforo, cuya concentración cumple con la condición $2,303 \varepsilon b [c] < 0,05$, se define como:

$$F = 2,303 B I_0 \phi \varepsilon b [c] \quad (2.5)$$

B es una constante asociada a varios parámetros instrumentales; I_0 representa la intensidad de la fuente de excitación; b , el paso óptico; ϕ , el rendimiento cuántico de fluorescencia; ε , es la absorptividad molar a la longitud de onda de excitación y $[c]$, la concentración molar del luminóforo.

La comparación de los espectros de la Figura 2.8, tomados en condiciones tales que el factor $2,303 B I_0 b [c]$ es constante, indica que la diferencia en la intensidad de fluorescencia está dada por el factor $\phi\varepsilon$, mayor en el caso de C4RA. El valor de ε de C1RA es menor al de C4RA en medios acuosos (Tabla 2.7), lo cual justifica parcialmente la intensidad de emisión fluorescente más baja.

2.5. CONCLUSIONES

Los C-alquilresorcin[4]arenos C4RA, C7RA y C11RA se sintetizaron de acuerdo a los procedimientos de síntesis descritos y los productos se obtuvieron de manera estereoselectiva y con alta pureza.

Los macrociclos, a excepción de C11RA, pueden ser disueltos en soluciones acuosas a concentraciones que permiten la adquisición de espectros de absorción UV-visible y de emisión de fluorescencia, aunque las soluciones presentan una estabilidad de un día. El comportamiento espectroscópico de los macrociclos C4RA, C7RA y C11RA por espectroscopia UV-visible indican que sus ϵ no dependen significativamente del medio, ya sea acuoso, CH₃OH o CHCl₃. El menor valor de ϵ de C1RA con respecto a los demás macrociclos podría deberse a una mayor flexibilidad conformacional del macrociclo.¹³ Además, el valor inferior de ϵ de C1RA justifica en parte su emisión fluorescente menor con respecto a C4RA (espectros de ambas especies obtenidos en las mismas condiciones).

2.6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.6.1. Instrumentos

Los puntos de fusión se determinaron empleando un equipo electrotérmico Electrothermal.

Los espectros de ¹H-RMN se determinaron en un equipo Bruker Avance II (400 MHz) a 25,0 °C. Los solventes empleados fueron etanol-*d*₆, (CD₃)₂CO y CDCl₃.

Los espectros de absorción UV-Vis se registraron en espectrofotómetros Shimadzu UV-2101 PC o Shimadzu 1800. Los parámetros instrumentales empleados fueron: ancho de rendija = 1,0 nm en ambos equipos, velocidad de barrido media y adquisición de la absorbancia cada 0,5 nm.

Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron empleando un espectrofluorímetro Perkin Elmer (LS 55). Los anchos de rendija de emisión y de excitación empleados fueron 10 nm y la ganancia del fotomultiplicador (g.f.) se especifica en cada caso.

La homogenización de las muestras se realizó con un sonicador Testlab tb02 o Arcano. La temperatura de las soluciones y del compartimiento de la celda se controló empleando baños con circulación Haake.

2.6.2. Síntesis y purificación de C-alquilresorcin[4]arenos

2.6.2.1. C-butilresorcin[4]areno

La síntesis de C-butilresorcin[4]areno¹³ se realizó a partir de cantidades equimolares de pentanal y resorcinol. El medio en el que se llevó a cabo la reacción fue C₂H₅OH, H₂O y solución acuosa concentrada de HCl en la proporción 2:2:1 v/v, respectivamente. Las condiciones de reacción fueron 25,0 °C a reflujo durante 24 h. El producto obtenido se purificó por columna cromatográfica y recristalización. En cromatografía se utilizó la técnica de siembra en columna húmeda humedeciendo la sílica en éter de petróleo y agregando la siembra (producto+sílica) en éter de petróleo. Se emplearon como fases móviles éter de petróleo-acetona 70:30 y 60:40 v/v. Las fracciones obtenidas se recristalizaron a partir de éter de petróleo-acetona 90:10 y los productos de recristalización se filtraron a presión reducida. La eficiencia de las purificaciones realizadas se evaluó por cromatografía en placa delgada (TLC) con fase estacionaria de alúmina. Se empleó como fase móvil éter de petróleo-acetona 50:50 v/v y se compararon las fracciones recristalizadas con producto no purificado y producto purificado. El producto de recristalización que mostró por TLC la mayor pureza se secó a presión reducida durante 10 h a 93-95 °C.

2.6.2.2. C-heptilresorcin[4]areno

La síntesis de C-heptil[4]resorcinareno¹³ se llevó a cabo empleando 120 mmoles de resorcinol y 60 moles de octanal en C₂H₅OH 95%:H₂O:HCl 37% 2:2:1 a 50 °C durante una hora y luego de dejó reaccionar a temperatura ambiente durante una semana. El crudo de reacción se recuperó por filtración y se lavó con agua hasta que se alcanzó pH neutro. Posteriormente se lavó con etanol frío para eliminar parcialmente el producto secundario de la polimerización de color rojizo y consistencia oleosa. Finalmente, el producto de recristalizó de C₂H₅OH:H₂O 1:1, aunque resultó insatisfactoria. Se optó recristalizar por segunda vez en C₂H₅OH:H₂O 1:1 disolviendo primeramente el sólido en etanol, donde la solubilidad fue alta y se generó una solución naranja pardo, y luego se añadió igual volumen de agua a reflujo. Se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente obteniéndose una suspensión espesa de color marrón claro. El producto se filtró al vacío y se lavó con 22 mL del solvente de recristalización, eliminándose una impureza de color naranja en las aguas madres, y luego con etanol absoluto. El sólido obtenido se secó en una estufa a 50 °C. Dado que las impurezas no se lograron eliminar mediante la recristalización efectuada, se decidió purificar el macrociclo mediante cromatografía en columna.

Las fases móviles se seleccionaron analizando los valores de relación de frente (R_f) del macrociclo. C-heptil[4]resorcinareno se disolvió en acetona y se sembró en una placa de

TLC. La fase móvil éter de petróleo:acetona 75:25 v/v no tuvo polaridad suficiente para que la muestra migrara y ésta permaneció en el punto de siembra.

Una mezcla éter de petróleo:acetona 1:1 v/v permitió que la siembra migrara con $R_f = 0,46$. De acuerdo a estas pruebas, las fases móviles seleccionadas y los volúmenes empleados en la cromatografía en columna fueron:

1º: Éter de petróleo acetona 70:30 v/v; 35 mL

2º: Éter de petróleo acetona 60:40 v/v; 35 mL

3º: Éter de petróleo acetona 1:1 v/v; 30 mL

4º: Acetona; 10 mL

La muestra se preparó en forma de pastilla de sílica y se sembró en la columna. La misma se acondicionó con 10 mL de éter de petróleo. Seguidamente se eluyeron las fases móviles mencionadas con polaridad creciente. La pureza de las fracciones obtenidas se analizó por TLC empleando éter de petróleo acetona 1:1 v/v como fase móvil y se revelaron con lámpara UV. Se recolectaron 15 fracciones, de las cuales 7-15 presentaron una única mancha con $R_f = 0,45$ y se consideró que contenían el mismo componente. En las fracciones 1-6 no eluyó ningún compuesto. Las fracciones se combinaron en un erlenmeyer y la solución no mostró el color naranja-pardo característico de la muestra impura. En el punto de siembra de la columna quedó una impureza roja-rosada y a una distancia mayor se observó un gradiente de color pardo. El solvente de las fracciones recombinadas se evaporó en un evaporador rotatorio, obteniéndose un sólido de color marrón muy claro, con igual apariencia a la de los resorcinarenos puros sintetizados. C-heptilresorcin[4]areno purificado se secó a presión reducida a 60 °C durante 7 horas.

2.6.2.3. C-undecilresorcin[4]areno

La síntesis de C-undecilresorcin[4]areno³¹ se realizó disolviendo 0,082 moles de resorcinol en C₂H₅OH:HCl 37% 3:1 v/v y posteriormente se hicieron reaccionar con 0,080 moles de dodecanal, el cual se adicionó al medio gota a gota con agitación a 5 °C. Culinada la adición del aldehído, se armó un equipo de reflujo y la temperatura de la reacción se elevó a 80 °C durante 24 horas.

El crudo de reacción se filtró a presión reducida y el sólido obtenido de coloración naranja se lavó con abundante agua hasta neutralización de las aguas madres. Las impurezas de la reacción que originaban el color naranja-rojizo se eliminaron lavando el sólido con metanol frío. Finalmente, el producto se recrystalizó dos veces en metanol. El solvente remanente se eliminó secando en la estufa y luego al vacío a 90 °C durante 7 horas.

2.7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, K. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry: From Supramolecules to Nanotechnology*; John Wiley & Sons, 2007.
- (2) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, 2009.
- (3) De Greef, T. F. A.; Smulders, M. M. J.; Wolfs, M.; Schenning, A. P. H. J.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. Supramolecular Polymerization. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (11), 5687.
- (4) Weinelt, F.; Schneider, H. J. Host-Guest Chemistry. Mechanisms of Macrocyclic Genesis. The Condensation of Resorcinol with Aldehydes. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5527.
- (5) Gutsche, D. C.; Bauer, L. J. Calixarenes. 13. The Conformational Properties of Calix[4]arenes, Calix[6]arenes, Calix[8]arenes, and Oxacalixarenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6052.
- (6) Mann, G.; Weinelt, F.; Hauptmann, S. Influence of Aromatic Substituents on the Configuration and Conformation of calix[4]areneoctols. *J. Phys. Org. Chem.* **1989**, *2*, 531.
- (7) Abis, L.; Dalcanale, E.; Du vosel, A.; Spera, S. Structurally New Macrocyclics from the Resorcinol-Aldehyde Condensation. Configurational and Conformational Analyses by Means of Dynamic NMR, NOE, and T1 Experiments. *J Org Chem* **1988**, *53*, 5475.
- (8) Sverker Högberg, A. G. Stereoselective Synthesis and DNMR Study of Two 1,8,15,22-Tetraphenyl[1 4]metacyclophan-3,5,10,12,17,19,24,26-Octols. *J Am Chem Soc* **1980**, No. 102, 6046.
- (9) H.-J. Schneider; U. Schneider. The Host-Guest Chemistry of Resorcinarenes. In *Calixarenes 50th Anniversary: Commemorative Issue*; Springer Netherlands, 1994; pp 67–83.
- (10) Hoegberg, A. G. S. Two Stereoisomeric Macrocyclic Resorcinol-Acetaldehyde Condensation Products. *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (22), 4498.
- (11) Schiel, C.; Hembury, G. A.; Borovkov, V. V.; Klaes, M.; Agena, C.; Wana, T.; Grimme, S.; Inoue, Y.; Mattay, J. New Insights into the Geometry of Resorc[4]arenes: Solvent-Mediated Supramolecular Conformational and Chiroptical Control. *J Org Chem* **2006**, No. 71, 976.
- (12) Botta, B.; Cassani, M.; D'Acquarica, I.; Misiti, D.; Subissati, D.; Monache, G. D. Resorcarenes: Emerging Class of Macrocyclic Receptors. *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9*, 337.
- (13) Tunstad, L. M.; Tucker, J. A.; Dalcanale, E.; Weiser, J.; Bryant, J. A.; Sherman, J. C.; Helgeson, R. C.; Knobler, C. B.; Cram, D. J. Host-Guest Complexation. 48. Octol Building Blocks for Cavitands and Carcerands. *J Org Chem* **1989**, *54*, 1305.
- (14) M. Pietraszkiewicz; M. Pietraszkiewicz; E. Uzig; P. Prus; Z. Brzózka; K. Woźniak; R. Bilewicz; T. Borowiak; M. Mączyński. Recent Advances in Calix[4]resorcinarene Chemistry. *Chem. Comput. Simul. Butlerov Commun.* **2000**, *3*, 55.
- (15) Pacioni, N. L.; Bracamonte, A. G.; Veglia, A. V. Comparative Effect of Cyclodextrin Nanocavities versus Organic Solvents on the Fluorescence of Carbamate and Indole Compounds. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2008**, *198*, 179.
- (16) Kubinyi, M.; Brátán, J.; Grofcsik, A.; Biczók, L.; Poór, B.; Bitter, I.; Grün, A.; Bogáti, B.; Tóth, K. Proton Transfer and Supramolecular Complex Formation between Nile Blue and tetraundecylcalix[4]resorcinarene - a Fluorescence Spectroscopic Study. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2002**, *2*, 1784.

- (17) Kobayashi, K.; Asakawa, Y.; Kikuchi, Y.; Toi, H.; Aoyama, Y. CH- π Interaction as an Important Driving Force of Host-Guest Complexation in Apolar Organic Media. Binding of Monools and Acetylated Compounds to Resorcinol Cyclic Tetramer As Studied by ^1H NMR and Circular Dichroism Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2648.
- (18) Kikuchi, Y.; Tanaka, Y.; Sutarto, S.; Kobayashi, K.; Toi, H.; Aoyama, Y. Highly Cooperative Binding of Alkyl Glucopyranosides to the Resorcinol Cyclic Tetramer due to Intracomplex Guest-Guest Hydrogen-Bonding: Solvophobicity/solvophilicity Control by an Alkyl Group of the Geometry, Stoichiometry, Stereoselectivity, and Cooperativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10302.
- (19) Timmerman, P.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. Resorcinarenes. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2663.
- (20) K. Sugiyama; K. Esumi; Y. Koide. Aqueous Properties of Resorcinol-Type Calix[4]arenes Bearing Four Alkyl Side Chains. *Langmuir* **1996**, No. 12, 6006.
- (21) Lukin, O.; Shivanyuk, A.; Pirozhenko, V. V.; Tsymbal, I. F.; Kalchenko, V. I. Synthesis, Conformation, and Binding Properties of Resorcicarene Tetrasulfonates. Asymmetric Reorganization of Pendant Sulfonyl Groups via Intramolecular S=O - H-O Hydrogen Bonds. *J Org Chem* **1998**, *63*, 9510.
- (22) Kazakova, E. K.; Makarova, N. A.; Ziganshina, A. U.; Muslinkina, L. A.; Muslinkin, A. A.; Habicher, W. D. Novel Water-Soluble tetrasulfonatomethylcalix[4]resorcinarenes. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 10111.
- (23) Vagapova, L. I.; Fakhertdinova, A. G.; Burirov, A. R.; Pudovik, M. A. Calix[4]resorcinols Modified with γ -Aminobutyric Acid Fragments. *Russ. J. Gen. Chem.* **2015**, *85*, 1783.
- (24) Kunsági-Máté, S.; Szabó, K.; Lemli, B.; Bitter, I.; Nagy, G.; Kollár, L. Increased Complexation Ability of Water-Soluble Calix[4]resorcinarene Octacarboxylate toward Phenol by the Assistance of Fe(II) Ions. *J Phys Chem B* **2004**, *108*, 15519.
- (25) Mustafina, A. R.; Elistratova, Y. G.; Syakaev, V. V.; Amirov, R. R.; Konovalova, A. I. Receptor Properties of calix[4]resorcinarenes toward Tetramethylammonium and Choline Cations in Micellar Solutions of Sodium Dodecyl Sulfate. *Russ. Chem. Bull.* **2006**, *55*, 1419.
- (26) Mustafina, A. R.; Amirov, R. R.; Elistratova, Y. G.; Skripacheva, V. V.; Nugaeva, Z. T.; Kazakova, E. K. Solubility, Acid-Base and Complexation Properties of Calix[4]resorcinarene in Aqueous Solutions of Nonionic Surfactants. *Colloid J.* **2002**, *64*, 734.
- (27) Mustafina, A. R.; Elistratova, Y. G.; Amirov, R. R.; Gruner, M.; Konovalov, A. I.; Habicher, W. D. Solubilization and Acidic and Receptor Properties of calix[4]resorcinarenes in Aqueous Solutions of Oxyethylated Dodecanol Brij-35. *Russ. Chem. Bull.* **2005**, *54*, 383.
- (28) Franco, L. S.; Salamanca, Y. P.; Maldonado, M.; Vargas, E. F. Solubility of Calix[4]resorcinarene in Water from (278.15 to 308.15) K. *J. Chem. Eng. Data* **2010**, *55*, 1042.
- (29) Kämmerer, H.; Happel, G. *Makromol. Chem.* **1978**, *179* (5), 1199.
- (30) Gutsche, C. D. The Calixarenes. In *Structural Chemistry*; Springer, 1984; pp 1-47.

- (31) Aoyama, Y.; Tanaka, Y.; Toi, H.; Ogoshi, H. Polar Host-Guest Interaction. Binding of Nonionic Polar Compounds with a Resorcinol-Aldehyde Cyclooligomer as a Lipophilic Polar Host. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (2), 634.

Capítulo 3

Propiedades ácido-base de C-alquilresorcin[4]arenos

3.1. CARACTERIZACIÓN ÁCIDO-BASE DE SISTEMAS HUÉSPED-RECEPTOR

La determinación precisa de las propiedades en solución de especies químicas tales como la solubilidad, energías libres de solvatación y desolvatación y constantes de disociación ácido-base, resulta crucial no sólo por el aporte de parámetros fisicoquímicos básicos, sino además por la aplicación práctica de estas características para el desarrollo racional de nuevos sistemas. Por ejemplo, las propiedades espectroscópicas de los analitos analizados por diversas técnicas en muchas ocasiones depende de sus comportamientos en solución, la comprensión de los fenómenos de agregación y sistemas auto-ensamblados requiere conocer la solubilidad, la concentración micelar crítica y otras propiedades acuosas de las especies involucradas, las propiedades huésped-receptor pueden ser moduladas por la polaridad del medio, la concentración iónica y el pH. Además, el estudio de las propiedades fundamentales en medios acuosos de distintas especies simples y complejas permite la comprensión de los mecanismos que conducen a los fenómenos fisicoquímicos observados y en muchas ocasiones este conocimiento es útil para la elucidación de los procesos análogos que ocurren en los sistemas vivos.¹ Desde otro punto de vista, una de las razones fundamentales por las que es necesario conocer las propiedades acuosas de receptores que pueden funcionar como anfitriones de distintos sustratos de interés biológico es la potencial aplicación de los sistemas huésped-receptor en campos de la biología, biotecnología e investigación farmacéutica.^{2,3}

El conocimiento de las propiedades ácido-base tanto del sustrato libre como del receptor libre son fundamentales para la posterior interpretación de la interacción supramolecular o su ocurrencia dependiente del pH.⁴ Por ejemplo, cavitandos fenólicos como los calixarenos y los resorcinarenos han sido empleados como recubrimiento de columnas para HPLC. Dado que los cavitandos presentan grupos OH ionizables, la eficiencia de la separación de los analitos puede ser controlada modificando el grado de ionización del cavitando por efecto del pH.^{5,6} El control de estas propiedades también es fundamental, por ejemplo, para las aplicaciones de los cavitandos fenólicos en procedimientos de extracción de cationes metálicos⁷ o en la inclusión de fármacos que posteriormente deben ser liberados de manera controlada.⁸

Los grupos OH de calixarenos y resorcinarenos se comportan como ácidos débiles por lo que reviste particular interés el estudio de sus propiedades polipróticas.⁹ De acuerdo a teoría ácido-base clásica de Brønsted-Lowry, el grado de ionización debido la capacidad donora o aceptora de protones está gobernado por las constantes de disociación ácido-base. En el caso particular de los cavitandos derivados de fenol, se ha demostrado que las constantes ácidas de la primera disociación son mayores con respecto a la de sus análogos monoméricos.^{10,11} En adición, la clasificación de ácidos y bases como duros o blandos según

el grado de la polarizabilidad de sus densidades electrónicas (teoría ácido-base de Lewis) también juega un rol fundamental para comprender muchas interacciones supramoleculares. En el caso de los cavitandos fenólicos, la presencia de los grupos OH aromáticos genera una disminución de la densidad electrónica de los arilos, lo cual se traduce en un aumento de la acidez de Lewis del sistema π . Dado que los grupos OH son ácidos de Brønsted, la disociación del protón y la posibilidad de deslocalización de la carga del fenóxido genera en consecuencia un incremento de la basicidad de Lewis de los electrones π .¹² Por lo tanto, el comportamiento poliprótico de los ciclofanos y el efecto electrónico notorio sobre el sistema π de la cavidad puede conducir a modificaciones en las interacciones con sustratos cuya polarizabilidad electrónica es complementaria.^{12,13}

3.1.1. Efecto del solvente sobre las constantes de disociación de especies orgánicas

Las determinaciones de las constantes de disociación ácida de los cavitandos fenólicos calixarenos y resorcinarenos, informadas generalmente como pK_a ($pK_a = -\log K_a$), a menudo se realizan en solventes orgánicos o mezclas acuoso-orgánico debido a la baja solubilidad de los macrociclos nativos en agua.¹⁴ Sin embargo, la naturaleza de las interacciones soluto-solvente y el grado de solvatación pueden afectar notablemente el comportamiento de especies orgánicas como ácidos o bases de Brønsted.¹⁵ En la disociación de especies neutras tales como los cavitandos fenólicos ocurre un cambio desde una especie neutra hacia dos especies iónicas, un fenolato y un protón. Debido a la aparición de cargas sobre las especies generadas, las interacciones electrostáticas se tornan importantes.¹⁶ Los efectos del solvente sobre los equilibrios ácido-base en ocasiones son interpretados en términos de los cambios en los efectos electrostáticos y de las interacciones no electrostáticas.¹⁵ La energía requerida para la separación de dos cargas opuestas en un solvente es inversamente proporcional a su constante dieléctrica. Esta energía puede ser provista por la solvatación de los iones y la formación de puentes de hidrogeno intermoleculares entre soluto y solvente también provee cierta estabilización.¹⁵ En solventes con baja constante dieléctrica, la solvatación de los iones menos efectiva provoca que las especies cargadas se mantengan cercanas y en solución se describen como un par iónico.¹⁷ Como consecuencia, el grado de ionización de especies ácidas en solventes orgánicos disminuye con respecto al agua y se observa un aumento de valor de pK_a .¹⁸

3.1.2. Efecto macrocíclico y de la compartimentalización sobre las constantes de disociación ácido-base de receptores y sustratos

El efecto macrocíclico produce que los grupos ionizables se encuentren a distancias muy cortas unos de otros y ello ha sido evidenciado por IR y RMN.¹⁹ El desplazamiento químico característico del grupo hidroxilo (grupo OH) de fenol y resorcinol en ^1H RMN es

alrededor de 7 ppm, mientras que en los análogos cíclicos calix[n]arenos y resorcin[4]arenos se presentan a campos más bajos (10 ppm). La frecuencia de absorción IR de la vibración del enlace O–H se desplaza de 3100 cm^{-1} en los monómeros fenólicos a $3200 - 3300\text{ cm}^{-1}$ en los derivados cíclicos. Los resultados espectroscópicos revelan un aumento de la energía del enlace O–H debido al efecto que posee la preorganización de las unidades aromáticas facilitando las interacciones puente de hidrógeno intramoleculares.¹⁹ Además de las propiedades físicas, las características químicas de los grupos OH también se modifican. La capacidad donora de hidrógeno de los calix[4]arenos en presencia de una base fuerte ha demostrado ser hasta 10 unidades de pK_a mayor con respecto al fenol.²⁰ Estos fenómenos son ejemplos del *efecto macrocíclico* que justifica las propiedades tanto físicas como químicas inusuales de los grupos OH que se presentan con una distribución pre-organizada con respecto a los análogos monoméricos u oligómeros acíclico.^{12,21}

La presencia de sustratos con grupos ionizables en micro-entornos como los generados por los surfactantes en soluciones acuosas o las nano-cavidades de los receptores macrocíclicos puede afectar sus propiedades ácido-base por efecto de la compartimentalización.²² Este efecto puede traducirse en la protección del huésped por la cavidad disminuyendo su constante de disociación; o bien, la disociación de la especie incluida puede estar promovida por la mayor estabilización de la base conjugada dentro de la cavidad, lo que genera un aumento de su constante de disociación.^{23,24} Los efectos de desplazamiento de las constantes ácido-base de sustratos producidos por la interacción con receptores macrocíclicos han sido ampliamente demostrados con las ciclodextrinas,^{25–28} cucurbiturilos^{29,30} y calix[n]arenos.^{6,24} Sin embargo, los estudios reportados sobre el efecto de resorcin[4]arenos sobre el comportamiento prático de distintos sustratos incluidos son escasos. Se destacan la alteración de la ionización de la histidina por interacción con tetrametilsulfonato-C-metilresorcin[4]areno³¹ y la transferencia de un protón de C-undecilresorcin[4]areno al colorante *Nile Blue* (Figura 3.1).³²

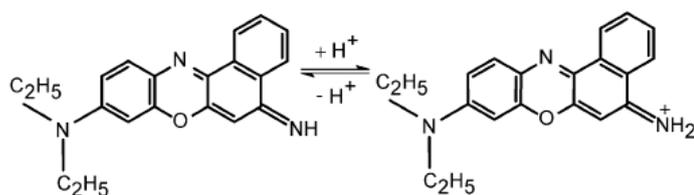


Figura 3.1. La protonación de la amina secundaria de *Nile Blue* por abstracción de un protón de C-undecilresorcin[4]areno es inducida por la formación de un complejo sustrato-receptor.

Además, resulta importante mencionar que el comportamiento ácido-base descrito por Brønsted-Lowry se refiere a la especie en su estado electrónico basal y en ocasiones, su excitación a un estado electrónico superior afecta notoriamente el grado de disociación

evidenciado por un valor de pK_a en el estado excitado (pK_a^*) distinto.³³ Algunos casos destacables de este efecto han sido demostrados por el incremento de pK_a^* de 1-aminopireno cuando se encuentra incluido en la cavidad de cucurbit[6]urilo³⁴ y la modificación de la acidez en el estado excitado de complejos de derivados de indol con ciclodextrinas con respecto a los sustratos libres.^{27,28} El efecto de la compartimentalización y casos análogos al efecto macrocíclico, como la pre-organización de grupos funcionales en los sitios activos de enzimas,¹⁹ han resultado ser fundamentales para que numerosos procesos biológicos tengan lugar.³⁵ Este hecho motiva la tendencia a la aplicación de la química ácido-base como uno de los estímulos más simples para manipular de manera controlada las interacciones de metabolitos biológicos, fármacos y moléculas de interés alimentario e industrial con receptores macrocíclicos en sistemas acuosos,^{1,3,6,36,37} y ello implica la necesidad de estudios exhaustivos, aún faltantes, de las propiedades polipróticas de macrociclos con elevado potencial y aplicabilidad como los resorcin[4]arenos.^{9,11,38,39}

3.1.3. Comportamiento poliprótico de calix[4]arenos

Debido a la similitud estructural existente entre los resorcin[4]arenos y los calix[4]arenos es esperable que ambos macrociclos presenten propiedades y comportamientos semejantes, por ejemplo sus características ácidas. Dado que las propiedades ácidas de los calix[4]arenos han sido extensa y metódicamente más estudiadas,^{10,21,40} resulta imprescindible ahondar en las particularidades fisicoquímicas y estructurales que les confieren a estos macrociclos su comportamiento ácido excepcional.

Los grupos OH unidos al portal de menor diámetro en los calix[4]arenos establecen una red de fuertes interacciones puente de hidrógeno intramoleculares que favorecen la conformación cono (Figura 3.2).⁴¹ Se ha demostrado que la pre-organización de las unidades fenólicas en los oligómeros acíclicos precursores juegan un rol fundamental en la formación de los tetrámeros cíclicos debido a que la cavidad delimitada favorece que los grupos OH formen una red circular de puentes de hidrógeno intramoleculares.⁴² Considerando el impacto sintético que presentan las interacciones intramoleculares entre grupos OH en los calix[4]arenos y el comportamiento poliprótico inusual resultante, resulta esperable que los resorcin[4]arenos evidencien fenómenos similares dado que la pre-organización de los grupos OH también juega un rol fundamental en la obtención de los isómeros con conformación cono.

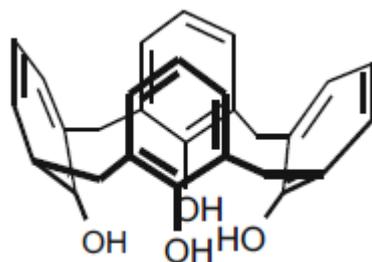
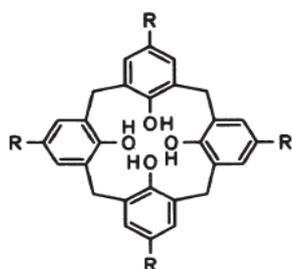


Figura 3.2. Estructura química de calix[4]areno. La cercanía de los grupos OH en la conformación como permite la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares de manera más efectiva.

Los calix[4]arenos derivatizados con distintos grupos funcionales exhiben propiedades ácidas en soluciones acuosas,¹⁹ orgánicas¹⁴ y mezclas de ambas¹⁸ (según sus solubilidades) con constantes determinadas para la primera disociación ácida superiores con respecto a los precursores acíclicos^{14,19} y notablemente mayores comparadas con la unidad fenólica correspondiente.

En la Tabla 3.1 se muestran las constantes de disociación ácida (expresadas como $pK_a(n)$, donde $n = 1$ corresponde a la primera disociación, $n = 2$ a la segunda, etc.) del calix[4]areno nativo ($R = H$) y derivados (Figura 3.3) obtenidas mediante experimentos de titulación potenciométrica o espectrofotométrica con distintas bases.



R	Nombre
H	(3.1) Calix[4]areno
NO ₂	(3.2) <i>p</i> -tetranitrocalix[4]areno
SO ₃ ⁻	(3.3) <i>p</i> -tetrasulfonatocalix[4]areno
C(CH ₃) ₃	(3.4) <i>p</i> - <i>t</i> -butilcalix[4]areno

Figura 3.3. Calix[4]arenos *para*-tetra-sustituídos con grupos funcionales de distinta naturaleza.

Tabla 3.1. Constantes de disociación ácida ($pK_a(n)$) de los grupos OH de calix[4]arenos de la Figura 3.3 y del monómero fenólico correspondiente (pK_a^{mono}). ΔpK_a corresponde a la diferencia $pK_a^{mono} - pK_a(1)$.

Calix[4]areno	$pK_a(1)$	$pK_a(2)$	$pK_a(3)$	$pK_a(4)$	$pK_a^{mono} (\Delta pK_a)$	Ref.
(3.1)	11,40 (8,53) ^a	—	—	—	13,56 (2,16)	15
	16,6 (4,05) ^b	—	—	—	26,6 (10,0)	-
(3.2) ^c	2,9	10,9	12,3	14	8,90 (6,0)	15
(3.3) ^d	3,26	11,3	12,8	14	8,62 (5,36)	10
	3,48 ^e	—	—	—	-	-
	3,74 ^f	—	—	—	-	-
(3.4)	4,11 ^g	—	—	—	10,9 (6,8)	-
	19,06 (5,51) ^h	> 33	—	—	26,6 (7,54)	20
	2,6 ⁱ	—	—	—	10,23 (7,6)	43

Las condiciones experimentales de las determinaciones reportadas son:

^a Titulación espectrofotométrica con NaOH en 95 % v/v EtOH/H₂O a 25 °C. El valor entre paréntesis corresponde a la constante en H₂O obtenida partir de la ecuación matemática que relaciona pK_a^{EtOH/H_2O} con $pK_a^{H_2O}$.⁴⁴

^b Titulaciones espectrofotométricas con aminas en acetonitrilo (MeCN) a 25 °C. Los valores de pK_a se obtienen mediante un procedimiento indirecto; por lo tanto, son aparentes.²⁰ El valor entre paréntesis corresponde a la constante en H₂O obtenida partir de la ecuación matemática que relaciona pK_a^{MeCN} con $pK_a^{H_2O}$.⁴⁴

^c Titulaciones potenciométrica y espectrofotométrica con NBU₄OH en 88,1 % v/v EtOH/H₂O a 25 °C. Los valores de pK_a son aparentes.¹⁹

^d Titulaciones potenciométrica y espectrofotométrica con KOH en H₂O a 25 °C; excepto ^e y ^f. Las desprotonaciones de los grupos SO₃H ocurren a valores de pH muy ácidos.⁴⁰

^e Titulación espectrofotométrica con NaOH en 50 % v/v MeOH/H₂O a 25 °C.¹⁸

^f Titulación espectrofotométrica con NaOH en 70 % v/v MeOH/H₂O a 25 °C.¹⁸

^g Titulación espectrofotométrica con sal de picrato en THF a 25 °C. Los valores de pK_a son aparentes.¹⁴

^h Titulación espectrofotométrica con aminas en MeCN a 25 °C. Los valores de pK_a son aparentes.⁴⁵ El valor entre paréntesis corresponde a la constante en H₂O obtenida partir de la ecuación matemática que relaciona pK_a^{MeCN} con $pK_a^{H_2O}$.⁴⁴

ⁱ Titulaciones potenciométrica y espectrofotométrica con NaOH en 75 % v/v EtOH/H₂O a 25 °C.⁴⁶ El valor entre paréntesis corresponde a la constante en H₂O obtenida partir de la ecuación matemática que relaciona pK_a^{EtOH/H_2O} con $pK_a^{H_2O}$.⁴⁴

Las discrepancias entre los valores de pK_a de los calix[4]arenos obtenidas en solventes de distinta naturaleza dificulta una comparación exacta (Tabla 3.1). No obstante, algunas tendencias generales acerca del efecto de sustituyentes, del solvente y del aumento de la acidez con respecto al fenol correspondiente (ΔpK_a) son destacables.

Los calix[4]arenos presentan cuatro constantes de disociación ácida debido a la ionización de los grupos OH en etapas, tal como se ha demostrado con las titulaciones de **3.3** con KOH.⁴⁰ El valor de pK_a (1) y la generación del mono-fenolato correspondiente en general sucede a valores de pH muy ácidos, en tanto que las disociaciones siguientes (segunda a cuarta, di-fenolato a tetra-fenolato) ocurren en medios moderadamente a muy alcalinos (Tabla 3.1). El cambio espectroscópico que permite las determinaciones directas de las constantes por UV-visible se atribuye a la formación de una banda a mayor longitud de onda que corresponde a la transición electrónica $n-\pi$ del fenóxido.^{19,40,44} Estudios realizados mediante cálculos semiempíricos demostraron que el mono-fenolato producto de la disociación es más estable que la especie protonada debido a la micro-solvatación intramolecular⁴ del anión fenóxido por formación de puente de hidrógeno con los dos grupos OH adyacentes (Figura 3.4).^{10,19,42} Coincidentemente, se ha demostrado mediante estudios computacionales que la capa de solvatación del anión fenolato libre en medios acuosos está compuesta por dos moléculas de agua en torno al fenóxido que forman dos puentes de hidrógeno intermoleculares.⁴⁷

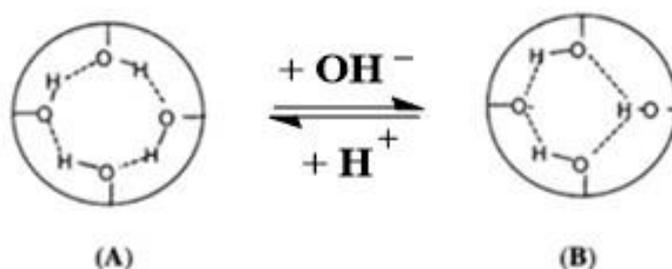


Figura 3.4. Representación esquemática de la alteración de la red de puentes de hidrógeno intramoleculares sobre el portal inferior de calix[4]arenos por efecto ácido-base. (A) calix[4]areno neutro; (B) base conjugada mono-fenolato.

Las determinaciones de los parámetros termodinámicos asociados al equilibrio $(\mathbf{3.3})^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons (\mathbf{3.3})^-$ indican que la contribución entrópica y principalmente la entálpica ($\Delta H^\circ = -25,9$ kJ/mol) contribuyen de manera favorable a la basicidad del di-fenolato para generar el mono-fenolato. Además, el valor de ΔH° determinado para el equilibrio $(\mathbf{3.3})^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \mathbf{3.3}$ es $+2,6$ kJ/mol.⁴² Los resultados termodinámicos y los estudios semiempíricos complementan la propiedad ácida excepcional observada para la especie neutra cuyo origen radica en la estabilización excepcional del mono-anión debido a la red circular de puentes de hidrógeno más fuertes y estables en **B** con respecto a **A** (Figura 3.4).^{40,42,45} La

deslocalización electrónica de la carga negativa del fenóxido también contribuye a la estabilización del mono-anión.⁴² Se ha demostrado que la acidez de la unidad fenólica central en trímeros fenólicos lineales es mayor con respecto al fenol debido a la estabilización del fenóxido por la formación de puentes de hidrógeno con las unidades vecinas.¹⁴ Por lo tanto, la acidez aún mayor de los tetrámeros fenólicos cíclicos refleja el aporte de la pre-organización en la formación de una red intramolecular que estabiliza de manera más eficiente al mono-fenolato independientemente de la naturaleza del solvente en el que tiene lugar la disociación.^{14,42,48} No obstante, el costo termodinámico para la generación del mono-fenolato y el grado de su estabilización sí resultan dependientes de los *para*-sustituyentes de los calix[4]arenos y de las propiedades del solvente, tal como lo reflejan los valores de ΔpK_a (Tabla 3.1).

La acidez de los fenoles se modifica según el tipo de sustituyente y la posición de la sustitución. El valor de pK_a del fenol en agua es 9,95;¹⁵ pero su acidez aumenta si la posición *para* es sustituida por un grupo tomador de densidad electrónica como NO₂ o SO₃⁻. Para estos casos, los valores de pK_a se reducen a 7,16¹⁵ y 8,62,¹⁰ respectivamente. Si el sustituyente es un grupo alifático como *t*-butilo, la acidez del fenol disminuye debido al efecto inductivo ($pK_a = 10,23$).⁴³ Los mismos efectos descriptos condicionan la acidez en los tetrámeros cíclicos como se observa en los valores de ΔpK_a más pequeños de **3.2** y **3.3** con respecto a **3.1** (en MeCN) y **3.4** debido al aumento de la acidez producida por los grupos NO₂ o SO₃⁻ (Tabla 3.1).

La marcada discrepancia en los valores de ΔpK_a de **3.1** (2,16 en 95 % v/v EtOH/H₂O⁴⁴ y 10,0 en MeCN²⁰) se atribuyó al carácter protofílico de la mezcla EtOH/H₂O que interrumpe la red intramolecular de puentes de hidrógeno por la competencia de las interacciones intermoleculares soluto-solvente.⁴⁴ MeCN aprótico permite que la estabilización del fenóxido sea únicamente por interacciones intramoleculares y ello es evidenciado en el mayor carácter ácido del macrociclo en este solvente. Otro efecto del solvente que puede afectar el grado de disociación del macrociclo es su capacidad de solvatación. Este efecto ha sido demostrado con **3.3** cuyos valores de $pK_a(1)$ exhibieron un aumento conforme se incrementa la concentración de MeOH en mezclas MeOH/H₂O.¹⁸ En este caso, la disminución de la acidez de **3.3** se asocia a la menor capacidad del solvente para solvatar al mono-fenolato a medida que su constante dieléctrica desciende con la concentración creciente de MeOH.¹⁸ En el caso de **3.4**, la dependencia moderada de ΔpK_a con las disociaciones de la especie neutra en los solventes THF, MeCN y 75 % v/v EtOH/H₂O refleja que, pese a que la acidez es mayor en el solvente prótico con mayor capacidad de solvatación, la estabilización global del mono-fenolato no está condicionada por competencias intermoleculares soluto-solvente o por la eficiencia de la solvatación del mono-fenolato, sino fundamentalmente a la estabilidad intrínseca de mono-anión. A

diferencia de lo que ocurre con la dependencia de ΔpK_a de **3.1** con el solvente, posiblemente la presencia de los grupos *t*-butilo en **3.4** provea algún efecto adicional que favorece la formación del mono-anión. La conformación cono de **3.4** está más favorecida con respecto a la de **3.1** debido a restricciones en la movilidad ocasionada por la inclusión de moléculas de solvente en una cavidad de mayor volumen dada por los *para*-sustituyentes *t*-butilo.⁴¹ Este efecto reduce el costo energético del cambio conformacional durante la desprotonación entre las especies neutra y mono-aniónica, cuya conformación más estable es el cono.^{42,49} Como consecuencia, la menor energía libre asociada a la disociación del primer protón de **3.4** se traduce en la consistencia de sus valores de ΔpK_a . En contraposición, la conformación cono de **3.1** está favorecida en MeCN debido a que los grupos OH permanecen cercanos por efecto hidrofóbico, en tanto en el solvente prótico las interacciones intermoleculares soluto-solvente favorecen la flexibilidad conformacional.⁴⁴ Como consecuencia, la inversión energética en la pre-organización de **3.1**, como antelación al proceso de disociación, contrarresta el efecto estabilizador ganado en el mono-anión y ello se traduce en un valor de $pK_a(1)$ básico (de acuerdo a la extrapolación de $pK_a^{\text{EtOH/H}_2\text{O}}$ a $pK_a^{\text{H}_2\text{O}}$) y el menor valor de ΔpK_a (Tabla 3.1).

Las disociaciones posteriores de los calix[4]arenos se caracterizan por su ausencia en solventes con elevada constante dieléctrica, o bien, por ocurrir en condiciones acuosas básicas. El efecto de la capacidad de solvatación del solvente es mucho mayor si la carga del anión del calix[4]areno es mayor. La disociación de los calix[4]arenos solubles en agua presentan valores de $pK_a(2)$ superiores con respecto a pK_a del fenol correspondiente (Tabla 3.1). La razón de este fenómeno se justifica nuevamente por la estabilidad del mono-fenolato y además debido a que en las desprotonaciones siguientes a la primera, el número de puentes de hidrógeno intramoleculares que se establecen en el portal inferior de los macrociclos se reduce de cuatro en el mono-fenolato a uno en los di-fenolato y tri-fenolato, y ninguna en el tetra-fenolato.⁴² Conforme las interacciones desaparecen, las repulsiones electrostáticas entre grupos fenólicos gobierna la alta basicidad de los aniones de mayor orden. Como consecuencia, los valores de $pK_a(2)$, $pK_a(3)$ y $pK_a(4)$ se registran en la escala acuosa de pH cercanos al límite alcalino.^{19,40}

Durante el desarrollo de experimentos de titulaciones ácido-base de especies ionizables es importante considerar la fuerza iónica de la solución. Se ha reportado que la primera disociación ácida de **3.4** es sensible a cambios de la concentración salina.⁵⁰ Por ejemplo, el valor de $pK_a(1)$ de **3.4** determinado en presencia de concentraciones variables de NaClO_4 decrece moderadamente de 3,24 a 2,93 en el intervalo $0,10 \text{ M} < [\text{NaClO}_4] < 0,50 \text{ M}$ y posteriormente aumenta de manera prácticamente lineal hasta 3,90 en presencia de $[\text{NaClO}_4] = 4,00 \text{ M}$. A concentraciones salinas bajas ($< 0,50 \text{ M}$), las actividades de los iones en soluciones pueden ser aproximadas a sus concentraciones molares.⁵⁰ Sin embargo, en

presencia de concentraciones salinas superiores, el efecto de las interacciones iónicas entre soluto y solvente debe ser contemplado, lo cual puede conducir a interpretaciones erróneas acerca del carácter ácido de los macrociclos, o bien, a discrepancias en las comparaciones con las constantes ácidas reportadas por otros autores.

3.1.4. Comportamiento poliprótico de resorcin[4]arenos

Los resorcin[4]arenos formados por cuatro unidades de resorcinol presentan ocho grupos OH de los cuales sólo cuatro son ionizables; en tanto los grupos remanentes permanecen protonados.^{51,52} Coincidentemente con los calix[4]arenos, cuatro constantes ácidas pueden ser determinadas para los resorcin[4]arenos que corresponden a la pérdida de 4 protones y la generación de la base conjugada tetra-fenolato (Figura 3.5).^{53,54}

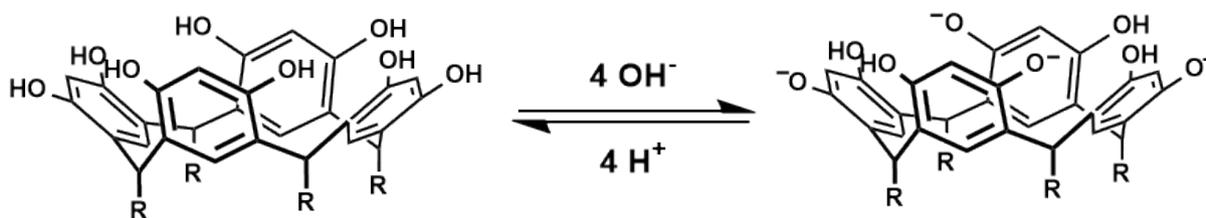


Figura 3.5. Equilibrio ácido-base entre las especies de resorcin[4]areno neutra (C4RAH₈) y tetra-fenolato (C4RAH₄⁴⁻).

Mediante ¹H RMN se ha demostrado que el equilibrio conformacional cono/bote de resorcin[4]arenos se estabilizan estrictamente en la conformación cono luego de la adición de NaOD debido a la generación de poli-fenóxidos y sus estabilizaciones por formación de puentes de hidrógeno intramoleculares. El poli-fenóxido de mayor carga observado fue el tetra-fenolato y la adición de exceso de base o de una base muy fuerte como CD₃ONa no produce la disociación del tetra-fenolato.⁵¹ Estos resultados indican que la estabilización del isómero cono tetra-fenolato es excepcional debido a la disposición espacial favorable de las interacciones O⁻...H-O entre anillos adyacentes y la deslocalización de la carga sobre los anillos aromáticos (Figura 3.5).^{52,55}

La ubicación espacial diferente de los grupos OH fenólicos en los distintos estereoisómeros de resorcin[4]arenos provoca que sus comportamientos ácidos sean notablemente distintos. Schneider *et al.* demostró el efecto de la configuración espacial sobre el comportamiento ácido mediante experimentos de titulación por ¹H RMN de los diastereómeros silla y cono de C-metilresorcin[4]areno con NaOD.⁵¹ El tratamiento del isómero cono con la base indicó que un equivalente del macrociclo consume cuatro equivalentes de NaOD y la disociación del cuarto protón ocurren a un valor de pH menor (9,4 en acetona-d₆/D₂O, 3/5 v/v) con respecto a la desprotonación observada para resorcinol (pH = 11).⁵¹ El mayor carácter ácido de todas las disociaciones de resorcin[4]arenos nativos

(no funcionalizados sobre anillos aromáticos) con respecto al monómero ha sido destacado por diversos autores^{11,38,53} y su fundamento, como ocurre con los calix[4]arenos, radica en el comportamiento diferencial de los grupos OH fenólicos cuando forman parte de sistemas pre-organizados como las estructuras macrocíclicas de los metaciclofanos.^{4,12} El seguimiento de la titulación del isómero silla de C-metilresorcin[4]areno (**3.5a**) con exceso de NaOD demostró por ¹H RMN que la formación del octa-fenolato es posible (Figura 3.6).^{51,52,55} La disociación de los dos primeros protones ocurre a un valor de pH menor a 11 ($pK_a(2)$ menor al de resorcinol) debido a la estabilización del di-fenolato **3.5b** por formación de dos puentes de hidrógeno intramoleculares.⁵¹ El consumo de dos equivalentes más NaOD exhibió la formación del tetra-fenolato **3.5c** acompañada de un cambio conformacional. Se ha evidenciado que la isomerización silla-cono de **3.5c** es posible debido a que la estabilidad ganada por la formación de cuatro puentes de hidrógeno intramoleculares compensa la reconfiguración desfavorable de los sustituyentes metilo de axiales en el isómero silla a ecuatoriales en el isómero cono.^{52,56} Posteriormente, la pérdida de dos protones de **3.5c** genera el hexa-fenolato **3.5d** con configuración silla.⁵⁵ Las señales de ¹H indicaron que la adición de exceso de NaOD permite la disociación de los últimos dos protones y la obtención del octa-fenolato **3.5e**, cuya configuración silla desplegada permite que la repulsión electrostática de los iones fenóxido sea mínima.⁵¹

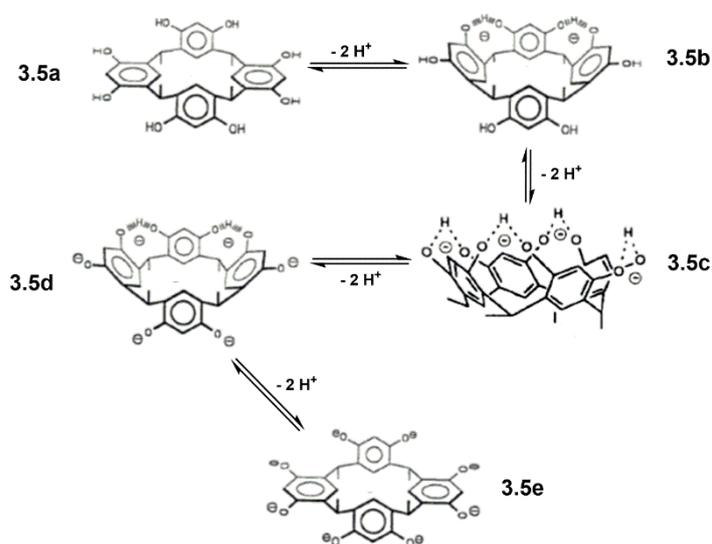
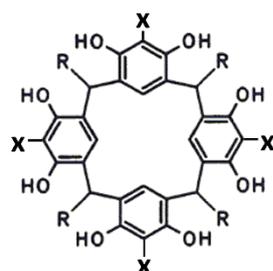


Figura 3.6. Desprotonaciones del isómero silla de C-metilresorcin[4]areno (**3.5a**) y conformaciones más estables de los poli-fenolatos generados (di-fenolato, silla (**3.5b**); tetra-fenolato, cono (**3.5c**); hexa-fenolato, silla (**3.5d**); octa-fenolato, silla desplegada (**3.5e**)).

En la Tabla 3.2 se presentan las constantes de disociación ácida de los resorcin[4]arenos de la Figura 3.7.



X	R	Nombre
H	CH ₃	(3.6) C-metilresorcin[4]areno
H	C ₆ H ₁₅	(3.7) C-hexilresorcin[4]areno
CH ₃ SO ₃ Na	CH ₃	(3.8) Tetrametilsulfonato-C-metilresorcin[4]areno de sodio
CN	C ₂ H ₅	(3.9) Tetraciano-C-etilresorcin[4]areno

Figura 3.7. Resorcin[4]arenos nativos (**3.6** y **3.7**) y *orto*-tetra-sustituídos (**3.8** y **3.9**) con grupos funcionales de distinta naturaleza.

Tabla 3.2. Constantes de disociación ácida (pK_a (n)) de los grupos OH de resorcin[4]arenos de **Figura 3.7** y del monómero resorcinol correspondiente (pK_a^{mono} (1) y (2))[§].

Resorcin[4]areno	pK_a (1)	pK_a (2)	pK_a (3)	pK_a (4)	pK_a^{mono} (1) y (2)	
(3.6)	a	—	—	9,4	(2) 11,0	
	b	—	—	11,7	(2) 13,6	
	c	7,9	9,4	10,2	11,2	—
	d	9,0	10,2	10,9	12,1	—
(3.7) ^c	7,9	9,4	10,2	11,2	—	
(3.8) ^e	9,0	9,3	pK_a (3,4) = 10,8		—	
(3.9) ^f	~ 5	pK_a (2,3) ~ 6 – 11		~ 11,7	(1) 5,94; (2) 8,02 ^g	

[§] El resorcinol presenta dos valores de pK_a , (1) y (2).

Las condiciones experimentales de las determinaciones reportadas son:

^a Titulación por ¹H RMN con NaOD en acetona-*d*₆/D₂O 3/5 v/v a 27 °C.⁵¹

^b Titulación por ¹H RMN con NaOD en DMF-*d*₆/D₂O 1/1 v/v a 27 °C.⁵¹

^c Titulación potenciométrica (8 < pH < 11) en 60 % v/v MeOH/H₂O a 25 °C.⁵⁷

^d Titulación potenciométrica en 79 % v/v isopropanol/H₂O.

^e Titulación potenciométrica (6 < pH < 11) con NaOH en H₂O a 25 °C.⁵⁸

^f Titulación espectrofotométrica (4 < pH < 14) con NaOH en 2% v/v MeOH/H₂O a 28 °C. Los valores de pK_a reportados fueron estimados.⁵⁹

^g Valores de pK_a de 2-cianoresorcinol calculados según la ecuación de Hammett.⁶⁰

Los valores de pK_a (4) de **3.6** determinados en acetona- d_6 /D₂O 3/5 v/v y en DMF- d_6 /D₂O 1/1 se encuentran ~2 unidades por debajo de pK_a (1) del resorcinol, determinado en las mismas condiciones (Tabla 3.2).⁵¹ Debido a que los resultados de Schneider *et al.* fueron los primeros que demostraron el carácter ácido de los resorcin[4]arenos, las publicaciones y *reviews*^{11,52,55} posteriores se han valido de los mismos para indicar que la acidez de estos macrociclos es moderadamente mayor con respecto al resorcinol. Las titulaciones potenciométricas de **3.6** en mezclas binarias alcohol/H₂O demostraron efectivamente el comportamiento poliprótico de los resorcin[4]arenos al determinar cuatro disociaciones de hidrógeno.⁵⁷ Otros estudios han demostrado que las disociaciones ácidas ocurren a valores de pH más elevados a medida que se incrementa la proporción orgánica en mezclas orgánico-acuosas debido a la ineficiencia de estos solventes con constantes dieléctricas decrecientes para solvatar los poli-fenolatos de resorcin[4]arenos.⁶¹ La limitación de la solubilidad de los resorcin[4]arenos nativos ha dificultado el análisis exhaustivo de su comportamiento poliprótico en medios acuosos. El uso de surfactantes ha permitido incrementar su solubilidad y en estas condiciones se determinaron las constantes ácidas. Sin embargo, las soluciones obtenidas no son homogéneas, sino que se trata de sistemas coloidales y, además, las propiedades ácidas del macrociclo dentro del micro-ambiente generado por el surfactante son distintas con respecto al macrociclo en estado libre.^{54,62}

La sustitución aromática de los resorcin[4]arenos afecta notoriamente el comportamiento ácido, tal como sucede con los calix[4]arenos. La incorporación de grupos CH₂SO₃⁻ (**3.8**), a expensas del aumento de la solubilidad en agua de los macrociclos, disminuye notablemente su acidez debido a que la generación de los aniones fenóxido está inhibida por la presencia de los grupos CH₂SO₃⁻ en las posiciones vecinas.⁵⁸ La sustitución con grupos CN (**3.9**) también permite una mejora en la solubilidad del macrociclo, a la vez que el efecto tomador de electrones de los sustituyentes incrementa notablemente la acidez de la primera disociación.⁵⁹ No obstante, la última disociación ocurre con pK_a (4) mayor a pK_a (2) del monómero.

Los estudios mencionados de resorcin[4]arenos (Tabla 3.2) fueron realizados con el objetivo de maximizar las aplicaciones de estos receptores y por ello, resultó necesario explorar las características polipróticas de estos macrociclos. Por ejemplo, la eficiencia de las interacciones huésped-receptor de estos macrociclos con amonios de interés biológico puede ser modulada por efecto del pH debido a modificaciones de la densidad de carga negativa del receptor.^{31,63} Gran parte de la versatilidad sintética de los resorcin[4]arenos se debe a la facilidad con la que los grupos OH pueden ser modificados de manera selectiva.^{38,64} En este sentido, el conocimiento de las constantes de disociación exactas de tales grupos

permitiría sus modificaciones de manera más controlada basándose, por ejemplo, en el pH del medio.

Las aplicaciones de los resorcin[4]arenos está en expansión como lo demuestran sus aplicaciones en la cromatografía como revestimiento de columnas, ⁶⁵ para la liberación controlada de fármacos,^{8,39} en química huésped-receptor,^{11,66} como surfactantes,^{67,68} en separaciones de iones metálicos y como bloques de construcción de sistemas auto-ensamblados complejos.^{2,69} Sorprendentemente hasta el momento de la escritura de esta Tesis, la bibliografía existente carece de un estudio sistemático acerca de una propiedad fisicoquímicas fundamental de los extensamente aplicados resorcin[4]arenos, el comportamiento poliprótico.

3.2. OBJETIVOS

Dada la ausencia de información acerca del carácter poliprótico de C-alquilresorcin[4]arenos en medios acuosos, se proponen los siguientes objetivos específicos:

✚ Determinar las constantes de disociación ácida de C-butilresorcin[4]areno (C4RAH₈) en 2% v/v MeOH/H₂O mediante titulaciones ácido-base con NaOH seguidas por potenciometría y espectrofotometría UV-visible.

✚ Obtener las constantes de ionización de C4RAH₈ empleando LiOH y KOH como titulantes con el fin de evaluar el efecto del contra-ión (Li⁺, Na⁺ y K⁺) sobre los equilibrios de disociación de hidrógeno del macrociclo.

✚ Determinar las constantes ácidas de C-metilresorcin[4]areno (C1RAH₈) y de C-heptilresorcin[4]areno (C7RAH₈) con NaOH en 2 % (v/v) MeOH/H₂O con la finalidad de elucidar el efecto de la longitud de la cadena alifática de los C-alquilresorcin[4]arenos C1RAH₈, C4RAH₈ y C7RAH₈ sobre sus comportamientos polipróticos.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Titulaciones ácido-base de C-butilresorcin[4]areno

3.3.1.1. Titulación potenciométrica de C4RAH₈ con NaOH

El carácter ácido de C4RAH₈ se estudió inicialmente mediante titulaciones potenciométricas en 2 % v/v MeOH/H₂O empleando NaOH. La variación del pH de soluciones ácidas diluidas de C4RAH₈ con distintas concentraciones de NaOH 5,0×10⁻³ M (o 9,1×10⁻³ M) evidenció tres cambios abruptos en las lecturas potenciométricas. El gráfico de pH en función del volumen de NaOH empleado presenta dos curvas sigmoideas marcadas

(Figura 3.8 A) y una tercera curva con una variación suave en condiciones alcalinas (Figura 3.8 B). Las regiones planas de las curvas indican los valores de pH en los cuales la capacidad *buffer* del par ácido/base conjugada es máxima, mientras que cada salto representa el punto final de titulación dado por la neutralización completa del ácido por NaOH. Los tres saltos observados indican la existencia de al menos tres equilibrios ácido-base de C4RAH₈.

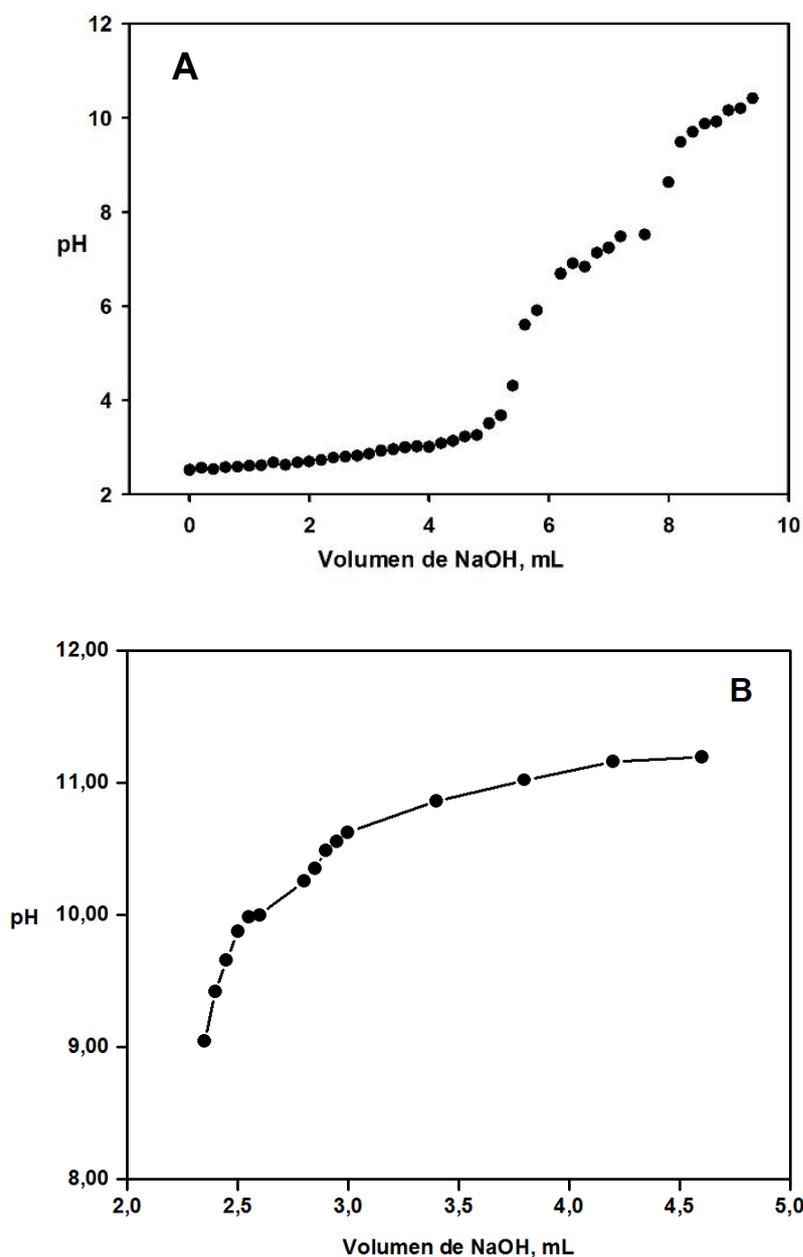
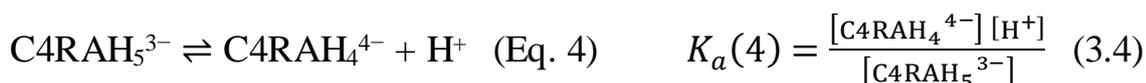
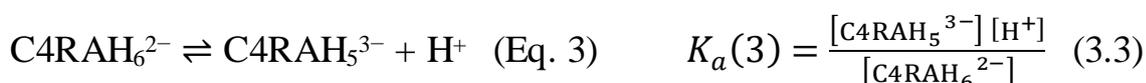
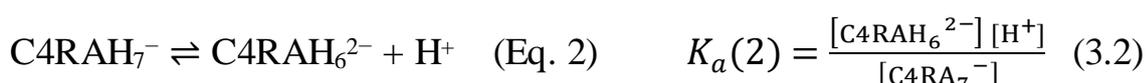
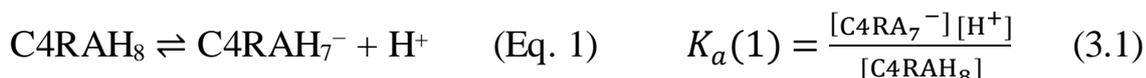


Figura 3.8. Titulaciones potenciométricas de C4RAH₈ con NaOH. (A) [C4RA] = $3,4 \times 10^{-6}$ M; [HCl] = $6,87 \times 10^{-3}$ M; [NaOH] = $5,0 \times 10^{-3}$ M; [NaCl] = $11,6 \times 10^{-3}$ M; 25,0 °C. (B) [C4RA] = $16,8 \times 10^{-6}$ M; [HCl] = $2,50 \times 10^{-3}$ M; [NaOH] = $9,1 \times 10^{-3}$ M; [NaCl] = $6,8 \times 10^{-3}$ M; 25,0 °C.

La reacción de NaOH con el ácido fuerte (HCl) es la primera que ocurre y consume 1 equivalente de la base. Posteriormente NaOH reacciona con el ácido débil (C4RAH₈) y cada equivalente de C4RAH₈ consume 4 equivalentes de la base dado que el anión de mayor carga posible es el tetra-fenolato C4RAH₄⁴⁻ (Figura 3.5).^{51,52}

Por lo tanto, la neutralización completa de los ácidos fuerte y débil requiere 5 equivalentes de NaOH. Considerando las cantidades de moles de HCl y de C4RAH₈ presentes en las soluciones preparadas ($V_F = 10,00 \pm 0,02$ mL) y los volúmenes de NaOH consumidos hasta el primer y segundo cambio de la señal potenciométrica (5,6 mL y 8,2 mL, respectivamente, Figura 3.8 A) y tercer cambio (2,8 mL, Figura 3.8 B), es posible calcular el número de equivalentes de base consumidos por cada etapa de neutralización. La cantidad de equivalentes totales de NaOH consumidos en los puntos finales primero, segundo y tercero fueron 2,0; 3,0 y 5,1, respectivamente. Por lo tanto, el primer punto final corresponde a la disociación de un protón de C4RAH₈ y la formación del mono-fenolato C4RAH₇⁻; el segundo punto final indica la desprotonación de un protón de C4RAH₇⁻ y la generación del di-fenolato C4RAH₆²⁻; y el último punto final a la neutralización completa de HCl y C4RAH₈ por NaOH y la formación del tetra-fenolato C4RAH₄⁴⁻. Las constantes de las reacciones de neutralización (K_n) están relacionadas con las constantes ácidas (K_a) y la constante de auto-ionización del agua ($K_w = 10^{-14}$)^{3a} mediante la ecuación $K_n \times K_w = K_a$. En las condiciones de equilibrio, la concentración de OH⁻ es mínima y se cumple que $K_n = K_a$. Por lo tanto, las disociaciones ácidas de C4RAH₈ hasta C4RAH₄⁴⁻ se describen mediante los equilibrios químicos (Eq. 1–4)^{3b} y sus constantes termodinámicas asociadas (Ec. 3.1–3.4).



Dado que el consumo de 4 equivalentes de NaOH correspondiente a la formación del tri-fenolato C4RAH₅³⁻ (Eq. 3) no pudo ser registrado en las titulaciones potenciométricas, se concluye que los equilibrios ácido-base correspondientes a las disociaciones del tercer y cuarto protón (Eq. 3 y 4) ocurren a dos valores de pH que se

^{3a} Se considera que K_w no varía de manera apreciable en presencia de 2 % v/v de MeOH.

^{3b} Las moléculas de H₂O y los iones Na⁺ se han omitido en los equilibrios químicos.

encuentran cercanos entre sí y la constante termodinámica determinada es global, $K_a(3,4) = K_a(3) \times K_a(4)$.

A partir de cada curva sigmoidea se puede calcular el valor del punto final V_{PF} mediante la Ec. 3.5 donde $\partial^2 pH$ corresponde a los valores de derivada segunda de pH en función del volumen de titulante. La máxima diferencia entre valores consecutivos de La segunda derivada del pH ($\partial^2 pH$) corresponde a $\partial^2 pH(+)$ (valor máximo) y $\partial^2 pH(-)$ (valor mínimo), y el volumen de titulante asignado a $\partial^2 pH(-)$ es V . Las soluciones de C4RAH₈ se preparan de manera de independiente con una concentración constante del macrociclo y con concentraciones variables de la base. La diferencia de volumen de base empleada (ΔV) entre dos soluciones consecutivas se mantuvo constante (3.6. Sección experimental).

$$V_{PF} = V + \Delta V \times \frac{\partial^2 pH(+)}{[\partial^2 pH(+)-\partial^2 pH(-)]} \quad (3.5)$$

El valor de pH que corresponde a la mitad del volumen del punto final se define como el valor de pK_a del par ácido/base correspondiente (Ec. 3.6).

$$pH^{V_{PF}/2} = pK_a \quad (3.6)$$

En la Tabla 3.3 se presentan los valores de $pK_a(n)$ de C4RAH₈ determinados a partir de los valores de $V_{PF}(n)$ obtenidos en las titulaciones potenciométricas.

Tabla 3.3. Número de equivalentes de NaOH, volumen consumido de base (V_{PF}) y los valores de pK_a asociados a cada punto final durante la titulación potenciométrica de C4RAH₈.^a

Equivalentes de NaOH consumidos por C4RAH ₈	V_{PF} , mL	pK_a
1,0	5,4	(1) $3,1 \pm 0,2$ ^b
2,0	2,3	(2) $7,2 \pm 0,2$ ^b
4,1	0,4	(3,4) $10,0 \pm 0,3$ ^c

^a El último punto final corresponde a la superposición de los equilibrios ácido-base $K_a(3)$ y $K_a(4)$.

^b [C4RAH₈] = $3,4 \times 10^{-6}$ M; [HCl] = $6,87 \times 10^{-3}$ M; adiciones de [NaOH] = $5,0 \times 10^{-3}$ M como titulante; [NaCl] = $11,6 \times 10^{-3}$ M; 25,0 °C.

^c [C4RAH₈] = $16,8 \times 10^{-6}$ M; [HCl] = $2,50 \times 10^{-3}$ M; adiciones de [NaOH] = $9,1 \times 10^{-3}$ M como titulante; [NaCl] = $6,8 \times 10^{-3}$ M; 25,0 °C.

3.3.1.2. Titulaciones espectrofotométricas de C4RAH₈ con NaOH

Los cambios exhibidos por C4RAH₈ en 2 % v/v MeOH/H₂O por espectrofotometría UV-visible a medida que el pH aumenta desde 2,50 hasta 11,34 indican un corrimiento batocrómico y la presencia de varios puntos isobéuticos (Figura 3.9). Estos resultados, también observados en los calix[n]arenos, indican las disociaciones de hidrógeno de C4RAH₈ que tienen lugar para neutralizar el NaOH. Consecuentemente, las transiciones electrónicas n- π de los poli-fenóxidos se evidencian como una banda creciente con el pH a \sim 300 nm y la banda a 287 nm que caracteriza las transiciones π - π de los anillos aromáticos desaparece.^{14,40}

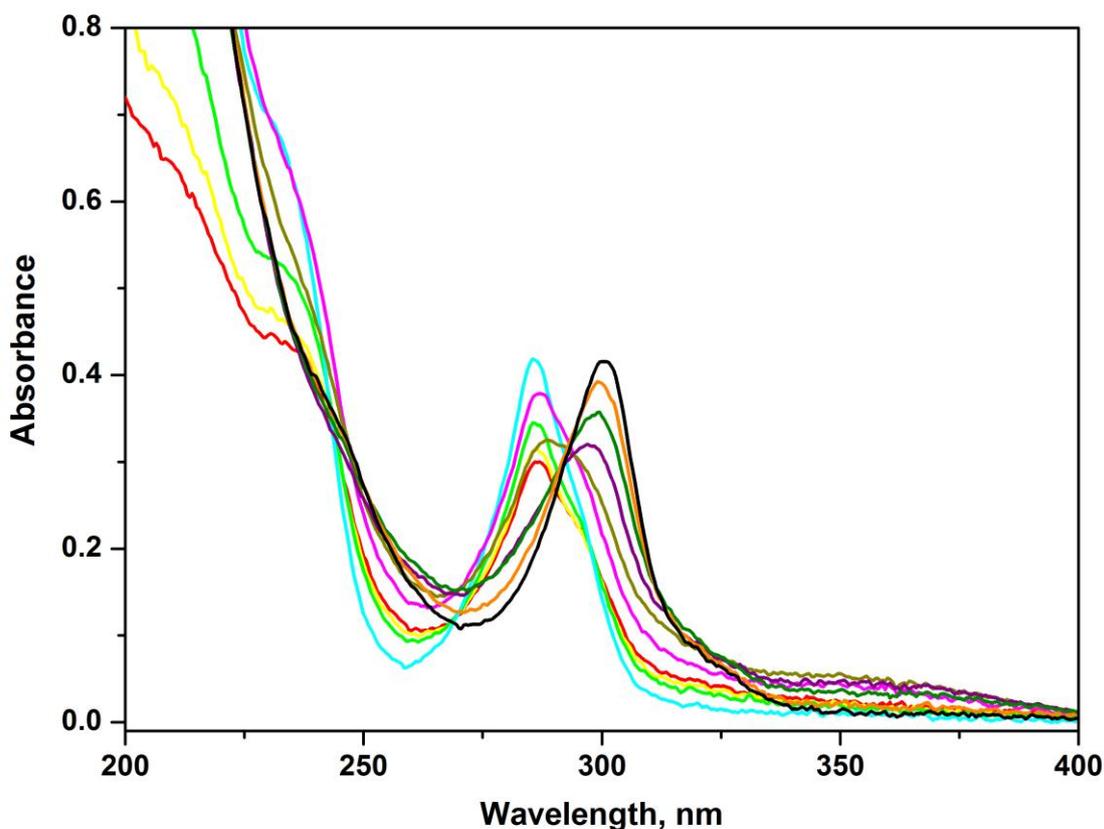


Figura 3.9. Espectros de absorción UV-visible de C4RA a distintos valores de pH: (—) 3,11.; (—) 4,28; (—) 6,58; (—) 9,04; (—) 9,66; (—) 9,88; (—) 10,22; (—) 10,62; (—) 10,86; (—) 11,34. [C4RA] = $16,8 \times 10^{-6}$ M; 2 % v/v MeOH/H₂O; b = 1 cm; 25,0 °C.

En condiciones tanto ácidas como moderadamente básicas ($3,11 < \text{pH} < 9,04$, **Figura 3.9**), la dependencia de la absorción UV de C4RAH₈ con el pH se caracteriza por el aumento de la intensidad de la banda a 287,0 nm. Los valores de pK_a obtenidos de las titulaciones potenciométricas (Tabla 3.3) indican que los primeros cambios espectroscópicos observados involucran a las especies de los equilibrios Eq. 1 y 2. La presencia de los puntos isobéuticos a 271,0 nm y 296,0 nm posiblemente se deban a la conversión de C4RAH₇⁻ en C4RAH₆²⁻

dato que el aumento de la absorptividad molar a 287,0 nm está relacionado con una energía mayor de las transiciones electrónicas n- π . El aumento del pH por encima de 9,04 exhibe el inicio del desplazamiento batocrómico de la banda n- π , el cual se extiende hasta valores de pH muy básicos. Por lo tanto, en el intervalo $9,04 < \text{pH} < 11,34$ predominan los equilibrios ácidos $K_a(3)$ y $K_a(4)$ (Eq. 3 y 4). El aumento moderado del pH de 9,66 a 10,22 produce un cambio espectral apreciable caracterizado por un corrimiento batocrómico de 10 nm acompañado por la disminución de la absorbancia (0,379 a 287,0 nm \rightarrow 0,320 a 297,0 nm) y la aparición de una nueva banda ancha y de baja intensidad a 350,0 nm. La variación espectral presenta dos puntos isobésticos a 269,0 nm y 294,0 nm. Finalmente, el cambio espectral de C4RAH₈ en condiciones alcalinas ($10,62 < \text{pH} < 11,34$) presenta de tres puntos isobésticos a 250 nm, 293nm y 311,0 nm y se caracteriza por un leve corrimiento batocrómico acompañado por un aumento de la absorción y la desaparición de la banda a 350,0 nm. A pH = 11,34, la especie C4RAH₄⁴⁻ predomina en solución (Tabla 3.2)⁵¹ y su espectro de absorción está caracterizado por $\lambda_{\text{máx}}$ a 300,5 nm.

Los gráficos de las absorbancias a las longitudes de onda donde se registraron los mayores cambios espectrales en función del pH indicaron que las respuestas presentan perfiles sigmoideos (Figura 3.10).

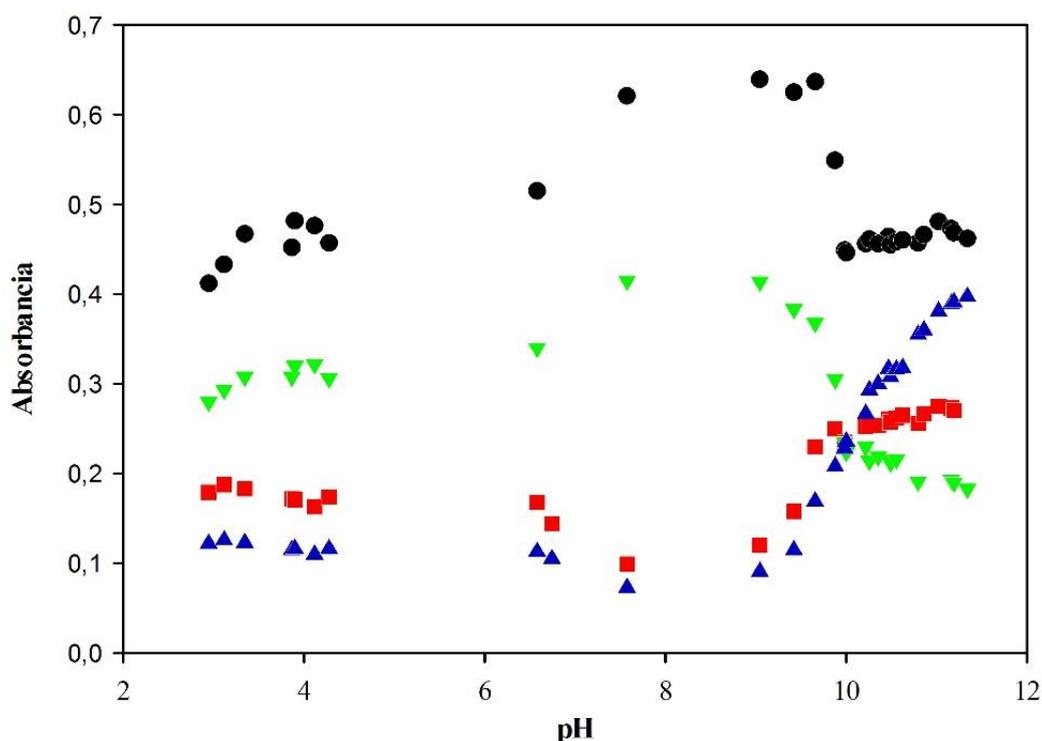


Figura 3.10. Efecto del aumento de la concentración de NaOH $9,1 \times 10^{-3}$ M sobre la absorbancia de C4RAH₈ $16,8 \times 10^{-6}$ M a las longitudes de onda: ● 234,5 nm, ▼ 285,0 nm, ■ 250,5 nm y ▲ 303,0 nm. $I_{\text{NaCl}} = 6,8 \times 10^{-3}$ M; 2 % v/v MeOH/H₂O; b = 1 cm; 25,0 °C.

A 285,0 nm y, de manera más apreciable, a 234,5 nm, se observó un leve aumento de la absorbancia a cada longitud de onda con el incremento del pH. Considerando que pK_a (1) de C4RAH₈ obtenido mediante potenciometría es $3,1 \pm 0,2$; el menor cambio espectral producido por el pH en la región 2,95 – 4,28 se asoció al equilibrio ácido-base C4RAH₈/C4RAH₇⁻ (Eq. 1). La realización de varios experimentos de titulaciones espectrofotométricas evidenció que en la mayoría de los casos, la similitud de los espectros de absorción de las especies neutra y mono-fenolato dificulta la distinción del equilibrio ácido-base. Sin embargo, el mismo es evidente mediante el procedimiento potenciométrico. La semejanza de los espectros de las especies involucradas se relaciona con que la formación del mono-fenóxido no modifica de manera considerable los orbitales moleculares de la especie ácida C4RAH₈. Por lo tanto, tanto en C4RAH₈ como en C4RAH₇⁻, las transiciones electrónicas π - π son las más relevantes, en tanto que las transiciones n - π no se evidencian (**Figura 3.9**) debido a la ausencia de un corrimiento batocrómico.

El cambio producido en las señales espectrales por adición de NaOH se evidenció como un aumento de la absorción del hombro a 234,5 nm y de la banda a 285,0 nm. Con un cambio inverso y de menor intensidad, a 250,5 nm y a 303,0 nm los valores de absorbancia decaen. Las variaciones observadas junto a los puntos isobésticos a 271,0 nm y 296,0 nm son indicativos de un equilibrio ácido-base asignado en este caso a Eq. 2. El plató inferior a pH ~ 4 indica el predominio en solución de la especie mono-fenolato C4RAH₇⁻. La abstracción de un protón de esta especie ocasiona un punto de inflexión marcado en los valores de absorbancia alrededor de pH ~ 7, los cuales en condiciones levemente básicas se estabilizan nuevamente (pH ~ 9) debido a la presencia de una única especie en solución, el di-fenolato C4RAH₆²⁻. El equilibrio ácido-base descrito se evidenció por una variación de la absorbancia sin cambios en $\lambda_{\text{máx}}$ por efecto del pH (Figura 3.9). Por lo tanto, la formación de C4RAH₆²⁻ se traduce espectralmente como un aumento más marcado de la absorptividad molar a 287,0 nm de lo que ocurre por la generación del mono-fenóxido. Las transiciones electrónicas π - π son más relevantes que las n - π debido que hasta pH ~ 9 no se evidencia el corrimiento batocrómico esperado para este tipo de ciclofano.¹⁴

Desde pH = 9,04, a 303,0 nm se observa un aumento constante de la absorbancia en función del pH. Sin embargo, a las otras tres longitudes de onda se observa una única inflexión de la curva de titulación que indica que dos procesos químicos ocurren simultáneamente. La titulación potenciométrica indicó que el tercer punto final observado permite determinar la constante global K_a (3,4). Este resultado es consistente con lo ocurrido a 303,0 nm donde se evidencia un único proceso. La ventaja de la titulación espectrofotométrica, que provee varias longitudes de onda de trabajo, es que permite diferenciar los equilibrios ácido-base asociados a K_a (3) y a K_a (4) y se concluye que la especie tri-fenolato C4RAH₅³⁻, al no presentar un plató con absorbancia constante, no se

acumula en solución, sino que rápidamente reacciona con NaOH para generar el tetra-fenolato $C_4RAH_4^{4-}$. La distinción de los equilibrios Eq. 3 y Eq. 4 es posible mediante espectrofotometría dado que el tetra-fenolato no absorbe a $pH > 10$ a 234,5 nm. Por lo tanto, las señales de absorbancia registradas a $pH > 10$ corresponden a la formación de tetra-anión. Con un comportamiento análogo, las ionizaciones del monómero resorcinol ocurren de manera superpuestas en condiciones básicas y los valores reportados correspondientes a la formación del mono-fenolato y del di-fenolato son 9,21 y 10,90, respectivamente.⁷⁰ De manera interesante, el intervalo de pH en el que se ocurre el equilibrio di-fenolato/tri-fenolato ($9,04 < pH < 9,98$), coincide con la aparición y posterior desaparición de la banda ancha y poco intensa a 350 nm.

Los valores de pK_a (n) correspondientes a las ionizaciones de C_4RAH_8 se obtuvieron a partir de las regresiones sigmoideas del cambio de la absorbancia a una determinada longitud de onda (A_λ) en función del pH empleando la Ec. 3.7.²⁸ Los valores constantes de absorbancia de los platós inferior y superior corresponden a A_{menor} y A_{mayor} , respectivamente.

$$A_\lambda = \frac{[A_{menor} - A_{mayor} \times 10^{(pH - pK_a(n))}]}{10^{(pH - pK_a(n))} + 1} \quad (3.7)$$

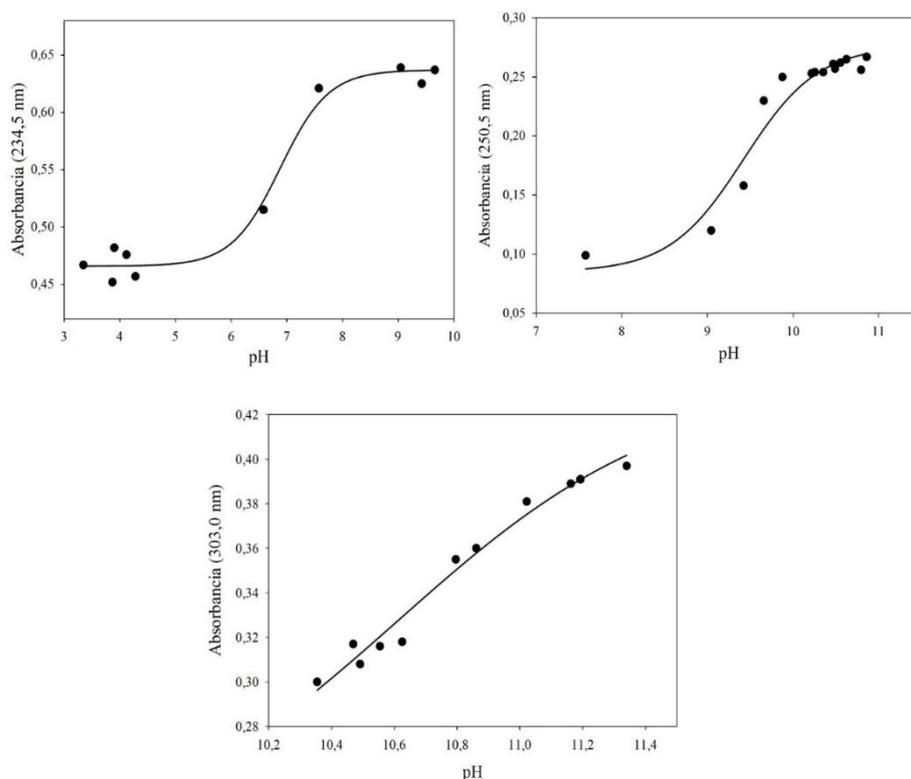


Figura 3.11. Determinaciones de pK_a (2), pK_a (3) y pK_a (4) a partir de las regresiones de las titulaciones espectrofotométricas (A_λ vs pH). $[C_4RAH_8] = 16,8 \times 10^{-6}$ M; $[NaOH] = 9,1 \times 10^{-3}$ M; $[NaCl] = 6,8 \times 10^{-3}$ M; 2 % v/v MeOH/ H_2O ; b = 1 cm; 25,0 °C.

En la Figura 3.11 se muestran los gráficos de A_λ en función del pH y las regresiones obtenidas mediante la Ec. 3.7 que permitieron determinar los valores más precisos de pK_a (n) de C4RAH₈ en 2% v/v MeOH/H₂O. Los valores obtenidos fueron pK_a (2) = 6,9 ± 0,1 (234,5 nm); pK_a (3) = 9,4 ± 0,3 (250,0 nm) y pK_a (4) = 10,6 ± 0,2 (303,0 nm). Los valores de pK_a (n) determinados a cada longitud de onda se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Constantes de disociación ácida de C4RAH₈ (pK_a (n)) determinados a distintas longitudes de onda mediante titulación espectrofotométrica con NaOH.^a

Longitud de onda	pK_a (1)	pK_a (2)	pK_a (3)	pK_a (4)
234,5 nm	—	6,9 ± 0,1	9,9 ± 0,2	—
250,5 nm	3,5 ± 0,6	6,9 ± 0,3	9,4 ± 0,3	10,6 ± 0,2
285,0 nm	3,6 ± 0,5	6,9 ± 0,2	9,8 ± 0,2	10,7 ± 0,3
303,0 nm	3,4 ± 0,6	6,9 ± 0,4	9,96 ± 0,06	10,6 ± 0,2
$\overline{pK_a}$	3,5 ± 0,6	6,9 ± 0,2	9,9 ± 0,2	10,6 ± 0,2

^a [C4RAH₈] = 16,8×10⁻⁶ M; [NaOH] = 9,1×10⁻³ M; [NaCl] = 6,8×10⁻³ M; 2 % v/v MeOH/H₂O; b = 1 cm; 25,0 °C.

La consistencia de cada constante de acidez obtenida a distintas longitudes de onda refleja la robustez de las determinaciones mediante la técnica y la precisión de las determinaciones.

Las determinaciones de las constantes de disociación ácida de las especies más ácidas de C4RAH₈ fueron posibles mediante las mediciones potenciométricas, pero la superposición de los equilibrios químicos de las especies más básicas no permite determinar con precisión los puntos finales asociados a pK_a (3) y pK_a (4). Opuestamente, los espectros de absorción evidencian que el cambio de absorbancia en función del pH es menos sensible en condiciones muy ácidas (pH < 4), pero las evidencias de las formaciones de los aniones di-, tri- y tetra-fenolato permiten compensar la deficiencia de la técnica potenciométrica para las determinaciones de la acidez de C4RAH₈ en condiciones alcalinas. De esta manera, la aplicación conjunta de ambas técnicas es suficiente para la determinación de las cuatro constantes de disociación esperadas para C4RAH₈ en solución acuosa diluida (~10⁻⁵ - 10⁻⁶ M).

3.3.2. Titulaciones ácido-base de C-butylresorcin[4]areno con KOH

Las soluciones de C4RAH₈ 19,1×10⁻⁶ M a distintos pH (2,80 – 11,41) se prepararon en 2 % v/v MeOH/H₂O de manera independiente empleando alícuotas crecientes de KOH 9,9×10⁻³ M. El efecto producido por la base sobre la absorción UV-visible de C4RAH₈ fue

igual al observado durante la titulación espectrofotométrica con NaOH. Los cambios observados en la absorción UV-visible de C4RAH₈ por aumento del pH indicaron el desplazamiento batocrómico de la banda correspondiente a las transiciones π - π debido a la prevalencia de las transiciones n- π . Los puntos isobéuticos confirmaron que las disociaciones de C4RAH₈ para generar los poli-fenolatos correspondientes tienen lugar debido a la neutralización de KOH. Los gráficos de A_λ en función del pH a las longitudes de onda que exhibieron los mayores cambios de la absorbancia por efecto de la base indicaron que tres puntos finales tienen lugar durante la titulación de C4RAH₈ con KOH (Figura 3.12, A). La respuesta potenciométrica, debido al empleo de una solución más concentrada de concentrada de KOH, no evidenció puntos finales definidos a diferencia de lo ocurrido con NaOH más diluido (Figura 3.12, B).

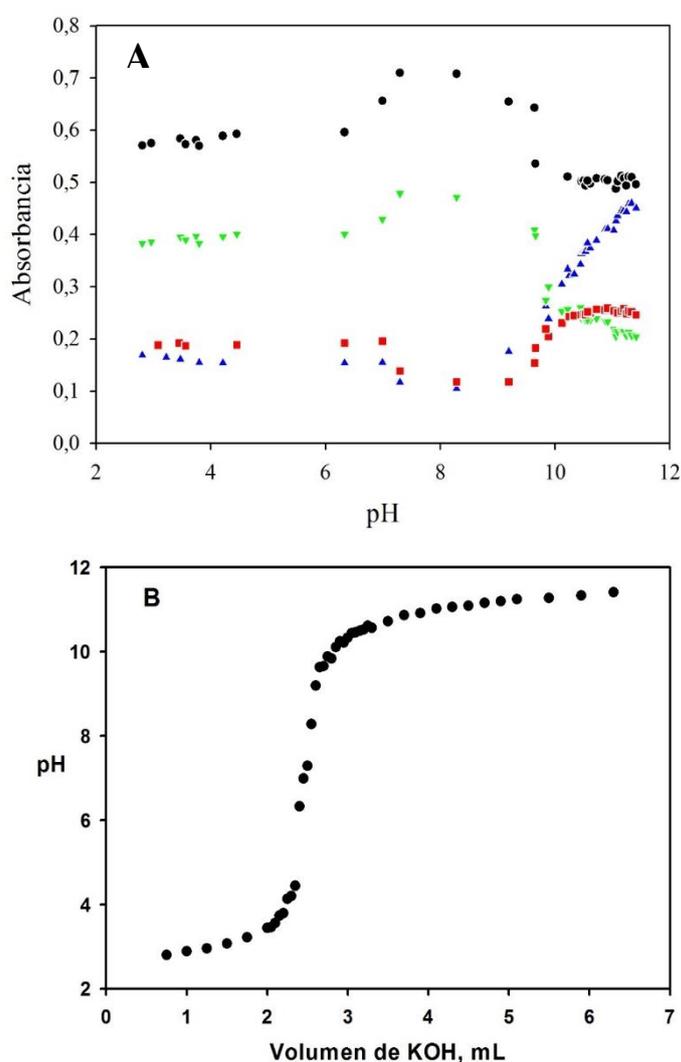


Figura 3.12. Titulaciones espectrofotométrica (A) y potenciométrica (B) de C4RAH₈ con KOH. A. Seguimiento de la variación de la absorbancia a distintas longitudes de onda por efecto del aumento del pH (● 235,5 nm, ▼ 287,0 nm, ■ 253,0 nm y ▲ 303,5 nm). B. Respuesta del pH en función del volumen de KOH empleado. [C4RAH₈] = $19,1 \times 10^{-6}$ M; [HCl] = $2,0 \times 10^{-3}$ M; [KOH] = $9,9 \times 10^{-3}$ M; [KCl] = $8,2 \times 10^{-3}$ M; 2 % v/v MeOH/H₂O; b = 1 cm; 25,0 °C.

El cambio de la absorbancia de C4RAH₈ en presencia de concentraciones crecientes de KOH no fue significativo en el intervalo de pH 2,80 – 6,33, evidenciándose que por espectrofotometría no es posible diferenciar con precisión entre las especies neutra y mono-aniónica del macrociclo. El análisis de la curva de titulación potenciométrica indica que el primer punto final con un cambio de pH de 4,45 a 6,33 tiene lugar con $V_{PF} = 2,38$ mL según la Ec. 3.6. Por lo tanto, la disociación de C4RAH₈ y la generación cuantitativa de C4RAH₇⁻ ocurre a pH < 6,33. El valor de $pK_a(1)$ determinado según la Ec. 3.7 asociado a la primera desprotonación (**Eq. 1**) fue $2,9 \pm 0,3$.

El primer cambio de absorbancia ocurrió entre pH 6,33 y 7,29 y se registró a todas las longitudes de onda evaluadas, siendo la variación más intensa a 235,5 nm y a 287,0 nm. Las especies involucradas en la reacción ácido-base, C4RAH₇⁻ y C4RAH₆²⁻, presentan una banda de absorción a 287,0 nm que corresponde a las transiciones electrónicas π - π . A pH ~8, la acumulación de la especie di-aniónica es máxima como lo indica el plató superior de la curva de titulación. Coincidentemente, la presencia de esta única especie en solución se traduce en la observación del segundo punto final en la titulación potenciométrica con 2,50 mL de KOH consumidos y un cambio de pH de 6,99 a 7,29 ($V_{PF} = 2,48$ mL). De acuerdo a los datos obtenidos, los valores de $pK_a(2)$ determinados fueron $(7,2 \pm 0,3)$ y $(6,7 \pm 0,3)$ por espectrofotometría y potenciometría, respectivamente. Dado que las lecturas potenciométricas correspondientes al plató inferior del segundo punto final fueron escasas, la exactitud del valor de $pK_a(2)$ determinado es menor con respecto a la determinación espectrofotométrica.

Los cambios espectroscópicos a partir de pH = 8,28 indicaron la formación de los poli-fenolatos de mayor orden debido al corrimiento batocrómico asociado a las transiciones electrónicas n- π . Los cambios de los valores de absorbancia exhibieron comportamientos similares a las distintas longitudes de onda, excepto a 303,0 nm. A tales longitudes de onda se observaron cambios abruptos en la absorbancia con un punto de inflexión en común a pH ~ 9,7. Posteriormente, las absorbancias alcanzaron valores constantes en el intervalo de pH 10,12 – 11,41 a 235,5 nm y 253,0 nm; en tanto a 287,0 nm se registró una leve disminución de la señal en este rango de pH. Con un comportamiento especial a 303,0 nm, se observó un aumento marcado de la absorbancia y sin inflexiones desde pH=8,28 hasta 11,44. La capacidad multi-respuesta de esta técnica permitió concluir que las curvas de titulación en el intervalo de pH 8,28 – 10,12 a 235,5 nm y 253,0 nm corresponden a la disociación de un protón de C4RAH₆²⁻ y la formación de C4RAH₅³⁻, mientras que de pH 10,12 a 11,41 el equilibrio predominante es la generación del tetra-fenolato C4RAH₄⁴⁻ el cual absorbe a 287,0 nm y presenta su máximo de absorción a 303,0 nm, mientras que no presenta señales a las otras longitudes de onda evaluadas. De manera similar a lo ocurrido en las determinaciones con NaOH, la cercanía de las constantes ácidas de las especies di-fenolato

y tri-fenolato, pK_a (3) y pK_a (4) respectivamente, se traduce en la dificultad de las determinaciones de los puntos finales correspondientes por potenciometría y en la obtención de un valor poco preciso de pK_a (4) debido a la superposición de las curvas por espectrofotometría. En este caso, la re-evaluación de los datos empleando un diagrama de absorbancia o diagrama-A (nombre traducido de su denominación en inglés, *A-diagram*) permite una mejor interpretación de los equilibrios ácido-base involucrados en un intervalo acotado de pH y permite la obtención de valores más precisos de las constantes ácidas asociadas cuando la diferencia entre las mismas es relativamente pequeña ($\Delta pK_a \leq 1,7$).⁷¹

Un diagrama de absorbancia corresponde al gráfico de los valores de absorbancia a una determinada longitud de onda en función de las absorbancias a una longitud de onda diferente ($A_{\lambda 1}$ vs $A_{\lambda 2}$). Este tipo de gráfico ha resultado útil para evidenciar los cambios de absorbancia relativa por efecto del pH.^{40,70} Si un único equilibrio ácido-base ocurre en el intervalo de pH evaluado, $A_{\lambda 1}$ resulta proporcional a $A_{\lambda 2}$ y se obtiene un gráfico lineal. Sin embargo, si en el sistema coexisten dos o más equilibrios ácido-base, se obtendrán un quiebre en cada respuesta lineal cada vez que un nuevo equilibrio prevalezca en el medio.

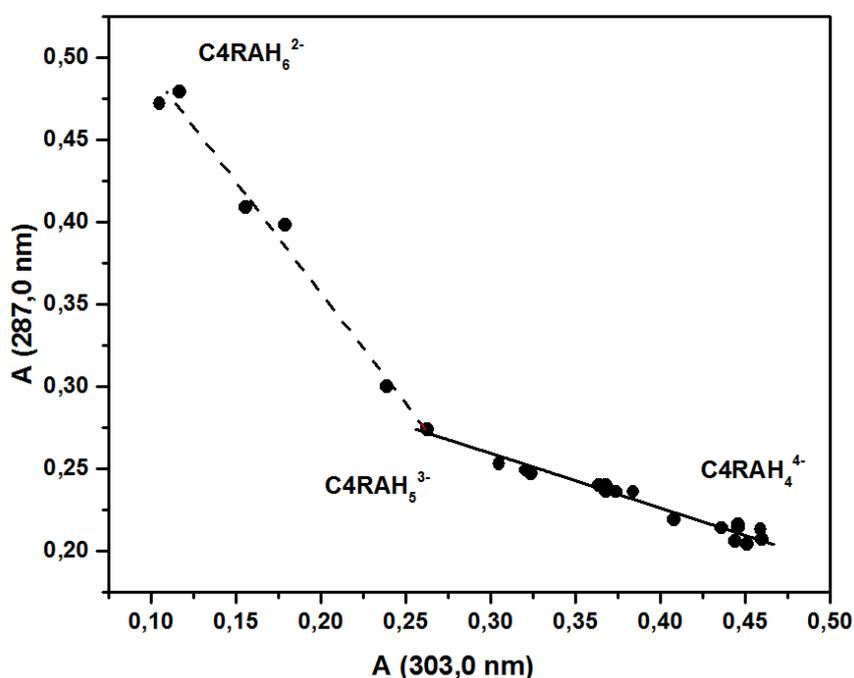


Figura 3.13. Diagrama de absorbancia de C4RAH₈ en el intervalo de pH 7,29 – 11,44. [C4RAH₈] = 19,1×10⁻⁶ M; [HCl] = 2,0×10⁻³ M M; [KOH] = 9,9×10⁻³ M; [KCl] = 8,2×10⁻³ M; 2 % v/v MeOH/H₂O; b = 1 cm; 25,0 °C.

El diagrama de $A_{287\text{ nm}}$ en función de $A_{303\text{ nm}}$ de C4RAH₈ en el intervalo de pH 7,29 – 11,44 exhibió dos respuestas lineales que evidenciaron claramente que dos equilibrios de desprotonación consecutivos tienen lugar (Figura 3.13); en tanto que el análisis de los datos de absorbancia en función del pH a una sola longitud no permiten llegar a esta conclusión.

El primer segmento lineal, gobernado por pK_a (3), ocurre en el rango de pH 7,29 – 9,84 donde al pH inferior predomina la especie $C4RAH_6^{2-}$ y al pH superior, $C4RAH_5^{3-}$. El segmento siguiente entre pH 9,84 y 11,41 corresponde a la rápida disociación de $C4RAH_5^{3-}$ y a la acumulación en solución de $C4RAH_4^{4-}$, y este equilibrio depende de pK_a (4) (Figura 3.13).

Las pendientes de los segmentos lineales están relacionadas con las constantes K_a (3) y K_a (4) y las mismas pueden ser obtenidas mediante la aplicación de la Ec. 3.8.

$$(A_\lambda - A_{polianión}) \times 10^{-pH} = -K_a \times A_\lambda + K_a(4) \times A_{polianión} \quad (3.8)$$

A_λ es la absorbancia a 287,0 nm o 303,0 nm, $A_{polianión}$ corresponde a la absorbancia de di-anión si se trata del primer segmento, o del tri-anión si se trata del segundo. En este último caso, $A_{trianión}$ corresponde a punto de inflexión de las rectas del diagrama-A.

La Ec. 3.8 surge de la linealización de la Ec. 3.7 y en este caso el valor de la pendiente corresponde a K_a .⁷⁰ Su aplicación al segundo segmento del diagrama-A, con más datos experimentales, permite obtener una respuesta lineal con pendiente igual a K_a (4) cuando se grafica $(A_{303nm} - A_{trianión}) \times 10^{-pH}$ en función de A_{300nm} (Figura 3.14). La misma respuesta es obtenida si se emplean los valores de A_{287nm} .

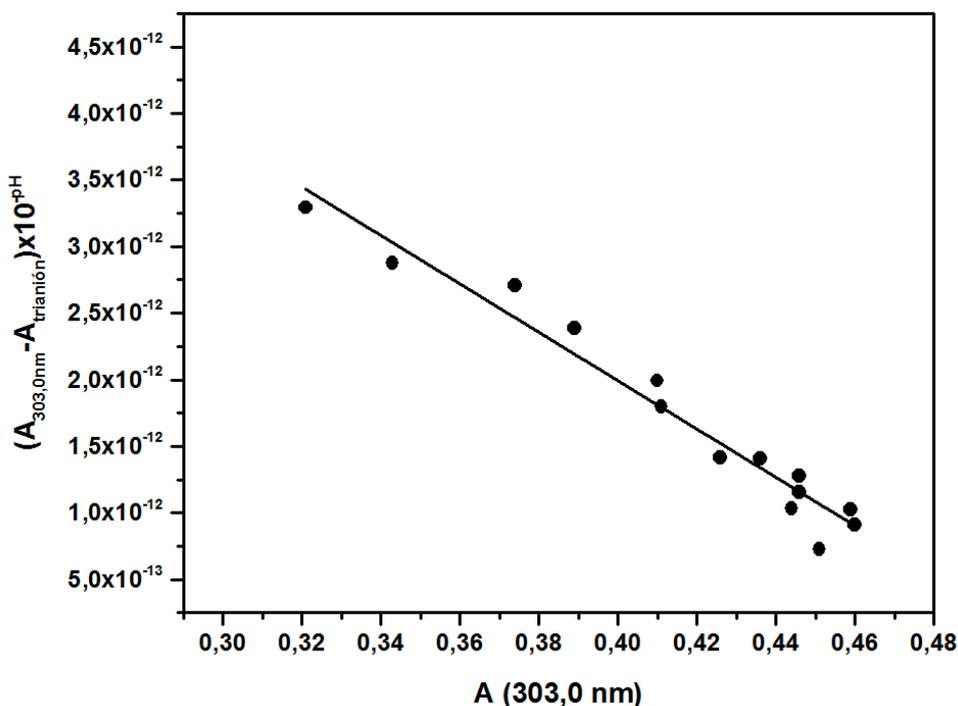


Figura 3.14. Determinación de K_a (4) correspondiente al equilibrio tri-fenolato/tetra-fenolato de $C4RAH_8$.

En la tabla 3.5 se indican los valores de pK_a (4) obtenidos mediante la aplicación de la ecuación 3.8 al segundo segmento del diagrama-A. Los valor de pK_a (4) obtenido mediante la ecuación 3.7 fue $10,8 \pm 0,3$ a 287,0 y a 303,0 nm. Sin embargo, dado que los datos graficados no presentaron un perfil sigmoide definido, las incertezas asociadas fueron mayores. La consistencia de los valores obtenidos demuestra la robustez del procedimiento y la exactitud en la determinación de la constante.

Tabla 3.5. Constantes de ionización del tri-fenolato de C4RAH₈ determinadas por espectrofotometría UV-visible.

λ , nm	K_a (4)	pK_a (4)
287,0	$(2,3 \pm 0,3) \times 10^{-11}$	$10,58 \pm 0,1$
303,0	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-11}$	$10,74 \pm 0,1$

^a El error absoluto de pK_a está dado por el error relativo de K_a .

A continuación se resumen los valores de pKa de C4RAH8 determinados mediante las titulaciones potenciométrica y fotométrica con KOH (Tabla 3.6). Los valores de pKa (1) por espectrofotometría y pKa (3) y pKa (4) mediante potencimetría no pudieron ser determinados (N.D.). La ultima consntante de ionizacion se determinó mediante el diagrama-A.

Tabla 3.6. Constantes de disociación ácida de C4RAH8 (pK_a (n)) obtenidas a partir de titulaciones potenciométricas y espectrofotométricas con KOH. ^a

Método	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a4} ^b
Potenciometría ^a	$2,9 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,3$	N.D.	N.D.
Espectrofotometría ^b	N.D.	$7,2 \pm 0,3$	$9,67 \pm 0,09$	$10,7 \pm 0,1$

^a [C4RAH₈] = $19,1 \times 10^{-6}$ M; [HCl] = $2,0 \times 10^{-3}$ M; [KOH] = $9,9 \times 10^{-3}$ M; [KCl] = $8,2 \times 10^{-3}$ M; 2 % v/v MeOH/H₂O; b = 1 cm; 25,0 °C.

^b Valor determinado a partir del diagrama-A.

3.3.3. Titulaciones ácido-base de C-butylresorcin[4]areno con LiOH

Las respuestas potenciométricas y de absorción UV-visible de C4RAH₈ por efecto del aumento del pH con LiOH fueron levemente diferentes a las obtenidas con los otros hidróxidos alcalinos. La titulación potenciométrica (Figura 3.15) demostró que el pH asciende abruptamente a partir de 3,47 luego de la adición de 0,88 mL de LiOH. El valor determinado de V_{PF} (1) (Ec. 3.6) correspondiente al primer punto final fue 1,07 mL. Posteriormente, el cambio del pH por la adición de LiOH exhibió un segundo punto final

($V_{PF} (2) = 1,22 \text{ mL}$) y un tercer punto final ($V_{PF} (3)=1,44$) como se muestra en el gráfico interno de la Figura 3.15. En la Tabla 3.7 se muestran los valores de $pK_a (n)$ determinados a partir de los datos potenciométricos.

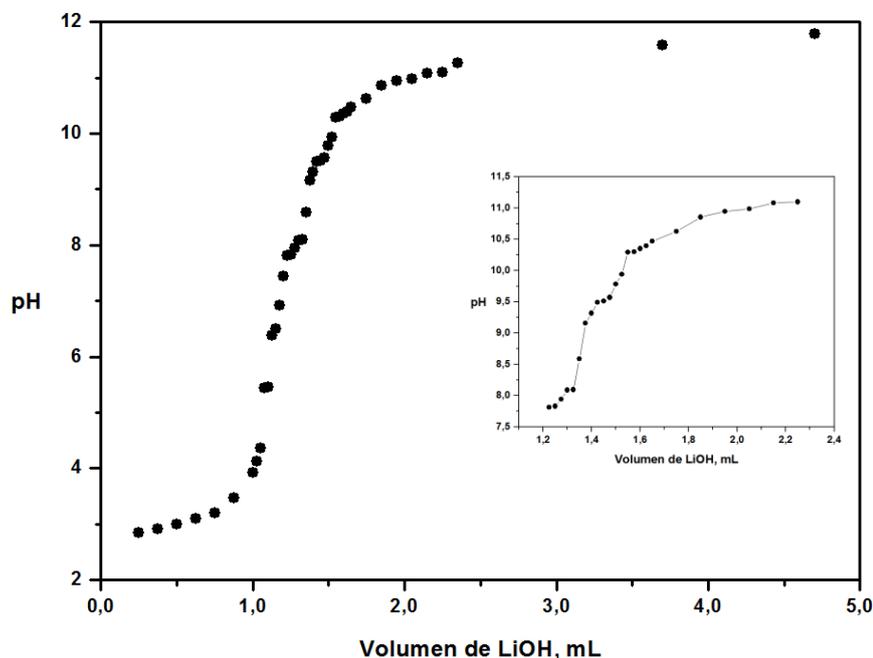


Figura 3.15. Titulación potenciométrica de $C4RAH_8$ con LiOH. Gráfico interno: ampliación de los puntos finales observados a $pH > 8$. $[C4RAH_8] = 16,8 \times 10^{-6} \text{ M}$; $[HCl] = 6,87 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[LiOH] = 8,5 \times 10^{-3} \text{ M}$; $I_{LiCl} = 10,9 \times 10^{-3} \text{ M}$; 2% v/v MeOH/H₂O; 25,0 °C.

Tabla 3.7. Volumen consumido de LiOH (V_{PF}) y los valores de $pK_a (n)$ asociados a cada punto final durante la titulación potenciométrica de $C4RAH_8$.^a

$V_{PF}, \text{ mL}$	$pK_a(n)$
1,07	(1) $3,0 \pm 0,2$
1,22	(2) $7,7 \pm 0,1$
1,44	(3) $9,3 \pm 0,1$
—	(4) $\sim 10,3$

^a El último punto final fue estimado.

Dado que los valores de $pK_a (2)$, (3) y (4) determinados se encuentran cercanos entre sí, las interpretaciones de las curvas de titulación espectrofotométricas fueron complicadas. No obstante, el diagrama de absorbancia a 256,0 nm y 303,0 nm permitió elucidar los equilibrios que tienen lugar en el intervalo de $pH 7,83 - 11,59$ (Figura 3.16).

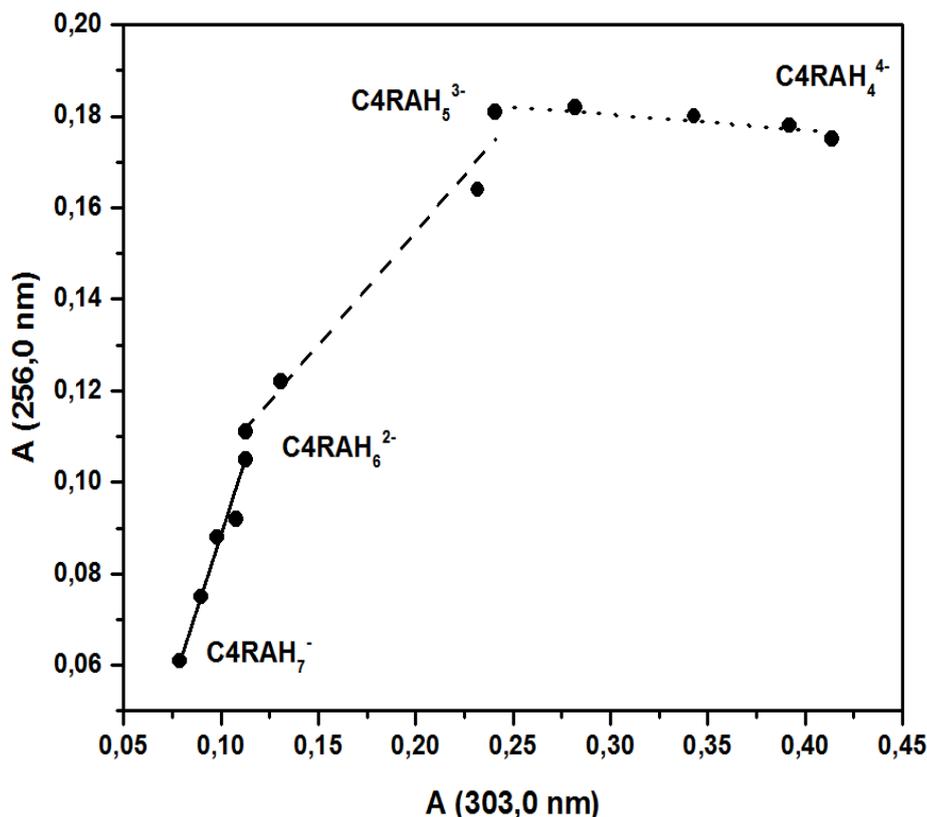


Figura 3.16. Diagrama de absorción de C4RAH₈ en el intervalo de pH 7,83 – 11,59. [C4RAH₈] = 16,8×10⁻⁶ M; [HCl] = 6,87×10⁻³ M; [LiOH] = 8,5×10⁻³ M; [LiCl] = 10,9×10⁻³ M; 2% v/v MeOH/H₂O; b = 1 cm; 25,0 °C.

El diagrama-A presenta tres segmentos lineales que demuestran la existencia de tres equilibrios ácido-base en la región de pH 7,83 – 11,59 y confirma los tres puntos finales registrados en la titulación potenciométrica. Considerando que el equilibrio K_a (1) correspondiente a la ionización de C4RAH₈ ocurre con un valor de pK_a (1) = 3,0 y que la espectrofotometría no es suficientemente sensible para su determinación, los cambios de A_λ en función del pH registrados indican la ocurrencia de manera consecutiva de los equilibrios Eq. 2, 3 y 4 en los intervalos de pH 7,83 – 8,09; 8,09 – 9,94 y 9,94 – 11,59, respectivamente. Dado que los intervalos de pH que delimitan los equilibrios ácido-base son conocidos, es posible obtener los valores de pK_a a partir de la Ec. 3.7. Sin embargo, la escasez de puntos experimentales no permite en algunos casos determinaciones de forma precisa o produce resultados con una incerteza mayor a la obtenida mediante el uso de la ecuación linealizada (Ec. 3.8). En la Tabla 3.8 se indican los valores de pK_a obtenidos mediante ambas ecuaciones, si es posible, a distintas longitudes de onda y los valores promediados.

Tabla 3.8. Constantes de disociación ácida de C4RAH₈ (pK_a (n)) determinados a distintas longitudes de onda mediante titulación espectrofotométrica con LiOH.^a

λ , nm	pK_a (2)	pK_a (3)	pK_a (4)
256,5	$7,6 \pm 0,4$	$8,8 \pm 0,2$ $8,54 \pm 0,05$ (*)	N.D.
286,0	$7,5 \pm 0,2$	N.D.	N.D.
303,0	$7,7 \pm 0,5$	$8,5 \pm 0,1$ (*)	$10,68 \pm 0,08$ $10,63 \pm 0,06$ (*)
$\overline{pK_a}$	$7,6 \pm 0,4$	$8,6 \pm 0,2$	$10,66 \pm 0,07$

(*) Corresponde a los valores de pK_a obtenidos a partir de la ecuación 3.8.

3.3.4. Titulaciones ácido-base de C-metilresorcin[4]areno con NaOH

3.3.4.1. Titulación potenciométrica de C1RAH₈

La modificación del pH de soluciones de C1RAH₈ en 2% v/v MeOH/H₂O preparadas de manera independiente con concentración constante del macrociclo se realizó empleando volúmenes variables de una solución acuosa de NaOH. El gráfico resultante de la titulación potenciométrica (Figura 3.17) exhibió dos puntos finales con cambios importantes en las lecturas de pH por adición de NaOH y un tercer punto final con una variación suave del pH.

La neutralización cuantitativa de HCl $7,79 \times 10^{-5}$ moles y C1RAH₈ $4,37 \times 10^{-7}$ moles presentes en cada solución ($V_F = 10,0$ mL) consumen un total de *ca.* $7,83 \times 10^{-5}$ moles de NaOH que corresponden por estequiometría a 5 equivalentes de base. Experimentalmente se obtuvo que el volumen necesario de NaOH para la neutralización completa fue 4,4 mL de NaOH $17,8 \times 10^{-3}$ M, lo cual coincide con el volumen teórico de NaOH para la neutralización completa. Posteriormente, con volúmenes de base superiores a 4,4 mL, la variación del pH es mínima, confirmándose que a partir de pH 11,58 la disociación de C1RAH₈ al tetra-fenolato ha sido cuantitativa. Los volúmenes teóricos de NaOH que representan 4; 3 y 2 equivalentes de base son 3,5; 2,6 y 1,8 mL de base, respectivamente. Los volúmenes de V_{PF} (n) experimentales asociados a los tres puntos finales registrados se determinaron mediante la Ec. 3.5. Los valores de pH correspondientes a volúmenes resultantes de V_{PF} (n)/2 indican que la capacidad reguladora del sistema es máxima; por lo tanto, corresponden a las constantes de ionización pK_a de C1RAH₈. En la tabla 3.9 se indican los volúmenes de NaOH teóricos, los valores de V_{PF} y los equivalentes de base determinados experimentalmente y las constantes pK_a .

Tabla 3.9. Volumen y equivalentes consumidos de NaOH (V_{PF}) y los valores de pK_a (n) asociados a cada punto final durante la titulación potenciométrica de C1RAH₈.

V_{PF} (n), mL	Equivalentes de NaOH consumidos	pK_a
2,09	2,3	(1) $3,0 \pm 0,3$
2,49	2,9	(2) $6,5 \pm 0,3$
~ 3,2	N.D.	(3,4) ~ 10,5

Los equivalentes de NaOH obtenidos experimentalmente son consistentes con los valores de los puntos finales primero y segundo, aunque no con el tercero. El cambio en la lectura del pH asociado al último punto final no permitió determinar con precisión el valor de V_{PF} (3). No obstante, este valor se estimó en ~ 3,2 mL de NaOH a partir del gráfico de pH en función del volumen de base (Figura 3.17). El valor de pK_a estimado corresponde a la superposición de los equilibrios K_a (3) y K_a (4), por lo tanto la constante estimada es global.

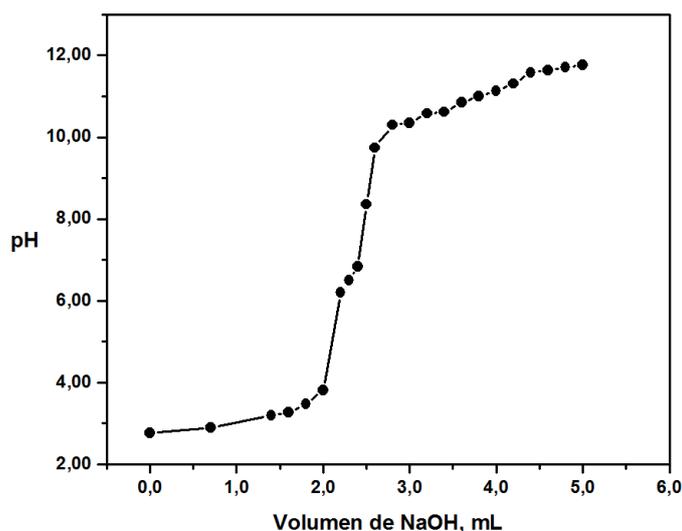


Figura 3.17. Titulación potenciométrica de C1RAH₈ con NaOH. $[C1RAH_8] = 43,7 \times 10^{-6}$ M; $[HCl] = 9,5 \times 10^{-3}$ M; $[NaOH] = 17,8 \times 10^{-3}$ M; $[NaCl] = 18,4 \times 10^{-3}$ M; 25,0 °C.

3.3.4.2. Titulación espectrofotométrica de C1RAH₈

Los cambios evidenciados por los espectros de absorción de C1RAH₈ debido a sus ionizaciones sucesivas por efecto de NaOH indicaron el corrimiento batocrómico característico con aumento de absorbancia debido a las transiciones electrónicas n- π (Figura 3.18). En el intervalo de pH 2,76 – 6,20 se observó un pequeño aumento de la absorción de la banda centrada a 282,0 nm, demostrándose que en las condiciones empleadas las absorptividades molares semejantes de las especies neutra y mono-aniónica de C1RAH₈ no permiten la determinación de la primera ionización por espectrofotometría UV-

visible. Posteriormente, la adición de una pequeña adición de base que generó un aumento del pH de 6,20 a 8,36 produjo un cambio sustancial sobre el perfil del espectro de absorción UV del mono-fenolato reflejado como un leve corrimiento batocrómico de 282,0 nm a 287,0 nm acompañado por la aparición de una nueva banda a 350,0 nm. La variación espectral registrada fue indicativa de la formación de la especie di-fenolato. En el caso de C4RA, el inicio del corrimiento batocrómico se había registrado en condiciones más básicas y fue asociado a la formación del tri-fenolato (Figura 3.9). El aumento del pH de en las soluciones de C1RAH₈ de 8,36 a 9,74 evidenció un corrimiento batocrómico más marcado de 287,0 nm a 296,5 nm con un aumento de la absorbancia de 0,463 a 0,621, mientras que la banda a 350,0 nm no varía. En condiciones más básicas (pH = 11,76), la señal a 350,0 nm desaparece, mientras que el desplazamiento batocrómico continuó hasta 300,0 nm con una absorbancia igual a 0,802. Dado que la curva potenciométrica no demostró cambios sustanciales en las lecturas de pH por encima de 11,58, se asumió que el espectro corresponde al tetra-fenolato de C1RAH₈.

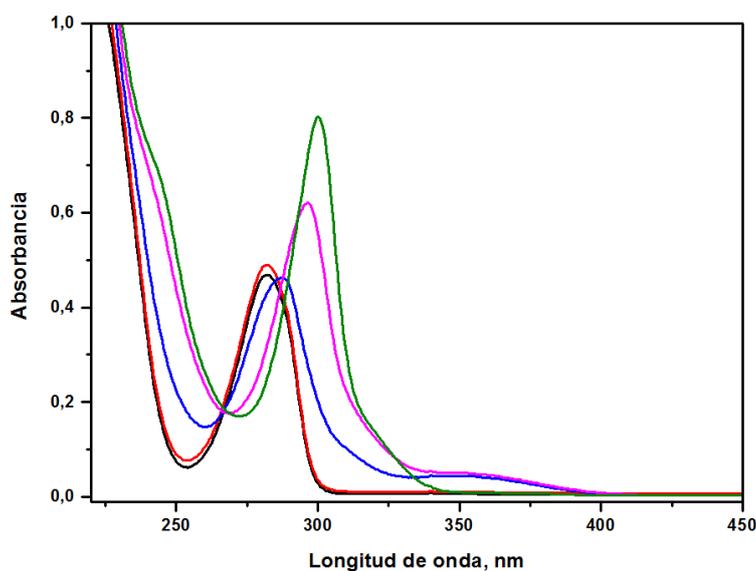


Figura 3.18. Espectros de absorción UV-visible de C1RAH₈ a distintos valores de pH: (—) 2,76; (—) 6,20; (—) 8,36; (—) 9,74; (—) 11,76. [C1RAH₈] = 43,7×10⁻⁶ M; 2 % v/v MeOH/H₂O; b = 1 cm; 25,0 °C.

En las titulaciones espectrofotométricas anteriores de C4RA, la banda a 350 nm corresponde a la formación del tri-fenolato. En el caso de C1RA, la aparición de la banda se registró a pH = 8,36 indicando que el di-fenolato ya se ha dissociado. Este resultado es consistente con el valor de pK_a (2) determinado mediante potenciometría (6,5). La concentración del tri-fenolato aumenta con el pH hasta 9,74 y la desaparición de la banda a 350 nm en el intervalo de pH 9,74 – 11,76 indica la formación del tetra-fenolato.

La determinación fotométrica de pKa (2) no fue precisa tanto por la regresión sigmoideal como la lineal. El diagrama-A de los valores de absorbancia a 254,0 nm y 280,0 nm demostró una respuesta lineal en el intervalo de pH 8,36 – 9,74. Por lo tanto, un único equilibrio ácido-ocurre en tales condiciones y el cambio espectral observado corresponde a la ionización del di-fenolato y a la formación del tri-fenolato. La regresión sigmoideal de los datos de A vs pH permitió obtener $\overline{pK_a}$ (3) = 8,3 ± 0,2 (valor promedio de las determinaciones a 256,5 nm, 286,0 nm y 303,0 nm). A pH > 10,30 debe ocurrir las disociaciones del tri-fenolato. El diagrama-A en el intervalo de pH 10,35 – 11,31 confirma esta hipótesis al exhibir un segmento lineal que demuestra que un equilibrio ácido-base tienen lugar y está asociado a la ionización del tri-fenolato y a la formación del tetra-fenolato. El valor de pKa (4) obtenidos a partir de una regresión sigmoideal fue pKa (4) = 10,68 ± 0,08 (303,5 nm). A continuación, en la Tabla 3.10 se muestran los valores de pKa (n) obtenidos para C1RAH₈.

Tabla 3.10. Constantes de disociación ácida de C1RAH₈ (pKa (n)) obtenidas a partir de titulaciones potenciométricas y espectrofotométricas con NaOH. ^a

Método	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃	pKa ₄
Potenciometría ^a	3,0 ± 0,3	6,5 ± 0,3	~ 10,5	
Espectrofotometría ^b	No determinado	No determinado	8,3 ± 0,2	10,68 ± 0,08

^a [C1RAH₈] = 43,7 × 10⁻⁶ M; [HCl] = 2,0 × 10⁻³ M; [NaOH] = 17,8 × 10⁻³ M; I_{NaCl} = 18,4 × 10⁻³ M; 2 % v/v MeOH/H₂O; b = 1 cm; 25,0 °C.

3.3.5. Titulaciones espectrofotométrica de C-heptilresorcin[4]areno con NaOH

Los espectros de absorción UV-visible de C7RA en 2% v/v MeOH/H₂O demostraron un aumento de la señal en todo el intervalo de longitudes de onda evaluado, mientras que el λ_{máx} se desplaza levemente de 286,0 nm a pH = 1,47 a 287,5 nm a pH = 11,66. A valores de pH > 9, una nueva banda de absorción aparece alrededor de 350,0 nm cuya intensidad aumenta con la adición de NaOH (Figura 3.19 A). Las longitudes de onda a las cuales ocurren los mayores cambios espectrales por el aumento del pH fueron 252,0 nm; 286,0 nm; 293,0 nm y 355,0 nm (Figura 3.19 B). Los valores de absorbancia a estos valores de longitud de onda se graficaron en función del pH. El análisis del gráfico indicó que la absorbancia aumenta, excepto a 355,0 nm, en el intervalo de pH 1,47 – 3,64. Por lo tanto, la primera ionización tiene lugar en este rango de pH. Posteriormente, los valores de absorbancia aumentan (excepto a 355,0 nm) a partir de pH = 6,05. El punto de inflexión observado entre valores de pH 6 y 8 es indicativo de la ionización del mono-fenolato de C7RA. A pH > 10,01, la absorbancia a todas las longitudes de onda evaluadas aumenta.

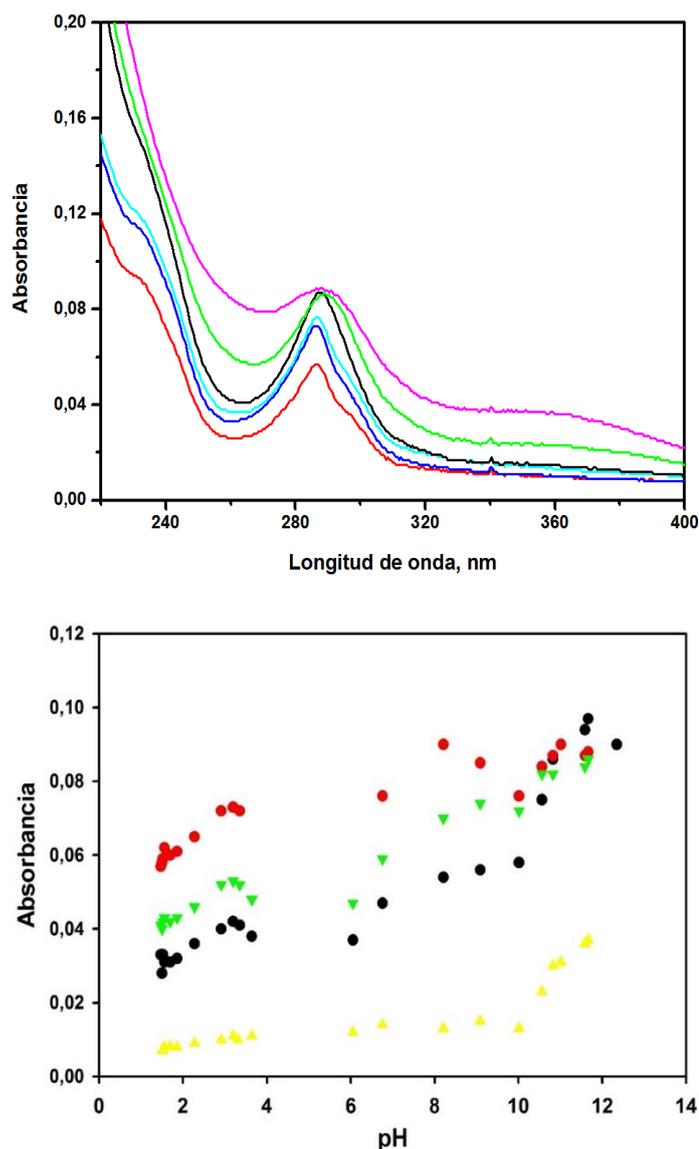


Figura 3.19. (A) Espectros de absorción UV-visible de C7RA a distintos valores de pH: (—) 1,47; (—) 3,20; (—) 6,76; (—) 9,09; (—) 10,56; (—) 11,66. (B) Seguimiento de la variación de la absorbancia a distintas longitudes de onda por efecto del aumento del pH (● 252,0 nm, ● 286,0 nm, ▼ 293,0 nm y ▲ 355,0 nm). $[C7RAH8] = 5,0 \times 10^{-6}$ M; $[HCl] = 3,5 \times 10^{-3}$ M; $[NaOH] = 6,7 \times 10^{-3}$ M; $[NaCl] = 8,5 \times 10^{-3}$ M; 2 % v/v MeOH/H₂O; b = 1 cm; 25,0 °C.

La banda ancha y de baja intensidad a $\sim 350,0$ nm fue observada durante las titulaciones espectrofotométricas de C1RA y de C4RA con tres bases diferentes. Sin embargo, en los estudios de los C-alkilresorcin[4]arenos de cadenas alquílicas más cortas se observó la desaparición de la banda en condiciones muy alcalinas debido a la formación del tetra-fenolato. En el caso de C7RA, este fenómeno no resulta evidente lo cual puede indicar que la formación del tetra-fenolato no ocurre incluso en las condiciones muy alcalinas (pH = 11,66). El gráfico de $A_{252\text{ nm}}$ vs $A_{355\text{ nm}}$ en el intervalo de pH 8,21 – 11,66 demostró que la tendencia de la absorbancia relativa es lineal (Figura 3.20). Por lo tanto, un

sólo equilibrio de ionización tiene lugar en el rango de pH evaluado y corresponde a la formación del tri-fenolato, en consonancia con la banda observada a 350 nm en condiciones muy alcalinas.

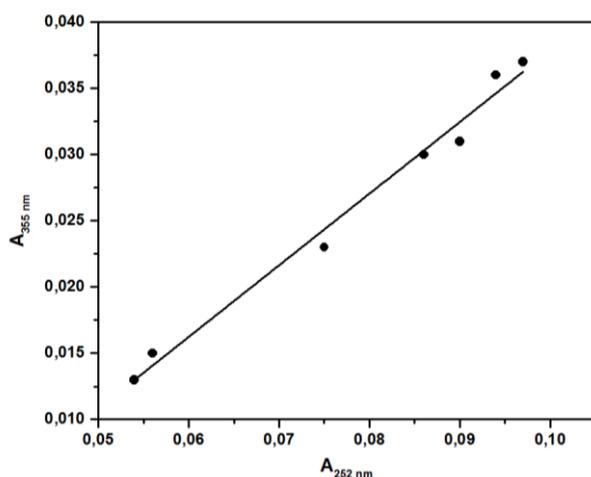


Figura 3.20. Diagrama de absorbancia de C7RAH₈ en el intervalo de pH 8,21 – 11,66.

La regresión sigmoïdal de los datos de A_λ vs pH permitió las determinaciones de las constantes de ionización de los equilibrios C7RAH₈/C7RAH₇⁻; C7RAH₇⁻/C7RAH₆²⁻ y C7RAH₆²⁻/C7RAH₅³⁻ en los intervalos de pH 1,47 – 3,64; 3,64 – 10,01 y 8,21 – 11,66, respectivamente. En la **Tabla 3.11** se muestran los valores de pK_a (n) obtenidos a las distintas longitudes de onda evaluadas. La multi-respuesta de la técnica espectrofotométrica permite las determinaciones de un mismo valor de pK_a a distintas longitudes de onda. La consistencia de cada constante determinada al menos a dos longitudes de onda distintas fortalece la precisión del resultado obtenido. Los valores de pK_a (n) se informan promediados.

Tabla 3.11. Constantes de disociación ácida de C7RAH₈ (pK_a (n)) determinados a distintas longitudes de onda mediante titulación espectrofotométrica con NaOH.^a

λ , nm	pK_a (1)	pK_a (2)	pK_a (3)
252,0	2,3 ± 0,4	7,1 ± 0,3	10,5 ± 0,2
286,0	2,2 ± 0,2	No determinado	No determinado
293,0	2,3 ± 0,2	7,1 ± 0,3	10,4 ± 0,3
355,0	—	—	10,7 ± 0,2
$\overline{pK_a}$	2,3 ± 0,3	7,1 ± 0,3	10,5 ± 0,2

^a [C7RAH8] = 5,0×10⁻⁶ M; [HCl] = 3,5×10⁻³ M; [NaOH] = 6,7×10⁻³ M; [NaCl] = 8,5×10⁻³ M; 2 % v/v MeOH/H₂O; b = 1 cm; 25,0 °C.

Tanto los espectros de absorción UV como el diagrama-A en condiciones alcalinas indican que, a diferencia de C1RA y C4RA, la formación del tetra-fenolato de C7RA no tiene lugar.

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1. Interpretación del comportamiento poliprótico de C4RA en medio acuoso

En la Tabla 3.12 se resumen las constantes de ionización de C4RAH₈ en 2% v/v MeOH/H₂O obtenidas mediante potenciometría y espectrofotometría empleando los hidróxidos de metales alcalinos KOH, NaOH y LiOH.

Tabla 3.12. Constantes de ionización (pK_a) de C4RAH₈ determinadas mediante titulaciones potenciométrica y espectrofotométrica con KOH, NaOH y LiOH.

		Potenciometría	Espectrofotometría UV-visible
pK_a (1)	KOH	$2,9 \pm 0,3$	—
	NaOH	$3,1 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,6$
	LiOH	$3,0 \pm 0,2$	—
pK_a (2)	KOH	$6,7 \pm 0,3$	$7,2 \pm 0,3$
	NaOH	$7,2 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,2$
	LiOH	$7,7 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,4$
pK_a (3)	KOH	—	$9,67 \pm 0,09$
	NaOH	—	$9,9 \pm 0,2$
	LiOH	$9,3 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,2$
pK_a (4)	KOH	—	$10,7 \pm 0,1$
	NaOH	$10,0 \pm 0,3$ *	$10,6 \pm 0,2$
	LiOH	$\sim 10,3$	$10,66 \pm 0,07$

(*) Corresponde a pK_a (3 y 4)

La Tabla 3.12 indica que los valores determinados de pK_a de otros resorcin[4]arenos (Sección 3.1.4) son diferentes a los obtenidos con C4RAH₈ y las razones se atribuyen a las distintas condiciones de los experimentos, lo que dificulta las comparaciones. La técnica empleada para la determinación, la naturaleza del solvente⁵¹ y los

grupos funcionales presentes en el macrociclo afectan notoriamente sobre el comportamiento ácido-base de los resorcin[4]arenos, tal como ha sido observado con los calix[4]arenos.

El resultado más sobresaliente acerca del comportamiento poliprótico de C4RAH8 es la marcada acidez correspondiente a su primera ionización, la cual se asemeja al comportamiento ácido de los macrociclos análogos calix[4]arenos. Los valores reportados de las constantes de acidez de resorcinol en agua son $pK_a(1) = 9,21$ y $pK_a(2) = 10,90$.⁷⁰ Los resultados obtenidos con C4RAH8, tetrámero cíclico de resorcinol, reflejan que las disociaciones de cuatro protones son más ácidas con respecto a la unidad monomérica y la primera disociación es 6,2 unidades menor con respecto a resorcinol. Sin embargo, en la bibliografía basada en los primeros datos de la acidez de resorcin[4]arenos en medios no acuosos se ha reportado $pK_a(1) \sim 7$,^{52,55} lo cual ha determinado que en experimentos subsiguientes el intervalo ácido de la escala de pH no sea explorada (ver condiciones experimentales en Tabla 3.2). El valor de $pK_a \sim 7$ ha sido obtenido para C4RAH8; no obstante, la consistencia de los resultados empleando distintas bases y dos técnicas diferentes han permitido confirmar que se trata de la segunda ionización. El resorcin[4]areno **3.9** (Figura 3.7) es el único macrociclo cuyos valores de pK_a reportados presentan un comportamiento moderadamente ácido con un valor estimado de $pK_a(1)$ igual a 5.⁵⁹ No obstante, dado que la acidez de 2-cianoresorcinol es mayor que la de resorcinol, de acuerdo a los resultados aquí obtenidos se espera y $pK_a(1)$ del macrociclo funcionalizado sea incluso menor que la de C4RAH8, tal como sucede con los calix[4]arenos sustituidos con grupos tomadores de electrones (Tabla 3.1). Además, considerando que las constantes de acidez de **3.9** fueron estimadas mediante UV-visible y que la disociación del primer protón no puede ser determinada con precisión por esta técnica como se evidenció con C4RAH8, es probable que el valor de $pK_a \sim 5$ en realidad corresponda a la segunda ionización y no a la primera como ha sido reportado.⁵⁹

El carácter ácido exhibido por C4RAH8 es comparable al de los calix[4]arenos hidrosolubles sustituidos con grupos NO_2 y SO_3^- y al de t-butilcalix[4]areno. En estos casos, la acidez se ha atribuido a la estabilización del mono-fenóxido generado por las interacciones puente de hidrógeno intramoleculares con dos grupos OH adyacentes. El mismo tipo de interacción sólo es posible de manera parcial en el caso del mono-fenóxido de resorcin[4]areno dado que el anión O^- sólo puede establecer un puente de hidrógeno intramolecular con el grupo OH del anillo vecino. Se ha reportado que el di-fenóxido de resorcinol es estabilizado en solución acuosa por interacciones puente de hidrógeno intermoleculares de cada grupo O^- con dos moléculas de agua.^{47,70} Además, se ha demostrado que C-undecilresorcin[4]areno se encuentra acomplejado con cuatro moléculas de agua en CCl_4 con una geometría donde cada molécula de agua forma parte un anillo de 6

miembros por interacción con dos grupos OH vecinales (Figura 3.21).⁷² La capacidad de los resorcinarenos de formar puentes de hidrógeno intermoleculares también ha sido demostrada por sus interacciones selectivas con alcoholes y con azúcares.⁷³ Por lo tanto, se asume que la intervención del solvente en la estabilización de los poli-aniones de C-alkilresorcin[4]arenos en solución acuosa es crucial.

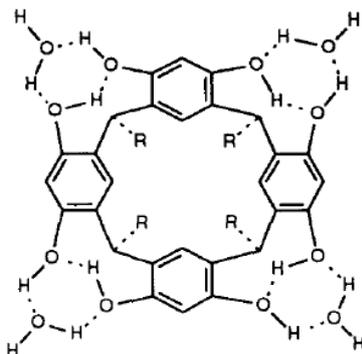


Figura 3.21. Representación del complejo C-undecilresorcin[4]areno:4 H₂O en CCl₄ (R = undecilo). Figura extraída de [52].

La correlación entre los valores de pKa (1) de ambos macrociclos y considerando que los monómeros fenol y resorcinol poseen propiedades ácidas similares evidencia que la estabilización termodinámica de sus mono-fenolatos es comparable como sugiere la ecuación predicha por Grootenhuis *et al.* para calix[4]arenos, $\Delta\Delta G_{\text{total}} = -1,4 \times \Delta pK_a$.⁴² En tanto en los calix[4]arenos se ha establecido que la estabilización resulta de la formación de un puente de hidrogeno bifurcado de tipo HO...O⁻...HO, en el caso de los resorcin[4]arenos, el costo entrópico debido a la re-orientación de una molécula de agua en torno a O⁻ es compensado por la pre-organización de los grupos OH.⁴²

La conformación que permite una mayor interacción entre grupos OH en los calix[4]arenos brinda la estructura tridimensional característica que asemeja la molécula a una copa. El mismo atributo estructural caracteriza a los resorcin[4]arenos. Sin embargo, las distancias efectivas entre átomos de oxígeno hace que la copa sea más abierta y la cavidad menos profunda.⁷⁴ Las distancias promedio entre átomos de oxígeno y de los puentes de hidrogeno son 2,92 Å y 2,06 Å, respectivamente, en los calix[4]arenos;⁷⁴ en tanto que la distancia promedio entre átomos de oxígeno es 2,70 Å en los resorcin[4]arenos.⁷⁵ Asumiendo que las diferencias estructurales entre ambos macrociclos permite que las distancias entre los puentes de hidrógeno sean similares en ambos casos, se asume que las distancias interatómicas en los entornos de los fenóxidos de ambas estructuras y la energía libre resultante de la micro-solvatación son similares, lo cual es justificado por la igualdad en sus valores de pKa (1). El factor entálpico predomina en la estabilización global del mono-fenolato de C4RAH8 con una contribución apreciable provista particularmente por la energía

de solvatación soluto-solvente que no es requerida en el caso de los calix[4]arenos donde la micro-solvatación es intramolecular.^{40,42,45} Si bien los resorcin[4]arenos son más flexibles que los calixarenos,⁹ la química asociada a la disociación del primer protón indica la importancia de las interacciones intramoleculares presentes en ambos ciclofanos y la estabilización del oxianión generado, propiedades permitidas por la pre-organización de los grupos OH.

Las ionizaciones posteriores de C4RAH8 están favorecidas como lo reflejan las constantes de acidez superiores a las del resorcinol. A diferencia de los calix[4]arenos donde la repulsión electrostática desfavorece las ionizaciones subsiguientes, en C4RAH8 los grupos fenóxido están separados por una unidad aromática y a su vez cada uno está estabilizado por la interacción con un grupo OH vecinal y una molécula de agua. En consecuencia, la acidez de C4RAH7⁻ es moderadamente mayor a la de resorcinol (ΔpK_a (3 - 1) ~ 2,2). La diferencia de acidez (ΔpK_a) entre los aniones di-fenolato y tri-fenolato es ~ 0,7 unidades, en tanto para resorcinol y su base conjugada es 1,7 unidades. La diferencia se atribuye a la estabilización particular del tetra-fenolato con disposiciones geométricas ideales de los cuatro grupos fenóxido y las deslocalizaciones de sus cargas.⁵² La estructura propuesta del anión tetra-fenóxido de C-alkilresorcin[4]areno estabilizada por solvatación por interacciones intermoleculares con cuatro moléculas de agua se presenta en la Figura 3.22.^{47,70}

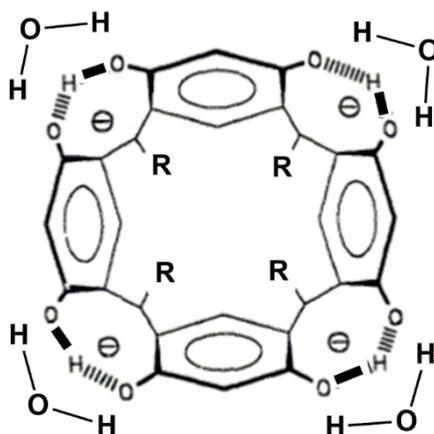


Figura 3.22. Representación de la red de puentes de hidrógeno intra- e intermoleculares sobre el portal superior de un C-alkilresorcin[4]areno tetra-aniónico.

El estudio exhaustivo realizado sobre las propiedades polipróticas de C4RAH8 en medio acuoso empleando 3 bases diferentes (KOH, NaOH y LiOH) y un total de 6 titulaciones (3 potenciométricas y 3 espectrofotométricas) no presenta precedentes bibliográficos hasta el momento de la realización de esta Tesis. El aporte de esta propiedad fundamental contribuye a la comprensión y a la extensión de las aplicaciones de los receptores macrocíclicos resorcin[4]arenos.

3.4.2. Efecto del contra-ión de los hidróxidos alcalinos en los equilibrios ácido-base de C-butirresorcín[4]areno

A partir del análisis de las constantes de ionización de C4RAH8 presentadas en la **Tabla 3.12**, se destaca la independencia de las constantes de acidez determinadas con los hidróxidos alcalinos KOH y NaOH. Este resultado es coherente con la química ácido-base de Brønsted que establece que los contra-iones de las bases están solvatados por el solvente y se mantienen como espectadores durante las reacciones de disociación de hidrógeno. Sin embargo, se observa que cuando LiOH es empleado como titulante, los valores de pKa (2) y pKa (3) obtenidos son distintos. Las diferencias $\Delta pK_a^{Li} - \Delta pK_a^{K,Na}$ obtenidas fueron 0,65 y -0,84 unidades para pKa (2) y pKa (3), respectivamente. Considerando que la fuerza iónica constante no justifica las variaciones registradas dado que se mantuvo constante en todas las titulaciones, los efectos reflejados como una disminución de la acidez del di-fenolato y un aumento de la acidez del tri-fenolato de C4RAH₈, se atribuyen a la naturaleza del contra-ión del hidróxido empleado, Li⁺. La participación del catión Li⁺ y la alteración del comportamiento poliprótico de C4RAH₈ resultante es un proceso que no puede ser explicado simplemente por la teoría de Brønsted.

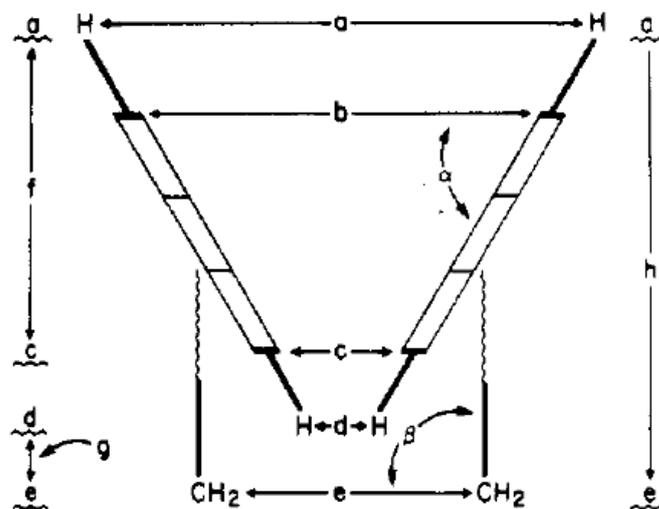
La naturaleza química asociada al catión Li⁺, diferenciada de Na⁺ y K⁺ debido a su menor tamaño le brinda propiedades particulares excepcionales tales como una menor polarizabilidad de su densidad de carga por lo que es considerado un ión duro según la teoría de Lewis, y una esfera de solvatación más rígida traducida en su mayor entalpía de desolvatación. Por otra parte, los cavitados resorcín[4]arenos poseen la capacidad de incluir cationes inorgánicos en sus nanocavidades, tal como lo hacen el p-sulfonatocalix[4]areno con cationes monovalentes como los metales alcalinos.⁷⁶ Por lo tanto, el comportamiento poliprótico de C4RAH₈ dada por sus grupos OH, la posibilidad de estos grupos de actuar como ligandos y la química huésped-receptor inherente a la cavidad posiblemente participen conjuntamente produciendo un comportamiento excepcional de C4RAH₈ frente a LiOH.

En un estudio realizado con tetrametil-C-metilresorcín[4]areno se demostró que entre los cloruros de metales alcalinos evaluados, LiCl, NaCl, KCl y CsCl, sólo NaCl y en mayor medida LiCl produjeron efectos cuantificables sobre la emisión fluorescente del resorcinareno en metanol.⁷⁷ Los parámetros termodinámicos determinados a partir de los cambios espectroscópicos observados reflejaron que la inclusión de los metales de menor radio iónico en la cavidad implica por un lado un reacomodamiento estructural previo del macrociclo para maximizar las interacciones catión- π y además se requiere la conservación de las esferas de solvatación de los iones por las moléculas de metanol para ocupar el volumen de la cavidad. Estas interacciones se traducen en valores positivos de la entropía dado que existe una reducción en la flexibilidad del macrociclo como resultado de la complejación y además las moléculas de solvente no retornan al seno de la solución. No

obstante, los calores liberados favorables como resultado de las interacciones catión- π y entre las moléculas de metanol que solvatan los cationes y los anillos aromáticos (CH- π), favorecen las formaciones de los complejos metal-resorcinareno a través de una compensación entrópico-entálpica ($\Delta G_{Li^+} = -17,27$ kJ/mol; $\Delta G_{Na^+} = -11,69$ kJ/mol). El estudio paralelo con el macrociclo análogo con los grupos OH puenteados (O—CH₂—O) de mayor rigidez estructural y mayor volumen demostró una selectividad invertida con preferencia hacia los cationes de mayor radio iónico K⁺ y Cs⁺ y no demostró interacción por Li⁺ o Na⁺. En este caso, el factor termodinámico que conduce a las estabilizaciones de los complejos metal-resorcinareno puenteados es predominantemente entrópico debido al efecto del solvente implicado en la desolvatación de las moléculas de metanol de los iones K⁺ y Cs⁺ como etapa previa a la inclusión dentro de la nanocavidad. Debido a la energía consumida por la desolvatación, en este caso el término entálpico contribuye en menor medida al proceso global de complejación. La complementación de estos resultados con estudios computacionales demostró que el solvente efectivamente juega un rol fundamental en la estabilización de los complejos metal-resorcinareno.

Las dimensiones de la cavidad de C4RAH8 se representan en la Figura 3.23.⁷⁵ Las características estructurales reportadas de los *clusters* correspondientes a los cationes alcalinos solvatados son Li⁺:4 H₂O; Na⁺:5-6 H₂O y K⁺:5-7 H₂O con distancias promedio O—catión 1,9-2,0 Å, 2,3-2,4 Å y 2,8-2,9 Å, respectivamente.⁷⁸ Considerando que los diámetros iónicos de Li⁺, Na⁺ y K⁺ son 1,36 Å, 1,96 Å y 2,66 Å, respectivamente,⁷⁹ la interacción Li⁺:4 H₂O con C4RAH8 es la más factible debido a que la complementariedad entre las dimensiones estructurales del *cluster* y la cavidad aromática del macrociclo permiten una mayor penetración del sustrato por el portal hidrofílico. La inclusión de K⁺ es posible si pierde su esfera de solvatación; sin embargo, el balance entrópico-entálpico probablemente no favorece la complejación dado que las constantes de acidez se mantienen invariables con KOH. A diferencia del caso tetrametil-C-metilresorcin[4]areno, la sustitución de los átomos de carbono C-2 con grupos metilo proporciona una cavidad de mayor volumen y una altura f mayor (3,81 Å) capaz de incluir parcialmente al catión Na⁺ solvatado.⁷⁷ Sin embargo, la presencia de átomos de H en lugar de CH₃ no proporciona una cavidad aromática con la profundidad suficiente para que la interacción con Na⁺ solvatado sea eficiente. Se concluye que es probable que C4RAH8 solo pueda interactuar con Li⁺ solvatado tal como lo expresan las diferencias en sus constantes de acidez y la complementariedad de los tamaños *cluster*-nanocavidad formando endo-complejos con el catión inmerso en la cavidad aromática. Considerando que en los experimentos de titulación realizados la presencia de Li⁺:4 H₂O afecta las constantes de ionización de C4RAH₆²⁻ y de C4RAH₇³⁻, las interacciones que pueden contribuir a la estabilización de los endo-complejos con estos aniones son predominantemente entálpicas y están dadas por la suma de las interacciones catión- π , aumento de la acidez de Lewis de los anillos aromáticos por la

presencia de los grupos fenólico, compatible con el carácter duro de Li^+ , interacciones puente de hidrógeno entre las moléculas de agua coordinadas al catión y los grupos OH/O^- del macrociclo⁷⁷ e interacciones electrostáticas.



Distancia	C1RAH8	C4RAH8
a, diámetro mayor del portal superior	9,71 Å	9,71 Å
b, diámetro menor del portal superior	8,51 Å	8,51 Å
c, diámetro mayor del portal inferior	5,25 Å	5,22 Å
d, diámetro menor del portal inferior	4,01 Å	4,00 Å
e, diámetro del canal hidrofóbico	7,24 Å	7,14 Å
f, longitud entre portales a y c	3,10 Å	3,10 Å
g, longitud entre portales d y e	0,79 Å	0,84 v
h, longitud entre portales a y e		

Figura 3.23. Dimensiones estructurales de C1RAH8 y C4RAH8.

Otros autores han demostrado que C-alkilresorcin[4]arenos son capaces de interactuar con cationes voluminosos como K^+ y Cs^+ . Sin embargo, tal como sucede con el caso del resorcinareno puenteado publicado por Li et al., en esos casos la interacción está favorecida por la ausencia de una esfera de solvatación que recubra a estos cationes. En un caso, los C-alkilresorcin[4]arenos con cadenas alifáticas de distintas longitudes fueron empleados en experimentos de extracción de cationes alcalinos desde una fase acuosa alcalina a una fase compuesta por benceno. La incapacidad de este solvente para solvatar a los cationes es probable que funcione como la fuerza impulsora para la inclusión de los mismos dentro de la cavidad aromática de los C-alkilresorcin[4]arenos.⁸⁰ Otro estudio reportado demuestra la interacción de C-metilresorcin[4]areno con cationes alcalinos en fase

gaseosa mediante ESI-MS que demostró que la inclusión ocurre de manera selectiva conforme el diámetro iónico aumenta resultando más favorecidos K^+ y Cs^+ .⁸¹ En este caso, la complejación está dirigida puramente por la complementariedad de tamaños catión-cavidad dado que las distancias a , b y f de C-metilresorcín[4]areno son 9,08 Å; 8,25 Å y 3,09 Å, respectivamente⁷⁵ (Figura 3.23) y los cationes Rb^+ y aún más Cs^+ son los que ocupan en mayor medida el volumen de la cavidad y maximizan las interacciones catión- π .⁸¹ Por lo tanto, se concluye que el efecto del solvente cumple un rol clave en la selectividad de C-álquiltrisorcin[4]arenos siendo mayor hacia cationes solvatados de menor diámetro y mayor hacia cationes más voluminosos que no presentan una capa de solvatación.

Asumiendo que los valores de pK_a (2) con KOH y con NaOH son iguales debido a que la disociación del mono-fenolato ocurre sin participación del contraión, la variación de pK_a (2) en presencia de Li^+ implica que existe una interacción entre $C4RAH_7^-$ y Li^+ gobernada por una constante de asociación, K_A . Por lo tanto, la constante de acidez determinada en este caso es aparente, K_a^{ap} .¹⁴

La formación del mono-fenolato de C4RAH8 no está favorecida por la naturaleza del contra-ión, debido a que el valor de pK_a (1) no varía con las distintas bases empleadas. Por lo tanto, la interacción del mono-fenolato con Li^+ solvatado ocurre de manera posterior a la generación del anión y el equilibrio de formación del complejo neutro Li^+ -mono-fenolato está gobernado por la Eq. 5. Posteriormente, un protón del complejo neutro se disocia para generar el complejo mono-aniónico formado por el di-fenolato y Li^+ solvatado (Eq. 6). Por lo tanto, la constante de acidez aparente contempla los equilibrios descritos de manera que $K_a^{ap} = K_A \times K_a^c$ (Eq. 7). Pese a la contribución de K_A , el valor determinado de K_a^{ap} en presencia de Li^+ fue menor a K_a (2) en presencia de Na^+ o K^+ . Por lo tanto se concluye que la acidez del complejo Li^+ -mono-fenolato es menor con respecto al mono-fenolato con su portal hidrofílico libre posiblemente debido a la interacción de los grupos OH/O^- con el *cluster* $Li(H_2O)_4^+$. La inhibición de la acidez del mono-fenolato complejoado refleja la estabilidad termodinámica del mismo, en cambio la acidez del mono-fenolato libre es mayor para adquirir una mayor estabilidad conformacional dada por las estructuras de los poli-aniones superiores. La estabilidad conformacional es compensada por la inclusión del catión en la cavidad aromática.⁷⁷



Posteriormente, la disociación de un protón del di-fenolato complejado genera el tri-fenolato complejado como lo indica Eq. 8 con pK_a^{app} determinada igual a 8,5. El valor de pK_a (3) con otra base es mayor, de manera que la inclusión de Li^+ solvatado por el di-fenolato aumenta su acidez facilitando la generación del tri-fenolato debido a una mayor estabilización conformacional del tri-anión como endo-complejo (Eq. 8).



Koide *et al.* demostró que la capacidad de extracción de metales alcalinos desde una fase acuosa básica a una fase de benceno conteniendo un C-alquilresorcin[4]areno lipofílico aumenta con el incremento del pH, lo cual indica que la interacción electrostática junto a las interacciones catión- π son los factores que más favorecen la complejación. Por lo tanto, se asume que el valor de K_A en solución acuosa es mayor para el complejo formado de Li^+ solvatado formado con el tri-fenolato con respecto al complejo con el di-fenolato. Como consecuencia, la mayor estabilización esperada del endo-complejo tri-fenolato- Li^+ se traduce en una mayor acidez aparente del endo-complejo con di-fenolato.

La contribución electrostática no parece contribuir a la estabilización del tetra-fenolato dado que los valores de pK_a (4) son independientes de la naturaleza del hidróxido alcalino. Este resultado confirma la estabilidad excepcional del tetra-fenolato en el que las interacciones intra- e intermoleculares fijan la configuración del macrociclo, y otras contribuciones como la interacción con sustratos no producen una estabilización extra.

El p-sulfonatocalix[4]reno con sus grupos OH no disociados presenta una afinidad por los metales alcalinos que responde a la complementariedad entre el diámetro iónico y la dimensión de la nanocavidad. Las constantes de asociación obtenidas decrecen en el orden $Li^+ > Na^+ \approx K^+ > Rb^+ > Cs^+$ justificando una contribución catión- π mayor para el complejo con el catión que se encuentra más incluido.⁷⁶ El valor de ΔG (298 K) obtenido para la complejación de Na^+ y Li^+ con p-sulfonatocalix[4]areno fue $-10,13$ kJ/mol y $-11,17$ kJ/mol, respectivamente (agua, pH = 2), mientras que para 2-metil-C-metilresorcin[4]areno fue $-11,69$ kJ/mol y $-17,27$ kJ/mol, respectivamente (MeOH). La pequeña diferencia en los valores refleja que la interacción que estabiliza ambos complejos es fundamentalmente la misma, catión- π , y su eficiencia depende de la complementariedad de tamaños entre la cavidad y el catión. A partir de estos resultado se puede aproximar que la constante de asociación entre las especies Li^+ y $C4RAH_6^{2-}$ es ~ 17 kJ/mol y, asumiendo que existe una contribución electrostática en la interacción con el tri-anión, en este caso se espera que K_A sea mayor.

3.4.3. Efecto de la longitud de la cadena alquílica sobre el comportamiento poliprótico de C-alquilresorcin[4]arenos

En la Tabla 3.13 se resumen los valores de las constantes de ionización de C1RAH₈, C4RAH₈ y C7RAH₈ obtenidas mediante titulaciones potenciométrica y espectrofotométrica con NaOH en 2% v/v MeOH/H₂O.

Tabla 3.13. Constantes de ionización de C-alquilresorcin[4]arenos determinadas mediante titulaciones potenciométrica (P) y espectrofotométrica (UV) en 2% v/v MeOH/H₂O con NaOH.

		C1RAH ₈	C4RAH ₈	C7RAH ₈ ^a
<i>pK_a</i> (1)	P	3,0 ± 0,3	3,1 ± 0,2	—
	UV	—	3,5 ± 0,6	2,3 ± 0,3
<i>pK_a</i> (2)	P	6,5 ± 0,3	7,2 ± 0,2	—
	UV	—	6,9 ± 0,2	7,1 ± 0,3
<i>pK_a</i> (3)	P	—	—	—
	UV	8,3 ± 0,2	9,9 ± 0,2	10,5 ± 0,2
<i>pK_a</i> (4)	P	~ 10,5*	10,0 ± 0,3*	—
	UV	10,68 ± 0,08	10,6 ± 0,2	No observado

^a Los valores de *pK_a* (n) sólo se determinaron mediante espectrofotometría UV.

* La constante determinada engloba a *pK_a* (3) y (4).

La primera ionización de C1RAH₈ y de C4RAH₈ ocurre a igual pH, en tanto que C7RAH₈ es desprotonado por NaOH en condiciones levemente más ácidas. Tunstad *et al.* demostró mediante rayos X que la estructura de C1RAH₈ presenta una configuración más similar al isómero bote, mientras que la estructura de C4RAH₈ se asemeja más al isómero cono.⁷⁵ La diferencia se debe a efecto de los sustituyentes, los cuales al ser metilo en C1RAH₈ permiten una mayor flexibilidad del macrociclo, mientras que los sustituyentes butilo en C4RAH₈ establecen interacciones de van der Waals entre sí y fijan la conformación cono de manera más favorable. Por lo tanto, es posible que la flexibilidad inherente de C1RAH₈ le permita acomodar de mejor manera al catión Na⁺ comparado con C4RAH₈ y C7RAH₈ cuya rigidez estructural de ambos macrociclos impide la interacción con el catión. Como consecuencia, Na⁺ puede inducir la ionización de C1RAH₈. El efecto de la reorganización conformacional de resorcin[4]arenos y su efecto sobre desprotonación ha sido evidenciada por Schneider *et al.*⁵⁵

Durante las titulaciones espectrofotométricas de todos los resorcin[4]arenos se observó la aparición de una banda transitoria alrededor de 350 nm. En el caso de C1RAH8, esta banda aparece a pH = 8,36 (Figura 3.18), mientras que para C4RAH8 se registra a pH = 9,66 (Figura 3.9) y para C7RAH8 alcanza su máxima amplitud a pH = 11,67 (Figura 3.19). Los espectros de absorción de C4RAH8 relacionados con esta banda indicaron que su aparición está asociada a la formación del tri-fenolato y el punto isosbético a 311,0 nm corresponde al incremento de la señal correspondiente al C4RAH₄⁴⁻ y al consumo del tri-fenolato, indicado por la desaparición de la banda a 350 nm. Mustafina *et al.* advirtió la aparición de esta banda durante la titulación espectrofotométrica de C7RA con KOH en 80% v/v DMF/H₂O cuya intensidad aumentó con el pH.⁸² Las adiciones de CsClO₄ o R₄NI (R = etilo, butilo) a soluciones neutras de C7RAH₈ también exhibieron la formación de la banda a 350 nm, la cual se asoció a la formación de un complejo entre Cs⁺ o R₄⁺ con C7RAH₈ y, debido a su localización a una longitud de onda mayor como consecuencia de las transiciones n- π , se concluyó que la complejación induce la expulsión de protones.⁸² Asumiendo que los cationes voluminosos como los evaluados por Mustafina y los iones Na⁺ y K⁺ empleados con C4RAH8 no interactúan con el portal hidrofílico mayor del macrociclo según las conclusiones arribadas en el inciso 3.4.2., se supone que las interacciones pueden ocurrir con el portal hidrofóbico sustituido con las cadenas alifáticas y las diferencias registradas en la aparición de la banda a distintos valores de pH es un indicio de una interacción selectiva con el portal hidrofóbico según la naturaleza alquílica de los sustituyentes. Dado que en solución acuosa la banda a 350 nm está asociada al tri-fenolato, se concluye que la interacción con esta especie es específica.

Los resorcinarenos son descritos como cavitandos ditópicos al incorporar una región hidrofóbica en la región opuesta al portal de carácter más polar formada por los anillos aromáticos y los grupos OH.⁷⁴ Por lo tanto, la naturaleza electrónica, su solubilidad en el medio, etc., pueden afectar su interacción con un determinado sustrato por el borde superior polar hidrofílico o canal hidrofóbico formado por los sustituyentes alquílicos. Por ejemplo, los resorcinarenos son conocidos por la formación de canales iónicos debido al entrecruzamiento de los colas hidrofóbicas, tal como se comportan los lípidos⁵⁹ (Figura 3.24) y la forma en la que cristalizan los resorcinarenos evidencia estructuras por rayos X con disposiciones cola-cola con sus cadenas alquílicas entrecruzadas.⁵ Además, las interacciones de van der Waals entre los sustituyentes hidrocarbonados pueden afectar la flexibilidad del macrociclo y modificar las dimensiones del portal mayor, modificándose en consecuencia la selectividad hacia ciertos sustratos. C1RAH₈, considerado como el resorcin[4]areno más simple, es el que posee la mayor flexibilidad debido a la menor interacción entre los sustituyentes metilo.⁷⁵

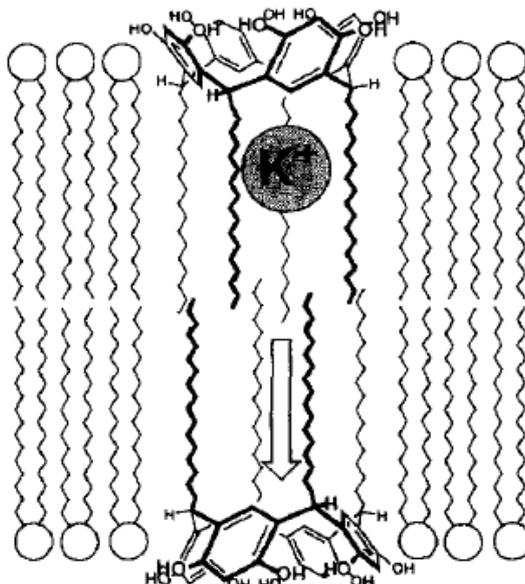


Figura 3.24. Representación de una bicapa lipídica con un canal iónico formado por dos moléculas auto-ensambladas de C-alkilresorcin[4]areno lipofílico.⁵⁹

La interacción de C4RAH₈ frente a Li⁺ se justifica por la afinidad del catión pequeño solvatado por el portal hidrofílico y la cavidad aromática, mientras que los cationes más voluminosos e incluso Li⁺ también pueden interactuar con el micro-ambiente generado por los sustituyentes del portal menor. En la comparación presentada en la **Tabla 3.13**, el catión involucrado Na⁺ presenta interacciones distintas con los sustituyentes alquílicos unidos a la cavidad de cada macrociclo y el efecto ditópico queda evidenciado por las alteraciones en las constantes de ionización. Mientras que la dimensión del catión solvatado es el factor determinante para la existencia de una interacción con el portal hidrofílico,⁷⁷ la complementariedad entre el diámetro del portal hidrofóbico y Na⁺ solvatado es la condición que limita la interacción. La desolvatación del catión es necesaria si el diámetro del catión solvatado es mayor al diámetro del portal.⁸³

Las dimensiones del canal hidrofóbico poseen un diámetro que no varía de manera significativa según la naturaleza alquílica (Figura 3.23). Por lo tanto, el diámetro del canal de C7RAH₈ debe ser similar al reportado para C4RAH₈.⁷⁵ La variación estructural predominante está gobernada por la longitud del canal.

El *cluster* Na⁺:5-6 H₂O posee distancias promedio O—catión iguales a 2,3-2,4 Å.⁷⁸ Considerando que el diámetro iónico de Na⁺ es 1,96 Å,⁷⁹ la interacción del catión solvatado con el canal hidrofóbico de los C-alkilresorcin[4]arenos es posible. En particular, la mayor movilidad conformacional de C1RAH₈ permite la interacción de Na⁺ por ambos portales, lo cual también podría justificar la acidez mayor encontrada de pKa (2) y pKa (3) con respecto a los otros resorcin[4]arenos. La formación del complejo C1RAH₅³⁻-Na⁺ es evidenciada por

la aparición de la banda a 350 nm a pH = 8,36, mientras que la interacción C4RAH₅³⁻-Na⁺ se manifiesta a pH = 9,66. El caso de C7RAH8 es particularmente inusual dado que a pH = 11,87 la banda asociada al complejo aún está presente indicando que la formación del tetra-fenolato en este caso ocurre en condiciones aún más básicas que las reportadas para C1RAH8 y C4RAH8 y ello se adjudica a la mayor estabilización del tri-fenolato de C7RAH8 complejoado con Na⁺. Resulta evidente que la elongación de la cadena alquílica favorece la interacción del el catión con el portal hidrofóbico. En estudios realizados por otros autores⁸³ se ha sugerido que C-alquilresorcin[4]arenos con cadenas más largas forman bicapas más estables. Ello se asocia a interacciones más efectivas entre las cadenas alifáticas y la formación de canales hidrofóbicos más estructurados. Coincidentemente, la titulación espectrofotométrica de C7RAH8 refleja una estabilización en solución acuosa del tri-fenolato en presencia de Na⁺.

Finalmente, la igualdad en los valores de pKa (4) de C1RAH8 y C4RAH8 indica que formación del tetra-anión ocurre a igual valor de pH en ambos casos y la estabilidad del tetra-fenolato gobierna su formación.

El comportamiento de macrociclos como poros iónicos ha sido demostrada anteriormente con p-t-butilcalix[4]areno-tetraamida que permite el pasaje de K⁺, pero no de un catión más voluminoso como Cs⁺.⁸⁴ Los resultados obtenidos pueden significar un aporte para la aplicación de membranas bicapa compuestas por C-alquilresorcin[4]arenos para el transporte selectivo de iones.^{63,83,85}

3.5. CONCLUSIONES

✚ El comportamiento poliprótico de C-alquilresorcin[4]arenos con cadenas alifáticas de hasta 7 átomos de carbono puede ser estudiado en medios fundamentalmente acuosos (2% v/v de MeOH como cosolvente) sin limitaciones por la solubilidad mediante la aplicación conjunta de potenciometría y espectrofotometría UV-visible.

✚ Las primera ionización de C1RA, C4RA y C7RA para generar el mono-fenolato correspondiente ocurre en condiciones muy ácidas (pH ~ 3) y este comportamiento se asemeja al de los calix[4]arenos. A pH>10, tanto C1RA como C4RA se encuentran en solución como tetra-fenolato y la acidez de ambos macrociclos es superior comparado con resorcinol.

✚ Con un comportamiento distinto, C7RA se encuentra como tri-fenolato incluso en condiciones muy básicas (con NaOH) y la formación del tetra-fenolato no fue evidenciada mediante espectrofotometría UV.

✚ En medio acuoso, sólo $\text{Li}(\text{H}_2\text{O})_4^+$ interacciona con el portal hidrofílico de C4RA, mientras que los cationes solvatados Na^+ y K^+ no lo hacen, y la complejación afecta las ionizaciones del di-fenolato y del tri-fenolato.

✚ El catión del hidróxido alcalino empleado como titulante (Li^+ , Na^+ , K^+) se compleja selectivamente con los tri-fenolatos de C-*alquilresorc*in[4]areno mediante interacciones con los sustituyentes alquílicos y el fenómeno fue evidenciado por la aparición de una banda de absorción UV transitoria a ~ 350 nm.

✚ La interacción de Na^+ ocurre de manera selectiva con el canal hidrofóbico de mayor longitud (C7RAH₈) y como consecuencia la ionización del tri-fenolato resulta inhibida, mientras que este fenómeno no ocurre con C1RAH₈ y C4RAH₈.

3.6. SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.6.1. Instrumentos

Las mediciones de pH se realizaron con un pH-metro Thermo Orion 720A equipado con un electrodo combinado Orion con sistema Ross a 25,0 °C. Previamente el equipo se calibró a la temperatura de trabajo usando las siguientes soluciones *buffer* estándar preparadas según el procedimiento descrito:⁴³ ftalato ácido de potasio a pH = 4,01; fosfato monobásico de sodio a pH = 6,99 y borato de sodio a pH = 9,16. La precisión del pH-metro fue 0,001 y la exactitud asociada a las lecturas fue $\pm 0,05$.

Los espectros de absorción UV-visible se obtuvieron empleando un espectrofotómetro Shimadzu equipado con un porta-celda para dos muestras conectado a un baño termostático con circulación Haake a 25,0 °C. La línea de base empleada en todos los casos corresponde a agua.

Los datos adquiridos se procesaron empleando los graficadores OriginPro 2016 y SigmaPlot versión 12.0 (2011).

3.6.2. Reactivos

El macrociclo C-*metilresorc*in[4]areno (C1RAH₈) fue adquirido de la empresa Aldrich y se utilizó sin previa purificación. Los compuestos C-*butilresorc*in[4]areno (C4RAH₈) y C-*heptilresorc*in[4]areno (C7RAH₈) se sintetizaron y purificaron de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección experimental, Capítulo 2.

Las soluciones de HCl empleadas se prepararon por dilución de HCl comercial 37% p/p (Anedra) con agua. Las soluciones de los hidróxidos alcalinos (calidad analítica) se

obtuvieron por disolución en agua de LiOH, NaOH y KOH. Las mismas se dejaron decantar y de cada una se recuperó el sobrenadante que posteriormente se diluyó en agua.

Los solventes empleados fueron: agua de calidad Milli-Q, deionizada, obtenida de un purificador Millipore y metanol (Sintorgan) de grado HPLC. Soluciones acuosas de LiCl, NaCl y KCl de concentraciones adecuadas se emplearon como reguladoras de la fuerza iónica.

3.6.3. Procedimientos

3.6.3.1. Preparación de las soluciones

Las soluciones madre de los C-alkilresorcin[4]arenos se prepararon por disolución del sólido en metanol y fueron empleadas durante el día de su preparado. Las concentraciones de las soluciones se determinaron empleando las curvas de calibración correspondientes mediante espectrofotometría UV-visible (Sección experimental, Capítulo 2).

La estandarización de la solución de HCl se efectuó mediante titulación potenciométrica (por duplicado) empleando borato de sodio como patrón primario. Posteriormente, la solución estandarizada de HCl se empleó para titular por potenciometría (por duplicado) las soluciones de los hidróxidos alcalinos.

A partir de las soluciones de concentración conocida de los C-alkilresorcin[4]arenos, HCl, XOH y XCl (X = Li, Na, K), se prepararon soluciones por adiciones de alícuotas constantes de CRA y HCl y alícuotas variables de XOH de manera de obtener soluciones acuosas con valores de pH diferentes. La fuerza iónica se mantuvo constante por adición de XCl. El solvente de las soluciones fue 2% v/v MeOH/H₂O.

3.6.3.2. Titraciones potenciométricas

La medición del pH de cada solución preparada se graficó en función del volumen de XOH empleado. Los valores de las constantes de ionización pK_a (n) se obtuvieron empleando las ecuaciones 3.8 y 3.10. Las incertezas asociadas a pK_a (n) están dadas por la incertezas de V_{PF} (n), las cuales se determinaron por propagación de errores según las ecuaciones

$$\Delta V_{PF} = \Delta V_{PF}^+ + \Delta V_{PF}^- \quad (3.9)$$

$$\Delta V_{PF}^{+/-} = V_{PF} \left(\frac{\Delta V_{matraz}}{V} + \frac{\Delta [CnRA]}{[CnRA]} + \frac{\Delta V_{OH}}{V_{OH}} \right) \quad (3.10)$$

donde la incertezas de V_{PF} (ΔV_{PF}) está dada por las propagaciones de los errores en el preparado de las soluciones anterior (ΔV_{PF}^-) y posterior (ΔV_{PF}^+) al punto final de titulación y las mediciones de sus valores de pH.

3.6.3.3. Titulaciones espectrofotométricas

El espectro de absorción de cada solución preparada fue registrado posterior a la medición del pH. Los valores de absorbancia a las longitudes de onda a las cuales ocurrieron los mayores cambios espectrales se graficaron en función del pH, obteniéndose las curvas de titulaciones espectrofotométricas. Los valores de $pK_a(n)$ y sus incertezas se determinaron a partir de la regresión sigmoideal (Ec. 3.7) obtenida mediante el programa SigmaPlot versión 12.0.

3.7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Oshovsky, G. V.; Reinhoudt, D. N.; Verboom, W. Supramolecular Chemistry in Water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (14), 2366.
- (2) Ramaiah, D.; Neelakandan, P. P.; Nair, A. K.; Avirah, R. R. Functional Cyclophanes: Promising Hosts for Optical Biomolecular Recognition. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (11), 4158.
- (3) Mokhtari, B.; Pourabdollah, K. Review: Medical Applications of Nano-Baskets. *J. Coord. Chem.* **2011**, *64*, 3189.
- (4) Lüning, U. Acid-Base Behaviour in Macrocycles and Other Concave Structures. In *Advances in physical organic chemistry*; Academic Press: London; San Diego, 1995; Vol. 30.
- (5) M. Pietraszkiewicz; M. Pietraszkiewicz; E. Uzig; P. Prus; Z. Brzózka; K. Woźniak; R. Bilewicz; T. Borowiak; M. Mączyński. Recent Advances in Calix[4]resorcinarene Chemistry. *Chem. Comput. Simul. Butlerov Commun.* **2000**, *3*, 55.
- (6) Mokhtari, B.; Pourabdollah, K.; Dalali, N. Analytical Applications of Calixarenes from 2005 up-to-Date. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2011**, *69*, 1.
- (7) Arora, V.; Chawla, H. M.; Singh, S. P. Calixarenes as Sensor Materials for Recognition and Separation of Metal Ion. *Sep. Sci. Technol.* **2007**, No. ii, 172.
- (8) Hoskins, C.; Curtis, A. D. M. Simple Calix[n]arenes and Calix[4]resorcinarenes as Drug Solubilizing Agents. *J Nanomed Res* **2015**, *2* (3).
- (9) Sliwa, W.; Kozłowski, C. *Calixarenes and Resorcinarenes: Synthesis, Properties and Applications*; Wiley-VCH Verlag & Co.: Weinheim, 2009.
- (10) Casnati, A.; Sciotto, D.; Arena, G. Water-Soluble Calixarenes. In *Calixarenes 2001*; Springer, 2001; pp 440–456.
- (11) Agrawal, R. N.; Patadia, Y. K. Studies on Resorcinarenes and Their Analytical Applications. *Rev. Anal. Chem.* **2006**, *25* (3), 155.
- (12) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Reido Unido, 2009.

- (13) Varshey, D. B.; Sander, J. R. G.; Frišćić, T.; MacGillivray, L. R. Supramolecular Interactions. In *Supramolecular Chemistry: from molecules to nanomaterials*; Gale, P. A., Steed, J. W., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 2012.
- (14) Araki, K.; Iwamoto, K.; Shinkai, S.; Matsuda, T. "pKa" of Calixarenes and Analogs in Nonaqueous Solvents. *Bull Chem Soc Jpn* **1990**, No. 63, 3480.
- (15) Influence of Solute–Solvent Interaction on Acid Strength of Some Substituted Phenols in Ethanol–Water Media. *J Solut. Chem* **2013**, *42*, 1691.
- (16) Gutsche, C. D. *Calixarenes: An Introduction*, 2nd ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2008.
- (17) Barcza, L.; Buvári-Barcza, Á. Acid-Base Titrations in Nonaqueous Solvents and Solvent Mixtures. *J. Chem. Educ.* **2003**, *80* (7), 822.
- (18) Sayadian, M.; Farajtabar, A. Deprotonation of Para-Sulphonatocalix[4]arene in Water–methanol Mixtures. *Phys. Chem. Liq.* **2013**, *51* (4), 447.
- (19) Shinkai, S.; Araki, K.; Grootenhuis, P. D. J.; Reinhoudt, D. N. pKa Determination of Water-Soluble Calix[4]arenes. *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1991**, 2 (12), 1883.
- (20) Nachtigall, F. F.; Lazzarotto, M.; Nome, F. Interaction of Calix [4] Arene and Aliphatic Amines: A Combined NMR, Spectrophotometric and Conductimetric Investigation. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13* (3), 295.
- (21) Gutsche, C. D. Chapter 3. Proving the Baskets: The Characterization and Properties of Calixarenes. In *Calixarenes: An Introduction*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2008; pp 61–76.
- (22) Rebek, J. *Hydrogen-Bonded Capsules: Molecular Behavior in Small Spaces*; World Scientific, 2015.
- (23) Afkhami, A.; Khalafi, L. Spectrophotometric Determination of Conditional Acidity Constant as a Function of β -Cyclodextrin Concentration for Some Organic Acids Using Rank Annihilation Factor Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *569* (1), 267.
- (24) Bakirci, H.; Koner, A. L.; Schwarzlose, T.; Nau, W. M. Analysis of Host-Assisted Guest Protonation Exemplified for P-Sulfonatocalix[4]arene—Towards Enzyme-Mimetic pKa Shifts. *Chem. – Eur. J.* **2006**, *12*, 4799.
- (25) Szente, L.; Szemán, J. Cyclodextrins in Analytical Chemistry: Host–Guest Type Molecular Recognition. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8024.
- (26) Galian, R. E.; Veglia, A. V.; de Rossi, R. H. Cyclodextrin Enhanced Fluorimetric Method for the Determination of Tryptamine. *Analyst* **1998**, *123* (7), 1587.
- (27) Galian, R. E.; Bracamonte, A. G.; Veglia, A. V. Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Effect on the Fluorescence of Auxin and Skatole and on the Simultaneous Determination of Binary Mixtures of Indole Compounds in Urine by First Derivative Spectrofluorimetry. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *540* (2), 393.
- (28) Bracamonte, A. G.; Veglia, A. V. Cyclodextrins Nanocavities Effects on Basic and Acid Fluorescence Quenching of Hydroxy-Indoles. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2013**, *261*, 20.
- (29) Wyman, I. W. Química Huésped-Receptor Entre Cucurbit[7]urilo Y Huéspedes Neutros Y Catiónicos. Tesis Doctoral, Universidad de Queen: Ontario, Canadá, 2010.

- (30) Carvalho, C. P.; Uzunova, V. D.; Silva, J. P. D.; Nau, W. M.; Pischel, U. A. Photoinduced pH Jump Applied to Drug Release from cucurbit[7]uril. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (31), 8793.
- (31) Kazakova, E. K.; Ziganshina, A. U.; Muslinkina, L. A.; Morozova, J. E.; Makarova, N. A.; Mustafina, A. R.; Habicher, W. D. The Complexation Properties of the Water-Soluble Tetrasulfonatomethylcalix[4]resorcinarene toward α -Aminoacids. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, 43, 65.
- (32) Kubinyi, M.; Brátán, J.; Grofcsik, A.; Biczók, L.; Poór, B.; Bitter, I.; Grün, A.; Bogáti, B.; Tóth, K. Proton Transfer and Supramolecular Complex Formation between Nile Blue and tetraundecylcalix[4]resorcinarene - a Fluorescence Spectroscopic Study. *J Chem Soc Perkin Trans 2* **2002**, 2, 1784.
- (33) Marciniak, B.; Kozubek, H.; Paszyc, S. Estimation of pKa* in the First Excited Singlet State. A Physical Chemistry Experiment That Explores Acid-Base Properties in the Excited State. *J. Chem. Educ.* **1992**, 69 (3), 247.
- (34) Sueldo Ocello, V. N. Efecto de Cucurbiturilos En Las Propiedades Físicoquímicas de Compuestos Orgánicos. Aplicaciones Analíticas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba, Argentina, 2011.
- (35) Atwood, J. L.; Steed, J. W. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, 1 edition.; CRC Press: New York, 2004.
- (36) Saleh, N.; Koner, A. L.; Nau, W. M. Activation and Stabilization of Drugs by Supramolecular pKa Shifts: Drug-Delivery Applications Tailored for Cucurbiturils. *Angew. Chem.* **2008**, 47, 5398.
- (37) Böhmer, V. Calixarenes, Macrocycles with (Almost) Unlimited Possibilities. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 713.
- (38) V.K. Jain; P.H. Kanaiya. Chemistry of calix[4]resorcinarenes. *Russ. Chem. Rev.* **2011**, 80 (1), 75.
- (39) Hoskins, C.; Papachristou, A.; Ho, T. M. H.; Hine, J.; Curtis, A. Investigation into Drug Solubilisation Potential of Sulfonated Calix (4) Resorcinarenes. *J Nanomed Nanotechnol* **2016**, 7 (370), 2.
- (40) Yoshida, I.; Yamamoto, N.; Sagara, F.; Ishii, D.; Ueno, K.; Shinkai, S. Re-Evaluation of the Acid Dissociation Constants of the Hydroxyl Groups in Tetrasodium 25,26,27,28-Tetrahydroxycalix[4]arene-5,11,17,23-Tetrasulfonate. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, 65 (4), 1012.
- (41) Gutsche, D. C.; Bauer, L. J. Calixarenes. 13. The Conformational Properties of Calix[4]arenes, Calix[6]arenes, Calix[8]arenes, and Oxacalixarenes. *J Am Chem Soc* **1985**, 107, 6052.
- (42) Grootenhuis, P. D.; Kollman, P. A.; Groenen, L. C.; Reinhoudt, D. N.; Van Hummel, G. J.; Ugozzoli, F.; Andreetti, G. D. Computational Study of the Structural, Energetic, and Acid-Base Properties of Calix [4] Arenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112 (11), 4165.
- (43) Lide, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 85th ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, EE.UU., 2005.
- (44) Miñambres, G. G.; Jaques, T. S.; Veglia, A. V.; Lazzarotto, M.; Nachtigall, F. F. Counter-Ion and Solvent Effects on the Acidity of calix[4]arene and Para-Tert-butylcalix[6]arene. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2015**, 81 (3–4), 311.

- (45) Cunningham, I. D.; Woolfall, M. Deprotonation of Calixarenes in Acetonitrile. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9248.
- (46) Miñambres, G. G. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba, Argentina, 2014.
- (47) Cunningham, I. D.; Bhaila, K.; Povey, D. C. Computational Calculation of Absolute Aqueous pKa Values for Phenols. *Comput. Theor. Chem.* **2013**, *1019*, 55.
- (48) Arena, G.; Cali, R.; Lombardo, G. G.; Rizzarelli, E.; Sciotto, D.; Ungaro, R.; Casnati, A. Water Soluble calix[4]arenes. A Thermodynamic Investigation of Proton Complex Formation. *Supramol. Chem.* **1992**, *1* (1), 19.
- (49) Shinkai, S.; Araki, K.; Koreishi, H.; Tsubaki, T.; Manabe, O. On the Acidity of the Hydroxyl Groups in Calix[4]arenes and the Dissociation-Dependent Conformational Change. *Chem. Lett.* **1986**, *15* (8), 1351.
- (50) Faraji, M.; Farajtabar, A.; Gharib, F. Ionic Strength Effect on the Deprotonation of Para-Sulfonatocalix[4]arene. *J. Serbian Chem. Soc.* **2013**, *78* (5), 681.
- (51) Schneider D.; Schneider, U., H. J. ..Güttes. Host-Guest Complexes with Water-Soluble Macrocyclic Polyphenolates Including Induced Fit and Simple Elements of a Proton Pump. *J Am Chem Soc* **1988**, *110* (19).
- (52) Timmerman, P.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. Resorcinarenes. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2663.
- (53) Kazakova, E. K.; Makarova, N. A.; Ziganshina, A. U.; Muslinkina, L. A.; Muslinkin, A. A.; Habicher, W. D. Novel Water-Soluble tetrasulfonatomethylcalix[4]resorcinarenes. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 10111.
- (54) Mustafina, A. R.; Amirov, R. R.; Elistratova, Y. G.; Skripacheva, V. V.; Nugaeva, Z. T.; Kazakova, E. K. Solubility, Acid-Base and Complexation Properties of Calix [4] Resorcinarene in Aqueous Solutions of Nonionic Surfactants. *Colloid J.* **2002**, *64* (6), 734.
- (55) H.-J. Schneider; U. Schneider. The Host-Guest Chemistry of Resorcinarenes [1]. In *Calixarenes 50th Anniversary: Commemorative Issue*; Springer Netherlands, 1994; pp 67–83.
- (56) Abis, L.; Dalcanale, E.; Spera, S.; others. Nuclear Magnetic Resonance Elucidation of Ring-Inversion Processes in Macrocyclic Octaols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, No. 12, 2075.
- (57) Mustafina, A. R.; Skripacheva, V. V.; Yelistratova, Y. G.; Kazakova, E. K.; Pod, S. N.; Katayev, V. E.; Kononov, A. I. Complexation of Cobalt (III)-Containing Complex Monocations with calix[4]resorcinarenes in Alkaline Water-methanolic Media. *Mendeleev Commun* **1998**, *8* (2), 71.
- (58) Mustafina, A. R.; Fedorenko, S. V.; Makarova, N. A.; Kazakova, E. K.; Bazhanova, Z. G.; Kataev, V. E.; Kononov, A. I. The Inclusion Properties of a New Watersoluble Sulfonated Calix[4]resorcinarene towards Alkylammonium and N-Methylpyridinium Cations. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *40*, 73.
- (59) Chen, W.-H.; Nishikawa, M.; Tan, S.-D.; Yamamura, M.; Satake, A.; Kobuke, Y. Tetracyanoresorcin[4]arene Ion Channel Shows pH Dependent Conductivity Change. *Chem Commun* **2004**, No. 7, 872.

- (60) Perrin, D. D.; Dempsey, B.; Serjeant, E. P. *pKa Prediction for Organic Acids and Bases*, 1st ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, Holanda, 1981.
- (61) Mustafina, A. R.; Skripacheva, V. V.; Gubaidullin, A. T.; Kononov, A. I. Structural and Thermodynamic Aspects of Complexation of a Calix [4] Resorcinarene with Diverse Cations in Water-Organic Media. *J. Struct. Chem.* **2005**, *46* (1), S76.
- (62) Mustafina, A. R.; Elistratova, Y. G.; Amirov, R. R.; Gruner, M.; Kononov, A. I.; Habicher, W. D. Solubilization and Acidic and Receptor Properties of Calix [4] Resorcinarenes in Aqueous Solutions of Oxyethylated Dodecanol Brij-35. *Russ. Chem. Bull.* **2005**, *54* (2), 383.
- (63) Tan, S.-D.; Chen, W.-H.; Satake, A.; Wang, B.; Xu, Z.-L.; Kobuke, Y. Tetracyanoresorcin[4]arene as a pH Dependent Artificial Acetylcholine Receptor. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* (19), 2719.
- (64) Botta, B.; Cassani, M.; D'Acquarica, I.; Misiti, D.; Subissati, D.; Monache, G. D. Resorcarenes: Emerging Class of Macrocyclic Receptors. *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9* (4), 337.
- (65) Li, N.; Harrison, R. G.; Lamb, J. D. Application of Resorcinarene Derivatives in Chemical Separations. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2013**, *78*, 39.
- (66) Morozova, J. E.; Kazakova, E. K.; Mironova, D. A.; Shalaeva, Y. V.; Syakaev, V. V.; Makarova, N. A.; Kononov, A. I. Investigation of Tetramethylenesulfonated calix[4]resorcinarene Interactions with Azo Dyes in Aqueous Solution. *J Phys Chem B* **2010**, *114* (41), 13152.
- (67) Zakharova, L. Y.; Kononov, a. I. Supramolecular Systems Based on Cationic Surfactants and Amphiphilic Macrocycles. *Colloid J.* **2012**, *74* (2), 194.
- (68) Heltunen, K.; Shahgaldian, P. Self-Assembly of Amphiphilic Calixarenes and Resorcinarenes in Water. *New J Chem* **2010**, *34* (12), 2704.
- (69) Vinodh, M.; Alipour, F. H.; Mohamad, A. a; Al-Azemi, T. F. Molecular Assemblies of Porphyrins and Macrocyclic Receptors: Recent Developments in Their Synthesis and Applications. *Molecules* **2012**, *17* (10), 11763.
- (70) Blanco, S. E.; Almandoz, M. C.; Ferretti, F. H. Determination of the Overlapping pKa Values of Resorcinol Using UV-Visible Spectroscopy and DFT Methods. *Spectrochim. Acta - Part Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, *61*, 93.
- (71) Polster, J.; Lachmann, H. *Spectrometric Titrations: Analysis of Chemical Equilibria*; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim; Basel (Switzerland); Cambridge; New York, NY, 1989.
- (72) Tanaka, Y.; Aoyama, Y. ¹H NMR Characterization of the Hydrogen-Bond Network in the Water Complex of Resorcinol-Dodecanal Cyclotetramer. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63* (11), 3343.
- (73) Tanaka, Y.; Ubukata, Y.; Aoyama, Y. Selective Sugar Binding with a Synthetic Polyhydroxy Macrocyclic. A Remarkable Selectivity for Fructose over Glucose. *Chem. Lett.* **1989**, *11*, 1905.
- (74) Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, K. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry: From Supramolecules to Nanotechnology*; John Wiley & Sons: Inglaterra, 2007.

- (75) Tunstad, L. M.; Tucker, J. A.; Dalcanale, E.; Weiser, J.; Bryant, J. A.; Sherman, J. C.; Helgeson, R. C.; Knobler, C. B.; Cram, D. J. Host-Guest Complexation. 48. Octol Building Blocks for Cavitands and Carcerands. *J Org Chem* **1989**, *54* (6), 1305.
- (76) Osouledini, N.; Gharib, F.; Zare, K. Complexation of Alkali Metal Cations by P-Sulfonato Calix (4) Arene in Aqueous Solution. **2009**.
- (77) Li, Y.; Csók, Z.; Kollár, L.; Iwata, K.; Szász, E.; Kunsági-Máté, S. The Role of the Solvation Shell Decomposition of Alkali Metal Ions in Their Selective Complexation by Resorcinarene and Its Cavitand. *Supramol. Chem.* **2012**, *24* (6), 374.
- (78) Kistenmacher, H.; Popkie, H.; Clementi, E. Study of the Structure of Molecular Complexes. VIII. Small Clusters of Water Molecules Surrounding Li⁺, Na⁺, K⁺, F⁻, and Cl⁻ Ions. *J. Chem. Phys.* **1974**, *61* (3), 799.
- (79) Williams, S. M.; Brodbelt, J. S.; Bartsch, R. A. Evaluation of Alkali and Alkaline Earth Metal Cation Selectivities of Lariat Ether Amides by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14* (11), 1215.
- (80) Koide, Y.; Oka, T.; Imamura, A.; Shosenji, H.; Yamada, K. Studies of Collectors. XIII. The Selective Flotation of Cesium Ion with Resorcinol-Type Calix[4]arenes with Alkyl Side Chains. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66* (8), 2137.
- (81) Mäkinen, M.; Vainiotalo, P.; Rissanen, K. Alkali Metal Mediated Resorcaren Capsules: An ESI-FTICRMS Study on Gas-Phase Structure and Cation Binding of Tetraethyl Resorcaren and Its per-Methylated Derivative. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13* (7), 851.
- (82) Mustafina, A. R.; Galimov, R. R.; Ermolaeva, L. V.; Sarvarova, N. N.; Burilov, A. R.; Reznik, V. S. Intermolecular Interactions of Tetraanions of Macrocyclic Tetraresorcinol in H₂O—DMF Solutions. *Russ. Chem. Bull.* **1996**, *45* (5), 1111.
- (83) Tanaka, Y.; Kobuke, Y.; Sokabe, M. A Non-Peptidic Ion Channel with K⁺ Selectivity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34* (6), 693.
- (84) Guilbaud, P.; Varnek, A.; Wipff, G. Molecular Dynamics Study of P-Tert-butylcalix[4]arenetetraamide and Its Complexes with Neutral and Cationic Guests. Influence of Solvation on Structures and Stabilities. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (18), 8298.
- (85) Konovalov, A. I.; Antipin, I. S.; Mustafina, A. R.; Solov'eva, S. E.; Pod'yachev, S. N. Design and Ionophore Properties of Some Macrocyclic Calixarene-Based Ligands. *Russ. J. Coord. Chem.* **2004**, *30* (4), 227.

Capítulo 4

Interacciones
supramoleculares de
C-alquilresorcin[4]arenos
con pesticidas
N-metilcarbamatos

4.1. INTRODUCCIÓN

La capacidad de los resorcín[4]arenos de incluir sustratos orgánicos e inorgánicos tanto neutros como iónicos en sus nano-cavidades ha sido la propiedad más explotada en el marco de la química huésped-receptor. No obstante, la capacidad de inclusión de sustratos por parte de los resorcín[4]arenos no modificados no es tan versátil con respecto a la de otros macrociclos como las ciclodextrinas, los éteres corona y los cucurbiturilos. El desarrollo de la química macrocíclica de los ciclofanos derivados de resorcinol ha permitido exitosamente la obtención de estructuras con cavidades más amplias y estructuradas, así como la incorporación de grupos funcionales complementarios a los sustratos que se desean complejar. Como resultado, los resorcín[4]arenos funcionalizados han demostrado propiedades de *endo*-complejación excepcionales.¹⁻³

La química inherente de los sitios de unión presentes en las estructuras de C-*alquilresorcín[4]arenos* no funcionalizados (Figura 4.1) puede compensar la necesidad de la extensión del volumen de la cavidad o la sustitución con grupos funcionales específicos para mejorar sus propiedades de complejación con ciertos sustratos. Los grupos OH interactúan de manera selectiva con alcoholes y con azúcares con los cuales establecen interacciones puente de hidrógeno intermoleculares efectivas en solventes apolares. La cavidad aromática ha demostrado afinidades excepcionales por sustratos biológicos con grupos amonio tales como carnitina y acetilcolina y aminoácidos debido a las interacciones catión- π favorables.^{1,4} Además, la diversidad química que pueden presentar los sustituyentes procedentes del aldehído precursor puede ser aprovechada para modular las interacciones dependiendo de si existe algún mecanismo de comunicación química entre los sitios de unión. En adición, la rigidez conformacional de la cavidad, la densidad de carga del macrociclo y la acidez de Lewis de los anillos aromáticos pueden ser moduladas mediante el pH, lo cual puede conducir a modificaciones notorias de la selectividad del receptor hacia ciertos sustratos.

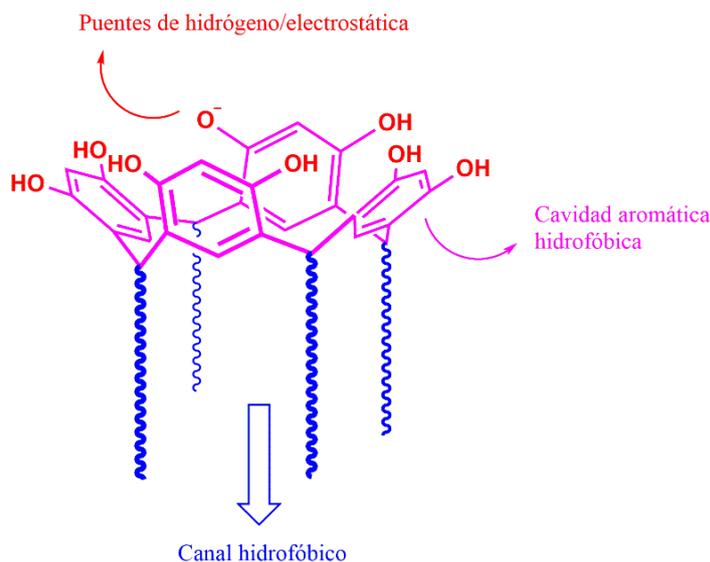


Figura 4.1. Representación de los sitios de unión presentes en la estructura de un C-alquilresorcin[4]areno ionizado.

4.1.1. Efecto de resorcin[4]arenos sobre las propiedades químicas y espectroscópicas de compuestos orgánicos

La química huésped-receptor de resorcin[4]arenos en medios acuosos ha sido demostrada fundamentalmente con macrociclos funcionalizados con grupos que incrementan la solubilidad acuosa como ciano y sulfonato, en tanto que las sustituyentes alquílicos del portal menor son de cadena corta. La capacidad de complejación de resorcin[4]arenos de cadena larga ha sido estudiada en solventes apolares.⁵ Sin embargo, el efecto conjunto de la carga de C-alquilresorcin[4]arenos y de la longitud de cadena alifática no ha sido explorada en medios acuosos debido principalmente a limitaciones de solubilidad. En este sentido, la aplicación de técnicas espectroscópicas tales como la espectrofotometría UV-visible y la espectrofluorimetría permiten el uso de bajas concentraciones y aun así evidenciar las interacciones que puedan ocurrir entre sustrato y receptor.^{6,7}

Las aplicaciones de las espectroscopias UV-visible o de emisión de fluorescencia requieren que el sustrato o el receptor presenten un grupo cromóforo o se comporten como luminóforos, respectivamente.ⁱⁱ La presencia de los anillos aromáticos (cromóforos) que componen los C-alquilresorcin[4]arenos permite que estas especies presenten una absorción moderada en el región UV, además presentan emisión fluorescente (Secciones 2.4.2.3 y 2.4.2.4). En la literatura no se menciona acerca del origen de la fluorescencia de estos macrociclos, aunque es posible que esté relacionada con factores estructurales de los C-alquilresorcinarenos que aportan. Además, las bajas concentraciones toleradas por los medios

ⁱⁱ En esta Tesis, el término luminóforo comprende a las especies con un grupo cromóforo y a las fluorescentes.

acuosos, pero detectadas por las técnicas ópticas permiten la exploración del efecto de la carga del macrociclo y la influencia de la longitud de la cadena en condiciones de alta dilución.

Los huéspedes orgánicos elegidos para el estudio de las propiedades de inclusión de los C-*alquilresorcín*[4]arenos fueron los pesticidas *N*-*metilcarbamatos* dado que se trata de moléculas orgánicas pequeñas, con grupos funcionales complementarios a los de los macrociclos y se trata de analitos de interés ambiental debido a sus aplicaciones en alimentos.

4.1.2. Pesticidas carbamatos

Los pesticidas carbamatos mayormente empleados son insecticidas, herbicidas y fungicidas y presentan toxicidades crónicas bajas a moderadas. Químicamente, son derivados del ácido carbámico (NH₂COOH). Los ésteres del ácido *N,N'*-sustituídos pueden presentar sustituyentes R¹, R² y R³ de una amplia variedad química (**Figura 4.2**).⁸

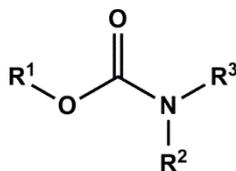


Figura 4.2. Estructura química fundamental de los pesticidas carbamatos.

El sustituyente R¹ puede ser un alcohol alifático, una oxima (R₂C=NOH) o un derivado de fenol, mientras que R² generalmente es CH₃ o H. La función específica del carbamato está dada por la naturaleza del grupo R³ actuando como insecticida si el sustituyente es CH₃, como herbicida si es un grupo aromático o fungicida si se trata del grupo benzoimidazol.⁸ Existen más de 50 carbamatos conocidos y sus empleos más comunes son como insecticidas, fungicidas, herbicidas y nematicidas. Cada tipo de pesticida actúa con un mecanismo fisiológico particular produciendo la muerte de las plagas.

Los insecticidas *N*-*metilcarbamatos* (R³ = CH₃) actúan inhibiendo la hidrólisis de la acetilcolina (ACh) de la enzima acetilcolinesterasa (AChEasa). En la Figura 4.3 se describe la reacción en el sitio activo enzimático, el cual involucra al grupo OH del aminoácido serina que hidroliza al grupo acetato de ACh y se genera la colina (Ch). El grupo acetato unido a la cadena lateral de la serina es posteriormente hidrolizado por agua,

regenerándose el sitio activo. Los pesticidas organofosforados actúan mediante un mecanismo similar, aunque su unión al sitio es irreversible ocasionando la inactivación de la enzima.

La baja persistencia ambiental de los *N*-metilcarbamatos y la reversibilidad de los efectos fisiológicos que causan en el sistema nervioso de los sistemas vivos los convierte en plaguicidas más inocuos. La inocuidad de los carbamatos es preferible frente a otros plaguicidas como los organofosforados u organoclorados persistentes.

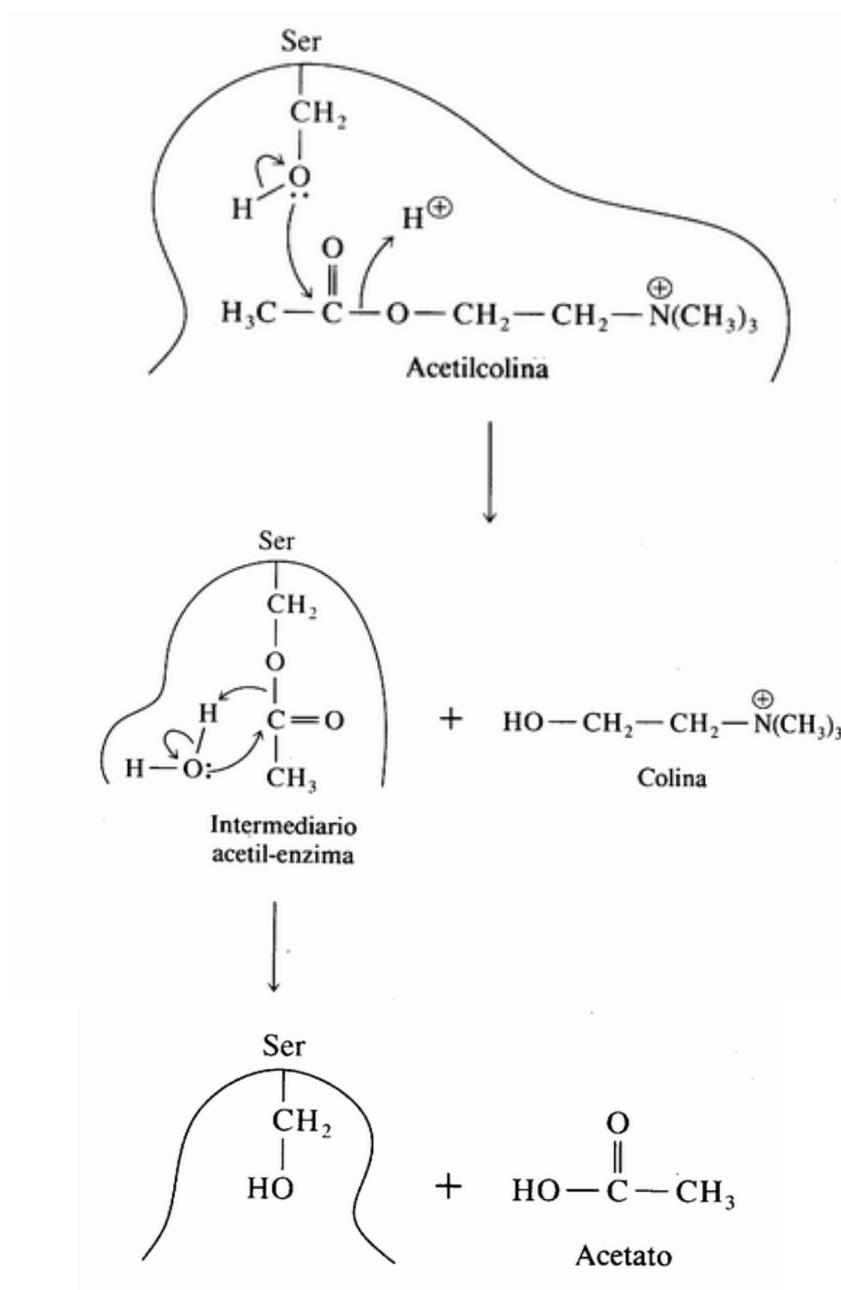


Figura 4.3. Mecanismo de la hidrólisis de la ACh a colina en el sitio activo de la AChEasa.

4.1.2.1. Propiedades de los Pesticidas *N*-metilcarbamatos

El uso principal de los pesticidas *N*-metilcarbamatos se debe a su acción efectiva como insecticidas contra una amplia variedad de invertebrados, por ejemplo, arañas, moscas de la fruta, moluscos que atacan cultivos de cítricos, algodón, forrajes, etc. La toxicidad de estos pesticidas frente a insectos se basa en la inactivación reversible del sitio activo de la AChEasa produciendo en consecuencia la inhibición de la hidrólisis de ACh. En la Figura 4.4 se muestra el mecanismo de inhibición que ocurre en el sitio activo de AChEasa debido a la hidrólisis del grupo carbamato, en lugar de ACh, generando el alcohol correspondiente y el ácido *N*-metilcarbámico.⁸ La toxicidad de los *N*-metilcarbamatos depende de la naturaleza química del sustituyente R¹ resultando más tóxicos aquellos con mayor complementariedad con el sitio activo de la enzima.⁸

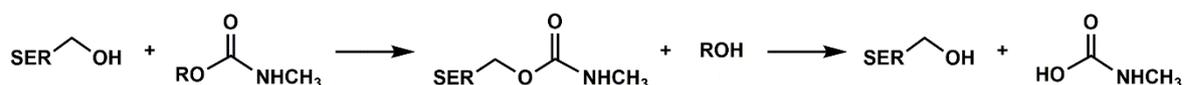


Figura 4.4. Mecanismo de la inhibición reversible en el sitio activo de AChEasa debido a la hidrólisis de un *N*-metilcarbamato al alcohol y ácido *N*-metilcarbámico.

La baja presión de vapor que presentan los carbamatos favorece su persistencia en suelo y en agua con respecto al aire.⁹ Sin embargo, en el suelo son metabolizados por distintos microorganismos mediante hidrólisis y oxidación, mientras que en el agua presentan tiempos de vida cortos debido a la hidrólisis del grupo carbamato a alcohol y al ácido carbámico *N*-sustituido, el cual se descompone en una amina secundaria y CO₂ (**Figura 4.5**).^{8,9} Además son degradados por absorción de radiación solar UV.⁹

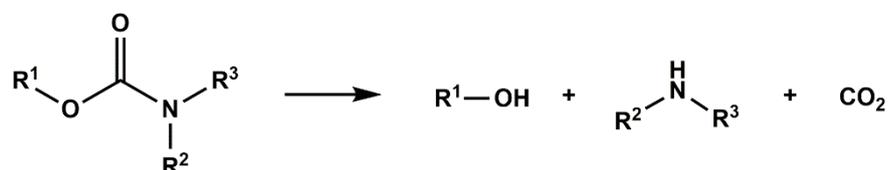


Figura 4.5. Hidrólisis completa de pesticidas carbamatos en medios acuosos.

El tetrafenolato de C-metilresorcín[4]areno presenta una afinidad muy alta por la acetilcolina en condiciones básicas.¹⁰ Considerando que tanto la ACh como los pesticidas

N-metilcarbamatos presentan una elevada afinidad por el sitio activo de ACHEasa y además, la complejación de ACh con el resorcin[4]areno, se plantea la premisa de que los N-metilcarbamatos también podrían interactuar favorablemente con C-alquilresorcinarenos.

Los pesticidas N-metilcarbamatos elegidos para los estudios de complejación con los C-alquilresorcin[4]arenos C1RAH₈ y C4RAH₈ fueron promecarb (PC) y aminocarb (AC) (Figura 4.6).

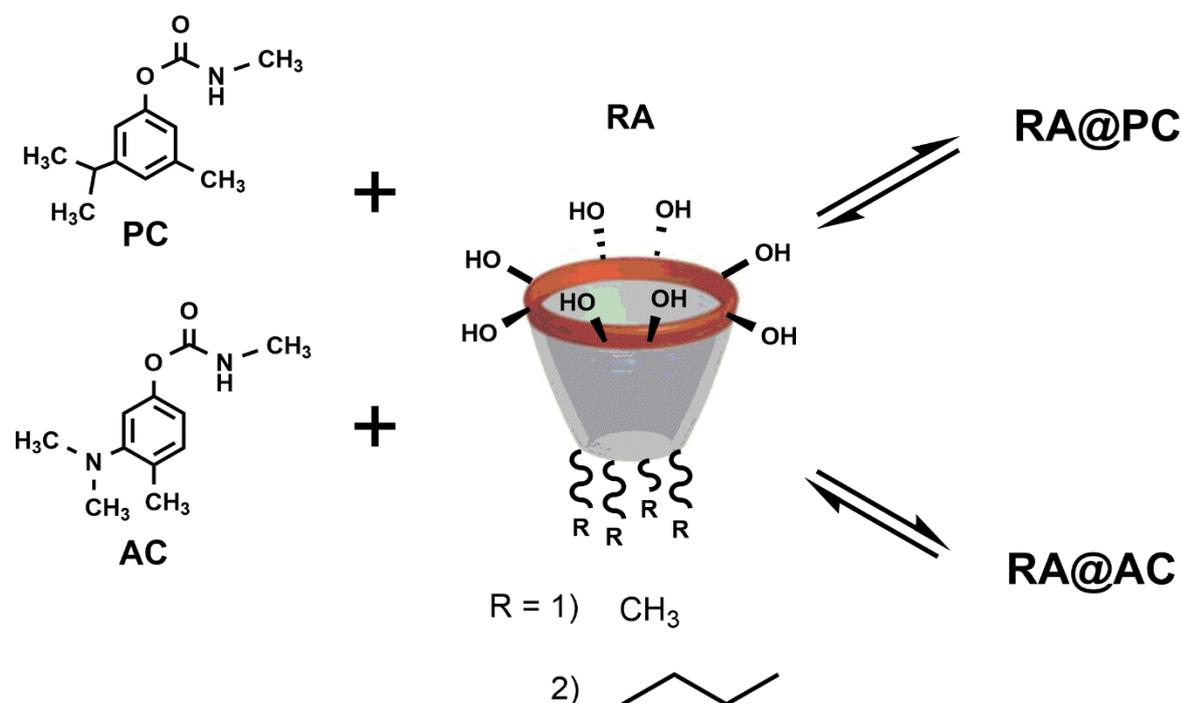


Figura 4.6. Representación esquemática de las interacciones huésped-receptor posibles entre los resorcin[4]arenos (RA) C-metilresorcin[4]areno y C-butilresorcin[4]areno y los pesticidas N-metilcarbamatos promecarb (PC) y aminocarb (AC).

4.2. OBJETIVOS

- Estudiar las interacciones huésped-receptor entre los pesticidas N-metilcarbamatos promecarb (PC) y aminocarb (AC) con C1RAH₈ y C4RAH₈ mediante las espectroscopias UV-Vis y de emisión de fluorescencia.
- Determinar las constantes de asociación entre sustrato y receptor y elucidar los mecanismos involucrados en las interacciones.

- Evaluar el efecto de la carga de los macrociclos, según el pH del medio, sobre las interacciones con los sustratos.
- Analizar el efecto de la longitud de los sustituyentes alquílicos de los macrociclos sobre la afinidad hacia los sustratos.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Caracterización por espectroscopia UV-visible de pesticidas *N*-*metilcarbamatos*

Las soluciones madre de PC y AC se prepararon en CH₃OH debido a la mayor solubilidad de los pesticidas en este solvente. Los estudios en medios acuosos se realizaron en 2% v/v CH₃OH/H₂O. Además, se evaluó el efecto del pH sobre las propiedades de absorción UV-visible de PC y de AC en ausencia y en presencia de los C-*alquilresorcín*[4]arenos.

4.3.1.1. Espectros de absorción UV-visible de promecarb y aminocarb

Las señales características de los espectros de absorción UV-visible de PC y AC en CH₃OH puro se presentan en la Figura 4.7. PC presenta un máximo de absorción a 262,0 nm acompañado de un pequeño hombro a 267,5 nm. El espectro de absorción de AC se caracteriza por el máximo de absorción a 246,0 nm y un hombro a 278,0 nm.

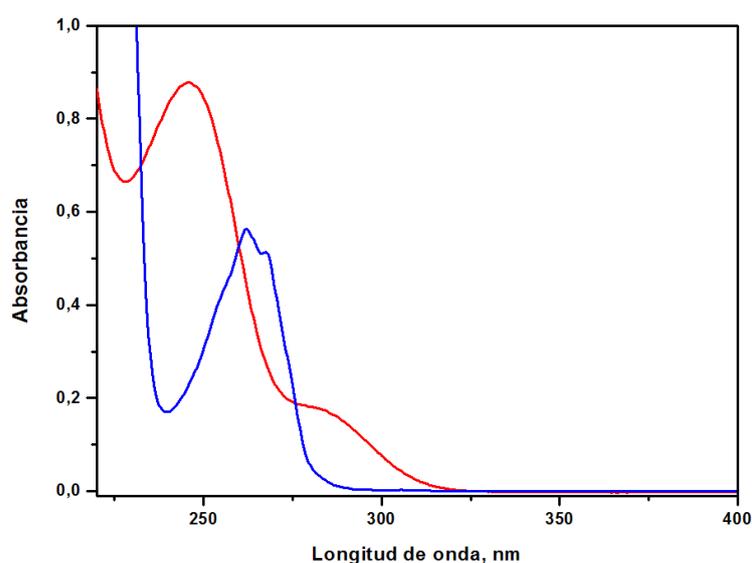


Figura 4.7. Espectros de absorción UV-visible de [PC] = $2,41 \times 10^{-3}$ M (—) y [AC] = $1,27 \times 10^{-4}$ M (—) en CH₃OH. b = 1 cm; 25,0 °C.

4.3.1.2. Efecto del pH sobre las absorciones UV-visible de promecarb y aminocarb

La principal diferencia entre PC y AC es la naturaleza básica del grupo $-N(CH_3)_2$ presente en AC. Por lo tanto, se comparó el efecto del pH sobre las propiedades espectroscópicas de ambos pesticidas. En la Figura 4.8 se presentan los espectros UV-visible de soluciones de AC y de PC a pH 1,50; 8,00 y 12,00 (sólo para AC). Los valores de pH se eligieron en función de los pK_a determinados para C1RA y AC, y considerando que a $pH > 10$ se produce la hidrólisis del pesticida.

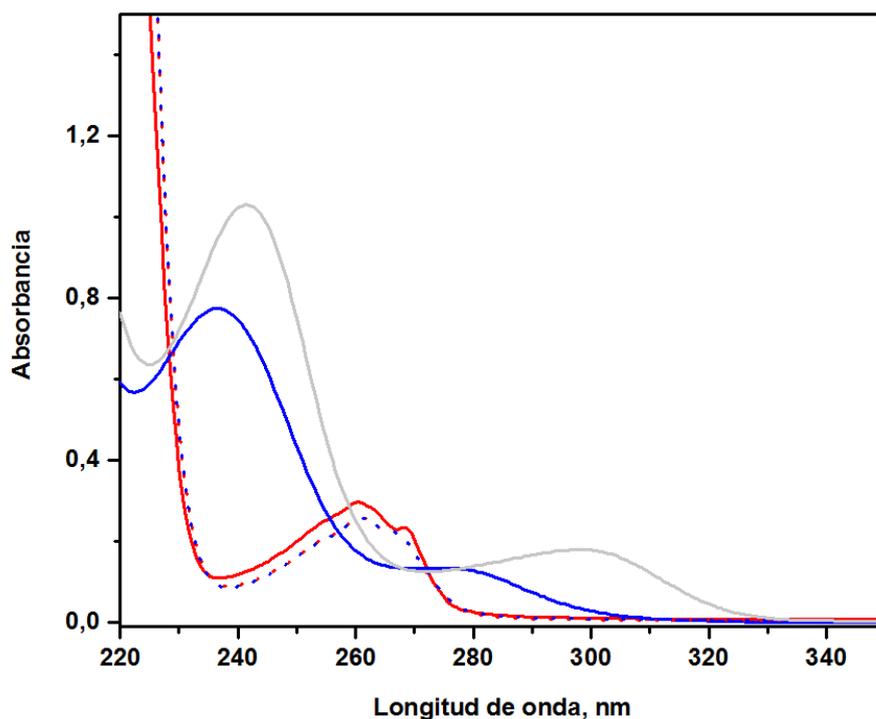


Figura 4.8. Espectros de absorción UV-visible de N-metilcarbamatos a distintos valores de pH. [PC] = $2,50 \times 10^{-4}$ M a pH=1,50 (---) y 8,00 (---); b = 4 cm. [AC] = $2,00 \times 10^{-4}$ M a pH=1,50 (—); $1,05 \times 10^{-4}$ M a pH=8,00 (—) y pH=12,00 (—); b = 1 cm; 2% v/v CH_3OH/H_2O ; 25,0 °C.

Los espectros de absorción de PC a valores de pH 1,50 y 8,00 se presentan superpuestos con un máximo de absorción a 261,0 nm. Sin embargo, la absorción UV-visible de AC varía notablemente con el aumento del pH. Por lo tanto, el comportamiento diferenciado de las absorciones de los pesticidas con el pH se atribuye a la ausencia de protones móviles en la estructura química de PC y a la presencia de la amina en AC. A pH = 1,50, el grupo $-N(CH_3)_2$ de AC se encuentra protonado (ACH^+) y el catión, con un perfil espectral semejante al de PC, presenta un máximo de absorción a 260,5 nm (hombro a 268,5

nm). Las similitudes de los espectros de AC a pH = 8,00 y en CH₃OH indican que el pesticida se encuentra en estado neutro y la especie se caracteriza por el máximo de absorción a 236,5 nm (hombro a 274,0 nm). Finalmente, el cambio espectral ocurrido desde pH = 8,00 a 12,00 fue atribuido a la hidrólisis de AC. El fenolato sustituido generado está caracterizado por la absorción a 298,0 nm. En general, el trabajo con los pesticidas *N*-metilcarbamatos no permitió la exploración de los valores de pH > 10 debido a la hidrólisis del grupo carbamato según la **Figura 4.5**.

4.3.1.3. Determinación de la constante de ionización de aminocarb

El equilibrio ácido-base de aminocarb entre las especies ácida (ACH⁺) y su base conjugada (AC) se plantea en la Figura 4.9, el cual está gobernado por una constante termodinámica ácido-base, K_a , definida en concentración de especies (Ec. 4.1).

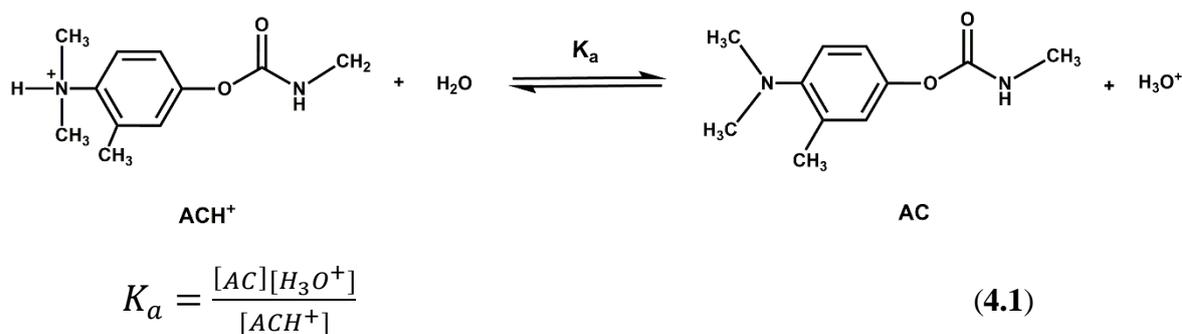


Figura 4.9. Disociación ácida de ACH⁺ a AC en medio acuoso y la constante de equilibrio K_a asociada.

La determinación del valor de pK_a de AC se realizó mediante espectrofotometría a partir de los datos de A_λ en función del pH. Los espectros de absorción de soluciones acuosas de AC indicaron la aparición de una banda a 236,0 nm a partir de pH = 5,14 cuya absorbancia aumentó con el incremento del pH. A partir de pH = 7,03, la variación de los espectros fue mínima con un perfil espectral igual al presentado para AC a pH = 8,00 (Figura 4.10). La longitud de onda a la cual se registró el mayor cambio de la absorbancia en función del pH fue 236,0 nm. En la Figura 4.10 se presenta el gráfico de $A_{236 \text{ nm}}$ vs pH y la regresión sigmoideal obtenida empleando (Ec. 3.7). El valor de pK_a determinado para AC fue $(5,69 \pm 0,06)$ en 2% v/v CH₃OH/H₂O a 25,0 °C.

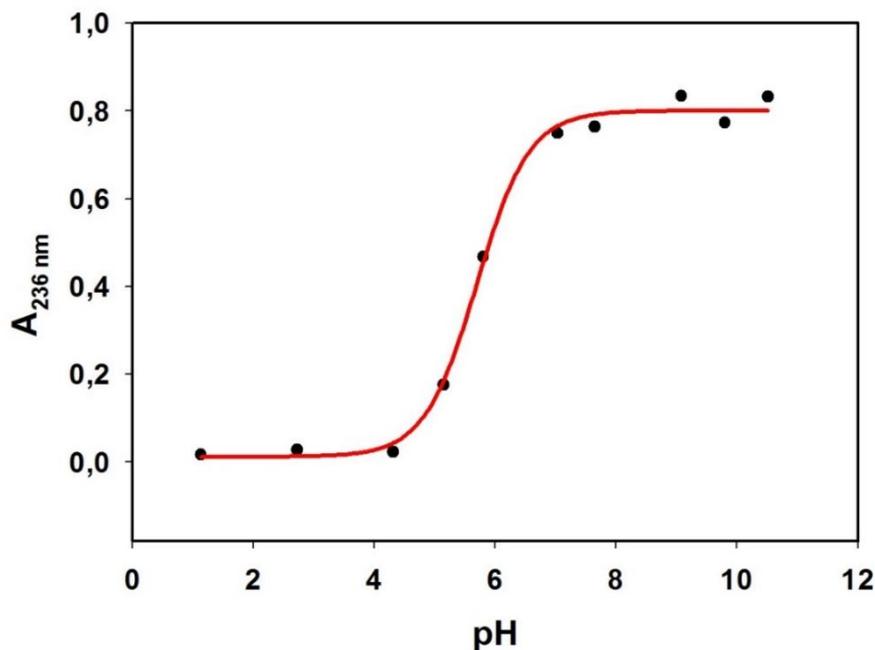


Figura 4.10. Curva de titulación espectrofotométrica de AC.

El análisis de la curva de titulación espectrofotométrica permite concluir que el catión ACH^+ predomina en soluciones ácidas de $\text{pH} < 4$. La coexistencia en solución de las especies ACH^+ y AC ocurre en el intervalo de $\text{pH} 4 - 7$. En condiciones alcalinas con pH en el intervalo $7 - 10$, la base conjugada neutra es la única especie presente en solución. Finalmente, la degradación de AC debido a la hidrólisis básica del grupo carbamato de AC es el proceso que predomina a $\text{pH} > 10$.

El conocimiento de la química ácido-base de AC y PC en el medio de reacción es fundamental para la interpretación de sus interacciones con los C-alquilresorcin[4]arenos neutros y sus poli-aniones en solución.

4.3.1.4. Determinación de las absorptividades molares de promecarb y aminocarb

Las absorptividades molares (ϵ) de los *N*-metilcarbamatos se determinaron a partir de las respuestas de absorbancia a la longitud de onda de absorción máxima en función de las concentraciones de los pesticidas. La regresión de los datos graficados según la ley de Lambert-Beer (Ec. 2.4) fue lineal en todos los casos con coeficientes de correlación $> 0,999$ ($n=10$) y a partir de las pendientes obtenidas por regresión de mínimos cuadrados se determinaron los valores de ϵ para PC y AC (Tabla 4.1, referirse a Sección Experimental 4.6).

Tabla 4.1. Absortividades molares (ϵ) de AC y PC en CH₃OH y en soluciones acuosas a distintos valores de pH a 25,0 °C.

Pesticida	Solvente ^a	$\lambda_{\text{máx}}$, nm	ϵ , $\times 10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ^b
AC	CH ₃ OH	246,0	691 \pm 1
	HCl, pH = 1,50	260,5	40 \pm 3
	PBS, pH = 8,00	236,5	750 \pm 8
PC	CH ₃ OH	262,0	23,1 \pm 0,9
	PBS, pH = 5,80	260,5	30,6 \pm 0,2

^a Los medios acuosos corresponden a 2% v/v CH₃OH/H₂O al pH correspondiente.

^b Las determinaciones de AC se efectuaron con b = 1 cm, mientras que para PC se empleó b = 5 cm.

Debido a que los espectros de PC son idénticos a valores de pH 1,50 y 8,00 (Figura 4.8), la absortividad molar determinada a pH = 5,80 (306 \pm 2 M⁻¹ cm⁻¹) se consideró representativa de PC en el intervalo de pH de trabajo.

4.3.2. Influencia de *N*-metilcarbamatos sobre las propiedades espectroscópicas de C-*alquilresorcín*[4]arenos

Una vez que los pesticidas fueron caracterizados por espectroscopia UV-visible, se procedió a analizar el efecto producido por la presencia de un *N*-metilcarbamato (PC o AC) sobre el espectro de absorción de un C-*alquilresorcín*[4]areno (C1RA o C4RA) y sus poli-aniones en soluciones a distintos valores de pH. En general, una interacción específica entre receptor (R) y sustrato (S) en sus estados electrónicos basales puede conducir a la formación de una nueva especie R@S con propiedades espectroscópicas distintas a las de sus componentes.¹¹ Por ejemplo, la formación de complejos de tipo huésped-receptor puede conducir a alteraciones en la absorbancia a $\lambda_{\text{máx}}$ de S y/o de R o con respecto a la aditividad de los mismos. En otras ocasiones, pueden ocurrir corrimientos batocrómicos o hipsocrómicos de $\lambda_{\text{máx}}$ como consecuencia de la interacción.

4.3.2.1. Influencia de pesticidas sobre las absorciones de C1RAH₈ y sus poli-aniones

Con el objetivo de evaluar el efecto de los *N*-metilcarbamatos sobre las propiedades espectroscópicas de C1RAH₈ y sus poli-aniones se compararon los espectros de absorción

de soluciones de los pesticidas (S), C1RA (R), la mezcla de S en presencia del R y el espectro aditivo denominado en adelante $S+R$ en 2% v/v $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ a valores de pH 1,50; 4,50 y 8,00.

Inicialmente, el sistema evaluado fue C1RA en presencia de PC. La comparación del espectro aditivo con el espectro de la solución mezcla $\text{C1RAH}_8 + \text{PC}$ a pH = 1,50 mostraron pequeñas diferencias, indicadas como $\Delta A = A_{\text{mezcla}} - A_{S+R}$, en sus valores de absorbancia a 282,0 nm ($\Delta A = -0,012$) y 244,5 nm ($\Delta A = -0,021$) ($b = 5$ cm). El estudio efectuado a pH = 8,00ⁱⁱⁱ reveló variaciones en los valores de absorbancia de los espectros de la mezcla con PC y el espectro $S+R$ a 284,5 nm y 243,0 nm con $\Delta A = -0,014$ a ambas λ ($b = 4$ cm en ambos medios). Los cambios espectroscópicos registrados se encuentran dentro del error instrumental de acuerdo a las dimensiones de las cubetas empleadas y no son suficientes para la determinación de la afinidad entre las especies. A modo representativo, en la Figura 4.11 se muestra el efecto de PC sobre el espectro de $\text{C1RAH}_7^-/\text{C1RAH}_6^{2-}$ a pH = 8,00 (a pH = 1,50 se emplearon las mismas concentraciones de S y R).

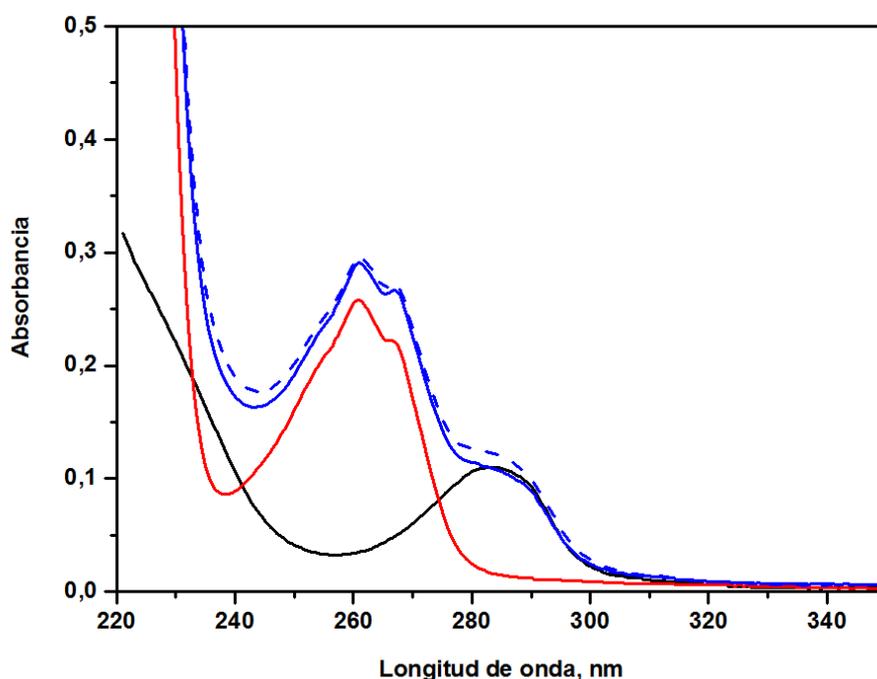


Figura 4.11. Espectros de C1RAH_6^{2-} $3,00 \times 10^{-6}$ M (—), PC $250,00 \times 10^{-6}$ M (—), C1RAH_6^{2-} en presencia de PC (—) y el espectro aditivo PC + C1RAH_6^{2-} (---); 2% v/v $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$; PBS pH = 8,00; $b = 4$ cm; 25,0 °C.

ⁱⁱⁱ A pH=8,00 coexisten en equilibrio C1RAH_7^- y C1RAH_6^{2-} debido a que $pK_a(3) = 8,3 \pm 0,2$ (Sección 3.3.4.2.)

La influencia de AC sobre la absorción de C-metilresorcín[4]areno se estudió a valores de pH 1,50; 4,50 y 8,00 con la finalidad de evaluar los efectos de pesticida en estados catiónico (ACH^+) y neutro sobre las especies neutra, mono-aniónica y di-aniónica del receptor, respectivamente.

A pH = 1,50, los espectros de C1RAH₈ en presencia de ACH^+ y S+R no demostraron diferencias significativas (< 10%). A pH = 4,50, los espectros generados por C1RAH₇⁻ en presencia de ACH^+ (6% de ACH^+ se encuentra disociado, pero la absorción de la especie neutra no fue evidenciada) y S+R exhibieron un cambio poco significativo con $\Delta A = -0,020$ a 257,0 nm (Figura 4.12 A). En medio moderadamente básico (pH = 8,00), el espectro de las especies en equilibrio C1RAH₇⁻ y C1RAH₆²⁻ en presencia de AC resultó idéntico al espectro S+R (Figura 4.12 B).

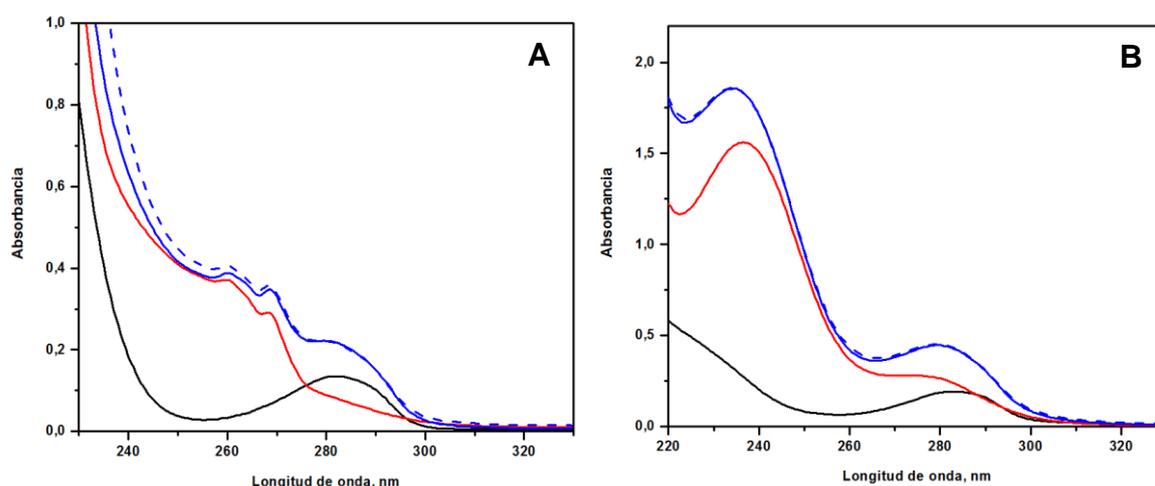


Figura 4.12. Espectros de absorción UV-visible de C1RA (—), AC (—), C1RA en presencia de AC (—) y el espectro aditivo AC + C1RA (---) a pH=4,50 (A) y pH=8,00 (B). (A) $[\text{C1RAH}_8] = 4,00 \times 10^{-6}$ M, $[\text{ACH}^+] = 200,00 \times 10^{-6}$ M. (B) $[\text{C1RAH}_6^{2-}] = 4,55 \times 10^{-6}$ M, $[\text{AC}] = 52,00 \times 10^{-6}$ M. En ambos casos: 2% v/v $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$; b = 4 cm; 25,0 °C.

4.3.2.2. Efecto de promecarb y aminocarb sobre la absorción de C-butilresorcín[4]areno

Se realizó el mismo análisis de la influencia de los pesticidas sobre los espectros de absorción empleándose el receptor de mayor longitud de cadena, C-butilresorcín[4]areno. El efecto de la carga del receptor sobre la interacción con los pesticidas fue evaluado en soluciones a distintos valores de pH.

El efecto del aumento de la concentración de PC sobre el espectro de absorción de C4RAH₇⁻ a pH = 5,80, produjo aumentos de la absorbancia a 287,0 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ de C4RAH₇⁻)

y a 261,0 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ de PC). Sin embargo, el mayor cambio de ΔA ($A_{\text{mezcla}} - A_{\text{PC}}$) ocurrió a 261,0 nm, como indica la **Figura 4.13 A**.

La Figura 4.13 B corresponde al estudio del efecto de PC sobre la absorción de C-butilresorcín[4]areno a pH = 7,00. La absorbancia a 287,0 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ correspondiente a la absorción de las especies C4RAH_7^- y C4RAH_6^{2-} en equilibrio) disminuyó debido al aumento de concentración de PC (aparición de a banda a 261,0 nm). Además, la presencia del punto isobéptico a 281,0 nm indicó que la disminución de la absorción del par $\text{C4RAH}_7^-/\text{C4RAH}_6^{2-}$ está relacionada con el aumento de PC.

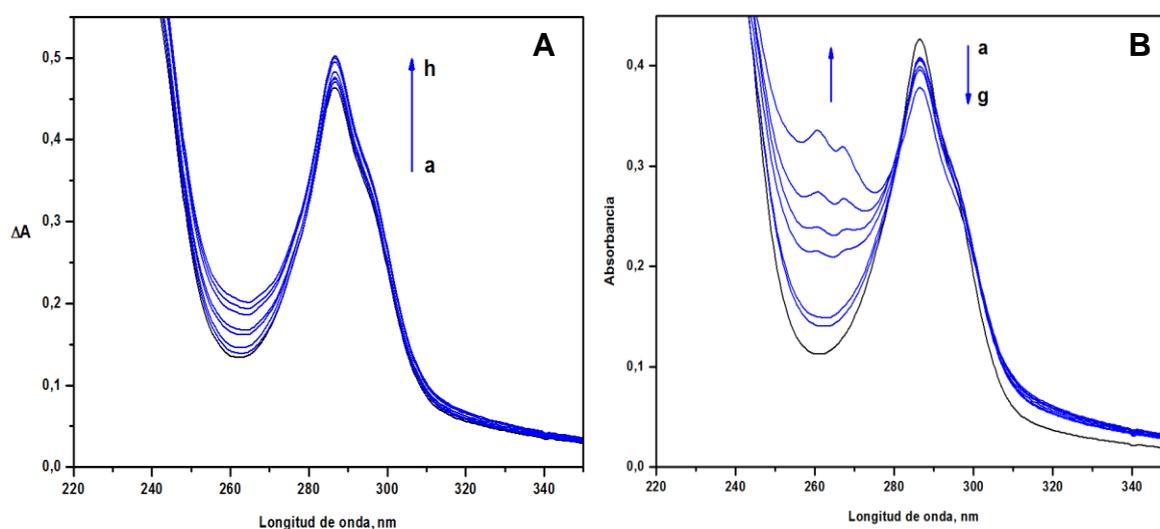


Figura 4.13. Efecto de PC (—) sobre los espectros de absorción de C4RA (---). (A) $[\text{C4RA}]_0 = 5,60 \times 10^{-6}$ M; $[\text{PC}]_0 = 0$ (a) – $87,62 \times 10^{-6}$ M (h); PBS pH = 5,80; espectros corregidos por blancos de PC. (B) $[\text{C4RA}]_0 = 4,34 \times 10^{-6}$ M; $[\text{PC}]_0 = 0$ (a) – $102,52 \times 10^{-6}$ M (g); PBS pH = 7,00; los blancos de PC no fueron descontados. 2% v/v $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, $b = 5$ cm; 25,0 °C.

Contrariamente a lo observado con PC, el pesticida AC no produjo alteraciones evidentes del espectro de C-butilresorcín[4]areno a ninguno de los valores de pH evaluados (1,50; 5,80 y 8,00).

En general, los efectos observados en los espectros de absorción de C-alkilresorcín[4]arenos debido a la presencia de PC o AC a distintos valores de pH fueron poco significativos. Las constantes de asociación sólo se pudieron determinar para las interacciones de C-butilresorcín[4]areno con PC (sección 4.5.5.1).

4.3.3. Caracterización de pesticidas N-metilcarbamatos por espectroscopia de fluorescencia

La emisión de fluorescencia de los pesticidas N-metilcarbamatos es moderada en solventes orgánicos. Sin embargo, sus propiedades luminiscentes son notoriamente inferiores en agua.^{7,12,13} Dado que el solvente en el que se desarrollaron los estudios en esta Tesis fue fundamentalmente acuoso, fue necesario analizar las propiedades de emisión fluorescente de PC y AC y sus dependencias con el pH como etapa previa a la incorporación de los C-alkilresorcín[4]arenos.

Inicialmente los espectros de fluorescencia se registraron empleando como longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) a los valores de $\lambda_{\text{máx}}$ determinados a partir de los espectros de absorción UV-visible en 2% v/v CH₃OH/H₂O: 261 nm y 236 nm para PC y AC neutro, respectivamente. La emisión de fluorescencia de PC no demostró dependencia con el pH del medio, tal como ocurrió por espectroscopia de absorción (Figura 4.14 A). Sin embargo, las especies protonada y neutra de AC exhibieron comportamientos luminiscentes notablemente distintos.

El aumento del pH de las soluciones de AC de 1,50 a 8,00 evidenció un aumento marcado de la señal de fluorescencia con un máximo de emisión ($\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}$) a 394 nm revelando que el catión ACH⁺ no es fluorescente, mientras que la base conjugada neutra sí presenta fluorescencia (Figura 4.14 B).

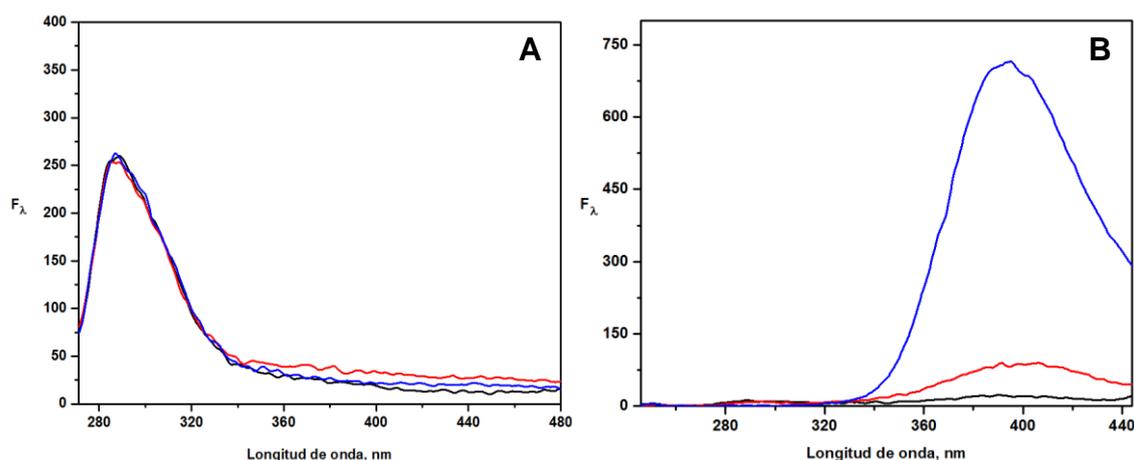


Figura 4.14. Espectros de emisión de fluorescencia de N-metilcarbamatos a pH 1,50 (—); 4,50 (---) y 8,00 (—). (A) [PC] = $40,0 \times 10^{-6}$ M; λ_{ex} = 261 nm; g.f. = 900. (B) [AC] = $3,3 \times 10^{-6}$ M; λ_{ex} = 236 nm; g.f. = 730. 2% v/v CH₃OH/H₂O; 25,0 °C.

La señal a $\text{pH} = 4,50$ se atribuyó a la disociación de *c.a.* 6% de ACH^+ ($\text{p}K_a = 5,69$). El espectro de absorción del pesticida en el mismo medio indicó que la especie predominante en solución es ACH^+ y las señales de la fracción generada de AC no se evidenciaron. Por lo tanto, la emisión de fluorescencia registrada a 394 nm de una solución diluida del pesticida ($3,3 \times 10^{-6}$ M) a $\text{pH} = 4,50$ se atribuyó a AC neutro, pese a que esta especie está presente en solución a una concentración muy baja (*c.a.* 6% = $0,2 \times 10^{-6}$ M) y su absorbancia a $\lambda_{\text{ex}} = 236$ nm es mínima ($b = 1$ cm). Además, el perfil del espectro de excitación de la solución resultó idéntico al espectro de absorción de AC neutro, confirmándose que la fluorescencia a 394 nm emerge de la disociación ácida de ACH^+ . Dada la intensidad de fluorescencia observada a una muy baja concentración de AC, se estima que el rendimiento cuántico es inusualmente elevado para la especie neutra comparado con otros *N*-metilcarbamatos en medios acuosos.⁷ En los estudios espectrofluorimétricos que se presentarán a continuación efectuados a $\text{pH} = 4,50$ se consideró que, pese a la observación de la emisión de AC neutro, su concentración en solución es despreciable frente a las demás especies por lo que los efectos espectrales observados se atribuyeron a la especie predominante ACH^+ . Finalmente, considerando que el área bajo la curva espectral (parámetro que se definirá en adelante como F_A) a $\text{pH} = 8,00$ representa la totalidad de AC en estado neutro, la concentración de la especie calculada según el valor de F_A obtenido a $\text{pH} = 4,50$ fue $0,4 \times 10^{-6}$ M, lo cual es consistente con la fracción esperada de AC neutro según la constante de $\text{p}K_a$ determinada en el estado basal (*c.a.* $0,2 \times 10^{-6}$ M). Por lo tanto, se descartó un comportamiento ácido diferente de ACH^+ en el estado excitado ($\text{p}K_a^* = \text{p}K_a$).

A $\text{pH} > 9$ se registró un leve decaimiento de la emisión de AC atribuida a la hidrólisis básica del pesticida.

4.3.4. Influencia de los *N*-metilcarbamatos sobre las propiedades de emisión de fluorescencia de *C*-alquilresorcin[4]arenos y efecto del pH

4.3.4.1. Espectros de emisión de C1RA

La emisión fluorescente de C1RA demostró una dependencia poco significativa con el aumento del pH del medio como se muestra en la Figura 4.15. Las especies ácido-base C1RAH_8 , C1RAH_7^- y $\text{C1RAH}_7^-/\text{C1RAH}_6^{2-}$ evaluadas a $\text{pH} 1,50$; $4,50$ y $8,00$, respectivamente, exhibieron la misma $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}$ a 316 nm.

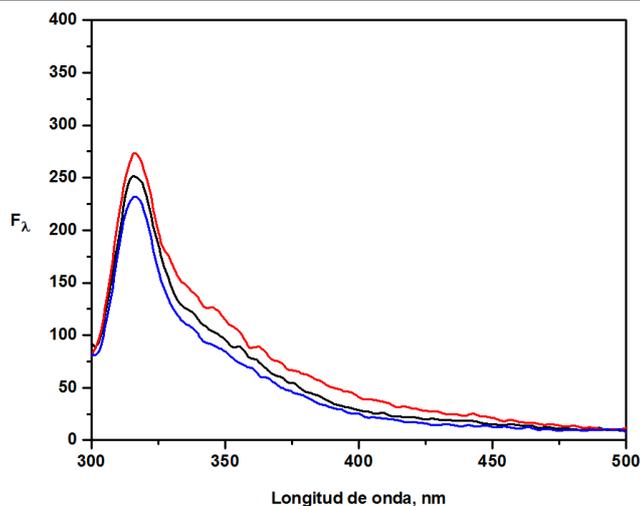


Figura 4.15. Efecto del pH sobre la emisión fluorescente de C1RA. [C1RA] = $1,0 \times 10^{-6}$ M; pH = 1,50 (—), 4,50 (—) y 8,00 (—); 2% v/v $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$; $\lambda_{\text{ex}} = 290$ nm; g.f. = 900; 25,0 °C.

La presencia de PC ($120,6 \times 10^{-6}$ M) no produjo alteraciones significativas en la emisión de fluorescencia de ninguna de las especies ácido-base de C1RA ($1,0 \times 10^{-6}$ M). La Figura 4.16 ejemplifica los espectros obtenidos de C1RAH_7^- a distintas concentraciones ($0,9 \times 10^{-6}$ M – $2,5 \times 10^{-6}$ M) en ausencia y en presencia de PC en PBS a pH = 5,80. La absorción del pesticida a $\lambda_{\text{ex}}=290$ nm resultó nula en todos los casos.

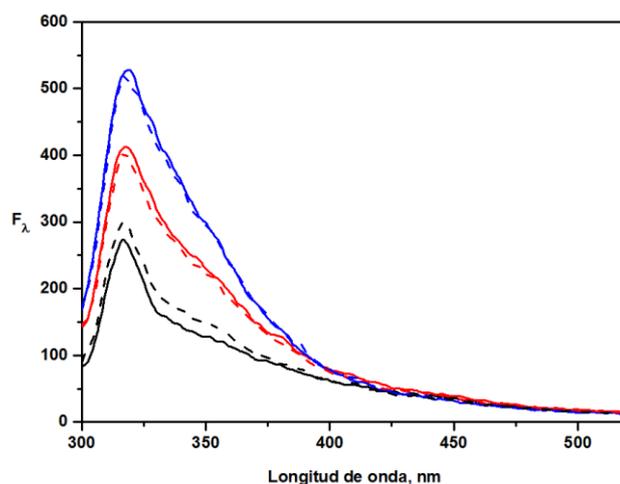


Figura 4.16. Espectros de emisión de C1RAH_7^- a distintas concentraciones en ausencia (—) y en presencia de PC $204,4 \times 10^{-6}$ M (---) a pH = 5,80. [C1RAH_7^-]: $0,9 \times 10^{-6}$ M (—); $1,8 \times 10^{-6}$ M (—); $2,5 \times 10^{-6}$ M (—). 2% v/v $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$; $\lambda_{\text{ex}} = 290$ nm; g.f. = 900; 25,0 °C.

Posteriormente se evaluó el efecto de AC sobre los espectros de emisión de C1RA a distintos pH (Figura 4.17). Análogamente a lo sucedido con PC, la presencia de ACH^+ , especie no fluorescente a $\text{pH} = 1,50$, no produjo alteraciones en la emisión de C1RAH₈ como lo indica la Figura 4.17 A. Sin embargo, a valores de pH superiores, donde predomina la especie neutra AC, se observaron efectos caracterizados por la atenuación o *quenching*^{4a} de la fluorescencia del receptor y/o el sustrato. En esta Tesis, la magnitud del *quenching* será informada como porcentaje, $Q\%$, el cual se determina a partir del valor relativo del área bajo la curva registrada (A_F) o, cuando resulte conveniente, como la intensidad relativa de la señal a $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}$ (I_λ).^{4b}

En solución acuosa de *buffer* acetato (ABS) $\text{pH} = 4,50$, coexisten C1RAH₇⁻ y mayoritariamente ACH^+ no fluorescente. Para minimizar la contribución del 6% de AC neutro, la λ_{ex} empleada fue 300 nm a la cual la especie absorbente es C1RAH₇⁻ ($A_{\text{AC}} = 0,002$). Aun así se observó la emisión de fluorescencia debida a la base conjugada AC con $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}} = 392$ nm. El descuento de la contribución de AC a la curva espectral de C1RAH₇⁻ en presencia del pesticida reveló que el efecto neto producido era el *quenching* de la emisión de C1RAH₇⁻ ($Q\% = 12\%$), sin cambios en $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}$ (Figura 4.17 B) y el efecto fue atribuido a la especie mayoritaria ACH^+ .

A $\text{pH} = 8,00$ se observó la superposición de los espectros de absorción de C1RAH₇⁻/C1RAH₆²⁻ y de AC a $\lambda < 300$ nm. Los espectros de emisión obtenidos por excitación a 300 nm indicaron que AC es el fluoróforo que mayoritariamente contribuye a la señal de emisión, mientras que la fluorescencia del receptor es despreciable. En condiciones alcalinas, la atenuación de la señal de emisión de AC es 11% en presencia del receptor. Sin embargo, a diferencia de la atenuación del receptor causada por AC a $\text{pH} = 4,50$, la débil fluorescencia del macrociclo permanece inalterada en presencia del pesticida a $\text{pH}=8,00$ (Figura 4.17 C). Los valores de ϵ de sustrato y receptor determinados a 300 nm fueron 240 y 1760 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, respectivamente. Dado que tanto S como R absorben a λ_{ex} , se debe verificar si la atenuación de la fluorescencia se debe a un efecto de filtro interno.^{4c}

En general, la emisión de fluorescencia de un fluoróforo (I_F en Ec. 4.1) a una determinada λ_{ex} puede ser corregida por el parámetro α que involucra los valores de absorbancia total ($A_{\text{total}}^{\lambda_{\text{ex}}}$) del fluoróforo y las demás especies cromóforas presentes en el

^{4a} El término en inglés *quenching* es comúnmente empleado en la bibliografía en español para referirse al proceso fotofísico de la atenuación de la emisión de fluorescencia de un fluoróforo.

^{4b} En esta Tesis, los valores de A_F o I_λ absolutos se relativizaron con respecto al valor de A_F (o I_λ) de un fluoróforo patrón. Referirse a Sección Experimental.

^{4c} Efecto caracterizado por la atenuación de la fluorescencia de un fluoróforo debido a la absorción de otras especies cromóforas a la λ_{ex} o a la λ_{em} .

medio y la absorbancia del fluoróforo ($A^{\lambda_{ex}}$).¹⁴ Si el valor de α es $\leq 5\%$ con respecto a I_F , entonces $I_F^{corr} \approx I_F$ y el efecto de filtro interno puede ser descartado.¹⁴

$$I_F^{corr} = I_F \frac{A_{total}^{\lambda_{ex}}}{A^{\lambda_{ex}}} \frac{1 - 10^{-A^{\lambda_{ex}}}}{1 - 10^{-A_{total}^{\lambda_{ex}}}} = I_F \alpha \quad (4.1)$$

Las concentraciones de trabajo empleadas para AC y C1RAH₇⁻/C1RAH₆²⁻ (1:1) fueron $38,8 \times 10^{-6}$ M y $18,3 \times 10^{-6}$ M, respectivamente. Los espectros de absorción de la mezcla y de AC indicaron que $A_{total}^{\lambda_{ex}} = 0,041$ y $A^{\lambda_{ex}} = 0,009$, respectivamente. El valor del parámetro α obtenido fue 1,04. La emisión de fluorescencia emerge del 22% de luz absorbida por AC en la mezcla. Aun así, las bajas concentraciones de trabajo de S y R hacen que la atenuación de la fluorescencia resulte despreciable como lo justifica la proximidad a la unidad de α . Dado que $I_F^{corr} \approx I_F$, la atenuación de la emisión de fluorescencia de AC (< 5%) producida por la acción de receptor como filtro interno en las condiciones experimentales evaluadas fue descartada. Por lo tanto, los efectos fotofísicos observados se atribuyeron a la acción de C1RAH₇⁻/C1RAH₆²⁻ (1:1) como *quencher* de la fluorescencia de la especie neutra de AC en PBS a pH = 8,00.

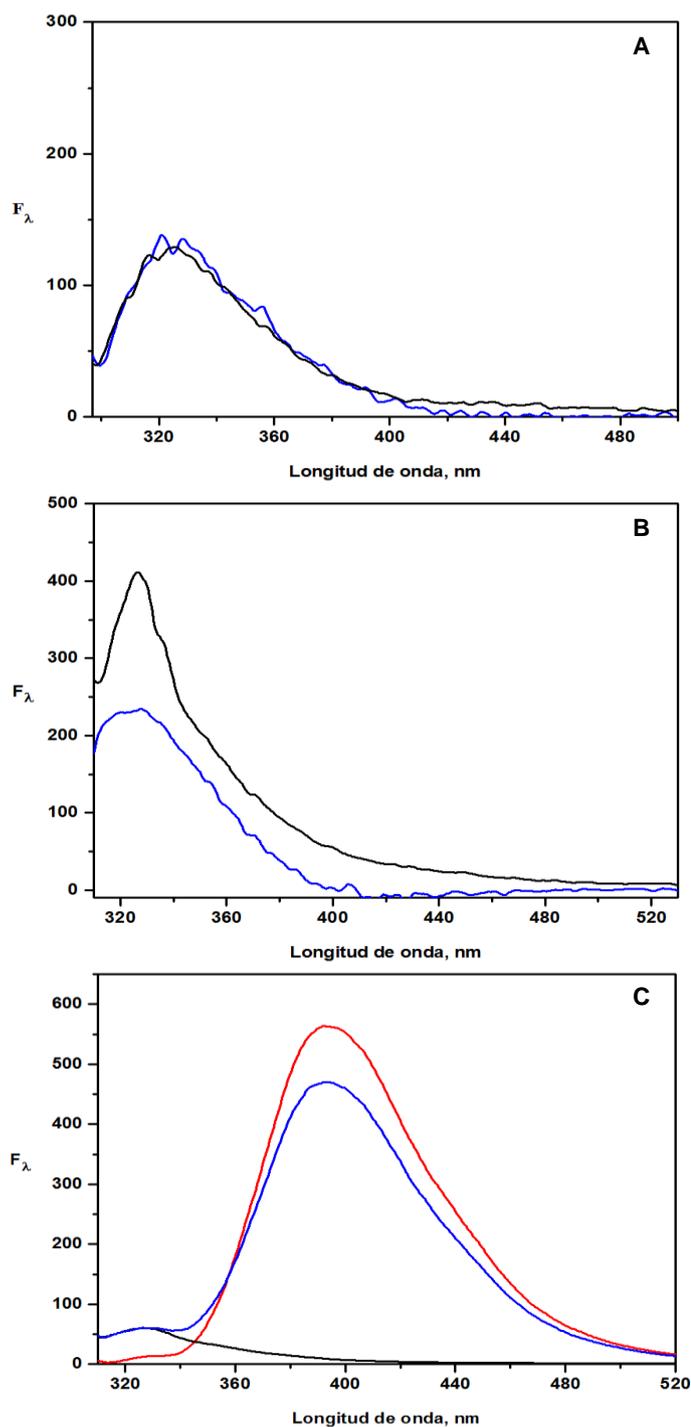


Figura 4.17. Espectros de emisión de C1RA en ausencia (—) y en presencia de AC (---) a distintos valores de pH. **A)** $[C1RAH_8] = 1,0 \times 10^{-6}$ M; $[ACH^+] = 100,0 \times 10^{-6}$ M; pH = 1,50; $\lambda_{ex} = 287$ nm; g.f. = 900. **B)** $[C1RAH_7^-] = 4,7 \times 10^{-6}$ M; $[AC] = 38,8 \times 10^{-6}$ M; pH = 4,50; $\lambda_{ex} = 300$ nm; g.f. = 900. **C)** $[C1RAH_6^{2-}] = 18,3 \times 10^{-6}$ M; $[AC] = 38,8 \times 10^{-6}$ M (---); pH = 8,00; $\lambda_{ex} = 300$ nm; g.f. = 800. 2% v/v CH_3OH/H_2O ; 25,0 °C.

4.3.4.2. Espectros de emisión de C4RA

El estudio del efecto del pH sobre las interacciones de los pesticidas con las distintas especies ácido-base de C4RA requirió inicialmente del análisis individual de las propiedades de los espectros de emisión de la especie neutra y los poli-aniones del receptor. La Figura 4.18 demuestra la influencia del pH sobre las propiedades luminiscentes de C4RA en solución acuosa ($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{máx}}^{\text{UV}} = 287 \text{ nm}$). En condiciones ácidas (pH = 1,50 y 4,50), las especies neutra y C4RAH₇⁻ exhibieron emisiones fluorescentes levemente diferentes y mayores con respecto a la especie di-básica C4RAH₆²⁻ (pH=8,00), la cual presentó un decaimiento marcado de su fluorescencia (43% con respecto a la especie neutra) aunque sin variaciones de $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}$ a 323 nm. Las propiedades de C-butiltrisorcin[4]areno como fluoróforo fueron superiores y mostraron una mayor dependencia del pH comparado con la emisión de fluorescencia de C-metilresorcin[4]areno (Figura 4.15), ambos evaluados a iguales concentraciones en las mismas condiciones.

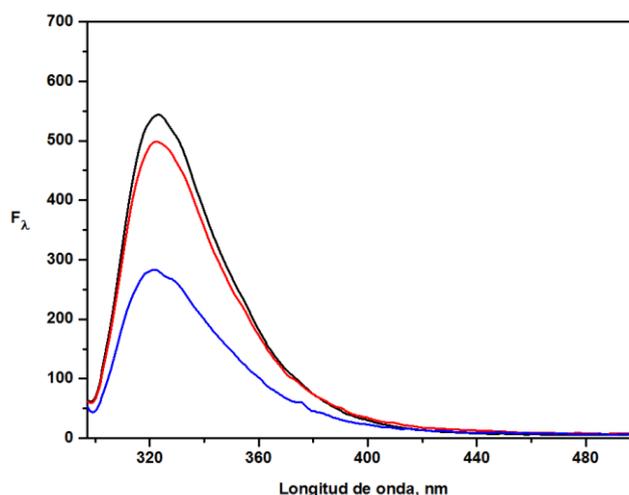


Figura 4.18. Efecto del pH sobre la emisión fluorescente de C4RA. [C4RA]₀ = 1,0×10⁻⁶ M; pH = 1,50 (—), 4,50 (—) y 8,00 (—); 2% v/v CH₃OH/H₂O; $\lambda_{\text{ex}} = 287 \text{ nm}$; g.f. = 800; 25,0 °C.

La incorporación de PC al sistema acuoso permitió trabajar convenientemente por espectroscopia de fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 287 \text{ nm}$, donde $A_{287 \text{ nm}}^{\text{PC}} < 0,002$ (250,0×10⁻⁶ M, b=1 cm) y el único fluoróforo y cromóforo fue C4RA en todos los medios evaluados. No obstante, en PBS a pH = 8,00 la fluorescencia de las mezclas de C4RA en presencia de PC debieron ser corregidas por el descuento de la señal de dispersión de luz producida por el pesticida.

Los fenómenos fotofísicos observados involucraron únicamente el *quenching* de la emisión de fluorescencia de C4RA por acción de PC. La atenuación fue observada sobre C4RAH₈ a pH = 1,50 (Figura 4.19) y sobre C4RAH₇⁻ en ABS a pH 4,50 y en PBS a pH 5,80 (Figura 4.20 A y B). La atenuación de la señal del receptor a la máxima concentración de PC evaluada fue similar en todos los casos, $Q\% \approx 37\%$. Este resultado indicó que la selectividad de C-butilresorcin[4]areno por PC es independiente del pH en condiciones ácidas. En comparación, a pH=8,00, la adición de PC produjo una menor atenuación de la fluorescencia de C4RAH₆²⁻. Con respecto a los medios ácidos, y el uso de una concentración máxima de PC equivalente a la empleada en las condiciones ácidas ($\sim 110 \times 10^{-6}$ M), produjo un comportamiento inusual caracterizado por un corrimiento batocrómico de $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}} = 322$ nm de C4RAH₆²⁻ a 345 nm en presencia de PC (Figura 4.21). Por lo tanto, las condiciones alcalinas no resultaron adecuadas para el estudio de la interacción de C4RAH₆²⁻ con PC.

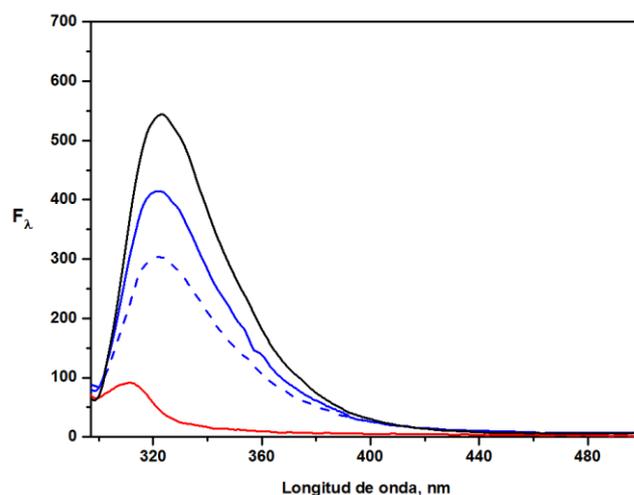


Figura 4.19. Espectros de emisión de C4RAH₈ $1,0 \times 10^{-6}$ M (—), PC $123,0 \times 10^{-6}$ M (—) y C4RAH₈ en presencia de PC $61,5 \times 10^{-6}$ M (—) y $127,4 \times 10^{-6}$ M (---) en HCl a pH = 1,50. 2% v/v CH₃OH/H₂O; $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm; g.f. = 800; 25,0 °C.

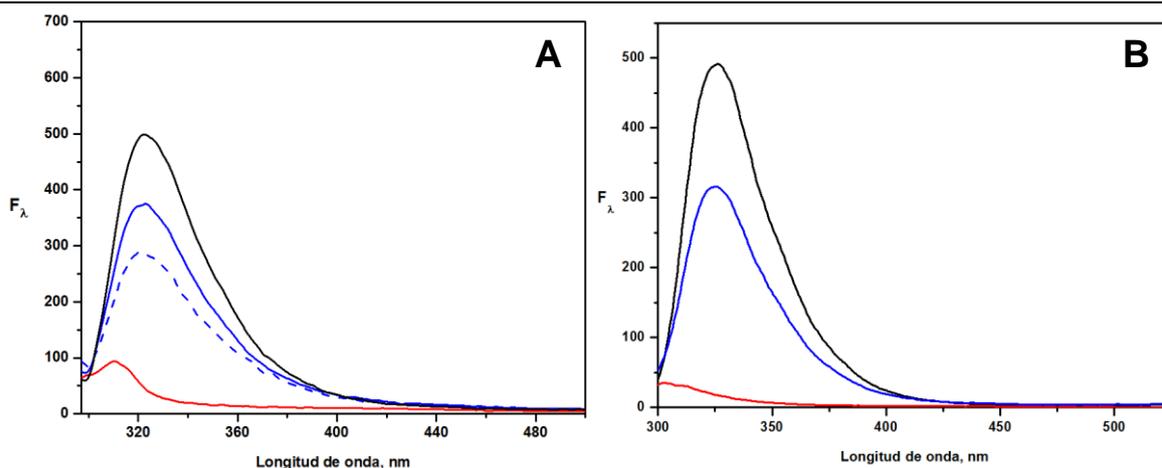


Figura 4.20. (A) Espectros de emisión de $C4RAH_7^-$ $1,00 \times 10^{-6}$ M (—), PC $123,0 \times 10^{-6}$ M (—) y $C4RAH_7^-$ en presencia de PC $61,5 \times 10^{-6}$ M (—) y $127,4 \times 10^{-6}$ M (---) en ABS a pH = 4,50. (B) Espectros de emisión de $C4RAH_7^-$ $1,00 \times 10^{-6}$ M (—), PC $107,4 \times 10^{-6}$ M (—) y $C4RAH_7^-$ en presencia de PC $107,4 \times 10^{-6}$ M (—) en PBS a pH = 5,80. 2% v/v CH_3OH/H_2O ; $\lambda_{ex} = 287$ nm; g.f. = 800; 25,0 °C.

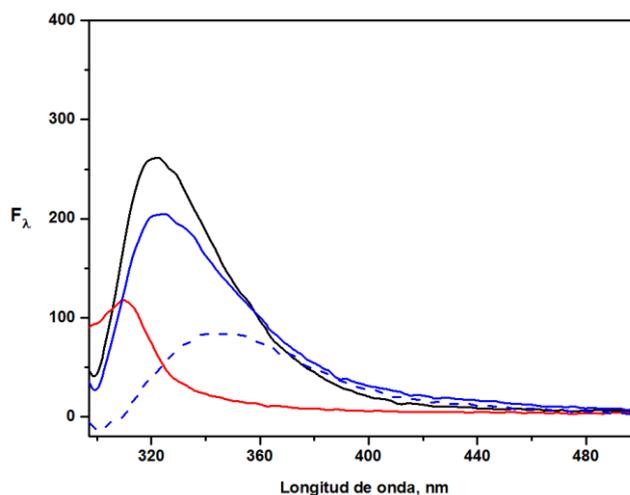


Figura 4.21. Espectros de emisión de $C4RAH_6^{2-}$ $1,0 \times 10^{-6}$ M (—), PC $123,0 \times 10^{-6}$ M (—) y $C4RAH_6^{2-}$ en presencia de PC $61,5 \times 10^{-6}$ M (—) y $123,0 \times 10^{-6}$ M (---) en PBS a pH = 8,00. 2% v/v CH_3OH/H_2O ; $\lambda_{ex} = 287$ nm; g.f. = 800; 25,0 °C.

La atenuación de la fluorescencia de $C4RAH_8$ registrada a pH = 1,50 en presencia de ACH^+ fue atribuida a la acción del pesticida como *quencher* (Figura 4.22). Coincidentemente, tanto PC neutro como ACH^+ , en concentraciones del mismo orden (123×10^{-6} M y 100×10^{-6} M, respectivamente), produjeron una atenuación similar de

C4RAH₈ a pH=1,50 (37% y 44%, respectivamente). Análogamente a las propiedades de PC, ACH⁺ no es fluorescente y no absorbe a $\lambda = 287$ nm, por lo que resultó conveniente emplear este valor como λ_{ex} a la cual la única especie luminófora es el C-butilresorcín[4]areno.

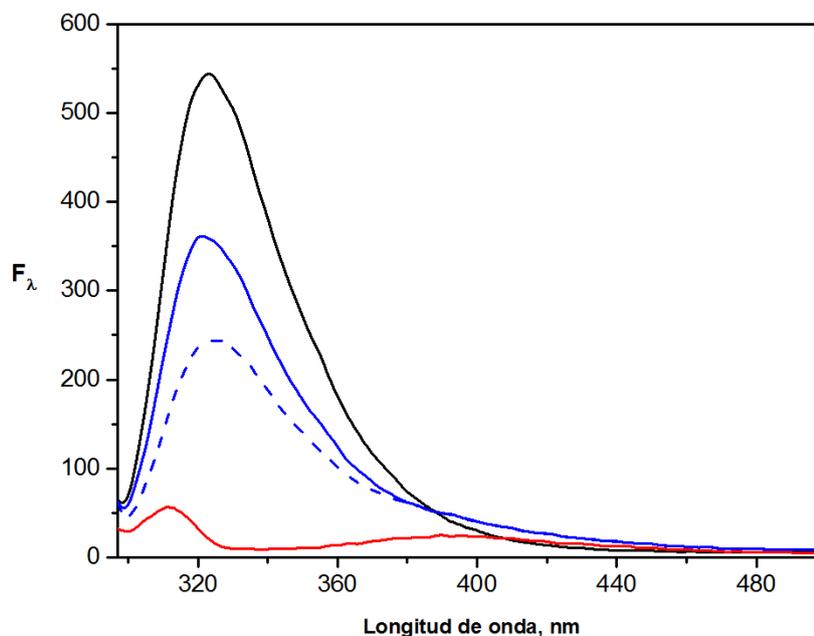


Figura 4.22. Espectros de emisión de C4RAH₈ $1,0 \times 10^{-6}$ M (—), ACH⁺ $90,0 \times 10^{-6}$ M (—) y C4RAH₈ en presencia de ACH⁺ $45,0 \times 10^{-6}$ M (—) y $100,0 \times 10^{-6}$ M (---) en HCl a pH = 1,50. 2% v/v CH₃OH/H₂O; $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm; g.f. = 800; 25,0 °C.

La evaluación de la interacción del sustrato con el receptor en ABS a pH = 4,50 dificultó el análisis de los espectros de fluorescencia debido a la aparición de la banda intensa a 392 nm generada por la emisión de la fracción de AC neutro (Figura 4.23). La interpretación de los resultados en este caso resultó conveniente empleando las intensidades relativas de las señales de I_{λ} a 322 nm, correspondiente a $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}$ de C4RAH₇⁻, dado que no existe contribución de la emisión procedente la fracción neutra de AC y no se requiere la preparación de soluciones blanco (a diferencia del trabajo con A_F). En la Figura 4.23 se muestra que el valor de $I_{322 \text{ nm}}$ de C4RAH₇⁻ $1,0 \times 10^{-6}$ M se reduce significativamente en presencia de $[\text{AC}]_0 = 45,0 \times 10^{-6}$ M (ACH⁺_{94%}/AC_{6%} a pH = 4,50) y se registra la señal procedente de AC neutro a 392 nm. El aumento de $[\text{AC}]_0$ a $90,0 \times 10^{-6}$ M prácticamente produce la atenuación total de $I_{322 \text{ nm}}$ de C4RAH₇⁻ con $Q^{\circ} = 90,9\%$; en tanto que la señal de fluorescencia residual de AC neutro a 392 nm se superpuso con la emisión de AC en ausencia del receptor. El efecto sobre las propiedades fotofísicas del receptor se atribuyó a la acción como *quencher* de la especie predominante ACH⁺.

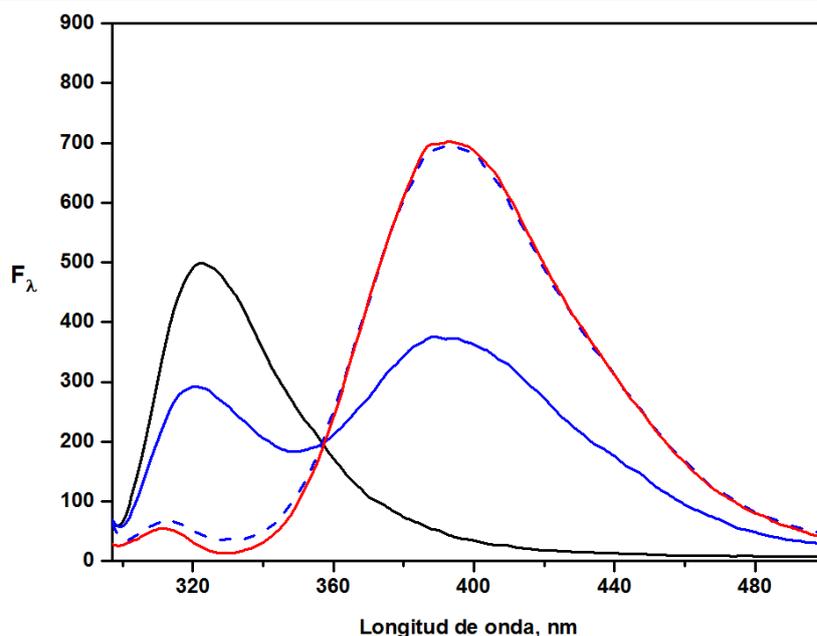


Figura 4.23. Espectros de emisión de C4RAH₈ $1,0 \times 10^{-6}$ M (—), AC $90,0 \times 10^{-6}$ M (—) y C4RAH₈ en presencia de AC $45,0 \times 10^{-6}$ M (—) y $90,0 \times 10^{-6}$ M (---) en ABS a pH = 4,50. 2% v/v CH₃OH/H₂O; λ_{ex} = 287 nm; g.f. = 800; 25,0 °C.

El solapamiento de los espectros de absorción de C4RAH₆²⁻ y AC en PBS a pH = 8,00 impidió evaluar la interacción e estas condiciones alcalinas.

En la Tabla 4.2 se resumen los efectos de *quenching* producidos por la presencia de PC o de AC (o ACH⁺) sobre las propiedades luminiscentes de los receptores neutros C1RA y C4RA y sus bases conjugadas poli-aniónicas a distintos valores de pH. Los valores se informan como F/F_0 donde F_0 y F corresponden a las emisiones de fluorescencia relativas (A_F o I_λ) del receptor en ausencia y en presencia de uno de los pesticidas, respectivamente.¹⁴ F/F_0 del receptor en ausencia de un analito es igual a 1,00 (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. *Quenching* de la fluorescencia C-alkilresorcín[4]arenos por efecto de *N*-metilcarbamatos a distintos valores de pH en 2% v/v CH₃OH/H₂O a 25,0 °C.^a

C-alkilresorcín[4]areno ^b	<i>N</i> -metilcarbamato	F/F_0 ^g			
		pH			
		1,50	4,50	5,80	8,00
C4RA	—	1,00	1,00	1,00	1,00
	PC ^c	0,56	0,60	0,40	0,44 ^h
	AC ^d	0,56	0,55 ⁱ	n.d. ^j	n.d. ^j
C1RA	—	1,00	1,00	—	1,00 ^k
	PC ^c	<i>S.E.</i> ^l	<i>S.E.</i> ^l	—	<i>S.E.</i> ^l
	AC ^f	<i>S.E.</i> ^l	0,09 ⁱ	—	0,88 ^m

^a Los detalles experimentales de cada caso se encuentran informados al pie de las Figuras 4.15 a 4.23.

^b [Receptor]_{cte} = 1,0×10⁻⁶ M, excepto C1RA en presencia de AC a pH = 4,50 ([C1RA]_{cte} = 4,7×10⁻⁶ M) y a pH = 8,00 ([C1RA]_{no cte} = 0 – 18,3×10⁻⁶ M).

^c [PC]₀ = 123,0×10⁻⁶ M y 107,4×10⁻⁶ M (pH = 5,80).

^d [AC]₀ = 90,0×10⁻⁶ M (pH = 1,50) y 45,0×10⁻⁶ M (pH = 4,50).

^e [PC]₀ = 120,6×10⁻⁶ M.

^f [AC]_{cte} = 100,0×10⁻⁶ M (pH = 1,50); [AC]_{cte} = 38,8×10⁻⁶ M (pH = 4,50); [C1RA]_{no cte} = 0 – 38,8×10⁻⁶ M (pH = 8,00).

^g Valores relativos a A_F del receptor en ausencia del pesticida. Las desviaciones estándar de las medidas por duplicado (o triplicado) fueron < 5%.

^h Valores corregidos por blancos de PC.

ⁱ F_0/F expresado en términos de I_λ .

^j n.d.: no determinado.

^k Fluorescencia relativa a AC en ausencia del receptor.

^l *S.E.* = sin efecto observado.

^m *Quenching* de AC producido por C1RAH₇⁻/C1RAH₆²⁻ (1:1).

4.3.4.3. Emisión de fluorescencia de resorcinol e influencia de PC. Efecto de la pre-organización.

Los fenómenos espectroscópicos presentados en el apartado anterior se atribuyeron a una interacción específica entre sustrato y receptor, posibilitada por la estructura pre-organizada de este último. Sin embargo, la adición de sustancias que se comportan como modificadores del medio, por ejemplo el uso de surfactantes como sensitizadores,¹⁵ también

puede producir cambios en las propiedades de absorción y/o de emisión fluorescente de ciertos analitos. Estos efectos no están asociadas a interacciones específicas, sino más bien a alteraciones en los micro-ambientes circundantes de los analitos que modifican sus respuestas ópticas.¹⁶

Con el objetivo de confirmar que los fenómenos de *quenching* de fluorescencia están asociados a una interacción específica entre la cavidad de un C-alkilresorcín[4]areno y un N-metilcarbamato, se empleó como modelo la atenuación de la fluorescencia del sistema C4RAH₇⁻ + PC en PBS a pH = 5,80 y se comparó con la respuesta dada por el par resorcínol (Re)+ PC en las mismas condiciones. La emisión de fluorescencia de Re, el constituyente principal de la cavidad hidrofóbica de C1RA y C4RA, no presentó variaciones significativas (< 7%) por la presencia de PC (Tabla 4.3). Los resultados sugieren que el comportamiento de las unidades libres de Re no es suficiente para reconocer la presencia del pesticida. En cambio, si las mismas unidades se encuentran pre-organizadas en un tetrámero cíclico, la nueva estructura permite evidenciar de manera efectiva la presencia del analito en solución. Por lo tanto, los cambios espectrales observados por las técnicas ópticas (UV-visible y fluorescencia) se atribuyeron a una interacción específica entre PC y la cavidad delimitada por las unidades de Re de C4RAH₇⁻.

Tabla 4.3. Comparación de los efectos de PC sobre la emisión de fluorescencia de Re y de C4RAH₇⁻.^a

[PC], ×10 ⁻⁶ M	<i>F/F</i> ₀ ^b	
	C4RAH ₇ ⁻ + PC ^c	Re + PC ^d
0	1,00	1,00
44,9	0,65	1,00
86,0	0,50	1,13

^a 2% v/v CH₃OH/H₂O a pH = 5,80 (PBS); λ_{ex} = 287 nm; 25,0 °C.

^b Valores relativos a *F*_A de Re y de C4RAH₇⁻ en ausencia de PC. Las desviaciones estándar de las medidas por duplicado fueron < 5%. Valores corregidos por blancos de PC.

^c [C4RAH₇⁻] = 1,0 ×10⁻⁶ M.

^d [Re] = 4,0 ×10⁻⁶ M. Moles de Re equivalentes por mol de C4RAH₇⁻.

4.3.5. Termodinámica de la asociación entre sustrato y receptor

La asociación entre un receptor macrocíclico R y un determinado sustrato S puede ocurrir por inclusión de S dentro de la cavidad de R, en cuyo caso la nueva especie se denomina *endo-complejo*. Otro tipo de interacción puede tener lugar entre los grupos funcionales externos de R con S y, para diferenciarla de la asociación anterior, en este caso se llama *exo-complejo*.^{16,17} La formación de un complejo R@S (endo o exo) puede producir modificaciones de las propiedades físicas y químicas tanto de R como de S. Diversas técnicas instrumentales se han empleado para evaluar los cambios inducidos por la complejación como espectroscopia UV-Visible, fluorescencia o RMN. El estudio de estos cambios permite determinar los parámetros termodinámicos de la reacción de complejación tales como la constante de asociación sustrato-receptor (K_A), la entropía (ΔS), la entalpía (ΔH) y la energía libre (ΔG).¹¹

Suponiendo que en la estequiometría de la reacción de complejación es 1:1, se establece el equilibrio químico descrito por la Figura 4.24 cuya constante termodinámica corresponde a K_A ^{iv} (Ec. 4.2).



Figura 4.24. Reacción de complejación huésped-receptor (S representa el sustrato; R, el receptor y S-R, el complejo).

$$K_A = \frac{[S@R]}{[S]_l [R]_l} \quad (4.2)$$

$[S@R]$, $[S]_l$ y $[R]_l$ se refieren a las concentraciones en el equilibrio del complejo, y de S y R no asociados (*l*, libres), respetivamente. El procedimiento comúnmente empleado para establecer los valores de las constantes de asociación se basa en la medición de la propiedad afectada por la interacción huésped-receptor, mediante una dada técnica, variando la concentración de uno de los componentes mientras que la concentración del otro se mantiene constante. Este procedimiento muy útil para las determinaciones de las fuerzas con

^{iv} De acuerdo a la definición termodinámica, las cantidades de las especies involucradas en el equilibrio se expresan en actividades. No obstante, las concentraciones de trabajo empleadas permiten aproximar las actividades de las especies a sus concentraciones molares.¹⁸

que ocurren las interacciones supramoleculares ha sido definido como *titulación supramolecular*.¹⁹

Las propiedades cromóforas y fluorescentes de los C-alkilresorcin[4]arenos C1RA y C4RA y de los pesticidas PC y AC permitieron cuantificar los cambios en las propiedades espectroscópicas de las especies resultantes de la complejación mediante las técnicas ópticas UV-visible y de emisión de fluorescencia. Por lo tanto, considerando los cambios espectroscópicos descritos, se determinaron las constantes de asociación entre las especies a partir de las ecuaciones correspondientes, en función de la técnica óptica empleada.

4.3.5.1. Determinaciones de K_A mediante espectroscopia de absorción UV-visible

A continuación se presenta la derivación de la ecuación usada como modelo para explicar la variación de la absorbancia en función de la concentración del compuesto macrocíclico suponiendo que la estequiometría huésped-receptor del complejo formado es 1:1. Considerando que los espectros de absorción del sustrato libre y acomplejado presentan diferencias y que todas las especies cumplen con la ley de Lambert y Beer, se elige una longitud de onda a la cual las constantes de absorptividad molar del sustrato libre y acomplejado, ϵ_S y ϵ_{S-R} , sean diferentes.

Según la ley de Lambert-Beer, la absorbancia de la solución en ausencia del receptor es proporcional a la concentración analítica del sustrato, $[S]_0$:

$$A_0 = \epsilon_S b [S]_0 \quad (4.3)$$

Adicionando el macrociclo, la absorbancia del sistema en equilibrio es la sumatoria de las contribuciones del sustrato, del receptor y del complejo.

$$A = b (\epsilon_S [S]_I + \epsilon_R [R]_I + \epsilon_{S-R} [S - R]) \quad (4.4)$$

Combinando los balances de masas del sustrato ($[S]_0 = [S]_I + [S - R]$) y del receptor ($[R]_0 = [R]_I + [S - R]$) con la Ec. 4.4 se obtiene:

$$A = b (\epsilon_S [S]_0 - \epsilon_S [S - R] + \epsilon_R [R]_0 - \epsilon_R [S - R] + \epsilon_{S-R} [S - R]) \quad (4.5)$$

Agrupando los términos relacionados a la concentración del complejo y considerando que $\Delta\epsilon_{S-R} = \epsilon_{S-R} - (\epsilon_S + \epsilon_R)$, se deriva la Ec. 4.6:

$$A = b (\epsilon_S [S]_0 + \epsilon_R [R]_0 + \Delta\epsilon_{S-R} [S - R]) \quad (4.6)$$

Esta ecuación se simplifica descontando la absorbancia correspondiente al sustrato si $\epsilon_R [R]_0 \gg \epsilon_S [S]_0$:

$$A = b (\varepsilon_R [R]_0 + \Delta\varepsilon_{S-R} [S - R]) \quad (4.7)$$

Por otra parte, combinando las expresiones de la constante de asociación y del balance de masas del receptor se obtiene:

$$[R]_l = \frac{[R]_0}{1 + K_A [S]_l} \quad (4.8)$$

Reemplazando $[S-R]$ de la Ec. 4.7 por la definición de la constante de asociación y sustituyendo el término correspondiente a $[R]_l$ por la Ec. 4.8, se derivan las ecuaciones siguientes:

$$A = b \left(\varepsilon_R [R]_0 + \frac{\Delta\varepsilon_{S-R} [R]_0 K_A [S]_l}{1 + K_A [S]_l} \right) \quad (4.9)$$

$$A = b \varepsilon_R [R]_0 + \frac{b \Delta\varepsilon_{S-R} [R]_0 K_A [S]_l}{1 + K_A [S]_l} \quad (4.10)$$

Si se trabaja en condiciones de pseudo-primer orden ($[S]_0 \gg [R]_0$), se establece la aproximación $[S]_l \approx [S]_0$ y, en consecuencia, se obtiene la Ec. 4.11 que relaciona la variación de la absorbancia a una dada longitud de onda con el cambio de la concentración total del sustrato.

$$A = A_0 + \frac{b \Delta\varepsilon_{S-R} [R]_0 K_A [S]_0}{1 + K_A [S]_0} \quad (4.11)$$

Las constantes de asociación determinadas entre C4RAH₈ y PC no se obtuvieron en condiciones de pseudo-primer orden. Se emplearon los datos experimentales y la Ec. 4.11 para estimar el valor de K_A y con la Ec. 4.12 se calculó $[S]_l$ para cada $[S]_0$ evaluada. Las determinaciones de las absorbancias de las soluciones de C4RAH₈ en presencia de PC se corrigieron descontando la contribución del sustrato libre.

$$K_A = \frac{[S-R]}{[S]_l [R]_l} = \frac{x}{([S]_0 - x)([R]_0 - x)} \quad (4.12)$$

La máxima diferencia de absorbancia (ΔA_{\max}) entre los espectros de las soluciones de C4RA en presencia y en ausencia de PC se presenta a 261,0 nm a pH = 5,80 ($\Delta A_{\max} = 0,025$); a 260,5 nm a pH = 7,00 ($\Delta A_{\max} = 0,011$) y a 287,0 nm a pH = 8,00 ($\Delta A_{\max} = 0,054$) ($b = 5$ cm en todos los casos). A esta longitud de onda se determinaron las absorbancias con el incremento de la concentración del pesticida descontando la señal correspondiente al blanco. En la figura 4.25 se muestra los valores de las absorbancias obtenidos experimentalmente de C4RA, los cuales incrementan a medida que aumenta la

concentración de PC tanto a pH = 5,80 como a pH = 7,00. La regresión no lineal de los datos empleando la Ec. 4.11 permitió determinar los valores de K_A (Figuras 4.25 y 4.26). Los valores de las constantes de asociación obtenidos entre C4RA y PC fueron $K_A = (3,1 \pm 0,4) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ a pH = 5,86, $K_A = (10 \pm 3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a pH = 7,00 y $K_A = (6 \pm 2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a pH = 8,40.

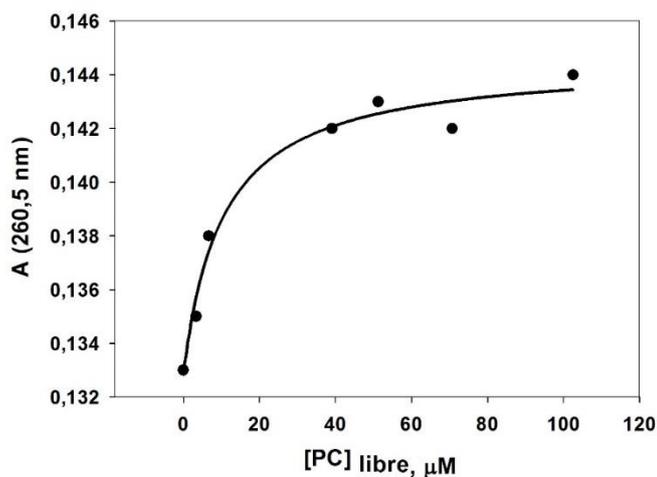


Figura 4.25. Absorbancia a 260,5 nm de $C4RAH_7^-/C4RAH_6^{2-}$ en función de la concentración de PC. $[C4RA]_0 = 4,34 \times 10^{-6} \text{ M}$; $[PC]_e = (0 - 102,52) \times 10^{-6} \text{ M}$; pH = 6,994; 2% v/v CH_3OH/H_2O ; $b = 5 \text{ cm}$; $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

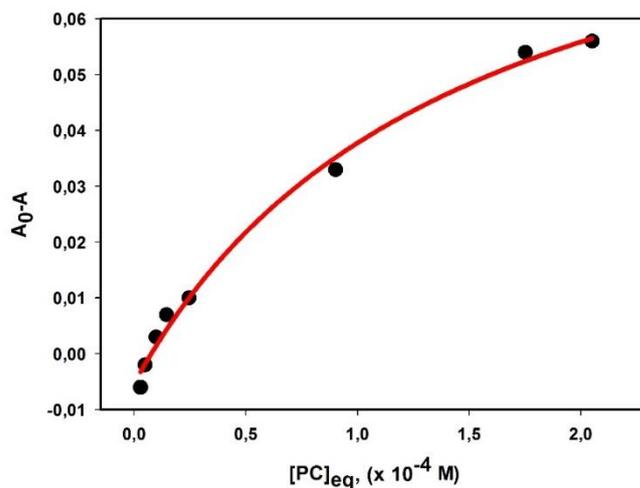


Figura 4.26. Variación de la absorbancia a 287,0 nm de $C4RAH_6^{2-}$ en función de la concentración de PC. $[C4RAH_6^{2-}] = 3,23 \mu M$; $[PC]_e = (2,81 - 205,02) \times 10^{-6} M$; pH = 8,40; 2% v/v CH_3OH/H_2O ; b = 5 cm; 25,0 °C.

El valor obtenido a pH = 5,80, un orden de magnitud superior a la constante determinada a pH = 8,00, y los valores obtenidos a partir de las medidas de fluorescencia (sección siguiente) indicaron que la determinación era imprecisa debido a que el cambio espectroscópico evaluado es muy pequeño.

4.3.5.2. Determinaciones de las constantes de *quenching* o de Stern-Volmer (K_{SV})

En general, el cambio de las propiedades fluorescentes de un receptor macrocíclico R y un dado sustrato S puede conducir a una intensificación de la intensidad de fluorescencia de S asociado con respecto a S libre como resultado del reconocimiento molecular entre las especies.^{12,20} La alteración de la señal espectroscópica es la traducción de procesos más específicos resultantes de la compartimentalización de S por formación de un endo-complejo con R.²¹ A menudo, la determinación específica del proceso que conduce a la mejora de la señal analítica es difícil de identificar dado que su origen puede deberse al efecto conjunto de diversos fenómenos tales como las restricciones de los grados de libertad de la especie incluida, alteraciones de la micropolaridad circundante, o bien, por protección de los estados excitados dentro de la cavidad.²¹ En otros casos, como los conciernen en esta Tesis, el cambio espectroscópico puede expresarse como una disminución de la intensidad de fluorescencia de R en presencia de S. Este tipo de fenómeno, denominado *quenching* de la emisión de fluorescencia, es un proceso que involucra a otra especie, el *quencher* Q, cuya presencia provoca la atenuación de la intensidad de emisión fluorescente de un fluoróforo F en el estado excitado (F^*) de manera competitiva con los procesos naturales de desactivación radiativos y no radiativos (procesos 1 y 2 en Figura 4.27).²² El tipo de *quenching* que

involucran a Q en general puede ser descripto como *estático* o *dinámico* según el mecanismo de acción de Q, aunque existen casos complejos en los que operan ambos simultáneamente. En el primer caso, la pre-formación de un complejo no fluorescente $F\sim Q$ en el estado energético basal gobernado por K_A (proceso 3, Figura 4.27) conlleva a una disminución de la fracción de F libre. En el segundo caso, F^* es desactivado por la colisión bimolecular con Q (proceso 4, Figura 4.27).^{21,23}

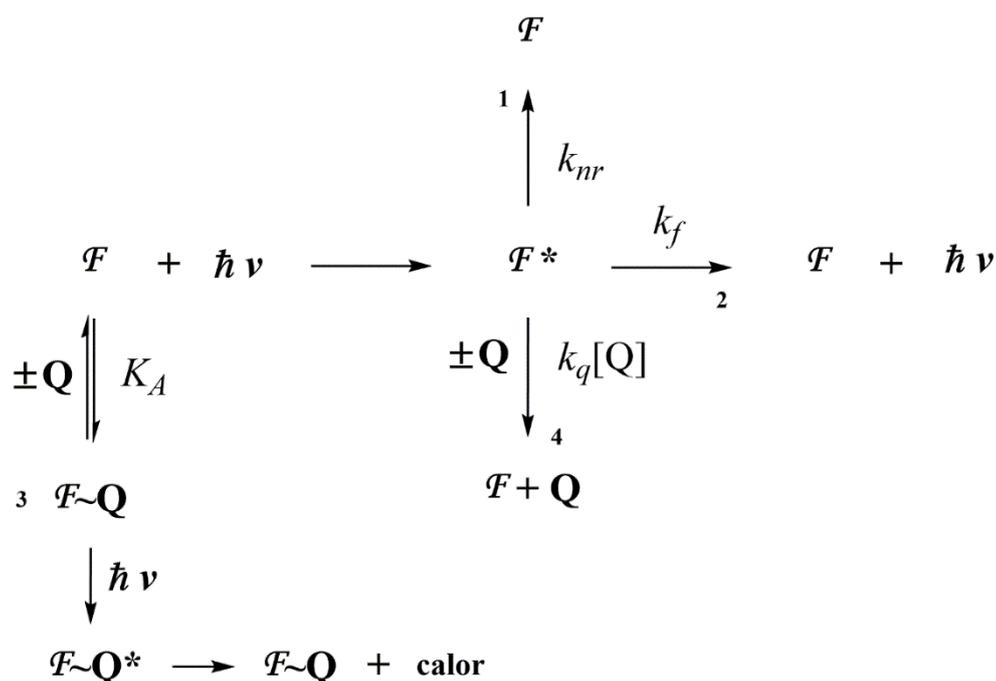


Figura 4.27. Representación esquemática de los mecanismos posibles de atenuación de la emisión de fluorescencia de un fluoróforo F . Mecanismos de desactivación intrínsecos de F^* : 1, desactivación no radiativa gobernada por la constante de velocidad k_{nr} ; 2, emisión de fluorescencia dependiente de la constante de velocidad k_f . Mecanismos de *quenching* de la fluorescencia de F^* : 3, formación de $F\sim Q$ no fluorescente en el estado basal entre F y un *quencher* Q (*quenching* estático). 4, desactivación de F^* por colisión bimolecular con Q dependiente de la constante de velocidad de *quenching* k_q y [Q] (*quenching* dinámico). $\hbar\nu$, se refiere a la absorción de luz de frecuencia ν . \hbar , constante de Plank. K_A , constante de asociación.

La dependencia de la atenuación de la fluorescencia con el incremento de la concentración del *quencher* mediante una asociación entre las especies en el estado basal se deriva a partir de la correspondiente constante termodinámica K_A (Ecuación 4.2). De acuerdo a la Ec. 2.5, la fluorescencia de una solución del receptor en ausencia de un sustrato está

dada por la Ec. 4.14 donde ξ_R representa las constantes de proporcionalidad que relaciona el valor de la intensidad de fluorescencia F_0 con la concentración del receptor.

$$F_0 = \xi_R [R]_0 \quad (4.14)$$

Asumiendo que S es el *quencher* Q, a partir del balance de masa del receptor y de la Ec. 4.14 se obtiene:

$$F_0 = \xi_R [R]_\ell (1 + K_A [Q]_\ell) \quad (4.15)$$

La intensidad de fluorescencia de una solución (F) que, además de R, contiene un determinado Q, está dada por la sumatoria de las contribuciones de las distintas especies fluorescentes en el equilibrio (Ec. 4.16) asumiendo que la fluorescencia emerge únicamente de las fracciones de las especies R y S libres dado que el complejo R~S no es fluorescente.

$$F = \xi_R [R]_\ell + \xi_Q [Q]_\ell \quad (4.16)$$

El segundo término puede despreciarse si Q no es fluorescente ($\xi_Q = 0$), o bien, descontando su contribución mediante soluciones blanco en el caso que ξ_Q no pueda ser despreciado.

El cociente entre las intensidades de fluorescencia de R en presencia de Q (Ec. 4.16 simplificada) y en ausencia de Q (Ec. 4.14) genera la Ec. 4.17.

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1}{1 + K_A [Q]_\ell} \quad (4.17)$$

La recíproca de la Ecuación 4.17 es una función lineal denominada *ecuación de Stern-Volmer* que relaciona las señales de fluorescencia relativas de R en ausencia y en presencia de Q (F/F_0) en función de la concentración de Q (Ec. 4.18).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_A [Q]_\ell \quad (4.18)$$

En condiciones de pseudo-primer donde $[Q]_0 \gg [R]_0$, se cumple que $[Q]_\ell \approx [Q]_0$. Si $[Q]_0 \approx [R]_0$, la Ec. 4.12 permite calcular $[Q]_\ell$. Es importante destacar que la derivación de la Ec. 4.18 procede de la constante de la asociación entre R y Q en el estado basal; es decir, asumiendo que el tipo de *quenching* es estático.

La derivación formal de la ecuación de Stern-Volmer surge de las consideraciones de las velocidades de todos los procesos de desactivación de un fluoróforo en el estado excitado (k_{nr} , k_f y k_q , Figura 4.27). En este sentido, la variable que engloba las constantes de velocidad de los procesos de desactivación es el tiempo de vida de F^* , τ . Los experimentos

de determinación de los tiempos de vida que una fluoróforo perdura en el estado excitado (técnica denominada *espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo*) en ausencia (τ_0) y en presencia (τ) de Q permiten discernir inequívocamente el tipo de *quenching* involucrado. En general, si $\tau = \tau_0$, la presencia de Q no afecta a F^* ; de manera que la asociación ocurre con F en el estado basal (*quenching* estático). Por el contrario, si $\tau < \tau_0$, la aceleración en la desactivación de F^* se atribuye a la colisión bimolecular con Q (*quenching* dinámico). A partir de un gráfico de τ_0/τ en función de [Q] y por regresión de los datos mediante la Ecuación 4.8 es posible determinar de manera directa la constante de velocidad de *quenching* colisional, k_q .

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (4.19)$$

En la espectroscopia de fluorescencia estacionaria, ξ es proporcional al rendimiento cuántico de fluorescencia, Φ , de la especie F, y por definición, la dependencia de Φ con las velocidades de los procesos de desactivación intrínsecos F en ausencia de Q está dada por la Ecuación 4.20.

$$\Phi_0 = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = \frac{k_r}{1/\tau_0} = k_r \tau_0 \quad (4.20)$$

El rendimiento cuántico de fluorescencia de F en presencia de Q (Φ) implica la consideración del factor $k_q[Q]$ (Ecuación 4.21).

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q[Q]} = \frac{k_r}{1/\tau_0 + k_q[Q]} \quad (4.21)$$

La relación de rendimientos cuánticos de F en ausencia (Ecuación 4.20) y en presencia de Q (Ecuación 4.21) genera la Ecuación 4.22.

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (4.22)$$

Dado que Φ es proporcional a la intensidad de fluorescencia F (Ec. 2.5), surge la igualdad $\Phi_0/\Phi = F_0/F$. En este caso, el gráfico de F_0/F en función de la concentración de Q proporciona una respuesta lineal cuya pendiente corresponde a la constante de Stern-Volmer, K_{SV} (Ecuación 4.23).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (4.23)$$

Por lo tanto, el gráfico de la respuesta instrumental obtenida, F_0/F o τ_0/τ , en función de [Q] será lineal sólo si el tipo de *quenching* que opera es puramente dinámico o estático.²⁴

Si el quenching es estático se cumple que $K_{SV} = K_A$ y las Ec. 4.18 y 4.23 son equivalentes; pero si es dinámico, $K_{SV} = k_q \tau_0$. Si ambos mecanismos ocurren simultáneamente, se obtienen desviaciones de la linealidad.²⁴

Todos los casos estudiados entre los receptores macrocíclicos polipróticos C1RA y C4RA y los pesticidas *N*-metilcarbamatos PC y AC a distintos valores de pH se caracterizaron por la atenuación de la fluorescencia. En la mayoría de los casos, el pesticida actuó como *quencher* de la emisión de los macrociclos, a excepción de C1RA en presencia AC en condiciones básicas en las que el macrociclo fue el causante de la atenuación de la fluorescencia del pesticida fluorescente. El gráfico de F_0/F (o I_0/I cuando resultó conveniente) de los receptores en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de cada pesticida (curva de Stern-Volmer) demostró en cada caso un comportamiento lineal. Los valores de las constantes de K_{SV} se obtuvieron en cada caso a partir de la regresión lineal de los datos por mínimos cuadrados empleando la Ecuación 4.23.

Los valores obtenidos de F/F_0 para C4RA en presencia de PC a distintos valores de pH (Tabla 4.2) indicaron que la de emisión de fluorescencia que resulta atenuada de manera más efectiva por PC corresponde a la especie mono-aniónica del macrociclo C4RAH₇⁻. El gráfico de los datos experimentales de F_0/F empleando una concentración constante de C4RAH₇⁻ ($1,0 \times 10^{-6}$ M) en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de PC reveló que la respuesta analítica es lineal hasta una concentración máxima del pesticida igual a $107,4 \times 10^{-6}$ M, registrándose a valores superiores desviaciones de la linealidad. Las concentraciones de trabajo del pesticida empleadas fueron dos y tres órdenes de magnitud superiores con respecto a la concentración del receptor. Por lo tanto, la aproximación $[PC]_t \approx [PC]_0$ fue válida. En la Figura 4.28 se muestra la regresión lineal de los datos graficados, la cual presentó un coeficiente de correlación aceptable ($r = 0,995$). El valor de la constante K_{SV} determinado fue $(1,12 \pm 0,03) 10^4 \text{ M}^{-1}$ en PBS a pH=5,80 (25,0 °C).

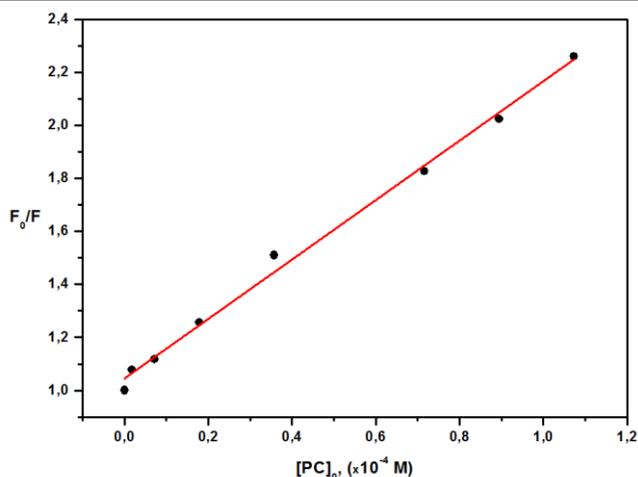


Figura 4.28. Curva de Stern-Volmer de C4RAH₇⁻ en presencia de PC en PBS a pH = 5,80. [C4RAH₇⁻]₀ = 1,0×10⁻⁶ M; [PC]₀ = (0 – 107,4)×10⁻⁶ M; λ_{ex} = 287 nm; 2% v/v CH₃OH/H₂O; 25,0 °C.

El valor de K_A determinado a partir de las mediciones de absorbancia no resultó coincidente con el valor de K_{SV} determinado por la técnica fluorimétrica debido posiblemente a que K_A fue determinado a partir de cambios espectroscópicos muy pequeños.

Cuando no ocurren cambios en las propiedades fluorescentes de las especies o éstos son muy pequeños, existen otros métodos para determinar la naturaleza del *quenching* observado. Si bien la determinación de k_q (K_{SV}/τ_0) mediante fluorescencia resuelta en el tiempo es el camino directo, no es la única alternativa. Otra metodología usualmente empleada para la elucidación del tipo de *quenching* se basa en la evaluación de la dependencia de K_{SV} , determinada por fluorescencia estacionaria, con la temperatura.^{15,22}

Los valores de F_0/F de soluciones C4RAH₇⁻ sin PC y variando la concentración del pesticida se determinaron a 5,0 y a 25,0 °C. La **Figura 4.29** indica el efecto de la temperatura sobre las curvas de Stern-Volmer cuyas pendientes fueron $(0,99\pm 0,03)\times 10^4$ M⁻¹ y $(0,93\pm 0,09)\times 10^4$ M⁻¹ a 5,0 y a 25,0 °C, respectivamente. La ecuación de Van't Hoff (Ec. 4.24) establece la dependencia de $\ln K_A$ con la temperatura. No obstante, las regresiones lineales demostraron que no existe discrepancia en los valores de K_{SV} a las temperaturas evaluadas concluyéndose que la contribución del factor entálpico (ΔH°) es pequeña y que ΔG° de complejación está gobernado principalmente por la entropía (ΔS°).

$$\ln K_A = \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{R T} \quad (4.24)$$

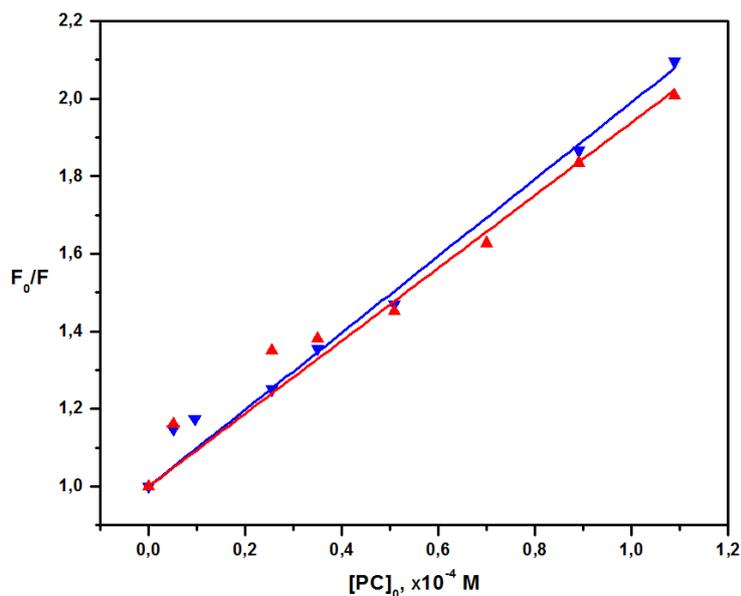


Figura 4.29. Dependencia de las curvas de Stern-Volmer de $C4RAH_7^-$ en presencia de PC con la temperatura: (∇) 5,0 °C y (\blacktriangle) 25,0 °C. $[C4RAH_7^-]_0 = 1,0 \times 10^{-6}$ M; $[PC]_0 = (0 - 108,9) \times 10^{-6}$ M; $\lambda_{ex} = 287$ nm; 2% v/v CH_3OH/H_2O ; pH = 5,80.

Con la finalidad de analizar el efecto de las especies ácido-base de C4RA sobre la eficiencia del *quenching* de la emisión del macrociclo por PC se determinaron las constantes K_{SV} en soluciones acuosas a distintos valores de pH. La **Figura 4.30** muestra las curvas de Stern-Volmer obtenidas en las distintas condiciones. Los valores de K_{SV} determinados fueron $(0,48 \pm 0,02) \times 10^4$ M⁻¹ a pH = 1,50 ($r > 0,999$); $(0,387 \pm 0,007) \times 10^4$ M⁻¹ a pH = 4,50 ($r > 0,999$) y $\sim 0,8 \times 10^4$ M⁻¹ a pH = 8,00 (valor estimado con $n = 3$, gráfico no mostrado) correspondientes a la atenuación de las intensidades de fluorescencia de $C4RAH_8$, $C4RAH_7^-$ y $C4RAH_6^{2-}$ ($1,0 \times 10^{-6}$ M en todos los casos) por PC ($0 - 123,0 \times 10^{-6}$ M), respectivamente. De acuerdo a los resultados obtenidos, la eficiencia de PC como *quencher* de la emisión de C4RA, reflejada por la magnitud de K_{SV} , es mayor cuando el receptor se encuentra en estados mono-básico en PBS a pH = 5,80 y di-básico en PBS a pH = 8,00.

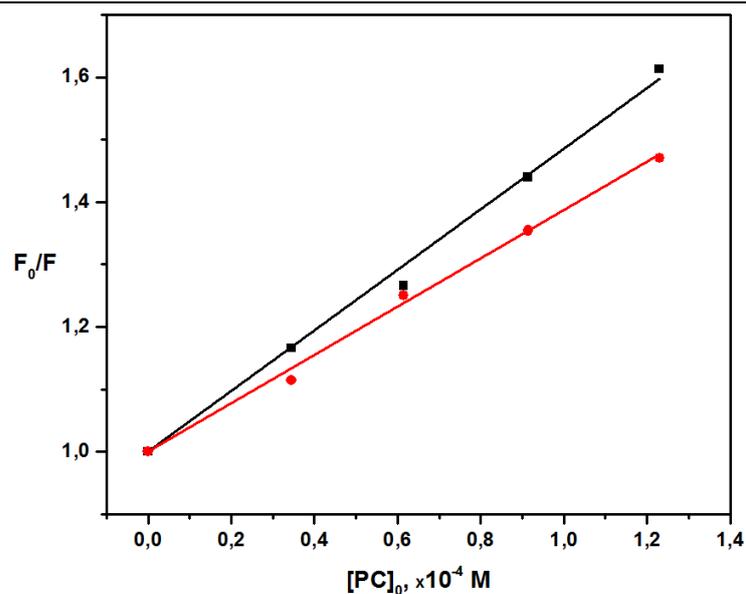


Figura 4.30. Dependencia de las curvas de Stern-Volmer de C4RA en presencia de PC con el pH: (■) pH = 1,50 y (●) pH = 4,50. [C4RA]₀ = 1,0×10⁻⁶ M; [PC]₀ = (0 – 123,0)×10⁻⁶ M; λ_{ex} = 287 nm; 2% v/v CH₃OH/H₂O; 25,0 °C.

El estudio realizado en presencia de AC reveló que el pesticida en estado protonado a valores de pH 1,50 y 4,50, también actúa como *quencher* de la fluorescencia de C4RA. La obtención de las curvas de Stern-Volmer en ambos medios demostró que la eficiencia de ACH⁺ como *quencher* de la fluorescencia de C4RAH₇⁻ a pH = 4,50 es notablemente superior con respecto a la atenuación del macrociclo neutro a pH = 1,50 (Figura 4.31). Los valores de K_{SV} determinados fueron $(0,88 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a pH = 1,50 ($r = 0,998$) y $(1,80 \pm 0,08) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a pH = 4,50 ($r = 0,998$).

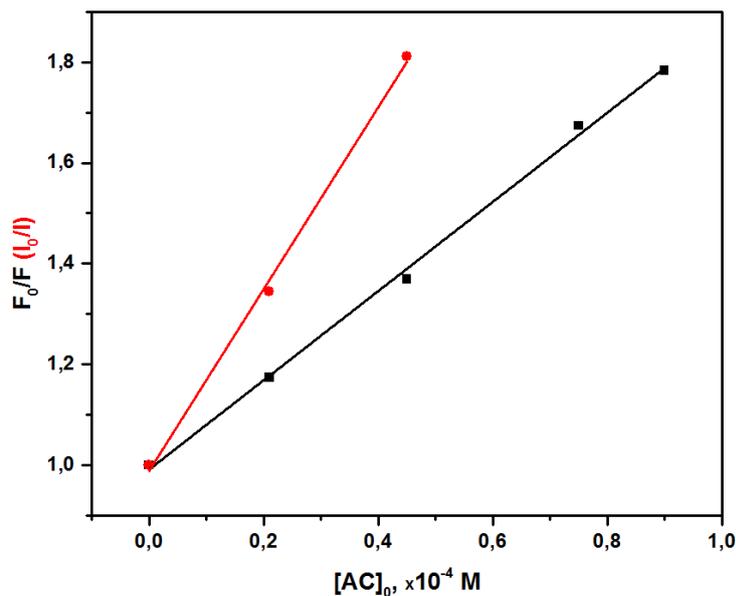


Figura 4.31. Curvas de Stern-Volmer de C4RA en presencia de ACH⁺ a pH = 1,50 (■) y a pH = 4,50 (●). [C4RA]₀ = 1,0×10⁻⁶ M; [ACH⁺]₀ = (0 – 90,0)×10⁻⁶ M (pH = 1,50); [ACH⁺]₀ = (0 – 45,0)×10⁻⁶ M (pH = 4,50) λ_{ex} = 287 nm; 2% v/v CH₃OH/H₂O; 25,0 °C.

El comportamiento demostrado por C1RA en presencia de los pesticidas fue significativamente diferente al exhibido por C4RA. Mientras que los espectros de emisión de las especies neutra y poli-aniónicas de C1RA no demostraron alteraciones a causa de PC, en presencia de AC los resultados obtenidos fueron diferentes según el medio. La interacción entre C1RAH₈ y ACH⁺ a pH = 1,50 no fue evidenciada por espectroscopia de fluorescencia. A pH = 4,50, la emisión de C1RAH₇⁻ resultó débilmente atenuada a causa de ACH⁺. En condiciones alcalinas y empleando un valor de λ_{ex} conveniente a la cual AC es la especie fluorescente, la intensidad del pesticida fue atenuada por la presencia de las especies mono-básica y di-básica del macrociclo a pH = 8,00 (= pK_a(3)). En estas condiciones, el valor de K_{SV} determinado a partir de la correspondiente curva de Stern-Volmer fue (3,27±0,07)×10⁴ M⁻¹ (r = 0,996) (Figura 4.32).

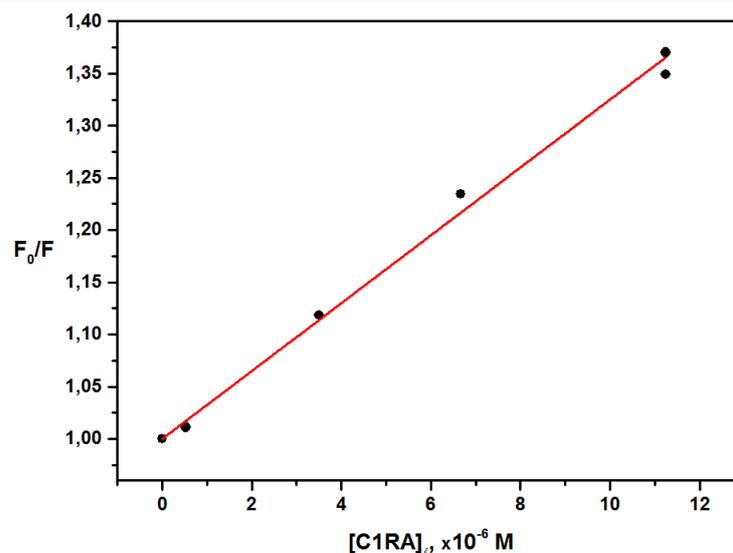


Figura 4.32. Curva de Stern-Volmer de AC en presencia de C1RAH₇⁻/C1RAH₆²⁻ (1:1) en PBS a pH = 8,00. [AC]₀ = 38,8 ×10⁻⁶ M; [C1RA]_l = (0 – 18,3)×10⁻⁶ M; λ_{ex} = 300 nm; 25,0 °C.

En la Tabla 4.4 se presentan los valores de K_{SV} obtenidos para cada sistema formado por una determinada especie ácido-base de C-alkilresorcín[4]areno en presencia de un N-metilcarbamato.

Tabla 4.4. Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) de C-alkilresorcín[4]arenos en presencia de N-metilcarbamatos determinadas a distintos valores de pH en 2% v/v CH₃OH/H₂O a 25,0 °C.^a

		$K_{SV}, \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ }^b$			
		pH			
		1,50	4,50	5,80	8,00
C4RA	PC	0,48±0,02	0,387±0,007	1,12 ± 0,03	~0,8 ^c
	AC	0,88±0,02	1,80±0,08 ^d	n.d. ^e	n.d.
C1RA	PC	ϕ ^f	n.d.	ϕ	ϕ
	AC	ϕ	(*) ^g	n.d.	3,27±0,07 ^h

^a Los detalles experimentales de cada caso se encuentran informados al pie de las Figuras 4.28 a 4.32.

^b Valores relativos a A_F del receptor en ausencia del pesticida, excepto aclaración.

^c Valores de F_0/F corregidos por blancos de PC.

^d Valores relativos a I_λ del receptor en ausencia del pesticida.

^e n.d.: no determinado.

^f Q = ausencia de *quenching*.

^g (*) El cambio espectral registrado ($I_0/I < 10\%$) no permitió la determinación de K_{SV} .

^h *Quenching* de AC producido por C1RAH₇⁻/C1RAH₆²⁻ (1:1).

4.4. DISCUSIÓN

4.4.1. Propiedades espectroscópicas de C-alquilresorcin[4]arenos

Las características de los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de una molécula provee información asociada a la estructura, la energía y la dinámica de los estados electrónicos basal y excitados de la misma.²⁵ Por ejemplo, la banda de emisión de fluorescencia de una dada transición electrónica se desplaza a longitudes de onda mayores respecto a la banda de absorción ($\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}} > \lambda_{\text{máx}}$). La diferencia entre ambas bandas se denomina corrimiento de Stokes.²⁵ En general, el perfil del espectro de emisión de fluorescencia se asemeja a la imagen especular de la banda de absorción de la transición electrónica $S_0 \rightarrow S_1$ de acuerdo a la regla de Kasha y no varía con λ_{ex} (regla de Vavilov).²⁴ El cambio de estas características en los espectros de un dado fluoróforo se asocia a un comportamiento luminiscente particular del mismo.²⁴

La Figura 4.33 demuestra que C4RA presenta un corrimiento de Stokes pequeño (38 nm), mientras que las estructuras de los espectros de absorción y emisión están caracterizadas por bandas relativamente anchas y son simétricas entre sí de acuerdo a la regla de Kasha.

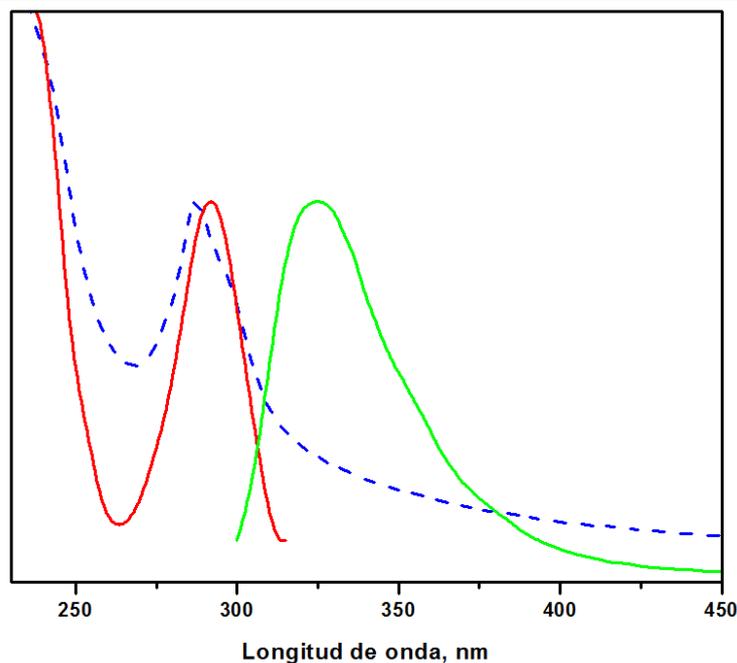


Figura 4.33. Espectros normalizados de absorción (---), excitación (rojo) y emisión de fluorescencia de C4RA7- a pH = 5,80.

La pre-organización de los anillos de resorcinol en una estructura cíclica produce un corrimiento batocrómico de $\lambda_{\text{máx}}$ de 268 nm²⁶ a 287 nm; en tanto la emisión de fluorescencia del monómero es menor con respecto al macrociclo y estos cambios espectroscópicos han sido atribuidos al aumento de la organización conformacional posibilitada por las interacciones puente de hidrógeno intramoleculares.

Las intensidades de emisión de fluorescencia de C1RA y C4RA demostraron discrepancias que fueron atribuidas a factores estructurales intrínsecos de los receptores macrocíclicos considerando que sus propiedades luminiscentes fueron evaluadas en igualdad de condiciones. Diferencias en las propiedades de absorción de C1RA con respecto a C4RA se evidenciaron en el valor de ϵ menor del receptor con sustituyentes metilo. Este resultado podría justificar la menor fluorescencia de C1RA con respecto a C4RA debido a que sus propiedades luminóforas son inferiores. Por otra parte, la caracterización de las estructuras cristalinas de C1RA indicó que los sustituyentes metilo presentan interacciones débiles entre sí permitiendo una mayor flexibilidad del macrociclo y con parámetros estructurales distorsionados con respecto a estructuras análogas con sustituyentes alquílicos de mayor longitud (Figura 3.23).²⁷ Por lo tanto, es probable que los procesos de desactivación no radiativos de C1RA en el estado excitado sean más significativos comparado con C4RA dado que la movilidad conformacional de este último está reducida por las interacciones de van der Waals entre los sustituyentes butilo.

4.4.2. Interacciones entre C-alkilresorcin[4]arenos y pesticidas N-metilcarbamatos

El efecto predominante observado fue, en general, el *quenching* de la fluorescencia de los macrociclos producido por la acción de los N-metilcarbamatos como *quencher*s. Los corrimientos de Stokes de C1RA y C4RA no varían en presencia de los pesticidas, sugiriendo que sus conformaciones en los estados basal y primer estado excitado no cambian. Sin embargo, la atenuación de la fluorescencia de un macrociclo determinado demostró ser dependiente de la naturaleza del pesticida, así como la interacción de un pesticida con un dado receptor varía según sus sustituyentes alquílicos. La influencia del pH sobre algunas de las interacciones estudiadas sugiere que la carga de las especies involucradas es crucial para la maximización de la asociación.

Uno de los resultados más sobresalientes radica en la sensibilidad de la fluorescencia de C4RA ante la acción *quencher* de cualquier pesticida independientemente de la carga del receptor, convirtiéndose en un buen candidato para aplicaciones con fines de detección de analitos específicos con escasa o nula propiedades fluorescentes como PC. En contraposición, C1RA no demostró un comportamiento que pueda ser explotado como un sensor químico. En este sentido, la incorporación de sustituyentes alquílicos que provean un macrociclo con una estructura más organizada es crucial para su aplicación como un sensor sensible ante la presencia de un *quencher*.

El análisis del efecto de la carga del macrociclo dependiente del pH del medio no demostró un efecto consistente en presencia del pesticida no ionizable PC. Aun así, pese a la ausencia de selectividad entre las distintas especies ácidas de C4RA y PC, la eficiencia de la atenuación en presencia de PC resultó mayor para la especie mono-básica a pH = 5,80 dado por PBS. El macrociclo en presencia del pesticida ionizable AC exhibió un valor de K_{SV} superior a pH = 1,50 debido posiblemente a interacciones mediadas por fuerzas intermoleculares más específicas como catión- π entre el grupo amonio y las densidades de electrones π presentes en la cavidad. El valor de la constante se duplica cuando el receptor se encuentra ionizado a pH = 4,50 lo que sugiere que cuando ambas especies se encuentran ionizadas, la interacción electrostática entre las mismas contribuye a las fuerzas catión- π existentes. La comparación con C1RA en las mismas condiciones revela que la interacción de ACH^+ con el macrociclo más simple es nula a pH = 1,50, mientras que a pH = 4,50 se evidencia una interacción aunque menos específica. Atribuyendo las discrepancias en los resultados a la mayor flexibilidad de C1RA y al menor volumen definido por su nanocavidad, se concluye que la presencia de una cavidad más organizada y profunda como la provista por C4RA es la causa de la selectividad de los analitos por el macrociclo con sustituyentes butilo y la modulación de la interacción por el pH es posible si el analito es ionizable.

Los resorcín[4]arenos han servido de receptores de diversos sustratos orgánicos tanto neutros como iónicos. Por ejemplo, las interacciones de estos macrociclos con alcoholes²⁸ y azúcares²⁹⁻³² se han justificado por las interacciones intermoleculares entre los grupos OH presentes tanto en el sustrato como el receptor. La fuerza de la interacción puede ser maximizada en solventes orgánicos debido a que la inversión de energía en la desolvatación de los grupos OH no es requerida.³³

Analitos con otros grupos polares como amina,³⁴⁻³⁶ amonio,³⁷⁻⁴⁴ o dos grupos amonio presentes en la misma molécula como el caso de los di-alquilamonios cuaternarios^{45,46} han exhibido interacciones con constantes de asociación más fuertes con resorcín[4]arenos ionizados demostrando que las interacciones electrostáticas juegan un rol fundamental en la formación de los complejos. Algunos ejemplos de analitos de relevancia biológica que han demostrado fuertes interacciones con resorcín[4]arenos son la colina,^{1,46} la carnitina^{1,46} y los neurotransmisores acetilcolina⁴⁷ y dopamina,⁴⁷ todos ellos caracterizados por la presencia de un grupo amonio en sus estructuras. Un caso sobresaliente es la interacción del tetra-fenolato de C1RA con la acetilcolina cuya K_A es $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ en solución acuosa básica (NaOD 0,5 N).¹⁰ La presencia del grupo amonio en la acetilcolina es crucial para la estabilización del estado de transición formado durante la hidrólisis del grupo acetato (Figura 4.3). Sin embargo, si el grupo amonio se encuentra asociado al tetra-fenolato, la estabilización no es posible y la hidrólisis de la acetilcolina a colina resulta inhibida.¹⁰ La presencia de sustituyentes alquilo unidos a N^+ en los amonios orgánicos favorece la interacción superficial entre las cargas opuestas ($K_A = 2,9 \pm 0,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ con tetrametilamonio), pero el valor de K_A disminuye drásticamente conforme la longitud de sustituyente aumenta debido a la que la atracción electrostática disminuye con la distancia ($0,35 \pm 0,04 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ con tetraetilamonio, 32 ± 5 con tetrapropilamonio y $< 2 \text{ M}^{-1}$ con tetrabutilamonio). En cuanto a derivados de N-alquilpiridínios, el catión N-metilpiridinio *p*-sustituido con pireno ha demostrado valores de K_A del orden a los obtenidos con acetilcolina.

La especie ACH^+ se trata de un N,N'-dimetil-N-aril amonio y el valor de K_A obtenido con $C4RAH_7^-$ ($1,80 \pm 0,08 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) es del orden al informado con tetrametilamonio en presencia de $C1RAH_4^{4-}$. En tanto que la interacción de $C1RAH_7^-$ con ACH^+ fue débil impidiendo la determinación de la constante de asociación correspondiente. La comparación demuestra que la asociación débil con el ACH^+ atribuida a la carencia de una cavidad definida en $C1RA_7^-$ y la flexibilidad del receptor puede ser compensada por interacciones electrostáticas fuertes con las especies más básicas de C1RA en condiciones alcalinas (el tetra-fenolato presenta un conformación más estabilizada con respecto a la especie totalmente protonada).

En empleo de condiciones alcalinas en las que predomina la especie di-básica de los C-alkilresorcin[4]arenos permitió demostrar que se evidencia interacción entre PC y C4RAH₆²⁻ por ambas técnicas ópticas. En condiciones básicas, las propiedades luminóforas de la especie neutra AC sólo permitió su estudio en presencia de C4RAH₆²⁻ en equilibrio con la especie mono-básica a pH = 8,00. Sin embargo, considerando que C1RA no presentó selectividad por el pesticida neutro PC en ninguno de los medios evaluados ni por la especie catiónica ACH⁺, es probable que la atenuación de la intensidad de fluorescencia de AC esté causada por la desactivación colisional del estado excitado debido a las especies básicas de C1RA presentes en solución. La ausencia de complejación en el estado basal es consistente con las superposiciones obtenidas del espectro de absorción de las soluciones mezcla y el espectro aditivo en los distintos medios evaluados.

La complejación de PC con otras receptores macrocíclicos ha sido reportada. Tal es el caso de la interacción de PC cuyos valores de K_A determinados por exaltación de la fluorescencia del pesticida fueron $(6\pm 2)\times 10^2 \text{ M}^{-1}$ con βCD y $(2,3\pm 0,3)\times 10^2 \text{ M}^{-1}$ con HPCD con estequiometría 1:1 en ambos casos.⁷ La estabilidad de estos complejos es menor a la reportada en esta Tesis con receptores metaciclofanos. Se ha propuesto que la fuerza que conduce a la complejación de PC con las CDs es el efecto hidrofóbico. En el caso de los receptores aromáticos, además del efecto hidrofóbico, las interacciones π - π entre las paredes de la nanocavidad y el sustrato podría favorecer la complejación en el estado basal. Se ha reportado que los resorcin[4]arenos son capaces de incluir moléculas de benceno tanto en su cavidad como en el portal hidrofóbico formado por sustituyentes alquílicos de cadena larga.⁴⁸

A pesar de que los cambios observados en los comportamientos espectroscópicos de los sustratos estudiados indican la formación de complejos preferentemente con C4RA, no proveen información de la estructura de la especie supramolecular. La espectroscopia de resonancia magnética nuclear permite caracterizar la relación espacial entre el huésped y el receptor en solución. Sin embargo, esta relación entre los sustratos orgánicos estudiados y C4RA en los complejos formados no pudo evaluarse experimentalmente debido a la limitada solubilidad de estos compuestos a las concentraciones necesarias para determinar los correspondientes espectros.

4.5. CONCLUSIONES

✚ La fluorescencia de AC es dependiente del pH: la especie ácida (ACH⁺) no es fluorescente, mientras que la especie básica presenta una fluorescencia elevada comparada con la de PC.

✚ La fluorescencia de C1RA, menor a la de C4RA e independiente del pH, no presentó alteraciones por la presencia de AC o de PC. No obstante, a pH = 8,00 se registró el *quenching* de la fluorescencia de AC en presencia del macrociclo y el valor de la constante determinada fue $(3,27 \pm 0,07) \times 10^4$ M.

✚ La emisión de fluorescencia de C4RA resultó atenuada tanto en presencia de PC como de ACH⁺ en todas las condiciones de pH evaluadas (1,50 – 8,00). Las magnitudes de las constantes de Stern-Volmer determinadas fueron de mismo orden ($\sim 10^4$ M), aunque los valores absolutos indican que la asociación con ACH⁺ es más fuerte, particularmente cuando C4RA se encuentra como mono-anión (pH = 4,50), debido a la interacción electrostática entre las especies.

✚ Los espectros de absorción de las distintas mezclas de C1RA con los pesticidas no presentaron cambios con respecto a los espectros aditivos, incluso a distintos valores de pH. En el caso de C4RA, en presencia de AC no hubo variaciones espectrales, mientras que con PC se registraron diferencias poco significativas entre los espectros de las mezclas y los espectros aditivos.

4.6. SECCIÓN EXPERIMENTAL

4.6.1. Instrumentos y reactivos

La homogenización de las muestras se realizó con un sonicador Testlab tb02 o Arcano.

Las mediciones de pH se realizaron con un pH-metro Thermo Orion 720A equipado con un electrodo combinado Orion con sistema Ross a 25,0 °C. Previamente el equipo se calibró a la temperatura de trabajo de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (Sección Experimental, Capítulo 2).

Los espectros de absorción UV-visible se obtuvieron empleando un espectrofotómetro Shimadzu 1800 y los espectros de emisión de fluorescencia se registraron con un espectrofluorímetro Perkin Elmer (LS 55) con anchos de rendija de emisión y de excitación de 10 nm y la sensibilidad del fotomultiplicador (g.f.) especificada en cada caso. La temperatura de las soluciones se mantuvo a 25,0 °C conectando un baño termostático con circulación Haake a los porta-celdas de ambos equipos.

Los datos adquiridos se procesaron empleando los graficadores OriginPro 2016 y SigmaPlot versión 12.0 (2011).

Los *N*-metilcarbamatos fueron reactivos de grado analítico y sus purezas fueron corroboradas mediante la determinación de sus puntos de fusión empleando un equipo electrotérmico Electrothermal.

El resorcinol y las sales orgánicas e inorgánicas empleadas para preparar las soluciones *buffer* fueron reactivos comerciales de calidad analítica. Las soluciones de HCl empleadas se prepararon por dilución de HCl comercial 37% p/p (Anedra) con agua.

Los solventes empleados fueron: agua de calidad Milli-Q y deionizada obtenida de un purificador Millipore y metanol (Sintorgan) de grado HPLC. Los valores de pH de las soluciones fueron regulados empleando HCl acuoso para pH = 1,50, *buffer* ácido acético/acetato de sodio (ABS) a pH = 4,50 y *buffer*s NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (PBS) a pH = 5,80; 7,00 y 8,00. La fuerza iónica (*I*) de las soluciones se mantuvo constante a $32,5 \times 10^{-6}$ M.

4.6.2. Procedimientos

4.6.2.1. Descripción del preparado de soluciones empleadas en espectroscopia UV-Visible.

Los espectros de absorción se registraron entre 200 nm y hasta 450 nm usando cubetas de cuarzo de 1; 4 o 5 cm de paso óptico. Los experimentos se realizaron a $(25,0 \pm 0,1)$ °C.

La dependencia de los espectros de absorción de los *N*-metilcarbamatos PC y AC con el pH en el intervalo 1,50 – 12,00 se evaluó para establecer las posibles condiciones de trabajo en medios acuosos. El valor de pK_a de AC se determinó por espectrofotometría registrando la variación de la absorbancia a 236 nm en función del pH (1,13 – 10,51) en 2% v/v CH₃OH/H₂O.

Las curvas de calibración de los pesticidas se determinaron para establecer los coeficientes de absorptividad molar a 25,0 °C en medios acuosos (2% v/v CH₃OH/H₂O) a distintos valores de pH o en CH₃OH. Las soluciones de PC se prepararon a partir de diluciones de una solución madre en CH₃OH en CH₃OH y en medio acuoso a pH = 5,80 (PBS) y las mediciones se realizaron en cubeta de 5 cm de paso óptico. Las soluciones de AC se prepararon de acuerdo al mismo procedimiento variando las concentraciones del pesticida en CH₃OH y en medios acuosos a pH = 1,50 (HCl) y a pH = 8,00 (PBS).

El efecto de los pesticidas sobre las propiedades de absorción de los receptores inicialmente se evaluó registrando los espectros de soluciones preparadas por separado del sustrato y del receptor en 2% v/v CH₃OH/H₂O a un determinado pH y comparando el espectro aditivo resultante con el espectro de una mezcla de ambos componentes a las mismas concentraciones y en las condiciones (las concentraciones empleadas se encuentran

especificadas en las Figuras 4.11 y 4.12). El efecto de PC sobre la absorción de C4RA se analizó determinando los espectros de soluciones de C4RA a pH = 5,80 con distintas concentraciones de PC ($0 - 87,62 \times 10^{-6}$ M) mientras que las concentraciones del receptor se mantuvo constante a $5,60 \times 10^{-6}$ M. A pH = 7,00, la concentración empleada de C4RA fue $4,34 \times 10^{-6}$ M y las concentraciones de PC se variaron en el intervalo $0 - 102,52 \times 10^{-6}$ M. Las curvas de calibración de PC en las condiciones empleadas se determinaron para descontar las señales debidas al pesticida en el procesamiento cuantitativo de los datos.

4.6.2.2. Descripción del preparado de soluciones empleadas en espectroscopia de emisión de fluorescencia.

Las mediciones de fluorescencia se realizaron usando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los parámetros utilizados para la adquisición de los espectros de emisión fueron: 10 nm de ancho de rendijas de excitación y emisión, y una velocidad de barrido de 500 nm/min. La ganancia del fotomultiplicador se varió según cada caso (valores informados en las Figuras 4.15 a 4.24). Las λ_{ex} se eligieron previo análisis de los espectros de absorción de cada caso estudiado. Las soluciones de C1RA y de C4RA en ausencia de sustratos fueron excitados a los valores de sus $\lambda_{m\acute{a}x}$ (290 nm y 287 nm, respectivamente). Las condiciones experimentales empleadas para evaluar el efecto del pH sobre las propiedades luminiscentes de los macrociclos se encuentran detalladas en las Figuras 4.16 y 4.19.

La evaluación del efecto de PC sobre la emisión de fluorescencia de C1RA se llevó a cabo preparando soluciones del macrociclo ($1,0 \times 10^{-6}$ M) en 2% v/v CH₃OH/H₂O a tres valores de pH (1,50; 5,80 y 8,00) y adicionando alícuotas de soluciones de PC con una concentración final máxima de $120,0 \times 10^{-6}$ M. Además, a pH = 5,80 se evaluó el efecto de la variación de la concentración de C1RA ($0,9 \times 10^{-6}$ M; $1,8 \times 10^{-6}$ M y $2,5 \times 10^{-6}$ M) en presencia de PC $204,4 \times 10^{-6}$ M. Los parámetros instrumentales empleados fueron $\lambda_{ex} = 290$ nm y g.f. = 900. PC no presentó absorción a λ_{ex} . El efecto de AC sobre la emisión de fluorescencia de C1RA se evaluó en 2% v/v CH₃OH/H₂O a tres valores de pH. A pH = 1,50, las concentraciones evaluadas fueron C1RA $1,0 \times 10^{-6}$ M y AC $100,0 \times 10^{-6}$ M, y la λ_{ex} empleada fue 287 nm a la cual el sustrato no absorbe. A pH = 4,50, la concentración empleada de C1RA fue $4,7 \times 10^{-6}$ M y de AC fue $38,8 \times 10^{-6}$ M, y la solución mezcla se excitó a 300 nm para minimizar la absorción de la fracción de AC neutro. A pH = 8,00, la concentración de AC empleada fue $38,8 \times 10^{-6}$ M y se mantuvo constante, mientras se varió la concentración del receptor ($0 - 18,3 \times 10^{-6}$ M). Las soluciones se excitaron a 300 nm, siendo AC el fluoróforo y las absorbancias de las soluciones fueron $\leq 0,041$.

El efecto de PC sobre la fluorescencia de C4RA se determinó preparando dos soluciones en 2% v/v CH₃OH/H₂O a tres valores de pH (1,50; 4,50; 5,80 y 8,00): una del

macrociclo ($1,0 \times 10^{-6}$ M) y otra de igual concentración de C4RA en presencia de PC ($\leq 123,0 \times 10^{-6}$ M). Las distintas concentraciones de PC se obtuvieron por dilución de la solución mezcla y enrasando con la solución del macrociclo. De esta manera, fue posible minimizar la variación de la concentración del receptor en la preparación de las soluciones individuales.¹⁹ Los parámetros instrumentales empleados fueron $\nu_{\text{g.f.}} = 900$ y $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm, donde PC no presentó absorción. Mediante el mismo procedimiento, se prepararon las soluciones C4RA ($1,0 \times 10^{-6}$ M) en presencia de AC ($\leq 90,0 \times 10^{-6}$ M, ver Figura 4.33) en 2% v/v CH₃OH/H₂O a valores de pH 1,50 y 4,50. Los parámetros instrumentales usados fueron $\nu_{\text{g.f.}} = 800$ y $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm, y AC no presentó absorción a λ_{ex} .

El análisis cuantitativo de los espectros de emisión se realizó en función del área bajo la curva, excepto para el sistema C4RA@AC a pH = 4,50, el cual se analizó usando la intensidad de la señal a 322 nm. Los valores absolutos obtenidos fueron siempre relativizados con respecto al área (o intensidad) de una solución de referencia que consistió en C4RA $1,0 \times 10^{-6}$ M en 2% v/v CH₃OH/H₂O a pH = 5,80 (PBS, $I = 32,5 \times 10^{-6}$ M).

4.7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ballester, P.; Shivanyuk, A.; Far, A. R.; Rebek, J. A Synthetic Receptor for Choline and Carnitine. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14014.
- (2) Hof, F.; Trembleau, L.; Ullrich, E. C.; Rebek, Jr., J. Acetylcholine Recognition by a Deep, Biomimetic Pocket. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3150.
- (3) Ballester M. A., P. . S. Hybrid Cavitand-Resorcin[4]arene Receptor for the Selective Binding of Choline and Related Compounds in Protic Media. *Org Lett* **2006**, *8* (16), 3477.
- (4) Kazakova, E. K.; Ziganshina, A. U.; Muslinkina, L. A.; Morozova, J. E.; Makarova, N. A.; Mustafina, A. R.; Habicher, W. D. The Complexation Properties of the Water-Soluble Tetrasulfonatomethylcalix[4]resorcinarene toward α -Aminoacids. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *43*, 65.
- (5) Kubinyi, M.; Brátán, J.; Grofcsik, A.; Biczók, L.; Poór, B.; Bitter, I.; Grün, A.; Bogáti, B.; Tóth, K. Proton Transfer and Supramolecular Complex Formation between Nile Blue and tetraundecylcalix[4]resorcinarene - a Fluorescence Spectroscopic Study. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2002**, *2*, 1784.
- (6) Tanausú Vega Morales; Sarah Montesdeoca Esponda; José Juan Santana Rodríguez; Snezhana Efremova Aaron; Jean-Jacques Aaron. Luminescence Methods for Study and Determination of Pollutants in the Environment. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* **2010**, *29*, 1.
- (7) Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. Determination of Poorly Fluorescent Carbamate Pesticides in Water, Bendiocarb and Promecarb, Using Cyclodextrin Nanocavities and Related Media. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 63.
- (8) Morais, S.; Dias, E.; Pereira, M. D. L. Carbamates: Human Exposure and Health Effects. In *The Impact of Pesticides*; Jokanovic, Ed.; AcademyPublish.org, 2012.

- (9) Tomašević, A. V.; Gašić, S. M. 3. Photoremediation of Carbamate Residues in Water. In *Insecticides – Basic and Other Applications*; 2010.
- (10) Schalley, C. A. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Wiley-VCH, 2007.
- (11) Pacioni, N. L. N. L.; Veglia, A. V. A. V. Determination of Carbaryl and Carbofuran in Fruits and Tap Water by Beta-Cyclodextrin Enhanced Fluorimetric Method. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 488, 193.
- (12) Pacioni, N. L. Pesticidas En Sistemas Organizados: Propiedades Físicoquímicas Y Aplicaciones Analíticas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba: Argentina, 2007.
- (13) Bernard Valeur; Mário Nuno Berberan-Santos. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2 edition.; Wiley-VCH Verlag & Co.: Weinheim, Germany, 2012.
- (14) Yang, Q.; Yan, C.; Zhu, X. A Fluorescent Chemosensor for Paeonol Based on Tetramethoxy Resorcinarene Tetraoxyacetic Acid. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, 191, 53.
- (15) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, 2009.
- (16) Atwood, J. L.; Steed, J. W. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, 1st ed.; CRC Press, 2004.
- (17) Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, K. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry: From Supramolecules to Nanotechnology*; John Wiley & Sons, 2007.
- (18) Thordarson, P. Determining Association Constants from Titration Experiments in Supramolecular Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1305.
- (19) Sueldo Ocelllo, V. N.; Veglia, A. V. Cucurbit[6]uril Nanocavity as an Enhanced Spectrofluorimetric Method for the Determination of Pyrene. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 689, 97.
- (20) Memon, N.; Balouch, A.; Hinze, W. L. Fluorescence in Organized Assemblies. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R. A., Ed.; John Wiley & Sons, 2008.
- (21) Frajji, L. K.; Hayes, D. M.; Werner, T. C. Static and Dynamic Fluorescence Quenching Experiments for the Physical Chemistry Laboratory. *J. Chem. Educ.* **1992**, 69 (5).
- (22) Das, S.; Powe, A. M.; Baker, G. A.; Valle, B.; El-Zahab, B.; Sintim, H. O.; Lowry, M.; Fakayode, S. O.; McCarroll, M. E.; Patonay, G.; et al. Molecular Fluorescence, Phosphorescence, and Chemiluminescence Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 597.
- (23) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, 2006.
- (24) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 1 edition.; Wiley-VCH: Weinheim ; New York, 2001.
- (25) Blanco, S. E.; Almandoz, M. C.; Ferretti, F. H. Determination of the Overlapping pKa Values of Resorcinol Using UV-Visible Spectroscopy and DFT Methods. *Spectrochim. Acta - Part Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, 61, 93.

- (26) Tunstad, L. M.; Tucker, J. A.; Dalcanale, E.; Weiser, J.; Bryant, J. A.; Sherman, J. C.; Helgeson, R. C.; Knobler, C. B.; Cram, D. J. Host-Guest Complexation. 48. Octol Building Blocks for Cavitands and Carcerands. *J Org Chem* **1989**, *54*, 1305.
- (27) Kobayashi, K.; Asakawa, Y.; Kikuchi, Y.; Toi, H.; Aoyama, Y. CH- π Interaction as an Important Driving Force of Host-Guest Complexation in Apolar Organic Media. Binding of Monools and Acetylated Compounds to Resorcinol Cyclic Tetramer As Studied by ^1H NMR and Circular Dichroism Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2648.
- (28) Striegler, S. Selective Carbohydrate Recognition by Synthetic Receptors in Aqueous Solution. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 81.
- (29) He R. J.; Escobedo, J. O. . B., P. A. ..Kim, K. K. ...St.Luce, N. N. ..Davis, C. J. ..Lewis, P. T. ..Fronczek, F. R. ..Melancon, B. J. ..Mrse, A. A. ..Treleaven, W. D. ..Strongin, R. M. ..M. ..Johnson. Chromophore Formation in Resorcinarene Solutions and the Visual Detection of Mono- and Oligosaccharides. *J Am Chem Soc* **2002**, No. 124, 5000.
- (30) Kobayashi, K.; Asakawa, Y.; Kato, Y.; Aoyama, Y. Complexation of Hydrophobic Sugars and Nucleosides in Water with Tetrasulfonate Derivatives of Resorcinol Cyclic Tetramer Having a Polyhydroxy Aromatic Cavity: Importance of Guest-Host CH- π Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10307.
- (31) Kikuchi, Y.; Tanaka, Y.; Sutarto, S.; Kobayashi, K.; Toi, H.; Aoyama, Y. Highly Cooperative Binding of Alkyl Glucopyranosides to the Resorcinol Cyclic Tetramer due to Intracomplex Guest-Guest Hydrogen-Bonding: Solvophobicity/solvophilicity Control by an Alkyl Group of the Geometry, Stoichiometry, Stereoselectivity, and Cooperativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10302.
- (32) Timmerman, P.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. Resorcinarenes. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2663.
- (33) Waldemar Iwanek; Mariusz Urbaniak. The Complexes of Tetramethylresor[4]arene with Amines. Effect of the Amine Concentration on the Complex Composition. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 10377.
- (34) Waldemar Iwanek; Roland Fröhlich; Mariusz Urbaniak; Christian Näther; Jochen Mattay. The Complexes of Tetramethylresorc[4]arene with Amines, Amino Alcohols and Pyridine. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 14031.
- (35) Danil de Namor P. M.; Garrido Pardo, M. T. . P. T., D. A. ..Sueros Velarde, F. J. .. A. F. ..Blackett. From Molecules to Electrolytes. Electrochemical and Thermodynamic Aspects of the Interaction of Phenol and Resorcinol Based Calixarenes with Amines. *Pure Appl Chem* **1993**, *65* (3).
- (36) Inouye, M.; Hashimoto, K.; Isagawa, K. Nondestructive Detection of Acetylcholine in Protic Media: Artificial-Signaling Acetylcholine Receptors. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (12), 5517.
- (37) Koh, K. N.; Araki, K.; Ikeda, A.; Otsuka, H.; Shinkai, S. Reinvestigation of Calixarene-Based Artificial-Signaling Acetylcholine Receptors Useful in Neutral Aqueous (Water/Methanol) Solution. *J Am Chem Soc* **1996**, *118*, 755.
- (38) Späth, A.; König, B. Molecular Recognition of Organic Ammonium-Ions in Solution Using Synthetic Receptors. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*.
- (39) Morozova, Y. E.; Shalaeva, Y. V.; Makarova, N. A.; Syakaev, V. V.; Kazakova, E. K.; Kononov, A. I. Formation of Ionic Associates from Oppositely Charged

- calix[4]resorcinarene Host Molecules in the Presence of Guest Molecules. *Russ Chem Bull Int Ed* **2009**, 58 (1), 95.
- (40) Morikawa, O.; Yamaguchi, H.; Katsube, Y.; Abe, K.; Kobayashi, K.; Konishi, H. Host-Guest Complexation Behavior of Resorcinarenes with Tetraalkylammonium Ions and *N*-Methylpyridinium Ions in Methanol: The Effect of Bulky Hydrophobic Substituents at the Extra-Annular Positions. *Phosphorus Sulfur Silicon* **2006**, 181, 2877.
- (41) Atwood, J. L.; Szumna, A. Cation- π Interactions in Neutral calix[4]resorcinarenes. *J. Supramol. Chem.* **2002**, 2, 479.
- (42) Mustafina, A. R.; Fedorenko, S. V.; Makarova, N. A.; Kazakova, E. K.; Bazhanova, Z. G.; Kataev, V. E.; Konovalov, A. I. The Inclusion Properties of a New Watersoluble Sulfonated Calix[4]resorcinarene towards Alkylammonium and *N*-Methylpyridinium Cations. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, 40, 73.
- (43) Schneider, H.-J.; Kramer, R.; Simova, S.; Schneider, U. Solvent and Salt Effects on Binding Constants of Organic Substrates in Macrocyclic Host Compounds. A General Equation Measuring Hydrophobic Binding Contributions. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6442.
- (44) Mansikkamäki, H.; Schalley, C. A.; Nissinen, M.; Rissanen, K. Weak Interactions between Resorcinarenes and Diquaternary Alkyl Ammonium Cations. *New J Chem* **2005**, 29, 116.
- (45) Schneider, H.-J.; Güttes, D.; Schneider, U. Host-Guest Complexes with Water-Soluble Macrocyclic Polyphenolates Including Induced Fit and Simple Elements of a Proton Pump. *J Am Chem Soc* **1988**, 110, 6449.
- (46) Demura, M.; Yoshida, T.; Hirokawa, T.; Kumaki, Y.; Aizawa, T.; Nitta, K.; Bitter, I.; Tóth, K. Interaction of Dopamine and Acetylcholine with an Amphiphilic Resorcinarene Receptor in Aqueous Micelle System. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 1367.
- (47) Schneider U., H.-J. S. Inhibition of Choline Acetate Hydrolysis in the Presence of a Macrocyclic Polyphenolate. *J Org Chem* **1987**, 52, 1613.
- (48) K. Sugiyama; K. Esumi; Y. Koide. Aqueous Properties of Resorcinol-Type Calix[4]arenes Bearing Four Alkyl Side Chains. *Langmuir* **1996**, No. 12, 6006.

Capítulo 5

Atenuación de la emisión
fluorescente de
C-butilresorcin[4]areno por
promecarb.

Aplicaciones Analíticas

5.1. INTRODUCCIÓN

El impacto ambiental de diversos contaminantes en términos de distribución y concentración era años atrás desconocido o considerado poco significativo debido al escaso avance en técnicas de detección y determinación.¹ Sin embargo, el crecimiento de la población mundial reflejado por el desarrollo intensivo de la agricultura y la urbanización eventualmente provocó que niveles alarmantes y crecientes de nuevos contaminantes –los *contaminantes emergentes*– comenzaran a ser detectados en el suelo, las fuentes de agua superficial y subterránea y en el aire.² La presencia en la naturaleza de una amplia variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos en muy bajas concentraciones (micro-contaminantes) constituye en la actualidad un problema muy serio debido a sus potenciales efectos adversos y la toxicidad que pueden presentar para la biota en general.¹ Por lo tanto, diversas organizaciones han surgido con la finalidad de regularizar mediante normas el uso correcto, racional y el tratamiento posterior a su uso de ciertos compuestos químicos considerados contaminantes.²

La agricultura es una de las pocas actividades en la que se descargan deliberadamente en el medio ambiente productos químicos para acabar con algunas formas de vida. El uso de pesticidas, ya sean sintéticos o biopesticidas (derivados de fuentes naturales), es importante en la agricultura para la protección de los cultivos antes y/o después de la cosecha, para la prevención de su deterioro durante almacenamiento y/o transporte de la producción agrícola³ y para mejorar la productividad dado que eliminan o retardan el desarrollo de plagas que interfieren con el crecimiento de cultivos, árboles, u otra vegetación de interés para la población humana. Si bien los plaguicidas juegan un rol clave en la producción agrícola, su uso indebido e inadecuado implica una amenaza para los agricultores que los aplican, para los consumidores de los productos generados y para el medio ambiente en general (suelo, agua y aire) por lo que su aceptación social está actualmente seriamente cuestionada.⁴ En este marco, organizaciones internacionales tales como la Unión Europea (UE), la Comisión del Código Alimentario (Codex), la Agencia de Protección Ambiental Norteamericana (US EPA), entre otras, establecen leyes regulatorias acerca del uso de pesticidas y los límites máximos de residuos tolerados (LMRs) para satisfacer la demanda social de seguridad sanitaria en el consumo de productos directos procedentes de la agroindustria, productos procesados y la preservación de la calidad del ambiente.¹ El avance en el desarrollo de nuevas técnicas analíticas y las mejoras de las existentes ha permitido que contaminantes que anteriormente no eran detectados pasen a ser determinados con límites de detección (L_D) cada vez menores. La necesidad de métodos y procedimientos analíticos sensibles y selectivos para la identificación, detección y determinación de pesticidas es crucial para asegurar que si se encuentran presentes sea en niveles inferiores a lo establecido

según cada LMR. Además, su detección es crucial para la determinación de sus ciclos en los sistemas ambientales tales como su distribución, degradación, acumulación, persistencia y otras características, tanto en el ambiente como en sistemas vivos, y de esta manera establecer los niveles de toxicidad de los compuestos padres como los de sus productos de bio- y foto-degradación.⁵

5.1.1. Determinación analítica de pesticidas

En la Unión Europea, los valores de LMR permitidos por cada pesticida en el agua apta para consumo humano oscilan entre 0,1 µg/L y 0,5 µg/L, respectivamente.⁶ Los análisis cromatográficos multi-residuos de pesticidas permanecen entre las herramientas preferidas de identificación y determinación,⁷ aunque la espectroscopia luminiscente (emisión de fluorescencia y fosforescencia) también ha cobrado gran relevancia en los últimos años como método útil para el estudio y la cuantificación de estas especies químicas.⁵⁻⁷ Entre las ventajas analíticas que presentan los métodos luminiscentes se destacan su elevada sensibilidad, relativa selectividad, simpleza, bajo costo y adaptabilidad para el acoplamiento a otras técnicas.⁸ Los micro-contaminantes de diversas familias químicas han sido determinados en bajas concentraciones mediante el uso de técnicas analíticas luminiscentes en matrices ambientales complejas como la atmósfera, fuentes naturales de agua, el suelo e incluso en organismos vivos, prescindiendo en algunos casos de procesos exhaustivos de eliminación de interferentes.⁵

Los métodos analíticos luminiscentes pueden ser clasificados en dos grandes grupos: los métodos estáticos o estacionarios y los dinámicos.⁵ Algunos ejemplos se indican en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Métodos analíticos estáticos y dinámicos basados en luminiscencia.

Métodos estacionarios	Técnicas de flujo con detección luminiscente
Fluorescencia	HPLC
Fosforescencia	Electroforesis capilar
Quimioluminiscencia	Análisis de inyección en flujo (FIA)
Inmunosensores	
Biosensores bioluminiscentes	

Los análisis estandarizados de muchos pesticidas involucran la aplicación de HPLC con detección fluorescente (HPLC-FD) aunque la aplicación directa de esta técnica a menudo se ve imposibilitada debido a que la mayoría de los pesticidas presentan una fluorescencia nativa débil. Diversas metodologías de análisis indirecto han sido propuestas para mejorar la sensibilidad analítica espectrofluorimétrica de estos compuestos y la mayoría implica la derivatización química o fotoquímica (Figura 5.1).^{7,9} La fluorescencia inducida fotoquímicamente (PIF) permite que un analito con fluorescencia escasa o nula genere la formación de un foto-producto muy fluorescente al ser irradiado con luz UV de alta energía. Este procedimiento se ha adaptado a los análisis estáticos y dinámicos.⁵

Los métodos de derivatización química a menudo requiere de etapas previas de preparación de la muestra que implican la extracción de los analitos y su pre-concentración. La eficiencia de las técnicas de extracción empleada es crucial en muchas aplicaciones que permiten el análisis correcto de pesticidas y herbicidas en sistemas acuáticos, suelo, alimentos y otras matrices complejas. Las técnicas de extracción más simples consisten en una etapa de extracción con un solvente orgánico y diferentes sales, y una fase de extracción líquido-líquido. Sin embargo, el uso de estos procedimientos implica el uso de volúmenes elevados de solventes orgánicos, requieren tiempo y son procedimientos costosos, además de la generación de residuos y la incorrecta eliminación de los interferentes presentes en la matriz analizada. La incorporación de una etapa de dispersión en fase sólida permite la eliminación de agua presente en la muestra y una limpieza o *clean-up* debido a la adición de una sal anhidra y un adsorbente (C18, carbón activado, celite, etc.).¹⁰ Esta metodología generalmente permiten salvaguardar algunas de las desventajas mencionadas con la utilización de métodos de extracción líquido-líquido únicamente.¹¹

Resultados prometedores han sido obtenidos empleando sistemas organizados.^{5,12-}
¹⁴ Entre ellos se destacan las aplicaciones analíticas de receptores macrocíclicos tales como ciclodextrinas,^{15,16} cucurbiturilos^{17,18} y calixarenos^{19,20} y el uso de surfactantes.¹⁴ Por ejemplo, las ciclodextrinas han sido empleadas para la detección y cuantificación de rodenticidas, pesticidas *N*-metilcarbamatos por formación de complejos huésped-receptor fluorescentes. El calix[4]areno y *p-t*-butilcalix[4]areno demostraron que establecen interacciones supramoleculares con pesticidas neutros derivados de benzotrifluoruro y estos receptores demostraron ser candidatos promisorios para su uso como sensores químicos.⁵ Además, la detoxificación de fuentes de agua naturales ha sido posible mediante la complejación de pesticidas con sulfonatocalixarenos.²¹

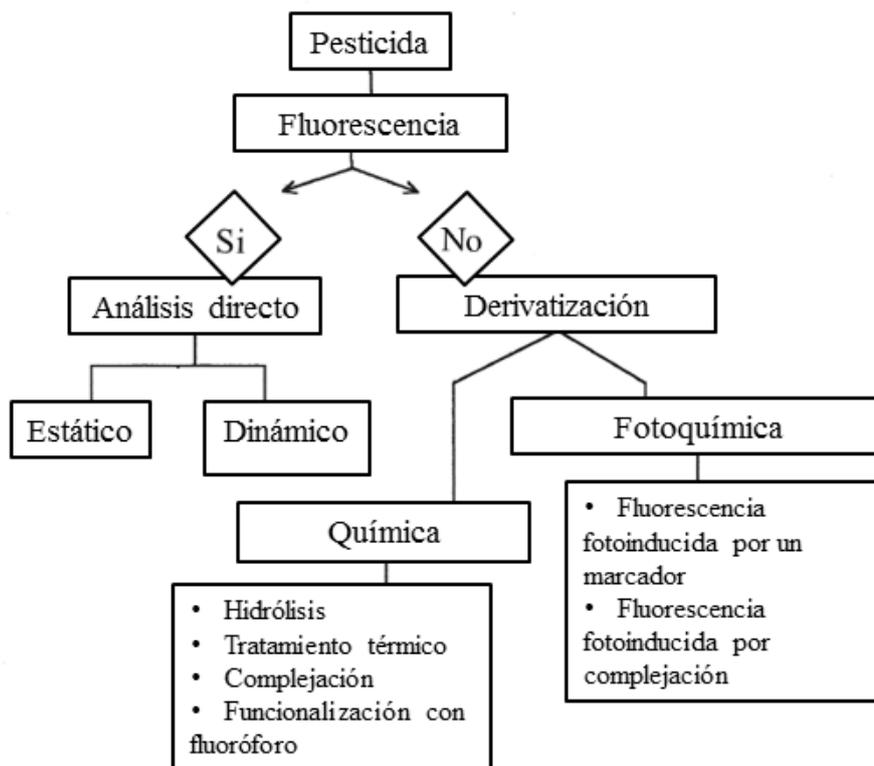


Figura 5.1. Análisis de pesticidas por métodos fluorimétricos.⁹

5.1.2. Análisis de carbamatos en agua y alimentos

Los pesticidas carbamatos, debido a su relativamente baja toxicidad en mamíferos, baja persistencia ambiental y su actividad biocida de amplio espectro con elevada efectividad en la erradicación de insectos, se han convertido en los más utilizados rutinariamente en cultivos de frutas, fibras, cereales, etc.²² Como consecuencia, diversos carbamatos han sido detectados en productos agrícolas, en alimentos procesados como jugos, vinos y en agua.^{2,23-26} Los carbamatos se encuentran como prioritarios en la lista de compuestos peligrosos emitida por la US EPA.²⁷ El LMR de carbamatos individuales presentes en el agua apta para el consumo humano de acuerdo a las legislaciones de la U.E. es 100 ng/L.²⁷ Por lo tanto, diversos métodos analíticos sensibles han sido propuestos para satisfacer la protección ambiental y la seguridad fitosanitaria.

Los métodos de cromatografía líquida (CL) han sido generalmente aplicados para la determinación de carbamatos en agua y alimentos dado que su inestabilidad térmica impide su análisis mediante cromatografía gaseosa (CG). CL acoplada a la detección por espectrometría de masas (EM) ha permitido la determinación simultánea de hasta 18 pesticidas en tabaco. Sin embargo, los procedimientos de preparación de la muestra para la eliminación de interferentes son rigurosos.²⁸ El uso de sistemas de detección como UV y

fluorescencia a menudo se ve limitada debido a bajos coeficientes de absorptividad molar y rendimientos cuánticos⁵ por lo que derivatización pos-columna han sido propuestos para el análisis de ciertos pesticidas como los carbamatos.

El protocolo estandarizado para la determinación de carbamatos aceptado por diversas organizaciones oficiales incluido US EPA consiste en HPLC con derivatización pos-columna y detección fluorescente. El análisis requiere la extracción de N-metilcarbamatos desde la matriz, posterior hidrólisis con NaOH a alta temperatura para la generación de metilamina, la cual reacciona posteriormente con *o*-ftalaldehído (OPA) en condiciones muy alcalinas para generar el isoindol correspondiente muy fluorescente que puede ser detectado a 455 nm ($\lambda_{ex} = 340$ nm).²⁹ Otros métodos como la complejación con un derivado de rutenio fotoquímicamente activo también ha sido propuesto.⁶

5.1.3. Validación de un método analítico

La validación de un método analítico comprende el conjunto de pruebas realizadas para establecer si dicho método es apropiado para un propósito determinado con criterios de calidad definidos con un dado nivel de confianza.³⁰

Los parámetros estadísticos que se deben evaluar para validar el método son: intervalo dinámico, intervalo lineal, sensibilidad, límites de detección y de cuantificación, precisión, exactitud, selectividad y robustez.³¹

- El intervalo dinámico es el intervalo de concentraciones del analito definido entre la menor concentración detectable y la concentración en la cual se pierde la relación entre la respuesta medida y la concentración del sustrato (Figura 5.2). En este intervalo el modelo de calibración puede ser lineal o no lineal.³² El intervalo dinámico lineal se refiere al intervalo de concentraciones en el cual la relación entre la intensidad de la señal obtenida y la concentración del analito responde a una función lineal.

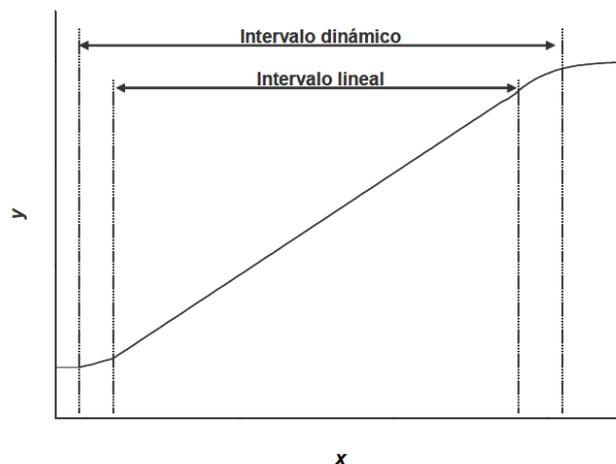


Figura 5.2. Intervalo dinámico e intervalo lineal correspondiente a una curva de calibración.

- La sensibilidad denota la variación de la respuesta instrumental con respecto al cambio de la cantidad del analito. La sensibilidad es la pendiente de la recta de regresión del gráfico de la señal medida en función de la concentración del analito.
- El límite de detección define la mínima cantidad del analito que genera una respuesta instrumental significativamente distinta de la señal del blanco.³³
- El límite de cuantificación indica la mínima cantidad cuantificable con una dada desviación estándar relativa mediante el método analítico.³³
- La precisión de los datos describe la magnitud de los errores aleatorios del método analítico. En términos estadísticos, mide la dispersión de los valores respecto a la media.³⁴
- La exactitud se refiere al grado de concordancia entre el valor individual o promedio establecido mediante el método analítico propuesto y el valor de referencia o verdadero. Los errores sistemáticos y aleatorios afectan este parámetro.³⁴
- La selectividad establece en qué medida la señal correspondiente al analito de interés es afectada por la presencia de otras especies interferentes en la muestra.
- La robustez define en qué medida los resultados se reproducen cuando se realizan pequeñas modificaciones en las condiciones experimentales del método propuesto.

Además de la determinación de estos parámetros estadísticos, a veces se precisa para una validación más completa del método analítico verificar ciertos criterios operativos tales como la complejidad del análisis, rapidez, aparatos e instrumentos necesarios,

requerimientos energéticos y de espacio, grado de automatización, higiene y seguridad, etc., y económicos como la inversión inicial, costo de aplicación, etc.

5.1.3.1. Calibración y linealidad

La calibración se refiere a la determinación de la función matemática que relaciona el valor de la respuesta o señal observada (y) con la cantidad o concentración del analito presente en la muestra (x) (Ec. 5.1).^{30,32}

$$y = F(x) + e_y \quad (5.1)$$

$F(x)$ representa la función de calibración y e_y es el error o la diferencia entre el resultado observado y el predicho por el modelo. El error, e_y , es una variable aleatoria que presenta una distribución normal con media y desviación estándar iguales a cero. Si la relación entre las variables x e y es lineal, la función de calibración se expresa según la Ec. 5.2 y el correspondiente gráfico se denomina curva de calibración:

$$F(x) = B + m x \quad (5.2)$$

La ordenada al origen, B , corresponde a la señal del blanco y la pendiente de la curva de calibración, m , representa la sensibilidad. Estos parámetros se estiman a partir de n pares de medidas (x_i, y_i) empleando un método de regresión. El método usado frecuentemente para estimar los coeficientes del modelo de regresión lineal es el método de mínimos cuadrados.^{31,32}

5.1.3.2. Límites de detección y de cuantificación

Las definiciones actuales de los límites de detección (L_D) y de cuantificación (L_Q), según las recomendaciones de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) y la Organización Internacional de Estándares (ISO), se presentan a continuación.³³

$$L_D = \frac{3,29 s_b}{m} \quad (5.3)$$

$$L_Q = \frac{10 s_b}{m} \quad (5.4)$$

s_b representa la desviación estándar de los blanco y m es la sensibilidad.

Los valores de la media y de la desviación estándar de la señal del blanco se pueden estimar a partir de la ordenada en el origen de la curva de calibración y la desviación estándar de los residuales de la regresión $s_{y/x}$, respectivamente. O bien, mediante la medición de un conjunto de blancos químicos preparados independientemente (preferiblemente $n > 20$).³³

Una señal que se encuentra a $3,29s_b$ indica que la probabilidad de que la detección positiva del analito sea falsa es $< 1\%$, mientras que las señales medidas con valores superiores a $10s_b$ permiten cuantificar el analito con un error mínimo en la determinación. En los trabajos reportados en el campo de la química analítica es común observar discrepancias acerca del factor numérico empleado en la definición de L_D . En general, dicho factor numérico se elige en función del nivel de confianza requerido para el análisis realizado. En este trabajo de Tesis se ha empleado el factor 3,29, recomendado por IUPAC, para definir L_D .

5.1.3.3. Precisión

La precisión se valida si la varianza de los resultados obtenidos con el método analítico propuesto, aplicado en determinadas condiciones de trabajo, es menor que la varianza de referencia establecida para el método aplicado en condiciones de trabajo similares. Se diferencian dos clases:³²

- Condiciones de repetibilidad: la misma persona realiza ensayos independientes con el método propuesto a una determinada muestra en un intervalo de tiempo corto en el mismo laboratorio y con los mismos aparatos e instrumentos.
- Condiciones de reproducibilidad: los ensayos independientes determinados por distintas personas que aplican el mismo método analítico a la misma muestra se realizan en diferentes laboratorios con distintos aparatos e instrumentos en un intervalo de tiempo prolongado.

5.1.3.4. Selectividad

En base a la respuesta en presencia de especies interferentes, los métodos analíticos se clasifican en:³⁵

- Método universal: muestra sensibilidades comparables para numerosos analitos que presentan diversas propiedades.
- Método selectivo: la sensibilidad del método es alta para un determinado grupo de especies químicas con propiedades comunes.
- Método específico: sensible a un único analito.

5.1.3.5. Exactitud

La exactitud de un método analítico se refiere a la igualdad entre las medias de dos o más series de medidas. Los principales métodos propuestos para el estudio de la exactitud son:³⁴

- Verificación con un material de referencia certificado (CRM).
- Realización de ensayos de recuperación sobre matrices o muestras reales.
- Comparación del método propuesto con un método de referencia.
- Comparación entre ensayos interlaboratorios.

5.1.3.6. Ensayos de recuperación

La recuperación, expresada como porcentaje, es una medida de la eficiencia del método analítico para recuperar y medir el analito adicionado en una matriz. El ensayo de recuperación consiste en agregar cantidades conocidas del analito al solvente y determinar la correspondiente curva de calibración. Luego se adicionan cantidades conocidas del sustrato a una matriz diferente y se determina la correspondiente curva de calibración. Si estas dos curvas coinciden se concluye que la recuperación es 100 % y que la interferencia de la matriz es despreciable. Si las curvas no se superponen se asocia a un posible efecto matriz. El efecto matriz produce errores sistemáticos por exceso o por defecto y, en consecuencia, aumenta proporcionalmente con la concentración del analito, distinguiéndose del efecto producido por especies interferentes.

Según las recomendaciones de IUPAC se distinguen la recuperación o factor de recuperación y la recuperación aparente cuyas definiciones se presentan a continuación:³⁶

- *Recuperación o factor de recuperación (R^*):* relación entre la cantidad de analito establecida por el método propuesto y la cantidad presente en la muestra, original o adicionada previo al procedimiento de extracción y/o preconcentración. En consecuencia, el valor de recuperación se relaciona al error sistemático global del procedimiento analítico.

- *Recuperación aparente (R):* cociente entre la cantidad de analito determinada a partir de la curva de calibración del método propuesto y el valor de referencia. El valor de referencia es la cantidad de analito adicionada a la muestra previo al proceso de medición. Por lo tanto, el valor de la recuperación aparente se asocia al error sistemático atribuido a un efecto matriz.

A partir de las recuperaciones aparentes establecidas a distintos niveles de fortificación se establece la recuperación aparente promedio. Posteriormente se determina si la recuperación aparente promedio es significativamente diferente de 100 % mediante una prueba o contraste de significación t bilateral a un dado nivel de significación. El estadístico t se calcula mediante la ecuación 5.5.³²

$$t = \frac{\sqrt{n}(R-100)}{s} \quad (5.5)$$

n representa el número de ensayos de recuperación considerados al establecer el valor de recuperación promedio y s , la desviación estándar muestral.

El valor de t calculado se compara con el valor de t estadístico tabulado para $(n - 1)$ grados de libertad al nivel de significación elegido, $t_{\alpha, n-1}$. Si se cumple que $t < t_{\alpha, n-1}$, se concluye que el método es exacto.³²

5.2. OBJETIVOS

Determinar los parámetros de la curva de calibración propuesta para la determinación de PC en medio acuoso a pH = 5,80 basado en el *quenching* de la emisión de fluorescencia de C-butíresorin[4]areno ($H_7C_4RA^-$) por el analito.

Estimar la desviación estándar de los blancos químicos (s_b) y determinar los parámetros L_D y L_Q según la definición actual propuesta por IUPAC (Ec. 5.3 y 5.4).

Evaluar la selectividad y la robustez del método propuesto.

Aplicar el método fluorimétrico en matrices reales de agua y pomelo rosado y determinar la eficiencia y la exactitud de la cuantificación de PC mediante ensayos de recuperación.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Función de calibración del método

Entre los C-alquilresorcin[4]arenos empleados, C1RA y C4RA, sólo el de cadena más larga demostró cambios espectroscópicos frente a PC, de manera que fue posible su aplicación como sensor del analito. El método se basó en la eficiencia del *quenching* de la emisión de fluorescencia del receptor como resultado de su interacción supramolecular con PC. La solubilidad de las especies en medio acuoso permitió analizar el efecto del pH sobre la asociación de las especies dado el carácter poliprótico de C4RA. La acción de PC como *quencher* de la fluorescencia del receptor fue efectiva frente a todas sus especies ácido-base,

desde la neutra hasta el di-anión; pero la magnitud de la interacción fue mayor con la especie mono-aniónica a pH = 5,80 con $K_{SV} = (1,12 \pm 0,03) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Dado que el modelo que explica el fenómeno luminiscente es la función de Stern-Volmer, la relación lineal entre las variables x e y provee la validez para que el función obtenida pueda ser además empleada como curva de calibración del método. Así, los parámetros estadísticos de la función de calibración, la sensibilidad (m) y la señal del blanco, corresponden a la constante K_{SV} y a la señal analítica del C4RA en ausencia de PC, $F_0/F = 1$, de acuerdo a la función de Stern-Volmer. La validez estadística de la regresión lineal obtenida por cuadrados mínimos (Figura 4.30) fue evaluada en función del coeficiente de correlación, el cual fue aceptable ($r = 0,995$).

5.3.2. Límites de detección y de cuantificación

Los parámetros L_D y L_Q se determinaron según la definición actual propuesta por IUPAC (Ec. 5.3 y 5.4). La desviación estándar del blanco químico, s_b , se determinó a partir de la media de las áreas de fluorescencia relativas de 19 soluciones de C4RA en ausencia de PC preparadas de manera independiente en 2% $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ a pH = 5,80. Los valores de L_D y L_Q se calcularon a partir de la s_b obtenida (0,026) y m . Además se estableció el intervalo dinámico lineal de trabajo cuyo extremo inferior corresponde a L_Q y el límite superior está dado por la concentración del analito a partir de la cual se pierde la linealidad de la respuesta. En la Tabla 5.2 se presentan los parámetros analíticos obtenidos para la determinación fluorimétrica de PC.

Tabla 5.2. Parámetros analíticos de la curva de calibración de PC.

$m, \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ^a	s_b ^b	Intervalo lineal, $\times 10^{-6} \text{ M}$	$L_D, \times 10^{-6} \text{ M}$ (o en $\mu\text{g}/\text{mL}$) ^c	$L_Q, \times 10^{-6} \text{ M}$ (o en $\mu\text{g}/\text{mL}$) ^c
$1,12 \pm 0,03$	0,026	1,79 – 107,35	7,64 (1,62)	23,21 (4,93)

^a 2% $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ a pH = 5,80; 25,0 °C.

^b Desviación estándar de F_0/F de soluciones de C4RA en ausencia de PC ($n = 19$).

^c Calculados según Ec. 5.3 y 5.4. En literatura usualmente se informan como masa de analito/volumen ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

La precisión del método se corroboró preparando 5 soluciones de PC de manera independiente a dos niveles de concentración ($60,0 \times 10^{-6}$ y $100,0 \times 10^{-6} \text{ M}$) y determinando los errores relativos de F_0/F para las concentraciones empleadas. El ensayo reveló que los

errores relativos de las señales analíticas eran $\leq 10\%$ con respecto a los valores predichos por la función de calibración.

5.3.2. Robustez del método

5.3.2.1. Efecto de la concentración de *buffer*

Se evaluó el efecto de la variación de la concentración de PBS a pH = 5,80 (5,43 – 43,44 mM) sobre las señales de fluorescencia de C4RA en ausencia (F_0) y en presencia de PC (F/F_0) preparando soluciones independientes por triplicado (Figura 5.3). Las medias de los datos obtenidos se evaluaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) unifactorial para determinar si las medias de F/F_0 a cada concentración de PBS evaluada eran estadísticamente iguales o diferentes.³² El valor del estadístico F calculado para cada concentración de *buffer* fue menor que el valor tabulado ($\alpha = 0,05$), indicando que las medias de F/F_0 no muestran diferencias estadísticamente significativas por la variación de la concentración de PBS en el intervalo analizado. La concentración de PBS se mantuvo constante a 32,58 mM en todos los experimentos realizados.

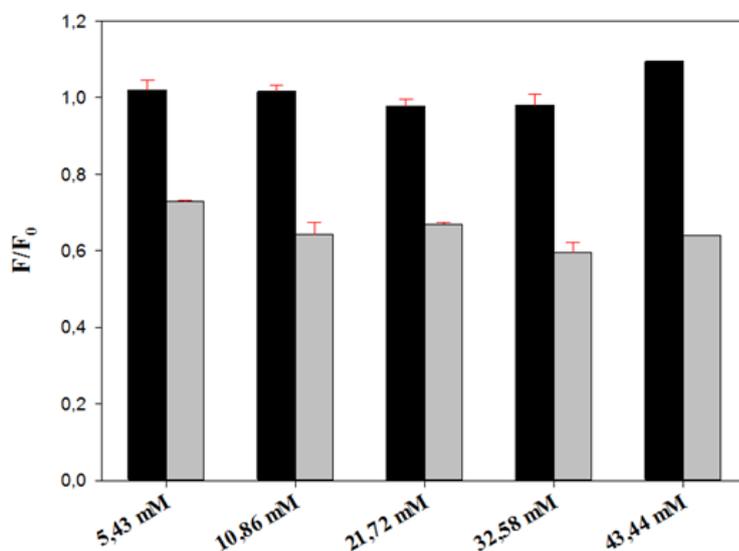


Figura 5.3. Efecto de la concentración de PBS a pH = 5,80 sobre la emisión de fluorescencia de C4RA (barras negras) y sobre el *quenching* del receptor por PC (barras grises). [C4RA] = $1,0 \times 10^{-6}$ M; [PC] = $60,0 \times 10^{-6}$ M; $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm; 2% CH₃OH/H₂O; 25,0 °C.

5.3.2.2. Efecto de la naturaleza del *buffer* y del pH

La respuesta de la señal analítica se evaluó en *buffer* ACS a pH = 4,60 de manera que la especie predominante en solución es C4RA. Los espectros del macrociclo en ausencia ($1,0 \times 10^{-6}$ M) y en presencia de PC ($80,0 \times 10^{-6}$ M) no mostraron diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 0,05$) por el cambio del *buffer* ni por la modificación del pH.

5.3.2.3. Efecto de la temperatura

La influencia de la temperatura sobre la emisión de fluorescencia de C4RAH₇⁻ en presencia de PC fue evaluada. Los experimentos demostraron que la sensibilidad de la curva de calibración correspondiente a K_{SV} no varía cuando la temperatura disminuye de 25,0 °C a 5,0 °C. Por lo tanto, el análisis de PC se puede realizar en el intervalo de temperatura definido con errores mínimos en las determinaciones.

5.3.3. Selectividad

La selectividad del método propuesto se evaluó analizando la influencia de especies potencialmente presentes en muestras reales. Las determinaciones se realizaron adicionando las especies posiblemente interferentes a soluciones conteniendo C4RAH₇⁻ y PC. En todos los casos, se consideró que se producía una interferencia por la especie añadida cuando la variación de la señal era superior al 5%.

Se preparó una solución compuesta por C4RAH $1,0 \times 10^{-6}$ M y PC $78,7 \times 10^{-6}$ M. Una alícuota de 3,0 mL de esta solución se colocó en una cubeta para fluorescencia, se registró su espectro de emisión y posteriormente se realizaron pequeñas adiciones de una solución acuosa del interferente de concentración conocida hasta observar una variación espectral mayor al 5%. En la Tabla 5.3 se muestran las especies interferentes examinadas y los niveles de tolerancia se informan como la relación p/p de interferente/analito. Los niveles tolerados de iones inorgánicos son aceptables considerando las concentraciones normales en las que los interferentes se pueden hallar en matrices reales. Los resultados fueron semejantes a otro método analítico basado en el *quenching* de la fluorescencia de un resorcin[4]areno,³⁷ lo cual sugiere que la señal analítica de estos macrociclos es sensible a la presencia de aniones como F⁻, CO₃²⁻ y NO₃⁻.

Tabla 5.3. Efecto de interferentes.

Especies interferentes	Interferente/analito tolerancia, p/p
Na⁺	200
Br⁻	150
K⁺, Ba²⁺, Cl⁻	100
SO₄²⁻	70
Ca²⁺	40
F⁻	30
CO₃²⁻, NO₃⁻	10

5.3.4. Aplicabilidad del método en matrices reales

La eficiencia y exactitud del método propuesto para la detección y cuantificación de PC fueron evaluadas mediante ensayos de recuperación del analito en matrices reales, tales como agua corriente y pomelo rosado, en las que este pesticida puede ser encontrado.^{22,25,38}

La aplicación del método para cuantificar la concentración de un analito en una matriz real puede conducir a determinaciones imprecisas. Estas desviaciones pueden ser positivas si la concentración determinada del analito es mayor a la concentración real del mismo presente en la matriz o negativas si la cantidad del analito determinada es menor. Este efecto matriz sobre las señales analíticas puede ser corregido o minimizado empleando el método de las adiciones estándar (MOSA). Este método se basa en agregar distintas cantidades conocidas del analito a soluciones que contienen cantidades constantes de la matriz, las cuales se diluyen a un mismo volumen final.

Los ensayos de recuperación se realizaron preparando soluciones de C4RA ($1,0 \times 10^{-6}$ M) fortificadas con distintos niveles de concentración de PC, por triplicado, dentro del intervalo lineal establecido previamente. Antes de enrasar, se añadieron a las soluciones una dada cantidad de cada matriz. En el caso del agua corriente, las concentraciones de matriz evaluadas fueron 5% y 10% v/v sin la necesidad de un tratamiento previo de la matriz. La evaluación de concentraciones superiores de agua corriente produjo alteraciones en los espectros de emisión que impidieron la determinación exacta del analito. La muestra de pomelo rosado inicialmente fue tratada como la fruta entera. Sin embargo, se detectaron interferentes procedentes de la cáscara que obstaculizaron el análisis. El uso de la pulpa de pomelo rosado resultó más conveniente, y se trató de dos maneras distintas para obtener finalmente un extracto metanólico de la fruta (5,00 g de fruta/mL de extracto). Las soluciones

de C4RA fortificadas con PC toleraron una concentración máxima del extracto de 5,0 mg de fruta/mL de solución; mientras que el empleo de concentraciones superiores produjo efectos sobre los espectros de emisión que impidieron el análisis (Sección experimental 5.4). El pesticida no fue detectado en las soluciones no fortificadas de ambas matrices.

Los valores de recuperación, R , se calcularon estableciendo el cociente entre la cantidad de analito determinada a partir de la señal analítica obtenida y la curva de calibración y la cantidad adicionada conocida previo al proceso de medición. En las Tablas 5.4 y 5.5 se especifican los valores de R obtenidos en los ensayos en presencia de agua corriente y de extracto de pulpa de pomelo rosado, respectivamente.

Tabla 5.4. Recuperaciones de PC en muestras de agua corriente.^a

Agua corriente, % v/v	PC adicionado, μM ^b	PC determinado, μM	R, %
5	34,8	34 ± 1	96 ± 3
5	42,7	$43,6 \pm 0,4$	102 ± 1
5	58,3	$58,3 \pm 0,9$	100 ± 1
5	69,8	$69,3 \pm 0,9$	99 ± 1
10	34,8	36 ± 2	103 ± 6
10	52,2	52 ± 2	100 ± 5

^a [C4RA]=1,00 μM ; 2% v/v CH₃OH/H₂O; pH = 8,50; λ_{ex} =287 nm; 25,0 °C.

^b Soluciones preparadas por triplicado.

Tabla 5.5. Recuperaciones de PC en muestras de extracto de pulpa de pomelo rosado.^a

PC adicionado, μM ^b	PC determinado, μM	R, %
46,6	$39,2 \pm 1$	84 ± 3
69,8	$64,9 \pm 5$	93 ± 7

^a [[C4RA]=1,00 μM ; 2% v/v CH₃OH/H₂O; pH = 8,50; λ_{ex} =287 nm; 25,0 °C.^b

^b Soluciones preparadas por triplicado.

Las recuperaciones aparentes a distintos niveles de fortificación en las muestras de agua corriente (5% y 10%) se encuentran entre (96 – 103) %; mientras que en las muestras de extracto de pomelo rosado se encuentran entre (84 – 93) %.

Las recuperaciones promedio ($\% \bar{R}$) se calcularon para evaluar la exactitud del método propuesto aplicado a las matrices reales. En todos los casos, a partir de la recuperación promedio se determinó el valor del estadístico t para realizar una prueba de

hipótesis para establecer si la recuperación aparente promedio es significativamente diferente de 100 %. Los valores de los parámetros correspondientes al análisis de agua corriente y de extracto de pomelo rosado se especifican en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6. Recuperaciones promedio de PC en muestras de agua corriente y de extracto de pomelo rosado y valores del estadístico t experimental (t_{exp}) y de tabla (90% y 95% de confianza).

Muestra ^a	%R (σ)	t_{exp}	$t_{\alpha, n-1} = 0,05$	$t_{\alpha, n-1} = 0,10$
Extracto de pulpa de pomelo rosado (2)	88,5 (6,4)	2,56	12,71	6,31
Agua corriente 5 % (v/v) (4)	99 (2)	1,00	3,18	2,35
Agua corriente 10 % (v/v) (2)	102 (2)	1,41	12,71	6,31

^a Entre paréntesis se especifica el número de ensayos de recuperación usados para el cálculo de la recuperación promedio.

La hipótesis se aceptó debido a que el valor del estadístico t calculado es menor que el valor estadístico t tabulado, $t_{\alpha, n-1}$, a niveles de significación $\alpha=0,10$ y $\alpha=0,05$. Por lo tanto, se concluye que el método es exacto para la cuantificación de PC en muestras conteniendo hasta 10% v/v de agua corriente y en presencia de extracto de pulpa de pomelo rosado.

El LMR para distintos pesticidas en agua corriente es 0,1 ng/mL. Dado este bajo LMR, el análisis de agua corriente involucra un etapa de pre-concentración previa a la determinación de los pesticidas.³⁹ Por otra parte, los LMR de pesticidas en cítricos establecidos por el Codex Alimentarius FAO/WHO varían entre 0,2 y 0,5 mg/kg). Los L_Q de N-metil carbamatos determinados en matrices animales y vegetales mediante distintas procedimientos analíticos validados son del orden de 0,01 mg/kg.⁴⁰ Por esta razón, la Unión Europea (U.E.) ha establecido regulaciones aún más restrictivas para distintos alimentos como frutas y verduras con LMRs que oscilan entre 0,01 y 0,05 mg/kg).²²

El ensayo de aplicabilidad del método analítico propuesto permitió la determinación de 323 mg de PC/kg de pomelo rosado (646 LMR según Codex Alimentarius, y 6460 LMR según U.E.). Sin embargo, el L_D de este método resultó comparable con otras metodologías para determinar la contaminación por PC en muestras alimenticias (Sección 5.3.5) y controlar el contenido de soluciones 450 veces más diluidas a las indicadas de formulaciones comerciales de PC como Carbamult (50% p/p de PC) usado en aspersiones (1,5 g de Carbamult/L agua) sobre bovinos como garrapaticida.

5.3.5. Otros métodos de determinación de PC

El método propuesto permitió la detección y cuantificación de PC con $L_D = 1,62 \mu\text{g/mL}$ a una λ_{ex} a la cual el pesticida no absorbe (287 nm) mediante un procedimiento indirecto basado en la atenuación de la fluorescencia del receptor macrocíclico C4RA.

El análisis de PC mediante preconcentración del analito, extracción de punto nube y posterior determinación por HPLC-UV es un procedimiento simple, pero el L_D informado es mayor con respecto al método fluorimétrico presentado ($20 \mu\text{g/mL}$).⁴¹

La detección fluorimétrica de PC por métodos dinámicos basados en la reacción con un marcador fluorogénico a altas temperaturas⁴² o en la degradación fotoquímica y detección quimioluminiscente del producto⁴³ son menores que el valor obtenido ($0,1 \mu\text{g/mL}$ y $0,085 \mu\text{g/mL}$). Además se ha propuesto la microextracción en fase sólida de PC y posterior análisis en flujo acoplado a HPLC con $L_D = 0,2 \mu\text{g/mL}$ ⁴⁴ Sin embargo, los procedimientos incluyen etapas previas como reacciones de derivatización o de hidrólisis, el uso de técnicas más costosas como HPLC y sistemas de flujo cuyo manejo requiere de personal capacitado, el consumo de grandes cantidades de solventes orgánicos y, en general, tiempos de análisis más lentos. El L_D obtenido por espectrofotometría mediante la hidrólisis de PC y detección del fenol producto por reacción de acoplamiento mediante espectrofotometría en medio micelar es similar al informado aquí con C4RA ($1 \mu\text{g/mL}$).⁴⁵ Este procedimiento con baja generación de residuos tóxicos implica el uso de medios micelares en agua. Sin embargo, la etapa previa de hidrólisis del analito extiende el tiempo del análisis.

Los sistemas organizados también se han empleado para el análisis de pesticidas N-metilcarbamatos.^{46,47,39} En el caso de PC, su baja fluorescencia nativa fue incrementada ($\lambda_{\text{ex}} = 261 \text{ nm}$) debido a la interacción supramolecular con β -ciclodextrina en agua a $\text{pH} = 7,00$ obteniéndose un L_D del orden o menor ($0,091 \mu\text{g/mL}$) a otros procedimientos informados con el mismo fin.³⁹ El L_D del método basado en la exaltación de la fluorescencia de PC es 17 veces más bajo con respecto al método propuesto basado en la detección indirecta de PC mediante *quenching* de la fluorescencia de C4RA en medio acuoso a $\text{pH} = 5,80$. Aun así, el método planteado es una alternativa que puede ser empleada en condiciones con λ de trabajo a las cuales PC no absorbe, pero puede ser detectado en presencia de C4RA.

Aunque los valores de L_D informados son en algunos casos menores con respecto al método fluorimétrico propuesto, la utilización de la atenuación de la señal de C4RA por el pesticida es un procedimiento simple, rápido, robusto y de bajo costo con una baja generación de residuos predominantemente acuosos. Por lo tanto, se resalta la propuesta de este nuevo método como una alternativa para el análisis de PC en agua corriente y en cítricos.

5.4. SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.4.1. Instrumentos y reactivos

Para el tratamiento de las muestras de pomelo rosado se empleó un homogeneizador (Waring Products Div.); una centrifuga con la cual se trabajó a 2500 rpm y un evaporador rotatorio (Büchi RE 121). Los reactivos empleados se detallan en el procedimiento empleado para tratar las muestras reales.

Los instrumentos restantes fueron los mismos que los informados en la Sección experimental del Capítulo 4.

5.4.2. Procedimientos

5.4.2.1. Preparación de las soluciones en presencia de agua corriente

Las soluciones se prepararon en matraces de 10,0 mL conteniendo $1,0 \times 10^{-6}$ M de C4RA, se adicionó agua corriente sin tratamiento previo a dos niveles de concentración, 5% y 10% v/v, y luego el *buffer* PBS a pH = 5,80 (concentración final = $32,5 \times 10^{-3}$ M). Concentraciones superiores al 10% v/v de agua corriente produjeron efecto matriz debido a la presencia de interferentes que no pudieron ser eliminados mediante filtración. Previo a las mediciones de fluorescencia, las soluciones con 5% v/v de agua corriente fueron fortificadas con PC a 4 niveles de concentración ($34,8 \times 10^{-6}$ M – $69,8 \times 10^{-6}$ M), mientras que con 10% v/v de agua corriente las soluciones se fortificaron con $34,8 \times 10^{-6}$ M – $52,2 \times 10^{-6}$ M del analito. Finalmente se completó con CH₃OH para una concentración final de 2% v/v y se agregó agua hasta el enrase.

5.4.2.2. Tratamiento de la pulpa pomelo rosado con partición líquida-líquida

Este tratamiento se basó en los protocolos de la AOAC⁴⁸ y de Krause con algunas modificaciones para la extracción de pesticidas N-metilcarbamatos de frutas.

25 g de pulpa de pomelo rosado se homogeneizaron con 50 mL de metanol durante 30 segundos a velocidad media y por 1,5 minutos a velocidad máxima. La mezcla se filtró al vacío con filtro de papel obteniéndose 55,3 mL de extracto líquido, al cual se le añadieron 15,7 mL de agua. Se evaporó hasta bajo volumen a 35 °C, obteniéndose 20 mL de extracto.

La primera etapa de *clean-up* del extracto se realizó por partición líquida-líquida según el protocolo de la AOAC. Para ello, el extracto se colocó en una ampolla de extracción, “A”, de 150 mL y su recipiente se lavó 3 veces con 6,7 mL de ACN trasvasando luego de cada lavado el solvente a la ampolla. Luego se agregaron 3,8 g de NaCl y se agitó durante

30 segundos y se dejó reposar 5 minutos. La fase acuosa inferior se eluyó en una nueva ampolla, "B", de 50 mL. Se agregaron 13,3 mL de ACN y se agitó por 20 segundos. Se descartó la fase acuosa inferior y se reservó la fase orgánica. A la fase orgánica de la ampolla "A" se le añadieron 6,7 mL de una solución acuosa de NaCl 20% p/v y se agitó por 20 segundos. La fase acuosa inferior se transfirió a la ampolla "B" y se agitó 20 segundos. En la ampolla "B", se descartó la fase acuosa y se reservó la fase orgánica. Se añadieron 26,7 mL de éter de petróleo a la ampolla "A" y se agitó 20 segundos. La fase inferior de ACN se transfirió a una nueva ampolla, "C", de 100 mL. El ACN de la ampolla "B" se combinó con el éter de petróleo en la ampolla "A" y se agitó 20 segundos; el ACN se transfirió a la ampolla "C". A la fase etérea de la ampolla "A" se le agregaron 2,5 mL de ACN y se agitó 20 segundos; el ACN se transfirió a la ampolla "C" y la fase etérea se descartó. En la ampolla "C" se colocaron 13,3 mL de solución acuosa de NaCl 2% y se extrajo consecutivamente con 26,6 mL; 6,7 mL y 6,7 mL de CH₂Cl₂ agitando en cada caso 20 segundos. La fase orgánica inferior de cada extracción se pasó por una columna de Na₂SO₄ anhidro. La fase acuosa se descartó. El extracto en CH₂Cl₂/ACN, se evaporó a sequedad a 35 °C y el sólido se retomó con 5 mL de CH₂Cl₂.

La segunda etapa de *clean-up* del extracto se llevó a cabo por adsorción sólida-líquida según el protocolo de Krause con algunas modificaciones. Se preparó una columna de separación colocando en la base 3,5 g de celite; luego 2,3 g de carbón activado/celite (1+4 p/p) como suspensión en 10 mL del solvente de elución tolueno/ACN (1+3 v/v); y finalmente 0,5 cm de Na₂SO₄ anhidro en la parte superior. La columna se acondicionó con 25 mL del solvente de elución. Se sembró el extracto y se eluyeron por separado 10 mL de CH₂Cl₂ y 13 mL de tolueno/ACN (1+3 v/v), ambos solventes usados para lavar el contenedor del extracto. Luego se eluyeron 30 mL del solvente de elución a 5 mL/minuto. El solvente se evaporó a bajo volumen a 32 °C y se agregaron 5 mL de metanol. Luego se evaporó a sequedad y el sólido se retomó en 5 mL de metanol. Finalmente, el extracto metanólico se filtró con membrana de nylon (13 mm de diámetro y 0,22 µm de tamaño de poro).

5.4.2.3. Preparación de las soluciones en presencia de pulpa de pomelo rosado

Las soluciones se prepararon en matraces de 10,0 mL con $1,0 \times 10^{-6}$ M de C4RA y el volumen necesario de buffer PBS a pH = 5,80 para una concentración final $32,5 \times 10^{-3}$ M. Inicialmente se evaluó la máxima concentración de extracto metanólico de pulpa de pomelo rosado (5,00 g/mL extracto) tolerada por las soluciones. Las concentraciones de fruta empleadas en las soluciones finales fueron 10,02 mg/mL (20 µL extracto); 7,52 mg/mL (15 µL extracto) y 5,01 mg/mL (10 µL extracto). El efecto matriz positivo observado en las soluciones finales con concentraciones de fruta de 10,02 mg/mL y 7,52 mg/mL, limitó el empleo de cantidades superiores a 5,01 mg fruta/mL de solución. Las fortificaciones de las

soluciones con PC se realizaron a 2 niveles de concentración ($46,6 \times 10^{-6}$ M – $69,8 \times 10^{-6}$ M) por triplicado. Finalmente, a cada solución se le agregó CH₃OH para una concentración final de 2% v/v y agua hasta el enrase.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Handford, C. E.; Elliott, C. T.; Campbell, K. A Review of the Global Pesticide Legislation and the Scale of Challenge in Reaching the Global Harmonization of Food Safety Standards: Global Harmonization of Pesticide Legislation. *Integr. Environ. Assess. Manag.* **2015**, *11* (4), 525.
- (2) Stuart, M. E.; Manamsa, K.; Talbot, J. C.; Crane, E. J. *Emerging Contaminants in Groundwater*; 2011.
- (3) Bhadekar, R. Developments in Analytical Methods for Detection of Pesticides in Environmental Samples. *Am. J. Anal. Chem.* **2011**, *2*, 1.
- (4) Ecobichon, D. J. Pesticide Use in Developing Countries. *Toxicology* **2001**, *160* (1), 27.
- (5) Tanausú Vega Morales; Sarah Montesdeoca Esponda; José Juan Santana Rodríguez; Snezhana Efremova Aaron; Jean-Jacques Aaron. Luminescence Methods for Study and Determination of Pollutants in the Environment. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* **2010**, *29*, 1.
- (6) López-Paz, J. L.; Catalá-Icardo, M. Analysis of Pesticides by Flow Injection Coupled with Chemiluminescent Detection: A Review. *Anal. Lett.* **2011**, *44* (1–3), 146.
- (7) Aaron, J.-J.; Coly, A. Luminescence Methods in Pesticide Analysis. Applications to the Environment. *Analisis* **2000**, *28*, 699.
- (8) Wang, X.; Lin, J.; Liu, M.; Cheng, X. Flow-Based Luminescence-Sensing Methods for Environmental Water Analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2009**, *28* (1), 75.
- (9) Coly, a; Aaron, J. J. Fluorimetric Analysis of Pesticides: Methods, Recent Developments and Applications. *Talanta* **1998**, *46*, 815.
- (10) Fernandes, V. C.; Domingues, V. F.; Mateus, N.; Delerue-Matos, C. Determination of Pesticides in Fruit and Fruit Juices by Chromatographic Methods. An Overview. *J. Chromatogr. Sci.* **2011**, *49* (9), 715.
- (11) Santaladchaiyakit, Y.; Srijaranai, S.; Burakham, R. Methodological Aspects of Sample Preparation for the Determination of Carbamate Residues: A Review. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35* (18), 2373.
- (12) Meaney, M. S. Analytical Applications of Fluorescence Quenching. Dissertation/Thesis, Michigan State University: Michigan, United States, 2008.
- (13) De Silva, A. P.; Gunaratne, H. N.; Gunlaugsson, T.; Huxley, A. J.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515.
- (14) Santana Rodríguez, J. J.; Halko, R.; Betancort Rodríguez, J. R.; Aaron, J. J. Environmental Analysis Based on Luminescence in Organized Supramolecular Systems. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 525.

- (15) Prognon, P.; Kasselouri, A.; Desroches, M. C.; Mahuzier, G. Usefulness of Cyclodextrins for Detection in Molecular Fluorescence. Application to Xenobiotics and Drugs. *Analisis* **2000**, 28 (8), 664.
- (16) Szente, L.; Szemán, J. Cyclodextrins in Analytical Chemistry: Host–Guest Type Molecular Recognition. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 8024.
- (17) Elbashir, A. A.; Aboul-Enein, H. Y. Supramolecular Analytical Application of Cucurbit[n]urils Using Fluorescence Spectroscopy. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2015**, 45, 52.
- (18) Sueldo Ocelllo, V. N.; Veglia, A. V. Cucurbit[6]uril Nanocavity as an Enhanced Spectrofluorimetric Method for the Determination of Pyrene. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 689, 97.
- (19) Agrawal, Y. K.; Pancholi, J. P. Analytical Applications of Thiacalixarenes: A Review. *Indian J. Chem.* **2007**, 46A, 1373.
- (20) Mokhtari, B.; Pourabdollah, K.; Dalali, N. Analytical Applications of Calixarenes from 2005 up-to-Date. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2011**, 69, 1.
- (21) Guo, D.-S.; Liu, Y. Supramolecular Chemistry P-Sulfonatocalix[n]arenes and Its Biological Applications. *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 1925.
- (22) Morais, S.; Dias, E.; Pereira, M. D. L. Carbamates: Human Exposure and Health Effects. In *The Impact of Pesticides*; Jokanovic, Ed.; AcademyPublish.org, 2012.
- (23) Czarnik, A. W. Chemical Communication in Water Using Fluorescent Chemosensors. *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 302.
- (24) Ibañez, G. A.; Escandar, G. M. Luminescence Sensors Applied to Water Analysis of Organic Pollutants—An Update. *Sensors* **2011**, 11 (12), 11081.
- (25) Tomašević, A. V.; Gašić, S. M. 3. Photoremediation of Carbamate Residues in Water. In *Insecticides – Basic and Other Applications*; 2010.
- (26) Kataev, E. a.; Müller, C. Recent Advances in Molecular Recognition in Water: Artificial Receptors and Supramolecular Catalysis. *Tetrahedron* **2014**, 70, 137.
- (27) Khodadoust, S.; Ghaedi, M.; Hadjmohammadi, M. R. Dispersive Nano Solid Material-Ultrasound Assisted Microextraction as a Novel Method for Extraction and Determination of Bendiocarb and Promecarb: Response Surface Methodology. *Talanta* **2013**, 116, 637.
- (28) Malato, O.; Lozano, A.; Mezcuca, M.; Agüera, A.; Fernandez-Alba, A. R. Benefits and Pitfalls of the Application of Screening Methods for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218 (42), 7615.
- (29) *EPA Method 531.2, Revision 1.0, Edited 2001.*
- (30) Gustavo González, a.; Ángeles Herrador, M. A Practical Guide to Analytical Method Validation, Including Measurement Uncertainty and Accuracy Profiles. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2007**, 26 (3), 227.
- (31) Danzer, K.; Currie, L. A. Guideline for Calibration in Analytical Chemistry - Part 1. Fundamentals and Single Component Calibration. *Pure Appl Chem* **1998**, 70 (4), 993.
- (32) Miller, J. C.; Miller, J. N. *Estadística Para Química Analítica*; Addison-Wesley Iberoamerican, S.A.: Wilmington, 1993.

- (33) Long, G. L.; Wineford, J. D. Limit of Detection: A Closer Look at the IUPAC Definition. *Anal. Chem.* **1983**, 55 (7), 712.
- (34) González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G. Intra-Laboratory Testing of Method Accuracy from Recovery Assays. *Talanta* **1999**, 48 (3), 729.
- (35) Valcarcel, M. Analytical Chemistry—Today's Definition and Interpretation. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, 343 (11), 814.
- (36) Burns, D. T.; Danzer, K.; Townshend, A. Use of the Terms “recovery” and “apparent Recovery” in Analytical Procedures. *Pure Appl Chem* **2002**, 74 (11), 2201.
- (37) Yang, Q.; Yan, C.; Zhu, X. A Fluorescent Chemosensor for Paeonol Based on Tetramethoxy Resorcinarene Tetraoxyacetic Acid. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, 191, 53.
- (38) Goto, T.; Ito, Y.; Oka, H.; Saito, I.; Matsumoto, H.; Nakazawa, H. Simple and Rapid Determination of N-Methylcarbamate Pesticides in Citrus Fruits by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 487 (2), 201.
- (39) Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. Determination of Poorly Fluorescent Carbamate Pesticides in Water, Bendiocarb and Promecarb, Using Cyclodextrin Nanocavities and Related Media. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 583, 63.
- (40) European Food Safety Authority. Reasoned Opinion on the Review of the Existing MRLs for Carbofuran, Carbosulfan, Benfuracarb and Furathiocarb and the Setting of an Import Tolerance for Carbofuran in Cultivated Mushrooms: Review of the Existing MRLs for N-Methyl-Carbamate Insecticides. *EFSA J.* **2014**, 12, 3559.
- (41) Santalad, A.; Burakham, R.; Srijaranai, S.; Srijaranai, S.; Deming, R. L. Role of Different Salts on Cloud-Point Extraction of Isoprocarb and Promecarb Insecticides Followed by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **2012**, 50, 523.
- (42) García Sánchez, F.; Cruces Blanco, C. Determination of the Insecticide Promecarb by Fluorogenic Labelling with Dansyl Chloride. *The Analyst* **1991**, 116 (8), 851.
- (43) Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Martín, J. Chemiluminescence Determination of Carbofuran and Promecarb by Flow Injection Analysis Using Two Photochemical Reactions. *Analyst* **2002**, 127 (11), 1526.
- (44) Vichapong, J.; Burakham, R.; Srijaranai, S.; Grudpan, K. Sequential Injection-Bead Injection-Lab-on-Valve Coupled to High-Performance Liquid Chromatography for Online Renewable Micro-Solid-Phase Extraction of Carbamate Residues in Food and Environmental Samples. *J. Sep. Sci.* **2011**, 34 (13), 1574.
- (45) Alvarez-Rodriguez, L.; Esteve-Romero, J.; Escrig-Tena, I.; Garcia Alvarez-Coque, M. C. Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Phenolic Drugs and Carbamate Pesticides by Coupling with Diazotized 2,4,6-Trimethylaniline. *J. AOAC Int.* **1999**, 82 (4), 937.
- (46) Veglia, A. V. Fluorimetric Determination of Carbamate Pesticides in Host-Guest Complexes. *Molecules* **2000**, 5 (3), 437.
- (47) Pacioni, N. L. N. L.; Veglia, A. V. A. V. Determination of Carbaryl and Carbofuran in Fruits and Tap Water by Beta-Cyclodextrin Enhanced Fluorimetric Method. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 488, 193.

- (48) *Pesticides Laboratory Training Manual*; Meloan, C. E., Ed.; AOAC International: Gaithersburg, Md., USA, 1996.

Conclusiones generales

Las principales conclusiones obtenidas a partir de este trabajo de Tesis son:

✚ Los receptores macrocíclicos C-alkilresorcín[4]arenos con cadena alifáticas de hasta 7 átomos de carbono pueden ser aplicados en estudios en medios acuosos a distintos valores de pH. Las condiciones de pH que favorecen la generación de las distintas especies ácido-base de los macrociclos con sustituyentes metilo, butilo y heptilo fueron identificadas. Estos resultados, sin precedentes en la literatura, significa un gran aporte para posibles aplicaciones de estos receptores.

✚ La propiedades ácidas de C-butilresorcín[4]areno dependen del hidróxido alcalino empleado como base. El contra-ión del hidróxido es capaz de interactuar con el portal hidrofílico del receptor si el catión es pequeño como Li^+ , modificando sus características ácidas.

✚ El estudio sistemático del efecto de la longitud de la cadena alquílica sobre las propiedades ácidas de C-alkilresorcín[4]arenos frente a NaOH reveló que cuando los sustituyentes eran metilo o butilo, la formación de la especie tetra-fenolato era posible. Sin embargo, cuando el sustituyente era heptilo, sólo la especie tri-fenolato fue identificada en condiciones básicas fuertes.

✚ Las interacciones huésped-receptor de C-alkilresorcín[4]arenos con los pesticidas *N*-metilcarbamatos promecarb y aminocarb no pudieron ser determinadas con precisión mediante espectroscopia UV-Visible debido a que las magnitudes de los cambios espectroscópicos registrados no eran suficientes.

✚ Las asociaciones entre C-alkilresorcín[4]arenos con los *N*-metilcarbamatos fueron evaluadas mediante espectroscopia de emisión de fluorescencia. El receptor C-metilresorcín[4]areno sólo evidenció interacciones con aminocarb en condiciones alcalinas. Con un comportamiento notablemente diferente, C-butilresorcín[4]areno presentó interacciones con ambos pesticidas evidenciadas por el *quenching* de la fluorescencia del receptor. El macrociclo demostró que puede ser empleado como sensor de pesticidas no fluorescentes en las condiciones de trabajo empleadas. Además, la magnitud de la interacción puede ser modulada por efecto del pH del medio acuoso.

✚ La interacción sustrato-receptor que presentó la constante de asociación más alta fue entre C-butilresorcín[4]areno y promecarb en medio acuoso a pH = 5,80.

✚ En las condiciones experimentales que permitieron obtener la curva de calibración con la mayor sensibilidad analítica, se determinaron los parámetros estadísticos como los límites de detección y de cuantificación y el intervalo lineal de trabajo del método fluorimétrico propuesto para la determinación de promecarb. Además, el método se validó

mediante ensayos de selectividad frente a interferentes, de robustez y se demostró su aplicabilidad en matrices reales de agua corriente y de extracto de pomelo rosado.

✚ El método analítico propuesto representa una alternativa eficiente para la determinación de promecarb mediante un procedimiento sencillo, rápido, de bajo costo en el que se emplean soluciones muy diluidas de C-butilresorcina[4]areno en medio acuoso y los residuos generados no son tóxicos.

Lista de acrónimos, abreviaturas y símbolos

ABS	buffer ácido acético/acetato
ACh	acetilcolina
AChEasa	acetilcolinesterasa
CA	calixareno
CD	ciclodextrina
ESI-FTICR-MS	espectroscopia de masas con ionización electrospray de resonancia ciclónica de iones por transformada de Fourier
g.f.	ganancia del fotomultiplicador
HAP	hidrocarburos aromáticos policíclicos
IR	infrarrojo
ITC	titulación calorimétrica isotérmica
mL	mililitro
ng	nanogramo
NOE	efecto nuclear Overhauser
PBS	buffer fosfato
Re	resorcinol
Rf	relación de frentes
RMN	resonancia magnética nuclear
TLC	cromatografía en placa fina
µg	microgramo

Las siguientes presentaciones en reuniones científicas y publicaciones en redacción surgen de los resultados presentados en este trabajo de Tesis:

A. Presentaciones a reuniones científicas

1. XIX Simposio Nacional de Química Orgánica (organizado por SAIQO). “*Caracterización de C-metil[4]resorcinareno y quenching de fluorescencia por aminocarb.*” Salas, Santiago D.; Veglia, Alicia V. Póster FQO-83; libro de sinopsis ISSN 2346-9862. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 11 al 14 de noviembre de 2015.

2. VIII Congreso de Química Analítica (organizado por AAQA). “*Validación de un método para promecarb en agua corriente y pomelo rosado por quenching de fluorescencia de C-n-butyl[4]resorcinareno.*” Salas, Santiago D.; Veglia, Alicia V. Póster ESP 16, ISBN 978-950-34-1279-4. La Plata, Buenos Aires, Argentina. 3 al 6 de noviembre de 2015.

3. VI Jornadas de Posgrado (Facultad de Ciencias Químicas, U.N.C.). “*Determinación de promecarb por quenching de fluorescencia de C-n-butyl[4]resorcinareno.*” Salas, Santiago D.; Veglia, Alicia V. Presentación de poster (QO-137). Córdoba, Argentina. 5 y 6 de diciembre de 2013.

4. XIX Simposio Nacional de Química Orgánica (organizado por SAIQO). “*Promecarb como quencher de fluorescencia de C-n-butyl[4]resorcinareno.*” Salas, Santiago D.; Veglia, Alicia V. Presentación de poster (FQO-104). Mar del Plata, Argentina. 16 al 19 de noviembre de 2013.

5. VII Congreso de Química Analítica. “*Determinación de promecarb por quenching de fluorescencia de C-n-butyl[4]resorcinareno.*” Salas, Santiago D.; Veglia, Alicia V. Presentación de poster (P-A-33). Mendoza, Argentina. 1 al 4 de octubre de 2013.

6. XVIII Congreso Argentino de Fisicoquímica. “*Comportamiento ácido-base y complejación de c-n-butyl[4]resorcinareno.*” Salas, Santiago D.; Blanco, Guillermo A.; Baumgartner, María T.; Veglia, Alicia V. Presentación de poster (EP-022). Rosario, Argentina. 9 al 12 de abril de 2013.

7. 13th Latin American Conference on Physical Organic Chemistry. “*Supramolecular Analytical Chemistry as a convenient alternative.*” Matías E. Carranza, Santiago D. Salas, María E. Majul Orihuela, Hugo M. Elero, Guadalupe G. Miñambres, Natalia L. Pacioni, y Alicia V. Veglia. 17 al 21 de mayo de 2015, Carlos Paz, Córdoba, Argentina. Presentación oral (OP19) a cargo de Alicia V. Veglia.

8. 12th Latin American Conference on Physical Organic Chemistry. "Calixarenes and related compounds as polyprotic acids and containers." Guadalupe G. Miñambres, Matías E. Carranza, Santiago D. Salas, Marcio Lazzarotto, María T. Baumgartner y Alicia V. Veglia. 7 al 12 de abril de 2013, Foz do Iguacu, Brasil. Presentación oral a cargo de Alicia V. Veglia.

B. Publicaciones (*en redacción*)

1. Salas, Santiago D; Baumgartner, María T.; Veglia, Alicia V. "*Acid-base properties and pK_a determinations of C-alkylresorcin[4]arenes in aqueous media.*"

2. Salas, Santiago D; Veglia, Alicia V. "*C-butylresorcin[4]arene as chemosensor for promecarb. Analytical method validation.*"

Durante el desarrollo de esta Tesis se realizaron las siguientes misiones de trabajo:

Universidad Federal de Río Grande del Sur (Porto Alegre, Brasil). Título del proyecto "Sensores basados en la estructura de calixarenos." Estada en el marco del Programa de Centros Asociados de Posgrado Brasil/Argentina (CAPES SPU, N° 046/10 2011-2013) del 27/11/2014 al 15/12/2014 y del 05/11/2012 al 02/12/2012. Director de Brasil: Marcio Lazzarotto.