



I N F I Q C

***“Dispositivos moleculares como  
sensores de compuestos de  
interés biológico y ambiental”***

***Lic. HUGO MATÍAS ELERO***

**TESIS DOCTORAL**

**2020**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA**

***Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas de Córdoba, INFIQC, CONICET***



Esta Tesis ha sido presentada para optar al grado de  
*DOCTOR* en *CIENCIAS QUÍMICAS*, ante:

**Prof. Dra. Alicia V. VEGLIA**

(Directora)

Comisión Evaluadora:

**Prof. Dra. Ana María BARUZZI**

**Prof. Dra. Claudia GARNERO**

**Prof. Dra. Natalia L. PACIONI**

**Prof. Dr. Mariano GARRIDO**

(Evaluador externo)





I N F I Q C

Este trabajo de Tesis se realizó en el *Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba (INFIQC)* y en dependencias del *Departamento de Química Orgánica* de la *Facultad de Ciencias Químicas* de la *Universidad Nacional de Córdoba*, gracias al apoyo financiero de FONCyT y CONICET.





# AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a las instituciones que a través de las becas permitieron que pudiera trasladarme a la ciudad de Córdoba y vivir aquí para concretar este trabajo de tesis doctoral.

En segundo lugar, a la Facultad de Ciencias Químicas y al Departamento de Química Orgánica y también al Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba (INFIQC-CONICET), y muy especialmente a todo su personal que en incontables oportunidades me han ayudado con las cuestiones administrativas y demás, con gran gran calidez y siempre muy predispuestos a ayudarme. Un agradecimiento más que especial.

A mi directora, la Dra. Alicia Veglia por haberme permitido sumarme a su grupo de trabajo y por su acompañamiento y seguimiento inmensurable durante estos años.

A mi comisión evaluadora, que desde un primer momento se mostró muy predispuesto a ayudarme, guiarme y colaborar en cada reunión, para que el trabajo de tesis fuese más enriquecedor y productivo, fundamentalmente en este último tiempo, donde me ayudaron con sus minuciosas correcciones a que el manuscrito resultará lo más claro, preciso y definido. A Naty un gracias muy especial y particular.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio 004 que durante todos estos años, hemos construido una gran familia y que siempre resultó de gran gran importancia para sobrellevar los vaivenes de esta carrera y que sin todos ellos, se hubiese transformado en una misión imposible. También agradecer a la “*community colombian*” del 004 que siempre estuvieron apoyando y contribuyendo con sus cafeses internacionales y por tantos tantos dulces que llegaban año a año en cada febrero.

Quiero agradecer de manera especial también a los “*liziados*”, los “*teresos*”, los “*peñoños*”, los “*polimericos*”, los “*sungalab*” y los “*nature*” por cada reunión, por cada abrazo, beso y las infaltables charlas pasillezca, las comilonas, las idas al comedor, a la cantina y los cajeros y al disco, y por los prestamos yerbales y de cafeses que nunca fueron devueltos. Y nunca olvidaré las interminables reuniones de auxiliares...

Al Programa de Tutorías y al Área de Orientación y Asesoramiento Educativo de la FCQ por tanto tanto trabajo juntos y por permitirme trabajar a su lado y por todo el apoyo recibido.

A mis amigos los “*dinámicos*” por ser el punto de apoyo y transformarse en mi familia en Córdoba. Los asados, los viajes a las sierras, las salidas al parque, los viajes compartidos, por todo. Por cada charla, cada reunión, cada comilona

y por sobre todo, los terribles partidos de padel que todos los martes o jueves que siempre me tocó ganarles... No aflojen y sigan entrenando.!!

A mis amigos de Río Cuarto, que siempre estuvieron en contacto y que me visitaron en más de una oportunidad en Córdoba.

A SYNERGY, especialmente a Cami, y a todo el equipo y grupo de trabajo, a Fede y Juan, y a todo el grupo de aerobox (Fii, Vero y et al) que todos los días eran el cable a tierra y que me recargaban de buenas vibras. Eternamente agradecido.

Por último, y no por eso menos importante, a mis viejos y hermanos y toda mi familia por estar siempre presentes y por sus visitas, que siempre resultaban ser una recarga energética más que importante para continuar.

eternamente agradecido...



# RESUMEN

Este trabajo de tesis surge como respuesta a la necesidad de nuevas metodologías para la determinación de compuestos de interés biológico y ambiental. Los compuestos estudiados poseen el núcleo de carbazol y quinolina, sustituidos con diferentes grupos.

Los nuevos métodos deben tener mejores sensibilidades, límites de detección y cuantificación que los informados previamente y de esta manera poder ser utilizados como metodologías alternativas más simples y rápidas en la detección de contaminantes en muestras reales.

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

Esta tesis está organizada con un índice temático general, siete capítulos y listas de abreviaturas y tablas.

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

El **Capítulo 2** se introduce los conceptos más importantes para una mejor comprensión de este trabajo. En una primera parte A, se describen los conceptos fundamentales de la química supramolecular. Tales como los requerimientos de complementariedad estructural y electrónica que deben existir para su existencia, y como los fundamentos para el reconocimiento molecular y la naturaleza de las interacciones involucradas durante el mismo. Al final de esta parte, se describen las características estructurales y las

propiedades fisicoquímicas más importantes de las ciclodextrinas y los calixarenos, así como sus aplicaciones analíticas más relevantes durante los últimos años. Por otro lado, la parte B de este capítulo, introduce la naturaleza, origen y las principales características de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, específicamente los nitrogenados y sus consecuencias e implicancias tanto ambientales y como biológicas. También, se mencionan diferentes métodos analíticos que se utilizan actualmente para la determinación de los mismos.

En los **Capítulos 3, 4, 5 y 6** se presentan y se discuten los resultados experimentales obtenidos en este trabajo. En cada uno de ellos se plantea: una introducción referente al tema específico que se va a tratar; los objetivos propuestos para el mismo; los resultados y discusiones que surgen del propio análisis de éstos; una sección experimental en donde se describen los reactivos, instrumentos y las técnicas y procedimientos que se emplearon; y por último, las conclusiones parciales del capítulo en cuestión.

El **Capítulo 3** presenta la caracterización fisicoquímica y espectroscópica de quinolina y de receptores macrocíclicos, y además, la evaluación de los complejos, considerando concentración de receptores en el equilibrio.

En el **Capítulo 4** se describen sistemas supramoleculares mixtos, en el que se abordan las reacciones de desplazamiento de la quinolina de la cavidad de la especie ácida del p-sulfonatocalix[6]areno, por analitos no fluorescentes, como ser glucosa, 3-clorofenol y 4-clorofenol.

El **Capítulo 5** muestra el desarrollo de una metodología analítica supramolecular, indirecta y fluorimétrica, la cual se utiliza como sensor de glifosato, por desplazamiento de la quinolina de la cavidad de la especie ácida del p-sulfonatocalix[6]areno. Se presentan los principales parámetros analíticos y se describe el proceso de validación necesario para asegurar que el método es confiable en la detección de glifosato.

En el **Capítulo 6** se describen los efectos de receptores macrocíclicos sobre las propiedades espectroscópicas de cuatro sustratos que derivan de los

núcleos del carbazol y la quinolina: harmina, harmano, 9-2-etilhexilcarbazol y quinina. En una primera parte se realizó una caracterización espectroscópica de los mismos, y luego, se examinaron los efectos que los receptores macrocíclicos producen sobre ellas. Para finalizar, se determinaron las constantes de asociación para cada sistema sustrato-receptor, las ecuaciones que describen los modelos empleados en los diferentes ajustes de datos experimentales.

Al finalizar cada capítulo, se especifica la bibliografía que se hace referencia en el texto con subíndices numéricos, la cual amplía y respalda los temas tratados en cada uno de ellos.

El **Capítulo 7** resume las conclusiones generales más importantes obtenidas de en este trabajo de tesis doctoral, con relación a los objetivos planteados inicialmente.



## ÍNDICE TEMÁTICO

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b><u>Capítulo 1: INTRODUCCIÓN GENERAL y OBJETIVOS</u></b>	
<b>1.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
1.1.1. QUÍMICA ANALÍTICA	23
1.1.2. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR	24
1.1.3. QUÍMICA ANALÍTICA SUPRAMOLECULAR	25
<b>1.2 OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
1.2.1. OBJETIVO GENERAL	28
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
<b>1.3. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>29</b>
<b><u>Capítulo 2: INTRODUCCIÓN TEMÁTICA</u></b>	
<b>PARTE A: QUÍMICA ANALÍTICA SUPRAMOLECULAR</b>	
<b>2.A.1. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR</b>	<b>33</b>
2.A.1.1. FACTORES FUNDAMENTALES EN QUÍMICA SUPRAMOLECULAR	36
<i>Reconocimiento molecular y complementariedad</i>	36
<i>Cooperatividad</i>	37
<i>Preorganización</i>	37
2.A.1.2. INTERACCIONES SUPRAMOLECULARES	38
<i>Interacciones ión – ión</i>	38
<i>Interacciones ión – dipolo</i>	39
<i>Interacciones dipolo – dipolo</i>	40
<i>Interacciones catión – <math>\pi</math></i>	41
<i>Interacciones anión – <math>\pi</math></i>	41

<i>Interacciones <math>\pi - \pi</math> stacking</i>	42
<i>Fuerzas de van der Waals</i>	43
<i>Puente hidrógeno</i>	43
<i>Efecto hidrofóbico</i>	44
2.A.1.3. RECEPTORES MACROCÍCLICOS	45
<i>CICLODEXTRINAS</i>	45
<i>CALIXARENOS</i>	49
2.A.1.4. APLICACIONES DE RECEPTORES MACROCÍCLICOS QUE AFECTAN LAS PROPIEDADES DE SUSTRATOS ORGÁNICOS	53
2.A.1.5. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	55
<i>Espectroscopia UV-visible</i>	56
<i>Espectroscopia de Fluorescencia</i>	56
 <b>PARTE B: HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS NITROGENADOS</b>	
2.B.1. ORIGEN, CONSECUENCIAS Y DETECCIÓN ANALÍTICA	58
2.B.2. BIBLIOGRAFÍA	64

**Capítulo 3: CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESPECTROSCÓPICA DE SUSTRATOS Y MACROCICLOS. REVALUACIÓN DE LOS COMPLEJOS QUINOLINA-RECEPTOR**

<b>3.1. OBJETIVOS</b>	<b>77</b>
<b>3.2. RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>	<b>78</b>
3.2.1. <i>Determinación de espectros de <math>^1\text{H}</math> RMN de <math>\beta</math>-ciclodextrina, p-sulfonatocalix[8]areno y quinolina</i>	78
3.2.2. <i>Caracterización de quinolina por espectroscopia UV-visible y de fluorescencia</i>	84
3.2.3. <i>Caracterización por espectroscopia UV-visible de las especies ácidas de los sulfonatocalix[n]arenos HCA[6]S y HCA[8]S</i>	87
3.2.4. <i>Determinación de la constante de asociación por espectroscopia de fluorescencia</i>	89

3.2.5. Cálculo de las constantes de asociación con concentraciones de receptor en el equilibrio e iteración para los sistemas de QUI-CA[6]S, QUI-CA[8]S y QUI- $\gamma$ -CD	92
3.2.5.1. Sistema QUI-HCA[6]S	93
3.2.5.2. Sistema QUI-HCA[8]S	96
3.2.5.3. Sistema QUI- $\gamma$ -CD	97
3.2.5.4. Sistema QUI- $\beta$ -CD	99
3.2.6. Efecto de la temperatura sobre la constante de asociación de los sistemas QUI-HCA[6]S y QUI- $\gamma$ -CD	101
<b>3.3. SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>	<b>103</b>
3.3.1. Reactivos e instrumentos	103
3.3.2. Determinación del punto de ebullición de QUI	105
3.3.3. Determinación del punto de fusión de las especies ácidas de los p-sulfonatocalix[n]arenos, CA[6]S y CA[8]S	106
3.3.4. Determinación de absortividades molares	106
3.3.5. Determinación de espectros de emisión de fluorescencia	108
<b>3.4. CONCLUSIONES PARCIALES</b>	<b>108</b>
<b>3.5. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>110</b>

## **Capítulo 4: SISTEMAS SUPRAMOLECULARES MIXTOS DEL COMPLEJO QUINOLINA-CALIX[6]ARENO y ANALITOS NO FLUORESCENTES**

<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>113</b>
<b>4.2. OBJETIVOS</b>	<b>119</b>
<b>4.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>	<b>119</b>
4.3.1. Reacción de desplazamiento de QUI por glucosa del sistema QUI-HCA[6]S	120
4.3.1.1. Estudio por espectroscopia UV-visible de glucosa en presencia del sistema QUI-HCA[6]S	120
4.3.1.2. Estudio por espectroscopia de fluorescencia de glucosa en presencia del sistema QUI-HCA[6]S	122

4.3.2. <i>Reacción de desplazamiento de QUI por 3-clorofenol del sistema QUI-HCA[6]S</i>	124
4.3.2.1. <i>Caracterización por espectroscopia UV-visible y de fluorescencia de 3-clorofenol</i>	124
4.3.2.2. <i>Estudio por espectroscopia Uv-visible de 3-clorofenol en presencia del sistema QUI-HCA[6]S</i>	125
4.3.2.3. <i>Estudio por espectroscopia de fluorescencia de 3-clorofenol en presencia del sistema QUI-HCA[6]S</i>	127
4.3.3. <i>Reacción de desplazamiento de QUI por 4-clorofenol del sistema QUI-HCA[6]S</i>	129
4.3.3.1. <i>Caracterización por espectroscopia UV-visible y de fluorescencia de 4-clorofenol</i>	129
4.3.3.2. <i>Estudio por espectroscopia Uv-visible de 4-clorofenol en presencia del sistema QUI-HCA[6]S</i>	130
4.3.3.3. <i>Estudio por espectroscopia de fluorescencia de 4-clorofenol en presencia del sistema QUI-HCA[6]S</i>	132
<b>4.4. SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>	134
4.4.1. Instrumentos y reactivos	134
<b>4.5. CONCLUSIONES PARCIALES</b>	137
<b>4.6. BIBLIOGRAFÍA</b>	137

## Capítulo 5: DETERMINACIÓN ANALÍTICA INDIRECTA de GLIFOSATO

<b>5.1. INTRODUCCIÓN</b>	143
5.1.1. <i>Características y propiedades de glifosato</i>	144
5.1.2. <i>Validación de un método analítico</i>	149
5.1.2.1. <i>Parámetros de validación</i>	149
<b>5.2. OBJETIVOS</b>	155
<b>5.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>	155
5.3.1. <i>Efecto de glifosato sobre el sistema QUI-HCA[6]S</i>	155
5.3.2. <i>Determinación de parámetros analíticos</i>	158
5.3.2.1. <i>Límites de Detección y Cuantificación</i>	158
5.3.2.2. <i>Linealidad</i>	158
5.3.2.3. <i>Robustez</i>	161



5.3.2.4. <i>Selectividad e Interferentes</i>	162
5.3.2.5. <i>Validación en muestras reales</i>	165
<i>Agua corriente</i>	165
<i>Leche en polvo</i>	168
<i>Formulaciones comerciales</i>	169
5.3.3. <i>Efecto de Glifosato sobre el sistema supramolecular CZL-HCA[6]S</i>	174
<b>5.4. SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>	<b>175</b>
5.4.1. <i>Reactivos e instrumentos</i>	175
5.4.2. <i>Determinación del punto de fusión de CZL</i>	177
<b>5.5. CONCLUSIONES PARCIALES</b>	<b>178</b>
<b>5.6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>178</b>

**Capítulo 6: EFECTO DE RECEPTORES MACROCÍCLICOS SOBRE LAS PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS de HARMANO, HARMINA, QUININA y 9-(2-ETIL HEXIL) CARBAZOL**

<b>6.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>187</b>
<b>6.2. OBJETIVOS</b>	<b>191</b>
<b>6.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>	<b>192</b>
6.3.1. <i>Caracterización espectroscópica de aminas heterocíclicas</i>	192
6.3.1.1. <i>Quinina</i>	192
6.3.1.2. <i>Harmano</i>	193
6.3.1.3. <i>Harmina</i>	194
6.3.1.4. <i>9-(2-etilhexil) Carbazol</i>	195
6.3.1.5. <i>Interpretación general de los espectros obtenidos</i>	196
6.3.2. <i>Estudio de los efectos macrocíclicos sobre las propiedades espectroscópicas de Quinina, Harmano, Harmina y 9-(2-etilhexil) Carbazol</i>	198
6.3.2.1. <i>Efecto de Calixarenos</i>	198
6.3.2.2. <i>Determinación de las constantes de asociación de Quinina y Harmina con Calixarenos</i>	199

<i>Sistema Quinina – p-sulfonatocalix[8]areno</i>	199
<i>Sistema Quinina – p-sulfonatocalix[6]areno</i>	201
<i>Sistema Harmina – p-sulfonatocalix[8]areno</i>	202
6.3.2.3. <i>Efecto de Ciclodextrinas</i>	204
6.3.2.4. <i>Determinación de las constantes de asociación de Quinina, Harmano y Harmina con CD</i>	205
<i>Sistema Harmina – hidroxipropil-<math>\beta</math>-ciclodextrina</i>	206
<i>Sistema Harmano – hidroxipropil-<math>\beta</math>-ciclodextrina</i>	207
<i>Sistema Quinina – hidroxipropil-<math>\beta</math>-ciclodextrina</i>	208
<i>Sistema Harmano – <math>\alpha</math>-ciclodextrina</i>	208
<i>Sistema Harmina – <math>\alpha</math>-ciclodextrina</i>	209
6.3.2.5. <i>Relación estequiométrica de los complejos con CD</i>	211
6.3.2.6. <i>Interpretación general de las constantes de asociación obtenidas para los complejos</i>	213
6.3.2.7. <i>Análisis de Harmina en presencia de <math>\alpha</math>-ciclodextrina</i>	214
6.3.2.8. <i>Determinación de parámetros analíticos para Harmina en presencia de <math>\alpha</math>-ciclodextrina</i>	217
<b>6.4. SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>	219
6.4.1. Reactivos e instrumentos	219
<b>6.5. CONCLUSIONES PARCIALES</b>	221
<b>6.6. BIBLIOGRAFÍA</b>	222
<b><u>Capítulo 7: CONCLUSIONES GENERALES</u></b>	231
<b>Producción Científica</b>	235
<b>Lista de Abreviaturas</b>	237

<b>Lista de Tablas</b>	<b>243</b>
<b>Lista de Esquemas</b>	<b>245</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>247</b>



# CAPÍTULO 1

---

## INTRODUCCIÓN GENERAL y OBJETIVOS

---

### 1.1. INTRODUCCIÓN

---

La química, en un campo muy general, se ocupa de la estructura y la transformación de la materia. De esta manera, la química molecular es el estudio de las entidades que se obtienen mediante la combinación de átomos, es decir, las moléculas. Por este motivo, muchas veces se dice que es la química del enlace covalente.<sup>1</sup> La química supramolecular va un paso más allá, ocupándose del estudio de cómo las moléculas interactúan entre sí, las cuales sin formar un enlace covalente entre ellas, son capaces de construir, de forma dinámica, conglomerados de dimensiones nano y micrométricas. La química supramolecular es entonces la química de las interacciones débiles. Precisamente, el término reconocimiento molecular se refiere a la interacción específica entre dos o más moléculas a través de enlaces no covalentes como el enlace de hidrógeno, la coordinación metálica, la fuerza hidrófoba, las fuerzas de van der Waals, las interacciones  $\pi$ - $\pi$  y/o las interacciones electrostáticas.<sup>2</sup> Además de estas interacciones directas, el disolvente puede también tener un destacado papel indirecto en la dirección del reconocimiento molecular en solución. De una manera más coloquial, Lehn ha descrito que las moléculas son como las personas, por lo que la química molecular trataría de

las personas. Por el contrario, la química supramolecular se ocuparía de la sociedad y, por decirlo de alguna manera, sería una sociología química.<sup>2</sup>

Actualmente, se encuentran en auge los nano-sistemas huésped-receptor basados en conglomerados o conjuntos y que se pueden dividir en dos categorías específicas: los grupos que sirven como huésped y para los cuales las moléculas funcionales están ancladas; y los grupos que sirven como receptor y que se organizan en grandes nanoestructuras. Los sistemas huésped-receptor basados en estos conglomerados suelen exhibir un rendimiento mejorado (por ejemplo, fotoluminiscencia, catálisis, estabilidad) en relación con su huésped constituyente y nanomateriales del receptor debido a la sinergia entre ellos, y por lo tanto, la creación del conjunto de huésped-receptor constituye un eficiente enfoque para la funcionalización de nanoestructuras con una función determinada.<sup>3,4,5</sup>

Por su parte, la interacción entre la ciencia de los polímeros y la química supramolecular conduce a la formación de diversos sistemas poliméricos supramoleculares.<sup>6</sup> Debido a la naturaleza dinámica de los enlaces no covalentes, los sistemas poliméricos supramoleculares pueden tener abundantes estructuras supramoleculares, dotados de muchas propiedades y funciones fascinantes como reversibilidad, adaptabilidad y respuesta a estímulos.<sup>7,8</sup> También existe un gran interés en la funcionalización de estructuras sintéticas multivalentes<sup>9</sup> tales como dendrímeros<sup>10</sup> y nanopartículas.<sup>11</sup> En este punto, la multivalencia se ha convertido en un concepto clave en los campos de biorreconocimiento,<sup>12</sup> catálisis,<sup>13</sup> química supramolecular,<sup>14</sup> y nanotecnología.<sup>15,16</sup> Esto, en consecuencia, resulta una combinación con atractivas propiedades ópticas y electrónicas intrínsecas y alta biocompatibilidad, lo que ha llevado a numerosas aplicaciones en nanomedicina<sup>17</sup> y diagnóstico.<sup>18</sup>

En los últimos años, muchos grupos de investigación en todo el mundo han demostrado que la química supramolecular puede jugar un papel único y poderoso en las ciencias analíticas. El campo involucra aplicaciones analíticas de estructuras de compuestos orgánicos e inorgánicos que sufren

reconocimiento molecular y autoensamblaje. Esta conjunción propone el floreciente campo de la "química analítica supramolecular".<sup>19</sup>

### 1.1.1. QUÍMICA ANALÍTICA

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.<sup>20</sup> 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 calidad de fármacos y alimentos, y las determinaciones de contaminantes ambientales.<sup>21</sup> 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.<sup>22,23,24</sup>

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.<sup>21</sup> Por ejemplo, diversas regulaciones establecen los niveles máximos permitidos de ciertos contaminantes ambientales o las concentraciones máximas permisibles para evitar efectos adversos para la salud. El análisis de analitos en cantidades trazas en muchos casos se ve dificultado debido a la baja sensibilidad analítica de las técnicas más comunes que permiten una determinación específica como la espectroscopia infrarroja (IR) o resonancia magnética nuclear (RMN). El uso de técnicas más sensibles

como las espectroscopias Ultravioleta-Visible (UV-visible) y de fluorescencia (F) 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.<sup>25</sup> En este contexto, la sensibilidad y la selectividad de las metodologías analíticas desarrolladas para satisfacer las necesidades actuales son aspectos cruciales.<sup>21</sup>

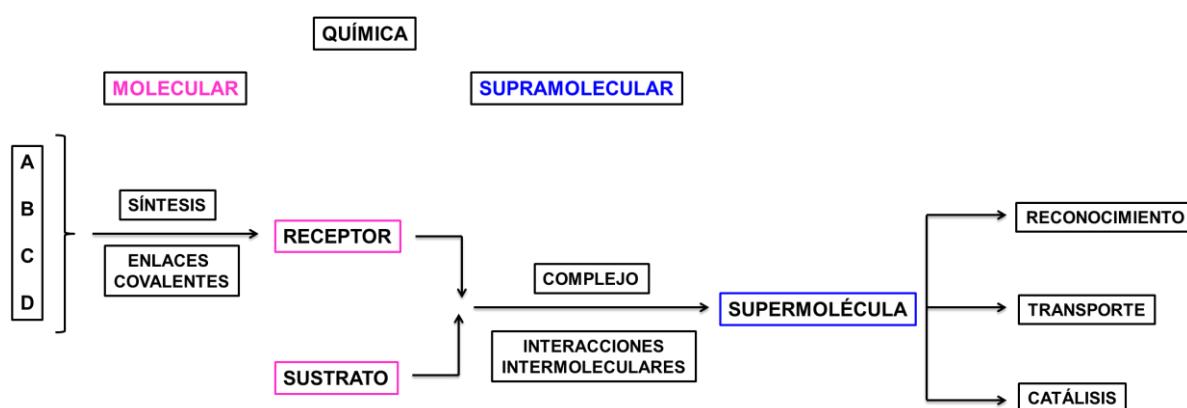
### 1.1.2. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

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.<sup>26</sup>

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.<sup>2</sup> 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 dado por el carácter hidrofóbico de las moléculas, interacciones dipolares y electrostáticas, formación de puentes hidrógeno, entre otros.<sup>27</sup> En otras palabras, la afinidad entre las moléculas es resultado de la complementariedad espacial y química existente entre ellas. Esta interacción denominada *supramolecular* de naturaleza no covalente puede ser intensificada mediante modificaciones sintéticas sobre el sensor que favorezcan, por ejemplo, la complementariedad química con el analito.<sup>28,29,30</sup> De esta manera, el aumento de la fuerza con la que la interacción supramolecular ocurre se traducirá en un mayor cambio de la señal analítica



del analito y, consecuentemente, en una determinación analítica más selectiva del mismo.<sup>31,32</sup> Este concepto se ve resumido en el Esquema 1.1, donde A, B, C y D representan los precursores moleculares para diseñar y construir un determinado receptor, el cual puede formar complejos de inclusión con un cierto sustrato o bien formar una *supermolécula*, la cual puede desempeñar diferentes funciones como reconocimiento o transporte molecular, entre otros:



Esquema 1.1: resumen y sinopsis de la química supramolecular

### 1.1.3. QUÍMICA ANALÍTICA SUPRAMOLECULAR

La conjunción de la Química Analítica y la Química Supramolecular ha dado origen a la últimamente definida Química Analítica Supramolecular.<sup>31</sup> 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.<sup>20,33</sup> 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.<sup>27,34</sup> 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.<sup>35</sup>

El área que involucra la aplicación analítica de estructuras orgánicas e inorgánicas que experimentan reconocimiento molecular y auto-organización ha sido recientemente definida como Química Analítica Supramolecular.<sup>31</sup> El crecimiento de este campo depende de la síntesis y empleo de receptores (R) complementarios a los sustratos que se quieren determinar. Dentro de los R más comunes para compuestos orgánicos, encontramos los cavitandos que poseen una cavidad intrínseca de dimensiones nano o subnanométricas, por ejemplo las ciclodextrinas (CD),<sup>36</sup> los cucurbiturilos (CB),<sup>37</sup> y los ciclofanos CF, entre otros.<sup>38</sup> Los CF son anillos aromáticos con puentes alifáticos, entre los cuales se destacan los resorcinarenos (RA) y los calixarenos (CA). Los RA contienen unidades de 3-hidroxifenol unidos por puentes metileno en las posiciones 4 y 6; en tanto que los CA son metaciclofanos con posiciones de unión 2,6 constituidos por unidades fenólicas en posición 1, ambos macrociclos poseen forma de canasta de basket siendo los RA más anchos y poco profundos para un mismo número de unidades monoméricas. Los CA, pueden ser obtenidos en cantidades de gramos y presentan mayor versatilidad sintética. Se conocen diversas reacciones de funcionalización de calixarenos,<sup>39</sup> adicionando grupos que aumentan su acidez, solubilidad en agua, o que pueden formar puente hidrógeno con los sustratos, y con los cuales hay pocos estudios realizados con fines mecanísticos y analíticos.<sup>40,41</sup> En la última década se ha informado la detección de trazas de hidrocarburos aromáticos policíclicos con nanopartículas de Ag funcionalizadas con CA.<sup>42</sup>

Los resultados de las investigaciones en el área de la química supramolecular llevaron a pensar que las moléculas son bloques constructores más convenientes que los átomos para la construcción de dispositivos y máquinas a nanoescala. En el sentido macroscópico un dispositivo o máquina es una entidad funcional compuesta de un número de componentes interactuantes que colectivamente conducen a una tarea predeterminada con resultados beneficiosos. Este concepto puede extenderse al nivel molecular y por lo tanto un dispositivo molecular (DM) puede definirse como un sistema

complejo construido de componentes moleculares con propiedades individuales definidas, mientras que el conjunto supramolecular total realiza una función más compleja y en donde la energía de interacción de los componentes debe ser menor a otros parámetros energéticos del sistema.<sup>35</sup> Una máquina molecular es un tipo de DM en el cual los componentes pueden producir cambios en sus posiciones relativas como resultado de un estímulo externo. En principio, los DM pueden diseñarse a partir de varias clases de sistemas supramoleculares. Los DM son sistemas químicos y por lo tanto funcionan por medio de procesos químicos que implican reordenamientos electrónicos y nucleares en la forma de: reacción química; absorción-emisión de fotones o adición-sustracción de electrones. Por otra parte, los cambios físicos y químicos que se producen en el sistema o en alguno de sus componentes sirven como señal para el control del proceso que ocurre y puede seguirse por técnicas espectroscópicas (RMN, UV-Visible, luminiscencia), de esta forma el sistema supramolecular funciona como un sensor químico.<sup>40,43,44,45,46</sup>

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados (HAPN), como el carbazol (CZL), la quinolina (QUI) y el indol (IN), tienen importancia biológica, industrial y medioambiental. Se ha informado que derivados con el núcleo de CZL actúan como intercaladores de ADN inhibiendo la replicación del ADN y la transcripción de ARN, y por lo tanto son agentes antitumorales. La QUI y sus derivados, se encuentran en algunos alcaloides biológicamente relevantes. Se ha informado que numerosos derivados de QUI han mostrado actividad contra varias infecciones parasitarias como leishmaniasis cutánea y visceral. En muchos casos los derivados del núcleo del IN actúan como hormonas y neurotransmisores. Por otra parte, la presencia de HAPN en corrientes de líquidos hidrocarbonados derivados del petróleo y el carbono, desactivan a los catalizadores utilizados para procesos de refinamiento de combustibles fósiles. La presencia de HAPN en el combustible final incrementa la emisión de óxidos de nitrógeno cuando el combustible se quema.<sup>47</sup> Por lo tanto, el desarrollo de métodos analíticos específicos y sensibles para la detección rápida de trazas de HAPN en efluentes acuáticos y combustibles líquidos es de gran importancia.

## **1.2. OBJETIVOS**

---

### **1.2.1. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo de investigación fue desarrollar métodos analíticos supramoleculares basados en la interacción de HAPN derivados de CZL y QUI con CA y CD como R, para la determinación directa de los analitos de interés e indirecta de otros analitos no fluorescentes por reacciones de desplazamiento.

Estos compuestos derivados de QUI y CZL poseen distintos sustituyentes en el núcleo aromático que posibilitan diferentes interacciones y cambios espectroscópicos en presencia de los R que serán objeto de estudio y análisis.

### **1.2.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- ✓ Aplicar el objetivo general a los siguientes analitos: quinina (QNA), harmano (HNO), harmina (HNA), 9-(2-etilhexil)-carbazol (EHC).
- ✓ Estudiar la influencia de receptores macrocíclicos, específicamente CD y CA, sobre el comportamiento espectroscópico de heterociclos nitrogenados derivados de QUI y CZL.
- ✓ Evaluar los tipos de interacción que se establecen en la asociación de los componentes moleculares para formar los distintos complejos sustrato-receptor.
- ✓ Desarrollar métodos analíticos supramoleculares para la detección de HAPN y de compuestos no fluorescentes que actúen como desplazantes.
- ✓ Validar los métodos propuestos mediante la determinación de parámetros analíticos y la aplicación del mismo en muestras reales.

### 1.3. BIBLIOGRAFÍA

---

- 1 S. I. Stupp and L. C. Palmer, Supramolecular chemistry and self-assembly in organic materials design, *Chem. Mater.*, 2014, **26**, 507–518.
- 2 J. M. Lehn, Perspectives in Supramolecular Chemistry From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self Organization, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, 1990, **29**, 1304–1319.
- 3 X. Kang and M. Zhu, Intra-cluster growth meets inter-cluster assembly: The molecular and supramolecular chemistry of atomically precise nanoclusters, *Coord. Chem. Rev.*, 2019, **394**, 1–38.
- 4 Q. He, P. Tu and J. L. Sessler, Supramolecular Chemistry of Anionic Dimers, Trimers, Tetramers, and Clusters, *Chem*, 2018, **4**, 46–93.
- 5 J. Zhao, D. Yang, X. J. Yang and B. Wu, Anion coordination chemistry: From recognition to supramolecular assembly, *Coord. Chem. Rev.*, 2019, **378**, 415–444.
- 6 J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen and L. L. Kiessling, Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 14922–14933.
- 7 B. Qin, Z. Yin, X. Tang, S. Zhang, Y. Wu, J.-F. Xu and X. Zhang, Supramolecular polymer chemistry: from structural control to functional assembly, *Prog. Polym. Sci.*, 2019, 101167.
- 8 L. A. Marchetti, L. K. Kumawat, N. Mao, J. C. Stephens and R. B. P. Elmes, The Versatility of Squaramides: From Supramolecular Chemistry to Chemical Biology, *Chem*, 2019, **5**, 1398–1485.
- 9 G. Pieters, C. Pezzato and L. J. Prins, Reversible control over the valency of a nanoparticle-based supramolecular system, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 15289–15292.
- 10 E. R. Gillies and J. M. J. Fréchet, Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discov. Today*, 2005, **10**, 35–43.
- 11 M. C. Daniel and D. Astruc, Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 293–346.
- 12 L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki and L. E. Strong, Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000, **4**, 696–703.
- 13 D. Méry and D. Astruc, Dendritic catalysis: Major concepts and recent progress, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, **250**, 1965–1979.

- 14 J. D. Badjić, A. Nelson, S. J. Cantrill, W. B. Turnbull and J. F. Stoddart, Multivalency and cooperativity in supramolecular chemistry, *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 723–732.
- 15 A. Mulder, J. Huskens and D. N. Reinhoudt, Multivalency in supramolecular chemistry and nanofabrication, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**, 3409–3424.
- 16 B. Rybtchinski, Adaptive supramolecular nanomaterials based on strong noncovalent interactions, *ACS Nano*, 2011, **5**, 6791–6818.
- 17 D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel and C. A. Mirkin, Gold nanoparticles for biology and medicine, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2010, **49**, 3280–3294.
- 18 K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li and V. M. Rotello, Gold nanoparticles in chemical and biological sensing, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 2739–2779.
- 19 E. V. Anslyn, Supramolecular analytical chemistry, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 687–699.
- 20 L. You, D. Zha and E. V. Anslyn, Recent Advances in Supramolecular Analytical Chemistry Using Optical Sensing, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 7840–7892.
- 21 M. Valcárcel, B. M. Simonet and S. Cárdenas, Analytical nanoscience and nanotechnology today and tomorrow, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **391**, 1881–1887.
- 22 T. State, *Social protection and agriculture to break the cycle of rural poverty*, 2015.
- 23 F. A. F, Innovation in Family Farming in Eastern Europe and Central Asia, *Rural Areas Dev.*, 2016, **13**, 16–20.
- 24 L. H. Samberg, J. S. Gerber, N. Ramankutty, M. Herrero and P. C. West, Subnational distribution of average farm size and smallholder contributions to global food production, *Environ. Res. Lett.*, 2016, **11**, 1748–9326.
- 25 N. Siraj, B. El-Zahab, S. Hamdan, T. E. Karam, L. H. Haber, M. Li, S. O. Fakayode, S. Das, B. Valle, R. M. Strongin, G. Patonay, H. O. Sintim, G. A. Baker, A. Powe, M. Lowry, J. O. Karolin, C. D. Geddes and I. M. Warner, Fluorescence, Phosphorescence, and Chemiluminescence, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 170–202.
- 26 J. Steed and J. Atwood, *Supramolecular chemistry*, Wiley, 2006, Second edition.
- 27 A. K. Yudin, Macrocycles: Lessons from the distant past, recent developments, and future directions, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 30–49.

- 28 D. Taura, Y. Taniguchi, A. Hashidzume and A. Harada, Macromolecular recognition of cyclodextrin: inversion of selectivity of  $\beta$ -cyclodextrin toward adamantyl groups induced by macromolecular chains, *Macromol. Rapid Commun.*, 2009, **30**, 1741–1744.
- 29 A. Pandith, H. Y. Kim, T. Shin and Y. J. Seo, Unprecedented green-emissive boranyl-hydrazone supramolecular assemblies and their in vitro diagnostic applications, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 2019, **197**, 111553.
- 30 S. Burattini, B. W. Greenland, D. H. Merino, W. Weng, J. Seppala, H. M. Colquhoun, W. Hayes, M. E. MacKay, I. W. Hamley and S. J. Rowan, A healable supramolecular polymer blend based on aromatic  $\pi$ - $\pi$  Stacking and hydrogen-bonding interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 12051–12058.
- 31 E. V. Anslyn, Supramolecular analytical chemistry, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 687–699.
- 32 X. Hu, F. Liu, W. Li, X. Wang and H. Deng, Sensitive detection of serum creatinine based on  $\beta$ -cyclodextrin- ferrocenylmethanol modified screen-printed electrode, *Anal. Sci.*, 2019, **35**, 903–909.
- 33 M. Ma, T. Luan, M. Yang, B. Liu, Y. Wang, W. An, B. Wang, R. Tang and A. Hao, Self-assemblies of Cyclodextrin Derivatives Modified by Ferrocene with Multiple Stimulus Responsiveness, *J. Mater. Chem. C*, 2015, **3**, 10715–10722.
- 34 A. Hashidzume, I. Tomatsu and A. Harada, Interaction of cyclodextrins with side chains of water soluble polymers: A simple model for biological molecular recognition and its utilization for stimuli-responsive systems, *Polymer (Guildf)*, 2006, **47**, 6011–6027.
- 35 Ariga K.; Kunitake T., *Supramolecular Chemistry – Fundamentals and Applications*, 2006.
- 36 G. Crini, S. Fourmentin, É. Fenyvesi, G. Torri, M. Fourmentin and N. Morin-Crini, Cyclodextrins, from molecules to applications, *Environ. Chem. Lett.*, 2018, **16**, 1361–1375.
- 37 J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti and L. Isaacs, The cucurbit[n]uril family, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2005, **44**, 4844–4870.
- 38 J. L. A. Jonathan W. Stedd, *Supramolecular chemistry*, 2006.
- 39 B. Y. Hou, Q. Y. Zheng, D. X. Wang, Z. T. Huang and M. X. Wang, Highly efficient construction of large molecular cavity using 1,3-alternate tetraoxacalix[2]arene[2]triazine as a platform, *Chem. Commun.*, 2008, 3864–3866.
- 40 Y. Cohen and S. Slovak, Diffusion NMR for the characterization, in solution, of supramolecular systems based on calixarenes,

- resorcinarenes, and other macrocyclic arenes, *Org. Chem. Front.*, 2019, **6**, 1705–1718.
- 41 D. S. Guo and Y. Liu, Calixarene-based supramolecular polymerization in solution, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 5907–5921.
- 42 L. Guerrini, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo and S. Sanchez-Cortes, Sensing polycyclic aromatic hydrocarbons with dithiocarbamate-functionalized ag nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 953–960.
- 43 V. Balzani, M. Gomez-Lopez and J. F. Stoddart, Molecular machines, *Mol. Mach.*, 2011, **31**, 1–275.
- 44 N. Sun, X. Xiao and J. Jiang, A cross-linked supramolecular polymer constructed from pillar[5]arene and porphyrine via host-guest interactions, *Polym. Chem.*, 2015, **6**, 5015–5020.
- 45 R. Sun, C. Xue, X. Ma, M. Gao, H. Tian and Q. Li, Light-driven linear helical supramolecular polymer formed by molecular-recognition-directed self-assembly of bis(p-sulfonatocalix[4]arene) and pseudorotaxane, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 5990–5993.
- 46 A. B. Ganganboina and R. an Doong, Functionalized N-doped graphene quantum dots for electrochemical determination of cholesterol through host-guest inclusion, *Microchim. Acta*, 2018, **185**, 1–11.
- 47 N. Li, X. Ma, Q. Zha and C. Song, Analysis and comparison of nitrogen compounds in different liquid hydrocarbon streams derived from petroleum and coal, *Energy and Fuels*, 2010, **24**, 5539–5547.



---

## INTRODUCCIÓN TEMÁTICA

---

### PARTE A:

## QUÍMICA ANALÍTICA SUPRAMOLECULAR

### 2.A.1. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

---

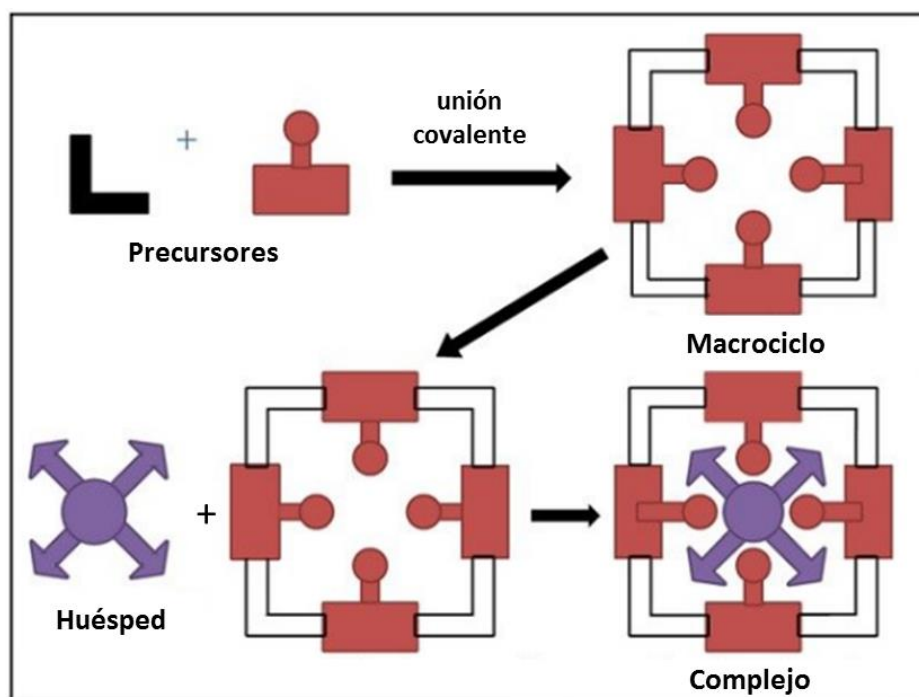
La química supramolecular ha sido definida por uno de sus principales mentores, Jean-Marie Lehn, como '*química de ensamblajes moleculares y del enlace intermolecular*'. Más coloquialmente, esto puede expresarse como "*química más allá de la molécula*".<sup>1</sup> Otras definiciones incluyen frases como "la química del enlace no covalente" y "química no molecular". Originalmente, la química supramolecular se definió en términos de interacción no covalente entre una molécula '*huésped*' o '*sustrato*' y un '*receptor*' como se destaca en la Figura 2.A.1, que ilustra la relación entre química molecular y supramolecular en términos de estructuras y funciones.<sup>1</sup>

Los orígenes de la química supramolecular están íntimamente ligados al trabajo pionero desarrollado por Pedersen en los años 60 en el que se describe la síntesis, identificación, estructura y propiedades de 33 poliéteres cíclicos a

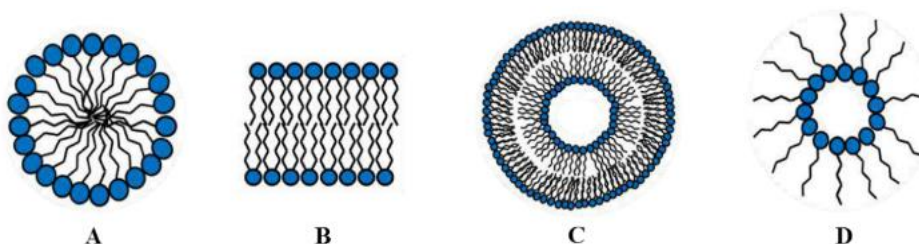
los que denominó éteres corona, por lo que se convirtieron en las primeras moléculas artificiales en mostrar ese reconocimiento.<sup>2</sup> Asimismo, se describe la preparación de complejos estables entre estos éteres y cationes como  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y otros. Por otro lado, Cram desarrolló el concepto de reconocimiento molecular creando una amplia gama de sistemas moleculares basados en sistemas tridimensionales<sup>3</sup> como los esferandos y cavitandos, estableciendo además un nuevo campo de la química, la denominada química huésped-receptor, donde la molécula anfitriona puede acomodar otra molécula (llamada la molécula huésped).<sup>4</sup> En 1978, Lehn intentó organizar esta nueva química, y propuso por primera vez el término química supramolecular, que definió como “más allá de la molécula”.<sup>1</sup> Este hecho representa el momento en que la química supramolecular se estableció de una manera clara. Pedersen, Cram y Lehn recibieron el premio Nobel en el año 1987 por su desarrollo y uso de moléculas con una estructura específica para interacciones de gran selectividad.<sup>5,6</sup>

La química supramolecular se puede dividir en dos amplias categorías: la química de “*huésped-receptor*” y la de sistemas “*autoensamblados*”, también definidos como ‘*sistemas organizados*’, como puede verse esquemáticamente en la Figura 2.A.1. La diferencia entre estas dos áreas es una cuestión de tamaño y forma.<sup>7</sup> Si una molécula es significativamente mayor que otra y puede ordenarse alrededor de ella, entonces se denomina “*receptor*”, y la molécula más pequeña es su “*huésped*”, que queda coordinado por el ‘*receptor*’. Donde no hay diferencia significativa en el tamaño y ninguna especie está actuando como *receptor* de otra, la interacción no covalente de dos o más especies se denomina autoensamblaje molecular.<sup>7</sup> Estrictamente, el autoensamblado es un equilibrio entre dos o más componentes moleculares para producir un sistema organizado con una estructura que sólo depende de la información contenida dentro de la química de dichos componentes. Este proceso es generalmente espontáneo, pero puede ser influenciado por solvatación.<sup>8</sup>

1



2



**Figura 2.A.1:** (1) Construcción de sistemas supramoleculares: complejo huésped-receptor y (2) Representación esquemática de distintos sistemas organizados: Micela directa (A) Bicapa (B) Vesícula (C) Micela inversa (D).

La química supramolecular surge como resultado natural del proceso de imitación que durante siglos ha realizado el hombre de los fenómenos que ha visto en la naturaleza. Las asociaciones no covalentes entre moléculas son muy comunes en los sistemas biológicos.<sup>8</sup> Por ejemplo, en el ADN dos cadenas se unen por enlaces de hidrógeno sin formar un enlace covalente, el sistema inmune se basa en el reconocimiento antígeno-anticuerpo, y la especificidad de las enzimas se basa en una rigurosa identificación supramolecular del sitio activo de la enzima por el sustrato. Y así existen

infinidad de ejemplos, que el hombre ha tomado como modelo para sintetizar compuestos supramoleculares y desarrollar la química supramolecular.<sup>9</sup>

De un modo más descriptivo, podemos decir que la química supramolecular se basa en la unión de entidades individuales (átomos, iones y/o moléculas) formando una nueva entidad cuyas propiedades son significativamente mejores y a la vez distintas que la suma de cada una de las propiedades de las entidades individuales. Como se dijo antes, en esta unión de dos o más especies químicas participan fuerzas intermoleculares débiles, mientras que la química clásica se basa en la formación de enlaces covalentes, más fuertes.<sup>10,11,12,13</sup>

#### *2.A.1.1. Factores fundamentales en química supramolecular*

##### *Reconocimiento molecular y complementariedad*

El reconocimiento molecular es un concepto integrado en la química supramolecular que corresponde a la capacidad que tienen las moléculas de reconocerse mutuamente.<sup>7</sup> Queda definido por la selección del sustrato por una molécula receptora determinada, la información involucrada en el enlace (no covalente) y la energía implicada. La interacción sustrato-receptor se basa en la afinidad entre ambos en cuanto a forma, tamaño, conformación, polaridad, polarizabilidad, etc.

El proceso de reconocimiento molecular hace que la química supramolecular involucre a los procesos de agregación espontánea de moléculas individuales en estructuras más grandes, que presentan un cierto orden. Para que se forme un complejo, el receptor debe poseer sitios de interacción electrónicamente adecuados (polaridad, pares de electrones disponibles, etc.) y distribuidos espacialmente de tal manera de *complementarse* al huésped. Si el receptor cumple con estos criterios, se dice que hay “complementariedad entre el huésped y el receptor”.<sup>8,14</sup>

### *Cooperatividad*

Cuando la interacción de todo el sistema es sinérgicamente mayor que la suma de las partes, es decir, cuando los sitios más vinculantes en un receptor cooperan de esta manera para vincular a un huésped el fenómeno es denominado *cooperatividad*. Si la estabilidad general del complejo es mayor que la suma de las energías de la interacción del huésped con los grupos de vinculantes del receptor individualmente, el resultado es una *cooperatividad positiva*.<sup>15</sup> Por otro lado, efectos estéricos o electrónicos desfavorables entre las partes, causan que la energía libre total de enlace para el complejo sea menor que la suma de sus partes, entonces el fenómeno se denomina *cooperatividad negativa*.<sup>8</sup>

El efecto cooperativo puede darse en sistemas de más de dos componentes (por ejemplo, un receptor con dos sustratos orgánicos, o dos receptores con una molécula orgánica).<sup>16</sup>

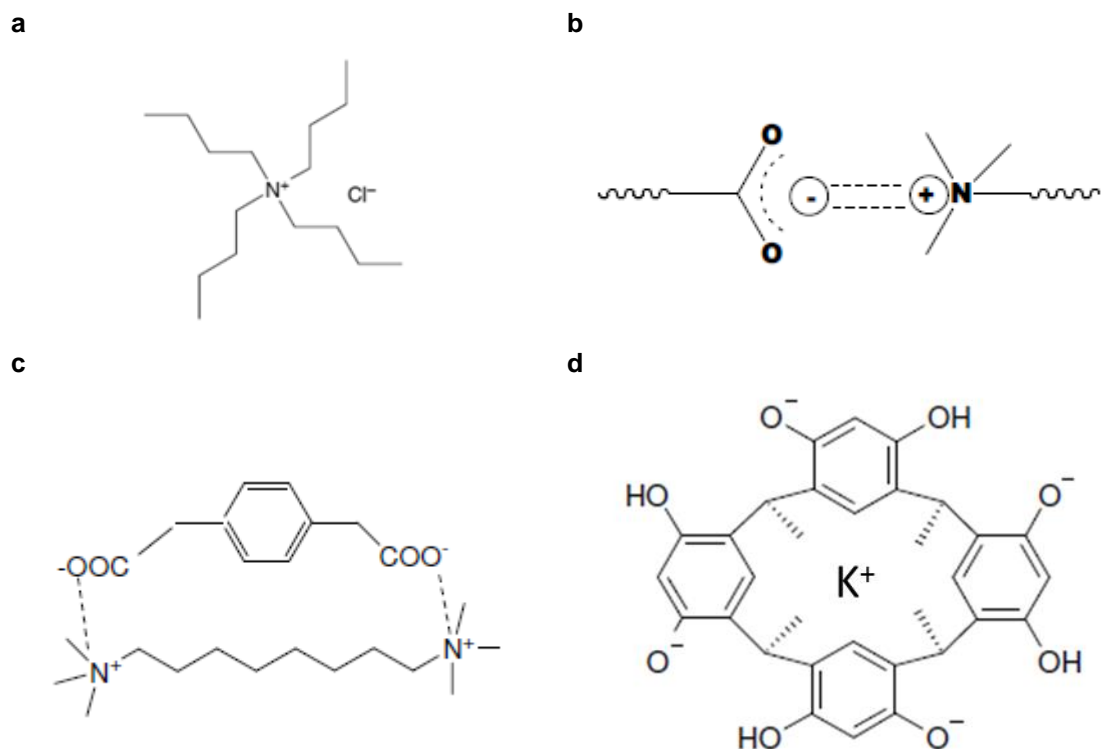
### *Preorganización*

Otro factor importante, es aquel que favorece o contribuye en la estabilidad del complejo, por efecto macrocíclico. El hecho de que los sitios de unión estén ubicados en una estructura macrocíclica hace que se requiera un menor cambio conformacional de la estructura, por lo que el complejo resultante se ve favorecido termodinámicamente. Este concepto es muy importante debido a que es el factor que más contribuye a la energía libre total de formación del complejo. Este fenómeno se atribuye a que si el receptor no sufre grandes cambios conformacionales al unirse al huésped, se dice que existe una “*preorganización*”.<sup>17</sup> 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.<sup>8</sup>

### 2.A.1.2. INTERACCIONES SUPRAMOLECULARES

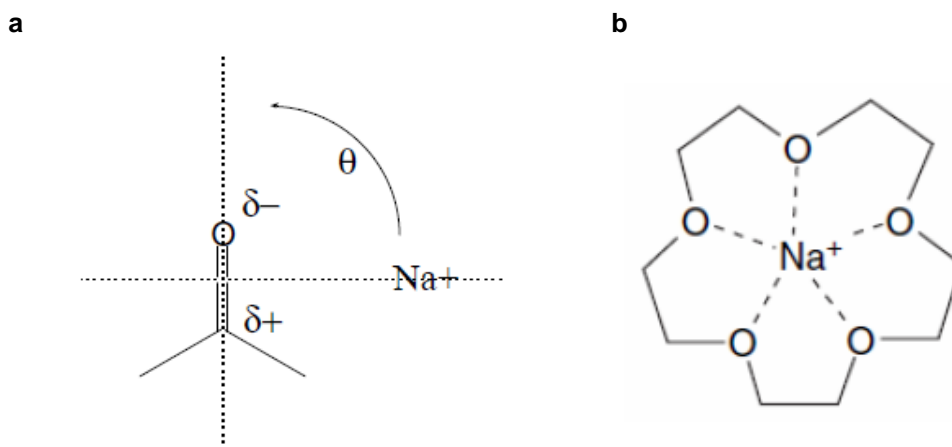
En general, la química supramolecular engloba a interacciones no covalentes. Este término involucra a una gran cantidad de fuerzas atractivas y repulsivas. A continuación, se describen las interacciones no covalentes más importantes.

**Interacciones ión-ión:** el enlace iónico es el más fuerte y es comparable en la fuerza de la unión a un enlace covalente (energía de enlace =  $(100 - 350) \text{ kJ mol}^{-1}$ ).<sup>7</sup> Esta clase de interacción se basa en la atracción coulombica entre cargas opuestas próximas entre sí. Un típico ejemplo de la química básica es el sólido iónico en forma de cubo del cloruro de sodio, en el cual cada catión  $\text{Na}^+$  se encuentra rodeado por seis aniones  $\text{Cl}^-$ . De manera similar a los que ocurre en la Figura 2.A.2.a. Las interacciones ión-ión son las más fuertes de las tipo electrostáticas y son no direccionales, es decir que las especies interactuantes pueden estar situadas en cualquier dirección.<sup>7</sup> Algunos ejemplos de este tipo de interacciones pueden observarse en los casos mostrados en la Figura 2.A.2. La Figura 2.A.2.b es un caso muy común de este tipo de interacción, presente en sistemas biológicos como ser en enzimas y proteínas.



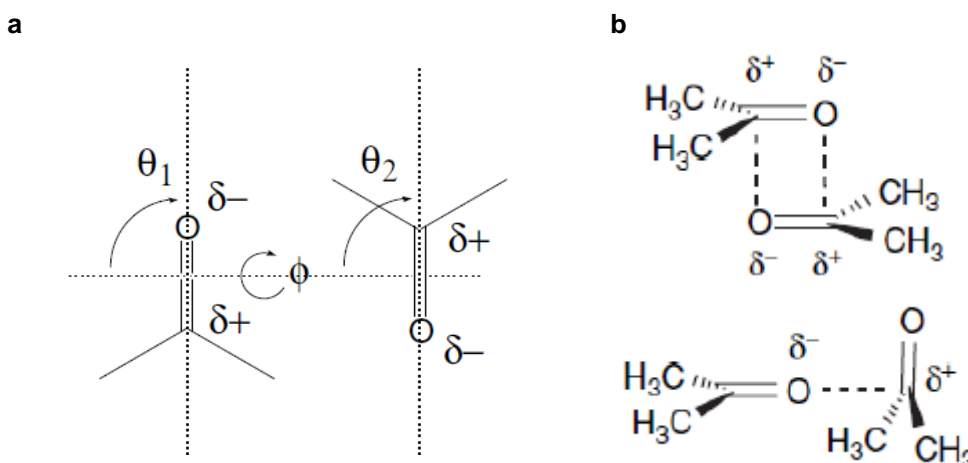
**Figura 2.A.2:** Ejemplos de interacciones ión-ión. **a.** interacción entre tetrabutilamonio y cloruro. **b** y **c.** interacción entre el anión carboxilato y una amina cuaternaria. **d.** interacción entre tetrafenolato de un resorcinareno y potasio.

**Interacción ión-dipolo:** la interacción entre el catión Na<sup>+</sup> con una molécula polar tal como agua, es un ejemplo de una interacción ión-dipolo. Es un tipo de interacción direccional, en que es necesaria cierta disposición espacial, para hacer más efectiva dicha interacción, como puede verse en la Figura 2.A.3.a. Otro ejemplo, en la química supramolecular, es la estructura formada entre un catión de un metal alcalino y un macrociclo formado por enlaces éter, llamado éter corona, como puede verse en la Figura 2.A.3.b. En dichas interacciones, los electrones desapareados del oxígeno son atraídos por la carga positiva del metal (energía de enlace = (50 – 200) kJ mol<sup>-1</sup>).<sup>7</sup>



**Figura 2.A.3:** Ejemplos de interacciones ión-dipolo. **a.** interacción entre catión sodio y agua. **b** interacción entre el catión sodio y un éter corona.

**Interacciones dipolo-dipolo:** se producen cuando hay un alineamiento de dipolos, es decir que requieren de cierta orientación entre las entidades para establecer de forma óptima, la interacción entre dos moléculas adyacentes (energía de enlace =  $(5 - 50 \text{ kJ mol}^{-1})$ ).<sup>7</sup> Esto puede verse en la Figura 2.A.4, en donde se muestra la orientación de máxima eficiencia del dipolo presente en la acetona.



**Figura 2.A.4:** Ejemplos de interacciones dipolo-dipolo en acetona. **a.** direccionamiento molecular óptimo. **b** interacciones dipolo-dipolo posibles.



**Interacción Cation –  $\pi$** . los cationes de metales de transición tales como  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Pt}^{+2}$  forman complejos con hidrocarburos olefínicos y aromáticos. El enlace en esos tipos de complejos ocurre entre los orbitales d parcialmente ocupados y los electrones de los dobles enlaces olefínicos (energía de enlace = (5 – 80)  $\text{kJ mol}^{-1}$ ).<sup>7</sup> Un ejemplo de este tipo de interacción se da entre la acetilcolina catiónica y un residuo de triptófano del receptor de acetilcolina.<sup>18</sup> Estos ejemplos se muestran en la Figura 2.A.5.

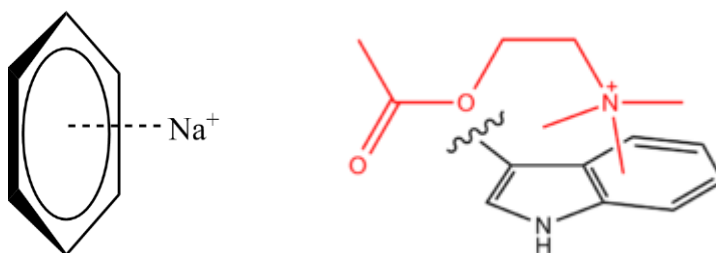
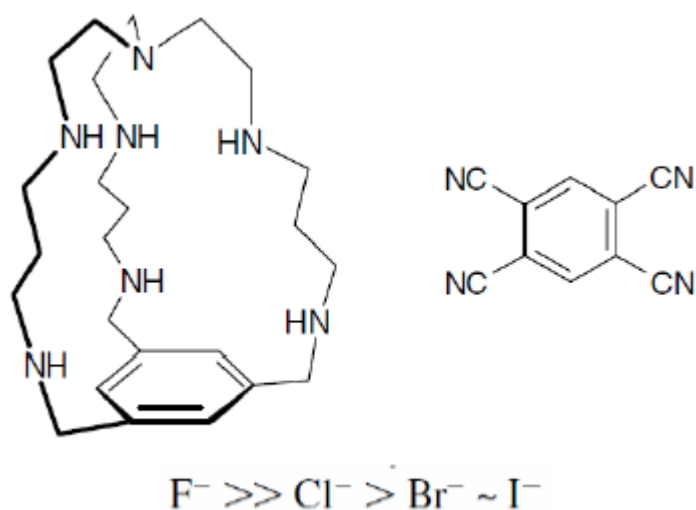


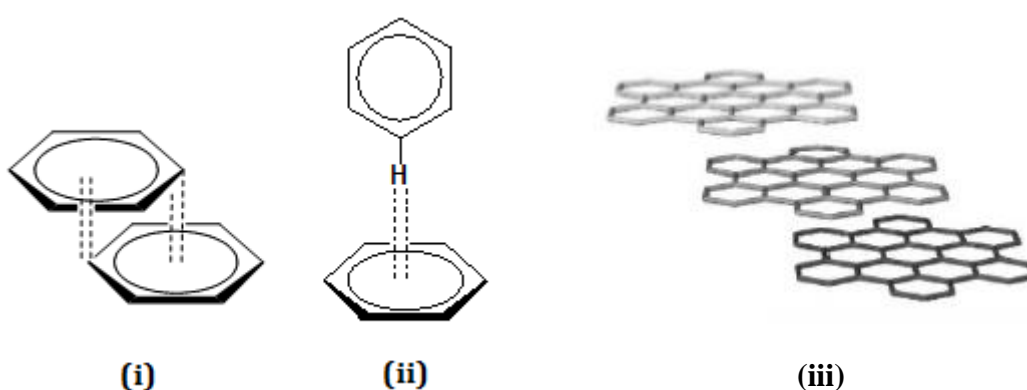
Figura 2.A.5: Ejemplos de interacciones catión- $\pi$ .

**Interacción Anión –  $\pi$** . estas interacciones son consideradas en el diseño de complejos de receptores con aniones, con el objetivo de atraer una carga negativa y donde la distribución de carga del sistema  $\pi$  debe estar invertida. Esto se consigue colocando algunos grupos que atraen fuertemente electrones junto al sistema  $\pi$ , como son los casos que se observan en la Figura 2.A.6 y los aniones de halógenos tal como  $\text{F}^-$  y  $\text{Cl}^-$  y en menor medida los demás halógenos ( $\text{Br}^-$  y  $\text{I}^-$ ).<sup>7</sup>



**Figura 2.A.6:** Ejemplos de interacciones anión- $\pi$ , con diferentes halógenos.

**Interacción  $\pi$ - $\pi$  stacking:** es una interacción electrostática débil que ocurre entre anillos aromáticos con una diferencia relativa de carga electrónica entre ellos (energía de enlace= (0 – 50) kJ mol<sup>-1</sup>) (ver Figura 2.A.7).<sup>7</sup>



**Figura 2.A.7:** Ejemplos de interacciones  $\pi$ - $\pi$ . i. cara-cara. ii. Borde-cara. iii. Láminas de grafeno.

**Fuerzas de van der Waals:** esta interacción es producto de la polarización y atracción electrostática de la nube electrónica de dos anillos aromáticos adyacentes. Es una interacción muy débil, no direccional y no-específica (energía de enlace  $\leq 5 \text{ kJ mol}^{-1}$ , variable) (ver Figura 2.A.8).<sup>7</sup>

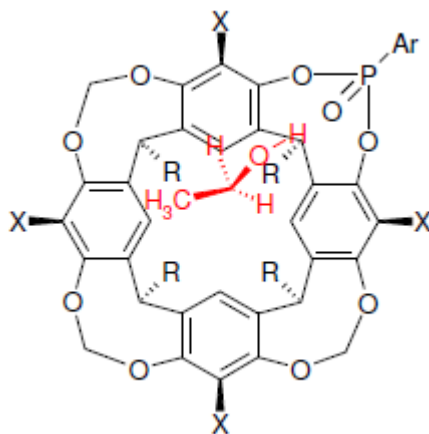


Figura 2.A.8: Ejemplos de interacciones van der Waals entre un resorcinareno y etanol.

**Puente hidrógeno:** esta interacción es bien conocida y representa un tipo de interacción dipolo-dipolo, y un muy buen ejemplo es la formación de dímeros de ácidos carboxílicos, como así también entre las bases nitrogenadas adenina y timina componentes de la doble hélice del ADN, entre otros (energía de enlace =  $(4 - 120) \text{ kJ mol}^{-1}$ ).<sup>7</sup> Estos ejemplos pueden verse en la Figura 2.A.9.

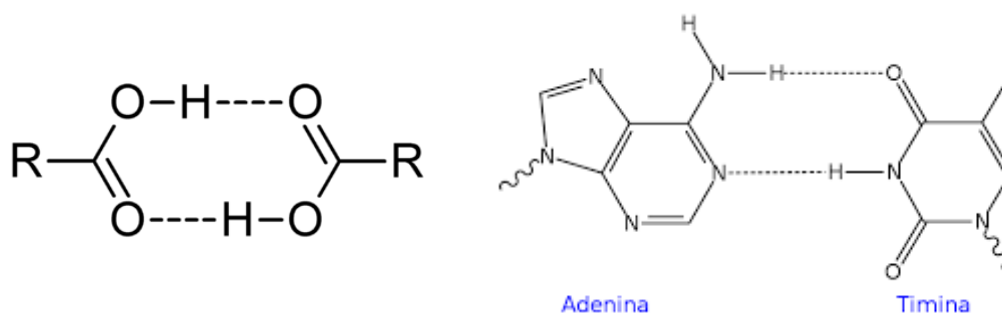
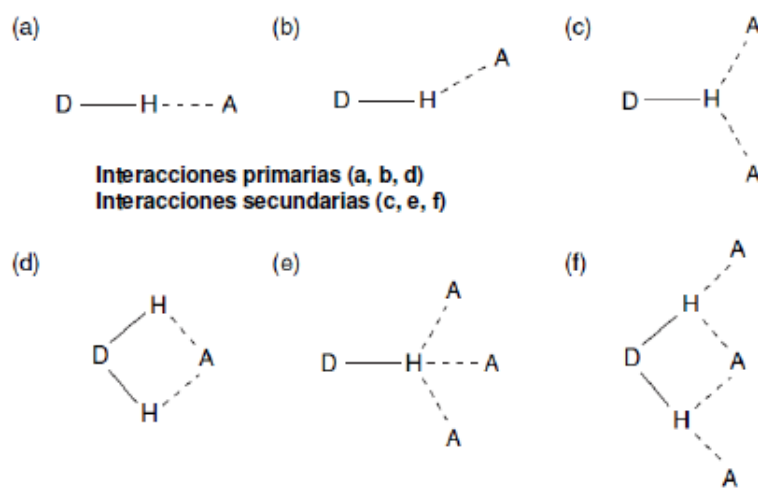


Figura 2.A.9: Ejemplos de interacciones puente de hidrógeno.

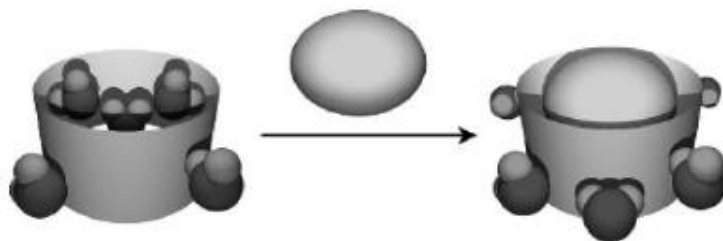
Es la interacción no covalentes más importante, que opera a distancias más cortas y permite varias disposiciones espaciales de enlace y categorías (primarias y secundarias), como puede verse en la Figura 2.A.10.<sup>7</sup>



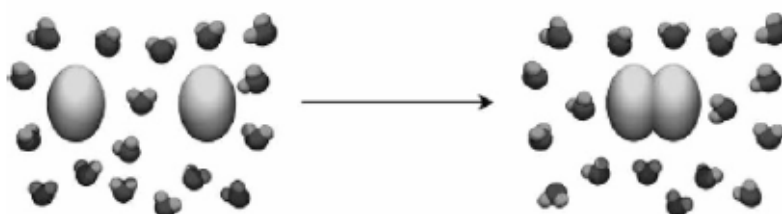
**Figura 2.A.10:** Tipos de geometría de interacciones puente de hidrógeno. (a) lineal. (b) doblada. (c) bifurcada. (d) bifurcada aceptor. (e) bifurcada donador. (f) trifurcada. (g) bifurcada tricentral.

**Efecto hidrofóbico:** está relacionado con la exclusión de solventes polares, particularmente agua, o partículas que se encuentren solvatadas. Este efecto se observa en la inmiscibilidad del agua y el aceite. Es de crucial importancia en la formación de un complejo huésped-receptor. Por lo general, el receptor posee una cavidad apolar que tiene moléculas de agua incluidas dentro de la misma, las cuales son excluidas al interactuar el receptor con el huésped por factores entálpicos y entrópicos que favorecen el proceso (ver Figura 2.A.11).<sup>7</sup>

(a) Liberación de moléculas de agua.



(b) Un hueco implica menor organización del solvente.



**Figura 2.A.11:** (a) Efecto hidrofóbico entálpico. (b) Efecto hidrofóbico entrópico.

### 2.A.1.3. RECEPTORES MACROCÍCLICOS

En este trabajo de tesis se emplearon receptores macrocíclicos del tipo cavitandos, como lo son las ciclodextrinas (CD) y los calixarenos (CA). Estos receptores poseen como característica en común una cavidad hidrofóbica capaz de incluir diferentes huéspedes. A continuación, se describen sus principales propiedades desde el punto de vista de la química supramolecular.

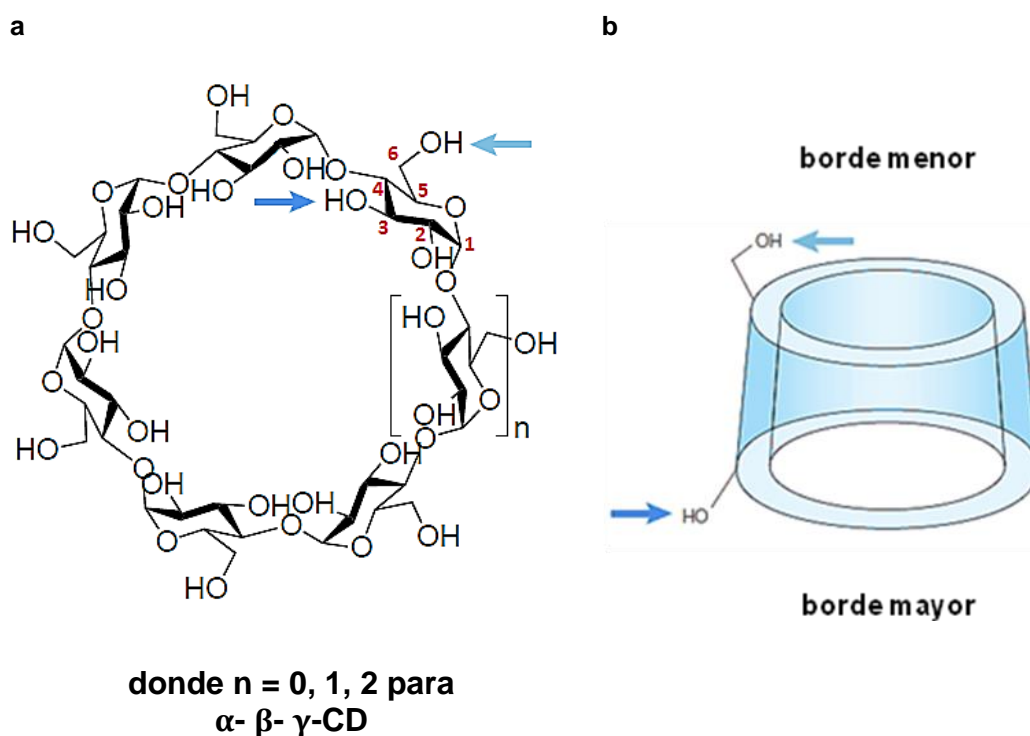
Presentan una inmensa variedad de aplicaciones como ser en síntesis orgánica, como sistemas catalíticos, en la innovación de nuevos materiales con propiedades de interés en química farmacéutica, medicina, agronomía y otras disciplinas como la química analítica.

#### **CICLODEXTRINAS**

Las CD, también llamadas dextrinas de Schardinger, cicloamilosas, o cicloglucanos son una serie de oligosacáridos producidos por la acción de la amilasa del *Bacillus macerans* del almidón. Las CD fueron descubiertas por

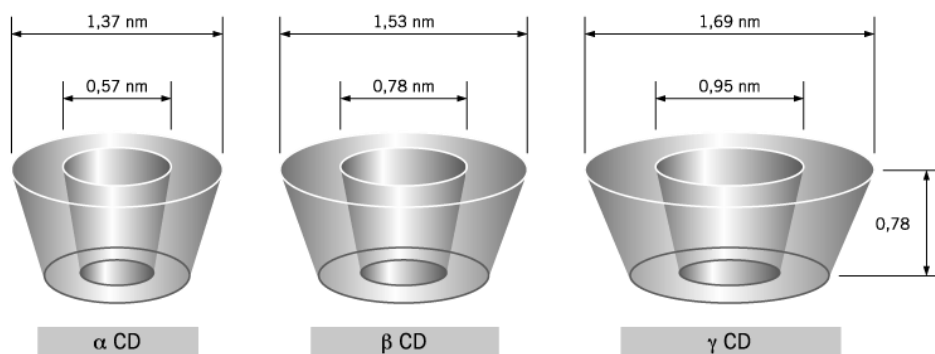
Villiers en 1891 y la primera descripción detallada de su preparación y aislamiento fue realizada por Schardinger.<sup>19,20</sup>

Las CD están formadas por unidades de D (+) glucopiranosas enlazadas mediante uniones glicosídicas  $\alpha$ -(1,4).<sup>20</sup> Según el número de unidades de glucosa las CD se clasifican con letras griegas, siendo  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -CD, para 6, 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente, las cuales son denominadas nativas. A partir de estudios de rayos X de la estructura cristalina de las CD, se conoce que poseen la forma de un cono truncado con una cavidad relativamente hidrofóbica.<sup>21</sup> En la Figura 2.A.12 se muestra la estructura química de CD nativas y las características indicadas anteriormente.



**Figura 2.A.12:** (a) Estructura de ciclodextrinas nativas. (b) Representación esquemática de la estructura en forma de cono de las ciclodextrinas. Se indica con flechas los grupos hidroxilos que forman el borde menor (hidroxilos primarios) y mayor (hidroxilos secundarios).

El número de unidades de glucosa determinan las dimensiones y el tamaño de la cavidad.<sup>22</sup> En la Figura 2.A.13 se muestran estas características y sus dimensiones aproximadas.



**Figura 2.A.13:** Representación esquemática de la estructura en forma de cono de las ciclodextrinas y sus dimensiones aproximadas.

Todas las unidades de glucosa tienen la conformación silla y por ello los grupos hidroxilos secundarios se ubican sobre la boca más grande del cono, mientras que los primarios en la boca de menor diámetro, como se indicó en la Figura 2.A.12 b.<sup>22</sup> En el interior de la CD se encuentran las cadenas de  $-\text{CH}_2-$  y los oxígenos glicosídicos, y como resultado de la ubicación de los grupos funcionales y átomos, el interior de la cavidad es apolar relativa al agua y el exterior es hidrofílico.

Debido a sus características estructurales, las CD poseen propiedades físicas y químicas particulares. Algunas de las propiedades más importantes se muestran en la Tabla 2.A.1.<sup>19</sup>

Tabla 2.A.1: Propiedades físicas y químicas de ciclodextrinas <sup>a</sup>

<i>Propiedades</i>	<i>α-CD</i>	<i>β-CD</i>	<i>γ-CD</i>
Nº de glucopiranosas	6	7	8
Masa Molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidad en agua (% p/v), 25 °C	14,5	1,85	23,2
Diámetro Cavity Interna (nm)	0,47 – 0,53	0,60 – 0,65	0,75 – 0,83
Diámetro Cavity Externa (nm)	1,46	1,54	1,75
Altura de la cavidad (nm)	0,79	0,79	0,79
Volumen de la cavidad (nm <sup>3</sup> )	0,174	0,262	0,472
Contenido de agua en el cristal (%P/P)	10,2	13,2 – 14,5	8,13 – 17,7
Moléculas de agua en la cavidad	6	11	17

<sup>a</sup> Datos obtenidos de Bender, M.L; Komiyama, M.; *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag, Berlín Heidelberg, New York, 1978.

La estructura macrocíclica se estabiliza por enlaces puente hidrógeno intramoleculares entre los grupos hidroxilos secundarios de dos unidades de glucopiranosas adyacentes. Debido a esta estabilización, las ciclodextrinas nativas  $\alpha$ -CD,  $\gamma$ -CD y en particular  $\beta$ -CD tienen limitada solubilidad en agua.<sup>19</sup> Esta interacción fue propuesta en base a estudios de cristalografía de rayos X y confirmada por los bajos corrimientos químicos de los grupos hidroxilos en dimetilsulfóxido. Estas fuertes interacciones puentes hidrógenos son atribuidas a la limitada rotación de las unidades de glucosa en estas moléculas cíclicas. Además, el pK<sub>a</sub> de los grupos hidroxilos secundarios disminuye alrededor de 12 en parte debido a las interacciones puentes hidrógenos (con respecto a los de la glucosa libre) que tienen un gran efecto en la reactividad de estos grupos.

Las CD son estables en soluciones alcalinas, sin embargo son susceptibles a la hidrólisis ácida parcial dando como productos glucosa y una serie de maltosacáridos acíclicos.<sup>23</sup> Bajo condiciones normales de trabajo de pH > 3,5 y temperatura por debajo de 60 °C las CD son bastante estables.



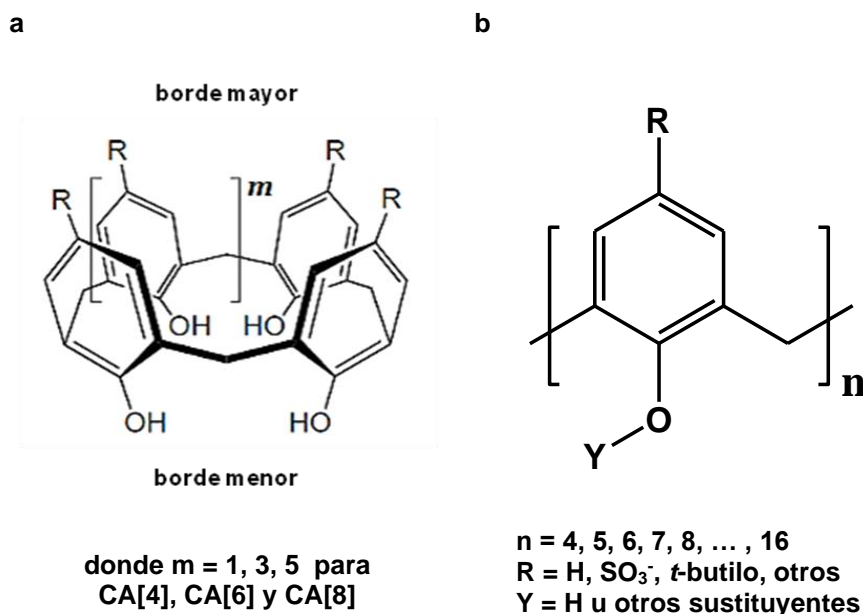
Además de las CD nativas, existen CD modificadas en las cuales los hidrógenos de los grupos hidroxilos de las posiciones 2, 3 y 6 de los carbonos del anillo de la glucosa han sido sustituidos por otros grupos. El objetivo de la derivatización puede ser para mejorar la solubilidad de la CD derivatizada con respecto a la CD nativa, mejorar la asociación con algún huésped, unir algún grupo específico (catalítico) para cumplir alguna función en particular, o para formar CD inmovilizadas en estructuras como polímeros. Un ejemplo de CD derivatizada es la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), en la cual los hidrógenos de los grupos hidroxilos han sido sustituidos parcialmente por restos 2-hidroxipropilos. Esta CD derivatizada es aproximadamente 30 veces más soluble que la  $\beta$ -CD. El grado de sustitución es variable y puede ser expresado por unidad de glucosa en cuyo caso los valores pueden estar en el intervalo de 0,3 – 0,9. Otra CD modificada resulta cuando sus grupos hidroxilos son derivatizados por grupos metoxilos (-OCH<sub>3</sub>), las cuales son llamadas ciclodextrinas permetiladas (PMCD), en donde no solamente se ve alterado el tamaño y forma de la cavidad, sino que también aumenta el carácter hidrofóbico.<sup>24,25</sup>

La principal característica de las CD es su capacidad de formar complejos de inclusión<sup>26,27,28</sup> con una gran variedad de huéspedes modificándoles sus propiedades fisicoquímicas, motivo por el cual ha surgido el interés de estudiar su aplicación a la química analítica en este trabajo de tesis.

## **CALIXARENOS**

El término calixareno deriva del vocablo griego “cáliz” que significa copa y “areno” que hace referencia a las unidades aromáticas de la estructura. Al poseer anillos aromáticos son miembros de la familia de los ciclofanos.<sup>7</sup> Estos compuestos poseen una estructura en forma de canasta de básquet con una cavidad, por lo que resultan interesantes desde el punto de vista de la química supramolecular. Los calixarenos (CA[n]) son una clase de macrociclos sintéticamente versátiles, producto de la condensación de fenoles *p*-sustituidos con formaldehído que se unen en posición *meta*.<sup>29</sup> Entre corchetes se indica el

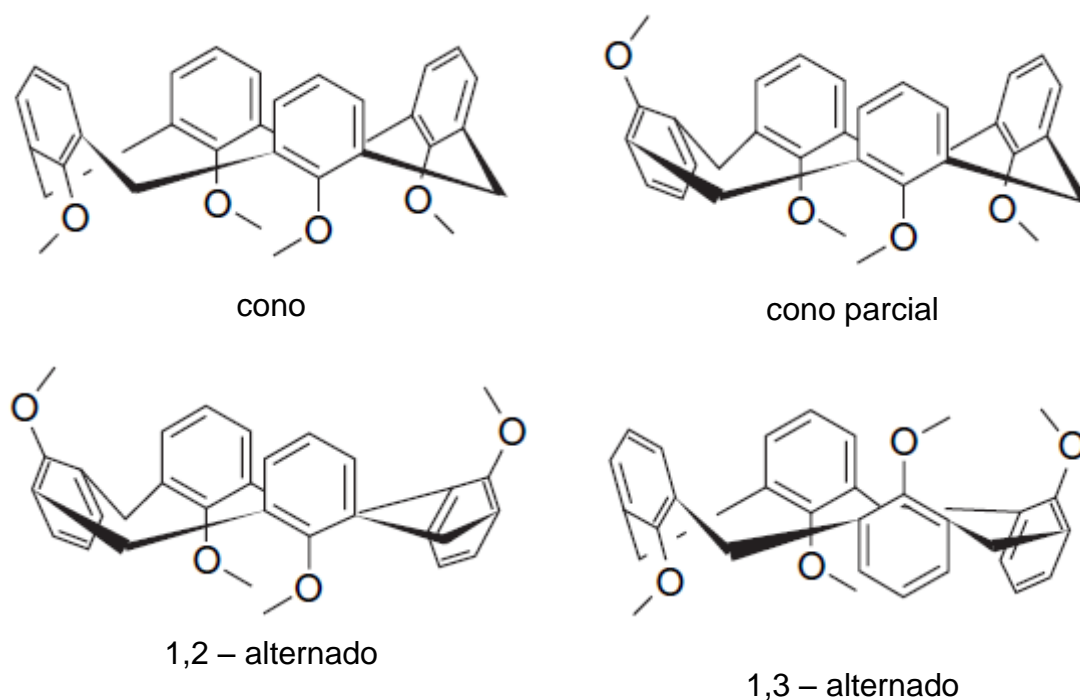
número de unidades fenólicas que forman la estructura cíclica ( $n = 4 - 16$ ), los derivados más comunes son el tetrámero, el hexámero y el octámero, con  $n = 4, 6$  y  $8$ .



**Figura 2.A.14:** (a) Estructura de calix[n]arenos (CA[n]). (b) Representación esquemática del monómero y sus posibles derivados.

Son receptores muy versátiles debido a la posibilidad de derivatizar tanto la cadena R como los grupos hidroxilos, como se indicó en la figura 2.A.14, con lo que se consiguen CA[n] con diferentes propiedades fisicoquímicas y de reconocimiento molecular. Dependiendo de la naturaleza de su funcionalización, pueden complejar cationes, aniones y moléculas neutras.<sup>30,31</sup>

Los CA[n] (de 4, 6 y 8 miembros) pueden adoptar al menos cuatro conformaciones, a causa de la libre rotación de los grupos metileno. Por esto, en solución, los grupos arilo rotan respecto a los grupos metilenos orientándose *syn* o *anti* unos en relación a otros generando los distintos confórmeros.<sup>32</sup> En la Figura 2.A.15 se esquematizan las cuatro conformaciones básicas: cono, cono parcial, 1,2-alternado y 1,3-alternado para el CA[4]. La cantidad de confórmeros se incrementa con el número de unidades monoméricas y la estabilidad de los mismos depende de diversos factores, como el tamaño de los sustituyentes, la naturaleza del disolvente y del huésped.<sup>7</sup>



**Figura 2.A.15:** Representación esquemática de los cuatro conformeros del CA[4]

La alta flexibilidad conformacional de los derivados CA[6] y CA[8] ha dificultado su utilización como reactores químicos, debido a la incapacidad de mantener un orden estructural y forzar la preorganización requerida de las moléculas reactantes en su cavidad.<sup>33,34</sup> A pesar de ello, su flexibilidad puede ser controlada por funcionalización de los bordes menor y mayor con grupos voluminosos adecuados a fin de bloquear la libre rotación de los grupos metileno.<sup>35</sup> Además, es posible favorecer un único conformero mediante la utilización de un sustrato adecuado que interaccione con la cavidad del macrociclo. Por ejemplo, se conoce que el derivado CA[8] puede presentar, en principio, 16 conformaciones diferentes.<sup>36</sup> Por otra parte, se ha demostrado que el empleo de 4-bispiridiletileno reduce el número de conformaciones adoptadas por el derivado *p*-sulfonatocalix[8]areno a 5 conformaciones posibles.<sup>33</sup>

Se han conseguido sintetizar derivados solubles en agua entre los que se destacan los *p*-sulfonatocalix[*n*]arenos (CA[*n*]S), dado que los CA[*n*] presentan baja solubilidad en agua, debido a su carácter apolar dominante. Los CA[*n*]S han sido ampliamente estudiados, debido a que poseen una alta solubilidad en medio acuoso (> 0,1 M).<sup>37,38</sup> Los CA[*n*]S proporcionan tanto una

cavidad como un entorno hidrofóbico (por los anillos bencénicos), y poseen en el borde superior grupos  $-\text{SO}_3^-$  que les otorgan un fuerte carácter hidrofílico.<sup>38</sup>

El interés en los CA[n]S en la química supramolecular es, en gran parte, debido a su tendencia a formar complejos en medio acuoso con una amplia gama de iones metálicos, moléculas orgánicas neutras y iónicas.<sup>39</sup> La contribución de las interacciones hidrofóbicas, electrostáticas e interacciones  $\pi$  (catión- $\pi$ ,  $\pi$ - $\pi$  stacking y CH- $\pi$ ) son importantes en la unión de sustratos y fundamentales para el reconocimiento molecular.

En la Tabla 2.A.2, se mencionan los valores de pKa de las especies ácidas de los CA[n]S. Como puede verse, la primera disociación de los fenoles de los CA[n]S tienen una constante ácida mayor que las respectivas unidades monoméricas, y su acidez se incrementa conforme disminuye el tamaño del anillo (ver tabla 2.A.2). La disociación del primer protón es relativamente fácil debido a la estabilización de la especie monoaniónica por formación de puentes hidrógenos con los grupos hidroxilos restantes. Por ejemplo, para el *p*-sulfonatocalix[4]areno la primera disociación ocurre a pH ácido ( $\text{pK}_{\text{a}1} = 3,26$ ), mientras que las otras tres disociaciones se observan a valores de pH bastante altos ( $\text{pK}_{\text{a}2} = 11,80$ ;  $\text{pK}_{\text{a}3} = 12,80$  y  $\text{pK}_{\text{a}4} = 14,00$ , ver tabla 2.A.2).<sup>40</sup>

**Tabla 2.A.2: Valores de  $\text{pK}_{\text{a}}$  para ácidos de diferentes derivados CA[n]S <sup>a</sup>**

<b>Compuesto</b>	<b><math>\text{pK}_{\text{a}}</math> de grupos <math>-\text{SO}_3\text{H}</math></b>	<b><math>\text{pK}_{\text{a}}</math> de grupos <math>-\text{OH}</math></b>
<b>HCA[4]S</b>	todos muy ácidos	$\text{pK}_{\text{a}1} = 3,26$ , $\text{pK}_{\text{a}2} = 11,80$ , $\text{pK}_{\text{a}3} = 12,8$ y $\text{pK}_{\text{a}4} = 14,0$
<b>HCA[6]S</b>	todos muy ácidos	$\text{pK}_{\text{a}1} = 3,45$ , $\text{pK}_{\text{a}2} = 5,02$ , $\text{pK}_{\text{a}3} > 11$
<b>HCA[8]S</b>	6 grupos muy ácidos; $\text{pK}_{\text{a}7} = 4,10$ ; $\text{pK}_{\text{a}8} = 4,84$	$\text{pK}_{\text{a}1} = 7,70$ , $\text{pK}_{\text{a}2} = 9,10$ , $\text{pK}_{\text{a}3} > 11$

<sup>a</sup> K. Araki, K. Iwamoto, S. Shinkai and T. Matsuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1990, 63, 3480–3485

Se han desarrollado aplicaciones en diversas áreas, tales como diseño mimético de enzimas, extracción líquido-líquido de metales, transporte selectivo de iones, catálisis y sensores.<sup>41,42</sup> Por ejemplo, su estructura molecular presenta una potencial capacidad de reconocimiento de moléculas; se sintetiza rápidamente en grandes cantidades y puede modificarse fácilmente para maximizar interacciones hacia una determinada molécula huésped, ya sea como una nueva entidad química de distintas actividades biológicas o como huésped de moléculas huésped bioactivas.<sup>43,44</sup>

#### **2.A.1.4. APLICACIONES DE RECEPTORES MACROCÍCLICOS QUE AFECTAN LAS PROPIEDADES DE SUSTRATOS ORGÁNICOS**

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

La complejación de un compuesto orgánico luminiscente con un receptor macrociclo involucra interacciones no covalentes que son relativamente débiles, pero que en conjunto actúan en forma cooperativa resultando una unión bastante fuerte del luminóforo con la cavidad receptora. Esta fuerte interacción es la responsable de llamativos cambios en ciertas propiedades de moléculas orgánicas.<sup>10,45</sup> En relación a esto, se ha encontrado: aumento en el rendimiento cuántico de fluorescencia, en tiempos de vida de la especie emisora, mejora en la solubilidad y fotoestabilidad, cambios en las propiedades ácido-base, etc.<sup>46,47,48,49</sup>

La alta densidad electrónica en la cavidad de la CD puede alterar los electrones de la molécula del huésped incluido, resultando en cambios en alguna propiedad medible tanto del huésped como del receptor. Este efecto de la CD sobre el huésped ha permitido su uso en mediciones analíticas incluyendo métodos espectrofotométricos, fluorescencia, fosforescencia y

resonancia magnética nuclear, entre otros.<sup>50</sup> Estos efectos han hecho que las CD sean importantes en el desarrollo de metodologías espectrofotométricas que continúan en desarrollo en la actualidad. Por otra parte, la espectrofluorimetría se ha establecido como técnica de rutina en muchas aplicaciones analíticas con límites de detección menores a los obtenidos con espectrofotometría.<sup>51,52</sup>

La inclusión del huésped en la cavidad de la CD tiene ciertas ventajas, como la protección del estado singlete en la fluorescencia o del estado triplete en la fosforescencia, entre otras. Además, las CD pueden mejorar los límites de detección en ciertos casos. En nuestro grupo de trabajo se han desarrollado métodos espectrofluorimétricos intensificados utilizando CD para determinar diversos analitos de interés biológico, como pesticidas en muestras de fruta y agua corriente,<sup>53</sup> melatonina en glándula pineal y preparados farmacéuticos.<sup>54</sup> Además, en literatura se encuentran trabajos en donde se describen el estudio de las características fluorescentes de los analitos en complejos con diferentes CD mediante modelado molecular y las posibles aplicaciones en análisis.<sup>55,56,57</sup>

Los derivados sulfonados de los calixarenos tienen numerosas aplicaciones como sensores de moléculas orgánicas catiónicas en solución acuosa, entre otras aplicaciones.<sup>58,59,60,61</sup> Los complejos sustrato-receptor formados por CA[n]S funcionan como sensores fluorescentes para la detección de sustancias biológicas. Particularmente, estos complejos se han aplicado para detectar neurotransmisores como acetilcolina y carnitina, así como también otros analitos orgánicos.<sup>62,63</sup> Otra aplicación de CA[n]S, son el empleo como unidades para la construcción de rotaxanos. Los rotaxanos como sistemas supramoleculares entrelazados han sido de gran atención debido a su especial utilidad para la construcción de máquinas moleculares.<sup>64,65,42</sup>

En este marco, los hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados (HAPN) son compuestos naturales o compuestos antropogénicos encontrados en mezclas complejas en el agua, el aire y el suelo.<sup>66</sup> Se encontraron HAPN naturales en alcaloides biológicos relevantes, por ejemplo, la *Cinchona pubescens*<sup>67</sup> (también conocido como cinchona roja y quina) que es nativa de América Central y América del Sur, contiene varios alcaloides con esta parte

aromática en sus estructuras. Entre ellos, la quinina es el ingrediente activo utilizado en el tratamiento de la malaria. Quinolina (QUI) es la unidad aromática de la quinina y otras sustancias farmacológicas activas con propiedades biológicas y farmacéuticas.<sup>68,69</sup> En la parte B de este capítulo, se describirán detalladamente estos compuestos, sus características, propiedades y aplicaciones.

El empleo de macrociclos orgánicos en el mejoramiento de técnicas analíticas basadas en el incremento o *quenching* (o desactivación) de emisión fluorescente, por formación de especies supramoleculares, es un campo de estudio importante en la actualidad dentro de la química analítica supramolecular.<sup>10,70,61,71</sup>

En el presente trabajo de tesis se emplean procedimientos simples con detección fluorescente para el estudio de complejos del tipo sustrato-receptor y la utilización de una de estas especies en el marco de la química analítica.

### **2.A.1.5. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

En la caracterización de especies supramoleculares como los complejos huésped-receptor, las técnicas espectroscópicas constituyen un importante recurso. Todos los métodos espectroscópicos se basan en la medición de la variación de una señal (en absorbancia, corrimiento químico en RMN, intensidad de fluorescencia, etc.) del sistema en estudio.<sup>22</sup> Por lo tanto, para la aplicabilidad de alguna de estas técnicas es necesario que dicha variación pueda ser detectada con suficiente precisión.<sup>10,22</sup>

La mayoría de estas metodologías consisten en trabajar a una concentración fija del sustrato o huésped, variando la concentración del receptor macrocíclico o viceversa. En esta introducción se detallan las técnicas que se utilizaron en este trabajo de tesis.

### *Espectroscopia UV-visible*

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

La modificación del espectro de absorción del cromóforo puede deberse a un cambio de polaridad en su entorno. La inclusión, desde un medio polar, hacia el interior de una cavidad hidrofóbica, es la causa de la variación observada en la señal espectroscópica de muchos sistemas supramoleculares de este tipo.<sup>10,22</sup>

Como resultado de la formación de complejo huésped-receptor se pueden observar desplazamientos batocrómicos e hipsocrómicos del máximo de absorción y/o aumento o disminución de la intensidad de absorción.<sup>22</sup> Se han publicado numerosos trabajos sobre el incremento en la intensidad de absorción, por la formación de complejos (fundamentalmente con CD), con o sin cambios en su longitud de onda de máxima absorción,  $\lambda_{\text{max}}$ .<sup>53,54</sup>

### *Espectroscopia de Fluorescencia*

La espectroscopia de F es una técnica instrumental sencilla, rápida y altamente sensible. Es una técnica particularmente útil para investigar la formación de complejos huésped-receptor entre sustratos fluorescentes y receptores macrocíclicos.<sup>22,72,73</sup> Su aplicación requiere de un fluoróforo, pero esto no limita los alcances de la técnica para su aplicación en la detección de especies no fluorescentes.<sup>70,63</sup> En la práctica, se necesitan cuidados rigurosos en la preparación de las muestras (ej. empleo de reactivos puros, limpieza de los materiales utilizados, etc.), para evitar interferencias.<sup>22</sup>

La inclusión dentro de la cavidad de CD produce generalmente un aumento de la intensidad de F del huésped orgánico debido a la protección hacia procesos de “*quenching*” y de procesos de decaimiento no radiactivo.<sup>73</sup> Por ejemplo, la F del naproxeno (un analgésico de uso general) y la benzocaína (un anestésico de uso local), fue incrementada en presencia de  $\beta$ -



CD y derivados metilados e hidroxipropilados proporcionando evidencia de la formación de complejos de inclusión; la emisión de F del gemfibrozil (derivado del ácido fibríco, que se utiliza para disminuir niveles de triglicéridos en sangre), fue exaltada en presencia de  $\gamma$ -CD, y aún más en presencia del derivado hidroxipropil- $\gamma$ -CD, debido a que la inclusión de su anillo aromático dentro de la cavidad tuvo un efecto de protección del estado excitado.<sup>74</sup>

## **PARTE B:**

# **HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS NITROGENADOS**

### **2.B.1. ORIGEN, CONSECUENCIAS Y DETECCIÓN ANALÍTICA**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) están presentes en el medio ambiente como contaminantes, debido a su formación durante la combustión incompleta o pirólisis de material orgánico. Se encuentran en el aire, agua, suelos y sedimentos, generalmente en niveles trazas excepto cerca de sus fuentes de origen. El humo del tabaco contiene altas concentraciones de HAP. Están presentes en algunos alimentos y en algunos productos farmacéuticos que se aplican a la piel. La exposición ocupacional a los HAP en varios entornos de trabajo puede llevar a que se acumulen en el organismo de los trabajadores expuestos, por lo que los niveles de concentración de HAP en ellos, son considerablemente más altas que las de la población general. Los HAP de dos a cuatro anillos están presentes, al menos parcialmente, en la fase gaseosa en ambiente y atmósferas industriales.<sup>75</sup>

En general, los HAP absorbidos por el organismo de humanos y animales se distribuyen a todos los tejidos pero tienden a almacenarse en los tejidos adiposos. En los sistemas biológicos los HAP se transforman en una mezcla de quininas, epóxidos, fenoles, dioles, trioles y tetraoles por diferentes vías metabólicas.<sup>76</sup> La mayoría de los metabolitos se eliminan en las heces y en menor proporción en la orina.<sup>77</sup> Sin embargo, algunos HAP se transforman en sustancias involucradas en procesos mutagénicos, cancerígenos y de disrupción hormonal.<sup>76</sup>

El efecto causado en la salud depende de cada HAP y es determinado por diferentes factores, como tipo y gravedad del efecto, dosis tóxica, vía y tiempo de exposición, características y hábitos del individuo (edad, sexo, estado nutricional, etc.), presencia de otras sustancias químicas, etc.<sup>66</sup> La exposición prolongada de humanos a mezclas complejas de HAP y otros compuestos químicos a través de la respiración o el contacto dérmico puede producir cáncer.<sup>76</sup> Basándose en los efectos adversos que estos compuestos causan sobre la salud, algunos HAP se incluyeron en las listas de contaminantes prioritarios de diferentes entidades, como: US EPA (de sus siglas en inglés correspondientes a la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos), ATSDR (de sus siglas en inglés correspondientes a la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de los Estados Unidos),<sup>78</sup> IARC (de sus siglas en inglés correspondiente a la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer),<sup>79</sup> EFSA (de sus siglas en inglés correspondientes a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria),<sup>76</sup> entre otras.<sup>80</sup>

En base a la problemática que representa la exposición a los HAP, es importante la detección y cuantificación de estos contaminantes. Las técnicas analíticas empleadas para tal fin son principalmente cromatográficas.<sup>77</sup> Además, ciertos organismos y metabolitos son usados como biomarcadores, por ejemplo, algunos moluscos bivalvos son buenos indicadores del nivel de polución en aguas contaminadas con HAP debido a que presentan la habilidad de filtrar agua pero no metabolizan eficientemente todos los HAP.<sup>81</sup>

Debido a la existencia de numerosos isómeros estructurales de los HAP, la separación por cromatografía de gases (CG)<sup>60,82</sup> o cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR)<sup>83</sup> se emplean, generalmente, para la identificación y cuantificación específica de isómeros. Además, la CLAR proporciona una técnica útil de fraccionamiento para aislar HAP a partir de mezclas de muestras complejas y permite la cuantificación selectiva después de una separación adicional, por ejemplo, por CG con espectrometría de masas (MS) (CG – MS).<sup>60,84,85,86</sup>

El desarrollo de columnas de CLAR de fase reversa (FR) junto con la detección ultravioleta (UV) o de fluorescencia (F) ha mejorado el análisis de un grupo de HAP incluyendo especies de alto peso molecular.<sup>84,87</sup> Las columnas capilares de alta eficiencia en CG con fases estacionarias térmicamente estables, son utilizadas habitualmente para el análisis de HAP. Usando CG–MS y tres fases estacionarias diferentes en CG, 23 isómeros de peso molecular 302 y cuatro isómeros de peso molecular 300, se cuantificaron recientemente en cuatro SRM (de su sigla en inglés *standard reference material*) de matriz ambiental diferentes: alquitrán de hulla (SRM 1597), sedimentos (SRM 1941) y partículas de aire (SRM 1648 y 1649a).<sup>85</sup>

La mayoría de los HAP presentes en el agua se originan en la corriente superficial, particularmente en áreas urbanas; partículas más pequeñas derivan de la caída atmosférica y partículas más grandes de la abrasión de pavimento de asfalto. Los efluentes industriales también pueden contribuir a las cargas de HAP en aguas superficiales, y los niveles de sedimento pueden variar hasta varios miles de microgramos por kilogramo.<sup>79</sup>

Los alimentos son una fuente importante de ingesta de HAP para la población en general. Las estimaciones de la ingesta de HAP a partir de los alimentos varían ampliamente, desde unos pocos nanogramos a unos pocos microgramos por persona por día. Las fuentes de HAP en la dieta incluyen carnes asadas a la parrilla y/o asadas y curadas con humo; alimentos asados, horneados y fritos (procesamiento de calor a alta temperatura); panes, cereales y granos (al menos por parte de secado de granos con gas/llama); y hortalizas cultivadas en suelos contaminados o con superficie contaminada por caída atmosférica de HAP.<sup>88</sup>

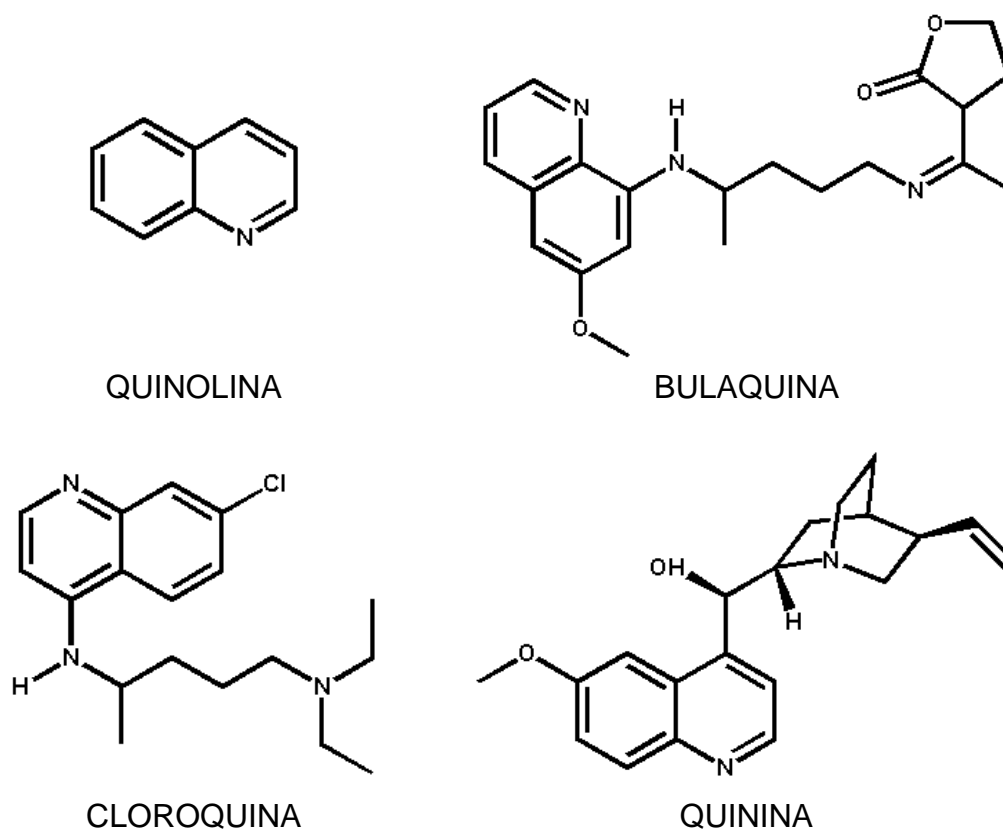
Muchos de los HAPN antropogénicos son contaminantes producidos por combustión de material orgánico en incendios forestales, estufas de leña, escape de automóviles, humo de cigarrillos, incineración de residuos e industrias petroleras, entre otros.<sup>66</sup> Estos compuestos pueden desactivar el catalizador utilizado en el refinamiento del petróleo de combustibles; reducir el poder oxidativo y la estabilidad térmica del producto, y también afectar su color y fragancia.<sup>89</sup> El transporte, distribución y persistencia de cada HAPN en el

medio ambiente, en los sistemas vivos y los alimentos dependen de sus propiedades fisicoquímicas, como la solubilidad en agua, volatilidad, reactividad, microbiología o degradación y oxidación fotoquímica, etc.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados (HAPN) son una clase de compuestos orgánicos constituidos por dos o más anillos fusionados en donde además de átomos de carbono e hidrógeno tienen átomos de nitrógeno formando parte de la estructura.<sup>90,91</sup> La quinolina (QUI) y el carbazol (CZL) son dos ejemplos de estos HAPN.

La QUI o también llamada 1-aza-naftaleno o benzo-[b]-piridina es un compuesto aromático heterocíclico que contiene nitrógeno, como puede verse en la Figura 2.B.1, en donde se muestran también algunos de sus derivados. Tiene una fórmula molecular de  $C_9H_7N$  y su peso molecular es 129,16 g/mol.<sup>92</sup> La QUI es una base terciaria débil, que puede formar sales con ácidos y muestra reacciones similares a las de piridina y benceno, es decir tanto sustitución nucleofílica como electrofílica aromática.<sup>93</sup>

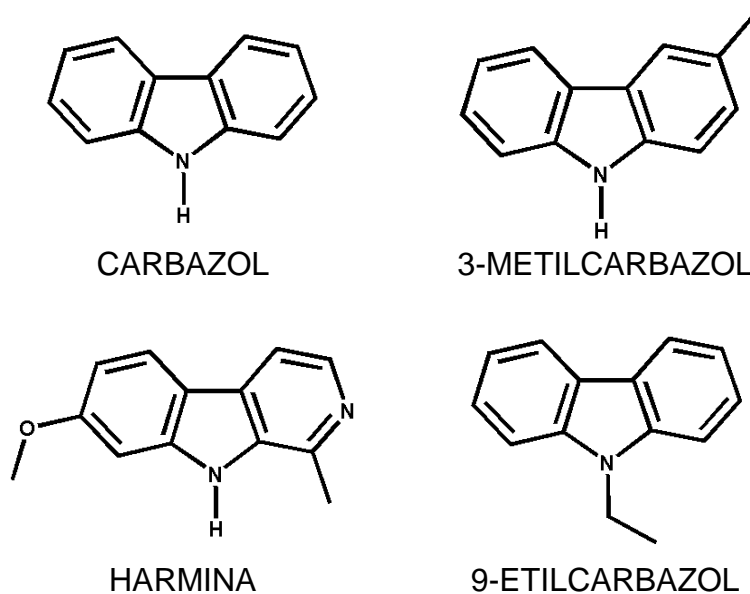
El núcleo de QUI es uno de los alcaloides aislados de la corteza de la quina, que proviene de la familia rubiaceas del género *Cinchona*.<sup>67</sup> Se encuentra en varios compuestos naturales derivados de este género y compone sustancias farmacológicamente activas mostrando una amplia gama de actividad biológica,<sup>68</sup> fundamentalmente contra la malaria.<sup>94,95</sup> Se ha encontrado que la QUI posee actividad antipalúdica, antibacteriana, antifúngica,<sup>96</sup> anticonvulsiva, antiinflamatoria y analgésica.<sup>69,97</sup>



**Figura 2.B.1:** Estructura de quinolina (QUI) y algunos compuestos naturales que poseen en su estructura este núcleo.

Además, la QUI y algunos de sus derivados se emplean principalmente para la preparación de agroquímicos y colorantes.<sup>98,99,100,101</sup> Por ejemplo, por oxidación de la QUI se proporciona ácido quinolínico, el cual se utiliza para la síntesis de 8-hidroxiquinolina, que es un importante precursor de pesticidas.<sup>76</sup>

El carbazol (CZL) es un compuesto aromático heterocíclico.<sup>102</sup> Es un triciclo que consiste en un anillo de pirrol con dos anillos de benceno fusionados, como puede verse en la Figura 2.B.2, en donde se muestran también algunos de sus derivados. Otra descripción establece que el carbazol es un 9-azafluoreno. Es una base débil y se comporta químicamente como una N,N-difenilamina. Sus derivados se obtienen por reacciones de monosustitución electrofílica aromática. Los alcaloides carbazólicos de plantas tienen como precursor al 3-metilcarbazol (ver estructura en la Figura 2.B.2).



**Figura 2.B.2:** Estructura de Carbazol (CZL) y algunos compuestos naturales que poseen en su estructura este núcleo.

En base a la problemática que representa la exposición a los HAPN, es importante la detección y cuantificación de estos contaminantes.<sup>91,103</sup> La química analítica ha sido importante desde los inicios de la química. Aunque la química analítica moderna está dominada por la instrumentación sofisticada, las raíces de la química analítica y algunos de los principios utilizados en los instrumentos modernos provienen de técnicas tradicionales, muchas de las cuales aún se utilizan en la actualidad. Tal como se mencionó en el capítulo 1, la espectroscopia de fluorescencia es una técnica instrumental sencilla, rápida y altamente sensible. Es una técnica particularmente útil para investigar la formación de complejos huésped-receptor entre sustratos fluorescentes y receptores macrocíclicos.<sup>22,73,72</sup> En la práctica, se requiere de cuidados rigurosos en la preparación de las muestras (por ejemplo el empleo de reactivos puros, limpieza de los materiales utilizados, etc.), para evitar interferencias.<sup>22</sup> Por lo tanto es de fundamental importancia hacer una caracterización previa de los reactivos que serán empleados en diferentes experimentos. Con esta perspectiva, en el siguiente capítulo de esta tesis, se llevaron a cabo los controles de pureza y las caracterizaciones generales de los analitos y los receptores macrocíclicos, que nos permitirán a posterior estudiar sus posibles interacciones y con ello diseñar metodologías analíticas,

respondiendo de esta manera, a los objetivos específicos de este trabajo de tesis.

## 2.2. BIBLIOGRAFÍA

---

- 1 J. M. Lehn, Supramolecular chemistry: Where from? Where to?, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 2378–2379.
- 2 C. J. Pedersen, Cyclic Polyethers and Their Complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **2**, 209.
- 3 D. J. Cram, The Design of Molecular Hosts, Guests, and Their Complexes, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, 1988, **27**, 1009–1112.
- 4 Z. Liu, S. K. M. Nalluri and J. Fraser Stoddart, Surveying macrocyclic chemistry: From flexible crown ethers to rigid cyclophanes, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 2459–2478.
- 5 I. V. Kolesnichenko and E. V. Anslyn, Practical applications of supramolecular chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 2385–2390.
- 6 P. A. Gale, Supramolecular chemistry: From complexes to complexity, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, 2000, **358**, 431–453.
- 7 J. Steed and J. Atwood, Supramolecular chemistry, *Wiley*, 2006, Second edition.
- 8 J. M. Lehn, Perspectives in Supramolecular Chemistry From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self Organization, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, 1990, **29**, 1304–1319.
- 9 L. A. Marchetti, L. K. Kumawat, N. Mao, J. C. Stephens and R. B. P. Elmes, The Versatility of Squaramides: From Supramolecular Chemistry to Chemical Biology, *Chem*, 2019, **5**, 1398–1485.



- 10 M. Shaikh, Y. M. Swamy and H. Pal, Supramolecular host-guest interaction of acridine dye with cyclodextrin macrocycles: Photophysical, pKa shift and quenching study, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 2013, **258**, 41–50.
- 11 S. S. Xue, C. P. Tan, M. H. Chen, J. J. Cao, D. Y. Zhang, R. R. Ye, L. N. Ji and Z. W. Mao, Tumor-targeted supramolecular nanoparticles self-assembled from a ruthenium- $\beta$ -cyclodextrin complex and an adamantane-functionalized peptide, *Chem. Commun.*, 2017, **53**, 842–845.
- 12 L. R. Hart, N. A. Nguyen, J. L. Harries, M. E. Mackay, H. M. Colquhoun and W. Hayes, Perylene as an electron-rich moiety in healable, complementary  $\pi$ - $\pi$  Stacked, supramolecular polymer systems, *Polymer (Guildf.)*, 2015, **69**, 293–300.
- 13 S. Burattini, B. W. Greenland, D. H. Merino, W. Weng, J. Seppala, H. M. Colquhoun, W. Hayes, M. E. MacKay, I. W. Hamley and S. J. Rowan, A healable supramolecular polymer blend based on aromatic  $\pi$ - $\pi$  Stacking and hydrogen-bonding interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 12051–12058.
- 14 D. Taura, Y. Taniguchi, A. Hashidzume and A. Harada, Macromolecular recognition of cyclodextrin: inversion of selectivity of  $\beta$ -cyclodextrin toward adamantyl groups induced by macromolecular chains, *Macromol. Rapid Commun.*, 2009, **30**, 1741–1744.
- 15 S. I. Stupp and L. C. Palmer, Supramolecular chemistry and self-assembly in organic materials design, *Chem. Mater.*, 2014, **26**, 507–518.
- 16 S. A. Dalrymple, M. Parvez and G. K. H. Shimizu, Intra and intermolecular second-sphere coordination chemistry: Formation of capsules, half-capsules, and extended structures with hexaquo and hexaamminemetal ions, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 6986–6996.
- 17 A. K. Yudin, Macrocycles: Lessons from the distant past, recent developments, and future directions, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 30–49.

- 18 D. L. Beene, G. S. Brandt, W. Zhong, N. M. Zacharias, H. A. Lester and D. A. Dougherty, Cation- $\pi$  interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT<sub>3A</sub>) and nicotinic acetylcholine receptors: The anomalous binding properties of nicotine, *Biochemistry*, 2002, **41**, 10262–10269.
- 19 M. L. Bender and M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, 1979, **31**, 1978–1979.
- 20 S. V. Kurkov and T. Loftsson, Cyclodextrins, *Int. J. Pharm.*, 2013, **453**, 167–180.
- 21 N. Sharma and A. Baldi, Exploring versatile applications of cyclodextrins : an overview, *Drug Deliv.*, 2014, **7544**, 1–19.
- 22 P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, **101**, 238–250.
- 23 P. Saokham, C. Muankaew and P. Jansook, Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes, *Molecules*, 2018, **23**, 1–15.
- 24 É. Fenyvesi, J. Szemán, K. Csabai, M. Malanga and L. Szente, Methyl-beta-cyclodextrins: The role of number and types of substituents in solubilizing power, *J. Pharm. Sci.*, 2014, **103**, 1443–1452.
- 25 Y. Liu, J. Shi and D. S. Guo, Novel permethylated  $\beta$ -cyclodextrin derivatives appended with chromophores as efficient fluorescent sensors for the molecular recognition of bile salts, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 8227–8234.
- 26 J. Szejtli, Past, present, and future of cyclodextrin research, *Pure Appl. Chem.*, 2004, **76**, 1825–1845.
- 27 M. Shaikh, Y. M. Swamy and H. Pal, Supramolecular host-guest interaction of acridine dye with cyclodextrin macrocycles: Photophysical, pK<sub>a</sub> shift and quenching study, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 2013,

- 258**, 41–50.
- 28 M. Shaikh, J. Mohanty, M. Sundararajan, A. C. Bhasikuttan and H. Pal, Supramolecular host-guest interactions of oxazine-1 dye with  $\beta$ - And  $\gamma$ -cyclodextrins: A photophysical and quantum chemical study, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 12450–12459.
- 29 M. X. Wang, Heterocalixaromatics, new generation macrocyclic host molecules in supramolecular chemistry, *Chem. Commun.*, 2008, 4541–4551.
- 30 H. J. Schneider, Strain effects determine the performance of artificial allosteric systems: calixarenes as models, *Chem. Commun.*, 2019, **55**, 3433–3444.
- 31 S. J. Dalgarno, M. J. Hardie, M. Makha and C. L. Raston, Controlling the conformation and interplay of p-sulfonatocalix[6]arene as lanthanide crown ether complexes, *Chem. - A Eur. J.*, 2003, **9**, 2834–2839.
- 32 Y. Cohen and S. Slovak, Diffusion NMR for the characterization, in solution, of supramolecular systems based on calixarenes, resorcinarenes, and other macrocyclic arenes, *Org. Chem. Front.*, 2019, **6**, 1705–1718.
- 33 R. Kaliappan, Y. Ling, A. E. Kaifer and V. Ramamurthy, Sulfonatocalix[8]arene as a Potential Reaction Cavity: Photo- and electro-active dicationic guests arrest conformational equilibrium, *Langmuir*, 2009, **25**, 8982–8992.
- 34 D. S. Guo and Y. Liu, Calixarene-based supramolecular polymerization in solution, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 5907–5921.
- 35 H. Galán, J. De Mendoza and P. Prados, Conformational control of calix[6]arenes through multiple bridges, *European J. Org. Chem.*, 2005, 4093–4097.
- 36 C. D. Gutsche and L. J. Bauer, Calixarenes. 13. The Conformational Properties of Calix[4]arenes, Calix[6]arenes, Calix[8]arenes, and

- Oxacalixarenes, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 6052–6059.
- 37 F. U. Rahman, H. N. Feng and Y. Yu, A new water-soluble cavitand with deeper guest binding properties, *Org. Chem. Front.*, 2019, **6**, 998–1001.
- 38 E. S. Español and M. M. Villamil, Calixarenes: Generalities and their role in improving the solubility, biocompatibility, stability, bioavailability, detection, and transport of biomolecules, *Biomolecules*, 2019, **9**, 1–15.
- 39 M. Bayrakci and B. Yilmaz, Intermolecular interactions and binding mechanism of inclusion complexation between sulfonate calix[n]arenes and ethidium bromide, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2018, **90**, 341–349.
- 40 K. Araki, K. Iwamoto, S. Shinkai and T. Matsuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1990, **63**, 3480–3485.
- 41 S. K. Dinda, M. Althaf Hussain, A. Upadhyay and C. P. Rao, Supramolecular Sensing of 2,4,6-Trinitrophenol by a Tetrapyrenyl Conjugate of Calix[4]arene: Applicability in Solution, in Solid State, and on the Strips of Cellulose and Silica Gel and the Image Processing by a Cellular Phone, *ACS Omega*, 2019, **4**, 17060–17071.
- 42 R. Sun, C. Xue, X. Ma, M. Gao, H. Tian and Q. Li, Light-driven linear helical supramolecular polymer formed by molecular-recognition-directed self-assembly of bis(p-sulfonatocalix[4]arene) and pseudorotaxane, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 5990–5993.
- 43 Â. De Fátima, S. A. Fernandes and A. A. Sabino, Calixarenes as New Platforms for Drug Design Calixarenes as New Platforms for Drug Design, *Curr. Drug Discov. Technol.*, 2009, **6**, 1–20.
- 44 G. Pan, J. Bu, D. Wang, J. Liu, L. Wan, Q. Zheng and C. Bai, Adlayer Structures of Calixarenes on Au ( 111 ) Surface Studied with STM, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 13111–13116.
- 45 C. Sowrirajan, S. Yousuf and I. V. M. V. Enoch, The unusual fluorescence

- quenching of coumarin 314 by  $\beta$ -cyclodextrin and the effect of  $\beta$ -cyclodextrin on its binding with calf thymus DNA, *Aust. J. Chem.*, 2014, **67**, 256–265.
- 46 N. Kandoth, S. D. Choudhury, T. Mukherjee and H. Pal, Host-guest interaction of 1,4-dihydroxy-9,10-anthraquinone (quinizarin) with cyclodextrins, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, **8**, 82–90.
- 47 S. Wu, Y. Luo, F. Zeng, J. Chen, Y. Chen and Z. Tong, Photoreversible fluorescence modulation of a rhodamine dye by supramolecular complexation with photosensitive cyclodextrin, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2007, **46**, 7015–7018.
- 48 K. N. Baglole, P. G. Boland and B. D. Wagner, Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion into parent and modified cyclodextrins, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 2005, **173**, 230–237.
- 49 M. Megyesi and L. Biczók, Considerable fluorescence enhancement upon supramolecular complex formation between berberine and p-sulfonated calixarenes, *Chem. Phys. Lett.*, 2006, **424**, 71–76.
- 50 D. Granadero, J. Bordello, M. J. Pérez-alvite and M. Novo, Host-Guest Complexation Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy: Adamantane – Cyclodextrin Inclusion, *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, **11**, 173–188.
- 51 S. D. Salas, M. T. Baumgartner and A. V. Veglia, Alkyl chain length and metallic cation effects on the acid-base properties of C-alkylresorcin[4]arenes in aqueous media, *J. Mol. Liq.*, 2019, **277**, 769–775.
- 52 N. L. Pacioni, V. N. Sueldo Ocelllo, M. Lazzarotto and A. V. Veglia, Spectrofluorimetric determination of benzoimidazolic pesticides: Effect of p-sulfonatocalix[6]arene and cyclodextrins, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **624**, 133–140.
- 53 N. L. Pacioni and A. V. Veglia, Determination of poorly fluorescent

- carbamate pesticides in water, bendiocarb and promecarb, using cyclodextrin nanocavities and related media, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **583**, 63–71.
- 54 R. E. Galian, A. V. Veglia and R. H. De Rossi, Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin enhanced fluorimetric method for the determination of melatonin and 5-methoxytryptamine, *Analyst*, 2000, **125**, 1465–1470.
- 55 M. Aghamohammadi and N. Alizadeh, Fluorescence enhancement of the aflatoxin B1 by forming inclusion complexes with some cyclodextrins and molecular modeling study, *J. Lumin.*, 2007, **127**, 575–582.
- 56 D. Subbiah, S. Kala and A. K. Mishra, Study on the fluorescence characteristics of bromadiolone in aqueous and organized media and application in analysis, *Chemosphere*, 2005, **61**, 1580–1586.
- 57 F. Hapiot, A. Ponchel, S. Tilloy and E. Monflier, Cyclodextrins and their applications in aqueous-phase metal-catalyzed reactions, *Comptes Rendus Chim.*, 2011, **14**, 149–166.
- 58 Y. J. Zhang, W. X. Cao and J. Xu, Interaction of Sulfonated Calix[n]arenes with Rhodamine B and Its Application to Determine Acetylcholine in a Real Neutral Aqueous Medium, *Chinese J. Chem.*, 2010, **20**, 322–326.
- 59 Ü. Ocak, M. Ocak and R. A. Bartsch, Calixarenes with dansyl groups as potential chemosensors, *Inorganica Chim. Acta*, 2012, **381**, 44–57.
- 60 F. Reisen and J. Arey, Atmospheric reactions influence seasonal PAH and nitro-PAH concentrations in the Los Angeles basin, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 64–73.
- 61 K. P. Aryal, T. K. Ekanayaka, S. Gilbert, P. A. Dowben and H. K. Jeong, Fluorescent detection of cholesterol using p-Sulfonatocalix[4]arene functionalized carbon nanotubes and thermally reduced graphite oxide composites, *Chem. Phys. Lett.*, 2019, 136856.

- 62 T. Jin, Near-infrared fluorescence detection of acetylcholine in aqueous solution using a complex of rhodamine 800 and p-sulfonato-calix[8]arene, *Sensors*, 2010, **10**, 2438–2449.
- 63 A. Hennig, H. Bakirci and W. M. Nau, Label-free continuous enzyme assays with macrocycle-fluorescent dye complexes, *Nat. Methods*, 2007, **4**, 629–632.
- 64 H. Fang, G. Li, D. Jiang and G. Zheng, A channel rotaxane coordination polymer (RCP) based on the assembly of p-sulfonatocalix[8]arene and 4,4'-bipyridine-N,N'-dioxide ligand, *Polyhedron*, 2019, **160**, 53–57.
- 65 N. Sun, X. Xiao and J. Jiang, A cross-linked supramolecular polymer constructed from pillar[5]arene and porphyrine via host-guest interactions, *Polym. Chem.*, 2015, **6**, 5015–5020.
- 66 O. Idowu, K. T. Semple, K. Ramadass, W. O'Connor, P. Hansbro and P. Thavamani, Beyond the obvious: Environmental health implications of polar polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environ. Int.*, 2019, **123**, 543–557.
- 67 V. Meléndez-Gómez, C. Kouznetsov, Alcaloides quinolínicos: importancia biológica y esfuerzos sintéticos, *Univ. Sci.*, 2005, **10**, 5–18.
- 68 S. Chen, R. Chen, M. He, R. Pang, Z. Tan and M. Yang, Design, synthesis, and biological evaluation of novel quinoline derivatives as HIV-1 Tat-TAR interaction inhibitors, *Bioorganic Med. Chem.*, 2009, **17**, 1948–1956.
- 69 Y. L. Chen, Y. L. Zhao, C. M. Lu, C. C. Tzeng and J. P. Wang, Synthesis, cytotoxicity, and anti-inflammatory evaluation of 2-(furan-2-yl)-4-(phenoxy)quinoline derivatives. Part 4, *Bioorganic Med. Chem.*, 2006, **14**, 4373–4378.
- 70 D. S. Guo, V. D. Uzunova, X. Su, Y. Liu and W. M. Nau, Operational calixarene-based fluorescent sensing systems for choline and acetylcholine and their application to enzymatic reactions, *Chem. Sci.*,

- 2011, **2**, 1722–1734.
- 71 L. Martín, A. León, M. A. Martín, B. Del Castillo and J. C. Menéndez, Detection and characterization of cyclodextrin complexes with  $\beta$ -carboline derivatives by spectroscopic techniques, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **32**, 991–1001.
- 72 L. Pu, Fluorescence of organic molecules in chiral recognition, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 1687–1716.
- 73 R. N. Dsouza, U. Pischel and W. M. Nau, Fluorescent dyes and their supramolecular host/guest complexes with macrocycles in aqueous solution, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 7941–7980.
- 74 P. Mura, S. Furlanetto, M. Cirri, F. Maestrelli, G. Corti and S. Pinzauti, Interaction of naproxen with ionic cyclodextrins in aqueous solution and in the solid state, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, **37**, 987–994.
- 75 R. W. Coutant, P. J. Callahan and J. C. Chuang, Efficiency of silicone-grease-coated denuders for collection of polynuclear aromatic hydrocarbons, *Atmos. Environ.*, 1992, **26**, 2831–2834.
- 76 S. N. Pandeya and A. Tyagi, Synthetic approaches for quinoline and isoquinoline, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2011, **3**, 52–61.
- 77 L. Rey-Salgueiro, M. S. García-Falcón, E. Martínez-Carballo, C. González-Barreiro and J. Simal-Gándara, The use of manures for detection and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons and 3-hydroxybenzo[a]pyrene in animal husbandry, *Sci. Total Environ.*, 2008, **406**, 279–286.
- 78 U.S. Department of health and Human Services, Health Consultation, *Agency Toxic Subst. Dis. Regist.*
- 79 IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks to Humans*, 2010, **93**, 9–38.
- 80 A. P. Gupta, P. Pandotra, M. Kushwaha, S. Khan, R. Sharma and S.



- Gupta, in *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier B.V., 2015, vol. 46, pp. 341–445.
- 81 L. Rey-Salgueiro, E. Martínez-Carballo, M. S. García-Falcón and J. Simal-Gándara, Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in canned bivalves and investigation of their potential sources, *Food Res. Int.*, 2009, **42**, 983–988.
- 82 R. Atkinson and J. Arey, Atmospheric degradation of volatile methyl-silicon compounds, *Environ. Sci. Technol.*, 2000, **34**, 1970–1976.
- 83 W. R. Biggs and J. C. Fetzer, Analytical techniques for large polycyclic aromatic hydrocarbons: A review, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 1996, **15**, 196–206.
- 84 C. Weiller, S. C. Ramsay, R. J. S. Wise, K. J. Friston and R. S. J. Frackowiak, Individual patterns of functional reorganization in the human cerebral cortex after capsular infarction, *Ann. Neurol.*, 1993, **33**, 181–189.
- 85 C. Bergvall and R. Westerholm, Determination of dibenzopyrenes in standard reference materials (SRM) 1649a, 1650, and 2975 using ultrasonically assisted extraction and LC-GC-MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **384**, 438–447.
- 86 K. H. Jung, B. Yan, S. N. Chillrud, F. P. Perera, R. Whyatt, D. Camann, P. L. Kinney and R. L. Miller, Assessment of Benzo(a)pyrene-equivalent Carcinogenicity and mutagenicity of residential indoor versus outdoor polycyclic aromatic hydrocarbons exposing young children in New York city, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2010, **7**, 1889–1900.
- 87 W. R. Biggs and J. C. Fetzer, Analytical techniques for large polycyclic aromatic hydrocarbons: A review, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 1996, **15**, 196–206.
- 88 International Agency for Research on Cancer, Other data relevant to an evaluation of carcinogenicity and its mechanisms, *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks to Humans*, 2010, **92**, 512–753.

- 89 S. Shin, M. Sarker, H. I. Lee and S. H. Jung, Metal-organic framework with various functional groups: Remarkable adsorbent for removal of both neutral indole and basic quinoline from liquid fuel, *Chem. Eng. J.*, 2019, **370**, 1467–1473.
- 90 Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food, *EFSA J.*, 2008, **6**, 724.
- 91 N. Li, X. Ma, Q. Zha and C. Song, Analysis and comparison of nitrogen compounds in different liquid hydrocarbon streams derived from petroleum and coal, *Energy and Fuels*, 2010, **24**, 5539–5547.
- 92 Sigma-Aldrich, Quinolina, *MSDS*, 2019, 1–10.
- 93 A. Marella, O. P. Tanwar, R. Saha, M. R. Ali, S. Srivastava, M. Akhter, M. Shaquiquzaman and M. M. Alam, Quinoline: A versatile heterocyclic, *Saudi Pharm. J.*, 2013, **21**, 1–12.
- 94 J. N. Domínguez, J. R. Caritza León, J. Rodrigues, J. G. Neira Gamboa de Domínguez and P. J. Rosenthal, Synthesis and evaluation of new antimalarial phenylurenyl chalcone derivatives, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 3654–3658.
- 95 D. P. Iwaniuk, E. D. Whetmore, N. Rosa, K. Ekoue-Kovi, J. Alumasa, A. C. de Dios, P. D. Roepe and C. Wolf, Synthesis and antimalarial activity of new chloroquine analogues carrying a multifunctional linear side chain, *Bioorganic Med. Chem.*, 2009, **17**, 6560–6566.
- 96 K. Suresh, B. Sandhya, S. Drabu and B. P. Panda, Design and synthesis of 2-chloroquinoline derivatives as non-azoles antimycotic agents, *Med. Chem. Res.*, 2011, **20**, 1340–1348.
- 97 L. Garuti, M. Roberti, M. Malagoli, T. Rossi and M. Castelli, Synthesis and antiproliferative activity of some benzimidazole-4,7-dione derivatives, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2000, **10**, 2193–2195.

- 98 B. Chandrasekhar, A. S. R. Prasad, S. Eswaraiah and A. Venkateswaralu, Development of an efficient process for 4,5,7-trichloroquinoline, a key intermediate for agrochemical synthesis, *Org. Process Res. Dev.*, 2002, **6**, 242–245.
- 99 P. J. Boratyński, M. Zielińska-Błajet and J. Skarzewski, Cinchona Alkaloids - Derivatives and Applications, *Alkaloids Chem. Biol.*, 2019, **82**, 29–145.
- 100 G. H. Elgemeie and R. A. Mohamed, Microwave synthesis of fluorescent and luminescent dyes (1990–2017), *J. Mol. Struct.*, 2018, **1173**, 707–742.
- 101 F. Aribi, A. Panossian, J. P. Vors, S. Pazenok and F. R. Leroux, 2,4-Bis(fluoroalkyl)quinoline-3-carboxylates as Tools for the Development of Potential Agrochemical Ingredients, *European J. Org. Chem.*, 2018, 3792–3802.
- 102 P. Eur and M. Kгаа, Ficha de Datos de Seguridad, *Toxicology*, 2007, **2006**, 1–5.
- 103 X. Cheng, T. Zhao, X. Fu and Z. Hu, Identification of nitrogen compounds in RFCC diesel oil by mass spectrometry, *Fuel Process. Technol.*, 2004, **85**, 1463–1472.



---

## CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESPECTROSCÓPICA DE SUSTRATOS Y MACROCICLOS. REVALUACIÓN DE LOS COMPLEJOS QUINOLINA-RECEPTOR

---

### 3.1. OBJETIVOS

---

En esta sección del trabajo de tesis, en base a antecedentes del grupo de investigación,<sup>1,2</sup> se propuso evaluar el efecto de receptores macrocíclicos sobre las propiedades espectroscópicas de la QUI, en el equilibrio de formación de complejos huésped-receptor, como base para la posterior detección de compuestos no fluorescentes.

Para ello, como objetivos específicos se planteó realizar el cálculo de las constantes de asociación de QUI con las especies nativas de ciclodextrinas  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD y las especies ácidas de los p-sulfonatocalix[n]arenes CA[6]S y CA[8]S, en función de concentraciones en el equilibrio para cada receptor.

## 3.2. RESULTADOS y DISCUSIÓN

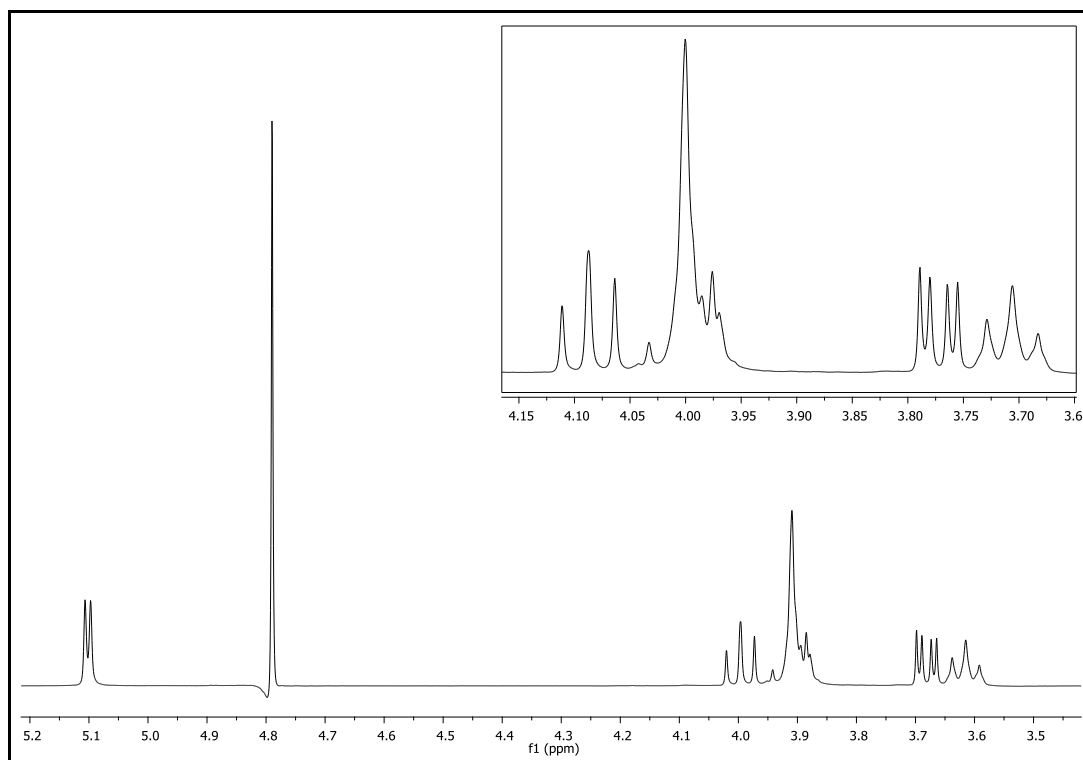
---

En una primera etapa, se caracterizaron los compuestos determinando constantes físicas y propiedades espectroscópicas para poder elegir las mejores condiciones de trabajo.

### *3.2.1. Determinación de espectros de $^1\text{H}$ RMN de $\beta$ -ciclodextrina, p-sulfonatocalix[8]areno y quinolina*

En este trabajo de tesis se emplearon receptores macrocíclicos del tipo cavitando, como lo son las CD y los CA[n]. Por tal motivo, se corroboró el estado de algunos de los receptores utilizados mediante resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$  RMN), dado que es una de las técnicas más importantes en la elucidación de estructuras de compuestos orgánicos. Además de su uso para la caracterización de reactivos, la RMN es una técnica importantísima en el estudio de complejos del tipo sustrato-receptor que permite comprender las interacciones y asociaciones no covalentes con los sustratos. Brinda información estructural ya que se observan los núcleos de los átomos y se puede conocer la influencia de cada entorno molecular sobre cada uno de ellos. En el caso del hidrógeno, el isótopo más abundante es el  $^1\text{H}$ , y es el que se observa en los siguientes espectros de RMN.

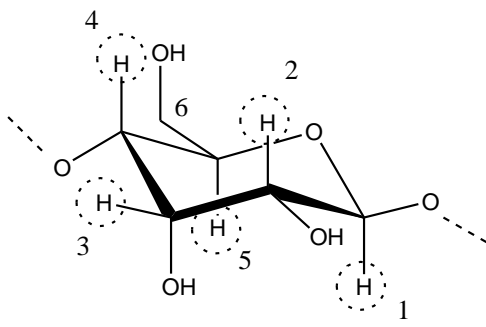
En primer lugar se muestra el espectro obtenido para la  $\beta$ -CD (Figura 3.1), luego el espectro de la especie ácida del p-sulfonatocalix[8]areno (HCA[8]S) (Figura 3.2) y finalmente, el espectro de la QUI (Figura 3.3).

➤ *β-Ciclodextrina:*

**Figura 3.1:** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de β-CD, utilizando D<sub>2</sub>O como solvente y medido en un Espectrómetro de RMN Bruker Advance de 400 MHz. Referencia TMS.

En la Tabla 3.1 se muestra la unidad monomérica de la β-CD, y en donde se destacan los hidrógenos con líneas de puntos y el número que los identifica y que permiten detallar sus desplazamientos químicos, la cantidad de H que integran, las constantes de acoplamiento y sus respectivas multiplicidades. Los desplazamientos químicos que se informan para cada señal, tienen como referencia tetra metil silano (TMS) y están corregidos según la señal de D<sub>2</sub>O ( $\delta = 4,78$  ppm).

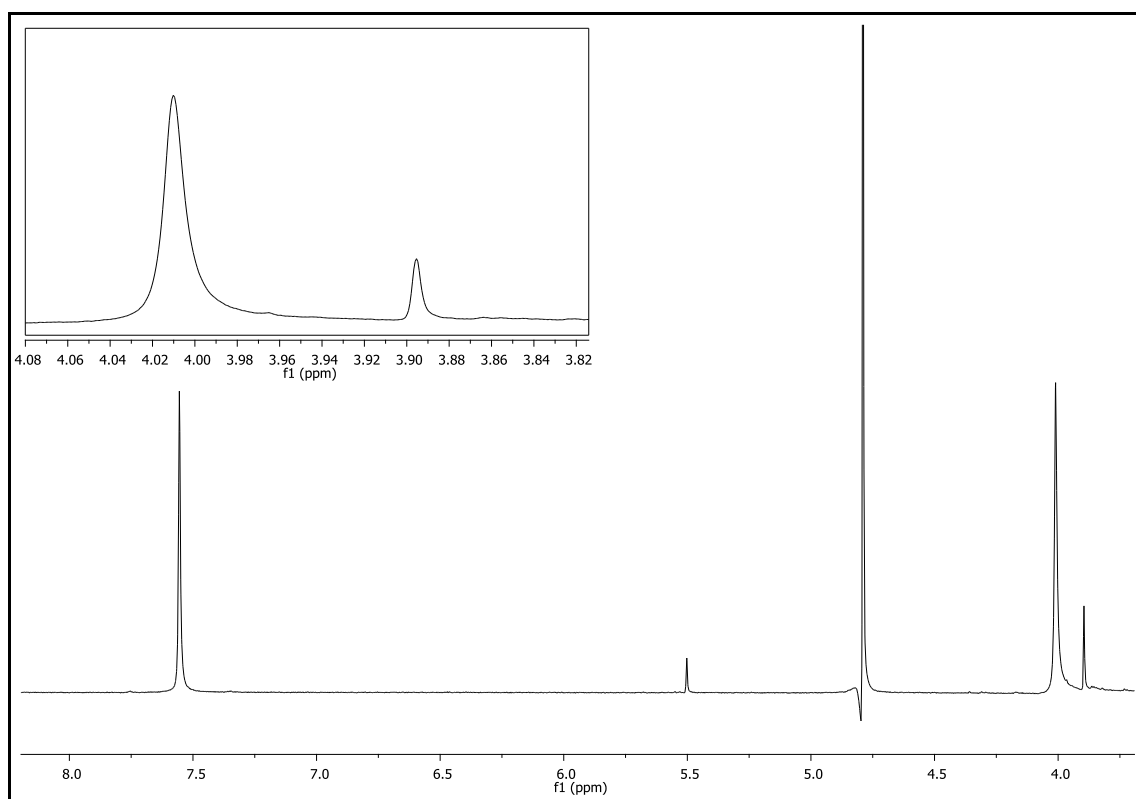
Tabla 3.1: Asignación de señales de  $^1\text{H}$  RMN para  $\beta$ -CD

	Corrimientos químicos (ppm)	Integral / Constante de acoplamiento (Hz)	Multiplicidad
	<b>1</b> <b>5,10</b>	<b>1H / 3,8</b>	<i>Doblete</i>
	<b>2</b> <b>3,77</b>	<b>1H / 9,9 – 3,7</b>	<i>Doblete de doblete</i>
	<b>3</b> <b>4,09</b>	<b>1H / 9,5</b>	<i>Triplete</i>
	<b>4</b> <b>3,71</b>	<b>1H / 9,2</b>	<i>Triplete</i>
	<b>5</b> <b>3,98</b>	<b>2H / nd<sup>a</sup></b>	<i>Triplete</i>
	<b>6</b> <b>4,00</b>	<b>2H / nd<sup>a</sup></b>	<i>Multiplete</i>

<sup>a</sup>nd= no determinado

Estos resultados fueron chequeados y comparados con datos de literatura, y se puede concluir que la CD se encuentra en condiciones de ser utilizada sin previa purificación. Fundamentalmente, se controlaron los corrimientos químicos de los H 3 y 5, que corresponden a los H internos de la cavidad del receptor, y que se utilizan como referencia dado que no deberían observarse desplazamientos, lo que indicaría que la cavidad se encuentra libre de huésped.<sup>3,4</sup>

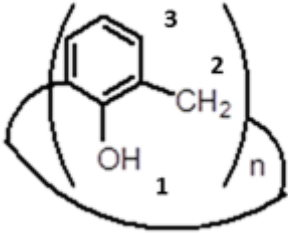


➤ *p*-sulfonatocalix[8]areno:

**Figura 3.2:** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de HCA[8]S, utilizando D<sub>2</sub>O como solvente y medido en un Espectrómetro de RMN Bruker Advance de 400 MHz. Referencia TMS.

En la Tabla 3.2 se pueden observar la unidad monomérica de HCA[8]S, indicando los diferentes tipos de H y los corrimientos químicos observados en el espectro de la Figura 3.2 y además se asignaron las señales a los diferentes núcleos. También se indican la cantidad de H que integran y sus respectivas multiplicidades. Los desplazamientos químicos que se informan para cada señal, tienen como referencia TMS y fueron corregidos según la señal de D<sub>2</sub>O ( $\delta = 4,79$  ppm).

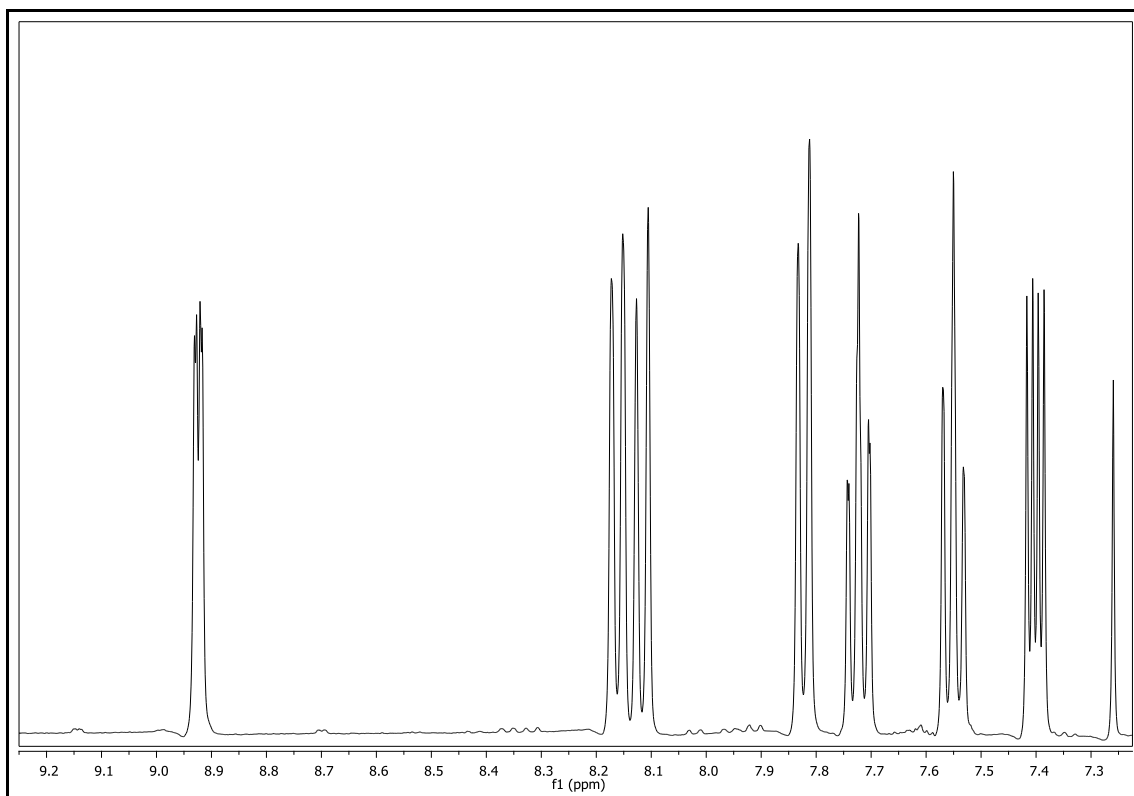
Tabla 3.2: Asignación de señales de  $^1\text{H}$  RMN para HCA[8]S

	Corrimientos químicos (ppm)	Integral	Multiplicidad
	1	5,50	8H
2	4,01	16H	Singlete
3	7,55	16H	Singlete

Como puede observarse en el recuadro menor de la Figura 3.2, existe una señal a un corrimiento químico de 3,89 ppm, que puede asignarse también a los H del  $\text{CH}_2$ , dado que este receptor presenta conformeros estructurales como los que se mostraron en la Figura 2.A.15, por lo que se generarían entornos diferentes a estos núcleos en las diferentes conformaciones.<sup>5</sup>

Por último, la señal que se observa a  $\delta = 5,50$  ppm se puede atribuir al H del hidroxilo y su baja intensidad se puede deber a su velocidad de intercambio y por ende no se puede apreciar la proporción entre las intensidades de las señales.

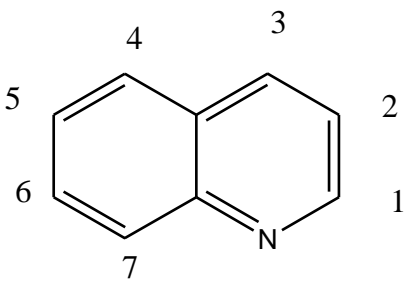
A partir de estos resultados, y comparando con datos de literatura y con resultados previos de grupo de investigación, se puede interpretar que este receptor se encuentra en condiciones para ser utilizado sin previa purificación.<sup>6,7,8</sup>

➤ Quinolina:

**Figura 3.3:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de QUI, utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente y medido en un Espectrómetro de RMN Bruker Advance de 400 MHz. Referencia TMS.

En la Tabla 3.3 se pueden observar los corrimientos químicos observados en el espectro de la Figura 3.3 y además las asignaciones de las señales a los diferentes núcleos, los cuales se indican en la estructura de la QUI que se muestra en la misma tabla. También se indican la cantidad de H que integran, las constantes de acoplamiento y sus respectivas multiplicidades. Los desplazamientos químicos que se informan para cada señal, tienen como referencia TMS y fueron corregidos según la señal de  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 7,26$  ppm).

Tabla 3.3: Asignación de señales de  $^1\text{H}$  RMN para QUI

	Corrimentos químicos (ppm)	Integral / Constante de acoplamiento (Hz)	Multiplicidad
	1	8,92	1H / 4,1 – 1,5
2	7,40	1H / 8,3 – 4,2	<i>Doblete de doblete</i>
3	8,12	1H / 8,5	<i>Doblete</i>
4	7,82	1H / 8,2	<i>Doblete</i>
5	7,55	1H / 7,5	<i>Triplete</i>
6	7,72	1H / nd <sup>a</sup>	<i>Multiplete</i>
7	8,16	1H / 8,2	<i>Doblete</i>

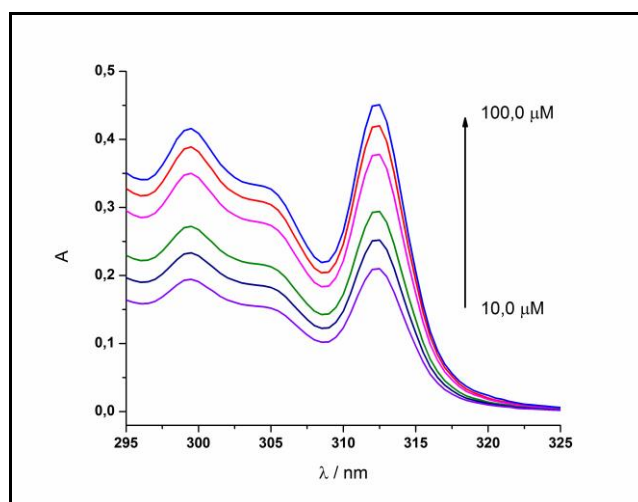
<sup>a</sup>nd= no determinado

El análisis de estos resultados permitió evaluar el estado del sustrato orgánico y habiendo comparando con datos de literatura, se decidió utilizarlo sin realizarle ningún tratamiento de purificación previo.<sup>9,10</sup>

Cabe aclarar que no fue posible determinar los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de las mezclas de QUI con los cavitandos, ya que las concentraciones en las que se trabajó para obtener los complejos QUI-HCA[8]S y QUI- $\beta$ -CD en agua, fueron muy bajas para el estudio por RMN, cuya sensibilidad se encuentra en el orden de mM.

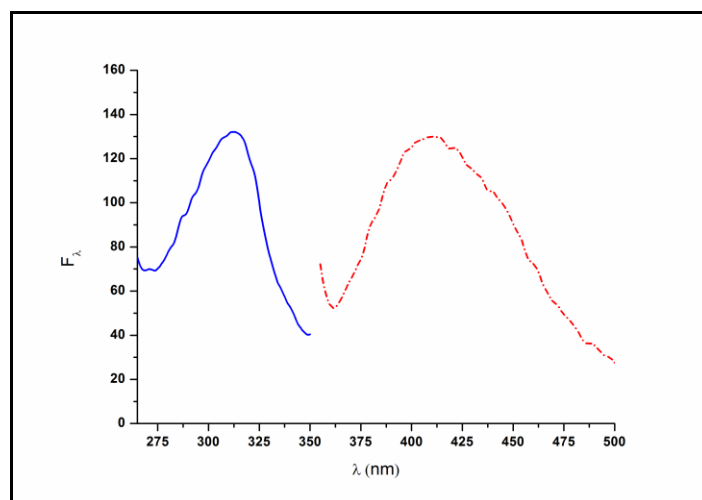
### 3.2.2. Caracterización de quinolina por espectroscopia UV-visible y de fluorescencia

En la Figura 3.4 donde se pueden ver los espectros obtenidos por espectroscopia UV-visible. En el máximo observado a los 313 nm, se pudo determinar su coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ), siendo de  $(3,938 \pm 0,008) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 3.4:** Espectros de absorción de QUI, con concentraciones de (10 – 100)  $\mu\text{M}$ . 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$  y  $b = 1$  cm.

Luego se midieron sus espectros de emisión y de excitación de fluorescencia. En la Figura 3.5 se pueden ver los espectros obtenidos, y en donde se indican las longitudes de onda determinadas para la excitación y emisión del receptor.



**Figura 3.5:** Espectros de excitación (—) (obtenido a  $\lambda_{\text{emi}} = 408,0$  nm) y de emisión (-.-.-) (obtenido a  $\lambda_{\text{exc}} = 313,0$  nm) de F de QUI. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$ . Potencia de detector 400 V y  $b = 1$  cm.

Las propiedades espectroscópicas de absorción y de emisión de F de una molécula proveen información asociada a la estructura, la energía y la dinámica de los distintos estados electrónicos de la misma molécula.<sup>11</sup>

La mayoría de los fluoróforos nativos son compuestos aromáticos. En general, un incremento en la extensión del sistema electrónico  $\pi$  (mayor conjugación) producirá un corrimiento batocrómico en los espectros de absorción y de F y un aumento del rendimiento cuántico de F ( $\phi$ ).<sup>12</sup> Las transiciones más bajas en hidrocarburos aromáticos son del tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , las cuales se caracterizan por altos coeficientes de absorción molar, tiempos de vida moderadamente cortos (unos pocos nanosegundos) y rendimientos cuánticos relativamente bajos. Cuando un heteroátomo está involucrado en el sistema  $\pi$ , una transición del tipo  $n \rightarrow \pi^*$  es responsable del proceso. Estas transiciones se caracterizan por tener tiempos de vida al menos 100 veces mayores (alrededor de  $10^{-6}$  s) que las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Este proceso es muy lento para competir efectivamente con las desactivaciones no radiactivas y, en consecuencia los  $\phi$  son muy bajos.

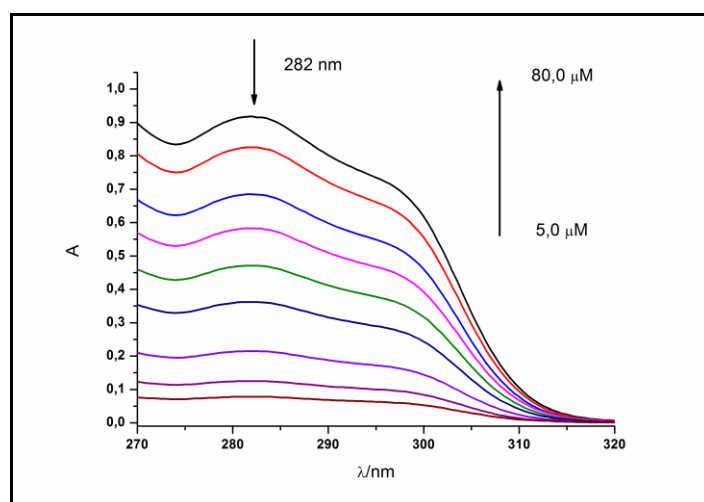
El espectro de absorción de la QUI de la Figura 3.4, presenta un perfil típico de hidrocarburos aromáticos, reflejando valores de coeficientes de absorción molar relativamente altos respecto a otros HAPN.<sup>13,14</sup> Las bandas de absorción en estos espectros involucran transiciones del tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  y son características de estas estructuras. Cabe mencionar que la transición de más baja energía presenta carácter  $n \rightarrow \pi^*$ , la cual queda solapada con la banda de absorción intensa a 280 nm de carácter  $\pi \rightarrow \pi^*$ .<sup>13</sup>

Los espectros de emisión de diferentes fluoróforos presentan ciertas características generales. Por ejemplo, se sabe que la banda de emisión de una determinada transición electrónica se desplaza hacia longitudes de onda mayores respecto a la banda de absorción ( $\lambda_{max}^{em} > \lambda_{exc}$ ).<sup>11</sup> La diferencia entre ambas bandas se denomina corrimiento de Stokes y en general el perfil del espectro de emisión de F corresponde a la imagen especular de la banda de absorción (o de excitación) de la transición  $S_0 \rightarrow S_1$  (Regla de Kasha), donde  $S_0$  corresponde el estado basal y  $S_1$  el estado electrónico singlete excitado, y además no varía con la longitud de onda de excitación (Regla de Vavilov).<sup>11</sup> Estas características se pueden observar en los espectros de la Figura 3.5, donde muestran una estructura amplia que responde a las condiciones a las que se obtuvo dicho espectro (ancho de rendija de excitación de 10,0 nm). La

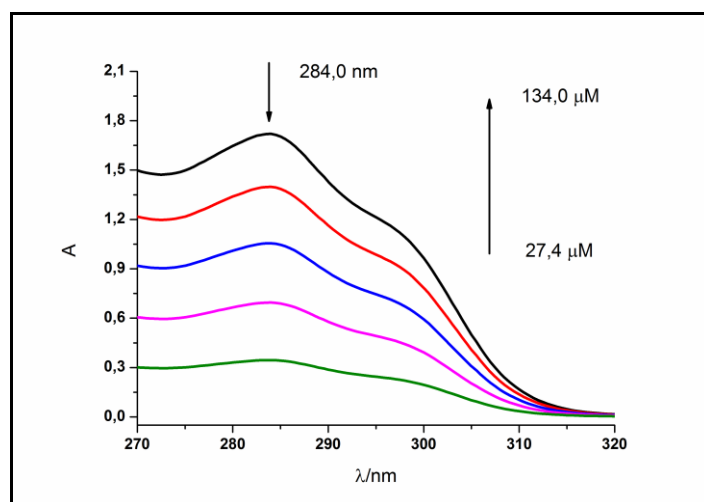
banda de emisión de QUI se relaciona con la correspondiente transición  $S_1 \rightarrow S_0$  como se mencionó anteriormente.

### 3.2.3. Caracterización por espectroscopia UV-visible de las especies ácidas de los sulfonatocalix[n]arenos HCA[6]S y HCA[8]S

Los resultados obtenidos por espectroscopia UV-visible permitieron la determinación de los coeficientes de absortividad molar ( $\epsilon$ ) de ambos receptores en los valores de máxima absorción. El valor obtenido fue  $(115,9 \pm 0,4) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 282,0 nm y  $(149,7 \pm 0,7) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 284,0 nm para HCA[6]S y HCA[8]S, respectivamente. En las Figuras 3.6 y 3.7 se pueden ver los espectros de absorción obtenidos y la longitud de onda elegida para la determinación anterior.



**Figura 3.6:** Espectros de absorción de la especie ácida del p-sulfonatocalix[6]areno (HCA[6]S), con concentraciones de (0 – 80)  $\mu\text{M}$ . 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$  y  $b = 1 \text{ cm}$ .



**Figura 3.7:** Espectros de absorción de la especie ácida del p-sulfonatocalix[8]areno (HCA[8]S), con concentraciones de (27,4 – 134,0)  $\mu\text{M}$ . 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$  y  $b = 1 \text{ cm}$ .

Las bandas que se observan en ambos espectros resultan características del anillo aromático y en los que se observa también el efecto de los sustituyentes, los que producen corrimientos batocrómicos en las bandas (ver figura en la Tabla 3.2). Las transiciones presentes en estos compuestos se deben fundamentalmente a las bandas de absorción de origen  $\pi \rightarrow \pi^*$  y también de transiciones del tipo  $n \rightarrow \pi^*$  debido a la presencia de los heteroátomos que están involucrados en el sistema  $\pi$ .

Luego de estas caracterizaciones de QUI y de algunos de los receptores, se continuó con el estudio de los complejos del tipo huésped-receptor. Para ello y a partir de los estudios previos de nuestro laboratorio acerca de las constantes de asociación obtenidas para los sistemas QUI-CA[6]S, QUI- $\gamma$ -CD, QUI-CA[8]S y QUI- $\beta$ -CD,<sup>2</sup> se calcularon las  $K_A$  para concentraciones de equilibrio de receptor por iteración para cada sistema, teniendo en cuenta la proporción de las concentraciones entre sustrato y receptor y la magnitud de dichas constantes experimentales. Para el sistema con CA[6]S se emplearon concentraciones hasta  $\sim 80 \mu\text{M}$  y  $\sim 10 \mu\text{M}$  para CA[8]S, mientras que para  $\gamma$ -CD se emplearon concentraciones hasta  $\sim 12 \text{ mM}$  y  $\sim 10 \text{ mM}$  para  $\beta$ -CD. Por su parte, la concentración para la QUI fue de  $\sim 25 \mu\text{M}$  para todos los casos, excepto para el sistema con CA[8]S, que fue de  $\sim 10 \mu\text{M}$ .



Con estos valores de concentración de fluoróforo respecto a la de cada receptor, es que los cálculos de las  $K_A$  se realizaron considerando ecuaciones de 2º orden para el caso de los CA[n]S (donde  $[QUI] \cong [CA[n]S]$ ) y de 1º orden para las CDs empleadas (donde  $[QUI] \ll [CDs]$ ).

#### 3.2.4. Determinación de la constante de asociación por espectroscopia de fluorescencia

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

En este apartado, se describirán las ecuaciones que nos permitan determinar las constantes de asociación  $K_A$  de los complejos de la QUI con los diferentes receptores en estudio, para llegar a obtener la expresión matemática que relaciona la emisión de fluorescencia del sustrato orgánico  $S$  con la concentración del receptor macrocíclico  $R$ . En primer lugar, se considera que en la reacción de complejación se forma un complejo de estequiometría 1:1, estableciéndose el siguiente equilibrio (Ecuación 3.01):



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

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

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

La intensidad de emisión de F (expresada en áreas, obtenida por integración del correspondiente espectro) de un fluoróforo, cuya concentración cumple con la relación  $2,303 \times A < 0,05$ , se define como:

$$F = 2,303BI_0b\phi\varepsilon[S] \quad (3.03)$$

donde  $B$  es una constante asociada a varios parámetros instrumentales;  $I_0$  representa la intensidad de la fuente de excitación;  $b$  es el paso óptico;  $\phi$  es el rendimiento cuántico de F;  $\varepsilon$  es la absorptividad molar a la longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) y  $[S]$  la concentración molar del fluoróforo. La ecuación 3.03 se puede reescribir definiendo la constante  $\xi$  que incluye todas las constantes de proporcionalidad que relacionan  $F$  con la concentración de  $S$  en ausencia del receptor, como sigue:

$$F_0 = \xi[S]_0 \quad (3.04)$$

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

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

$$F = \xi_S[S] + \xi_R[R] + \xi_{S-R}[S - R] \quad (3.05)$$

Considerando que el receptor no absorbe luz a la  $\lambda_{exc}$  y por lo tanto no emite F ( $\xi_R \cdot [R] = 0$ ), la ecuación 3.05 se simplifica a la siguiente expresión:

$$F = \xi_S[S] + \xi_{S-R}[S - R] \quad (3.06)$$

Combinando la ecuación 3.06 con la ecuación 3.02 se deriva la ecuación 3.07

$$F = [S](\xi_S + \xi_{S-R}K_A[R]) \quad (3.07)$$

Estableciendo el cociente entre la intensidad de emisión de F del sustrato en presencia ( $F$ ) y en ausencia ( $F_0$ ) de receptor macrocíclico (ecuaciones 3.07 y 3.05, respectivamente), donde  $\frac{F}{F_0} = F_R$  y se obtiene:

$$F_R = \frac{F}{F_0} = \frac{1 + \left(\frac{\xi_{S-R}}{\xi_S}\right)K_A[R]}{1 + K_A[R]} \quad (3.08)$$

Nótese que el cociente  $\frac{\xi_{S-R}}{\xi_S} = \frac{\varepsilon_{S-R}\phi_{S-R}}{\varepsilon_S\phi_S}$ , representa la relación de rendimientos cuánticos de F del sustrato complejado respecto al sustrato libre ( $\Phi = \phi_{S-R}/\phi_S$ ), siempre que se cumpla la igualdad  $\varepsilon_{S-R} = \varepsilon_S$  a la longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ). La ecuación 3.08 se puede reescribir para cuando  $[R]_0 \gg [S]_0$  aproximando entonces que  $[R] \approx [R]_0$ , dando lugar a la siguiente ecuación:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1 + \Phi K_A[R]_0}{1 + K_A[R]_0} \quad (3.09)$$

La ecuación 3.09 es llamada *isoterma de asociación* y relaciona la variación de las intensidades de emisión de F con el cambio de la concentración del receptor  $[R]_0$ . Pueden ocurrir gran variedad de efectos sobre las propiedades de F del sistema huésped-receptor, y la ecuación 3.09 engloba varios comportamientos posibles. Por ejemplo, en el caso que el rendimiento cuántico del complejo formado sea igual a cero ( $\xi_{S-R} = 0$ ), la relación de rendimientos cuánticos  $\Phi$  es nula y la ecuación 3.09 se puede reescribir de la siguiente manera:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_Q \cdot [Q] \quad (3.10)$$

La ecuación 3.10 es la ecuación de Stern-Volmer para un quenching del tipo estático o dinámico.<sup>11</sup> En el caso que se supone un quenching estático, por la formación de un complejo no fluorescente en el estado basal con una estequiometría 1:1, y Q es igual a R. Por otra parte, para un proceso dinámico, el término  $K_Q$  es el producto de la constante de velocidad del proceso de quenching colisional bimolecular ( $k_q$ ) y el tiempo de vida ( $\tau_0$ ) del fluoróforo en el estado excitado en ausencia de quencher, como se lo expresa mediante la ecuación 3.11 que se muestra a continuación:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad (3.11)$$

donde se reemplaza Q, que corresponde a la concentración de equilibrio por  $Q_0$ , si Q es mucho mayor que S, por la concentración inicial del quencher  $[Q]_0$ .

Previamente, en nuestro grupo de investigación<sup>2</sup> se determinaron los valores de constantes de asociación,  $K_A$ , de los complejos huésped-receptor entre el fluoróforo orgánico QUI, y varios receptores CDs y CA[n]S, en base a las ecuaciones 3.09 y 3.10.

### 3.2.5. Cálculo de las constantes de asociación con concentraciones de receptor en el equilibrio e iteración para los sistemas de QUI-CA[6]S, QUI-CA[8]S y QUI- $\gamma$ -CD

En la determinación de las  $K_A$  para los diferentes complejos supramoleculares, se partió de las *curvas de quenching experimentales* de los sistemas QUI-CA[6]S, QUI-CA[8]S, QUI- $\beta$ -CD, QUI- $\gamma$ -CD, y teniendo en cuenta la proporción de las concentraciones entre sustrato y los receptores, y la magnitud de las constantes experimentales determinadas, se calcularon por iteración las  $K_A$  para cada sistema según corresponda. Como se mencionó anteriormente, se considera que en la reacción de complejación se forma un complejo de estequiometría 1:1, estableciéndose un equilibrio acorde a la

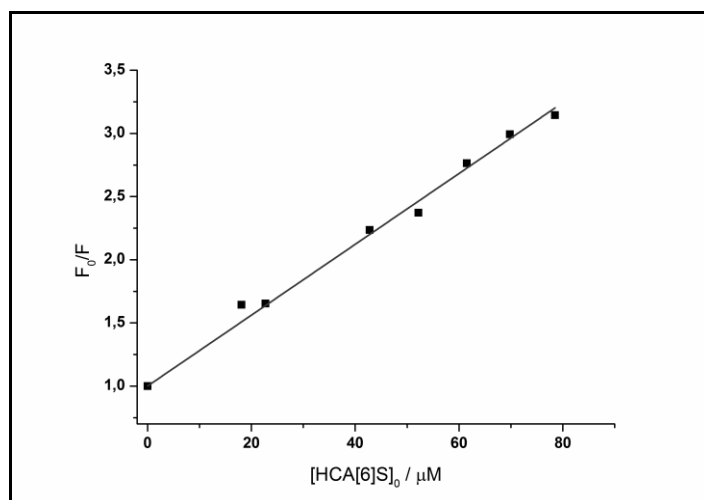
ecuación 3.01. Se procede entonces al cálculo de las concentraciones de complejo [S-R] (ver ecuación 3.02) formados para cada nivel de concentración de  $R_0$ . Como el sustrato en todos los casos es la QUI, se obtiene reemplazando en la ecuación 3.01, la expresión de  $K_A$  como puede verse en la ecuación 3.12, donde la única incógnita es  $[QUI \cdots R]_{equilibrio}$ , es decir, la concentración de complejo [S-R] en el equilibrio. Luego, la solución a esta ecuación es un polinomio de segundo orden, en donde la incógnita es  $[QUI \cdots R]_{equilibrio}$  y a partir de ella se determinan las concentraciones de  $R_{equilibrio}$  por diferencia de  $R_0$  y  $R_{complejado}$ ,

$$K_A = \frac{[QUI \cdots R]_{equilibrio}}{([QUI]_0 - [QUI]_{complejado}) \cdot ([R]_0 - [R]_{complejado})} \quad 3.12$$

De esta manera, se obtienen las concentraciones  $R_{equilibrio}$  para cada nivel de concentración de receptor y se las grafica respecto al valor experimental obtenido de  $F_0/F$  y se ajusta, nuevamente, según la ecuación 3.10. Estos pasos se repiten, es decir por iteración, se determinan las nuevas pendientes, y por ende los valores de  $K_A$  recalculados ahora a concentraciones de equilibrio de receptor ( $R_{equilibrio}$ ), y luego, nuevamente, se resuelve la ecuación 3.12 para la nueva determinación de  $R_{equilibrio}$  y así hasta obtener una nueva pendiente ( $K_A$ ), tal que los valores de las mismas no cambien en más de 5% de una iteración respecto de la siguiente.

#### 3.2.5.1. **SISTEMA QUI-HCA[6]S**

Realizadas todas estas consideraciones, se llevaron a cabo los cálculos correspondientes para el sistema QUI-HCA[6]S. Primero, se partió del ajuste de los datos de los resultados experimentales obtenidos para concentraciones iniciales de receptor.<sup>2</sup> La Figura 3.8 muestra el ajuste obtenido para la determinación de la  $K_A$  en términos de [HCA[6]S] inicial, donde resulta un valor de  $(28,0 \pm 0,5) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .



**Figura 3.8:** Curva de Stern-Volmer para QUI ( $F_0$ ) en presencia de concentraciones variables de HCA[6]S ( $F$ ). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C.  $[\text{QUI}] = 26,0 \mu\text{M}$ ; variando  $[\text{HCA[6]S}] = (0 - 80) \mu\text{M}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}} = 313,0 \text{ nm}$ ; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 400 V;  $b = 1,0 \text{ cm}$ .

En la Tabla 3.4 se muestran los valores obtenidos de las concentraciones de complejo formado, la concentración en el equilibrio para HCA[6]S y QUI, que resultaron de la 1° iteración para este sistema. Luego se muestra el ajuste correspondiente en la Figura 3.9, cuya pendiente tiene un valor de pendiente de  $(3,7 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

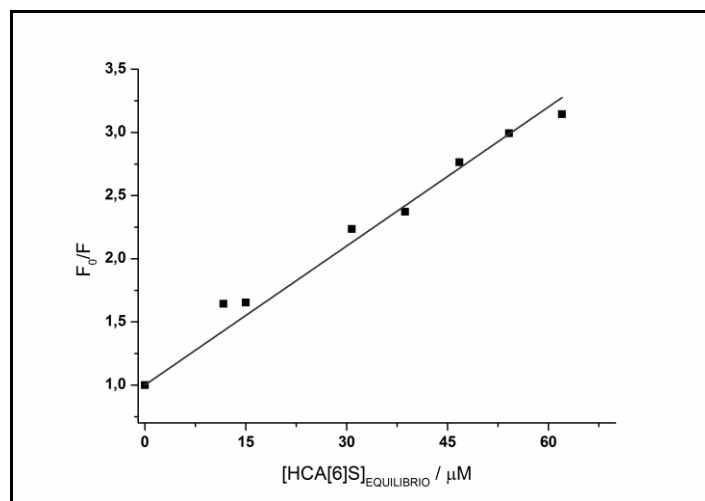
➤ 1° Iteración

$$[\text{QUI}]_0 = 26 \mu\text{M}$$

$$K_A^{[\text{QUI-CA[6]S}]} = (28,0 \pm 0,5) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$$

**Tabla 3.4:** Concentraciones calculadas a partir de la 1° iteración de QUI-HCA[6]S

$[\text{HCA[6]S}]_0$ ( $\mu\text{M}$ )	$[\text{QUI-HCA[6]S}]$ ( $\mu\text{M}$ )	$[\text{HCA[6]S}]_{\text{EQUI}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$[\text{QUI}]_{\text{LIBRE}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$F_0 / F$
0	0	0	26,0	1
18,1	6,411	11,689	19,589	1,643
22,7	7,693	15,007	18,307	1,653
42,8	12,033	30,767	13,967	2,235
52,2	13,518	38,682	12,482	2,372
61,5	14,741	46,759	11,259	2,764
69,8	15,665	54,135	10,335	2,993
78,5	16,497	62,003	9,503	3,144



**Figura 3.9:** Curva de Stern-Volmer de la 1ª iteración para QUI ( $F_0$ ) en presencia de concentraciones variables de HCA[6]S ( $F$ ) para valores en el equilibrio.

Siguiendo procedimientos similares a los descritos anteriormente, se muestran los resultados obtenidos para la 2ª iteración y sus respectivos valores de concentración obtenidos (ver Tabla 3.5), utilizando ahora el valor de la  $K_A$  obtenida en el ajuste de la 1ª iteración ( $(3,7 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ).

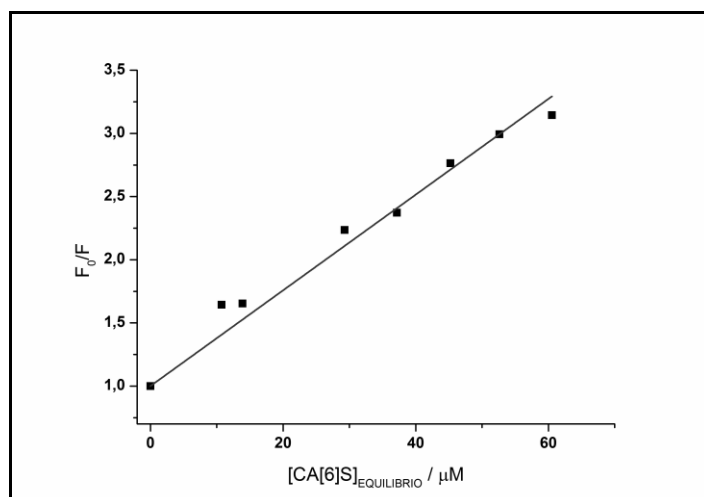
➤ *2ª Iteración*

$$[QUI]_0 = 26 \mu\text{M}$$

$$K_A^{[QUI-C6]S} = (3,7 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$

**Tabla 3.5:** Concentraciones calculadas a partir de la 2ª iteración de QUI-HCA[6]S

[HCA[6]S] <sub>0</sub> (μM)	[QUI-HCA[6]S] (μM)	[HCA[6]S] <sub>EQUI</sub> (μM)	[QUI] <sub>LIBRE</sub> (μM)	F <sub>0</sub> / F Exp.
0	0	0	26	1
18,1	7,383	10,717	18,617	1,643
22,7	8,821	13,879	17,179	1,653
42,8	13,520	29,280	12,480	2,235
52,2	15,050	37,150	10,950	2,372
61,5	16,274	45,226	9,726	2,764
69,8	17,178	52,622	8,822	2,993
78,5	17,974	60,526	8,026	3,144



**Figura 3.10:** Curva de Stern-Volmer de la 2<sup>o</sup> iteración para QUI ( $F_0$ ) en presencia de concentraciones variables de HCA[6]S ( $F$ ) para valores en el equilibrio.

El resultado encontrado para la 2<sup>o</sup> iteración, obtenido del ajuste mostrado en el Figura 3.10, indicó un valor de  $((3,8 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1})$ , lo que representa un cambio de un 2% respecto al valor obtenido en la 1<sup>o</sup> iteración y por tanto, se concluye que este último es el correspondiente para el valor de  $K_A$  para el sistema QUI-HCA[6]S. En la Tabla 3.6, se resumen los valores obtenidos para este sistema.

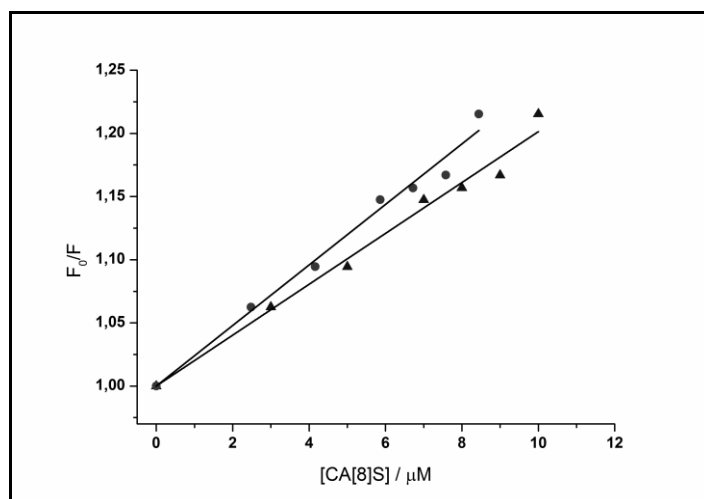
**Tabla 3.6: Valores de  $K_A$  para QUI-HCA[6]S**

	$K_A / \times 10^3 (\text{M}^{-1})$
<b>EXPERIMENTAL</b>	<b>(28,0 ± 0,5)</b>
<b>1<sup>o</sup> ITERACIÓN</b>	<b>(37 ± 1)</b>
<b>2<sup>o</sup> ITERACIÓN</b>	<b>(38 ± 1)</b>

### 3.2.5.2. SISTEMA QUI-HCA[8]S

Para este sistema, se llevaron a cabo procedimientos similares a los detallados anteriormente, en donde la concentración inicial de QUI utilizada fue de 9,4 μM. Sólo se muestran los resultados obtenidos para las curvas de ajustes (ver Figura 3.11) y los valores de pendientes obtenidos, se resumen en la Tabla 3.7.





**Figura 3.11:** Curvas de Stern-Volmer para QUI ( $F_0$ ) en presencia de concentraciones variables de HCA[8]S ( $F$ ) para valores iniciales ( $\blacktriangle$ ) y en el equilibrio ( $\bullet$ ).

**Tabla 3.7: Valores de  $K_A$  para QUI-HCA[8]S**

	$K_A / \times 10^3 (M^{-1})$
<b>EXPERIMENTAL</b>	<b>(20,1 ± 0,5)</b>
<b>1º ITERACIÓN</b>	<b>(23,5 ± 0,6)</b>
<b>2º ITERACIÓN</b>	<b>(24,0 ± 0,6)</b>

### 3.2.5.3. SISTEMA QUI- $\gamma$ -CD

Para los sistemas con ciclodextrinas, se emplearon para la determinación de las  $K_A$ , valores del orden mM de receptor, respecto de concentraciones  $\mu\text{M}$  de QUI y por tanto, los cálculos resultan de resolver una ecuación de primer orden, dado que se simplifica la ecuación 3.12 por ser  $[R]_0 \gg [QUI]_0$  y entonces se toma como aproximación que  $[R]_0 \sim [R]_{\text{equilibrio}}$ , por ende se obtiene la ecuación 3.13.

$$K_A = \frac{[QUI \cdots R]_{\text{equilibrio}}}{[[QUI]_0 - [QUI]_{\text{complejado}}] \cdot [R]_0} \quad 3.13$$

Teniendo en cuenta estas consideraciones, los resultados obtenidos de los cálculos de concentraciones de  $R_0$  se muestran en la Tabla 3.8. Luego se muestra el ajuste correspondiente en la Figura 3.12, el cual arroja un valor de pendiente de  $(57,054 \pm 0,003) \text{ M}^{-1}$ .

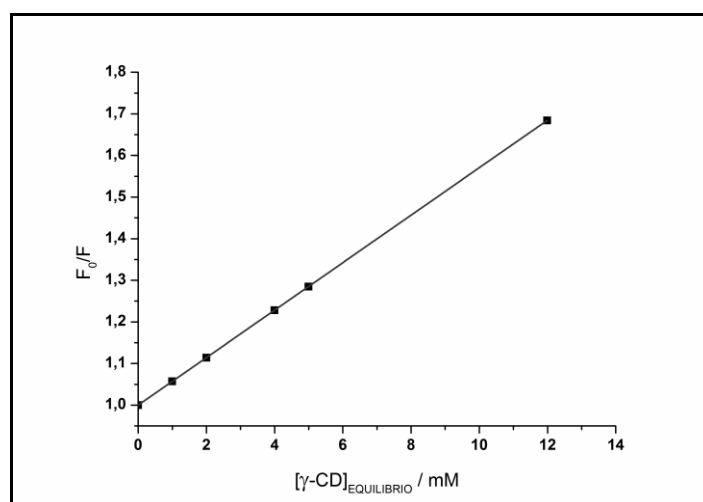
➤ 1º Iteración

$$[QUI]_0 = 26 \mu\text{M}$$

$$K_A^{[QUI-\gamma-CD]} = (57 \pm 1) \text{ M}^{-1}$$

**Tabla 3.8: Concentraciones calculadas a partir de la 1º iteración de QUI-  $\gamma$  - CD**

$[\gamma - \text{CD}]_0$ (mM)	$[\text{QUI} - \gamma - \text{CD}]$ ( $\mu\text{M}$ )	$[\gamma - \text{CD}]_{\text{EQUI}}$ (mM)	$[\text{QUI}]_{\text{LIBRE}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$F_0 / F$
0	0	0	26	1
1	1,402	0,999	24,5979	1,057
2	2,661	1,997	23,3393	1,114
4	4,827	3,995	21,1726	1,228
5	5,767	4,994	18,5847	1,285
12	10,561	11,989	15,4390	1,684



**Figura 3.12:** Curva de Stern-Volmer de la 1º iteración para QUI ( $F_0$ ) en presencia de concentraciones variables de  $\gamma$ -CD ( $F$ ) para valores en el equilibrio.

Con los resultados obtenidos en la 1° iteración, el valor ( $57,054 \pm 0,003$ )  $M^{-1}$  representa un cambio  $\ll 1$  % de valor obtenido respecto a concentraciones iniciales y por tanto, se concluye que el valor de pendiente de este último ajuste es el correspondiente para el valor de  $K_A$  para el sistema QUI- $\gamma$ -CD.

#### 3.2.5.4. SISTEMA QUI- $\beta$ -CD

Para este sistema, se desarrollaron procedimientos similares que para el caso anterior, y los resultados obtenidos de los cálculos de concentraciones de  $R_0$  se muestran en la Tabla 3.9. Luego se muestra el ajuste correspondiente en la Figura 3.13, el cual arroja un valor de pendiente de ( $54,03 \pm 0,01$ )  $M^{-1}$ .

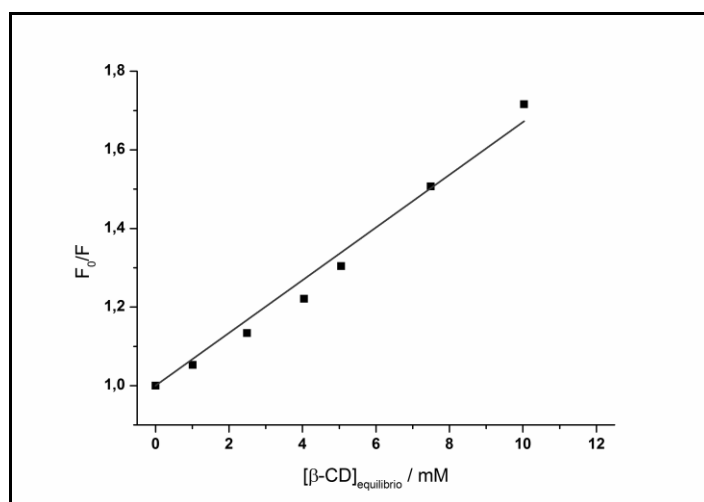
➤ 1° Iteración

$$[QUI]_0 = 21,5 \mu M$$

$$K_A^{[QUI-\beta-CD]} = (54 \pm 4) M^{-1}$$

**Tabla 3.9: Concentraciones calculadas a partir de la 1° iteración de QUI-  $\beta$  - CD**

$[\beta - CD]_0$ (mM)	[QUI- $\beta$ - CD] ( $\mu M$ )	$[\beta - CD]_{EQUI}$ (mM)	[QUI] <sub>LIBRE</sub> ( $\mu M$ )	$F_0 / F$
<b>0</b>	0	0	21,5	<b>1</b>
<b>1,01</b>	1,1120	1,008889	20,388	<b>1,053</b>
<b>3,03</b>	3,0232	3,26977	18,477	<b>1,107</b>
<b>4,04</b>	3,8504	4,0361496	17,649	<b>1,221</b>
<b>5,05</b>	4,6068	5,0453932	16,455	<b>1,304</b>



**Figura 3.13:** Curva de Stern-Volmer de la 1ª iteración de QUI ( $F_0$ ) en presencia de concentraciones variables de  $\beta$ -CD ( $F$ ) para valores en el equilibrio.

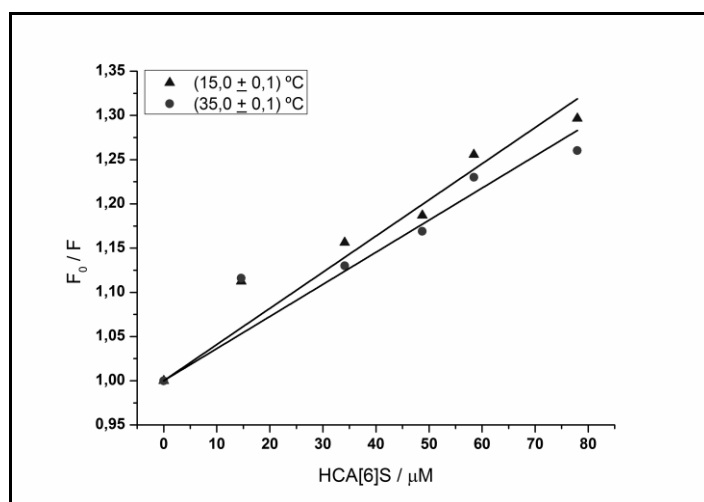
Una vez calculadas las  $K_A$  para los sistemas supramoleculares detallados anteriormente, se pueden observar las diferencias en sus magnitudes lo que evidencia una mayor afinidad de los CA[n]S por la QUI, respecto a las CD estudiadas. Esta diferencia se debe a las diferentes interacciones intermoleculares involucradas. La naturaleza del tipo electrostático que gobiernan en los complejos con los CA[n]S, son más intensas respecto a las interacciones de naturaleza hidrofóbica además de interacciones puente H, fuerzas de Van der Waals y dipolares.

Las magnitudes entre las  $K_A$  y las concentraciones de QUI y los diferentes receptores, permitieron calcular por iteración las soluciones a funciones polinómicas, de primer y segundo orden para CD y CA[n]S respectivamente, las cuales resultaron en valores que son acordes a resultados que son comparables a datos de literatura e incluso de órdenes de magnitud comparables a sistemas similares obtenidos por el grupo de investigación.<sup>1,15,16</sup>

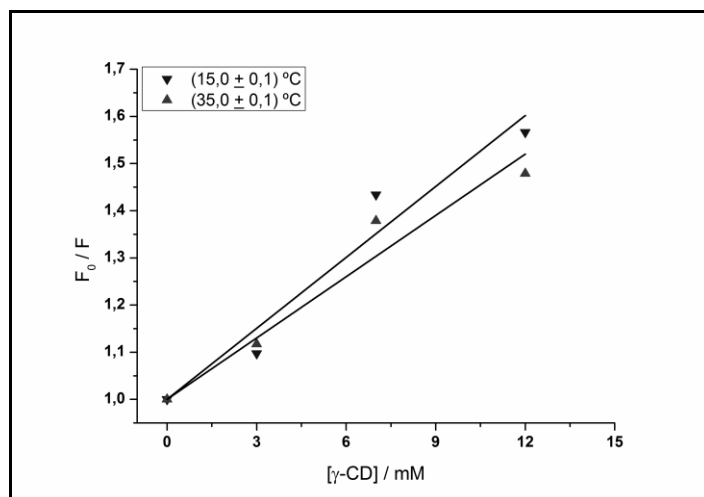
### 3.2.6. Efecto de la temperatura sobre la constante de asociación de los sistemas QUI-HCA[6]S y QUI- $\gamma$ -CD

En base a datos de literatura se interpretó el quenching de estos sistemas como estático por formación de un complejo no fluorescente en el estado basal. Para corroborar la interpretación de los resultados observados, las constantes de velocidad ( $k_q$ ) para un quenching de fluorescencia colisional se calcularon a partir de la igualdad ( $K_Q = k_q \tau_0$ )<sup>11</sup> (ver ecuación 3.11), donde  $\tau_0$  es el tiempo de vida de fluorescencia de QUI sin el macrociclo. Los valores de  $k_q$  ( $M^{-1} s^{-1}$ ) se estimaron a partir del promedio de datos de la literatura, donde  $\tau_0$  (ns) de QUI son 1,75 y 21,23 para  $\lambda_{em}$  (nm) 369 y 430, respectivamente, a  $\lambda_{exc} = 300$  nm en solución de agua a temperatura ambiente.<sup>17</sup> El intervalo estimado para las  $k_q$  fueron  $(20-2) \times 10^{12}$ ;  $(10-11) \times 10^{12}$  y  $(30-3) \times 10^9$  para CA[6]S, CA[8]S y  $\gamma$ -CD, respectivamente. Todos estos valores fueron superiores a la velocidad de difusión, en consecuencia, se propone la formación de complejos no fluorescentes QUI-receptor en el estado fundamental.<sup>17</sup>

Con el objetivo de confirmarlo experimentalmente y reforzar esta interpretación, se determinaron los valores de  $K_Q$  ( $M^{-1}$ ) a 15,0 y 35,0 °C a pH = 6.994, siguiendo el mismo procedimiento descrito a 25,0 °C. Los valores obtenidos fueron  $(3,4 \pm 0,2) \times 10^4$  y  $(3,2 \pm 0,3) \times 10^4$  para CA[6]S, y  $(50 \pm 4)$  y  $(43 \pm 4)$  para  $\gamma$ -CD, y se muestran en las Figura 3.14 y 3.15, respectivamente. Estos valores son prácticamente los mismos dentro del error experimental para cada macrociclo. Este comportamiento es contrario al esperado para un quenching dinámico donde el  $K_Q$  aumenta con los aumentos de temperatura.<sup>11</sup> Así, en estos casos, se propone el quenching como estático por formación de un complejo no fluorescente en el estado basal.



**Figura 3.14:** Curvas de Stern-Volmer para QUI ( $F_0$ ) en presencia de concentraciones variables de HCA[6]S ( $F$ ) determinadas con 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a  $15,0$  °C ( $\blacktriangle$ ) y  $35,0$  °C ( $\bullet$ ).



**Figura 3.15:** Curvas de Stern-Volmer para QUI ( $F_0$ ) en presencia de concentraciones variables de  $\gamma$ -CD ( $F$ ) determinadas con 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a  $15,0$  °C ( $\blacktriangledown$ ) y  $35,0$  °C ( $\blacktriangle$ ).

También, se intentaron medir directamente los tiempos de vida media para estos sistemas, pero debido a que los láseres disponibles en el laboratorio (267 nm y 375 nm) no son los adecuados para la excitación ( $\lambda_{\text{exc}} = 313$  nm), no se encontró un modelo adecuado que permitiera ajustar los tiempos de vida. En el caso de experimentos de QUI con HCA[6]S, dado que el receptor presenta absorbancia a 267 nm, esta longitud de onda de excitación no es adecuada para realizar las medidas en presencia del complejo con QUI, dado que la absorbancia de QUI es considerablemente menor a la de HCA[6]S. Además,

QUI no absorbe a 375 nm, por lo que tampoco este láser se puede utilizar para la excitación. Un problema similar se presentó en el caso con  $\gamma$ -CD, pero en este caso, ninguna de las partes del sistema supramolecular presentaba absorbancia a las longitudes de onda de los láseres disponibles.

### 3.3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

#### 3.3.1. Reactivos e instrumentos

Los receptores ciclodextrinas empleados fueron reactivos de grado analítico de laboratorios Roquette y Cerestar.

Los solventes empleados fueron: agua deionizada calidad Milli-Q obtenida de un purificador Millipore (resistividad, 25,0°C: 18 M $\Omega$  cm) y metanol (CH<sub>3</sub>OH) grado HPLC Sintorgan.

El sustrato orgánico utilizado en esta parte del trabajo fue la Quinolina (99% pureza, marca Aldrich).<sup>18</sup> En este caso, se preparó una solución concentrada del mismo pesando una cantidad correspondiente a un volumen de 20,0  $\mu$ L ( $\delta = 1,093$  g/cm<sup>3</sup> a 25 °C),<sup>18</sup> y se llevó a un volumen final con CH<sub>3</sub>OH de 10,0 mL. Dicha solución fue guardada en la heladera y resguardada de la luz con papel aluminio y recubierta con parafilm. Fue chequeada periódicamente por espectroscopia UV-visible y permaneció estable por más de 20 días.

A partir de la solución madre, se prepararon una serie de soluciones que permitieron la determinación de las constantes de asociación. Dichas soluciones fueron controladas por espectroscopia UV-visible y a partir de sus espectros se determinaron sus concentraciones según la ecuación 2.1.

Luego, las soluciones en presencia de receptores macrocíclicos CD ( $\beta$ -CD;  $\gamma$ -CD) se prepararon con una solución de receptor en su máxima concentración (en su límite de solubilidad), lo que permitió llegar a una concentración de CD de ~12 mM. Por su parte, las especies ácidas de los

derivados p-sulfonatocalix[n]arenos, CA[6]S y CA[8]S, se prepararon a partir de soluciones madres que permitieron alcanzar concentraciones máximas de 80,0  $\mu\text{M}$ . Las soluciones madres de todos los receptores, CD y Ca[n]S fueron preparadas en un medio de buffer fosfato de pH = 6,994 a 25,0 °C. A todas las soluciones se les midieron los espectros de absorción y de emisión de F.

Las medidas de absorbancia permitieron determinar las longitudes de onda de excitación, es decir, los máximos de absorción, según correspondiera para cada compuesto. En todos los casos, se registraron los espectros de excitación, en el intervalo de 200 a 300 nm. Con toda esta información, fue posible determinar los mejores parámetros experimentales, para obtener los correspondientes espectros de emisión.

Las mediciones de pH se realizaron con un pH-metro Thermo Orion modelo 520A 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 soluciones buffer estándar preparadas de pH = 4,008 (con 0,05 M de ftalato ácido de potasio marca J.T.Baker), de pH = 6,994 (con 0,02 M de fosfato dihidrógeno de sodio marca J.T.Baker, 0,03 M de fosfato monohidrógeno de disodio marca AppliChem y 0,02 M de cloruro de sodio marca Taurus) y de pH = 9,155 (con 0,01 M de borato de sodio marca J.T.Baker y 0,02 M de cloruro de sodio marca Taurus).<sup>19</sup> Se prepararon según el procedimiento descrito en la literatura citada, empleando reactivos de grado analítico.<sup>20</sup> Las soluciones buffer se controlaron por medición experimental. La precisión del pH-metro fue 0,001 y la exactitud asociada a las lecturas fue  $\pm 0,005$ .

Las soluciones estudiadas fueron preparadas en medio acuoso bufferizado, utilizando un 95 % v/v de buffer pH = 6,994 y empleando como co-solvente un 2 % de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), completando el volumen final con agua calidad Milli-Q.

Los espectros de absorción UV-visible se obtuvieron empleando un espectrofotómetro Shimadzu 1800 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 buffer pH =



6,994. En todos los experimentos se utilizó una celda de  $b = 1\text{ cm}$  de paso óptico.

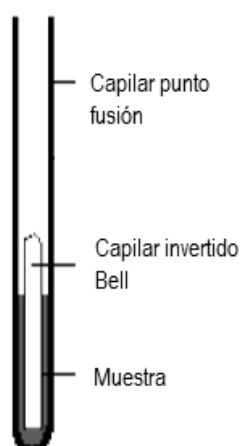
Los espectros de emisión de F se registraron con un espectrofluorímetro CARY Eclipse, con anchos de rendija de emisión y de excitación de  $10,0\text{ nm}$ , una velocidad de barrido de  $500\text{ nm/min}$  y una potencia del detector especificada en cada caso. La temperatura de las soluciones se mantuvo a  $25,0\text{ °C}$  conectando el porta-celda del equipo al accesorio Single Peltier CARY. En todos los experimentos se utilizó una celda de cuarzo de  $b = 1\text{ cm}$  de paso óptico.

La disolución de las muestras fue asistida con un sonicador Arcano modelo PS-10A.

Los datos adquiridos se procesaron empleando el software OriginPro 8.6 2018.

### 3.3.2. Determinación del punto de ebullición de Quinolina

En esta experiencia se empleó el método de micro escala<sup>21</sup> y se adaptó el sistema de capilares al fusiómetro electro térmico Thermo Scientific 9100, como se muestra en la Figura 3.16. En esta determinación se utilizó un volumen de QUI de unos  $25,0\text{ }\mu\text{L}$ .



**Figura 3.16:** Esquema del sistema de capilares adaptado para la determinación del punto de ebullición de la QUI.

El punto de ebullición (PB) de referencia es 238,0 °C, el cual se especifica en su hoja de seguridad Sigma Aldrich.<sup>18</sup> Con este dato de referencia, se realizó una primera medida en una rampa rápida de ascenso de temperatura (es decir 10,0 °C/min), lo que permitió tener una medida aproximada del PB. Luego, se utilizó una rampa lenta de temperatura, es decir 1,0 °C/min, y por triplicado se realizaron las determinaciones. El valor obtenido para el PB fue de (238 ± 1) °C. Con este resultado, se decidió utilizar este sustrato sin tratamiento previo, considerando que se encuentra en buen estado, y además teniendo el respaldo de la caracterización espectroscópica detallada en las secciones anteriores de este capítulo.

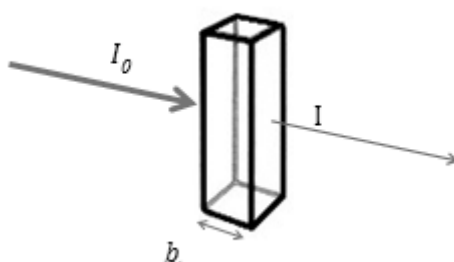
### 3.3.3. *Determinación del punto de fusión de las especies ácidas de los p-sulfonatocalix[n]arenos*

En este caso, los derivados ácidos p-sulfonatocalix[n]arenos, HCA[6]S y HCA[8]S, fueron sintetizados en colaboración con un laboratorio especializado en síntesis de calix[n]arenos en la Universidad de Río Grande del Sur, Brasil. Con los datos de referencia de los puntos de descomposición (PD), PD > 320,0 °C para CA[6]S y PD > 300,0 °C para CA[8]S,<sup>22</sup> se realizó una primera medida en una rampa rápida de ascenso de temperatura (10,0 °C/min). Luego, se utilizó una rampa lenta de temperatura (1,0 °C/min) y se realizaron las determinaciones por triplicado. En todos los casos, alrededor de los 270,0 °C, se observaron cambios de color y por arriba de los (280,0 – 285,0) °C, la completa descomposición de los sólidos resultando en productos marrones y negros. Estos resultados son acorde a datos de literatura e incluso coinciden con antecedentes obtenidos en el grupo de investigación. Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por UV-visible, fluorescencia y <sup>1</sup>H RMN, se decidió utilizar estos receptores sin ningún tratamiento de purificación.

### 3.3.4. *Determinación de absortividades molares*

Para determinar la concentración de las especies estudiadas por medio de su espectro de absorción se utiliza una curva de calibración y se emplea la ley de Lambert y Beer (ver ecuación 3.13). Esta ley enuncia que la cantidad de

luz absorbida por un  *cromóforo*  es independiente de la potencia o intensidad inicial de luz,  $I_0$ , y que la cantidad de luz absorbida es proporcional a la concentración de las moléculas absorbentes en el paso óptico,  $b$ , que el haz recorre a través de la solución. En la Figura 3.17 se esquematiza la absorción de una muestra, dando la expresión para la absorción de luz,  $A$ , en función de  $I_0$  y la intensidad del haz de luz transmitido  $I$ .



**Figura 3.17:** Representación esquemática de la absorción de luz

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon b [S] = A \quad (3.13)$$

donde  $A$  representa la absorbancia,  $\varepsilon$  la constante de proporcionalidad denominada absortividad molar (con unidades  $M^{-1}cm^{-1}$ ),  $b$  es la longitud del paso óptico del haz de luz a través de la solución (en  $cm$ ) y  $[S]$  es la concentración del sustrato (expresada en  $M$ ). El coeficiente  $\varepsilon$  es una propiedad intrínseca del compuesto en el medio donde está disuelto a la temperatura en que se efectúa su determinación a una dada longitud de onda ( $\lambda$ ). Este parámetro es determinado mediante el cálculo de la pendiente de una gráfica de  $A$  en función de la concentración de  $S$ , es decir su curva de calibración.

### 3.3.5. Determinación de espectros de emisión de fluorescencia

Para la determinación de los espectros de emisión de F de las sondas fluorescentes utilizadas en el trabajo de tesis, se emplearon soluciones cuyas concentraciones se encontraban dentro del rango lineal de respuesta del espectrofluorímetro. En todo momento se aseguró que la concentración del sustrato fuera tal que  $2,3xA < 0,05$  (con un  $b = 1,0$  cm).

Las mediciones de F se realizaron usando cubetas de cuarzo (con  $b = 1,0$  cm). Los espectros se registraron a partir de una longitud de onda mayor a la longitud de onda de excitación,  $\lambda_{exc}$ , del fluoróforo hasta una longitud de onda en la que la intensidad de emisión fuera nula. En todos los casos se obtuvieron las áreas absolutas de los espectros de emisión de F dentro del intervalo de longitudes de onda, según corresponda para cada caso. Estas áreas se emplearon para todos los estudios por esta técnica, es decir, las intensidades de las áreas representaron los valores de las integrales correspondientes de los espectros de emisión.

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

## **3.4. CONCLUSIONES PARCIALES**

---

Se realizó el control del estado de pureza y la caracterización espectroscópica de los reactivos. Los resultados obtenidos permitieron decidir que no fue necesario ningún tratamiento previo de purificación y que los reactivos se encuentran en condiciones óptimas para su uso.

Se pudieron calcular las  $K_A$  para los sistemas *QUI-CA[6]S*, *QUI- $\gamma$ -CD*, *QUI-CA[8]S* y *QUI- $\beta$ -CD* respecto a concentraciones de equilibrio de receptor

por iteración para cada sistema. Para todos los sistemas supramoleculares se empleó el modelo de Stern-Volmer para las determinaciones fluorimétricas en que las  $K_Q$  son equivalentes a la  $K_A$ .

De los valores obtenidos se observó que el HCA[8]S resultó ser mejor quencher y receptor para QUI en más de un 60 %, como lo indica la relación  $K_A^{(QUI-HCA[6]S)} / K_A^{(QUI-HCA[8]S)}$ . Por su parte, no hubo diferencias significativas en la afinidad de la QUI por  $\beta$ -CD o  $\gamma$ -CD, en donde la relación de  $K_A^{(QUI-\beta-CD)} / K_A^{(QUI-\gamma-CD)}$ , no es mayor al 5 %.

Por otra parte, los HCA[n]S resultaron casi 700 veces mejores tanto como quencher y como receptores que las correspondientes CDs. Esto indica una mayor eficiencia de HCA[n]S dado por un mayor cubrimiento de la QUI favorecida por la conformación flexible del macrociclo.<sup>5</sup> Además, se refleja en los diferentes tipos de interacciones que se ven involucradas en los diferentes complejos. La naturaleza, fundamentalmente, electrostática y del tipo  $\pi$ - $\pi$  de las interacciones son las responsables de los valores obtenidos de  $K_A$  para los HCA[n]S, respecto de las interacciones hidrofóbicas y del tipo puente de hidrógeno para las CDs. En este punto, es importante destacar que al pH de trabajo (6,994) la QUI se encuentra en su estado neutro, mientras que el receptor se encuentra con cargas netas negativas como producto de la deprotonación de fenolatos y los grupos sulfonatos.

Por último, con todos los resultados obtenidos, se pudo seleccionar el sistema supramolecular más propicio para continuar con los estudios, proponiendo reacciones de desplazamiento como alternativas analíticas para la detección y cuantificación de analitos no fluorescentes.

### 3.5. BIBLIOGRAFÍA

---

- 1 M. E. Carranza, H. M. Elero and A. V. Veglia, Aqueous on / off fluorescent switches based on systems of quinoline / quinoline-macrocyclic, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 2020, **390**, 112253–112259.
- 2 Matías Carranza, Diseño, síntesis y caracterización de nanocavidades para la construcción de dispositivos moleculares, *Univ. Nac. Córdoba*, 2015, Tesis doctoral.
- 3 E. Moctezuma, E. Monreal, E. Leyva and J. Beltrán, Estudio de RMN de los complejos de fenoles halogenados con ciclodextrinas, *Educ. Química*, 2018, **13**, 82.
- 4 R. Zhao, C. Sandström, H. Zhang and T. Tan, NMR Study on the Inclusion Complexes of  $\beta$ -Cyclodextrin with Isoflavones, *Molecules*, 2016, **21**, 1–11.
- 5 C. D. Gutsche and L. J. Bauer, Calixarenes. 13. The Conformational Properties of Calix[4]arenes, Calix[6]arenes, Calix[8]arenes, and Oxacalixarenes, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 6052–6059.
- 6 Y. Jia, M. Dong, B. Wang and C. Li, Synthesis and Host–Guest Properties of Acyclic Pillar[n]naphthalenes, *Front. Chem.*, 2019, **7**, 2296–2646.
- 7 C. T. Avetta, B. J. Shorthill, C. Ren and T. E. Glass, Molecular Tubes for Lipid Sensing: Tube Conformations Control Analyte Selectivity and Fluorescent Response, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 851–857.
- 8 S. K. Dinda, M. Althaf Hussain, A. Upadhyay and C. P. Rao, Supramolecular Sensing of 2,4,6-Trinitrophenol by a Tetrapyrenyl Conjugate of Calix[4]arene: Applicability in Solution, in Solid State, and on the Strips of Cellulose and Silica Gel and the Image Processing by a Cellular Phone, *ACS Omega*, 2019, **4**, 17060–17071.
- 9 J. Klenc, E. Raux, S. Barnes, S. Sullivan, B. Duszynska, A. J. Bojarski

- and L. Strekowski, Synthesis of 4-Substituted 2- ( 4-Methylpiperazino ) pyrimidines and Quinazoline Analogs as Serotonin 5-HT 2A Receptor Ligands, *J. Heterocycl. Chem.*, 2009, **46**, 1259–1265.
- 10 S. Jyotirmaya, S. P. Kshiroda Nandini and P. S. Kumar, In vitro antimicrobial investigations of newly synthesized transitional bivalent metal complexes derived from 8-hydroxyquinoline, *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, 2017, **51**, 480–489.
  - 11 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Tercera ed., 2006.
  - 12 B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2001, vol. 53.
  - 13 J. Sousa and L. Pinto da Silva, Modelling the absorption properties of polycyclic aromatic hydrocarbons and derivatives over three European cities by TD-DFT calculations, *Sci. Total Environ.*, 2019, **695**, 133881.
  - 14 S. Feng, X. Guo and J. Zhang, An effective strategy for simply varying relative position of two carbazole groups in the thermally activated delayed fluorescence emitters to achieve deep-blue emission, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2020, **226**, 117564.
  - 15 C. Meinguet, B. Masereel and J. Wouters, Preparation and characterization of a new harmine-based antiproliferative compound in complex with cyclodextrin: Increasing solubility while maintaining biological activity, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2015, **77**, 135–140.
  - 16 A. V. Veglia, Fluorimetric determination of carbamate pesticides in host-guest complexes, *Molecules*, 2000, **5**, 437–438.
  - 17 L. R. Naik, H. M. Suresh Kumar, S. R. Inamdar and N. N. Math, Steady-state and time-resolved emission studies of 6-methoxy quinoline, *Spectrosc. Lett.*, 2005, **38**, 645–659.
  - 18 Sigma-Aldrich, Quinolina, *MSDS*, 2019, 1–10.

- 19 C. R. N. Strauts, J. H. Gilfillan and H. N. Wilson, *Analytical Chemistry-The Working Tools*, *Oxford Univ. Press*, 1958, **Volumen I**, 228.
- 20 W. Hayes, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, *CRC Press*, 2014, **95<sup>TH</sup> edit**, 8–34 y 8–36.
- 21 D. Pavia, G. Lampman and G. K., *Organic Laboratory Techniques*, 2017.
- 22 M. Neagu, R.-M. Ion, G. Manda, C. Constantin, E. Radu and Z. Cristu, Antitumoral effect of calixarenes in experimental photodynamic therapy with K562 tumor cell line, *Rom. J. Biochem.*, 2010, **47**, 17–35.



# CAPÍTULO 4

---

## **SISTEMAS SUPRAMOLECULARES MIXTOS DEL COMPLEJO QUINOLINA- CALIX[6]ARENO Y ANALITOS NO FLUORESCENTES**

---

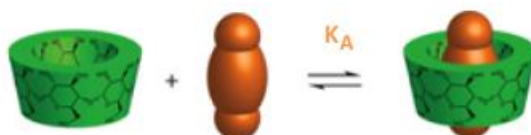
### **4.1. INTRODUCCIÓN**

---

El reconocimiento molecular es el proceso por el que un receptor reconoce e identifica una especie química a través de un conjunto de interacciones moleculares estructuralmente muy bien definidas. Este proceso se da en la naturaleza de forma espontánea y es el punto de partida de numerosos procesos biológicos tales como los que intervienen neurotransmisores, las hormonas, los sistemas enzima-sustrato y antígeno-anticuerpo, los mecanismos de acción de los fármacos, entre otros.<sup>1</sup> La especificidad del reconocimiento molecular (sustrato-receptor) se basa en la

complementariedad estructural y funcional de una parte de las moléculas que participan en el equilibrio de interacción. Son las interacciones no covalentes las que juegan un papel fundamental en este proceso de reconocimiento molecular, y generalmente, no es un único tipo de interacción intermolecular por sí misma la que impulsa la unión sustrato-receptor, sino que es la acción cooperativa de múltiples interacciones.<sup>2</sup> La cooperatividad es un concepto fundamental, no solo en el reconocimiento molecular sino también en los auto-ensamblajes supramoleculares, es decir en la asociación espontánea de pequeñas entidades, para formar agregados estables y perfectamente estructurados. La cooperatividad ha permitido explicar cómo el comportamiento de un sistema de interacciones en conjunto, es diferente de lo que se esperaría de cada una de las interacciones individuales aisladas. Cuanto más complementarios sean los sitios entre el sustrato y el receptor, mayor es su energía de unión, lo que lo convierte en un fenómeno fundamental en el desarrollo y la regulación de las propiedades colectivas en los complejos químicos.<sup>1</sup>

El desafío o reto, es la posibilidad de desarrollar o construir un ensamble de un número discreto de subunidades moleculares, diseñado para realizar una función determinada siendo de gran interés para uso médico, farmacéutico y ambiental. Es por ello que, en el campo de la investigación química actual, un objetivo de gran interés es el diseño, preparación y caracterización de complejos sustrato-receptor, debido a su elevado potencial en aplicaciones como el análisis de compuestos de importancia clínica, ambiental y preparación de sensores, como se muestra esquemáticamente en el esquema 4.1.<sup>3</sup>



Esquema 4.1: representación de un complejo sustrato-receptor

Resultados previos obtenidos en el grupo de investigación<sup>4</sup> han indicado que la quinolina (QUI) forma complejos ( $K_A$ ) con receptores macrocíclicos (R), como CDs y CA[n]S específicamente, sufriendo cambios espectrales por

fluorescencia (F), que no se ajustan a las leyes de aditividad espectral, como se discutió en el capítulo anteriormente. En este sentido, la F cumple un rol muy importante en el desarrollo de métodos analíticos que empleen sistemas organizados debido a su gran sensibilidad y selectividad.<sup>5</sup> Sin embargo, el empleo de métodos fluorimétricos directos ha sido limitado en muchos casos debido a la poca cantidad de compuestos que presentan F nativa. Por esto es que es de gran interés desarrollar métodos indirectos para este tipo de compuestos, como puede ser la derivatización, la formación de complejos fluorescentes o el *quenching* de F, que permitan determinar analitos no fluorescentes mediante esta técnica.<sup>5</sup>

Por su parte, el núcleo de QUI, como ya se mencionó, es un compuesto heterocíclico aromático nitrogenado. Es una base terciaria débil, que presenta F nativa. Este anillo se encuentra en numerosos compuestos naturales y sustancias con actividad farmacológica, entre otras.<sup>6,7</sup>

Considerando esta perspectiva es que los CA[n]S y las CD pueden ser empleados para la construcción de dispositivos supramoleculares diseñados para interactuar y producir una señal en presencia de un determinado sustrato, es decir un sensor químico.<sup>2,8,9</sup> Con el fin de desarrollar un método analítico para la cuantificación directa de QUI, se hubiera esperado que en presencia de un R bajo estudio, se hubiese producido una exaltación de la emisión de F. De esta forma, se podría haber desarrollado un método analítico basado en dicha exaltación, con una mejora en el valor de la sensibilidad analítica y en el límite de detección.<sup>8,9</sup> En los resultados mostrados en el Capítulo 3, se determinaron las  $K_A$  mediante mecanismos de *quenching* de la F de QUI, por formación de complejos de inclusión, y por lo tanto no resultaron convenientes para el desarrollo de una metodología analítica para la determinación directa de QUI.<sup>4</sup>

Los R empleados en el estudio de los efectos sobre las propiedades espectroscópicas de QUI, evidenciaron la formación de complejos con valores de constantes de asociación ( $K_A / M^{-1}$ ) en el orden de  $\sim 10^2$  para las CD mientras que las  $K_A$  para con los CA[n]S fueron del orden de  $\sim 10^4$ , todas obtenidas mediante *quenching* de F de los mismos sobre la señal de QUI, representando un potencial interruptor del tipo encendido/apagado (*switch*

*on/off*) en medio acuoso. Dado que estos R inhiben la emisión de QUI al formar un complejo, se pensó en emplear estos sistemas como un sensor químico que permita cuantificar indirectamente analitos no fluorescentes. Entonces, se propuso el diseño de estrategias supramoleculares por medio de reacciones de desplazamiento de la QUI complejada en la cavidad del R, por otros analitos no fluorescentes que compiten por la interacción con la cavidad, evaluando los cambios provocados en la señal de F de la QUI. Por lo tanto, se supone que se establecen dos equilibrios coexistentes para el sistema, lo que implica que tanto QUI como el analito desplazante (A) compiten por la cavidad del R. En presencia de otro huésped potencial, sólo una fracción de las cavidades pueden interactuar con QUI, lo que resulta en una disminución del complejo con QUI. Así, al agregar un A a una solución de complejo, se espera restablecer la emisión de F al liberar al medio parte de la QUI complejada, y se puede emplear ese cambio en la F para cuantificar al A.<sup>10</sup>

Los ensayos previos de desplazamiento de QUI de la cavidad se llevaron a cabo usando  $\beta$ -CD como R, ya que la  $K_A$  determinada para este complejo fue menor que la determinada para CA[6]S y CA[8]S, por lo que se esperaba que sea más fácil lograr el desplazamiento del S. Según datos de bibliografía de  $K_A$  para complejos con  $\beta$ -CD, determinadas bajo condiciones experimentales similares, se eligieron como A compuestos que presentan  $K_A$  con dicha CD mayores que la constante determinada para QUI- $\beta$ -CD. Los analitos seleccionados fueron glucosa, 3-clorofenol y 4-clorofenol, cuyas  $K_A/M^{-1}$  con  $\beta$ -CD son 417, 199 y 251 respectivamente.<sup>11</sup> Sin embargo, con los resultados que se encontraron no fue posible detectar un restablecimiento de la F en ninguno de los casos estudiados, y por lo tanto no se puede afirmar, al menos por las técnicas espectroscópicas empleadas, que se haya producido desplazamiento de la QUI de la cavidad del R como se pretendía.

En base a estos antecedentes y dado que con  $\beta$ -CD no se pudo lograr el objetivo planteado, se decidió evaluar el comportamiento de los correspondientes CA[n]S. Según los valores de  $K_A$  para el sistema QUI-HCA[6]S ( $K_A = (38 \pm 1) \times 10^3 M^{-1}$ ) y para el sistema QUI-HCA[8]S ( $K_A = (24,0 \pm 0,6) \times 10^3 M^{-1}$ ), calculadas en la sección 3.2.7, el complejo de HCA[8]S presenta

una  $K_A$  menor que el HCA[6]S y dado que la cantidad de QUI complejada es mayor con el HCA[6]S que con HCA[8]S, al ser desplazada permitiría observar un restablecimiento de la señal más notorio. Por lo tanto, se eligió el sistema supramolecular (QUI-HCA[6]S) formado por la especie ácida del p-sulfonatocalix[6]areno (HCA[6]S) y la QUI y se lo propuso como un posible dispositivo supramolecular para la determinación indirecta de analitos no fluorescentes, con el objetivo de desplazar la QUI de la cavidad del receptor logrando de esta forma restablecer la señal fluorescente. Se decidió también emplear los mismos analitos no fluorescentes que con la  $\beta$ -CD, es decir, glucosa, 3-clorofenol y 4-clorofenol.

La Glucosa (GLU) es un monosacárido con fórmula molecular  $C_6H_{12}O_6$ .<sup>12</sup> Es una hexosa, es decir, contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula (es un grupo aldehído). La GLU es el principal monosacárido en la naturaleza que proporciona energía a las células de una amplia gama de organismos, que va desde los más simples como la levadura hasta los más complejos como el ser humano.<sup>13</sup> La GLU, libre o combinada, es la fuente primaria de síntesis de energía de las células, mediante su oxidación catabólica, y es el componente principal de polímeros de importancia estructural como la celulosa y de polímeros de almacenamiento energético como el almidón y el glucógeno.<sup>14</sup> El metabolismo de la misma presenta uno de los campos de estudios más importante para las ciencias de la salud, dado que se conoce un sin número de investigaciones sobre sus efectos sobre la salud humana.<sup>15</sup> Por estas razones y muchas más es de fundamental importancia contar con metodologías que permitan la detección y cuantificación de la misma.<sup>16,17</sup> En el último tiempo se han informado diferentes métodos para la detección o determinación de GLU empleando sensores enzimáticos<sup>18,19</sup> o biosensores,<sup>20,21</sup> o incluso empleando nanopartículas<sup>22,23</sup> o sistemas de electrodos modificados con tal fin, entre muchos otros tipos de sensores.<sup>24,25,26,27</sup> Entre los más destacados resultados reportados, se puede citar el desarrollo de un chip de óxido de grafeno y nanopartículas de oro recubiertas con nano flores de cobre, mostrando un buen intervalo de linealidad (0,001 – 0,1) mM, con un límite de detección de 0,018  $\mu$ M.<sup>23</sup> Estos resultados indican que los materiales híbridos nano-bio pueden ser

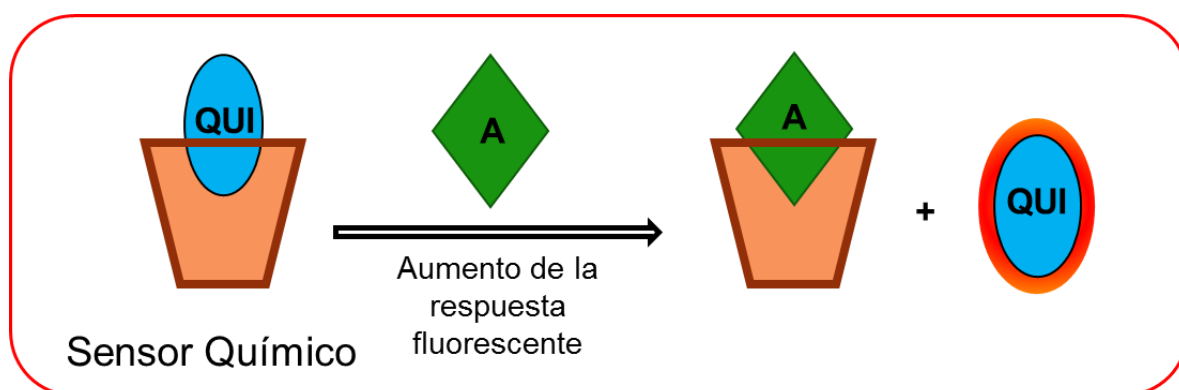
aplicado como un prometedor biosensor electroquímico para controlar los niveles de glucosa en biofluidos.

Los clorofenoles (CP) son compuestos empleados en numerosos procesos industriales y constituyen un importante grupo de contaminantes que pueden encontrarse en sedimentos, aguas residuales, aguas subterráneas, suelos y en gases emitidos por diversas industrias. Se utilizan para la síntesis de intermediarios o, directamente como materias primas, en la fabricación de herbicidas, fungicidas, pesticidas, insecticidas, productos farmacéuticos y pinturas; aunque también pueden ser generados como subproductos en la incineración de residuos, en el blanqueamiento de la pasta de papel con cloro y en la cloración de agua potable.<sup>28</sup> Su amplio espectro de utilización se debe fundamentalmente a sus propiedades antimicrobianas, que han favorecido su empleo como desinfectantes y como agentes conservantes para madera, pinturas, fibras vegetales y pieles.<sup>29</sup> Las concentraciones que se pueden alcanzar en el agua son muy bajas, sin embargo sus efectos organolépticos alertarían al ser humano de su presencia y propiciarían, por sí solos, el necesario tratamiento de las aguas residuales que los contuvieran.<sup>30,31</sup> Las numerosas aplicaciones de los clorofenoles unidas al diverso origen de estos compuestos, favorecen su presencia en aguas (subterráneas y residuales) y en cadenas tróficas, incluso en lugares con bajos niveles de contaminación. Esta situación constituye un grave riesgo para la salud y para el medio ambiente, ya que se trata de compuestos tóxicos y persistentes, que se bioacumulan en la cadena trófica, depositándose en los tejidos grasos de los seres vivos.<sup>32,33</sup> Últimamente se han reportado metodologías muy complejas para la detección y cuantificación de estos compuestos desde las electroquímicas,<sup>34,35,36</sup> y una muy sensible como el desarrollo de un polímero orgánico nanoporoso a base de ferroceno como adsorbente de extracción en fase sólida (SPE) que mostró una excelente capacidad de adsorción para clorofenoles del agua de red, bebida de té y muestras de jugo de durazno.<sup>37</sup> Los límites de detección del método medido en la relación señal/ruido ( $S/N = 3$ ) fueron (0,04 – 0,06)  $\text{ng mL}^{-1}$  para agua de red y (0,10 – 0,20)  $\text{ng mL}^{-1}$  para bebidas de té negro y muestras de jugo de durazno.<sup>37</sup>

## 4.2. OBJETIVOS

En esta parte del trabajo de tesis, se propuso estudiar al sistema supramolecular QUI-HCA[6]S como un sensor químico para analitos no fluorescentes proponiendo el desplazamiento de la QUI de la cavidad del receptor y de esta manera restablecer la señal fluorescente, permitiendo el desarrollo de metodologías analíticas indirectas para estos analitos, como se muestra ilustrativamente en el Esquema 4.2.

Específicamente, se propusieron como analitos (A) desplazantes a la glucosa, 3-clorofenol y 4-clorofenol, dada la importancia de poder detectarlos, cuantificarlos y evaluar de esta manera el desarrollo de una metodología analítica empleando a la fluorescencia como técnica de gran sensibilidad.



Esquema 4.2: Representación esquemática del objetivo propuesto

## 4.3 RESULTADOS y DISCUSIÓN

En busca de corroborar la hipótesis propuesta, es decir, evaluar al sistema QUI-HCA[6]S como un potencial interruptor encendido/apagado/encendido (*switch on/off/on*) en medio acuoso, se consideraron las

concentraciones de QUI y HCA[6]S para las cuales se obtuvo el valor máximo de  $F_0/F$ , siendo éstas de 26  $\mu\text{M}$  y 80  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Entonces se desarrollaron los experimentos en los cuales se hizo variar la concentración de los analitos no fluorescentes de interés y se analizaron las respuestas de sistema supramolecular en cuestión.

#### **4.3.1. Reacción de desplazamiento de QUI por glucosa del sistema QUI-HCA[6]S**

##### *4.3.1.1. Estudio por espectroscopia UV-visible de glucosa en presencia del sistema QUI-HCA[6]S*

Para comenzar el tratamiento de este sistema, se prepararon una serie de soluciones de glucosa por diluciones de la solución madre. Fueron determinados sus espectros de absorción y sus correspondientes espectros de emisión de F. Los espectros de absorción obtenidos, no mostraron señal y a la longitud de onda de excitación de la QUI (313,0 nm), la absorbancia resultó ser despreciable ( $\sim 0,002$ ). Por su parte, los espectros de emisión de F obtenidos no mostraron una dependencia con la concentración, e incluso sean a variaciones propias de la técnica dentro del error instrumental y por tanto no se muestran.

Luego, se llevaron a cabo los experimentos para las reacciones de desplazamiento de la QUI del sistema QUI-HCA[6]S por glucosa (GLU). Primero, se controlaron todas las soluciones por espectroscopia UV-visible calculando las concentraciones, según corresponda.

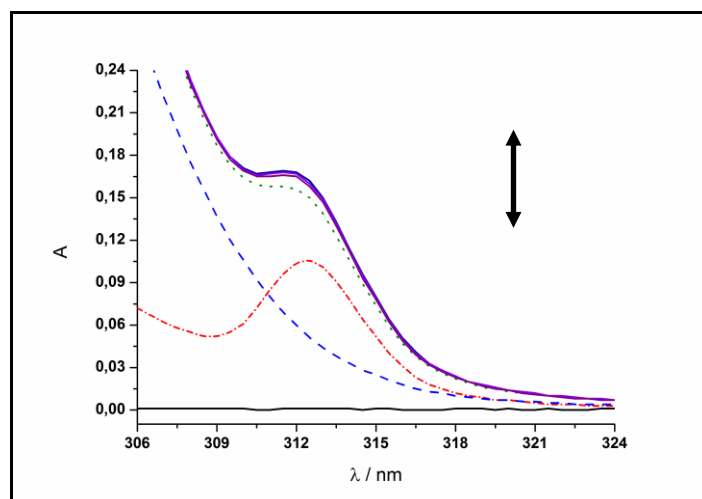
En un primer experimento, el rango de concentraciones en que se hizo variar a la GLU fue de 26  $\mu\text{M}$  a 1000  $\mu\text{M}$ . En la Tabla 4.1, se muestran los datos más relevantes obtenidos de los espectros UV-visible:



**Tabla 4.1:** Valores de absorbancias de soluciones de los compuestos individuales y de mezclas del sistema QUI-HCA[6]S (M) en presencia de GLU. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C y b = 1 cm.

<i>Solución</i>	<i>Abs</i> ( $\lambda=313,0\text{ nm}$ )	$\Sigma\text{ Abs}$	<i>Concentración</i>
HCA[6]S	0,044		80 $\mu\text{M}$
QUI	0,101		26 $\mu\text{M}$
GLUCOSA	0,001		1 mM
QUI-HCA[6]S (M)	0,139	0,145	0 $\mu\text{M}$ Glucosa
M <sub>1</sub>	0,170	0,146	26 $\mu\text{M}$ Glucosa
M <sub>2</sub>	0,150	0,146	100 $\mu\text{M}$ Glucosa
M <sub>3</sub>	0,149	0,146	500 $\mu\text{M}$ Glucosa
M <sub>4</sub>	0,147	0,146	1000 $\mu\text{M}$ Glucosa

De la Tabla 4.1 se puede concluir que las absorbancias que muestran las soluciones mezclas (M<sub>n</sub>) a la longitud de onda de excitación de F (313,0 nm), son iguales al sistema QUI-HCA[6]S en comparación a las soluciones utilizadas como referencias ( $\Sigma\text{Abs}$ ), es decir la sumatoria de todas las partes que conforman el sistema individualmente. A continuación, en la Figura 4.1 se muestran los espectros de absorción obtenidos para la experiencia.

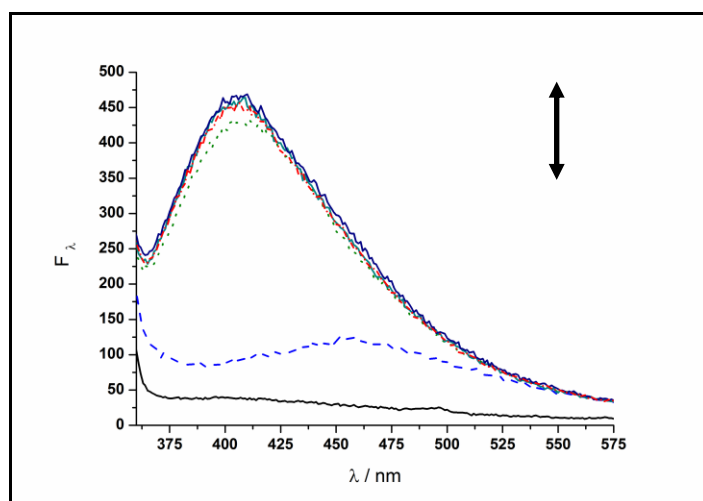


**Figura 4.1:** Efecto de GLU sobre los espectros de absorción del sistema QUI-HCA[6]S (26,0  $\mu\text{M}$  – 80,0  $\mu\text{M}$ ) (•••); [HCA[6]S] = 80,0  $\mu\text{M}$  (---); [QUI] = 26,0  $\mu\text{M}$  (-•-•); [GLU] = 1 mM (—); variando la [GLU] = (0 – 1) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C y b = 1cm.

Como se puede observar en los espectros, podemos concluir que la señal correspondiente a las soluciones mezclas no siguen una tendencia proporcional a la concentración de GLU. Estos cambios pocos significativos resultaron ser del orden de variación dentro del error instrumental, y por ende no se observó ninguna tendencia respecto al aumento en la concentración de GLU en las soluciones mezclas.

#### 4.3.1.2. Estudio por espectroscopia de fluorescencia de glucosa en presencia del sistema QUI-HCA[6]S

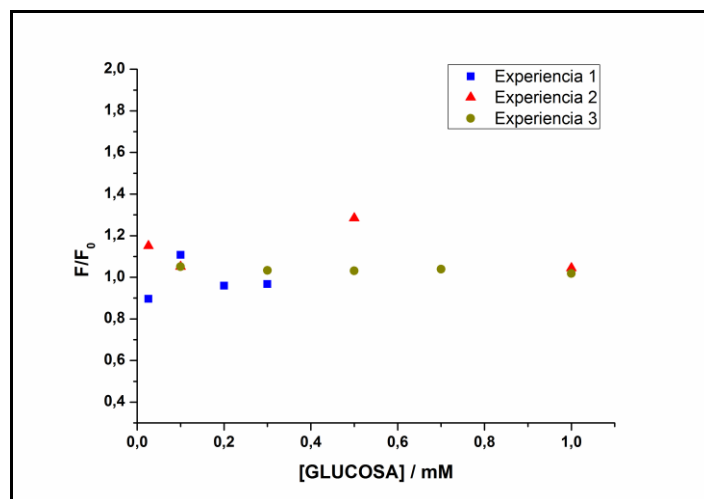
Por otro lado, se obtuvieron los espectros de emisión de F de las soluciones (ver Figura 4.2) y los resultados obtenidos muestran el mismo efecto que se observó anteriormente.



**Figura 4.2:** Efecto de GLU sobre los espectros de emisión de F del sistema QUI-HCA[6]S (26,0  $\mu$ M – 80,0  $\mu$ M) (•••); [HCA[6]S] = 80,0  $\mu$ M (---); [QUI] = 26,0  $\mu$ M (-•-•); [GLU] = 1 mM (—); variando la [GLU] = (0 – 1) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C.  $\lambda_{exc}$  = 313,0 nm, potencia de detector 800 V y b = 1 cm.

Luego, se desarrollaron tres experiencias similares a la descrita anteriormente en los que la máxima concentración de GLU empleada fue de 1 mM, dado que en una primera instancia se observó disminución de F y a mayor concentración de GLU se observaron incrementos de la misma. En la Figura

4.3, se resumen estos resultados observándose en todos los casos, cambios pocos significativos de la señal fluorescente con el aumento de la concentración de GLU.



**Figura 4.3:** Dependencia de  $F/F_0$  del sistema QUI-HCA[6]S ( $F_0$ ) y en presencia de GLU (F). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C;  $\lambda_{\text{EXC}} = 313,0$  nm; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 800 V;  $b = 1,0$  cm.

A partir de estas observaciones, se decidió realizar un último experimento, similar a los desarrollados anteriormente, pero llevando la concentración de GLU a una concentración máxima de 150 mM. Además, se analizaron los efectos que produce la GLU sobre la señal de QUI y la de HCA[6]S. Los resultados obtenidos en el estudio por espectroscopia UV-visible mostraron que el agregado de cantidades crecientes de GLU en presencia de HCA[6]S y QUI, generaron un efecto aditivo en la señal, como paso en los ensayos anteriores respecto al complejo QUI-HCA[6]S.

Con respecto a las soluciones mezclas, se pudo observar el mismo efecto, lo cual respalda los resultados que se reflejaron en todos los experimentos mostrados. Por tal motivo, no se muestran los espectros obtenidos, ni los procesamientos correspondientes a los mismos.

Por su parte, el estudio por F arrojó información que no nos permite generar conclusiones sobre la existencia o no de posibles interacciones en este sistema, dado que la intensidad en la señal observada en los espectros de emisión de F para las soluciones de GLU, indicaron que era necesario hacer

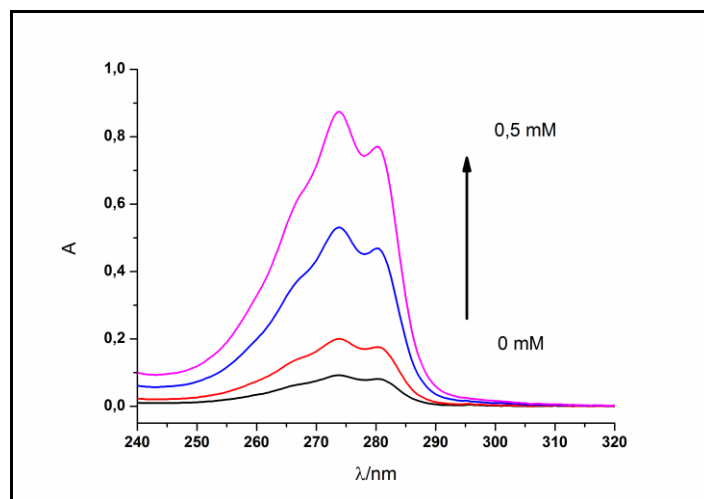
una corrección de señales, y que luego de realizadas, el efecto encontrado resultó ser simplemente una variación dentro del error instrumental de la señal analítica del sistema QUI-HCA[6]S respecto al aumento de la concentración de GLU.

#### **4.3.2. Reacción de desplazamiento de QUI por 3-clorofenol del sistema QUI-HCA[6]S**

Primero, se realizó una caracterización previa del analito desplazante, para lo cual se preparó una solución madre del compuesto y a partir de ella, una serie de soluciones que fueron estudiadas por las técnicas hasta ahora empleadas. Dichas soluciones se prepararon en el medio de trabajo y en condiciones experimentales similares a la que se llevarían a cabo las reacciones de desplazamiento posteriores.

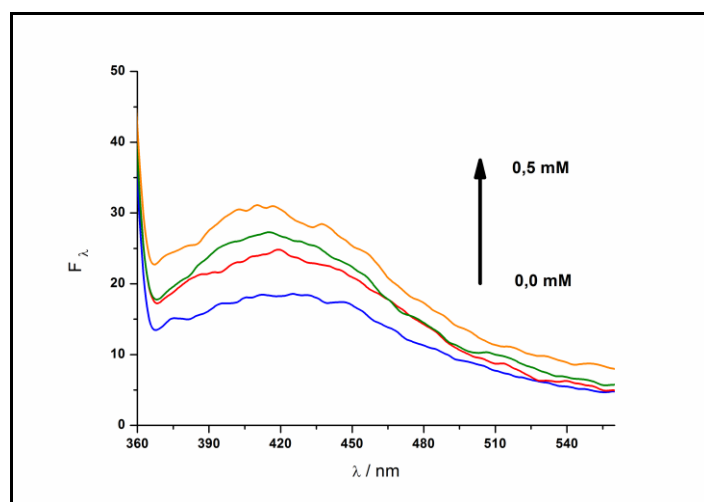
##### *4.3.2.1. Caracterización por espectroscopia UV-visible y de fluorescencia de 3-clorofenol*

Los resultados obtenidos por espectroscopia UV-visible permitieron la determinación de los coeficientes de absortividad molar ( $\epsilon$ ) del compuesto en los puntos de máxima absorción. Los valores obtenidos fueron  $(1543 \pm 6) \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $(1752 \pm 7) \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 280 nm y 274 nm, respectivamente. En la Figura 4.4 se pueden ver los espectros de absorción obtenidos y donde es posible ver que la absorbancia a la longitud de onda de excitación de la QUI, resulta despreciable ( $\sim 0,002$ ).



**Figura 4.4:** Espectros de absorción de 3-CIPh, variando su concentración en un intervalo de (0 – 0,5) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C y b = 1 cm.

Se determinaron los espectros de emisión de F de cada solución, los cuales indicaron que no hay una dependencia entre la señal fluorescente y el aumento de la concentración de 3-clorofenol (3-CIPh), y que además las intensidades de la señal, fueron muy débiles, como se puede ver en la Figura 4.5.



**Figura 4.5:** Espectros de emisión de F de 3-CIPh, variando su concentración en un intervalo de (0 – 0,5) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C.  $\lambda_{exc} = 313,0$  nm, potencia de detector 800 V y b = 1 cm.

Estos resultados obtenidos para 3-CIPh, permitieron analizar la respuesta espectroscópica del analito y de esta manera evaluar las condiciones

experimentales más apropiadas para desarrollar y planificar los experimentos en presencia del sistema supramolecular QUI-HCA[6]S.

#### 4.3.2.2. Estudio por espectroscopia UV-visible de 3-clorofenol en presencia del sistema QUI-HCA[6]S

Se llevaron a cabo los experimentos para las reacciones de desplazamiento de la QUI del sistema QUI-HCA[6]S por 3-CIPh. Primero, se controlaron todas las soluciones por espectroscopia UV-visible, en donde pudo observarse que el aumento en la concentración de 3-CIPh en presencia del sistema QUI-HCA[6]S, evidenció un efecto aditivo en la señal.

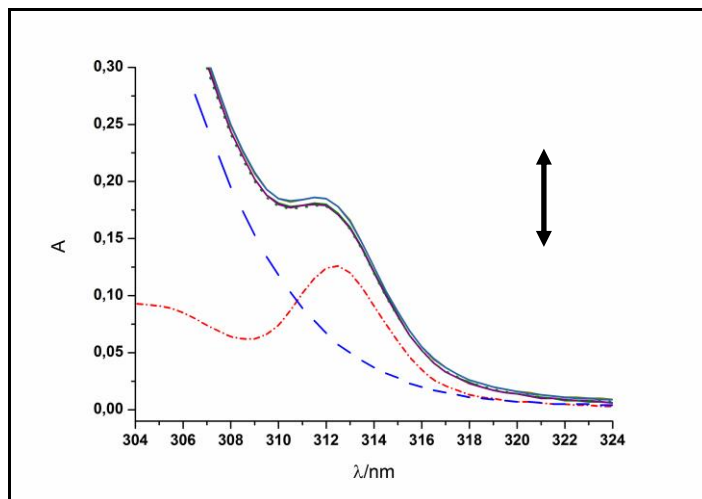
En la Tabla 4.2 se pueden corroborar los efectos observados, en donde la sumatoria de las absorbancias ( $\Sigma Abs$ ) de los componentes del sistema en estudio presentan cambios pocos significativos, respecto a la absorbancias de las soluciones mezclas ( $M_n$ ).

En la Figura 4.6 se pueden observar en los espectros de absorción obtenidos, y a partir de los cuales, se puede concluir que la señal correspondiente a las soluciones mezclas no siguen una tendencia proporcional a la concentración de 3-CIPh. Esto podría indicar, simplemente, una variación dentro del error instrumental en la señal, respecto al aumento en la concentración de 3-CIPh en las soluciones mezclas.

**Tabla 4.2:** Valores de absorbancias de soluciones de los compuestos individuales y de mezclas del sistema QUI-HCA[6]S (M) con 3-CIPh. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C y b = 1 cm.

<i>Solución</i>	<i>Abs</i> ( $\lambda=313,0\text{ nm}$ )	$\Sigma Abs$	<i>Concentración</i>
<b>HCA[6]S</b>	<b>0,050</b>		<b>80 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>QUI</b>	<b>0,120</b>		<b>26 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>QUI-HCA[6]S (M)</b>	<b>0,160</b>		
<b>3-CIPh</b>	<b>0,001</b>		<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>3-CIPh</b>	<b>0,001</b>		<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>3-CIPh</b>	<b>0,003</b>		<b>300 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>3-CIPh</b>	<b>0,005</b>		<b>500 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>M<sub>1</sub></b>	<b>0,159</b>	<b>0,161</b>	<b>50 <math>\mu\text{M}</math> 3-CIPh</b>

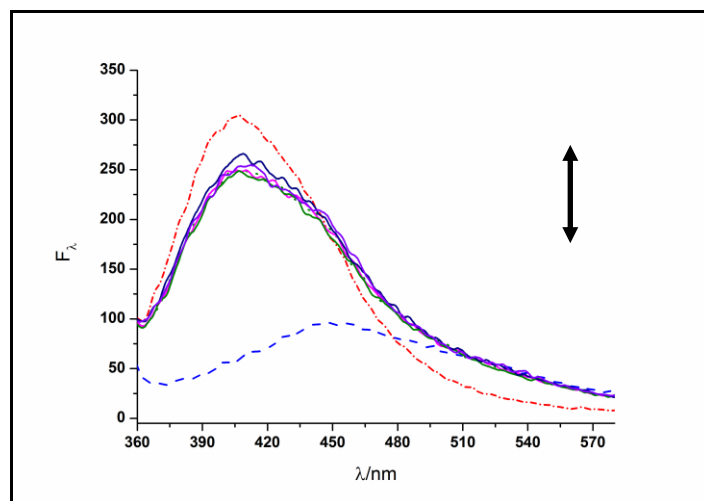
<b>M<sub>2</sub></b>	<b>0,158</b>	<b>0,161</b>	<b>100 μM 3-CIPh</b>
<b>M<sub>3</sub></b>	<b>0,166</b>	<b>0,163</b>	<b>300 μM 3-CIPh</b>
<b>M<sub>4</sub></b>	<b>0,165</b>	<b>0,165</b>	<b>500 μM 3-CIPh</b>



**Figura 4.6:** Efecto de 3-CIPh sobre los espectros de absorción del sistema QUI-HCA[6]S (26,0 μM – 80,0 μM) (•••); [HCA[6]S] = 80,0 μM (---); [QUI] = 26,0 μM (-•-•); variando la [3-CIPh] = (0 – 0,5) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C y b = 1 cm.

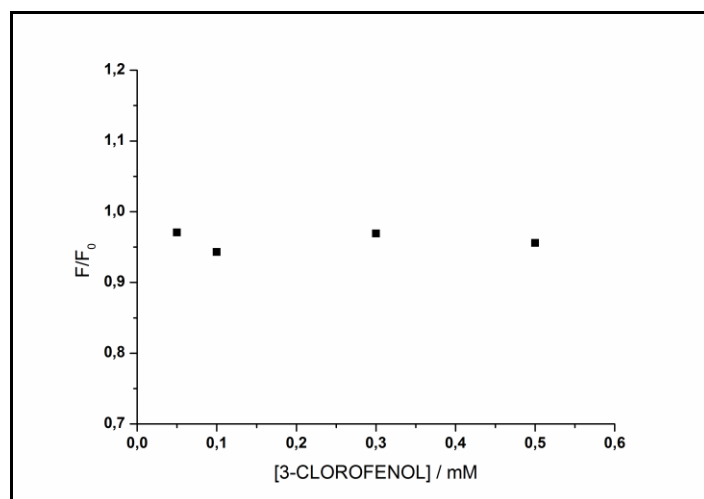
#### 4.3.2.3. Estudio por espectroscopia de fluorescencia de 3-clorofenol en presencia del sistema QUI-HCA[6]S

Luego, se continuó con la medición de los espectros de emisión de F y los resultados obtenidos no resultaron determinantes para obtener información relevante respecto a los efectos que produce el 3-CIPh sobre la emisión fluorescente del complejo QUI-HCA[6]S. Los espectros se procesaron siguiendo la metodología hasta ahora empleada, y se muestran en la Figura 4.7.



**Figura 4.7:** Efecto de 3-CIPh sobre los espectros de emisión de F del sistema QUI-HCA[6]S (26,0  $\mu\text{M}$  – 80,0  $\mu\text{M}$ ) ( $\bullet\bullet$ ); [HCA[6]S] = 80,0  $\mu\text{M}$  (---); [QUI] = 26,0  $\mu\text{M}$  (-.-.-); variando la [3-CIPh] = (0 – 0,5) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$ .  $\lambda_{\text{exc}}$  = 313,0 nm, potencia de detector 800 V y  $b = 1$  cm.

Como puede observarse en los espectros de emisión obtenidos, no se evidenciaron cambios significativos en la señal del complejo QUI-HCA[6]S con el aumento de la concentración de 3-CIPh, sino que podemos concluir que hay una variación dentro del error instrumental en la señal cuya relación ( $F/F_0$ ) media es 0,96. Este efecto se muestra en la Figura 4.8.



**Figura 4.8:** Dependencia de  $F/F_0$  del sistema QUI-HCA[6]S ( $F_0$ ) en presencia de 3-CIPh ( $F$ ). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$  = 313,0 nm; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 800 V;  $b = 1,0$  cm.

Estos resultados no presentaron relevancia e interés analítico, dado que la cantidad de QUI complejada no se vio modificada por la presencia de 3-

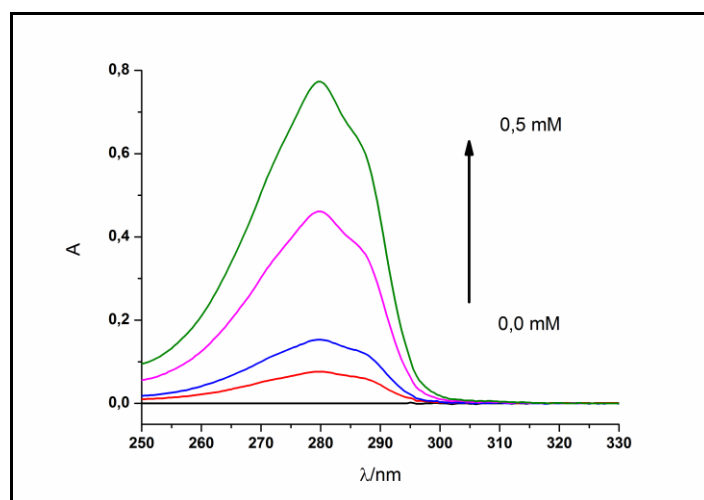


CIPh. Esto podría deberse a la gran selectividad del HCA[6]S por el heterociclo y por lo tanto, este sistema no permitiría el desarrollo de una estrategia analítica para 3-CIPh.

### **4.3.3. Reacción de desplazamiento de QUI por 4-clorofenol del sistema QUI-HCA[6]S**

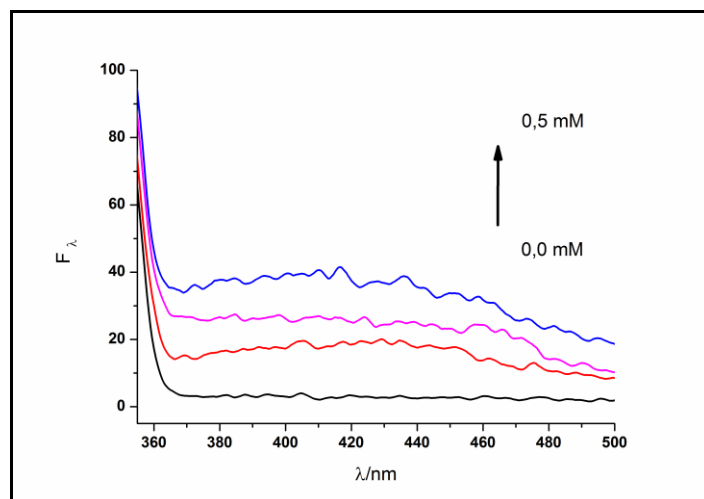
#### *4.3.3.1. Caracterización por espectroscopia UV-visible y de fluorescencia de 4-clorofenol*

Al igual que en el apartado anterior, primero se realizó una caracterización previa del analito desplazante, para lo cual se preparó una solución madre del compuesto y a partir de ella, una serie de soluciones que fueron estudiadas por espectroscopia UV-visible y luego por F. Dichas soluciones se prepararon en el medio de trabajo y en condiciones experimentales similares a la que se llevarían a cabo las reacciones de desplazamiento posteriores. Los resultados permitieron la determinación del coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) del compuesto, siendo de  $(1544 \pm 3) \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 280 nm. En la Figura 4.9 se pueden ver los espectros de absorción obtenidos evidenciando que la absorbancia a la longitud de onda de excitación de la QUI, resulta despreciable ( $\sim 0,002$ ).



**Figura 4.9:** Espectros de absorción de 4-CIPh, variando su concentración en un intervalo de (0 – 0,5) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C y b = 1 cm.

También, se determinaron los espectros de emisión de F de cada solución, los cuales indicaron que no hay una dependencia entre la señal fluorescente y la concentración de 4-clorofenol (4-CIPh), y que además las intensidades de la señal, fueron muy débiles, como se puede ver en la Figura 4.10.



**Figura 4.10:** Espectros de emisión de F de 4-CIPh, cuya concentración varía en un intervalo de (0 – 0,5) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C.  $\lambda_{exc} = 313,0$  nm, potencia de detector 800 V y b = 1 cm.

El análisis de estos resultados obtenidos para 4-CIPh, permitieron evaluar las condiciones experimentales más apropiadas para el diseño de los experimentos en presencia del sistema supramolecular QUI-HCA[6]S.

#### 4.3.3.2. Estudio por espectroscopia UV-visible de 4-clorofenol en presencia del sistema QUI-HCA[6]S

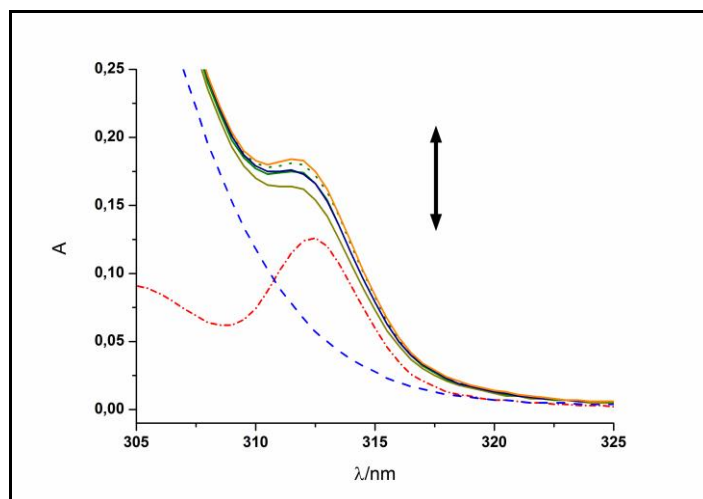
Finalizada la caracterización, se llevaron a cabo los experimentos para las reacciones de desplazamiento de la QUI desde el sistema QUI-HCA[6]S por 4-CIPh. Se midieron las soluciones por espectroscopia UV-visible y de los resultados obtenidos evidenciaron un efecto aleatorio en la señal, es decir que se produce una variación dentro del error instrumental en la señal del complejo QUI-HCA[6]S, con el aumento en la concentración de 4-CIPh. Esto puede verse en la Tabla 4.3, en donde la sumatoria de las absorbancias ( $\Sigma Abs$ ) de los

componentes del sistema en estudio presentan cambios pocos significativos, respecto a la absorbancias de las soluciones mezclas ( $M_n$ ).

**Tabla 4.3:** Valores de absorbancias de soluciones de los compuestos individuales y de mezclas del sistema QUI-HCA[6]S (M) con 4-CIPh ( $M_n$ ). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $CH_3OH$  a 25,0 °C y b = 1 cm.

<i>Solución</i>	<i>Abs</i> ( $\lambda=313,00$ nm)	$\Sigma Abs$	<i>Concentración</i>
<i>HCA[6]S</i>	0,050		80 $\mu M$
<i>QUI</i>	0,120		26 $\mu M$
<i>QUI-HCA[6]S</i>	0,160		
<i>4-CIPh</i>	0,000		50 $\mu M$
<i>4-CIPh</i>	0,002		100 $\mu M$
<i>4-CIPh</i>	0,002		300 $\mu M$
<i>4-CIPh</i>	0,002		500 $\mu M$
<i>4-CIM<sub>1</sub></i>	0,142	0,160	50 $\mu M$ 3-CLPh
<i>4-CIM<sub>2</sub></i>	0,154	0,162	100 $\mu M$ 3-CLPh
<i>4-CIM<sub>3</sub></i>	0,153	0,162	300 $\mu M$ 3-CLPh
<i>4-CIM<sub>4</sub></i>	0,162	0,162	500 $\mu M$ 3-CLPh

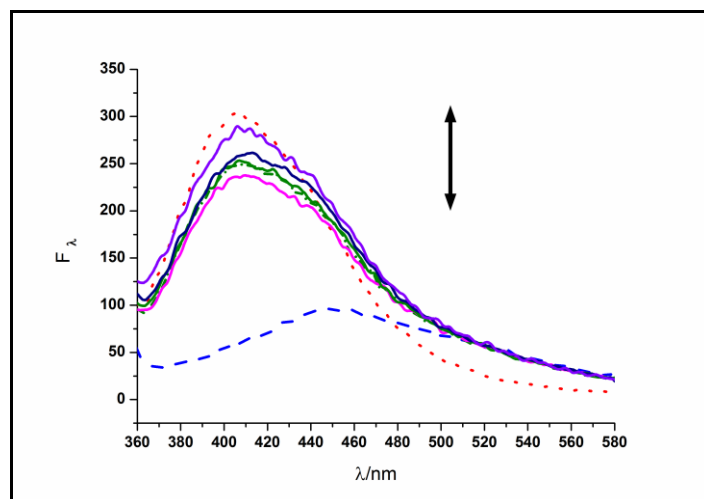
En la Figura 4.11 puede corroborarse el efecto observado en los espectros de absorción obtenidos, y a partir de los cuales, se puede concluir que la señal correspondiente a las soluciones mezclas no siguen una tendencia proporcional a la concentración de 4-CIPh, lo que podría indicar, simplemente, una variación dentro del error instrumental en la señal, respecto al aumento en la concentración de 4-CIPh en las soluciones mezclas.



**Figura 4.11:** Efecto de 4-CIPh sobre los espectros de absorción del sistema QUI-HCA[6]S (26,0  $\mu\text{M}$  – 80,0  $\mu\text{M}$ ) (●●●); [HCA[6]S] = 80,0  $\mu\text{M}$  (---); [QUI] = 26,0  $\mu\text{M}$  (-●-●); variando la [4-CIPh] = (0 – 0,5) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$  y  $b = 1$  cm.

#### 4.3.3.3. Estudio por espectroscopia de fluorescencia de 4-clorofenol en presencia del sistema QUI-HCA[6]S

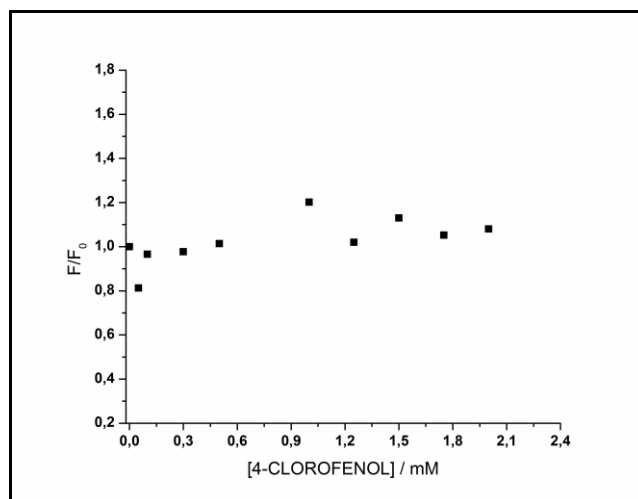
Luego, se continuó con el estudio por *fluorescencia* y los resultados obtenidos nuevamente no resultaron determinantes para obtener información relevante respecto a los efectos que produce el 4-CIPh sobre la emisión fluorescente del complejo QUI-HCA[6]S. Los espectros se procesaron siguiendo la misma metodología, y se muestran en la Figura 4.12, donde se puede observar que la modificación de la señal es aleatoria respecto al aumento de la concentración del 4-CIPh. A bajas concentraciones se observa una pequeña disminución y un efecto opuesto en el punto de mayor concentración del 4-CIPh.



**Figura 4.12:** Efecto de 4-CIPh sobre los espectros de emisión de F del sistema QUI-HCA[6]S (26,0  $\mu\text{M}$  – 80,0  $\mu\text{M}$ ) (•••); [HCA[6]S] = 80,0  $\mu\text{M}$  (---); [QUI] = 26,0  $\mu\text{M}$  (-•-•); variando la [4-CIPh] = (0 – 0,5) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$ .  $\lambda_{\text{exc}} = 313,0$  nm, potencia de detector 800 V y  $b = 1$  cm.

Si bien se observó un cambio poco significativo en la emisión fluorescente del sistema QUI-HCA[6]S, se decidió llevar a cabo una experiencia similar donde la concentración de 4-CIPh fuese mayor a 1 mM, dado que a este nivel de concentración de 4-CIPh, se observó un pequeño incremento de la señal.

De los resultados encontrados, se puede concluir que una concentración mayor de 4-CIPh (hasta 2 mM) no se produjeron cambios relevantes y de gran importancia sobre la emisión fluorescente del complejo QUI-HCA[6]S, como se había encontrado anteriormente. Se muestra a modo de cierre de esta sección, la curva para este sistema (ver Figura 4.13) donde se comprueba la aleatoriedad de la señal del complejo QUI-HCA[6]S, conforme aumenta la concentración 4-CIPh.



**Figura 4.13:** Dependencia de  $F/F_0$  del sistema QUI-HCA[6]S ( $F_0$ ) en presencia de 4-CIPh ( $F$ ). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C;  $\lambda_{\text{EXC}} = 313,0$  nm; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 800 V;  $b = 1,0$  cm.

Estos resultados, al igual que los obtenidos para GLU y 3-CIPh, no presentaron relevancia e interés analítico, dado que no fue posible desplazar la QUI de la cavidad del receptor. Esto muestra una vez más la gran estabilidad del complejo QUI-HCA[6]S y de las intensidad de las interacciones que se ven involucradas en la formación del mismo, como así también de la gran selectividad del HCA[6]S por el heterociclo. De este manera, el sistema QUI-HCA[6]S no representa un potencial sensor químico, dado no permitiría el desarrollo de una estrategia analítica para la detección y cuantificación de estos analitos, al menos por las técnicas estudiadas.

## **4.4. SECCIÓN EXPERIMENTAL**

### *4.4.1. Instrumentos y reactivos*

Los espectros de absorción UV-visible se obtuvieron empleando un espectrofotómetro Shimadzu 1800 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 buffer pH = 6,994. En todos los experimentos se utilizó una celda de cuarzo de  $b = 1$  cm de paso óptico.

Los espectros de emisión de F se registraron con un espectrofluorímetro CARY Eclipse, con anchos de rendija de emisión y de excitación de 10 nm, una velocidad de barrido de 500 nm/min y una potencia del detector especificada en cada caso. La temperatura de las soluciones se mantuvo a 25,0 °C conectando el porta-celda del equipo al accesorio Single Peltier CARY. En todos los experimentos se utilizó una celda de cuarzo de  $b = 1$  cm de paso óptico.

La disolución de las muestras fueron asistidas con un sonicador Arcano modelo PS-10A.

Los datos adquiridos se procesaron empleando el software OriginPro 8.6 2018.

Los compuestos utilizados en esta parte del trabajo fueron: glucosa (98% pureza, marca Cicarelli), el 3-clorofenol (98% pureza, marca Aldrich) y el 4-clorofenol (99% pureza, marca Aldrich). Todos ellos fueron reactivos comerciales de grado analítico y se utilizaron sin previa purificación.

Se prepararon soluciones concentradas de los reactivos, pesando la cantidad adecuada según se detalla a continuación, en un volumen final de 10,0 mL: glucosa (25,0 mg), el 3-clorofenol (8,0 mg) y el 4-clorofenol (10,0 mg). En todos los casos, la solución fue asistida con un minuto de sonicado. Dichas soluciones fueron guardadas en la heladera, resguardadas de la luz con papel aluminio y recubiertas con parafilm. Fueron chequeadas periódicamente por espectroscopia UV-visible y permanecieron estables por más de 20 días.

A partir de las soluciones madres, se prepararon una serie de soluciones que permitieron hacer una caracterización de cada compuesto tanto por espectroscopia UV-visible como de F. Para las medidas de absorbancia se trabajó con concentraciones de forma tal de tener valores entre 0,03 – 0,8 unidades de absorbancia. Por su parte, para las mediciones de fluorescencia, se prepararon soluciones de concentración entre 50,0 y 500,0  $\mu\text{M}$ .

Las medidas de absorbancia permitieron determinar los coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) para cada compuesto. Las longitudes de onda de excitación se eligieron a partir de los máximos en los espectros de absorción,

según correspondiera para cada compuesto. En todos los casos se registraron los espectros de excitación, en el intervalo de 200 a 300 nm. Con toda esta información, fue posible determinar los mejores parámetros experimentales, para obtener los correspondientes espectros de emisión.

Los solventes empleados fueron: agua deionizada calidad Milli-Q obtenida de un purificador Millipore (resistividad, 25°C: 18MΩ cm) y metanol (CH<sub>3</sub>OH) grado HPLC Sintorgan.

Las mediciones de pH se realizaron con un pH-metro Thermo Orion modelo 520A 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 soluciones buffer estándar preparadas de pH = 4,008 (con 0,05 M de ftalato ácido de potasio marca J.T.Baker), de pH = 6,994 (con 0,02 M de fosfato dihidrógeno de sodio marca J.T.Baker, 0,03 M de fosfato monohidrógeno de disodio marca AppliChem y 0,02 M de cloruro de sodio marca Taurus) y de pH = 9,155 (con 0,01 M de borato de sodio marca J.T.Baker y 0,02 M de cloruro de sodio marca Taurus).<sup>38</sup> Se prepararon según el procedimiento descrito, empleando reactivos de grado analítico.<sup>39</sup> Las soluciones buffer se controlaron por medición experimental. La precisión del pH-metro fue 0,001 y la exactitud asociada a las lecturas fue ± 0,005.

Las soluciones estudiadas fueron preparadas en medio acuoso bufferizado, utilizando un 95% v/v de buffer pH = 6,994 y empleando como co-solvente un 2 % de metanol (CH<sub>3</sub>OH) y completando el porcentaje restando con agua calidad Milli-Q.



## 4.5. CONCLUSIONES PARCIALES

---

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que, para los analitos no fluorescentes estudiados, el sistema QUI-HCA[6]S propuesto como sensor químico no evidenció cambio significativo, dado que tanto por espectroscopia UV-visible y fluorescencia, los efectos observados no permiten inferir conclusiones acerca de las posibles interacciones entre el sensor y los analitos estudiados.

La baja afinidad de la glucosa y de ambos clorofenoles por la cavidad de HCA[6]S, puede deberse a que en las condiciones experimentales utilizadas, predominaran interacciones intermoleculares que no fueron suficientes para compensar aquellas de naturaleza fundamentalmente electrostáticas, que caracterizan la formación del complejo propuesto como sensor. Por lo tanto, la proporción de QUI libre no se ve modificada y por ende la respuesta fluorescente no se ve afectada.

## 4.6. BIBLIOGRAFÍA

---

- 1 J. Steed and J. Atwood, *Supramolecular chemistry*, Wiley, 2006, Second edition.
- 2 J. M. Lehn, *Perspectives in Supramolecular Chemistry From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self Organization*, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, 1990, **29**, 1304–1319.
- 3 E. V. Anslyn, *Supramolecular analytical chemistry*, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 687–699.

- 4 M. E. Carranza, H. M. Elero and A. V. Veglia, Aqueous on / off fluorescent switches based on systems of quinoline / quinoline-macrocycle, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 2020, **390**, 112253–112259.
- 5 B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2001, vol. 53.
- 6 A. Marella, O. P. Tanwar, R. Saha, M. R. Ali, S. Srivastava, M. Akhter, M. Shaquiquzzaman and M. M. Alam, Quinoline: A versatile heterocyclic, *Saudi Pharm. J.*, 2013, **21**, 1–12.
- 7 N. Li, X. Ma, Q. Zha and C. Song, Analysis and comparison of nitrogen compounds in different liquid hydrocarbon streams derived from petroleum and coal, *Energy and Fuels*, 2010, **24**, 5539–5547.
- 8 N. L. Pacioni, V. N. Sueldo Ocelllo, M. Lazzarotto and A. V. Veglia, Spectrofluorimetric determination of benzoimidazolic pesticides: Effect of p-sulfonatocalix[6]arene and cyclodextrins, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **624**, 133–140.
- 9 N. L. Pacioni and A. V. Veglia, Determination of poorly fluorescent carbamate pesticides in water, bendiocarb and promecarb, using cyclodextrin nanocavities and related media, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **583**, 63–71.
- 10 M. Megyesi and L. Biczók, Considerable fluorescence enhancement upon supramolecular complex formation between berberine and p-sulfonated calixarenes, *Chem. Phys. Lett.*, 2006, **424**, 71–76.
- 11 L. R. Naik, H. M. Suresh Kumar, S. R. Inamdar and N. N. Math, Steady-state and time-resolved emission studies of 6-methoxy quinoline, *Spectrosc. Lett.*, 2005, **38**, 645–659.
- 12 L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman and P. V. Minorsky, *Campbell Biology*, Pearson, Edición 11., 2016.
- 13 M. Castrejón, V. Carbó, R. Martínez, Mecanismos moleculares que

- intervienen en el transporte de la glucosa, *Rev. Educ. Bioquímica. Univ. Nac. Autónoma México*, 2007, **26**, 49–57.
- 14 I. Valverde, J. Cancelas and M. L. Villanueva-Peñacarrillo, El GLP-1: Acción biológica y posibles efectos terapéuticos, *Endocrinol. y Nutr.*, 2006, **53**, 256–262.
  - 15 J. Pérez-Guisado, Hidratos de carbono, metabolismo de la glucosa y cáncer, *Endocrinol. y Nutr.*, 2006, **53**, 252–255.
  - 16 M. C. Urrejola, L. V Soto, C. C. Zumarán, J. P. Peñaloza, B. Álvarez, I. Fuentesvilla and Z. S. Haidar, Sistemas de Nanopartículas Poliméricas I: de Biodetección y Monitoreo de Glucosa en Diabetes a Bioimagen, Nano-Oncología, Terapia Génica, Ingeniería de Tejidos/Regeneración a Nano-Odontología, *Int. J. Morphol.*, 2018, **36**, 1490–1499.
  - 17 M. Clemente León, L. Bilbao Gassó, A. Moreno-Galdó, A. Campos Martorell, S. Gartner Tizzano, D. Yeste Fernández and A. Carrascosa Lezcano, Oral glucose tolerance test and continuous glucose monitoring to assess diabetes development in cystic fibrosis patients, *Endocrinol. Diabetes y Nutr.*, 2018, **65**, 45–51.
  - 18 S. Liu, W. Zeng and Y. Li, Synthesis of ZnCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> microrods grown on nickel foam for non-enzymatic glucose sensing, *Mater. Lett.*, 2020, **259**, 126820.
  - 19 W. da Silva, M. E. Ghica and C. M. A. Brett, Biotoxic trace metal ion detection by enzymatic inhibition of a glucose biosensor based on a poly(brilliant green)–deep eutectic solvent/carbon nanotube modified electrode, *Talanta*, 2020, **208**, 120427.
  - 20 Y. X. Wen, S. G. Liu, B. X. Tao, H. Q. Luo and N. B. Li, A signal-off photocathode biosensor based on a novel metal-organic polymer for the detection of glucose, *Sensors Actuators, B Chem.*, 2020, **304**, 127279.
  - 21 Y. Zhang, N. Li, Y. Xiang, D. Wang, P. Zhang, Y. Wang, S. Lu, R. Xu and J. Zhao, A flexible non-enzymatic glucose sensor based on copper

- nanoparticles anchored on laser-induced graphene, *Carbon N. Y.*, 2020, **156**, 506–513.
- 22 F. Zhou, W. Jing, S. Liu, Q. Mao, Y. Xu, F. Han, Z. Wei and Z. Jiang, Electrodeposition of gold nanoparticles on ZnO nanorods for improved performance of enzymatic glucose sensors, *Mater. Sci. Semicond. Process.*, 2020, **105**, 104708.
- 23 S. H. Baek, J. Roh, C. Y. Park, M. W. Kim, R. Shi, S. K. Kailasa and T. J. Park, Cu-nanoflower decorated gold nanoparticles-graphene oxide nanofiber as electrochemical biosensor for glucose detection, *Mater. Sci. Eng. C*, 2020, **107**, 110273.
- 24 B. Liu and Z. Li, Electrochemical treating of a smooth Cu-Ni-Zn surface into layered micro-chips of rice grain-like Cu/Ni(OH)<sub>2</sub> nanocomposites as a highly sensitive enzyme-free glucose sensor, *J. Electroanal. Chem.*, 2019, **855**, 113493.
- 25 B. S. Kumar, V. C. Gudla, R. Ambat, S. K. Kalpathy and S. Anandhan, Graphene nanoclusters embedded nickel cobaltite nanofibers as multifunctional electrocatalyst for glucose sensing and water-splitting applications, *Ceram. Int.*, 2019, **45**, 25078–25091.
- 26 H. Celik Kazici and M. Yayla, An electrocatalyst for detection of glucose in human blood: synergy in Pd–AuNPs/GOx/C surfaces, *Chem. Eng. Commun.*, 2019, **206**, 1731–1742.
- 27 Q. Guo, W. Zeng and Y. Li, Highly sensitive non-enzymatic glucose sensor based on porous NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanowires grown on nickel foam, *Mater. Lett.*, 2019, **256**, 126603.
- 28 A. Barrena Medina, Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 2013, *D. Of. la Unión Eur.*, 2013, **2013**, 22–23.
- 29 R. Kahrs, Principios generales de la desinfección, *Organ. Mund. Sanid. Anim.*, 2008, **14**, 143–163.

- 30 Y. Ku, Y. C. Lee and W. Y. Wang, Photocatalytic decomposition of 2-chlorophenol in aqueous solution by UV/TiO<sub>2</sub> process with applied external bias voltage, *J. Hazard. Mater.*, 2006, **138**, 350–356.
- 31 M. Z. Khan, P. K. Mondal, S. Sabir and V. Tare, Degradation pathway, toxicity and kinetics of 2,4,6-trichlorophenol with different co-substrate by aerobic granules in SBR, *Bioresour. Technol.*, 2011, **102**, 7016–7021.
- 32 A. O. Olaniran and E. O. Igbinsosa, Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: Properties, distribution and microbial degradation processes, *Chemosphere*, 2011, **83**, 1297–1306.
- 33 M. Á. Arellano-González, I. González and A. C. Texier, Mineralization of 2-chlorophenol by sequential electrochemical reductive dechlorination and biological processes, *J. Hazard. Mater.*, 2016, **314**, 181–187.
- 34 R. H. AL-Ammari, A. A. Ganash and M. A. Salam, Electrochemical molecularly imprinted polymer based on zinc oxide/graphene/poly(o-phenylenediamine) for 4-chlorophenol detection, *Synth. Met.*, 2019, **254**, 141–152.
- 35 Y. Xie, X. Tu, X. Ma, M. Xiao, G. Liu, F. Qu, R. Dai, L. Lu and W. Wang, In-situ synthesis of hierarchically porous polypyrrole@ZIF-8/graphene aerogels for enhanced electrochemical sensing of 2, 2-methylenebis (4-chlorophenol), *Electrochim. Acta*, 2019, **311**, 114–122.
- 36 C. Casimero, T. Bigham, R. J. McGlynn, J. S. G. Dooley, N. G. Ternan, W. J. Snelling, M. E. Critchley, C. L. Zinkel, R. B. Smith, L. P. Sabogal-Paz and J. Davis, Electroanalytical properties of chlorophenol red at disposable carbon electrodes: Implications for Escherichia coli detection, *Bioelectrochemistry*, 2019, **130**, 107321.
- 37 Q. Wang, L. Yao, L. Hao, Y. Li, C. Wang, Q. Wu and Z. Wang, Ferrocene-based nanoporous organic polymer as solid-phase extraction sorbent for the extraction of chlorophenols from tap water, tea drink and peach juice samples, *Food Chem.*, 2019, **297**, 124962.

- 38 C. R. N. Strauts, J. H. Gilfillan and H. N. Wilson, *Analytical Chemistry-The Working Tools*, *Oxford Univ. Press*, 1958, **Volumen I**, 228.
- 39 W. Hayes, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, *CRC Press*, 2014, **95<sup>TH</sup> edit**, 8–34 y 8–36.

---

## DETERMINACIÓN ANALÍTICA FLUORESCENTE INDIRECTA DE GLIFOSATO

---

### 5.1. INTRODUCCIÓN

---

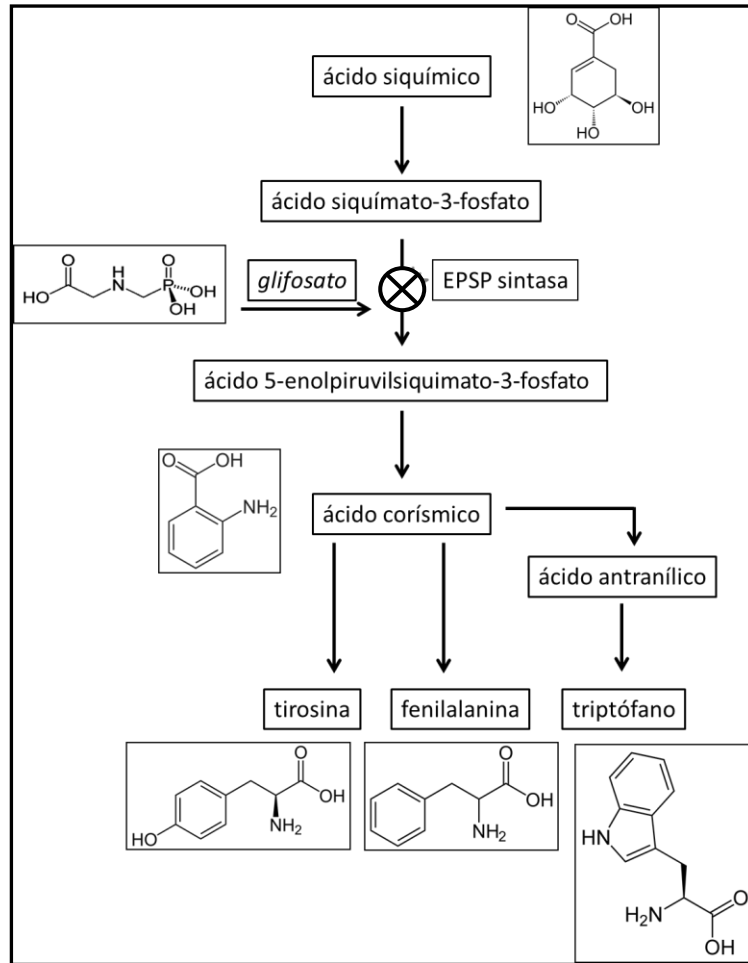
La interacción huésped-receptor requiere, además de la complementariedad química entre los sitios de unión, que el tamaño y forma del espacio receptor sean compatibles con las dimensiones de la molécula huésped,<sup>1</sup> tal como ocurre entre la especie ácida del p-sulfonatocalix[6]areno (HCA[6]S) y la quinolina (QUI), como se ha indicado en el capítulo 4. En estudios previos, se encontró que los cambios espectroscópicos producidos sobre la emisión fluorescente de la QUI en presencia de HCA[6]S se debieron a un efecto macrocíclico y no a un efecto del medio por una alta concentración del receptor. Esta complejación se evidenció mediante un mecanismo de quenching que transcurre vía un complejo no fluorescente entre QUI en el estado basal y el receptor calixareno.<sup>2</sup> Con estas evidencias, el sistema supramolecular no permitiría la determinación directa del fluoróforo, y por tanto se propuso emplearlo como un sensor químico supramolecular para analitos no fluorescentes. Específicamente, se propuso el estudio de este sistema, para el desarrollo de una metodología fluorimétrica indirecta para glifosato por desplazamiento de la QUI de la cavidad del HCA[6]S. Es en este punto, donde

se debe hacer hincapié, dado que el glifosato no presenta absorbancia ni fluorescencia nativa, por lo tanto desarrollar una metodología fluorescente indirecta, resulta importante, novedosa e interesante.

### *5.1.1. Características y propiedades de glifosato*

El glifosato (GLI) (N-fosfonometilglicina,  $C_3H_8NO_5P$ , CAS 1071-83-6)<sup>3</sup> es un herbicida de amplio espectro, desarrollado para eliminación de hierbas y de arbustos, en especial los perennes. Desde un punto de vista químico, el GLI es un derivado de la glicina, el aminoácido más pequeño hallado en las proteínas. En la molécula de GLI, uno de los átomos de hidrógeno de la glicina está reemplazado por un grupo fosfonometil. Una vez absorbido por la planta, el GLI se une a la enzima enolpiruvilsiquimato-3-fosfosintasa (EPSPS, por sus siglas en inglés), y la bloquea.<sup>4</sup> La enzima EPSPS se encuentra al principio de la vía metabólica del ácido siquímico, que convierte a los precursores carbohidratos simples derivados de la glucólisis y la vía de la pentosa fosfato en aminoácidos aromáticos y otros metabolitos importantes en la planta. La enzima normalmente se encuentra dentro de los cloroplastos, donde cataliza la reacción de siquimato-3-fosfato (S3P) y fosfoenolpiruvato para formar 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (ESP).<sup>4</sup> ESP es un precursor de aminoácidos aromáticos y, en última instancia, de proteínas, hormonas, vitaminas y otros metabolitos esenciales de las plantas. Las similitudes estructurales con el fosfoenolpiruvato permiten al GLI unirse al sitio de unión del sustrato de EPSPS para inhibir su actividad y bloquear su integración al cloroplasto. Por lo tanto, el GLI mata las plantas interfiriendo con la síntesis de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano.<sup>4</sup> (ver Esquema 5.1)





**Esquema 5.1:** Mecanismo de acción del glifosato en plantas

Aunque el crecimiento se detiene a las pocas horas de la aplicación, las hojas tardan días en volverse amarillas.<sup>4</sup> La EPSPS sólo es sintetizada por plantas y algunos microbios, pero no por mamíferos, por lo que este mecanismo de acción no les afecta.<sup>5</sup> Dado que el sitio activo de la enzima EPSPS es muy constante en las plantas superiores, el GLI afecta un amplio espectro de malezas indiscriminadamente. Si bien el GLI es una molécula pequeña y simple, su solubilidad en agua es demasiado baja para permitir su fácil pulverización en los campos. En consecuencia, las formulaciones de GLI más comunes para fines comerciales lo combinan con otras sustancias para mejorar su eficiencia. Muchos productos comerciales de protección de plantas, el GLI se formula como una sal para mejorar su solubilidad en agua. Este es absorbido por las hojas y no por las raíces. Se puede aplicar a las hojas, inyectarse a troncos y tallos, o pulverizarse a tocones como herbicida forestal.

La aplicación de GLI elimina las plantas debido a que suprime su capacidad de generar aminoácidos aromáticos. El GLI es el principio activo del herbicida Roundup<sup>6</sup> (nombre comercial producido por Monsanto). Es el herbicida más usado en EE.UU. usándose, 2.000-4.000 toneladas/año en céspedes, y 40.000-50.000 toneladas /año en su agricultura.<sup>7</sup>

El uso del herbicida es objeto de controversia desde el punto de vista toxicológico y ambiental. En sistemas agrícolas donde el GLI es regularmente aplicado, la deriva y los residuos que quedan pueden causar daños a las plantas no objetivo. Cantidades significativas de GLI aplicado a plantas no objetivo llegan al suelo como resultado del contacto directo, del lavado desde las hojas y de la exudación de las raíces de las malezas tratadas.<sup>8</sup> Alrededor del 10 % del GLI aplicado puede llegar a las plantas no objetivo. La vida media del GLI en el suelo es muy larga, desde semanas a años. La mayoría de los residuos del GLI (90 %) se encuentran en los primeros 15 cm del suelo, y estos residuos representan una amenaza importante para la actividad microbiológica del suelo y la absorción por parte de las raíces de las plantas no objetivo.<sup>9</sup> Recientemente, se observó que la deriva de un 12 % de las dosis comúnmente aplicadas de GLI afectaron el crecimiento de los tallos y la actividad de los nódulos (fijación del nitrógeno) en plantas de soja resistentes a GLI, especialmente durante los estadios de crecimiento vegetativo.<sup>10,11,12</sup>

Existe evidencia actual que demuestra que el GLI compite con los nutrientes por los sitios de intercambio en las partículas de los suelos. Los cationes del suelo son complejados con las partículas de GLI formando complejos insolubles que disminuyen la disponibilidad para las plantas.<sup>13</sup> En consecuencia se han observado disminuciones en los rendimientos de los cultivos en situaciones controladas. Los resultados de estas investigaciones sugieren que los residuos del GLI o su difusión al medio ambiente puede resultar en severas deficiencias de nutrientes para las plantas que no son el objetivo de este herbicida.<sup>14</sup>

Las normativas sanitarias, en conformidad con la Ley de Inocuidad de los Alimentos y reguladas por la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), y en Sanidad Agraria, por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria

(SENASA), establecen los límites máximos de residuos (LMR) de este herbicida permitidos en Argentina. A modo de ejemplo, algunos valores que es interesante recalcar son los LMR para uva, naranja o mandarina de 0,2 ppm ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ). Para algunos cereales por ejemplo maíz (1,0 ppm como forraje), soja (20,0 ppm como forraje), trigo (5,0 ppm grano consumo).<sup>15</sup>

Dadas las controversias y las discusiones en torno al uso, muchas veces desmedido de este herbicida, resulta importante el desarrollo de metodologías que permitan el control, chequeo y la determinación del mismo. Se han desarrollado numerosos procedimientos analíticos para la detección y cuantificación de este analito.<sup>16,17,18,19</sup> La mayoría de los métodos reportados son complicados, con una preparación de la muestra larga y compleja y con equipamientos muy costosos.<sup>20,21,22</sup> Uno de los métodos más utilizados en aguas naturales, suelos, frutos, etc. es el análisis por CLAR acoplado a diversos sistemas de detección siendo el detector masas/masas el más empleado.<sup>23,24</sup> Para mejorar el comportamiento cromatográfico del analito y debido a la ausencia de grupos cromóforos o fluoróforos, en todos estos casos es necesaria una derivatización previa.<sup>25,26,27</sup>

Se ha determinado GLI en maíz y arroz utilizando cromatografía líquida (CL) acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo.<sup>28</sup> Las recuperaciones medias para ambas matrices estuvieron dentro del 70-105 % en tres niveles de fortificación, incluido el LOQ. EL LOD fue  $0,002 \text{ mg kg}^{-1}$  para arroz y  $0,004 \text{ mg kg}^{-1}$  para maíz.<sup>28</sup> El LOQ fue de  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  tanto para el maíz como para el arroz. Debido a su versatilidad, la propuesta de este método podría considerarse útil para la determinación, en análisis de rutina, de glifosato en cereales. Entre otros ejemplos, encontrados en literatura, se pueden mencionar técnicas cromatográficas, como ser la extracción de pesticidas polares modificados con detección por cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada con espectrometría de masas en tándem (CLUR-MS/MS)<sup>29</sup>, con LOD de  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$  para glifosato y  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  para su metabolito mayoritario, el ácido aminometilfosfónico (AMPA). También, se ha determinado GLI en extractos de colza mediante cromatografía líquida con detección de triple cuadrupolo MS (CL-MS/MS) y por cromatografía líquida con

derivatización de post-columna y detección de fluorescencia (CL-DF).<sup>30</sup> Los LOD informados fueron de  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  por CL-MS/MS y  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$  por CL-DF. Ambos métodos son simples y eficientes para el análisis de rutina de glifosato y AMPA y se validó en una matriz grasa.<sup>30</sup>

La CL-MS/MS es una técnica muy poderosa y se muestra como la más atractiva actualmente para el análisis de residuos de este compuesto. Si bien tiene excelentes características analíticas, los métodos basados en CL-MS/MS requieren normalmente una etapa de derivatización previa, con el fin de mejorar la separación cromatográfica y facilitar la retención de GLI y de AMPA en el proceso de pre-concentración (ejemplo, SPE en análisis de aguas).<sup>31</sup> Así, en un estudio realizado sobre 50 muestras de aguas subterráneas y superficiales de entornos con fuerte actividad agrícola, se detectó GLI en el 25 % de las muestras analizadas, en concentraciones que variaron entre  $0,06$  y  $0,48 \mu\text{g L}^{-1}$ , mientras que el AMPA se detectó en el 40 % de las muestras, con niveles entre  $0,05$  y  $0,18 \mu\text{g L}^{-1}$ . La frecuente detección de AMPA, tanto en aguas como en suelos, es indicativa de la degradación del GLI en el medio ambiente.<sup>32</sup>

En otro estudio, se monitorearon tres campos del centro del país con dos y tres aplicaciones de GLI en distintas concentraciones obteniéndose residuos entre  $(0,3 - 4,0) \text{ mg kg}^{-1}$  para GLI y  $(0,2 - 0,9) \text{ mg kg}^{-1}$  de AMPA en plantas y granos de soja.<sup>33</sup> Estos resultados indican una detección de residuos de GLI en todo el ciclo de cultivo, y se demostró el efecto residual del mismo. Las concentraciones fueron mayores cuando se pulverizó el herbicida cerca de la cosecha y no se encontraron relaciones con respecto a las dosis de aplicación.

Por otro lado, si bien se conoce que los mamíferos no bioacumulan el GLI y se excreta rápidamente,<sup>34</sup> se han reportado niveles insignificantes de GLI en la carne, la leche y los huevos de bovinos, cerdos y aves de corral.<sup>34</sup> Otros estudios detectaron niveles traza de AMPA en muestras de orina,<sup>35</sup> cereales<sup>36</sup> y también leche humana y bovina.<sup>37,38,39</sup>

Por último, se ha informado la interacción entre un hexaazamacrociclo que exhibe una conformación con anillos de fenilo casi paralelos,<sup>40</sup> lo que

sugiere que la conformación adoptada se estabiliza mediante interacciones  $\pi - \pi$ , y se pudo determinar una constante de asociación con GLI ( $307 \text{ M}^{-1}$  medida en metanol a  $20,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ) proponiendo la formación de un complejo ternario en presencia de  $\text{Cu}^{+1}$ .<sup>40</sup> También, se han estudiado las interacciones de GLI con agua<sup>41</sup> por medio de ultrasonido, evaluando cambios en la viscosidad y densidad del medio. Con estos antecedentes, resulta interesante evaluar la selectividad y la capacidad de reconocimiento molecular de HAC[6]S por el GLI, empleando al sistema supramolecular QUI-HCA[6]S, como un sensor químico fluorescente.

### 5.1.2. Validación de un método analítico

Se conoce como *validación* al análisis que demuestra que un método analítico desarrollado es capaz de proveer suficiente especificidad, exactitud y precisión en la determinación de un analito en una dada muestra real. Este análisis proporciona evidencia básica para fundamentar la validez de los resultados obtenidos por el método propuesto.<sup>42</sup>

La validación de un método analítico es necesaria para respaldar la acreditación o publicación del mismo, o defender resultados generados por su uso. Las capacidades para detectar y cuantificar un analito son consideradas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, más conocida por sus siglas en inglés IUPAC, y la “*International Organization for Standardization*” (ISO), ponen especial énfasis en los acuerdos internacionales sobre los requisitos de evaluación, particularmente sobre los estándares internacionales como parámetros de comparación.<sup>42,43</sup>

#### 5.1.2.1. Parámetros de validación

Los parámetros o propiedades analíticas que se deben evaluar para validar un método desarrollado son los siguientes:

- ✓ **Linealidad.** Aquel intervalo de concentraciones del analito donde la respuesta analítica se correlacione linealmente. En general, se aconseja para el trabajo cuantitativo el empleo del intervalo lineal.

- ✓ **Especificidad.** Se debe corroborar que la respuesta analítica debe ser atribuible al analito.<sup>42</sup>
- ✓ **Selectividad.** Establece en qué medida la señal correspondiente al analito de interés es afectada por la presencia de otras especies en la muestra.<sup>44</sup>
- ✓ **Precisión.** Indica cuan cercanos son entre sí los valores obtenidos tras mediciones repetidas. Un indicador de la dispersión de los datos es la desviación estándar de la muestra (**S**).
- ✓ **Sensibilidad.** Es el cambio en la respuesta analítica inducida por un cambio en la concentración del analito en estudio. La sensibilidad de calibración de una técnica se define como la pendiente de la recta de calibrado.<sup>43,45</sup>
- ✓ **Límite de Detección (LOD).** Se puede definir como límite de detección de un analito a aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (*y*) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”.<sup>43,45</sup>
- ✓ **Límite de Cuantificación (LOQ).** Es considerado como la mínima cantidad de analito cuantificable por un dado método.<sup>43</sup>
- ✓ **Robustez.** Evalúa la insensibilidad del método a pequeñas variaciones en las condiciones y en el equipamiento (sustitución de alguna pieza), ambiental (temperatura, humedad), procesos de deterioro (columna CG CLAR, reactivos), y composición de la muestra. La robustez del método proporciona un indicio de su fiabilidad durante el uso normal.<sup>42</sup>
- ✓ **Exactitud.** Describe el grado de concordancia (sesgo) entre el valor verdadero y el determinado por la aplicación del método analítico.<sup>43</sup>

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

#### *Límites de Detección y de Cuantificación*

La definición moderna del límite de detección (*LOD*), que representa la mínima concentración detectable por el método analítico, se expresa mediante la ecuación 5.01.

$$LOD = \frac{3,29 \cdot \sigma_b}{A} \quad (5.01)$$

donde  $\sigma_b$  es la desviación estándar poblacional de los blancos y  $A$  la sensibilidad de calibración.<sup>45</sup> En la práctica, se estima  $\sigma_b$  como la desviación estándar de una muestra de blancos  $S_b$  obtenida mediante la medición de un conjunto de blancos químicos preparados independientemente ( $\geq 20$ ).<sup>45</sup> Por lo que la ecuación 5.01 puede escribirse reemplazando  $\sigma_b$  por  $S_b$ .

El *LOD* se puede estimar en función de la desviación estándar de la concentración predicha para una muestra problema cualquiera ( $\hat{S}_b$ ). Para calcular  $\hat{S}_b$  se recurre a la ecuación 5.02.

$$\hat{S}_b = \frac{s_{y/x}}{A} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(\hat{x} - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2}} \quad (5.02)$$

donde  $s_{y/x}$  es la desviación estándar de los residuales de la regresión (dados por la ecuación 5.03),  $A$  es la pendiente de la recta de regresión,  $n$  es el número de réplicas de la muestra incógnita,  $m$  es el número total de patrones

de calibrado,  $X_i$  es la concentración de cada uno de los  $m$  patrones de calibrado,  $\bar{X}$  es el promedio de las concentraciones de calibrado.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (5.03)$$

y por lo tanto el  $LOD$  queda definido por la ecuación 5.04.

$$LOD = 3,29 \cdot \hat{S}_b \quad (5.04)$$

De esta forma el cálculo de  $\hat{S}_b$  permite conseguir una estimación del  $LOD$  para cuando se tiene un número bajo de muestras replicadas. Por esto, los valores de  $LOD$  determinados son superiores a los obtenidos mediante la ecuación 5.01 con lo cual se requiere la obtención experimental de  $S_b$ . Es importante informar el valor de  $n$  que se utiliza en el cálculo de  $\hat{S}_b$  y por lo tanto del  $LOD$ .

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

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma_b}{A} \quad (5.05)$$

Esta ecuación al igual que la ecuación 5.01 puede escribirse reemplazando  $\sigma_b$  por  $S_b$  considerando una *muestra* de por lo menos 25 blancos químicos.<sup>45</sup>

### *Selectividad e Interferencia*

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



Teniendo en cuenta esta definición, en este capítulo se consideraron como concentraciones tolerables de interferentes, aquellos niveles de concentración que no modifiquen en más de 10 % el valor de la señal analítica.

### *Exactitud*

Cuando se aplica un método analítico es necesario saber cuánto se aproxima la determinación de la concentración al verdadero valor. Esto se expresa como la exactitud del método. La misma ISO definen la exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de la aplicación de un método analítico y el valor de referencia aceptado del analito.<sup>43,45</sup>

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

- ✓ Ensayos de *recuperación* sobre matrices o muestras reales.
- ✓ Comparación de los resultados del método propuesto con un método de referencia.
- ✓ Uso de materiales certificados.

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

### *Ensayos de Recuperación*

Se entiende por recuperación,  $R$ , a la eficiencia del método analítico para recuperar y medir el analito adicionado en una matriz real.<sup>44</sup>

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

y, en consecuencia, aumenta proporcionalmente con la concentración del analito.<sup>43</sup>

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

$$R = \frac{Q^M}{Q^R} \quad (5.06)$$

Se distingue también la recuperación aparente,  $R_A$ , definida como el cociente entre la cantidad de analito determinada a partir de la curva de calibración del método propuesto ( $x^M$ ) y el valor de referencia ( $x^R$ ) como se expresa en la ecuación 5.07. El valor  $x^R$  es la cantidad de analito adicionada a la muestra antes del proceso de medición.<sup>43</sup>

$$R_A = \frac{x^M}{x^R} \quad (5.07)$$

Para los distintos *niveles de fortificado* se obtienen los correspondientes valores de  $R_A$  y a partir de estos se puede obtener el promedio de las recuperaciones aparentes,  $\overline{R_A}$ , definido por la ecuación 5.08 siguiente

$$\overline{R_A} = \frac{\sum_i^n R_A^i}{n} \quad (5.08)$$

Para examinar la exactitud del método, se evalúa si el valor de  $\overline{R_A}$  es significativamente diferente al 100,0 % de recuperación mediante una prueba de significación  $t$  bilateral a un dado *nivel de significación* planteando como hipótesis nula  $H_0$ : %  $\overline{R_A} = 100,0$  %. El valor del estadístico  $t$  se calcula mediante la ecuación 5.09 siguiente

$$t = \frac{\sqrt{n}(\overline{R}_A - 100)}{s} \quad (5.09)$$

donde  $n$  representa el número de ensayos de recuperación considerados para evaluar  $\overline{R}_A$  y  $s$ , la *desviación estándar muestral*.

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

## **5.2. OBJETIVOS**

---

En este capítulo del trabajo de tesis, se propuso evaluar al complejo quinolina-calix[6]areno (QUI-HCA[6]S) como un sensor químico supramolecular para glifosato (GLI) y desarrollar de esta manera una metodología analítica fluorimétrica indirecta.

Específicamente, se propuso realizar la validación de un método, y por tanto el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado.

## **5.3 RESULTADOS y DISCUSIÓN**

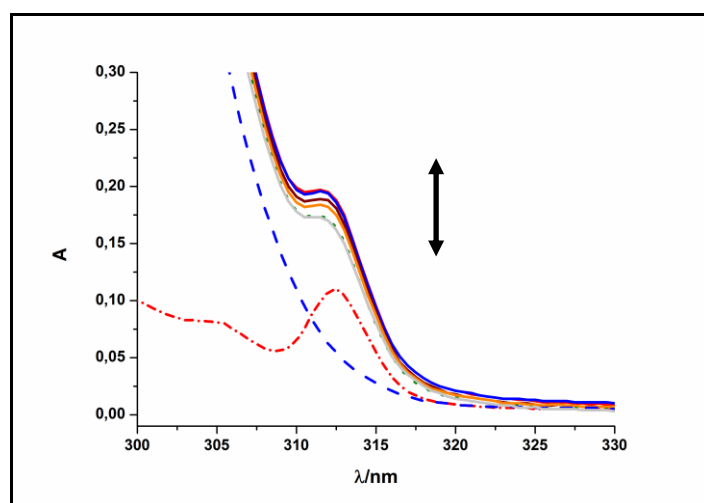
---

### **5.3.1. Efecto de glifosato sobre el sistema QUI-HCA[6]S**

En una primera etapa, se prepararon las soluciones de QUI y HCA[6]S, determinando sus concentraciones por medio de espectroscopia UV-visible

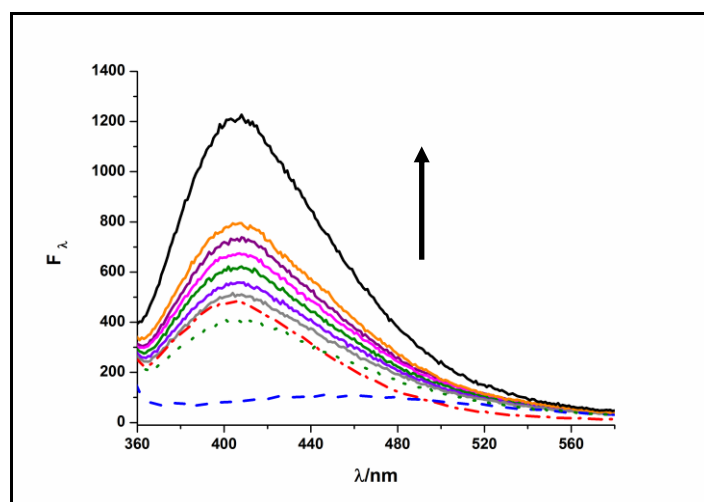
teniendo en cuenta los valores de absortividad molar ( $\epsilon$ )<sup>46</sup> determinados previamente en el grupo de trabajo para cada especie, y luego se prepararon las soluciones mezclas con GLI, según corresponda.

De los resultados obtenidos por espectroscopia UV-visible se observó que un aumento en la concentración de GLI en el intervalo de (0 – 7) mM, no produce un cambio significativo en la señal del complejo QUI-HCA[6]S y que además, el efecto resultó aleatorio, como se muestra en los espectros de la Figura 5.1.



**Figura 5.1:** Efecto de GLI sobre los espectros de absorción del sistema QUI-HCA[6]S (26,0  $\mu\text{M}$  – 80,0  $\mu\text{M}$ ) (•••); [HCA[6]S] = 80,0  $\mu\text{M}$  (---); [QUI] = 26,0  $\mu\text{M}$  (-••); variando la [GLI] = (0 – 7) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$  y  $b = 1$  cm.

Por otro lado, en el estudio por F se encontró que existe una dependencia entre la señal analítica y el aumento de la concentración de GLI sobre el sistema QUI-HCA[6]S. Por un lado, se analizaron soluciones de GLI en ausencia del sistema QUI-HCA[6]S y de los resultados obtenidos se pudo concluir que no es necesario hacer correcciones en las soluciones mezcla, dado que no existe una dependencia de la concentración de GLI con la señal analítica. Luego, se analizaron las soluciones mezclas y se observó que se producía un incremento en la señal de F, el cual se podría atribuir al desplazamiento de la QUI de la cavidad del receptor, por efecto del GLI, como se puede visualizar en los espectros de la Figura 5.2, en concordancia con el accionar de un interruptor del tipo apagado/encendido, es decir un sistema *switch off/on*.



**Figura 5.2:** Efecto de GLI sobre los espectros de emisión de F del sistema QUI-HCA[6]S (26,0  $\mu\text{M}$  – 80,0  $\mu\text{M}$ ) (•••); [HCA[6]S] = 80,0  $\mu\text{M}$  (---); [QUI] = 26,0  $\mu\text{M}$  (-•••); variando la [GLI] = (0 – 7) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$ .  $\lambda_{\text{exc}}$  = 313,0 nm, potencia de detector 800 V y  $b = 1$  cm.

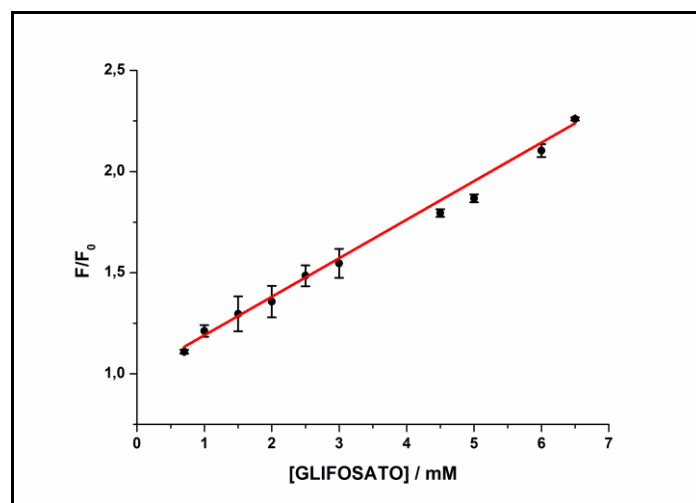
Como puede observarse en los espectros mostrados en la Figura 5.2, no sólo que fue posible reestablecer la emisión de F de la QUI, sino que además se produce una exaltación de la misma, debido posiblemente a la presencia de GLI. Este aumento en la concentración de QUI libre, producido posiblemente por desplazamiento de la cavidad de HCA[6]S por GLI, contribuya de cierta manera en la estabilización de la especie en el estado excitado, permitiendo que el tiempo de vida de fluorescencia de QUI en este medio aumente, lo que podría justificar la exaltación evidenciada.

En literatura se ha reportado que aumenta significativamente la fluorescencia nativa de ciertas fluoroquinolonas mediante la formación de complejos de coordinación por la presencia de itrio. Las fluoroquinolonas utilizadas fueron ciprofloxacina, norfloxacina, enoxacina entre otras, y si bien todas ellas presentan fluorescencia nativa, la presencia de itrio produjo la exaltación de la misma.<sup>47</sup> Otro reporte menciona que a partir de los espectros de absorción, se demostró la formación de un complejo histamina-ortoftalaldehído con una estequiometría 1:1. En los espectros de emisión, se observó que la fluorescencia compleja se inhibe en medio ácido, pero que en medio alcalino, se observó una exaltación de fluorescencia, para el complejo histamina-OPA.<sup>48</sup>

### 5.3.2. Determinación de parámetros analíticos

#### 5.3.2.1. Límites de Detección y Cuantificación

El incremento observado en la fluorescencia del sistema QUI-HCA[6]S, el cual fue considerado como referencia ( $F_0$ ), y la intensidad del sistema en presencia de cantidades crecientes de GLI, es decir el valor de  $F$  para cada nivel de concentración de GLI, permitió obtener la curva de calibrado (Figura 5.3) y del correspondiente ajuste se pudieron obtener la sensibilidad ( $A = (0,190 \pm 0,002) [mM]^{-1}$ ), los límites de detección ( $LOD = (1,22 \pm 0,02) mM$ ) y de cuantificación ( $LOQ = (3,70 \pm 0,05) mM$ ) del método. Para estas determinaciones se consideró la desviación estándar de una muestra de blancos  $S_b$  obtenida mediante la medición de blancos preparados independientemente ( $n = 25$ ), con un valor de 0,070, utilizando la ecuación 5.01.



**Figura 5.3:** Curva de calibrado del sistema QUI-HCA[6]S ( $F_0$ ) en presencia de concentraciones variables de GLI ( $F$ ). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $CH_3OH$  a 25,0 °C;  $[GLI] = (0 - 7) mM$ ;  $\lambda_{EXC} = 313,0 nm$ ; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 800 V;  $b = 1,0 cm$ .

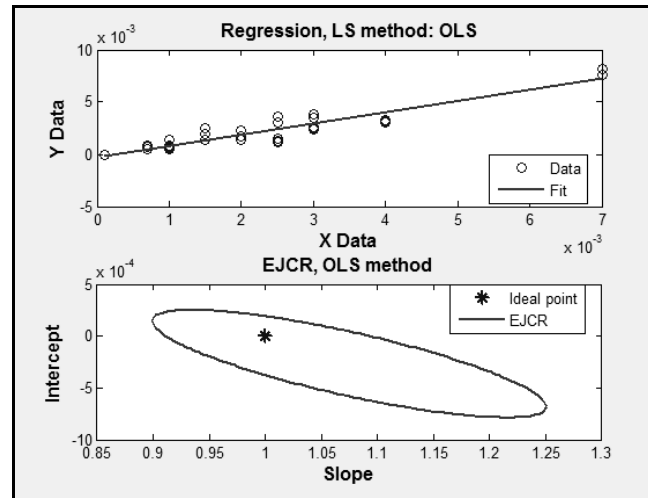
#### 5.3.2.2. Linealidad

Para verificar la validez estadística del modelo de regresión lineal, se empleó análisis de la varianza (ANOVA), para evaluar la contribución a la varianza total. Cuando se dispone de observaciones experimentales, la

varianza total se divide en dos componentes: la variación atribuida a la imprecisión experimental (*error*) y la variación asociada a la regresión lineal (*modelo*). En consecuencia, la hipótesis nula ( $H_0: \beta_1 = 0$ ) plantea que la variación asociada al modelo propuesto (regresión lineal) es menor que la variación asociada al procedimiento experimental ( $H_1: \beta_1 \neq 0$ ), donde  $\beta$  representa la pendiente. El estadístico de contraste,  $F$ , corresponde a la relación entre la varianza atribuida a la regresión y la varianza asociada al error experimental. La hipótesis nula ( $H_0$ ) se rechazará a un nivel de confianza  $\alpha$  si  $F_{calc}$  excede su valor crítico ( $F_{crítico}$ ). En lugar de usar un valor crítico, usualmente se calcula la probabilidad de que  $F_{calc}$  sea mayor a  $F_{crítico}$ , llamado *p-valor*. En este caso, la hipótesis nula se rechaza (el modelo es *significativo*) a un nivel de confianza  $\alpha$  si el *p-valor* es menor que  $\alpha$ .<sup>50</sup> El valor obtenido para el *p-valor* fue de  $2,83 \times 10^{-11}$  para los correspondientes grados de libertad y para un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0,05$ ) y en el intervalo de concentraciones evaluado. De esta manera, se concluye que el modelo lineal es estadísticamente válido. Cabe aclarar que el *p-valor* se obtuvo mediante los ajustes correspondientes que el software empleado, OriginPro 8.6 2018, realiza sobre los parámetros propios del ajuste.

Con el fin de verificar la fiabilidad de la pendiente y la ordenada al origen obtenidas para la curva predicha con la nominal, se decidió considerar el intervalo de confianza conjunto, es decir, aplicar el test de la Elipse.<sup>49</sup> Este intervalo es una región en el plano de las dos variables (pendiente y ordenada al origen) que tiene forma elíptica. Esta prueba estadística consiste en investigar si el punto (1,0) está contenido en la región elíptica de confianza conjunta de la pendiente y la ordenada al origen. Por tanto, se prepararon una serie de patrones con concentraciones conocidas de GLI, en presencia del sistema supramolecular QUI-HCA[6]S, diferentes a las utilizadas en la etapa de calibración. Luego, se determinó la concentración de GLI por interpolación en la recta de calibrado (predicha), y se analizó la exactitud de la determinación a través de la recuperación de las concentraciones nominales de GLI (curva predicha vs nominal). En los resultados obtenidos, el punto (1,0) quedó incluido dentro de los límites definidos por la elipse (ver Figura 5.4) y por tanto se

concluyó que el método propuesto es exacto. Los valores obtenidos fueron: Pendiente =  $(1,1 \pm 0,1)$  y Ordenada =  $(0,0003 \pm 0,00003)$ .



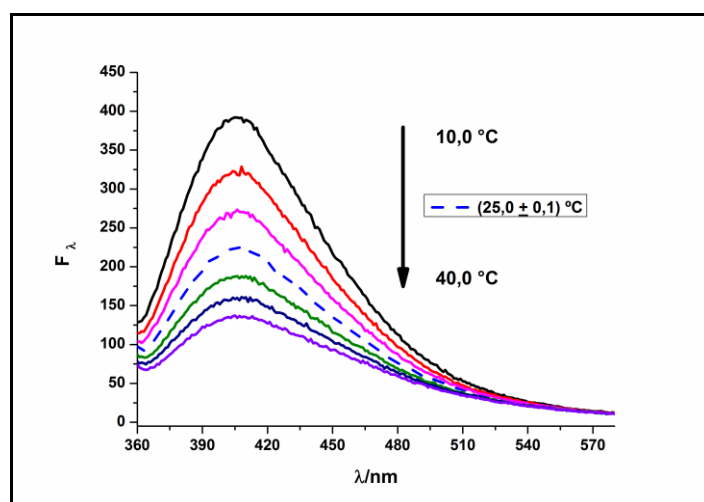
**Figura 5.4:** Ajuste de la región elíptica de confianza conjunta de la pendiente y la ordenada al origen

Por otra parte, el LOD determinado para el método propuesto, el cual fue del orden mM, no permitiría la cuantificación en cereales, frutos u otras matrices reales al nivel de los LMR15 establecidos por las normativas vigentes. Por ejemplo, algunos valores de los LMR para frutas como ser uva, naranja o mandarina es de 0,5 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ); para algunos cereales como ser maíz (1,0 ppm), soja (20,0 ppm como forraje), trigo (5,0 ppm). Estos valores de LMR resultan ser inferiores al LOD ( $206 \pm 4$ ) ppm y LOQ ( $626 \pm 8$ ) ppm determinado por el método propuesto con el complejo QUI-HCA[6]S, pero si podría emplearse para el control y chequeo de este principio activo en formulaciones comerciales, y de esta manera poder realizar un monitoreo o auditoria en aquellos lugares donde se trabaje con este herbicida, para de esta manera elaborar actividades de planificación del control de los riesgos asociados a la manipulación, traslado o acumulación del producto. Por tanto, también serviría para garantizar una correcta utilización de estas formulaciones en cualquier ámbito de trabajo, con adecuadas medidas de seguridad.



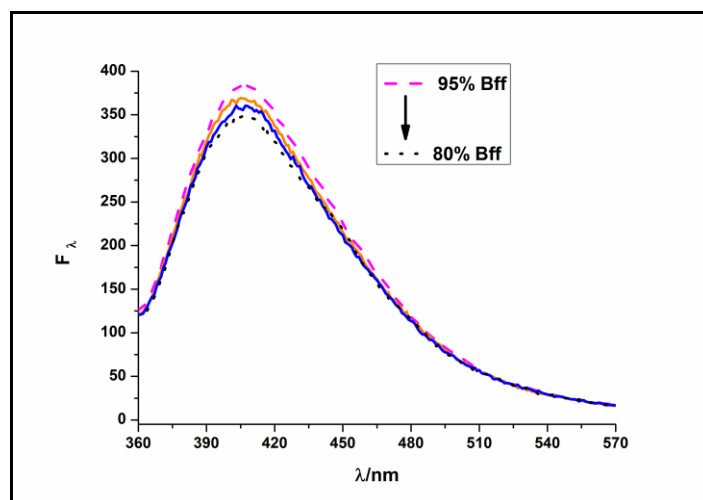
### 5.3.2.3. Robustez

Continuando con la determinación de parámetros analíticos del método fluorimétrico propuesto, se analizó la robustez del mismo considerando su capacidad de permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en las condiciones del mismo, proporcionando un índice de su confiabilidad durante su uso normal. En primer lugar, se evaluaron los efectos del cambio en la temperatura en las determinaciones. De los resultados obtenidos, se puede inferir que este factor debe ser estrictamente controlado, dado que los efectos sobre la señal analítica son notorios, como se puede observar en la Figura 5.5.



**Figura 5.5:** Efecto de la temperatura sobre el espectro de emisión de F de una solución 3 mM de GLI en presencia de QUI-HCA[6]S ( $26,0 \mu\text{M} - 80,0 \mu\text{M}$ ); 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a  $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}} = 313,0 \text{ nm}$ ; potencia de detector 700 V;  $b = 1,0 \text{ cm}$ .

Por otro lado, se evaluaron los efectos que producen las variaciones en la concentración del buffer (95 %, 90 %, 85 % y 80 % respectivamente), con y sin control de la fuerza iónica del medio, sobre la señal analítica. De los resultados obtenidos (ver Figura 5.6), resultó que el método tolera hasta un 10 % de dilución del buffer si se mantiene la fuerza iónica del medio, dado que los cambios no resultaron significativos.



**Figura 5.6:** Efecto de la dilución del medio sobre la emisión de F de una solución 5 mM de GLI en presencia de QUI-HCA[6]S (26,0  $\mu$ M – 80,0  $\mu$ M) con fuerza iónica controlada ( $I_m = 0,1235$  M); 25,0  $^{\circ}$ C;  $\lambda_{exc} = 313,0$  nm; potencia de detector 700 V;  $b = 1,0$  cm.

#### 5.3.2.4. Selectividad e Interferentes

Luego, se analizaron los efectos de posibles interferentes de la señal analítica. Para ello se tuvieron en cuenta tanto el efecto de interferentes orgánicos (ver Tabla 5.1), y por otra parte el de interferentes inorgánicos (ver Tabla 5.2). En las mencionadas tablas, se pueden observar las concentraciones máximas toleradas (**a**) de cada una de las especies consideradas como interferentes, dado que las mismas producen un cambio en la señal analítica no superior al 10 %. Por otro lado, se muestra también, el coeficiente de relación, entre las concentraciones tolerables con respecto a la concentración de GLI analizada (**b**). Tanto la concentración del analito como de interferentes están expresados en concentraciones mM, resultando el segundo de ellos (**b**) adimensional.

**Tabla 5. 1: Efecto de interferentes orgánicos**

<i>Compuesto</i>	<i>a / mM</i>	<i>b</i>
glucosa	22,3	3,2
3-clorofenol	0,38	0,05
4-clorofenol	3,0	0,43

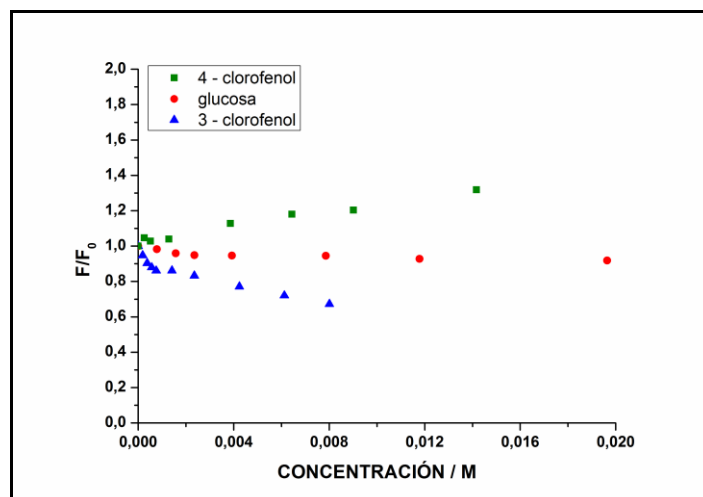
- (a) Concentraciones de interferentes orgánicos que no modifican la señal más de un 10 %.  
 (b) Relación de concentraciones interferente/GLI.

**Tabla 5. 2: Efecto de interferentes inorgánicos**

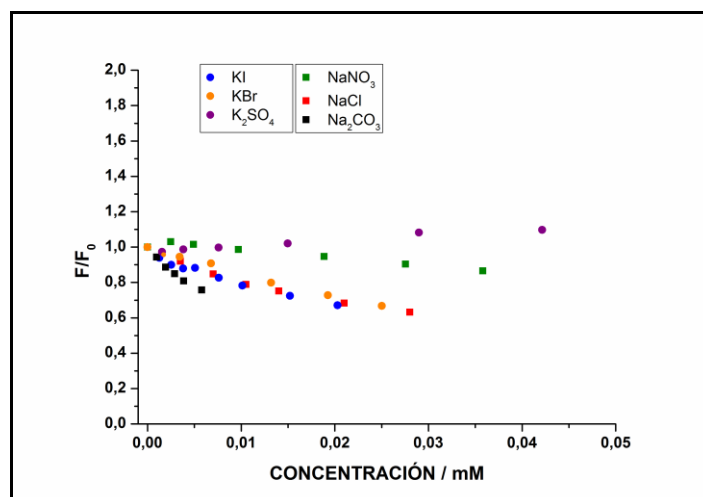
<i>Compuesto</i>	<i>Ión</i>	<i>a / mM</i>	<i>b</i>
NaNO <sub>3</sub>	Na <sup>+</sup>	27,5	3,93
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27,5	3,93
KBr	K <sup>+</sup>	6,8	0,97
	Br <sup>-</sup>	6,8	0,97
BaCl <sub>2</sub>	Ba <sup>+</sup>	4	0,57
	Cl <sup>-</sup>	8	1,14
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na <sup>+</sup>	34	4,86
	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	17	2,43
CaCl <sub>2</sub>	Ca <sup>+</sup>	2,4	0,34
	Cl <sup>-</sup>	4,8	0,69
NaCl	Na <sup>+</sup>	4,7	0,67
	Cl <sup>-</sup>	4,7	0,67
KI	K <sup>+</sup>	1,7	0,24
	I <sup>-</sup>	1,7	0,24
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Na <sup>+</sup>	3	0,43
	CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	1,5	0,21
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	K <sup>+</sup>	84,4	12,06
	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	42,2	6,03

- (a) Concentraciones de interferentes inorgánicos que no modifican la señal más de un 10 %.  
 (b) Relación de concentraciones interferente/GLI.

En las Figuras 5.7 y 5.8 se muestran las curvas en las cuales se reflejan los cambios encontrados sobre la señal de una solución de QUI-HCA[6]S con 7 mM de GLI ( $F_0$ ) y la de soluciones en las que aumenta la concentración de cada interferente ( $F$ ).



**Figura 5.7:** Efecto de interferentes orgánicos sobre la emisión de F de una solución de QUI-HCA[6]S (26,0  $\mu$ M – 80,0  $\mu$ M) con 7 mM de GLI. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C;  $\lambda_{EXC}$  = 313,0 nm; potencia de detector 800 V; b = 1,0 cm.



**Figura 5.8:** Efecto de interferentes inorgánicos sobre la emisión de F de una solución de QUI-HCA[6]S (26,0  $\mu$ M – 80,0  $\mu$ M) con 7 mM de GLI con 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C;  $\lambda_{EXC}$  = 313,0 nm; potencia de detector 800 V; b = 1,0 cm.

Cabe aclarar que la elección de los interferentes estudiados, se debió a que son especies químicas presentes en una de las matrices reales elegidas para la validación. Fundamentalmente los interferentes inorgánicos, son los iones mayoritarios presentes en aguas subterráneas; y los compuestos orgánicos mencionados, en menor medida, pueden llegar al medio ambiente durante su producción o cuando se aplican como pesticidas.<sup>51</sup> El origen de la contaminación hídrica está asociado directamente a actividades antropogénicas, dado que el hombre genera aguas residuales que pueden ser

clasificadas de origen doméstico, industrial o agrícola.<sup>51</sup> La mayoría de los clorofenoles liberados en el medio ambiente va al agua, y en muy pocas cantidades al aire. Los compuestos que tienen más probabilidades de ingresar al aire son los mono- y los diclorofenoles, ya que son los más volátiles.<sup>52</sup> Una vez en el aire, la luz solar ayuda a deshacer estos compuestos y la lluvia los elimina del aire. Los clorofenoles se adhieren al suelo y a sus sedimentos en el fondo de los lagos, los ríos y los arroyos. Sin embargo, algunos niveles bajos de clorofenoles en el agua, el suelo o los sedimentos se descomponen por la acción de los microorganismos y se eliminan del medio ambiente en cuestión de días o semanas.<sup>51,53</sup>

#### *5.3.2.5. Validación en muestras reales*

Por último, con el objetivo de demostrar la eficiencia del método propuesto, se realizaron ensayos de recuperación del analito en matrices reales. Por tanto, se desarrollaron experimentos que permitieron evaluar la respuesta del método en presencia de las siguientes matrices: agua corriente (AC), leche en polvo (LP) y formulaciones comerciales que tienen como principio activo al glifosato.

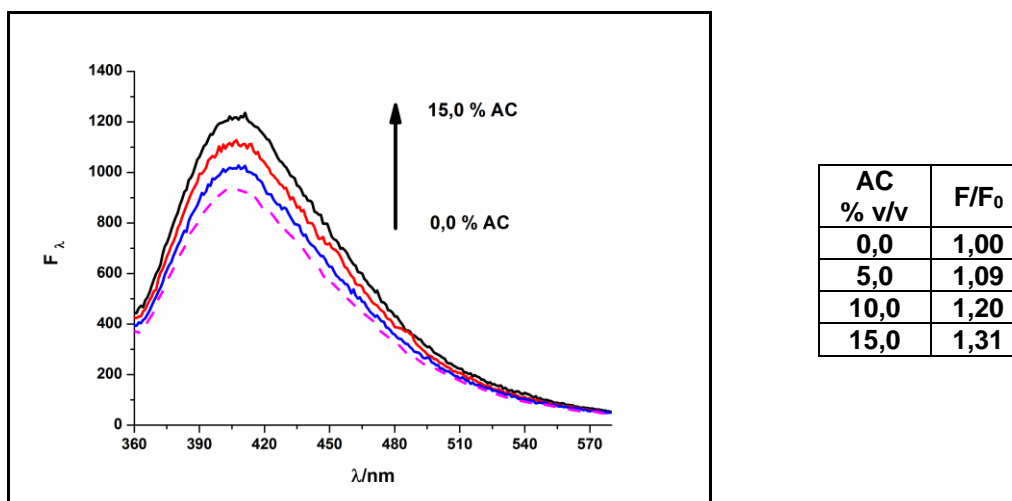
#### *Agua corriente*

En primer lugar se desarrollaron los ensayos con AC. Esta matriz se colectó de una canilla que se encuentra fuera del edificio Ciencias II y luego de dejar correr por 10 minutos el agua. No se realizaron tratamientos previos de la muestra y los ensayos correspondientes se llevaron a cabo el mismo día en que se colectó la muestra. Se determinaron las recuperaciones aparentes en una serie de soluciones conteniendo menos del 15 % v/v de agua corriente (ver Tabla 5.3). En dicha tabla, se muestran las recuperaciones calculadas por el método propuesto para cuatro niveles de fortificación del analito (1,0; 3,0; 5,0 y 7,0 mM respectivamente), y considerando el 5 %, 10 % y 15 % v/v de matriz (AC) en ausencia y presencia del sistema supramolecular.

**Tabla 5.3:** Recuperaciones porcentuales determinadas para GLI en AC, en presencia del sistema QUI-HCA[6]S.

	[GLI] / mM		F/F <sub>0</sub>	R, %	$\overline{R_A}$
	Cantidad agregada	Cantidad determinada			
5 % AC	1,0	1,3	1,24	130	111 %
	3,0	2,9	1,55	97	
	5,0	5,1	1,97	102	
	7,0	8,1	2,54	116	
10 % AC	1,0	2,1	1,40	210	149 %
	3,0	3,8	1,73	127	
	5,0	6,2	2,17	124	
	7,0	9,5	2,80	136	
15 % AC	1,0	2,2	1,43	220	167 %
	3,0	4,1	1,77	137	
	5,0	7,2	2,37	144	
	7,0	11,6	3,21	166	

Los resultados evidencian un efecto matriz positivo ( $R > 100 \%$ ) en niveles mayores al 10 % v/v de AC, que interfiere con la detección correcta del analito. En la Figura 5.9, se muestran los espectros de emisión del sistema y el efecto que produce el aumento de la matriz real. Por tanto, el sistema es capaz de tolerar esta matriz hasta un 5 %, con lo cual la señal analítica no cambia más de un 10 %, como puede verse en la tabla anexa a la figura. Entonces, el sistema resultó ser exacto en esta matriz hasta un 5 %, dado que el  $t_{\text{exp}}(2,39) < t_{n-1;\alpha}(3,18)$  al 95 % de confianza ( $\alpha = 0,05$ ) y 3 grados de libertad (ver ecuación 5.09).



**Figura 5.9:** Efecto de diferentes porcentajes (0 %, 5 %, 10 % y 15 %) respectivamente de agua corriente (AC) sobre la emisión de F de una solución de QUI-HCA[6]S (26,0  $\mu\text{M}$  – 80,0  $\mu\text{M}$ ) con 5 mM de GLI (---) con 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}} = 313,0 \text{ nm}$ ; potencia de detector 800 V; b = 1,0 cm.

Los resultados obtenidos hasta el momento y considerando también las concentraciones tolerables de interferentes (inorgánicos y orgánicos) determinados en la sección anterior, se podría atribuir el efecto observado de AC sobre la señal del sistema supramolecular, a la posible presencia de materia orgánica. Las fuentes de abastecimiento de agua contienen compuestos orgánicos capaces de promover el crecimiento bacteriano en el sistema de distribución.<sup>54,55</sup> Este desarrollo bacteriano depende fundamentalmente del contenido de materia orgánica biodegradable y de nutrientes inorgánicos, de la eficiencia del desinfectante residual, de la temperatura, del tiempo de residencia del agua en los conductos y depósitos de almacenamiento, del pH del agua y del material de construcción de las tuberías.<sup>55,56</sup> Los sistemas de almacenamiento y distribución de agua constituyen un ambiente idóneo para la proliferación bacteriana; el flujo de agua favorece el transporte de nutrientes y bacterias, mientras que las paredes de las tuberías y las partículas presentes en el agua sirven de superficie adherente para los microorganismos.<sup>57</sup> Los organismos adheridos tienen una mayor eficacia para absorber nutrientes y además son más resistentes a los ambientes adversos tales como la escasez de nutrientes y la presencia de desinfectantes.

*Leche en polvo*

Luego, se desarrollaron los ensayos con LP. Esta matriz se preparó en base a las indicaciones de una porción con valor nutricional óptimo (0,1 gr / 10,0 mL). No se realizaron tratamientos previos de la muestra y los ensayos correspondientes se llevaron a cabo el mismo día en que se preparó la muestra. Se determinaron las recuperaciones aparentes en una serie de soluciones que contenían LP (ver Tabla 5.4). En dicha tabla, se muestran las recuperaciones obtenidas por el método propuesto para cinco niveles de fortificación del analito (1,0; 2,0; 3,0, 4,0 y 5,0 mM respectivamente), y considerando el 1 % de matriz (LP) en presencia del sistema supramolecular.

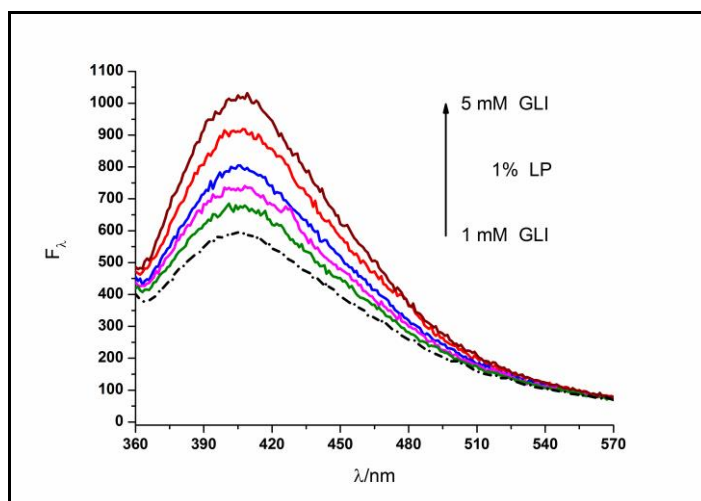
**Tabla 5.4:** Recuperaciones porcentuales determinadas para GLI en presencia de 1% de LP, en presencia del sistema QUI-HCA[6]S.

	[GLI] / mM		F/F <sub>0</sub>	R, %	$\overline{R}_A$
	Cantidad agregada	Cantidad determinada			
1 % LP	1,0	1,1	1,22	110	99,8 %
	2,0	1,7	1,33	85	
	3,0	3,1	1,61	103	
	4,0	4,1	1,80	102	
	5,0	4,9	1,98	98	

Analizando los resultados obtenidos, se calculó el estadístico  $t$  a un 95 % de confianza ( $\alpha = 0,05$ ) y 4 grados de libertad (ver ecuación 5.09), y por lo tanto, el sistema resultó ser exacto en esta matriz con un 1 % v/v de LP, dado que el  $t_{\text{exp}}$  (0,048) <  $t_{n-1;\alpha}$  (2,78). En la Figura 5.10, se muestran los espectros de emisión de F del sistema y el efecto que produce la matriz real.

Cabe aclarar que se intentó validar el método a mayores % de LP, no pudiéndose realizar la determinación, dado que las soluciones se tornaron opalescentes en valores mayores al 5 % de LP. Por tal motivo, sólo fue posible el estudio con un 1 % de LP.

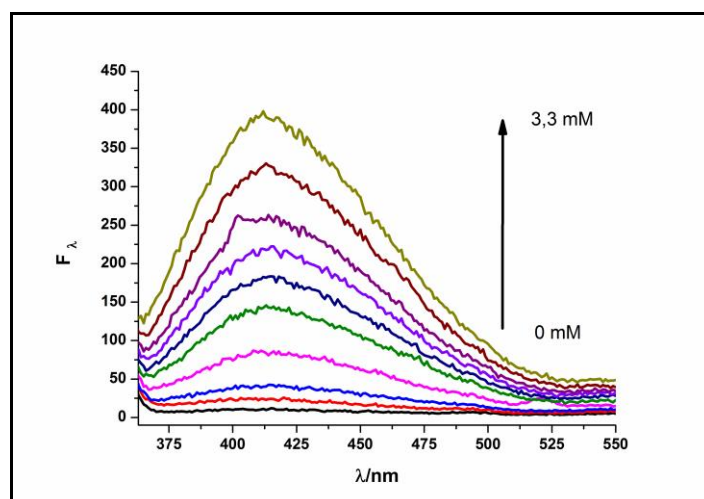




**Figura 5.10:** Efecto de leche en polvo (LP) al 1% v/v sobre la emisión de F de una solución de QUI-HCA[6]S (---) (26,0  $\mu$ M – 80,0  $\mu$ M) con GLI. Intervalo de concentración de GLI: (1,0 - 5,0) mM. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C;  $\lambda_{\text{EXC}}$  = 313,0 nm; potencia de detector 800 V; b = 1,0 cm.

### *Formulaciones comerciales*

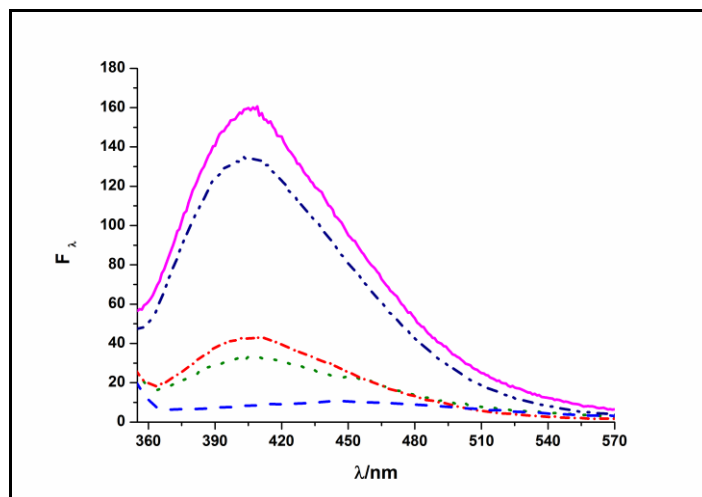
Para finalizar se realizó la validación del método con dos formulaciones comerciales, una en presentación granulada y otra líquida, las cuales tienen como principio activo el analito de interés, el GLI. Primero, se realizó un estudio previo del producto granulada (*Round-Up Ultra Max - Monsanto*) por las técnicas hasta ahora empleadas (UV-visible y F). Se prepararon una serie de soluciones de concentraciones calculadas respecto a equivalentes de sal de potasio de N-(fosfonometil) glicina (sal de potasio de glifosato). Los espectros de absorción obtenidos no mostraron señal y a la longitud de onda de excitación (313,00 nm) la absorbancia resultó ser despreciable ( $\sim 0,002$ ). Por su parte, los espectros de emisión de F obtenidos mostraron una dependencia con la concentración de GLI, como se puede observar en la Figura 5.11.



**Figura 5.11:** Espectros de emisión de F de soluciones de formulación comercial granulada con 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C;  $\lambda_{\text{EXC}} = 313,0$  nm; potencia de detector 600 V; b = 1,0 cm.

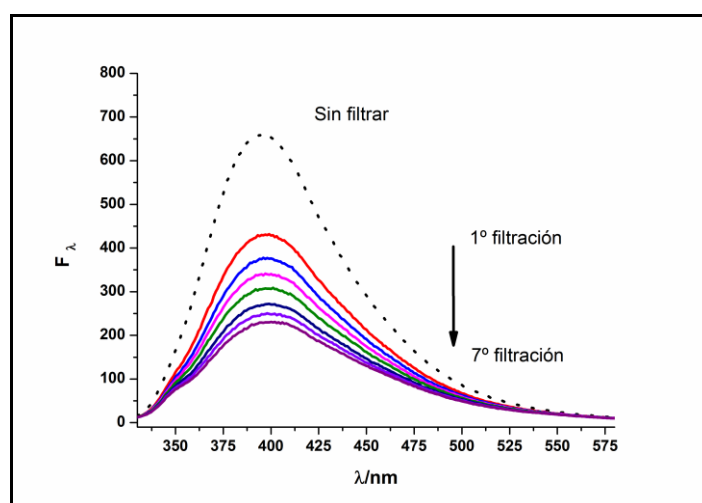
Dada esta dependencia con la concentración, se decidió realizar una filtración de la solución madre de la formulación y los resultados obtenidos mostraron una disminución de la señal (38 %) pero no la suficiente como para aplicarla al sistema supramolecular propuesto, dada su gran intensidad. Esto puede deberse a la presencia de coadyuvantes, estabilizantes y surfactantes (desconocidos todos) presentes en la formulación, y que actúan como efectivos interferentes de la señal analítica.

Pese a la gran interferencia observada, se llevaron a cabo los experimentos con la formulación en presencia del sistema supramolecular propuesto y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.12. Como puede verse, la presencia de GLI (presente en la formulación) aumenta la intensidad propia del sistema QUI-HCA[6]S, pero de forma extremadamente incrementada, en comparación al aumento que produjo el GLI de referencia utilizado. Incluso, la señal fluorescente de la formulación presenta una intensidad exagerada, sin la presencia del sistema QUI-HCA[6]S.



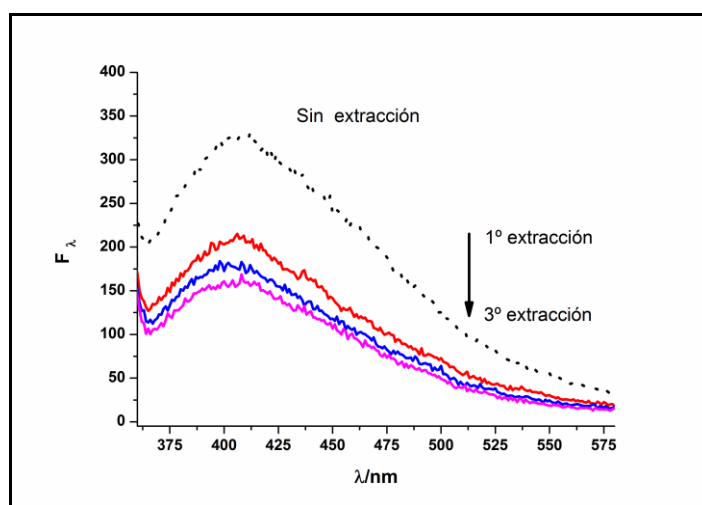
**Figura 5.12:** Efecto de formulación comercial granulada sobre el espectro de emisión de F de una solución de QUI-HCA[6]S ( $26,0 \mu\text{M} - 80,0 \mu\text{M}$ ) ( $\bullet\bullet$ ) en presencia de  $1 \text{ mM}$  de GLI ( $\text{---}$ ); [HCA[6]S] =  $80,0 \mu\text{M}$  ( $\text{---}$ ); [QUI] =  $26,0 \mu\text{M}$  ( $\text{---}\bullet$ ); [GLI] =  $1,0 \text{ mM}$  ( $\text{---}\bullet\bullet$ ) de formulación;  $95,0 \%$  v/v de buffer fosfato de  $\text{pH} = 6,994$  y  $2,0 \%$  v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}} = 313,0 \text{ nm}$ ; potencia de detector  $600 \text{ V}$ ;  $b = 1,0 \text{ cm}$ .

En base a los resultados obtenidos, se decidió realizar los ensayos de validación con otra formulación, del mismo principio activo. Para ello se trabajó con una muestra de *Round-Up Full II – Monsanto*, la cual se comercializa como solución. Se realizó una caracterización previa, y dado que encontramos resultados similares a los de la otra formulación se decidió realizar filtraciones de una solución madre de Full II, encontrando una disminución del  $60 \%$  de la señal. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.13.



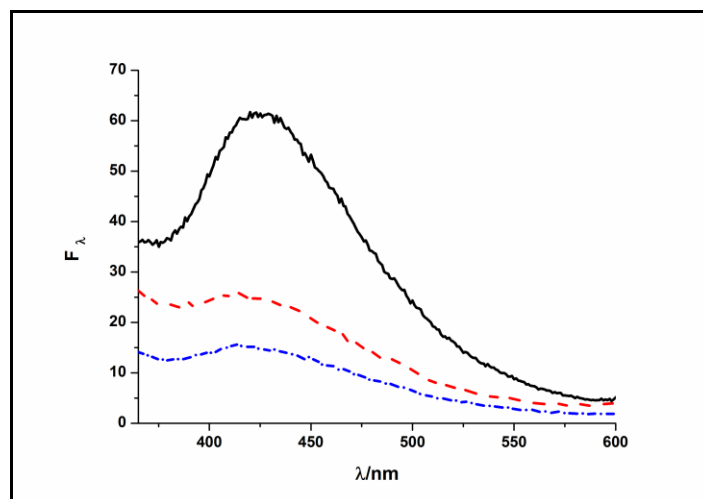
**Figura 5.13:** Efecto de filtraciones sucesivas sobre el espectro de emisión de F de una solución  $5 \text{ mM}$  de GLI;  $95,0 \%$  v/v de buffer fosfato de  $\text{pH} = 6,994$  y  $2,0 \%$  v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}} = 313,0 \text{ nm}$ ; potencia de detector  $700 \text{ V}$ ;  $b = 1,0 \text{ cm}$ .

Si bien se logró disminuir la señal, la misma sigue siendo de gran intensidad respecto a la señal del sistema QUI-HCA[6]S y por ende se decidió realizar extracciones con solventes de diferente polaridad, con el objetivo de eliminar todos aquellos excipientes con los que cuenta la formulación comercial y que producen tal intensificación de la señal. Para ello se trabajó individualmente con hexano, acetato de etilo y metanol. En todos los casos, se realizaron los ensayos a tres valores de pH. De todos los resultados obtenidos, se observó que luego de la tercera extracción con metanol, la señal remanente de la solución fue de un 45 %. Si bien el metanol es miscible con agua, durante la extracción se observó la formación de una interfaz de consistencia blancuzca, y fue esta misma la que se extrajo. Los espectros de absorbancia no mostraron resultados relevantes y sólo se muestran en la Figura 5.14 los espectros de emisión de fluorescencia, donde puede observarse la notoria disminución de señal.



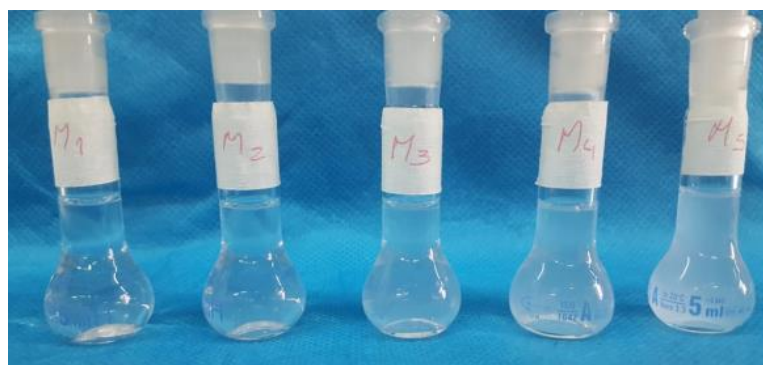
**Figura 5.14:** Efecto de extracciones sucesivas con  $\text{CH}_3\text{OH}$  sobre el espectro de emisión de F de una solución 3 mM de GLI (•••); a pH=7,0 en  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $\lambda_{\text{exc}} = 313,0 \text{ nm}$ ; potencia de detector de 800 V;  $b = 1,0 \text{ cm}$ .

Con estos resultados, se decidió evaluar el efecto conjunto de filtraciones y extracciones con metanol, con el objetivo de mejorar aún más los resultados. Por tanto, se realizaron 3 extracciones sucesivas con metanol de una solución de formulación y luego las 3 filtraciones. Los resultados encontrados se muestran en los espectros de F de la Figura 5.15, donde se observa que la señal disminuye en un 72 %.



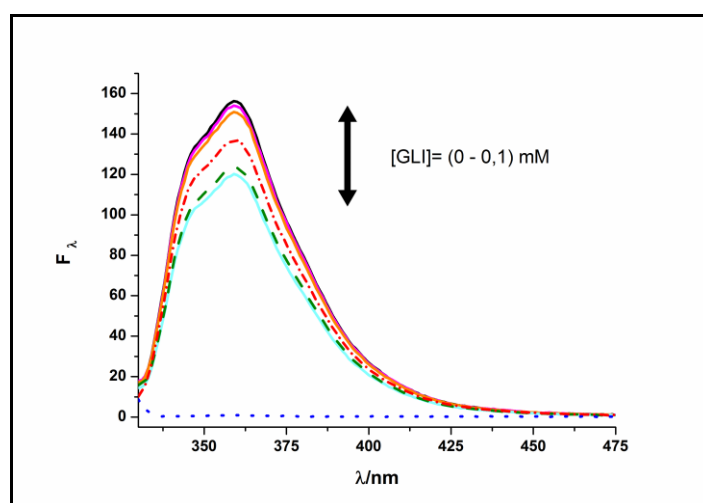
**Figura 5.15:** Efecto de extracciones sucesivas con  $\text{CH}_3\text{OH}$  sobre el espectro de emisión de F de una solución 5 mM de GLI; Sin extraer y filtrar (—); Luego de 3 extracciones (---); Luego de 3 filtraciones (-••-); a pH = 7,0 en  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}} = 313,0 \text{ nm}$ ; a una potencia de detector de 600 V;  $b = 1,0 \text{ cm}$ .

Luego, se llevaron a cabo los experimentos desarrollados anteriormente pero en presencia del sistema supramolecular. Los resultados encontrados mostraron tanto por espectroscopia UV-vis como de F, que un aumento en la concentración de formulación en presencia del complejo QUI-HCA[6]S produce una opalescencia cada vez más notoria y por tanto, no fue posible validar el método con ninguna de las formulaciones comerciales analizadas. A modo ilustrativo, se muestra una imagen de las soluciones preparadas. En ellas, se hizo variar la concentración de formulación (referidas a equivalentes de la sal de potasio de glifosato) en un rango de (1 - 7) mM.



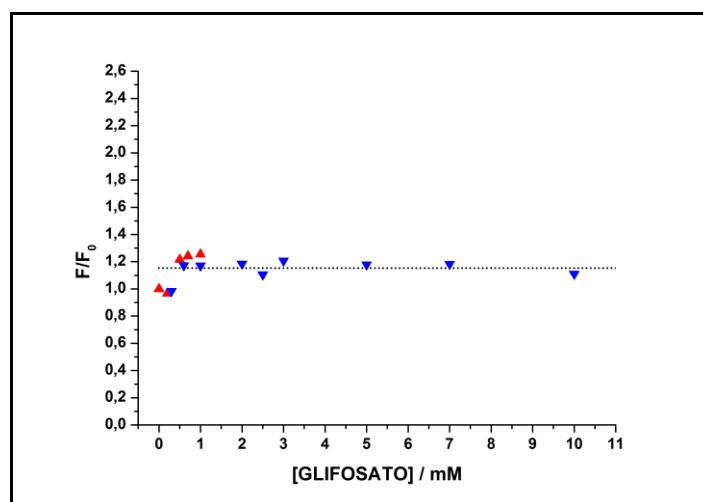
### 5.3.3. Efecto de glifosato sobre el sistema supramolecular CZL-HCA[6]S

En estudios previos,<sup>46</sup> se determinó la  $K_A$  del sistema CZL-HCA[6]S mediante un quenching de F. El valor calculado fue de  $(47 \pm 1) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ . Con la misma estrategia que para el sistema QUI-HCA[6]S, se llevaron a cabo los estudios correspondientes para proponer un método indirecto fluorimétrico para GLI, analizando la señal de CZL. Los resultados obtenidos por espectroscopia UV-visible mostraron aditividad en la señal, mientras que por F se encontró que no hay una relación entre la señal y el aumento en la concentración de GLI. Los espectros de F se muestran en la Figura 5.16.



**Figura 5.16:** Efecto de GLI sobre los espectros de emisión de F del sistema CZL-HCA[6]S (**M**) ( $5,0 \mu\text{M} - 180,0 \mu\text{M}$ ) (---); [CZL] =  $5,0 \mu\text{M}$  (-.-.-); [HCA[6]S] =  $180 \mu\text{M}$  (•••); variando la [GLI] =  $(0 - 0,1) \text{ mM}$ ; 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}} = 322,0 \text{ nm}$ ; potencia de detector 400 V;  $b = 1,0 \text{ cm}$ .

Se llevaron adelante más experimentos similares pero a mayor concentración de GLI, y no se logró restablecer la señal fluorescente de CZL. Los resultados encontrados se resumen en la Figura 5.17, en la que puede observarse una dispersión de la señal analítica, luego de producirse un ligero aumento, respecto al aumento en la concentración de GLI.



**Figura 5.17:** Dependencia de  $F/F_0$  del sistema CZL-HCA[6]S ( $F_0$ ) en presencia de GLI (F). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C;  $\lambda_{\text{EXC}} = 322,0$  nm; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector de 400 V;  $b = 1,0$  cm.

Estos resultados, demuestran la gran selectividad del HCA[6]S por el heterociclo. De este manera, el sistema CZL-HCA[6]S no representaría un potencial sensor químico para GLI, dado que no permitiría el desarrollo de una estrategia analítica para su detección y cuantificación, al menos por las técnicas estudiadas y la metodología propuesta.

## 5.4. SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 5.4.1. Reactivos e instrumentos

Los solventes empleados fueron: agua deionizada calidad Milli-Q obtenida de un purificador Millipore (resistividad, 25°C: 18MΩ cm) y metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) grado HPLC Sintorgan.

La muestra de leche en polvo, corresponde a la marca Svelty de ©Nestle, y las soluciones corresponden a la indicación según la información nutricional del producto, es decir, 20,0 gr por cada 200,0  $\text{cm}^3$  de producto listo para consumir. La solución madre de LP fue asistida por 10 minutos de sonicado, para garantizar una completa disolución de la muestra.

Las mediciones de pH se realizaron con un pH-metro Thermo Orion modelo 520A 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 soluciones buffer estándar preparadas de pH = 4,008 (con 0,05 M de ftalato ácido de potasio marca J.T.Baker), de pH = 6,994 (con 0,02 M de fosfato dihidrógeno de sodio marca J.T.Baker, 0,03 M de fosfato monohidrógeno de disodio marca AppliChem y 0,02 M de cloruro de sodio marca Taurus) y de pH = 9,155 (con 0,01 M de borato de sodio marca J.T.Baker y 0,02 M de cloruro de sodio marca Taurus).<sup>58</sup> Se prepararon según el procedimiento descrito en la literatura citada, empleando reactivos de grado analítico.<sup>59</sup> Las soluciones buffer se controlaron por medición experimental. La precisión del pH-metro fue 0,001 y la exactitud asociada a las lecturas fue  $\pm 0,005$ .

Las soluciones estudiadas fueron preparadas en medio acuoso bufferizado, utilizando un 95 % v/v de buffer pH = 6,994, empleando como co-solvente un 2 % de metanol (CH<sub>3</sub>OH) y completando volumen final con agua calidad Milli-Q.

Los espectros de absorción UV-visible se obtuvieron empleando un espectrofotómetro Shimadzu 1800 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 buffer pH = 6,994. En todos los experimentos se utilizó una celda de  $b = 1$  cm de paso óptico.

Los espectros de emisión de F se registraron con un espectrofluorímetro CARY Eclipse, con anchos de rendija de emisión y de excitación de 10 nm, una velocidad de barrido de 500 nm/min y una potencia del detector especificada en cada caso. La temperatura de las soluciones se mantuvo a 25,0 °C conectando el porta-celda del equipo al accesorio Single Peltier CARY. En todos los experimentos se utilizó una celda de cuarzo de  $b = 1$  cm de paso óptico.

Los datos adquiridos se procesaron empleando el software OriginPro 8.6 versión 2018. Con este mismo, se realizaron los cálculos correspondientes



de los parámetros analíticos de los datos extraídos del correspondiente ajuste de los resultados experimentales.

#### 5.4.2. Determinación del punto de fusión de CZL

El punto de fusión de un compuesto puro es una propiedad física característica del mismo. Las mediciones de los puntos de fusión se realizaron con un aparato digital Thermo Fisher serie IA9000. La resolución del aparato fue 0,1 °C y de una exactitud de  $\pm 0,5$  a 20°C.

Para llevar a cabo esta determinación, se utilizó un valor de referencia (244-246) °C del punto de fusión, el cual se especifica en su hoja de seguridad Sigma Aldrich.<sup>60</sup> Con este dato de referencia, se realizó una primera medida en una rampa rápida de ascenso de temperatura (es decir 10,0 °C/min), lo que permitió tener una medida aproximada del intervalo de temperatura de fusión (PF). Luego, se utilizó una rampa lenta de temperatura, es decir 1,0 °C/min, y las determinaciones se realizaron por triplicado. A continuación se muestran los resultados que se obtuvieron de los triplicados.

1. *Rampa Rápida hasta 250°C.*  
PF= (244,3 - 247,9) °C
2. *Rampa Rápida hasta 240°C y luego de 1°C/min.*  
PF= (244,7 - 249,2) °C
3. *Rampa Rápida hasta 240°C y luego de 1°C/min.*  
PF= (244,4 – 248,8) °C
4. *Rampa Rápida hasta 240°C y luego de 1°C/min.*  
PF= (244,5 – 248,5) °C

Estos resultados, nos permiten confirmar la pureza del CZL, y por lo tanto este reactivo fue empleado en los experimentos desarrollados sin tratamientos previos.

## 5.5. CONCLUSIONES PARCIALES

---

Se desarrolló, caracterizó y validó un método analítico indirecto, sencillo, alternativo y fluorimétrico para cuantificar GLI, por desplazamiento de QUI de la cavidad del receptor en el sistema QUI-HCA[6]S, con el consecuente restablecimiento de la señal analítica.

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

Se consiguió una buena sensibilidad analítica e intervalo lineal de concentraciones de aplicabilidad de la técnica.

El método quedó validado (al 95 % de confianza) en agua corriente al 5 % y en leche en polvo al 1 %, de acuerdo a los exámenes realizados de exactitud, precisión, selectividad, especificidad y robustez.

El sistema supramolecular CZL-HCA[6]S no resultó sensible para GLI.

## 5.6. BIBLIOGRAFÍA

---

- 1 H.-J. Schneider and A. K. Yatsimirsky, *Principles and methods in supramolecular chemistry*, Wiley, 2000.
- 2 M. E. Carranza, H. M. Elero and A. V. Veglia, Aqueous on / off fluorescent switches based on systems of quinoline / quinoline-macrocycle, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 2020, **390**, 112253–112259.
- 3 Data Sheet Safety Quinoline, *Sigma-Aldrich*, 2019, 1–7.
- 4 S. O. Duke and S. B. Powles, Glyphosate: a once-in-a-century herbicide,

- Pest Manag. Sci.*, 2008, **64**, 319–325.
- 5 C. S. Carranza, C. L. Barberis, S. M. Chiacchiera and C. E. Magnoli, Assessment of growth of *Aspergillus* spp. from agricultural soils in the presence of glyphosate, *Rev. Argent. Microbiol.*, 2017, **49**, 384–393.
  - 6 Monsanto Argentina S.A.I.C., Roundup FULL II - Hoja de datos de seguridad de materiales, 2005, 1–5.
  - 7 A. Fischer, Resistencia a herbicidas: mecanismos y mitigación, *Rev. Espec. Maleza*, 2013, 13–19.
  - 8 A. H. C. Van Bruggen, M. M. He, K. Shin, V. Mai, K. C. Jeong, M. R. Finckh and J. G. Morris, Environmental and health effects of the herbicide glyphosate, *Sci. Total Environ.*, 2018, **616–617**, 255–268.
  - 9 C. A. Moldes, L. O. Medici, O. S. Abrahão, S. M. Tsai and R. A. Azevedo, Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate, *Acta Physiol. Plant.*, 2008, **30**, 469–479.
  - 10 N. Swanson, A. Leu, J. Abrahamson and B. Wallet, Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America, *J. Org. Syst.*, 2014, **9**, 6–37.
  - 11 S. H. Bai and S. M. Ogbourne, Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2016, **23**, 18988–19001.
  - 12 H. Greim, D. Saltmiras, V. Mostert and C. Strupp, Evaluation of carcinogenic potential of the herbicide glyphosate, drawing on tumor incidence data from fourteen chronic/carcinogenicity rodent studies, *Crit. Rev. Toxicol.*, 2015, **45**, 185–208.
  - 13 L. P. E. Miteva, S. V. Ivanov and V. S. Alexieva, Alterations in glutathione pool and some related enzymes in leaves and roots of pea plants treated with the herbicide glyphosate, *Russ. J. Plant Physiol.*, 2010, **57**, 131–136.
  - 14 F. Peirano, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 7 y 8 de Julio de 2009 1,

- I Congr. Anu. AEDA*, 2009, 1–16.
- 15 Servicio nacional de sanidad y calidad agroalimentaria, Límites máximos de residuos, *Codex Aliment.*, 2019, 1–3.
  - 16 V. Toss, I. Leito, S. Yurchenko, R. Freiberg and A. Kruve, Determination of glyphosate in surface water with high organic matter content, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2017, **24**, 7880–7888.
  - 17 L. Sun, D. Kong, W. Gu, X. Guo, W. Tao, Z. Shan, Y. Wang and N. Wang, Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2017, **1502**, 8–13.
  - 18 J. Ding, G. Jin, G. Jin, A. Shen, Z. Guo, B. Yu, Y. Jiao, J. Yan and X. Liang, Determination of Underivatized Glyphosate Residues in Plant-Derived Food with Low Matrix Effect by Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Food Anal. Methods*, 2016, **9**, 2856–2863.
  - 19 A. Romero-Natale, I. Palchetti, M. Avelar, E. González-Vergara, J. L. Garate-Morales and E. Torres, Spectrophotometric detection of glyphosate in water by complex formation between bis 5-phenyldipyrinate of nickel (II) and glyphosate, *Water (Switzerland)*, 2019, **11**, 1–14.
  - 20 K. Usui, E. Minami, Y. Fujita, E. Kubota, H. Kobayashi, T. Hanazawa, T. Yoshizawa, Y. Kamijo and M. Funayama, Application of probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry to ultra-rapid determination of glufosinate and glyphosate in human serum, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2019, **174**, 175–181.
  - 21 C. S. Dourado, E. S. Lins and A. C. B. Dias, Development of a sequential injection system with online photo-cleavage coupled to SPE for spectrophotometric determination of N-nitrosoglyphosate, *Microchem. J.*, 2019, **147**, 1061–1067.
  - 22 B. Cartigny, N. Azaroual, M. Imbenotte, D. Mathieu, E. Parmentier, G.

- Vermeersch and M. Lhermitte, Quantitative determination of glyphosate in human serum by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, *Talanta*, 2008, **74**, 1075–1078.
- 23 C. V. Waiman, M. J. Avena, M. Garrido, B. Fernández Band and G. P. Zanini, A simple and rapid spectrophotometric method to quantify the herbicide glyphosate in aqueous media. Application to adsorption isotherms on soils and goethite, *Geoderma*, 2012, **170**, 154–158.
- 24 C. Hidalgo, C. Rios, M. Hidalgo, V. Salvadó, J. V. Sancho and F. Hernández, Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1035**, 153–157.
- 25 M. Ibáñez, Ó. J. Pozo, J. V. Sancho, F. J. López and F. Hernández, Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1081**, 145–155.
- 26 A. Ghanem, P. Bados, L. Kerhoas, J. Dubroca and J. Einhorn, Glyphosate and AMPA analysis in sewage sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOc derivatization on strong anion-exchange resin as solid support, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 3794–3801.
- 27 C. N. Albers, G. T. Banta, P. E. Hansen and O. S. Jacobsen, The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil - Comparing different soils and humic substances, *Environ. Pollut.*, 2009, **157**, 2865–2870.
- 28 A. Santilio, C. Pompili and A. Giambenedetti, Determination of glyphosate residue in maize and rice using a fast and easy method involving liquid chromatography–mass spectrometry (LC/MS/MS), *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, 2019, **54**, 205–210.
- 29 H. Guo, H. Wang, J. Zheng, W. Liu, J. Zhong and Q. Zhao, Sensitive and

- rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos and metabolites by UPLC–MS/MS using a modified Quick Polar Pesticides Extraction method, *Forensic Sci. Int.*, 2018, **283**, 111–117.
- 30 P. Kaczyński and B. Łozowicka, Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection, *Open Chem.*, 2015, **13**, 1011–1019.
- 31 Y. Zhang, Y. Zhang, Q. Qu, G. Wang and C. Wang, Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soybean samples by high performance liquid chromatography using a novel fluorescent labeling reagent, *Anal. Methods*, 2013, **5**, 6465–6472.
- 32 P. Azcarate and J. Porfiri, Carolina Montoya, in *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)*, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), 2017, vol. 1.
- 33 M. C. Arregui, A. Lenardón, D. Sanchez, M. I. Maitre, R. Scotta and S. Enrique, Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean, *Pest Manag. Sci.*, 2004, **60**, 163–166.
- 34 A. L. Van Eenennaam and A. E. Young, Detection of dietary DNA, protein, and glyphosate in meat, milk, and eggs, *J. Anim. Sci.*, 2017, **95**, 3247–3269.
- 35 P. K. Jensen, C. E. Wujcik, M. K. McGuire and M. A. McGuire, Validation of reliable and selective methods for direct determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in milk and urine using LC-MS/MS, *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, 2016, **51**, 254–259.
- 36 Y. Liao, J. M. Berthion, I. Colet, M. Merlo, A. Nougadère and R. Hu, Validation and application of analytical method for glyphosate and glufosinate in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2018, **1549**, 31–38.

- 37 J. S. Bus, Analysis of Moms Across America report suggesting bioaccumulation of glyphosate in U.S. mother's breast milk: Implausibility based on inconsistency with available body of glyphosate animal toxicokinetic, human biomonitoring, and physico-chemical data, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2015, **73**, 758–764.
- 38 M. K. McGuire, M. A. McGuire, W. J. Price, B. Shafii, J. M. Carrothers, K. A. Lackey, D. A. Goldstein, P. K. Jensen and J. L. Vicini, Glyphosate and aminomethylphosphonic acid are not detectable in human milk, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2016, **103**, 1285–1290.
- 39 P. C. Oliveira, E. M. Maximiano, P. A. Oliveira, J. S. Camargo, A. R. Fiorucci and G. J. Arruda, Direct electrochemical detection of glyphosate at carbon paste electrode and its determination in samples of milk, orange juice, and agricultural formulation, *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, 2018, **53**, 817–823.
- 40 S. Carvalho, C. Cruz, R. Delgado, M. G. B. Drew and V. Félix, Dinuclear copper and zinc complexes of a hexaazamacrocyclic containing p-xylyl spacers and bridging anions: Theoretical and spectroscopic studies, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2003, **3**, 4261–4270.
- 41 P. Manon, K. C. Juglan, K. Kaur, N. Sethi and J. P. Kaur, Intermolecular interaction studies of glyphosate with water, *AIP Conf. Proc.*, 2017, **1860**, 1–8.
- 42 J. Miller and J. Miller, *Analytical Chemistry. Theoretical and Metrological Fundamentals*, 2007.
- 43 D. T. Burns, K. Danzer and A. Townshend, Use of the terms 'recovery' and 'apparent recovery' in analytical procedures (IUPAC Recommendations 2002), *Pure Appl. Chem.*, 2003, 2201–2205.
- 44 N. J. Galan-Freyte, A. M. Figueroa-Navedo, Y. C. Pacheco-Londoño, W. Ortiz-Rivera, L. C. Pacheco-Londoño and S. P. Hernández-Rivera, Chemometrics-enhanced fiber optic Raman detection, discrimination and

- quantification of chemical agents simulants concealed in commercial bottles, *Anal. Chem. Res.*, 2014, **2**, 15–22.
- 45 J. Miller and J. Miller, *Métodos de Calibración en Análisis Instrumental: Regresión y Correlación*, 2002.
- 46 Matías Carranza, Diseño, síntesis y caracterización de nanocavidades para la construcción de dispositivos moleculares, *Univ. Nac. Córdoba*, 2015, Tesis doctoral.
- 47 F. Cañada-Cañada, J. A. Arancibia, G. M. Escandar, G. A. Ibañez, A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña and A. C. Olivieri, Second-order multivariate calibration procedures applied to high-performance liquid chromatography coupled to fast-scanning fluorescence detection for the determination of fluoroquinolones, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 4868–4876.
- 48 S. E. Douabalé, M. Dione, A. Coly and A. Tine, Contributions to the determination of histamine rate by measuring out the histamine-orthophthalaldehyde complex in the absorption and fluorescence, *Talanta*, 2003, **60**, 581–590.
- 49 A. Olivieri and H. Goicoechea, La calibración en Química Análítica, *Univ. Nac. del Litoral*, 2007, **1**, Editorial UNL.
- 50 M. C. Ortiz, M. S. Sánchez and L. A. Sarabia, Quality of Analytical Measurements: Univariate Regression, *Compr. Chemom.*, 2009, **1**, 127–169.
- 51 N. Rincon Silva and J. Moreno Piraján, Remoción de fenol, p-nitrofenol y p-clorofenol desde carbones activados químicamente con ácido sulfúrico desde material lignocelulosico de desecho: Efecto de la concentración del agente activante, *Afinidad Rev. química teórica y Apl.*, 2017, **74**, 112–123.
- 52 División de Toxicología y Medicina Ambiental, Resumen de Salud Pública Clorofenoles, *Agencia para Sust. Toxicas y el Regist. Enfermedades*,



- 2000, 1–6.
- 53 División de Toxicología y Medicina Ambiental, Resumen de Salud Pública Clorofenoles, *Agencia para Sust. Toxicas y el Regist. Enfermedades*, 2000, 1–6.
- 54 F. Ling, R. Whitaker, M. W. LeChevallier and W. T. Liu, Drinking water microbiome assembly induced by water stagnation, *ISME J.*, 2018, **12**, 1520–1531.
- 55 S. Fass, J. C. Block, M. Boualam, V. Gauthier, D. Gatel, J. Cavard, S. Benabdallah and V. Lahoussine, Release of organic matter in a discontinuously chlorinated drinking water network, *Water Res.*, 2003, **37**, 493–500.
- 56 M. M. H. Fernandes, A. P. Coelho, C. Fernandes, M. F. da Silva and C. C. Dela Marta, Estimation of soil organic matter content by modeling with artificial neural networks, *Geoderma*, 2019, **350**, 46–51.
- 57 X. Zhang, Z. Chen, J. Shen, S. Zhao, J. Kang, W. Chu, Y. Zhou and B. Wang, Formation and interdependence of disinfection byproducts during chlorination of natural organic matter in a conventional drinking water treatment plant, *Chemosphere*, 2020, **242**, 125227.
- 58 C. R. N. Strauts, J. H. Gilfillan and H. N. Wilson, Analytical Chemistry-The Working Tools, *Oxford Univ. Press*, 1958, **Volumen I**, 228.
- 59 W. Hayes, CRC Handbook of Chemistry and Physics, *CRC Press*, 2014, **95<sup>TH</sup> edit**, 8–34 y 8–36.
- 60 Data Sheet Safety Carbazole, *Sigma Aldrich*, 2020, **1**, 1–9.



---

## **EFECTO DE RECEPTORES MACROCÍCLICOS SOBRE LAS PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE QUININA, HARMANO, HARMINA y 9-(2-ETIL HEXIL) CARBAZOL**

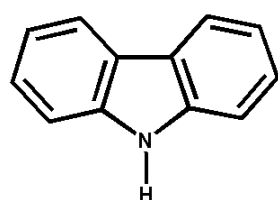
---

### **6.1. INTRODUCCIÓN**

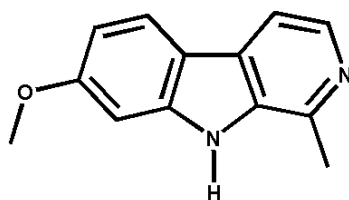
---

Los alcaloides de la familia de la  $\beta$ -carbolina son compuestos del tipo HAPN, tales como harmano (HNO) y harmina (HNA) (ver sus estructuras en la Figura 6.0). Están presentes en una gran variedad de medicamentos que derivan de plantas y también, se producen endógenamente en tejidos humanos y animales como producto del metabolismo secundario.<sup>1,2,3</sup> Poseen diversidad en cuanto a sus propiedades biológicas como hipotensor, alucinógeno o acciones antimicrobianas<sup>4</sup> y tremorogénesis.<sup>5,6</sup> Son capaces de unirse a receptores de la benzodiazepina y también, se han propuesto como ligandos endógenos para receptores de imidazolina. Recientemente, se ha demostrado que el HNO y otras  $\beta$ -carbolinas interfieren con la acción de las especies

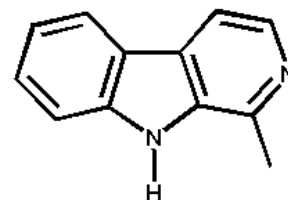
reactivas de oxígeno, protegiendo el sistema nervioso<sup>7</sup> y que este comportamiento se debe a sus propiedades antioxidantes.<sup>8</sup> El análisis de alcaloides de  $\beta$ -carbolina puede llevarse a cabo por HPLC con fluorimetría,<sup>9</sup> espectrofotométrica UV-Vis y detección de espectrometría de masas.<sup>10</sup> Dado que la HNA puede ser un metabolito de HNO,<sup>6</sup> su separación es de interés.



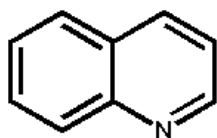
CARBAZOL



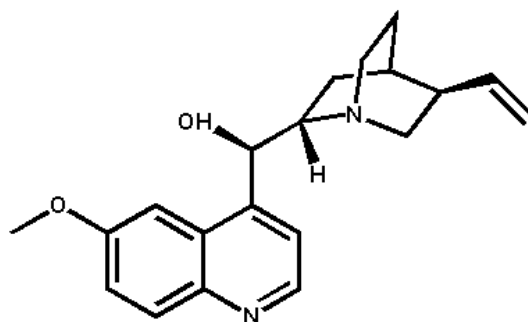
HARMINA



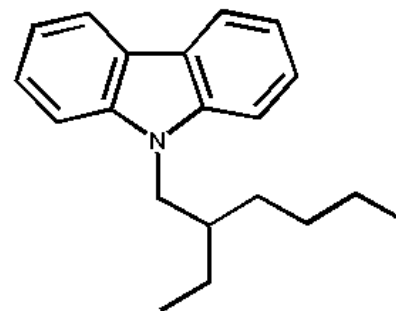
HARMANO



QUINOLINA



QUININA



9-(2-ETILHEXIL)-CARBAZOL

**Figura 6.0:** Estructura de carbazol (CZL) y quinolina (QUI) y algunos compuestos naturales que poseen en su estructura estos núcleos.

La HNA es un alcaloide alucinógeno encontrado en la semilla de *Peganum harmala* y *Banisteriopsis caapi*, que se utilizaban tradicionalmente para rituales y preparaciones medicinales en el Medio Oriente, Asia Central y América del Sur.<sup>11,12</sup> En los últimos años han sido revelados una amplia gama de efectos farmacológicos de la HNA, como antioxidación,<sup>13</sup> antigenotoxicidad y también, con efectos como antidiabético.<sup>14,15</sup> Algunos hallazgos preclínicos demostraron que la HNA tiene posibles actividades similares a los antidepresivos en casos agudos y crónicos.<sup>16,17,18</sup> Además, han sido evidenciadas correlaciones más fuertes entre HNA y la depresión por estudios en pacientes deprimidos, en el que una dosis única de ayahuasca, una planta alucinógena que contiene HNA, produce efectos rápidos y sostenidos similares

a los antidepresivos.<sup>19</sup> También hay algunos informes sobre las acciones cardiovasculares de estos alcaloides presentes en las semillas de harmala. Por ejemplo, se ha informado que la HNA reduce la presión arterial vascular sistémica y periférica total, pero las disminuciones provocadas por HNA son, frecuentemente, seguidos de un aumento secundario.<sup>20</sup>

Por su parte, la quinina (QNA) o también llamada chinchona, es un alcaloide natural, blanco y cristalino, con propiedades antipiréticas, antipalúdicas y analgésicas producido por algunas especies del género Chinchona.<sup>21</sup> La QNA era el principal compuesto empleado en el tratamiento de la malaria hasta que fue sustituido por otros medicamentos sintéticos más eficaces, como la quinacrina, cloroquina y primaquina.<sup>22</sup> La QNA se utiliza todavía en el tratamiento de la malaria resistente.<sup>23</sup> También, se intentó utilizar para tratar pacientes infectados con priones, pero con un éxito limitado. Es un compuesto empleado frecuentemente en la adulteración de la heroína. En gastronomía, la QNA se usa como potenciador del sabor en el agua tónica, confiriéndole su característico sabor amargo.<sup>24</sup> Debido a los efectos secundarios de altas dosis de QNA, su concentración se ha limitada por la FDA a un máximo de 83 ppm. Este valor es, aproximadamente, un cuarto del empleado terapéuticamente y se ha visto que a estas dosis no tiene ningún efecto perjudicial para la salud, más bien lo contrario. La tónica, aparte de aportar energía, por su contenido en QNA, tiene ciertas propiedades: induce la secreción de las glándulas salivares y gástricas, a la que sigue una vascularización de la mucosa gástrica y cierto grado de actividad de la pared muscular del estómago; de esta forma se refuerza el apetito y la digestión resulta más "rápida y completa", confiriendo a la tónica sus propiedades digestivas.<sup>25</sup>

Por último, el 9-(2-etilhexil)-Carbazol (EHC) es un compuesto derivado del núcleo de carbazol (ver Figura 6.0) que presenta interesantes propiedades, las que han permitido el desarrollo de diodos orgánicos emisores de luz (OLED).<sup>26</sup> Presenta potenciales características dado que es posible su empleo en el diseño de materiales prometedores en electrónica orgánica<sup>27</sup> y en la optimización de la gama de colores, reduciendo el consumo de energía y

aumentando la vida útil de los componentes activos.<sup>28</sup> El desarrollo de OLED azules de alta eficiencia atrae una atención especial porque sus características hasta ahora son inferiores a las de rojo o los verdes.<sup>26,29</sup> El ancho de banda de semiconductores orgánicos como derivados de carbazol utilizados para capas emisoras de luz azul,<sup>30,31</sup> a menudo tiene un problema relacionado con la inyección eficiente de portadores de carga (electrones y agujeros) en la capa activa del dispositivo.<sup>32</sup> Por otra parte, muchos de los materiales emisores de color azul son morfológica y térmicamente inestables.<sup>33</sup> La formación de OLED con espectros de emisión en ultravioleta o región casi ultravioleta sigue siendo un desafío.<sup>34</sup> Si fuese posible resolver este problema, permitiría la elaboración de OLED que presenten una gran expansión de la gama de colores y también, la fabricación de dispositivos emisores de color blanco "natural".<sup>35</sup>

El 3,6-di(9-carbazolilo)-9-(2-etilhexil) carbazol, derivado del EHC, fue utilizado con éxito en materiales para el desarrollo de un dispositivo orgánico azul de electrofosforescencia (PHOLED).<sup>36</sup> La implementación práctica de PHOLED en tecnologías de visualización está asociada con algunas dificultades debido a los efectos de concentración de dopantes en la reproducibilidad del color de emisión y la eficiencia de luminancia de dispositivos.<sup>36</sup>

También, el número de fotorrefractivos poliméricos investigados como materiales avanzados para aplicaciones en optoelectrónica, ha aumentado rápidamente y han causado un interés cada vez mayor tanto de académicos como de laboratorios de investigación industriales. Algunos polímeros fotorrefractivos han sido considerados como candidatos prometedores para el almacenamiento de datos holográficos y el procesamiento de imágenes en aplicaciones en tiempo real. Hasta la fecha, poli(N-vinilcarbazol) y los compuestos a base de [metil(3-carbazol-9-ilpropil)-siloxano], han sido el principal foco de interés en esta área, junto con varios otros químicos, tales como cromóforos ópticos no lineales (NLO), plastificantes, y fotosensibilizadores.<sup>37</sup>

## 6.2. OBJETIVOS

---

En esta parte del trabajo de tesis, se propuso evaluar la formación de complejos del tipo sustrato-receptor entre las aminas heterocíclicas derivadas de los núcleos de carbazol (CZL) y de quinolina (QUI), con diferentes receptores macrocíclicos (ciclodextrinas y calixarenos), con el objetivo de analizar la posibilidad de implementar nuevos métodos de análisis.

Específicamente se propuso:

- ❖ Caracterizar mediante espectroscopia UV-visible y de fluorescencia a las aminas heterocíclicas: quinina (QNA), harmano (HNO), harmina (HNA), 9-(2-etilhexil)-carbazol (EHC).
- ❖ Evaluar las interacciones sustrato-receptor entre las aminas heterocíclicas y los receptores ciclodextrinas  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD, HP $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD, Me- $\beta$ -CD y de los receptores p-sulfonatocalix[n]arenos CA[6]S y CA[8]S, mediante las espectroscopias UV-visible y de emisión de fluorescencia.
- ❖ Determinar las constantes de asociación entre sustrato y receptor y elucidar los mecanismos involucrados en las interacciones.
- ❖ Analizar el efecto atribuible a los sustituyentes presentes en las aminas heterocíclicas quinina (QNA), harmano (HNO), harmina (HNA), 9-(2-etilhexil)-carbazol (EHC), respecto al comportamiento observado para los núcleos de carbazol (CZL) y de quinolina (QUI), según corresponda.

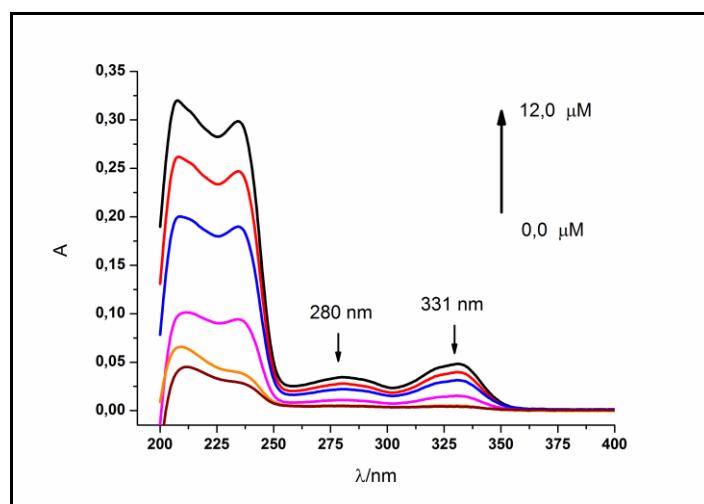
## 6.3 RESULTADOS y DISCUSIÓN

En primer lugar, todas las aminas heterocíclicas, se caracterizaron individualmente por espectroscopia UV-visible y por F. Luego, se examinaron los efectos que los receptores macrocíclicos producen sobre ellas. Para finalizar, se determinaron las constantes de asociación entre cada sistema sustrato-receptor.

### 6.3.1. Caracterización espectroscópica de aminas heterocíclicas

#### 6.3.1.1. Quinina

Los resultados obtenidos por espectroscopia UV-visible permitieron la determinación de los coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) del compuesto en los valores de máxima absorción. Los valores obtenidos fueron  $(3,1 \pm 0,1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $(4,3 \pm 0,1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 280 nm y 331 nm, respectivamente. En la Figura 6.1 se pueden ver los espectros de absorción obtenidos y las longitudes de onda elegidas para las determinaciones anteriores.

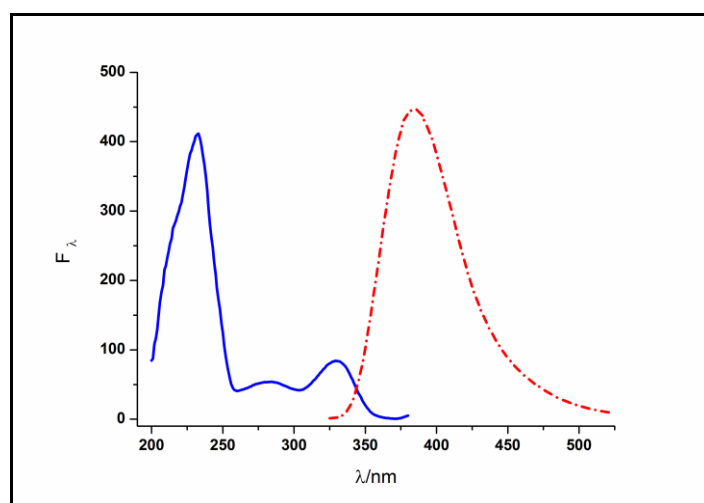


**Figura 6.1:** Espectros de absorción de QNA. Intervalo de concentración: (0 – 12)  $\mu\text{M}$ . 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$  y b = 1cm.

Luego, se midieron sus espectros de emisión y de excitación de F y con ellos se determinaron los mejores parámetros experimentales. La concentración óptima de QNA para obtener una emisión de F con la intensidad adecuada, fue de 6,5  $\mu\text{M}$ . Con ese valor fue posible evaluarla en presencia de los receptores macrocíclicos. En la Figura 6.2 se pueden ver los espectros



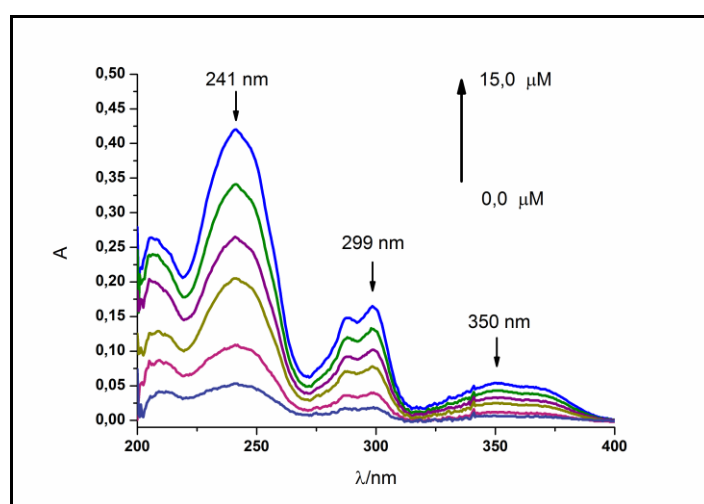
obtenidos, y en donde se indican las longitudes de onda determinadas para la excitación y emisión del analito.



**Figura 6.2:** Espectros de excitación (—) (obtenido a  $\lambda_{\text{emi}} = 384 \text{ nm}$ ) y emisión (-.-.-) (obtenido a  $\lambda_{\text{exc}} = 331 \text{ nm}$ ) de F de QNA  $6,5 \mu\text{M}$ . 95,0 % v/v de buffer fosfato de  $\text{pH} = 6,994$  y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Potencia de detector 400 V y  $b = 1 \text{ cm}$ .

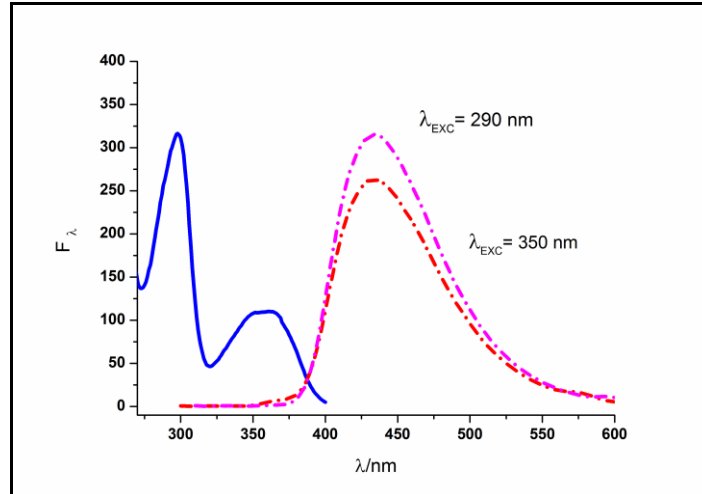
### 6.3.1.2. *Harmano*

En lo que respecta a este analito, los espectros de absorción obtenidos se muestran en la Figura 6.3. Los valores calculados de los coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) del compuesto fueron  $(28 \pm 1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $(11,1 \pm 0,5) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $(3,6 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 241 nm, 299 nm y 350 nm, respectivamente.



**Figura 6.3:** Espectros de absorción de HNO. Intervalo de concentración: (0 – 15)  $\mu\text{M}$ . 95,0 % v/v de buffer fosfato de  $\text{pH} = 6,994$  y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $b = 1 \text{ cm}$ .

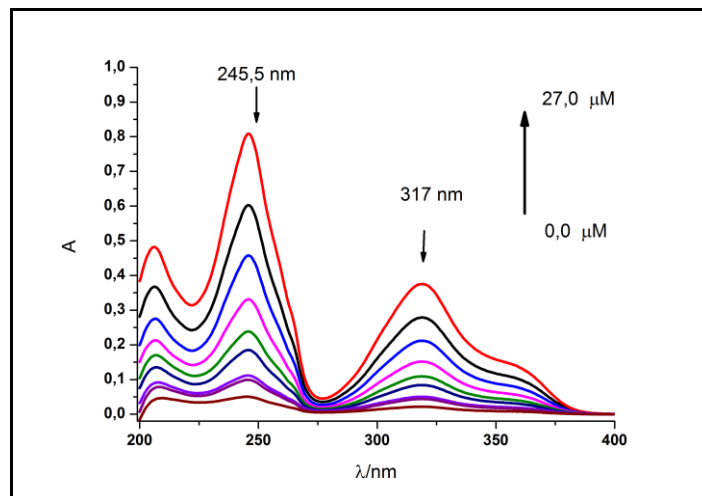
Luego, de sus espectros de emisión y de excitación de F, se determinaron los mejores parámetros experimentales, para un nivel de concentración 4,3  $\mu\text{M}$  de HNO. En la Figura 6.4 se pueden ver los espectros obtenidos y en los cuales se indican las longitudes de onda determinadas para la excitación y emisión del analito.



**Figura 6.4:** Espectros de excitación (—) (obtenido a  $\lambda_{\text{emi}} = 433 \text{ nm}$ ) y emisión (-.-.-) (obtenidos a  $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ ) de F de HNO 4,3  $\mu\text{M}$ . 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$ . Potencia de detector 400 V y  $b = 1 \text{ cm}$ .

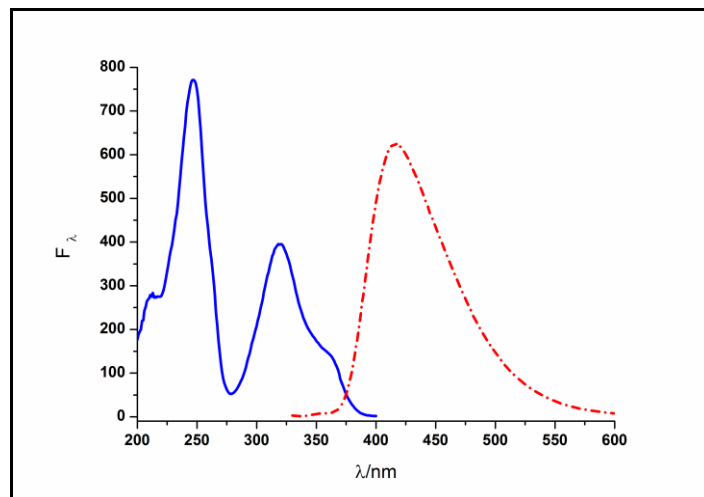
### 6.3.1.3. Harmina

A partir de los espectros de absorción, se calcularon los coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) cuyos valores fueron de  $(30,8 \pm 0,8) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $(14,2 \pm 0,3) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 245,5 nm y 317 nm, respectivamente. Los espectros de absorción se muestran en la Figura 6.5.



**Figura 6.5:** Espectros de absorción de HNA. Intervalo de concentración: (0 – 27)  $\mu\text{M}$ . 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$  y  $b = 1 \text{ cm}$ .

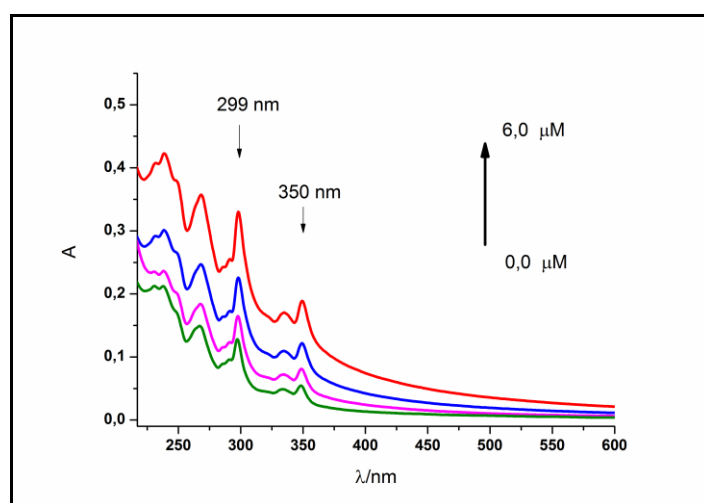
También, se obtuvieron los espectros de emisión y de excitación de F, para un nivel de concentración 1,5  $\mu\text{M}$  de HNA. En la Figura 6.6 se pueden ver los espectros obtenidos y en donde se indican las longitudes de onda determinadas para la excitación y emisión del analito.



**Figura 6.6:** Espectros de excitación (—) (obtenido a  $\lambda_{\text{emi}} = 415 \text{ nm}$ ) y emisión (-.-.-) (obtenido a  $\lambda_{\text{exc}} = 317 \text{ nm}$ ) de F de HNA 1,5  $\mu\text{M}$ . 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$ . Potencia de detector 500 V y b = 1 cm.

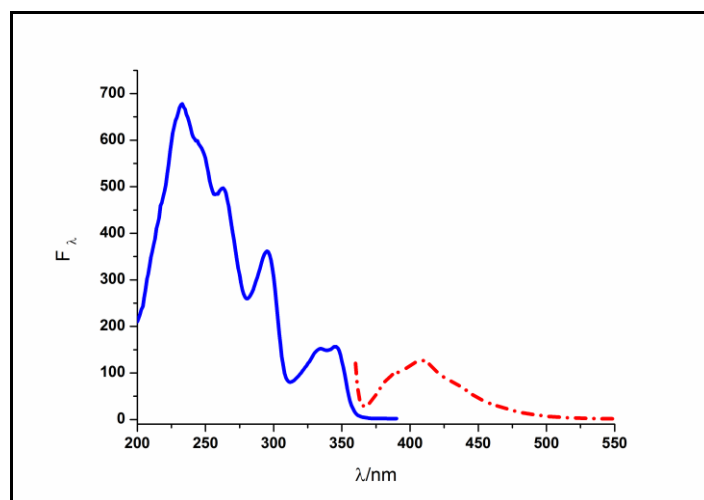
#### 6.3.1.4. 9-(2-etilhexil)-Carbazol

Con respecto a EHC, los espectros de absorción obtenidos se muestran en la Figura 6.7. Los valores determinados de coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) fueron de  $(12,7 \pm 0,4) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $(7,7 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 299 nm y 350 nm, respectivamente.



**Figura 6.7:** Espectros de absorción de EHC. Intervalo de concentración: (1 – 8)  $\mu\text{M}$ . 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$  y b = 4 cm.

Los espectros de emisión y de excitación de F obtenidos, se determinaron para un nivel de concentración 5,5  $\mu\text{M}$  de EHC. En la Figura 6.8 se pueden ver los dichos espectros y las longitudes de onda determinadas para la excitación y emisión del analito.



**Figura 6.8:** Espectros de excitación (—) (obtenido a  $\lambda_{\text{emi}} = 408 \text{ nm}$ ) y emisión (-.-.-) (obtenido a  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ ) de F de EHC 5,5  $\mu\text{M}$ . 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C. Potencia de detector 450 V y b = 1cm.

#### 6.3.1.5. Interpretación general de los espectros obtenidos

Esta caracterización espectroscópica de los sustratos permitió analizar la información asociada a la estructura, la energía y la dinámica de los distintos estados electrónicos de cada molécula.<sup>38</sup>

En todos los casos estudiados hasta ahora, los fluoróforos nativos son compuestos aromáticos. Las transiciones más bajas en estos hidrocarburos aromáticos son del tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , las cuales se caracterizan por altos coeficientes de absorptividad molar, tiempos de vida moderadamente cortos (unos pocos nanosegundos) y rendimientos cuánticos relativamente bajos.<sup>39</sup> Cuando un heteroátomo está involucrado en el sistema  $\pi$ , una transición del tipo  $n \rightarrow \pi^*$  es responsable del proceso. Estas transiciones se caracterizan por tener tiempos de vida al menos 100 veces mayores (alrededor de  $10^{-6} \text{ s}$ ) que las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Los  $\phi$  son muy bajos y en consecuencia este proceso es muy lento para competir efectivamente con las desactivaciones no radiactivas. En

general, un incremento en la extensión del sistema electrónico  $\pi$  (mayor conjugación) producirá un corrimiento batocrómico en los espectros de absorción y de fluorescencia y un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\phi$ ).<sup>40</sup>

Los espectros de absorción observados para estos compuestos, son los característicos para hidrocarburos aromáticos y tienen coeficientes de absorptividad molar relativamente altos respecto a otros HAPN.<sup>39</sup> Las transiciones son las esperadas para estas estructuras del tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ . En tanto que la banda de absorción intensa a 280 nm de carácter  $\pi \rightarrow \pi^*$ , solapa la transición de más baja energía  $n \rightarrow \pi^*$ .

Por su parte, los espectros de emisión obtenidos para los diferentes fluoróforos presentan ciertas características generales, entre ellas, que la banda de emisión de una determinada transición electrónica se desplaza hacia longitudes de onda mayores respecto a la banda de absorción ( $\lambda_{max}^{em} > \lambda_{exc}$ ).<sup>38</sup> Este desplazamiento se denomina corrimiento de Stokes y en general el perfil del espectro de emisión de fluorescencia corresponde a la imagen especular de la banda de absorción (o de excitación) de la transición  $S_0 \rightarrow S_1$  (Regla de Kasha)<sup>40</sup>, donde  $S_0$  corresponde el estado basal y  $S_1$  el estado electrónico singlete excitado, y además no varía con la longitud de onda de excitación (Regla de Vavilov).<sup>38,40</sup> Esto se demuestra para todos los núcleos en los espectros de emisión de F obtenidos, en donde se observa una estructura amplia correspondiente también a los parámetros instrumentales (entre ellos el ancho de rendija de excitación de 10,0 nm) en los que se obtuvieron dichos espectros.<sup>40</sup>

### 6.3.2. Estudio de los efectos de receptores macrocíclicos sobre las propiedades espectroscópicas de Quinina, Harmano, Harmina y 9-(2-etilhexil)-Carbazol.

#### 6.3.2.1. Efecto de Calixarenos

Para evaluar el efecto de las CA[n]S, se obtuvieron los espectros UV-visible en ausencia y en presencia de estos receptores. Específicamente, en esta sección, se realizaron procedimientos similares a los descritos anteriormente, se emplearon los derivados p-sulfonatocalix[n]arenos, CA[6]S y CA[8]S, los cuales fueron caracterizados previamente y por medio de sus coeficientes de absorción molar, se controlaron sus concentraciones. Con las correspondientes concentraciones de analitos, se prepararon las soluciones en presencia de CA[6]S y CA[8]S, a una concentración de 80  $\mu\text{M}$ . A todas las soluciones se les midieron los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia.

Los espectros de absorción obtenidos para todos los sistemas, no presentaron modificaciones sobre los espectros de los heterociclos, es decir que los cambios resultaron pocos significativos y aditivos en todos los casos. Por su parte, los cambios observados en los espectros de emisión fluorescente, se resumen en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1: Efecto de Calixarenos				
	*QNA 7,0 $\mu\text{M}$	*HNO 6,0 $\mu\text{M}$	*HNA 2,5 $\mu\text{M}$	*EHC 6,5 $\mu\text{M}$
HCA[6]S 80 $\mu\text{M}$	$F/F_0 = 0,51$	$F/F_0 = 0,86$	$F/F_0 = 0,77$	$F/F_0 = 0,74$
HCA[8]S 80 $\mu\text{M}$	$F/F_0 = 0,37$	sin cambios**	$F/F_0 = 0,64$	sin cambios**

\* QNA ( $\lambda_{\text{exc}} = 331 \text{ nm}$ ), HNO ( $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ ), HNA ( $\lambda_{\text{exc}} = 317 \text{ nm}$ ) y EHC ( $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ ), en presencia (F) y en ausencia ( $F_0$ ) de calixarenos.  
Medio: 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$  y b = 1cm.

\*\* Sin cambios respecto a la señal de la referencia utilizada para cada sustrato.

Como puede observarse en ella, ambos R produjeron quenching de la F de todos los heterociclos. Sin embargo, los mayores cambios se obtuvieron con HCA[6]S, excepto para QNA. Para HNO y EHC, el HCA[8]S produjo cambios pocos significativos, es decir, no se observó más del 5 % del cambio en la señal espectroscópica.

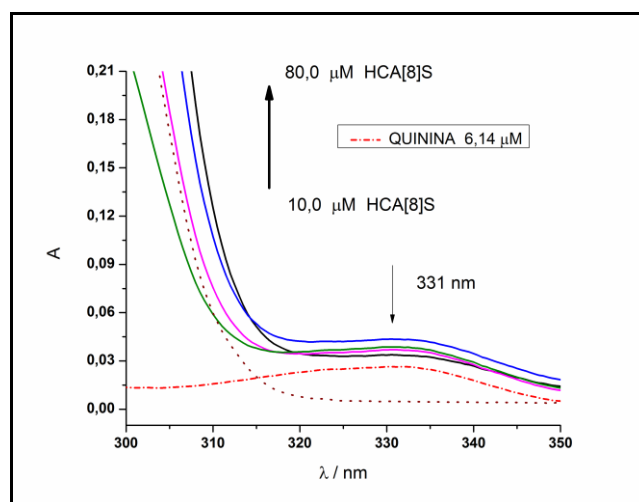
#### *6.3.2.2. Determinación de las constantes de asociación de Quinina y Harmina con Calixarenos*

Para evaluar el efecto de los CA[n]S sobre las propiedades espectroscópicas de absorción de los heterociclos nitrogenados, se obtuvieron los espectros UV-visible en ausencia y en presencia de estos receptores. Para ello, las soluciones se prepararon a partir de los ácidos de los psulfonatocalix[n]arenos CA[6]S y CA[8]S, en un intervalo de concentración de (0 – 80)  $\mu\text{M}$ , manteniendo constantes las concentraciones de los analitos según corresponda. En todos los casos se midieron los espectros de absorción y de emisión de F.

La determinación de las constantes de asociación por F, se llevó a cabo siguiendo los procedimientos indicados en la sección 3.2.4 y los ajustes se realizaron empleando el modelo de Stern-Volmer (ecuación 3.10). En todos los casos, se recalcularon las constantes de asociación en concentraciones en el equilibrio de CA[n]S, como se indicó en la sección 3.2.5.

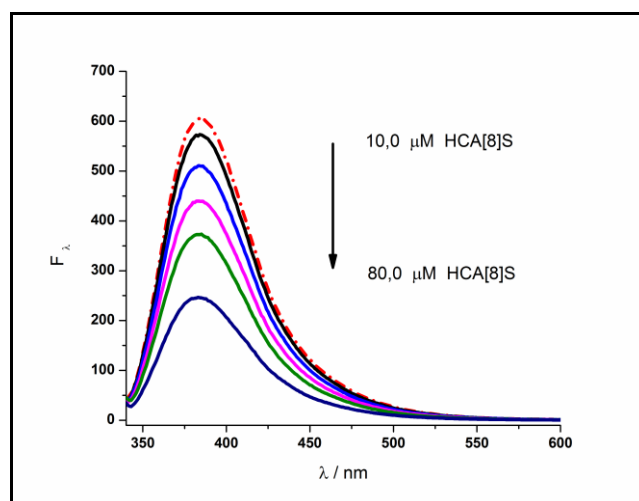
#### **Sistema Quinina – p-sulfonatocalix[8]areno**

Los resultados encontrados para el sistema QNA con CA[8]S, por espectroscopia UV-visible, presentaron cambios pocos significativos y efectos aditivos en la mayoría de los casos, como puede observarse en los espectros de la Figura 6.9.



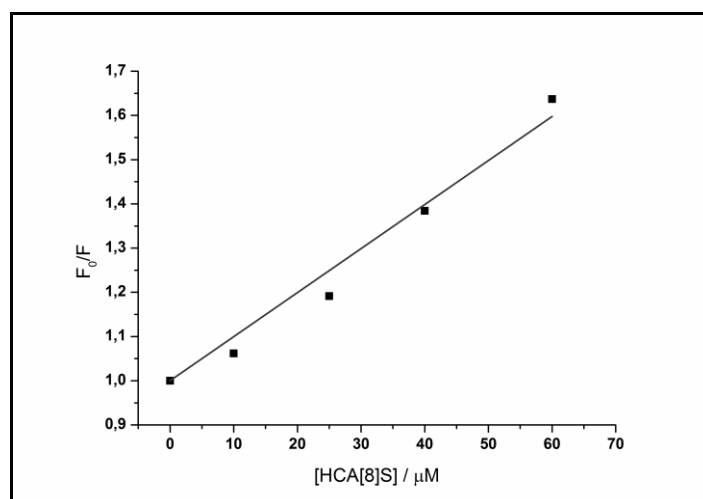
**Figura 6.9:** Espectros de absorción de QNA (---●---), y en presencia de HCA[8]S en un intervalo de concentración de (10,0 – 80,0)  $\mu\text{M}$ . [HCA[8]S] = 80,0  $\mu\text{M}$  (●●); 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$  y  $b = 1$  cm.

A partir de los espectros de emisión de F, se pudo determinar la  $K_A$ , acorde al modelo de Stern-Volmer (ver ecuación 3.10), para el sistema supramolecular en estudio, dado que la emisión del analito disminuye conforme aumenta la concentración del receptor. El mencionado efecto puede observarse en los espectros que se muestran en la Figura 6.10 y la curva de ajuste correspondiente, de la Figura 6.11 y del cual se obtuvo un valor de  $(10,0 \pm 0,5) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .



**Figura 6.10:** Efecto de HCA[8]S sobre la emisión de F de QNA (---●---) 6,14  $\mu\text{M}$ . Intervalo de concentración de HCA[8]S: (10 - 80)  $\mu\text{M}$ .  $\lambda_{\text{EXC}} = 331,0$  nm. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$ . Potencia de detector 500 V y  $b = 1$  cm.

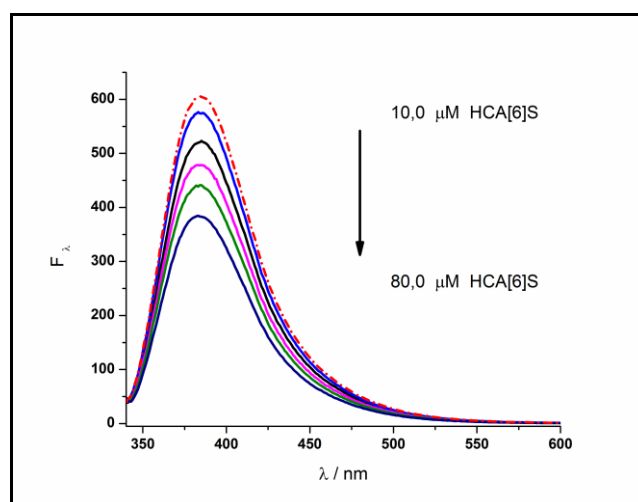




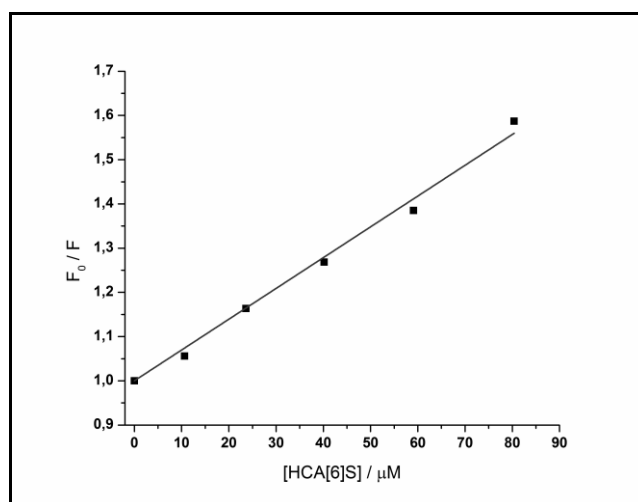
**Figura 6.11:** Dependencia de  $F_0/F$  de QNA ( $F_0$ ) con la concentración en presencia de concentraciones variables de HCA[8]S ( $F$ ). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C.  $[\text{QNA}] = 6,14 \mu\text{M}$ ; variando  $[\text{HCA[8]S}] = (10 - 80) \mu\text{M}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}} = 331,0 \text{ nm}$ ; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 500 V;  $b = 1,0 \text{ cm}$ .

### Sistema Quinina – p-sulfonatocalix[6]areno

Los espectros de emisión obtenidos (ver Figura 6.12) permitieron determinar la  $K_A$  acorde al modelo de Stern-Volmer (ver ecuación 3.10). Dicho ajuste se muestra en la Figura 6.13, y del cual se obtuvo un valor de  $(7,0 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .



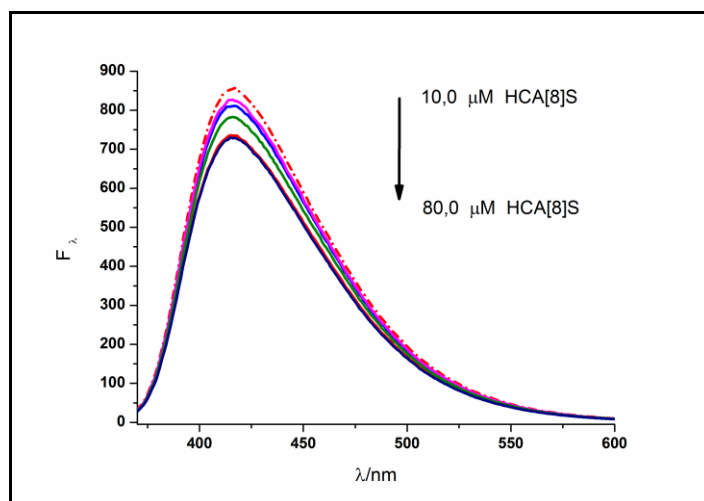
**Figura 6.12:** Efecto de HCA[6]S sobre la emisión de F de QNA (---) 6,14  $\mu\text{M}$ . Intervalo de concentración de HCA[6]S: (10 - 80)  $\mu\text{M}$ .  $\lambda_{\text{EXC}} = 331,0 \text{ nm}$ . 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C. Potencia de detector 500 V y  $b = 1 \text{ cm}$ .



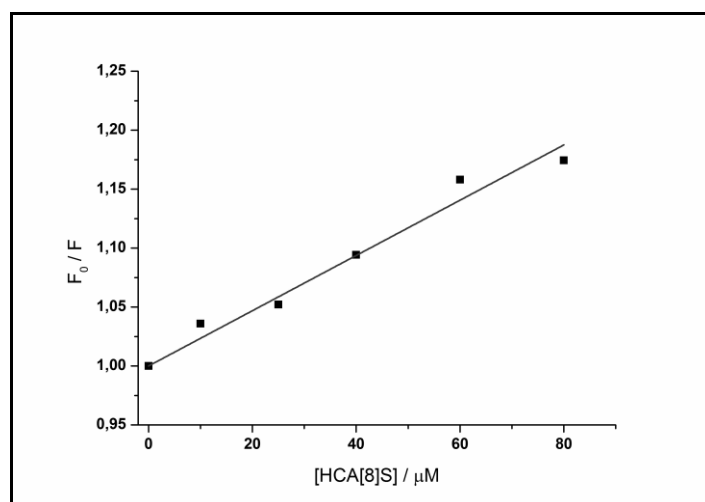
**Figura 6.13:** Dependencia de  $F_0/F$  de QNA ( $F_0$ ) con la concentración variables de HCA[6]S ( $F$ ). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C. [QNA] = 6,14  $\mu\text{M}$ ; variando [HCA[6]S] = (10 - 80)  $\mu\text{M}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}}$  = 331,0 nm; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 500 V; b = 1,0 cm.

### Sistema Harmina – p-sulfonatocalix[8]areno

Los espectros de emisión obtenidos (ver Figura 6.14) permitieron determinar la  $K_A$  mediante el modelo de ajuste de Stern-Volmer (ver ecuación 3.10). Dicho ajuste se muestra en la Figura 6.15, y del cual se obtuvo un valor de  $(2,3 \pm 0,1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .



**Figura 6.14:** Efecto de HCA[8]S sobre la emisión de F de HNA (---) 2,17  $\mu\text{M}$ . Intervalo de concentración de HCA[8]S: (10 - 80)  $\mu\text{M}$ .  $\lambda_{\text{EXC}}$  = 325,0 nm. 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C. Potencia de detector 500 V y b = 1cm.



**Figura 6.15:** Dependencia de  $F_0/F$  con la concentración de HNA ( $F_0$ ) en presencia de concentraciones variables de HCA[8]S ( $F$ ). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C.  $[\text{HNA}] = 2,17 \mu\text{M}$ ; variando  $[\text{HCA}[8]\text{S}] = (10 - 80) \mu\text{M}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}} = 325,0 \text{ nm}$ ; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 500 V;  $b = 1,0 \text{ cm}$ .

De esta manera, se determinaron los valores de  $K_A$  para los sistemas de QNA y HNA con CA[8]S y el sistema QNA con CA[6]S. Los resultados obtenidos para estas constantes de complejación, se resumen en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2: Valores de $K_A / \text{M}^{-1}$ de Calixarenos		
	QUININA ( $\times 10^3$ )	HARMINA ( $\times 10^3$ )
CA[6]S	(7,0 ± 0,2)	<sup>a</sup>
CA[8]S	(10,0 ± 0,5)	(2,3 ± 0,1)

<sup>a</sup>nd= no determinado.

Vale aclarar que no fue posible la determinación de  $K_A$  con los sustratos HNO y EHC, dado que no presentaron ningún tipo de tendencia con la variación de concentración de los receptores utilizados e incluso los cambios observados fueron pocos significativos para el sistema con HNO, y por lo tanto, no fue posible ajustar con un modelo adecuado.

### 6.3.2.3. Efecto de Ciclodextrinas

Para evaluar el efecto de las CD, se llevaron a cabo procedimientos similares a los descritos anteriormente, es decir, se analizaron los espectros UV-visible en ausencia y en presencia de estos receptores. Específicamente, se emplearon en este estudio,  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y su especie modificada, la HP- $\beta$ -CD. Cabe aclarar que con  $\gamma$ -CD y Me- $\beta$ -CD no se pudieron encontrar óptimas condiciones, por presentar ambas CD absorbancias elevadas que producían grandes interferencias, sobre la señal de los heterociclos.

En primer lugar, se examinaron los efectos de las CD sobre los espectros de absorción de QNA, HNO, HNA y EHC. Se emplearon ciclodextrinas en concentraciones cercanas a su límite de solubilidad en medios acuosos (~ 10,0 mM).

Luego, se midieron los espectros de emisión de F para todos los sistemas. Se analizaron los resultados obtenidos, comparando también, los efectos observados en los espectros de absorción. Esta exploración nos permitió visualizar los sistemas de manera individual y así poder seleccionar aquellos que reflejaran los mayores cambios espectroscópicos, lo que indicaría la existencia de posibles interacciones, y aportar además evidencias sobre la formación de complejos huésped-receptor.

Los resultados obtenidos de la evaluación de los espectros de absorción, no mostraron cambios significativos en la señal de los heterociclos, y en todos los sistemas, los efectos resultaron aditivos. Respecto a los espectros de emisión de F, los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3: Efecto de Ciclodextrinas

		*QNA 7,0 $\mu$ M	*HNO 6,0 $\mu$ M	*HNA 2,5 $\mu$ M	*EHC 6,5 $\mu$ M
$\alpha$ -CD	1 mM	F/F <sub>0</sub> = 1,20	F/F <sub>0</sub> = 1,36	F/F <sub>0</sub> = 1,41	F/F <sub>0</sub> = 1,22
	10 mM	sin cambios**	sin cambios**	sin cambios**	F/F <sub>0</sub> = 0,71
$\beta$ -CD	1 mM	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	F/F <sub>0</sub> = 1,07
	10 mM	sin cambios**	F/F <sub>0</sub> = 0,85	sin cambios**	F/F <sub>0</sub> = 0,77
HP- $\beta$ -CD	1 mM	F/F <sub>0</sub> = 1,18	F/F <sub>0</sub> = 1,16	F/F <sub>0</sub> = 1,26	F/F <sub>0</sub> = 0,85
	10 mM	F/F <sub>0</sub> = 0,70	F/F <sub>0</sub> = 0,81	F/F <sub>0</sub> = 0,68	F/F <sub>0</sub> = 0,71

\* QNA ( $\lambda_{exc} = 331$  nm), HNO ( $\lambda_{exc} = 350$  nm), HNA ( $\lambda_{exc} = 317$  nm) y EHC ( $\lambda_{exc} = 350$  nm), en presencia (F) y en ausencia (F<sub>0</sub>) de ciclodextrinas.

Medio: 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C y b = 1 cm.  
nd<sup>a</sup>= no determinado.

\*\* Sin cambios respecto a la señal de la referencia utilizada para cada sustrato.

Como puede observarse, los mayores cambios se obtuvieron con  $\alpha$ -CD e HP- $\beta$ -CD a concentraciones 1 mM, en los que se observó una exaltación de la fluorescencia de los analitos en presencia de estos receptores, excepto para EHC en el que se observó un ligero quenching.

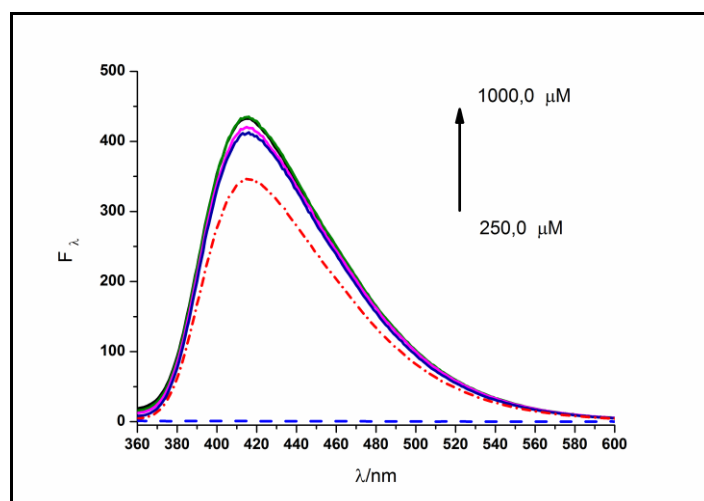
#### 6.3.2.4. Determinación de las constantes de asociación de Quinina, Harmano y Harmina con Ciclodextrinas

En esta sección se siguieron procedimientos similares a los descritos en las secciones anteriores, en los que las concentraciones de las ciclodextrinas,  $\alpha$ -CD e HP- $\beta$ -CD, se hicieron variar en un intervalo de concentración de (0 – 1) mM y manteniendo constantes las respectivas concentraciones de los analitos. En todos los casos se midieron los espectros de absorción y de emisión fluorescente.

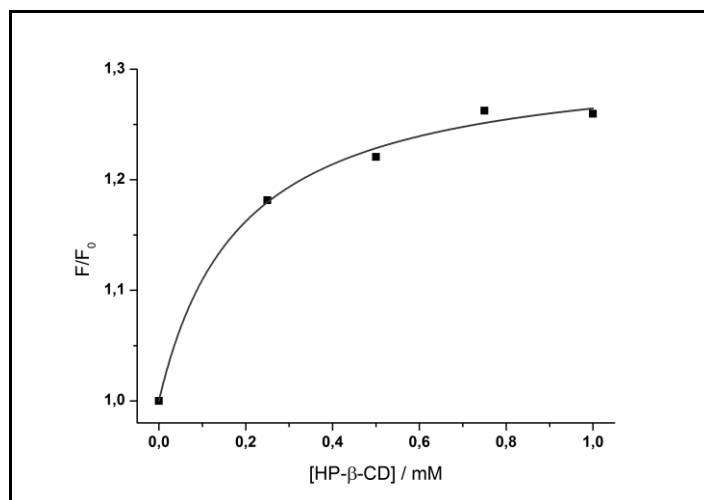
A continuación, se muestran todos los ajustes correspondientes a los diferentes sistemas con CD para la determinación de las  $K_A$ , los coeficientes de relaciones de rendimientos cuánticos  $\phi$  y los espectros de F que permitieron su determinación. La ecuación 3.09 es el modelo seguido para los correspondientes ajustes.

**Sistema Harmina – hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina**

Los resultados encontrados por espectroscopia UV-visible resultaron pocos significativos e incluso cuasi aditivos, y por tanto no se muestran los espectros. A partir de los espectros de emisión de F, se pudo determinar la  $K_A$  (ver Tabla 6.4) para el sistema supramolecular en estudio, dado que la emisión del analito aumenta conforme aumenta la concentración del receptor. El mencionado efecto puede observarse en los espectros de la Figura 6.16 y la dependencia de  $F/F_0$  con la concentración de HP- $\beta$ -CD de la Figura 6.17. Del correspondiente ajuste de datos, se obtuvo un valor de  $K_A$  de  $(5 \pm 1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  y de  $(1,31 \pm 0,09)$  para el coeficiente de relaciones de rendimientos cuánticos de F.



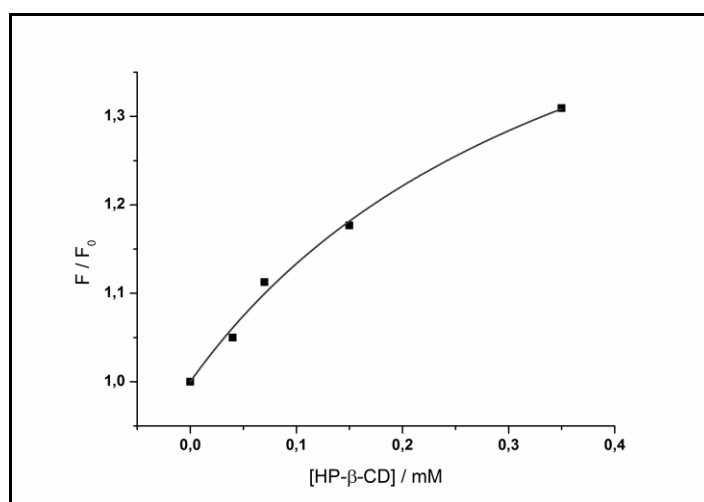
**Figura 6.16:** Efecto de HP- $\beta$ -CD sobre la emisión de F de HNA (---) 2,5  $\mu\text{M}$ , variando la concentración de HP- $\beta$ -CD entre (250 -1000)  $\mu\text{M}$ . [HP-  $\beta$ -CD] = 1000,0  $\mu\text{M}$  (---).  $\lambda_{\text{EXC}} = 317,0$  nm; 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0  $^\circ\text{C}$ . Potencia de detector 450 V y b = 1cm.



**Figura 6.17:** Dependencia de  $F/F_0$  de HNA con la concentración de HP- $\beta$ -CD (**F**). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C. [HNA] = 2,5  $\mu$ M (**F**<sub>0</sub>); [HP-  $\beta$ -CD] = (0 – 1) mM;  $\lambda_{\text{EXC}}$  = 317,0 nm; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 450 V; b = 1,0 cm.

### Sistema Harmano – hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

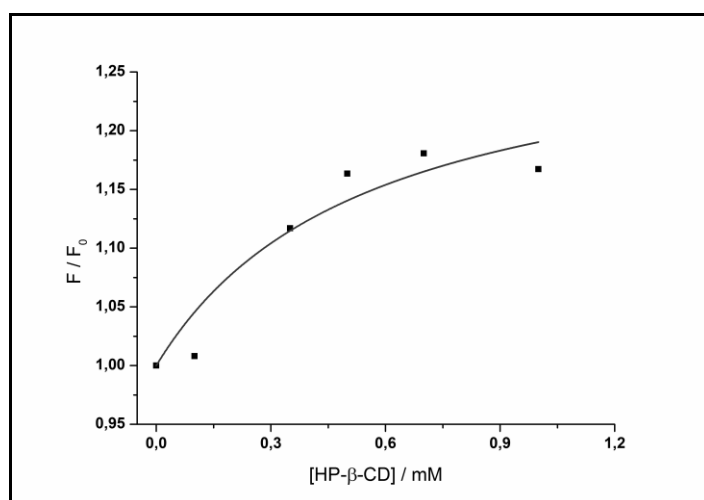
Los espectros de emisión obtenidos mostraron la misma tendencia que el sistema HNA-HP- $\beta$ -CD, lo que permitió determinar la  $K_A$  mediante la ecuación 3.09. La dependencia de  $F/F_0$  con la concentración de HP- $\beta$ -CD se muestra en la Figura 6.18, y del ajuste de los datos, se obtuvo un valor de  $K_A$  de  $(2,6 \pm 0,6) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  y de  $(1,7 \pm 0,7)$  para el coeficiente de relaciones de rendimientos cuánticos de F.



**Figura 6.18:** Dependencia de  $F/F_0$  de HNO con la concentración de HP- $\beta$ -CD (**F**). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C. [HNO] = 7,3  $\mu$ M (**F**<sub>0</sub>); [HP-  $\beta$ -CD] = (0 – 0,4) mM;  $\lambda_{\text{EXC}}$  = 350,0 nm; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 500 V; b = 1,0 cm.

**Sistema Quinina – hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina**

Los espectros de absorción de este sistema, presentaron modificaciones espectrales que resultaron ser poco significativas y por ende no se muestran. Por su parte, los espectros de emisión obtenidos mostraron la misma tendencia que los sistemas de HNA y HNO con HP- $\beta$ -CD, lo que permitió determinar la  $K_A$ . Dicho ajuste se muestra en la Figura 6.19, y del cual se obtuvo un valor para la  $K_A$  de  $(1,8 \pm 0,1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  y de  $(1,2 \pm 0,3)$  para el coeficiente de relaciones de rendimientos cuánticos de F.

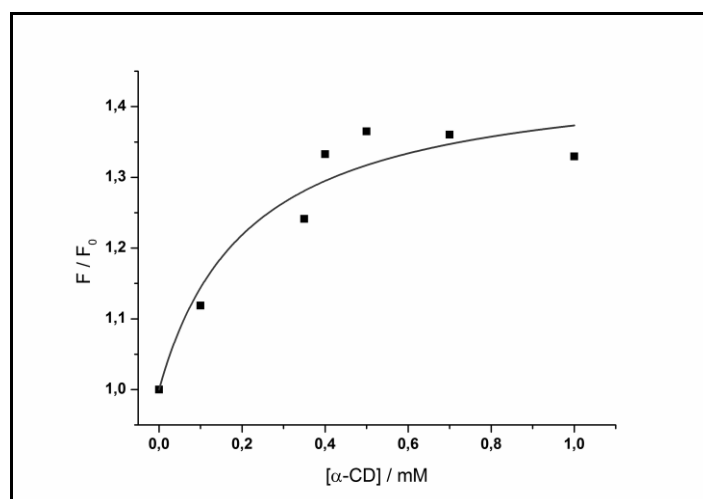


**Figura 6.19:** Dependencia de  $F/F_0$  de QNA con la concentración de HP- $\beta$ -CD (F). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C. [QNA] = 7,7  $\mu\text{M}$  ( $F_0$ ); [HP- $\beta$ -CD] = (0 – 1) mM;  $\lambda_{\text{EXC}} = 331,0 \text{ nm}$ ; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 500 V; b = 1,0 cm.

**Sistema Harmano –  $\alpha$ -ciclodextrina**

Los espectros de absorción de este sistema, resultaron ser pocos significativos y por ende no se muestran. Por su parte, los espectros de emisión obtenidos mostraron la misma tendencia que los sistemas anteriores, lo que permitió determinar la  $K_A$ . Dicho ajuste se muestra en la Figura 6.20, y del cual se obtuvo un valor de  $K_A$  de  $(1,0 \pm 0,3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  y de  $(1,4 \pm 0,2)$  para el coeficiente de relaciones de rendimientos cuánticos de F.

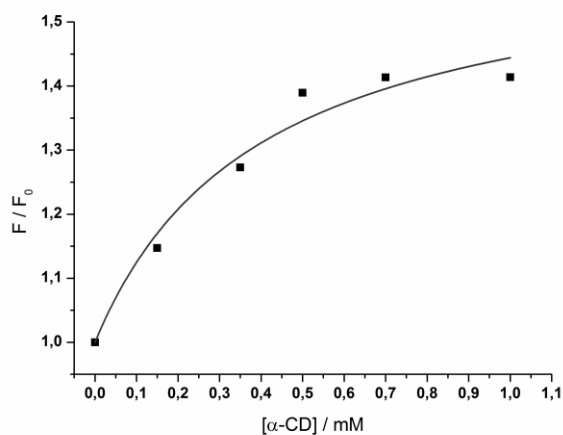




**Figura 6.20:** Dependencia de  $F/F_0$  de HNO con la concentración de  $\alpha$ -CD (**F**). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C.  $[\text{HNO}] = 6,8 \mu\text{M}$  (**F**<sub>0</sub>);  $[\alpha\text{-CD}] = (0 - 1) \text{ mM}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}} = 350,0 \text{ nm}$ ; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 450 V;  $b = 1,0 \text{ cm}$ .

### Sistema Harmina – $\alpha$ -ciclodextrina

De modo similar a todos los sistemas anteriores, los cambios espectrales observados en los espectros de absorción, resultaron ser pocos significativos y por ende no se muestran. De igual forma, los espectros de emisión obtenidos mostraron la misma tendencia que los casos anteriores, lo que permitió determinar la  $K_A$ . La dependencia de  $F/F_0$  con la concentración de  $\alpha$ -CD se muestra en la Figura 6.21, y del ajuste correspondiente, se obtuvo un valor para la  $K_A$  de  $(2,5 \pm 0,9) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  y de  $(1,6 \pm 0,3)$  para el coeficiente de relaciones de rendimientos cuánticos de F.



**Figura 6.21:** Dependencia de  $F/F_0$  de HNA con la concentración de  $\alpha$ -CD (**F**). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C.  $[\text{HNA}] = 2,5 \mu\text{M}$  ( $F_0$ );  $[\alpha\text{-CD}] = (0 - 1)$  mM;  $\lambda_{\text{EXC}} = 317,0$  nm; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 450 V;  $b = 1,0$  cm.

Por lo tanto, se han obtenido los valores de  $K_A$  y los valores de las relaciones de los rendimientos cuánticos de F para cada sistema huésped-receptor. Estos valores se resumen en la Tabla 6.4.

<b>Tabla 6.4: Valores de <math>K_A / \text{M}^{-1}</math> y <math>\Phi</math> de Ciclodextrinas</b>			
	<b>QNA (<math>\times 10^3</math>)</b>	<b>HNO (<math>\times 10^3</math>)</b>	<b>HNA (<math>\times 10^3</math>)</b>
<b><math>\alpha</math>-CD</b>	<sup>a</sup> nd	<b>(1,0 ± 0,3)</b>	<b>(2,5 ± 0,9)</b>
		<b><math>\Phi = (1,4 \pm 0,2)</math></b>	<b><math>\Phi = (1,6 \pm 0,3)</math></b>
<b>HP-<math>\beta</math>-CD</b>	<b>(1,8 ± 0,1)</b>	<b>(2,6 ± 0,6)</b>	<b>(5 ± 1)</b>
	<b><math>\Phi = (1,2 \pm 0,3)</math></b>	<b><math>\Phi = (1,7 \pm 0,6)</math></b>	<b><math>\Phi = (1,31 \pm 0,09)</math></b>

<sup>a</sup> nd= no determinado.

Cabe aclarar que no fue posible la determinación de  $K_A$  con el sustrato EHC, dado que no presentó ningún tipo de tendencia con la variación de concentración de los receptores utilizados, y por lo tanto no fue posible ajustar con un modelo adecuado.

### 6.3.2.5. Relación estequiométrica de los complejos con Ciclodextrinas

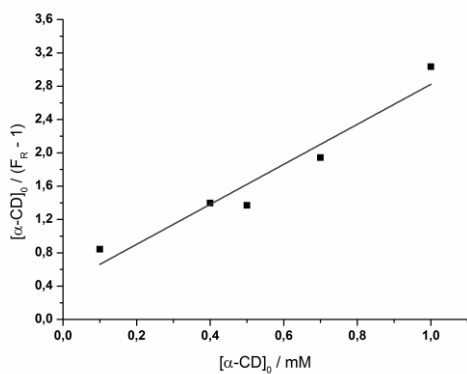
Para corroborar la relación estequiométrica entre los sustratos y las CD, se utilizó la ecuación de la doble recíproca (ecuación 6.01), utilizando las medidas de fluorescencia ( $F_R = F/F_0$ ), que se deriva de la isoterma de asociación (ecuación 3.09) presentada en el capítulo 3. Esta ecuación es empleada para determinar las constantes de asociación por espectroscopia de fluorescencia, pero además también permite evaluar la proporción de sustrato y receptor en la formación de un complejo supramolecular.

$$\frac{[R_0]}{F_R - 1} = \frac{1}{K_A(\emptyset - 1)} + \frac{[R_0]}{(\emptyset - 1)} \quad (6.01)$$

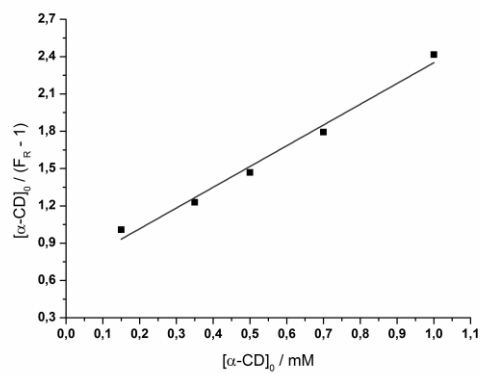
Considerando la ecuación 6.01, si al graficar  $[R]_0/(F_R - 1)$  en función de la concentración de receptor  $[R]_0$  y se obtiene una relación lineal, la estequiometría del complejo huésped-receptor formado, es 1:1. Por el contrario, si en dicho gráfico presenta una curvatura, indicaría que la relación estequiométrica entre el sustrato y el receptor es diferente a una 1:1.

A continuación, en la Figura 6.22, se muestran los gráficos de doble recíproca para la respuesta fluorescente de cada heterociclo con las correspondientes CD, con las que se confirma la estequiometría 1:1 de los complejos huésped-receptor formados, dada su linealidad.

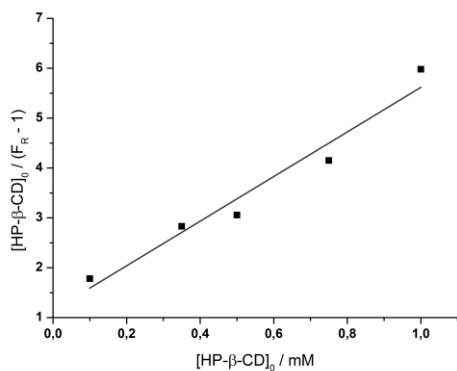
**a**



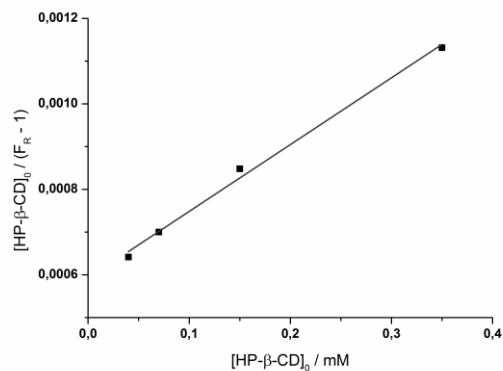
**b**



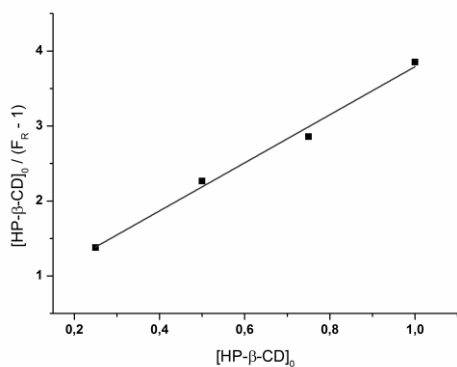
**c**



**d**



**e**



**Figura 6.22:** Gráficos de doble recíproca (ecuación 6.01) con medidas fluorimétricas para confirmación de estequiometría 1:1 de los complejos.

- a.** HNO- $\alpha$ -CD.
- b.** HNA- $\alpha$ -CD.
- c.** QNA-HP- $\beta$ -CD.
- d.** HNO-HP- $\beta$ -CD.
- e.** HNA-HP- $\beta$ -CD.

### 6.3.2.6. Interpretación general de las constantes de asociación obtenidas para los complejos

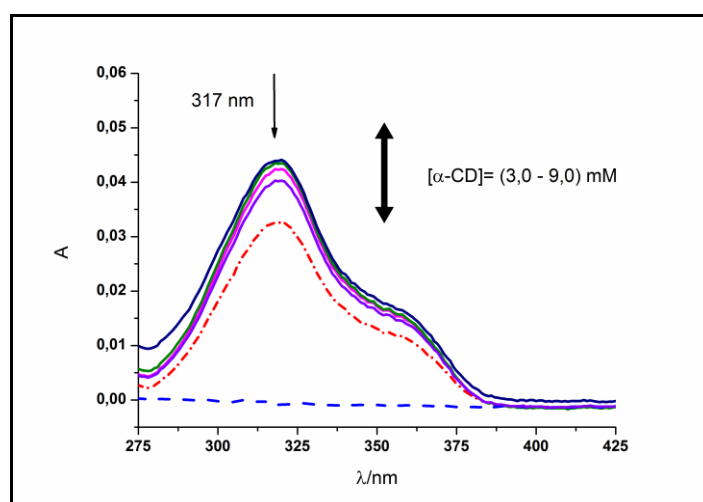
Por un lado, si se comparan la  $K_A/M^{-1}$  del sistema HNA-  $\alpha$ -CD, la cual fue de  $(2,5 \pm 0,9) \times 10^3$ , con respecto a la  $K_A/M^{-1}$  obtenida para el núcleo de CZL<sup>41</sup>  $(7 \pm 1) \times 10^2$  con  $\beta$ -CD, se pueden atribuir a una mayor afinidad por la cavidad de la CD estabilizadas por una mayor complementariedad estructural y electrónica que aporta el átomo de nitrógeno extra en la molécula de HNA y los grupos  $-CH_3$  y  $-OCH_3$  presentes. Estos mismos efectos se observaron en el caso del núcleo del HNO con  $\alpha$ -CD e HP- $\beta$ -CD, en que los valores de  $K_A$  para estos sistemas fueron más de un 50% afines por la cavidad de las CD, respecto al núcleo de CZL, incluso hasta 7 veces más selectivo para HNA con las HP- $\beta$ -CD, respecto a CZL.

Un análisis similar se puede realizar para los sistemas con los sustratos con núcleo quinolínicos, en donde si bien todos los sistemas presentaron quenching de la F, los valores en las  $K_A/M^{-1}$  para QUI<sup>41</sup> con  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD fueron menores a  $10^2$ , mientras que para QNA fue de 1800 con HP- $\beta$ -CD. Esto refleja una mejor eficiencia como receptor y quencher para la HP- $\beta$ -CD e incluso más de 20 veces mejor que la CD nativa  $\beta$ -CD.

Para el caso de los sistemas con CA[n]S, en donde todos los sustratos presentaron quenching de F, los valores obtenidos de las  $K_A/M^{-1}$  para QUI y QNA reflejan una mayor interacción (20 veces para HCA[6]S) como lo indica la proporción entre sus valores de las  $K_A$ .<sup>42</sup> Estas observaciones se pueden deber a la presencia de interacciones puramente electrostáticas (ión-dipolo, ión-ión y anión- $\pi$ ), dado que al pH de trabajo el p-sulfonatocalix[6]areno presenta sus grupos  $-SO_3H$  deprotonados, además de dos grupos  $-OH$  deprotonados también. Esta gran diferencia se puede atribuir además a la presencia del sustituyente bicíclico presente en el núcleo de la QNA. Esta parte alquímica podría interactuar más eficientemente y posicionarse de forma más adecuada sobre la cavidad del receptor, el cual también contribuye con su flexibilidad y su propio efecto macrocíclico.<sup>43,44</sup>

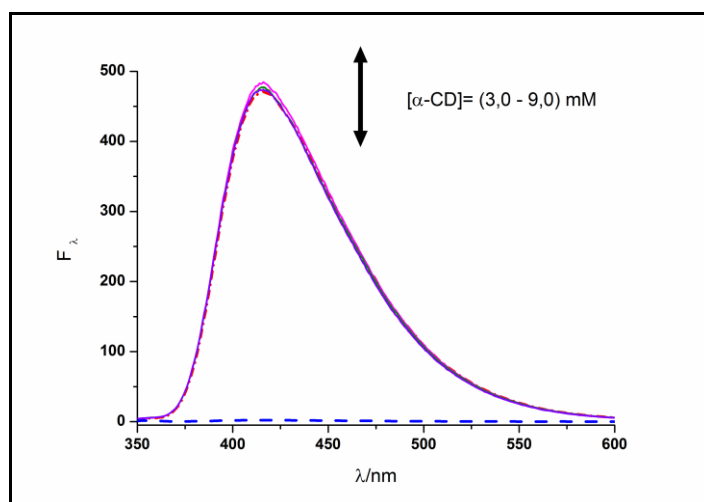
### 6.3.2.7. Análisis de HARMINA en presencia de $\alpha$ -Ciclodextrina

La evaluación de los efectos de las CD sobre la emisión fluorescente de los diferentes heterociclos (ver Tabla 6.1), evidenció que la mayor exaltación de la F de HNA se logró con una concentración 1 mM de  $\alpha$ -CD, mientras que a 10 mM de receptor este efecto desaparece. Entonces, se decidió evaluar la respuesta del sistema en concentraciones por encima de 1 mM de  $\alpha$ -CD. Para ello, se desarrollaron los experimentos necesarios variando la concentración de  $\alpha$ -CD entre (3 – 9) mM. Los resultados encontrados por espectroscopia UV-visible presentaron cambios pocos significativos e incluso se observó una dispersión de las señales, como se puede observar en los espectros de la Figura 6.23, en donde se indica también la longitud de onda en la que se excita al sustrato.



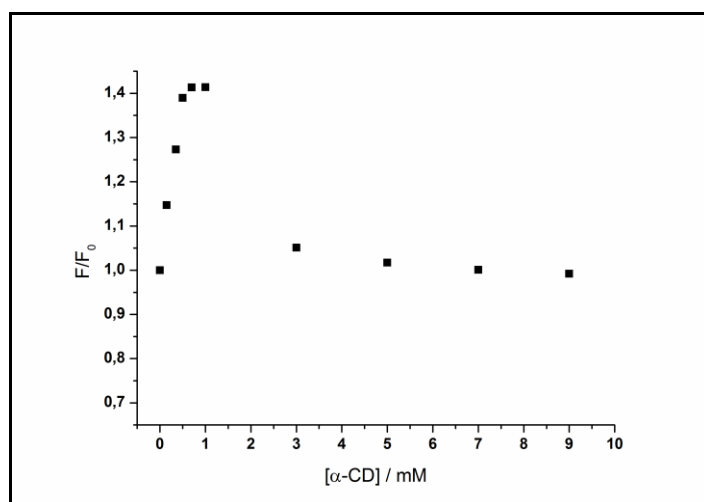
**Figura 6.23:** Efecto de  $\alpha$ -CD sobre el espectro la absorción de HNA (---) 2,4  $\mu$ M. Intervalo de concentración de  $\alpha$ -CD: (3 - 9) mM. [ $\alpha$ -CD] = 9,0 mM (---). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de CH<sub>3</sub>OH a 25,0 °C y b = 1 cm.

Los resultados encontrados en los espectros de emisión de F, no permitieron concluir sobre los efectos de la CD, dado que la señal fluorescente resultó ser aleatoria, como puede verse en la Figura 6.24.



**Figura 6.24:** Efecto de  $\alpha$ -CD sobre la emisión de F de HNA (---●---)  $2,4 \mu\text{M}$ . Intervalo de concentración de  $\alpha$ -CD: (3-9) mM.  $[\alpha\text{-CD}] = 9,0 \text{ mM}$  (---).  $\lambda_{\text{EXC}} = 317,0 \text{ nm}$ ; 95,0 % v/v de buffer fosfato de  $\text{pH} = 6,994$  y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Potencia de detector 450 V y  $b = 1 \text{ cm}$ .

Sin embargo, estos resultados fueron analizados en conjunto con los puntos obtenidos a menor concentración de  $\alpha$ -CD, y en donde fue posible determinar la constante de complejación, como se indicó en la sección 6.3.7. Se muestran en la Figura 6.25, como se produce la exaltación de la emisión fluorescente ( $< 1 \text{ mM}$ ) y luego este efecto se disipa.



**Figura 6.25:** Dependencia de  $F/F_0$  con la concentración de HNA ( $F_0$ ) y en presencia de concentraciones variables de  $\alpha$ -CD ( $F$ ). 95,0 % v/v de buffer fosfato de  $\text{pH} = 6,994$  y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $[\text{HNA}] = 2,5 \mu\text{M}$ ;  $[\alpha\text{-CD}] = (0 - 10,0) \text{ mM}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}} = 317,0 \text{ nm}$ ; ancho de rendijas de excitación y emisión de  $10,0 \text{ nm}$ ; potencia de detector 450 V;  $b = 1,0 \text{ cm}$ .

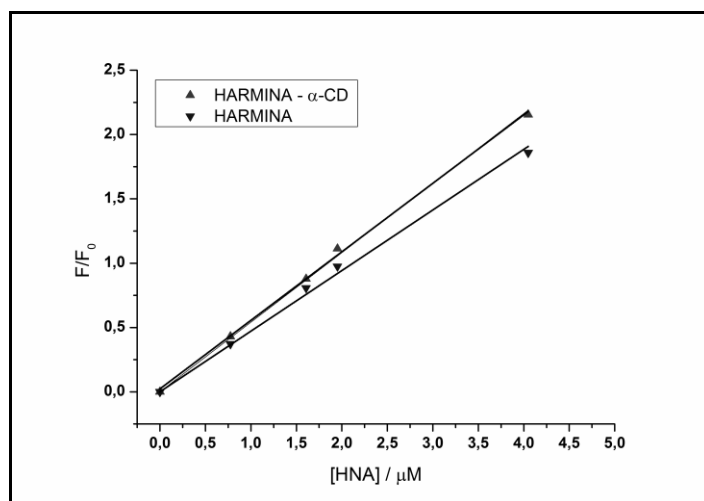
Estos resultados se podrían explicar en base a la formación de complejos con otro tipo de estequiometría sustrato receptor, lo cual puede producir cambios en las reacciones en el estado excitado, como ser transferencia de energía y procesos colisionales, como sucede en los complejos que se forman entre la 8-amino-quinolina en presencia de iones metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ ), con un CA[4] modificado con pirrol.<sup>45</sup> Otro ejemplo que presenta fenómenos de este tipo, son los sistemas supramoleculares de  $\alpha$ -CD y  $\beta$ -CD, que forman complejos de inclusión con HAP (como ser el 6-(p-toluidino) -2-naftalenosulfonato de sodio y el ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico), favorecidos por la rigidez estructural que presentan las CD y también por sus cavidades hidrofóbicas, permiten la formación de complejos de diferente estequiometría cuando la proporción de CD es mayor a la del huésped.<sup>46</sup> Otro ejemplo de este fenómeno, es el que muestran dos derivados de antraceno (como ser el sulfonato 1-anilino-8-naftaleno y el ácido 2-anilino-naftaleno-6-sulfónico) que en presencia de  $\alpha$ -CD, forman complejos con una proporción 1:2 con una mejora de la fluorescencia moderada cuando se incluye dentro de las ciclodextrina.<sup>46</sup> Otro caso, es el que presenta el sistema entre CA[4]S y el bromuro de etidio, en el que la conformación y la flexibilidad del receptor, representen probablemente, la mejor plataforma para el sustrato, como así también que el diámetro de la cavidad resulte ser el adecuado en cuanto a la complementariedad de forma y tamaño. Además, la conformación del CA[4]S puede ser influenciado por las interacciones con el sustrato, mediante las interacciones  $\pi$ - $\pi$  o van der Waals.<sup>43</sup> Por último, se menciona el complejo entre carbendazim y CA[6]S en el que a concentraciones equimolares la estequiometría del complejo resultó ser 1:1, mientras que cuando  $[\text{CA}[6]\text{S}] > [\text{carbendazim}]$ , la estequiometría fue de 2:1, lo que produjo notables cambios en la relación de rendimientos cuánticos de F para los dos tipos de complejos y por lo tanto, un pronunciado quenching de la F.<sup>47</sup>



### 6.3.2.8. Determinación de parámetros analíticos para HARMINA en presencia de $\alpha$ -Ciclodextrina

Analizando los sistemas con CD, que produjeron una exaltación en la emisión fluorescente de varios de los sustratos, el mejor cambio de señal lo presentó el sistema de HNA con  $\alpha$ -CD. Estos cambios observados en la emisión fluorescente de HNA por la presencia de  $\alpha$ -CD, permitieron la determinación de la constante de asociación para el sistema huésped-receptor, como se indicó en la sección 6.3.7.5. Luego de los estudios realizados en la sección 6.3.9., se decidió trabajar hasta una concentración 1,0 mM de  $\alpha$ -CD, es decir a la concentración de receptor en donde se obtuvo el mayor cambio de señal y construir la correspondiente curva de calibrado para el sistema.

Los resultados encontrados para la calibración del sistema se pueden ver en la Figura 6.26, y donde se puede observar que la presencia de  $\alpha$ -CD ( $\blacktriangle$ ) mejora en un 20 % la sensibilidad de calibración, respecto a la respuesta de HNA en ausencia de  $\alpha$ -CD ( $\blacktriangledown$ ).



**Figura 6.26:** Dependencia de  $F/F_0$  con la concentración de HNA ( $F_0$ ) y en presencia de concentraciones variables de  $\alpha$ -CD ( $F$ ). 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 y 2,0 % v/v de  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 25,0 °C.  $[\text{HNA}] = (0 - 5,0) \mu\text{M}$ ;  $[\alpha\text{-CD}] = (1) \text{mM}$ ;  $\lambda_{\text{EXC}} = 317,0 \text{nm}$ ; ancho de rendijas de excitación y emisión de 10,0 nm; potencia de detector 450 V;  $b = 1,0 \text{cm}$ .

La sensibilidad de calibración y los LOD y de LOQ obtenidos según las definiciones introducidas en la sección 5.1.2.1., fueron de  $(47,1 \pm 0,9) \times 10^4 \mu\text{M}^{-1}$

y  $(54,1 \pm 0,7) \times 10^4 \mu\text{M}^{-1}$  y de  $(0,316 \pm 0,006) \mu\text{M}$  y  $(0,211 \pm 0,003) \mu\text{M}$  para el LOD y por último,  $(0,95 \pm 0,02) \mu\text{M}$  y  $(0,634 \pm 0,009) \mu\text{M}$  para el LOQ (en ausencia y presencia de  $\alpha$ -CD, respectivamente).

Estos resultados mostraron una mejora de un 20 % en la sensibilidad de calibración y una disminución de un 33 % en el LOD de HNA en presencia de  $\alpha$ -CD. Por lo tanto, se propone una metodología analítica para la determinación directa de HNA por exaltación de la emisión fluorescente en presencia de  $\alpha$ -CD.

Se han reportado LOD determinados por varios tipos de técnicas,<sup>48,49,50,51</sup> entre las que se pueden mencionar CLUR/MS,<sup>52</sup> TLC-SERS<sup>53</sup> o una SPE por agitación, utilizando polidimetilsiloxano como fase estacionaria SBSE (PDMS)<sup>54</sup> (de sus siglas en inglés) combinado con CL y detector de F. Este último presenta selectividad para otro HAPN, dado que permite la detección de HNO y no de HNA, y en el que se indica un LOD de  $0,103 \mu\text{g L}^{-1}$  en pulpa de fruta de la pasión y  $7,44 \mu\text{g g}^{-1}$  en semillas.<sup>54</sup> Otro método reportado muestra también la posibilidad de analizar extractos de semillas de *Peganum harmala*, en donde se pudo diferenciar por medio de CLAR-ESI-IMS<sup>11</sup> por su tiempo de retención y tiempo de deriva que por CLAR o ESI-IMS, trece alcaloides se identificaron tentativamente en función de su relación m/z y fragmentos de iones utilizando cromatografía líquida de ultra alto rendimiento de espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS).<sup>11</sup> Como estos métodos, hay otros que también permiten detectar este tipo de alcaloides.<sup>2,10</sup> Comparando estos LOD ya reportados, con el límite encontrado para el complejo de HNA-  $\alpha$ -CD, se puede observar que no son de órdenes de magnitud similares, la metodología analítica que se propone, para la determinación directa de HNA por exaltación de F en presencia de  $\alpha$ -CD, es ventajosamente más simple y rápida y además, el equipamiento utilizado resulta ser más económico y versátil.

## 6.4. SECCIÓN EXPERIMENTAL

---

### 6.4.1. *Reactivos e instrumentos*

Los compuestos utilizados en esta parte del trabajo fueron: QNA (99 % pureza, marca Aldrich), HNO (99 % pureza, marca Aldrich), HNA (99 % pureza, marca Aldrich) y EHC (99 % pureza, marca Aldrich). Todos ellos fueron reactivos comerciales de grado analítico y se utilizaron sin previa purificación.

Se prepararon soluciones concentradas de los reactivos, pesando la cantidad adecuada según se detalla a continuación, en un volumen final de CH<sub>3</sub>OH de 10,0 mL: QNA (15,0 mg), HNO (12,0 mg), HNA (12,0 mg) y EHC (10,0 mg). En este último caso, la disolución fue sometida a un minuto de sonicado. Dichas soluciones fueron guardadas en la heladera y resguardadas de la luz con papel aluminio y recubiertas con parafilm. Fueron chequeadas periódicamente por espectroscopia UV-visible y permanecieron estables por más de 20 días.

A partir de las soluciones madres, se prepararon una serie de soluciones que permitieron hacer la caracterización de cada compuesto tanto por espectroscopia UV-visible como de F. Para las medidas de absorbancia se trabajó con concentraciones de forma tal de tener valores entre 0,03 – 0,8 unidades de absorbancia. Por su parte, para las mediciones de F, se prepararon soluciones de concentración entre 5,0 y 25,0  $\mu$ M según corresponda para cada heterociclo.

Para la determinación de las constantes de asociación, las soluciones de los analitos se prepararon a partir de sus soluciones madres en metanol y se chequearon sus concentraciones por espectroscopia Uv-visible. Las concentraciones fueron las indicadas para cada heterociclo. Luego las soluciones en presencia de receptores macrocíclicos CDs ( $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD,  $\beta$ -CD) se prepararon con una solución en su máxima concentración (en su límite de solubilidad), lo que permitió llegar a una concentración de ciclodextrinas de  $\sim$ 10 mM. Por su parte, las especies ácidas de los derivados p-sulfonatocalix[n]arenos, CA[6]S y CA[8]S, se prepararon a partir de madres que

permitieron alcanzar concentraciones máximas de 80,0  $\mu\text{M}$ . Las soluciones madres de todos los receptores, CDs y Ca[n]S fueron preparadas en un medio de 95,0 % v/v de buffer fosfato de pH = 6,994 a 25,0 °C. A todas las soluciones se les midieron los espectros de absorción y de emisión de F.

Las medidas de absorbancia permitieron determinar los coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) para cada compuesto. Las longitudes de onda de excitación se eligieron a partir de los máximos en los espectros de absorción, según correspondiera para cada compuesto. En todos los casos se registraron los espectros de excitación, en el intervalo de 200 a 300 nm. Con toda esta información, fue posible determinar los mejores parámetros experimentales, para obtener los correspondientes espectros de emisión.

Los solventes empleados fueron: agua deionizada calidad Milli-Q obtenida de un purificador Millipore (resistividad, 25 °C: 18 M $\Omega$  cm) y metanol (CH<sub>3</sub>OH) grado HPLC Sintorgan.

Las mediciones de pH se realizaron con un pH-metro Thermo Orion modelo 520A 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 soluciones buffer estándar preparadas de pH = 4,008 (con 0,05 M de ftalato ácido de potasio marca J.T.Baker), de pH = 6,994 (con 0,02 M de fosfato dihidrógeno de sodio marca J.T.Baker, 0,03 M de fosfato monohidrógeno de disodio marca AppliChem y 0,02 M de cloruro de sodio marca Taurus) y de pH = 9,155 (con 0,01 M de borato de sodio marca J.T.Baker y 0,02 M de cloruro de sodio marca Taurus).<sup>55</sup> Se prepararon según el procedimiento descrito en la literatura citada, empleando reactivos de grado analítico.<sup>56</sup> Las soluciones buffer se controlaron por medición experimental. La precisión del pH-metro fue 0,001 y la exactitud asociada a las lecturas fue  $\pm 0,005$ .

Las soluciones a estudiadas fueron preparadas en medio acuoso bufferizado, utilizando un 95 % v/v de buffer pH = 6,994 y empleando como co-solvente un 2 % de metanol (CH<sub>3</sub>OH) y completando el volumen final con agua calidad Milli-Q. La homogenización de las muestras se asistieron con un sonicador Arcano modelo PS-10A.

Los espectros de absorción UV-visible se obtuvieron empleando un espectrofotómetro Shimadzu 1800 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 buffer pH = 6,994. En todos los experimentos se utilizó una celda de  $b = 1\text{cm}$  de paso óptico.

Los espectros de emisión de F se registraron con un espectrofluorímetro CARY Eclipse, con anchos de rendija de emisión y de excitación de 10,0 nm, una velocidad de barrido de 500 nm/min y una potencia del detector especificada en cada caso. La temperatura de las soluciones se mantuvo a 25,0 °C conectando el porta-celda del equipo al accesorio Single Peltier CARY. En todos los experimentos se utilizó una celda de cuarzo de  $b = 1\text{cm}$  de paso óptico.

Los datos adquiridos se procesaron empleando el graficador OriginPro 8.6 2018.

## 6.5. CONCLUSIONES PARCIALES

---

Se analizaron los efectos de CD y HCA[n]S sobre las propiedades espectroscópicas de los HAPN en estudio.

Con respecto a los derivados p-sulfonatocalix[n]arenos, produjeron un pronunciado quenching de F de QNN, HNO y HNA, atribuidos a la formación de un complejo no fluorescente, pudiéndose determinar sus  $K_A = K_Q$ . Estos complejos pueden ser producto de interacciones electrostáticas (ión-dipolo, ión-ión y anión- $\pi$ ), dado que al pH de trabajo HCA[6]S presenta sus grupos  $-\text{SO}_3\text{H}$  deprotonados, además de dos de sus grupos  $-\text{OH}$ .

Las CD por su parte, evidenciaron un ligero incremento en la emisión fluorescente de los sustratos (QNA, HNO y HNA), permitiendo la determinación de sus  $K_A$ . El incremento en el rendimiento cuántico de los sustratos

complejados, puede deberse a la restricción de los grados de libertad de movimiento del cromóforo que desfavorece los procesos de desactivación no radiativas, favoreciendo así la desactivación radiativa por fluorescencia.

Además, para el sistema HNA- $\alpha$ -CD, se obtuvo una mejora de un 20 % en la sensibilidad de calibración respecto al analito solo y una disminución de ~ 50 % en el LOD de HNA en presencia de  $\alpha$ -CD.

## 6.6. BIBLIOGRAFÍA

---

- 1 P. Piechowska, R. Zawirska-Wojtasiak and S. Mildner-Szkudlarz, Bioactive  $\beta$ -carbolines in food: A review, *Nutrients*, 2019, **11**, 1–10.
- 2 B. Jiang, L. Meng, N. Zou, H. Wang, S. Li, L. Huang, X. Cheng, Z. Wang, W. Chen and C. Wang, Mechanism-based pharmacokinetics-pharmacodynamics studies of harmine and harmaline on neurotransmitters regulatory effects in healthy rats: Challenge on monoamine oxidase and acetylcholinesterase inhibition, *Phytomedicine*, 2019, **62**, 152967.
- 3 A. Das, S. U. Dighe, N. Das, S. Batra and P. Sen,  $\beta$ -carboline-based turn-on fluorescence chemosensor for quantitative detection of fluoride at PPB level, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2019, **220**, 117099.
- 4 N. Ahmadinejad and A. Tahan, The comparison of NMR tensors and NQR frequencies of hallucinogenic Harmine compound in the gas phase, *Russ. J. Phys. Chem. B*, 2015, **9**, 19–21.
- 5 C. C. Shi, J. F. Liao and C. F. Chen, Spasmolytic effects of three harmala alkaloids on guinea-pig isolated trachea, *Pharmacol. Toxicol.*, 2001, **89**, 259–264.

- 6 Y. Guan, E. D. Louis and W. Zheng, Toxicokinetics of tremorogenic natural products, harmine and harmine, in male sprague-dawley rats, *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A*, 2001, **64**, 645–660.
- 7 E. Ruiz-Durántez, J. Á. Ruiz-Ortega, J. Pineda and L. Ugedo, Stimulatory effect of harmine and other  $\beta$ -carbolines on locus coeruleus neurons in anaesthetized rats, *Neurosci. Lett.*, 2001, **308**, 197–200.
- 8 L. B. Nicolas, Y. Kolb and E. P. M. Prinssen, A combined marble burying-locomotor activity test in mice: A practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants, *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, **547**, 106–115.
- 9 Y. Wu, L. Chen, Y. Xian, X. Hou, M. Liang, H. Dong and J. Chen, Quantitative analysis of fourteen heterocyclic aromatic amines in bakery products by a modified QuEChERS method coupled to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), *Food Chem.*, 2019, **298**, 125048.
- 10 N. S. Kadam, A. A. Naik, P. J. Doshi and T. D. Nikam, High-Performance Thin-Layer Chromatography Method for Simultaneous Determination of Antipsychotic and Medicinally Important Five  $\beta$ -Carboline Alkaloids, *J. Chromatogr. Sci.*, 2019, **57**, 312–322.
- 11 Z. Wang, D. Kang, X. Jia, H. Zhang, J. Guo, C. Liu, Q. Meng and W. Liu, Analysis of alkaloids from *Peganum harmala* L. sequential extracts by liquid chromatography coupled to ion mobility spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2018, **1096**, 73–79.
- 12 M. Tascón, F. Benavente, N. M. Vizioli and L. G. Gagliardi, A rapid and simple method for the determination of psychoactive alkaloids by CE-UV: application to *Peganum Harmala* seed infusions, *Drug Test. Anal.*, 2017, **9**, 596–602.
- 13 J. J. Fortunato, G. Z. Réus, T. R. Kirsch, R. B. Stringari, L. Stertz, F. Kapczinski, J. P. Pinto, J. E. Hallak, A. W. Zuardi, J. A. Crippa and J.

- Quevedo, Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, 2009, **33**, 1425–1430.
- 14 U. Bonnet, N. Scherbaum and M. Wiemann, The endogenous alkaloid harmine: Acidifying and activity-reducing effects on hippocampal neurons in vitro, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, 2008, **32**, 362–367.
- 15 S. Maldonado, “Estudio y puesta a punto de procedimientos para la determinación de harmina mediante cromatografía HPLC con detector UV / Visible y cromatografía de gases con detector de ionización de llama”, *Tesis Maest. Univ. Valladolid*, 2017, 8–19.
- 16 G. Saúl and E. Cornejo, Las Propiedades Farmacocinéticas Del Ayahuasca, *Lib. Rev. Psicol.*, 2015, **21**, 313–319.
- 17 S. E. Hammack, J. D. Guo, R. Hazra, J. Dabrowska, K. M. Myers and D. G. Rainnie, The response of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis to serotonin: Implications for anxiety, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, 2009, **33**, 1309–1320.
- 18 D. Farzin and N. Mansouri, Antidepressant-like effect of harmine and other  $\beta$ -carbolines in the mouse forced swim test, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 2006, **16**, 324–328.
- 19 F. Aricioglu and H. Altunbas, Harmine Induces Anxiolysis and Antidepressant-Like Effects in Rats, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003, **1009**, 196–200.
- 20 R. Qayyum, H. M. ud D. Qamar, S. Khan, U. Salma, T. Khan and A. J. Shah, Mechanisms underlying the antihypertensive properties of *Urtica dioica*, *J. Transl. Med.*, 2016, **14**, 1–13.
- 21 K. Lawson-Wood and K. Evans, Quinine Fluorescence Determination of Quinine in Tonic Water, *PerkinElmer Appl. Note - Fluoresc. Spectrosc.*, 2013, **1**, 1–5.



- 22 B. M. Cumming and J. P. D. Goldring, Monocyte phagocytosis of malaria  $\beta$ -haematin in the presence of artemisinin, amodiaquine, chloroquine, doxycycline, primaquine, pyrimethamine and quinine, *Exp. Parasitol.*, 2019, **197**, 93–102.
- 23 R. A. Jones, S. S. Panda and C. D. Hall, Quinine conjugates and quinine analogues as potential antimalarial agents, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **97**, 335–355.
- 24 P. D. Tzanavaras, C. K. Zacharis, T. D. Karakosta, A. Zotou and D. G. Themelis, High-Throughput Determination of Quinine in Beverages and Soft Drinks Based on Zone-Fluidics Coupled to Monolithic Liquid Chromatography, *Anal. Lett.*, 2013, **46**, 1718–1731.
- 25 N. Rodríguez-Valero, D. Camprubí, E. García-Guijarro, J. Llenas-García, I. Alejo-Cancho, P. Cisteró, A. Mayor, J. Muñoz and H. Gupta, Suspected quinine resistant *P. falciparum* severe malaria possibly acquired in Ivory Coast, *Parasitol. Int.*, 2018, **67**, 684–687.
- 26 B. K. Shah, D. C. Neckers, J. Shi, E. W. Forsythe and D. Morton, Photophysical properties of anthanthrene-based tunable blue emitters, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **109**, 7677–7681.
- 27 A. Pron, P. Gawrys, M. Zagorska, D. Djurado and R. Demadrille, Electroactive materials for organic electronics: Preparation strategies, structural aspects and characterization techniques, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 2577–2632.
- 28 W. Brütting, S. Berleb and A. G. Mückl, Device physics of organic light-emitting diodes based on molecular materials, *Org. Electron. physics, Mater. Appl.*, 2001, **2**, 1–36.
- 29 L. H. Chan, R. H. Lee, C. F. Hsieh, H. C. Yeh and C. T. Chen, Optimization of high-performance blue organic light-emitting diodes containing tetraphenylsilane molecular glass materials, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 6469–6479.

- 30 J. I. Nishide, H. Nakanotani, Y. Hiraga and C. Adachi, High-efficiency white organic light-emitting diodes using thermally activated delayed fluorescence, *Appl. Phys. Lett.*, 2014, **104**, 1–6.
- 31 J. Frischeisen, D. Yokoyama, C. Adachi and W. Brütting, Determination of molecular dipole orientation in doped fluorescent organic thin films by photoluminescence measurements, *Appl. Phys. Lett.*, 2010, **96**, 20–23.
- 32 M. Ichikawa, K. Kobayashi, T. Koyama and Y. Taniguchi, Intense and efficient ultraviolet electroluminescence from organic light-emitting devices with fluorinated copper phthalocyanine as hole injection layer, *Thin Solid Films*, 2007, **515**, 3932–3935.
- 33 A. Kukhta, E. Kolesnik, I. Grabchev and S. Sali, Spectral and luminescent properties and electroluminescence of polyvinylcarbazole with 1,8-naphthalimide in the side chain, *J. Fluoresc.*, 2006, **16**, 375–378.
- 34 H. F. Xiang, Z. X. Xu, V. A. L. Roy, C. M. Che, P. T. Lai, P. J. Zeng, F. F. Niu, Y. W. Liu, W. Q. Tang, C. J. He and H. Ben Niu, Star-configured carbazole as an efficient near-ultraviolet emitter and hole-transporting material for organic light-emitting devices, *Appl. Phys. Lett.*, 2008, **92**, 2006–2009.
- 35 W. J. Kuo, S. L. Lin, S. Da Chen, C. P. Chang, R. H. Lee and R. J. Jeng, Efficient and bright non-doped blue light-emitting diodes based on glassy styrylcarbazoles, *Thin Solid Films*, 2008, **516**, 4145–4152.
- 36 I. C. Khoo, J. Ding, Y. Zhang, K. Chen and A. Diaz, Supra-nonlinear photorefractive response of C60 and single-wall carbon nanotube-doped nematic liquid crystal, *OSA Trends Opt. Photonics Ser.*, 2003, **88**, 2049–2051.
- 37 F. Würthner, S. Yao, J. Schilling, R. Wortmann, M. Redi-Abshiro, E. Mecher, F. Gallego-Gomez and K. Meerholz, ATOP dyes. Optimization of a multifunctional merocyanine chromophore for high refractive index modulation in photorefractive materials, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**,

- 2810–2824.
- 38 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Tercera ed., 2006.
- 39 J. Sousa and L. Pinto da Silva, Modelling the absorption properties of polycyclic aromatic hydrocarbons and derivatives over three European cities by TD-DFT calculations, *Sci. Total Environ.*, 2019, **695**, 133881.
- 40 B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2001, vol. 53.
- 41 Matías Carranza, Diseño, síntesis y caracterización de nanocavidades para la construcción de dispositivos moleculares, *Univ. Nac. Córdoba*, 2015, Tesis doctoral.
- 42 M. E. Carranza, H. M. Elero and A. V. Veglia, Aqueous on / off fluorescent switches based on systems of quinoline / quinoline-macrocycle, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 2020, **390**, 112253–112259.
- 43 M. Bayrakci and B. Yilmaz, Intermolecular interactions and binding mechanism of inclusion complexation between sulfonate calix[n]arenes and ethidium bromide, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2018, **90**, 341–349.
- 44 Z. Liu, S. K. M. Nalluri and J. Fraser Stoddart, Surveying macrocyclic chemistry: From flexible crown ethers to rigid cyclophanes, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 2459–2478.
- 45 K. D. Bhatt, H. D. Shah and M. Panchal, A switch-off fluorescence probe towards Pb(II) and Cu(II) ions based on a calix[4]pyrrole bearing amino-quinoline group, *Luminescence*, 2017, **32**, 1398–1404.
- 46 R. N. Dsouza, U. Pischel and W. M. Nau, Fluorescent dyes and their supramolecular host/guest complexes with macrocycles in aqueous solution, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 7941–7980.
- 47 N. L. Pacioni, V. N. Sueldo Ocelllo, M. Lazzarotto and A. V. Veglia,

- Spectrofluorimetric determination of benzoimidazolic pesticides: Effect of p-sulfonatocalix[6]arene and cyclodextrins, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **624**, 133–140.
- 48 J. D. Pope, K. W. Choy, O. H. Drummer and H. G. Schneider, Harmala Alkaloids Identify Ayahuasca Intoxication in a Urine Drug Screen, *J. Anal. Toxicol.*, 2019, **43**, e23–e27.
- 49 S. Li, L. Teng, W. Liu, X. Cheng, B. Jiang, Z. Wang and C. H. Wang, Pharmacokinetic study of harmine and its 10 metabolites in rat after intravenous and oral administration by UPLC-ESI-MS/MS, *Pharm. Biol.*, 2016, **54**, 1768–1781.
- 50 S. Navickiene, L. F. S. Santos, M. C. Santos and A. Gaujac, Use of coconut charcoal and menthone-thiosemicarbazone polymer as solid phase materials for the determination of N,N-dimethyltryptamine, harmine, harmaline, harmalol, and tetrahydroharmine in ayahuasca beverage by liquid chromatography-tandem mass spectro, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2019, **30**, 180–187.
- 51 K. L. Uhl, C. R. Schultz, D. Geerts and A. S. Bachmann, Harmine, a dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DYRK) inhibitor induces caspase-mediated apoptosis in neuroblastoma, *Cancer Cell Int.*, 2018, **18**, 1–14.
- 52 Y. Zhang, S. Li, Y. Wang, G. Deng, N. Cao, C. Wu, W. Ding, Y. Wang, X. Cheng and C. Wang, Potential pharmacokinetic drug–drug interaction between harmine, a cholinesterase inhibitor, and memantine, a non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, *Molecules*, 2019, **24**, 1–17.
- 53 F. Pozzi, N. Shibayama, M. Leona and J. R. Lombardi, TLC-SERS study of Syrian rue (*Peganum harmala*) and its main alkaloid constituents, *J. Raman Spectrosc.*, 2013, **44**, 102–107.
- 54 V. F. Freire, G. R. Silva and J. H. Yariwake, Targeted-Analysis of  $\beta$ -

- carboline alkaloids in passionfruit ('Maracujá') by SBSE(PDMS)-LC/Flu and UHPLC-MS, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2018, **29**, 775–781.
- 55 C. R. N. Strauts, J. H. Gilfillan and H. N. Wilson, *Analytical Chemistry-The Working Tools*, *Oxford Univ. Press*, 1958, **Volumen I**, 228.
- 56 W. Hayes, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, *CRC Press*, 2014, **95<sup>TH</sup> edit**, 8–34 y 8–36.



---

## CONCLUSIONES GENERALES

---

En este trabajo de tesis, se abordó el estudio espectroscópico de las interacciones entre sustratos orgánicos heterocíclicos, derivados de los núcleos de quinolina y carbazol, representativos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados (HAPN), y dos clases de receptores macrocíclicos: p-sulfonatocalix[n]arenos (CA[n]S) y ciclodextrinas (CD). Posteriormente, se utilizaron estos cambios espectroscópicos productos de estas interacciones, para el desarrollo de metodologías analíticas.

El desarrollo general de este trabajo de tesis, permitió extender y ampliar los conocimientos acerca de los complejos del tipo huésped-receptor, de QNN, HNA, HNO y EHC con los correspondientes receptores. Esto aporta a los antecedentes del grupo de investigación, las ventajas y desventajas de los diferentes sustituyentes presentes en estos núcleos derivados de quinolina y

carbazol, permitiendo analizar estrategias supramoleculares con potenciales aplicaciones analíticas. Además, resulta interesante incursionar en el estudio de sistemas supramoleculares mixtos, desde dos perspectivas diferentes. Por un lado, los sistemas en los que intervengan diferentes receptores macrocíclicos, combinándolos en base las respuestas que cada sistema presentó de forma individual. Por otro lado, combinar receptores de distinta naturaleza, es decir CA[n]S y CD, potenciando las afinidades observadas en los sistemas individuales. Esto permitiría el desarrollo de posibles dispositivos moleculares por formación de complejos de diferentes estequiometrías, como así también, emplear la coexistencia de estos equilibrios y que modificando químicamente las condiciones experimentales, favorecer específicamente uno de ellos. Estos efectos pueden ser, cambios de pH, temperatura o, lo que resulta aún más interesante, emplear otro sustrato que pudiese interactuar con alguno de los receptores, dando lugar al desarrollo de una estrategia supramolecular para una determinación simultánea de analitos.

Las principales conclusiones obtenidas se detallan a continuación:

- ✓ El sistema supramolecular *QUI-HCA[6]S* fue inalterado por los analitos no fluorescentes: GLU, 3-CIPh y 4-CIPh.
- ✓ El sistema supramolecular *QUI-HCA[6]S* resultó un potencial interruptor *switch on/off/on* para GLI y permitió el desarrollo de una metodología fluorimétrica indirecta para un analito no absorbente ni fluorescente. La misma resultó ser simple, rápida y económica y además no requiere de etapas previas de pre-concentración del analito.
- ✓ El sistema supramolecular *CZL-HCA[6]S* fue inalterado por glifosato.
- ✓ Los derivados p-sulfonatocalix[n]arenos (*HCA[6]S* y *HCA[8]S*), produjeron un pronunciado quenching de F de QNN, HNO y HNA, pudiéndose determinar sus  $K_A = K_Q$ .
- ✓ El *HCA[8]S* resultó ser 4 veces mejor, tanto como quencher y receptor, para QNA respecto a HNA. Esto puede deberse a la mayor afinidad del receptor por la parte alquílica de este sustrato orgánico, y también por la



contribución dada por un mayor cubrimiento del sustrato favorecida por la conformación más flexible de este macrociclo.

- ✓ El HCA[8]S presentó una afinidad 5 veces más fuerte por HNA respecto al núcleo de CZL. Esto puede deberse a una mayor interacción del receptor con los grupos alquilo presentes en ese sustrato.
- ✓ Las ciclodextrinas (HP- $\beta$ -CD y  $\alpha$ -CD), a bajas concentraciones (< 1 mM) mostraron un ligero aumento de la emisión fluorescente para QNN, HNO y HNA, permitiendo la determinación de sus  $K_A$ .
- ✓ Los valores encontrados para las  $K_A$  de CA[n]S resultaron ser  $\sim 100$  mayores que para las CD. Esto puede deberse a una mayor versatilidad en las conformaciones del macrociclo, lo que permite una mayor y mejor disposición de sus cavidades.
- ✓ La  $\alpha$ -CD modifica el  $\phi$  del complejo en mayor medida que HP- $\beta$ -CD, si bien ésta última presentó la mayor  $K_A$ .
- ✓ Los sistemas de CA[n]S con HNA y QNA podrían emplearse como potenciales sistemas para la determinación de analitos no fluorescentes.
- ✓ La exaltación encontrada con  $\alpha$ -CD y HNA representa un sistema prometedor para el desarrollo de un método analítico para este sustrato.



# PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

## **PUBLICACIONES CIENTIFICAS**

- ✓ Aqueous on/off fluorescent switches based on systems of quinoline / quinoline-macrocyclic. Matías E. Carranza; **Hugo M. Elero**; Alicia V. Veglia. J. Photochem. Photobiol. A Chem., 2020, 390, 112253–112259.
- ✓ Analytical application of the quinoline-calixarene complex for the fluorescent determination of glyphosate. **Hugo M. Elero**; Alicia V. Veglia. (en redacción).
- ✓ Effect of calixarenes and cyclodextrins on the spectroscopic properties of harmine and quinine. **Hugo M. Elero**; Alicia V. Veglia. (en redacción).

## **COMUNICACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS**

### ✓ **XXII Simposio Nacional de Química Orgánica**

Título: “Efecto de calixarenos y ciclodextrinas sobre las propiedades espectroscópicas de harmina y quinina”. **Hugo M. Elero**; Alicia V. Veglia. SAIQO, 05-08 de noviembre de 2019, Mendoza. Número de poster FQO – 20.

### ✓ **XXII Simposio Nacional de Química Orgánica**

Título: “Aplicaciones de ciclodextrinas funcionalizadas”. **Hugo M. Elero**, Johannes S. Ramírez Carvajal, A. Guillermo, Bracamonte, Alicia V. Veglia. SAIQO, 05-08 de noviembre de 2019, Mendoza. Número de poster FQO – 21.

✓ **10º Congreso de Química Analítica**

Título: “Estudio del efecto de ciclodextrinas y calixarenos sobre las propiedades espectroscópicas de Harmina”. **Elero Hugo M.**, Cipolloni, Fiamma B., Veglia Alicia V. AAQA - 2019, 17-20 de septiembre de 2019, Santa Rosa, La Pampa.

✓ **9º Congreso de Química Analítica**

Título: “Método analítico indirecto y alternativo basado en una estrategia supramolecular para Glifosato”. **Elero Hugo M.**, Veglia Alicia V. AAQA - 2017, 7-10 de noviembre de 2017, Río Cuarto, Córdoba.

✓ **XX Congreso Argentino de Físico-Química y Química Inorgánica**

Título: “Desarrollos Analíticos basados en Química Supramolecular”. Salas Santiago D., **Elero Hugo M.**, Ramírez Carvajal Johannes S., Bracamonte A. Guillermo, Veglia Alicia V. AAIFQ - 2017, 16-19 de mayo de 2017, Villa Carlos Paz, Córdoba. Número de poster FQO – 305.

✓ **XX Simposio Nacional de Química Orgánica**

Título: “Reacciones de Desplazamiento Supramolecular Estudiadas por Fluorescencia”. **Hugo M. Elero**; Matías E. Carranza; Alicia V. Veglia. SAIQO, 11-14 de noviembre de 2015, Mar del Plata. Número de poster FQO – 38.

✓ **8º Congreso de Química Analítica**

Título: “Métodos Analíticos Supramoleculares”. **Elero, Hugo M.**; Carranza, Matías E.; Veglia, Alicia V. AAQA, 3-6 de noviembre de 2015, La Plata. Número de poster ESP – 04.

✓ **XIX Congreso Argentino de Físico-Química y Química Inorgánica**

Título: “Interacción Supramolecular de Quinolina con Receptores Macrocíclicos”. M. Carranza, S. del Castillo, **H. Elero** y A. Veglia. AAIFQ - 2015, 12-15 de abril de 2015, Buenos Aires.

# LISTA DE ABREVIATURAS y SÍMBOLOS

## **A**

$\alpha$ -CD	$\alpha$ -Ciclodextrina
A	Analito desplazante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
A	Absorbancia
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de los Estados Unidos
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
AC	Agua corriente
ANOVA	Análisis de la varianza

## **B**

$\beta$ -CD	$\beta$ -Ciclodextrina
b	Paso óptico

## **C**

CD	Ciclodextrina
CB	Cucurbiturilo
CF	Ciclofano
CA[n]	Calix[n]areno
CZL	Carbazol
CA[n]S	Anión p-sulfonatocalix[n]areno
CA[4]S	Anión p-sulfonatocalix[4]areno
CA[6]S	Anión p-sulfonatocalix[6]areno
CA[8]S	Anión p-sulfonatocalix[8]areno
cm	centímetro
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CLUR-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra resolución acoplado a

	espectrometría de masas
CG	Cromatografía gaseosa
CG-MS	Cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masas
CL	Cromatografía líquida
CL-MS	Cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas
°C	Grado centígrado
CP	Clorofenoles
3-CIPh	3-clorofenoles
4-CIPh	4-clorofenoles

## D

DM	Dispositivo molecular
$\delta$	Corrimiento químico
DIGESA	Dirección General de Salud Ambiental

## E

EHC	9-2-etilhexilcarbazol
$\epsilon$	Coefficiente de absortividad molar
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EPSPS	Enzima enolpiruvilsiquimato-3-fosfatosintasa
ESP	Enolpiruvilsiquimato-3-fosfato

## F

F	Espectroscopia de Fluorescencia
$F$	Intensidad de emisión de fluorescencia
$F_0$	Intensidad de emisión de fluorescencia de referencia
$F_R$	Intensidad de fluorescencia relativa
$\phi$	Rendimiento cuántico de fluorescencia
F	Estadístico F

FDA Administración de Medicamentos y Alimentos de EEUU

## **G**

$\gamma$ -CD  $\gamma$ -Ciclodextrina

GLU Glucosa

GLI Glifosato

## **H**

HAP Hidrocarburos aromáticos policíclicos

HAPN Hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados

HNA Harmina

HNO Harmano

HP- $\beta$ -CD Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina

HCA[4]S Ácido p-sulfonatocalix[4]areno

HCA[6]S Ácido p-sulfonatocalix[6]areno

HCA[8]S Ácido p-sulfonatocalix[8]areno

## **I**

IR Espectroscopia infrarroja

IN Indol

$I_0$  Intensidad inicial

$I$  Intensidad de luz transmitido

$I_m$  Fuerza iónica

IARC Agencia Internacional para la investigación del Cáncer

IUPAC Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

ISO International Organization for Standardization

## **K**

$K_A$	Constante de asociación
$K_Q$	Constante de <i>quenching</i>
$k_Q$	Constante de <i>quenching</i> colisional bimolecular

## L

$\lambda$	Longitud de onda
$\lambda_{\text{EXC}}$	Longitud de onda de Excitación
$\lambda_{\text{EMI}}$	Longitud de onda de Emisión
LP	Leche en polvo
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación
LMR	Límites máximos de residuos permitidos

## M

Me- $\beta$ -CD	Metil- $\beta$ -Ciclodextrina
M	Molar
mM	Milimolar
$\mu\text{M}$	Micromolar
nm	Nanometro
$M_n$	Soluciones mezclas
min	Minuto

## O

-OCH <sub>3</sub>	Metoxilos
OLED	Diodos orgánicos emisores de luz

## P



PMCD	Ciclodextrina permetilada
PF	Punto de fusión
PB	Punto de ebullición
PD	Punto de descomposición
PHOLED	Dispositivo orgánico azul de electrofosforescencia

## **Q**

QUI	Quinolina
QNA	Quinina
$Q^M$	Cantidad de analito cuantificado
$Q^R$	Cantidad de analito original

## **R**

R	Receptor
RA	Resorcinareno
$R_{\text{equilibrio}}$	Concentración de receptor en el equilibrio
$R_0$	Concentración inicial de receptor
R	Recuperación
$R_A$	Recuperación aparente
$\overline{R_A}$	Promedio de recuperaciones aparentes
RP	Fase reversa
RMN	Resonancia magnética nuclear
$^1\text{H RMN}$	Resonancia magnética nuclear de protón

## **S**

S	Sustrato
[S-R]	Complejo sustrato-receptor
SRM	Material estándar de referencia
SPE	Extracción en fase sólida

S/N	Relación señal / ruido
$S_0$	Estado electrónico fundamental
$S_1$	Primer estado electrónico excitado
s	Desviación estándar muestral
$\hat{S}_b$	Desviación estándar de una muestras de blancos
$S_{y/x}$	Desviación estándar de los residuales
$\Sigma Abs$	Sumatoria de absorbancias
S3P	Siquimato-3-fosfato
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Agraria

## I

TMS	Tetra-metilsilano
$\tau_0$	Tiempo de vida de fluorescencia

## U

UV-visible	Espectroscopia ultravioleta-visible
US EPA	Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos

## V

v/v	Volumen en volumen
V	Voltios

# LISTA DE TABLAS

<b>2.A.1:</b> Propiedades físicas y químicas de ciclodextrinas	<b>48</b>
<b>2.A.2:</b> Valores de pKa para ácidos de diferentes derivados CA[n]S	<b>52</b>
<b>3.1:</b> Asignación de señales de <sup>1</sup> H RMN para β-CD	<b>80</b>
<b>3.2:</b> Asignación de señales de <sup>1</sup> H RMN para HCA[8]S	<b>82</b>
<b>3.3:</b> Asignación de señales de <sup>1</sup> H RMN para QUI	<b>84</b>
<b>3.4:</b> Concentraciones calculadas a partir de la 1° iteración de QUI-HCA[6]S	<b>94</b>
<b>3.5:</b> Concentraciones calculadas a partir de la 2° iteración de QUI-HCA[6]S	<b>95</b>
<b>3.6:</b> Valores de K <sub>A</sub> para QUI-HCA[6]S	<b>96</b>
<b>3.7:</b> Valores de K <sub>A</sub> para QUI-HCA[8]S	<b>97</b>
<b>3.8:</b> Concentraciones calculadas a partir de la 1° iteración de QUI-γ-CD	<b>98</b>
<b>3.9:</b> Concentraciones calculadas a partir de la 1° iteración de QUI-β-CD	<b>99</b>
<b>4.1:</b> Valores de absorbancias de soluciones de los compuestos individuales y de mezclas del sistema QUI-HCA[6]S con GLU	<b>121</b>
<b>4.2:</b> Valores de absorbancias de soluciones de los compuestos individuales y de mezclas del sistema QUI-HCA[6]S con 3-CIPh	<b>126</b>
<b>4.3:</b> Valores de absorbancias de soluciones de los compuestos individuales y de mezclas del sistema QUI-HCA[6]S con 4-CIPh C	<b>131</b>
<b>5.1:</b> Concentraciones de interferentes orgánicos y Relación de concentraciones interferente/GLI	<b>163</b>
<b>5.2:</b> Concentraciones de interferentes inorgánicos y Relación de concentraciones interferente/GLI	<b>163</b>
<b>5.3:</b> Recuperaciones porcentuales determinadas para GLI con diferentes % AC, en presencia del sistema QUI-HCA[6]S	<b>166</b>

<b>5.4:</b> Recuperaciones porcentuales determinadas para GLI con un 1% de LP, en presencia del sistema QUI-HCA[6]S	<b>168</b>
<b>6.1:</b> Efecto de CA[n]S	<b>198</b>
<b>6.2:</b> Valores de $K_A / M^{-1}$ y $\Phi$ de CA[n]S	<b>203</b>
<b>6.3:</b> Efecto de CD	<b>205</b>
<b>6.4:</b> Valores de $K_A / M^{-1}$ de CD	<b>210</b>

# LISTA DE ESQUEMAS

<b>1.1:</b> Resumen y sinopsis de la química supramolecular.	<b>25</b>
<b>4.1:</b> Representación de un complejo sustrato-receptor.	<b>114</b>
<b>4.2:</b> Representación esquemática del objetivo propuesto.	<b>119</b>
<b>5.1:</b> Mecanismo de acción del glifosato en plantas.	<b>145</b>



# LISTA DE FIGURAS

<b>2.A.1:</b> Construcción de sistemas supramoleculares	<b>35</b>
<b>2.A.2:</b> Ejemplos de interacciones ión-ión	<b>39</b>
<b>2.A.3:</b> Ejemplos de interacciones ión-dipolo	<b>40</b>
<b>2.A.4:</b> Ejemplos de interacciones dipolo-dipolo	<b>40</b>
<b>2.A.5:</b> Ejemplos de interacciones catión- $\pi$	<b>41</b>
<b>2.A.6:</b> Ejemplos de interacciones anión- $\pi$	<b>42</b>
<b>2.A.7:</b> Ejemplos de interacciones $\pi$ - $\pi$	<b>42</b>
<b>2.A.8:</b> Ejemplos de interacciones van der Waals	<b>43</b>
<b>2.A.9:</b> Ejemplos de interacciones puentes de hidrógeno	<b>43</b>
<b>2.A.10:</b> Tipos de geometría de interacciones puente de hidrógeno	<b>44</b>
<b>2.A.11:</b> Efecto hidrofóbico	<b>45</b>
<b>2.A.12:</b> Estructura de CD	<b>46</b>
<b>2.A.13:</b> Representación esquemática de CD	<b>47</b>
<b>2.A.14:</b> Estructura de CA	<b>50</b>
<b>2.A.15:</b> Representación esquemática de confórmeros del CA[4]	<b>51</b>
<b>2.B.1:</b> Estructura química de QUI y sus derivados	<b>62</b>
<b>2.B.2:</b> Estructura química de CZL y sus derivados	<b>63</b>
<b>3.1:</b> Espectro de $^1\text{H}$ RMN de $\beta$ -CD	<b>79</b>
<b>3.2:</b> Espectro de $^1\text{H}$ RMN de HCA[8]S	<b>81</b>
<b>3.3:</b> Espectro de $^1\text{H}$ RMN de QUI	<b>83</b>
<b>3.4:</b> Espectros de absorción de QUI	<b>85</b>
<b>3.5:</b> Espectros de emisión y excitación de QUI	<b>85</b>
<b>3.6:</b> Espectros de absorción de HCA[6]S	<b>87</b>
<b>3.7:</b> Espectros de absorción de HCA[8]S	<b>88</b>
<b>3.8:</b> Curva de Stern-Volmer para QUI con HCA[6]S	<b>94</b>

<b>3.9:</b> Curva de Stern-Volmer de la 1° iteración para QUI con HCA[6]S	<b>95</b>
<b>3.10:</b> Curva de Stern-Volmer de la 2° iteración para QUI con HCA[6]S	<b>96</b>
<b>3.11:</b> Curvas de Stern-Volmer para QUI con HCA[6]S comparativa	<b>97</b>
<b>3.12:</b> Curva de Stern-Volmer de la 1° iteración para QUI con $\gamma$ -CD	<b>98</b>
<b>3.13:</b> Curva de Stern-Volmer de la 1° iteración para QUI con $\beta$ -CD	<b>100</b>
<b>3.14:</b> Curvas de Stern-Volmer para QUI con HCA[6]S a 15,0 °C y 35,0 °C	<b>102</b>
<b>3.15:</b> Curvas de Stern-Volmer para QUI con $\gamma$ -CD a 15,0 °C y 35,0 °C	<b>102</b>
<b>3.16:</b> Esquema del sistema de capilares en determinación del PB de la QUI	<b>105</b>
<b>3.17:</b> Representación esquemática de la absorción de luz	<b>107</b>
<b>4.1:</b> Efecto de GLU sobre los espectros de absorción del sistema QUI-HCA[6]S	<b>121</b>
<b>4.2:</b> Efecto de GLU sobre los espectros de emisión de F del sistema QUI-HCA[6]S	<b>122</b>
<b>4.3:</b> Dependencia de $F/F_0$ del sistema QUI-HCA[6]S en presencia de GLU	<b>123</b>
<b>4.4:</b> Espectros de absorción de 3-CIPh	<b>124</b>
<b>4.5:</b> Espectros de emisión de F de 3-CIPh	<b>125</b>
<b>4.6:</b> Efecto de 3-CIPh sobre los espectros de absorción del sistema QUI-HCA[6]S	<b>127</b>
<b>4.7:</b> Efecto de 3-CIPh sobre los espectros de emisión de F del sistema QUI-HCA[6]S	<b>128</b>
<b>4.8:</b> Dependencia de $F/F_0$ del sistema QUI-HCA[6]S en presencia de 3-CIPh	<b>128</b>
<b>4.9:</b> Espectros de absorción de 4-CIPh	<b>129</b>
<b>4.10:</b> Espectros de emisión de F de 4-CIPh	<b>130</b>
<b>4.11:</b> Efecto de 4-CIPh sobre los espectros de absorción del sistema QUI-HCA[6]S	<b>132</b>
<b>4.12:</b> Efecto de 4-CIPh sobre los espectros de emisión de F del sistema QUI-HCA[6]S	<b>133</b>
<b>4.13:</b> Dependencia de $F/F_0$ del sistema QUI-HCA[6]S en presencia de 4-CIPh	<b>134</b>
<b>5.1:</b> Efecto de GLI sobre los espectros de absorción del sistema QUI-HCA[6]S	<b>156</b>
<b>5.2:</b> Efecto de GLI sobre los espectros de emisión de F del sistema QUI-HCA[6]S	<b>157</b>
<b>5.3:</b> Curva de calibrado del sistema QUI-HCA[6]S con GLI	<b>158</b>



<b>5.4:</b> Ajuste de la región elíptica de confianza conjunta de la pendiente y la ordenada al origen	<b>159</b>
<b>5.5:</b> Efecto de la temperatura sobre la emisión de F de una solución 3 mM de GLI en presencia de QUI-HCA[6]S	<b>161</b>
<b>5.6:</b> Efecto de la dilución del medio sobre la emisión de F de una solución 7 mM de GLI en presencia de QUI-HCA[6]S	<b>162</b>
<b>5.7:</b> Efecto de interferentes orgánicos sobre la emisión de F de una solución de QUI-HCA[6]S con 3 mM de GLI	<b>164</b>
<b>5.8:</b> Efecto de interferentes inorgánicos sobre la emisión de F de una solución de QUI-HCA[6]S con 3 mM de GLI	<b>164</b>
<b>5.9:</b> Efecto de AC sobre la emisión de F de una solución de QUI-HCA[6]S con 5 mM de GLI	<b>167</b>
<b>5.10:</b> Efecto de LP sobre la emisión de F de una solución de QUI-HCA[6]S con GLI (1,0 - 5,0) mM	<b>169</b>
<b>5.11:</b> Espectros de emisión de F de soluciones de formulación comercial	<b>170</b>
<b>5.12:</b> Efecto de formulación comercial granulada sobre la emisión de F de QUI-HCA[6]S en presencia de GLI	<b>171</b>
<b>5.13:</b> Efecto de filtraciones sucesivas sobre el espectro de emisión de F de una solución de GLI	<b>171</b>
<b>5.14:</b> Efecto de extracciones sucesivas con CH <sub>3</sub> OH sobre el espectro de emisión de F de una solución 3 mM de GLI	<b>172</b>
<b>5.15:</b> Efecto de extracciones sucesivas con CH <sub>3</sub> OH sobre el espectro de emisión de F de una solución 5 mM de GLI	<b>173</b>
<b>5.16:</b> Efecto de GLI sobre la emisión de F del sistema CZL-HCA[6]S	<b>174</b>
<b>5.17:</b> Dependencia de F/F <sub>0</sub> del sistema CZL-HCA[6]S en presencia de GLI	<b>175</b>
<b>6.0:</b> Estructura de CZL y QUI y algunos compuestos naturales que poseen en su estructura estos núcleos	<b>188</b>
<b>6.1:</b> Espectros de absorción de QNA	<b>192</b>
<b>6.2:</b> Espectros de excitación y emisión de F de QNA	<b>193</b>
<b>6.3:</b> Espectros de absorción de HNO	<b>193</b>
<b>6.4:</b> Espectros de excitación y emisión de F de HNO	<b>194</b>
<b>6.5:</b> Espectros de absorción de HNA	<b>194</b>
<b>6.6:</b> Espectros de excitación y emisión de F de HNA	<b>195</b>

<b>6.7:</b> Espectros de absorción de EHC	<b>195</b>
<b>6.8:</b> Espectros de excitación y emisión de F de EHC	<b>196</b>
<b>6.9:</b> Espectros de absorción de QNA en presencia de HCA[8]S	<b>200</b>
<b>6.10:</b> Efecto de HCA[8]S sobre la emisión de F de QNA	<b>200</b>
<b>6.11:</b> Dependencia de $F_0/F$ de QNA con la concentración de HCA[8]S	<b>201</b>
<b>6.12:</b> Efecto de HCA[6]S sobre la emisión de F de QNA	<b>201</b>
<b>6.13:</b> Dependencia de $F/F_0$ de QNA con la concentración de HCA[6]S	<b>202</b>
<b>6.14:</b> Efecto de HCA[8]S sobre la emisión de F de HNA	<b>202</b>
<b>6.15:</b> Dependencia de $F_0/F$ de HNA con la concentración de HCA[8]S	<b>203</b>
<b>6.16:</b> Efecto de HP- $\beta$ -CD sobre la emisión de F de HNA	<b>206</b>
<b>6.17:</b> Dependencia de $F/F_0$ de HNA con la concentración de HP- $\beta$ -CD	<b>207</b>
<b>6.18:</b> Dependencia de $F/F_0$ de HNO con la concentración de HP- $\beta$ -CD	<b>207</b>
<b>6.19:</b> Dependencia de $F/F_0$ de QNA con la concentración de HP- $\beta$ -CD	<b>208</b>
<b>6.20:</b> Dependencia de $F/F_0$ de HNO con la concentración de $\alpha$ -CD	<b>209</b>
<b>6.21:</b> Dependencia de $F/F_0$ de HNA con la concentración de $\alpha$ -CD	<b>210</b>
<b>6.22:</b> Gráficos de doble recíproca	<b>212</b>
<b>6.23:</b> Efecto de $\alpha$ -CD sobre la absorción de HNA	<b>214</b>
<b>6.24:</b> Efecto de $\alpha$ -CD sobre la emisión de F de HNA	<b>215</b>
<b>6.25:</b> Dependencia de $F/F_0$ de HNA con la concentración de $\alpha$ -CD	<b>215</b>
<b>6.26:</b> Dependencia de $F/F_0$ de HNA con la concentración de $\alpha$ -CD (comparativa)	<b>217</b>