



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Orgánica
Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas
de Córdoba, INFIQC, CONICET

Tesis doctoral

Sensores basados en nanocavidades de calixarenos y tiacalixarenos

Guadalupe Gloria Miñambres

2014

K.T

547.7

M

12411

autor

7.7.2019 / 01/03/20

7000		
------	--	--

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Directora:

Dra. Alicia V. Veglia

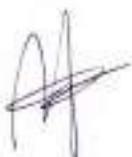


Comisión evaluadora:

Dra. Ana N. Santiago



Dra. Verónica Brunetti



Dr. Marcio Lazzarotto (Miembro propuesto por el Director)



Evaluador externo:

Dr. Julio Raba (Universidad Nacional de San Luis)



Agradecimientos

A mi familia, por el amor, la comprensión y el apoyo incondicional, a mis padres que me fomentaron la garra y perseverancia para vivir mis propios sueños como hicieron ellos.

A mi directora, por adoptarme para ser parte del grupo de trabajo, por la confianza y horas brindadas y por haberme guiado durante esta etapa compartiendo sus conocimientos y experiencia.

A todas las personas que contribuyeron en mi formación personal y académica posibilitando la realización de esta tesis.

A la Comisión de Tesis, por la excelente predisposición, sugerencias y aportes realizados durante el desarrollo y la redacción de esta tesis.

A aquellas personas que mediante su colaboración, recomendaciones y enseñanzas contribuyeron en este trabajo.

A mis 'hermanos' académicos por la compañía, consejos, paciencia, apoyo y ayuda.

A todos los integrantes del Departamento de Química Orgánica, por todos los momentos compartidos. A los integrantes de la secretaría por la dedicación y trato fraternal.

A todas las personas que hoy son amigos, por su cariño, alegría y compañía incluso a la distancia.

A todos los que aportaron a la "producción" de la tesis, las chicas del búnker, al 'artista' que realizó el diseño de las gráficas que me encantan, gracias por brindarme su espacio y hacerse de tiempo.

Finalmente, agradezco a las instituciones que hicieron factible el desarrollo de este trabajo de investigación. A la Universidad Nacional de Córdoba, por el espacio académico.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científica (CONICET) y otros organismos, por el apoyo financiero mediante la beca y los subsidios otorgados.

A todos muchas gracias 😊

Capítulo I

Titulo : Introducción general y objetivos

1.Introducción General	3
2. Objetivos	
2.1 Objetivo General	5
2.2 Objetivos Específicos	6
Bibliografía	7

Capítulo II

Titulo: Introducción Temática

1. Introducción	11
2. Química huésped-receptor	13
3. Sustratos	30
4. Bibliografía	43

Capítulo III

Titulo: Síntesis y caracterización de macrociclos

1. Introducción	51
2. Objetivos	56
3. Materiales y métodos	56
4. Resultados y discusión	62
5. Conclusiones	77
6. Bibliografía	78

Capítulo IV

Título: Efecto del metal alcalino en las constantes de disociación ácido-base de calixarenos y tiacalixarenos

1. Introducción	83
2. Objetivos	87
3. Materiales y métodos	88
4. Resultados y discusión	92
5. Conclusiones	107
6. Bibliografía	108

Capítulo V

Título: Estudio de interacciones supramoleculares

1. Introducción	113
2. Objetivos	114
3. Materiales y métodos	114
4. Resultados y discusión	117
5. Conclusiones	157
6. Bibliografía	158

Capítulo VI

Título: Métodos analíticos supramoleculares

1. Introducción	163
2. Objetivos	171
3. Materiales y métodos	173
4. Resultados y discusión	176
5. Conclusiones	183
6. Bibliografía	185

Conclusiones Generales 189

Reseña 191



Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

1. Introducción General

El área de la química que estudia la organización de especies químicas ensambladas mediante interacciones no covalentes se denomina *química supramolecular* [1].

El medio en los sistemas organizados se presenta en compartimentos, regiones con propiedades diferentes y, por lo tanto, se consideran microheterogéneos. El término microheterogéneo se debe a que estos medios son heterogéneos a un nivel microscópico [2]. Estos sistemas organizados se clasifican en: agregados moleculares, como micelas formadas por surfactantes o membranas constituidas por lípidos, y sistemas poliméricos abiertos o cerrados [3]. Entre los sistemas poliméricos de cadena cerrada se encuentran los receptores macrocíclicos que presentan cavidades como calixarenos (metaciclofanos) y ciclodextrinas (polisacáridos), capaces de interactuar con diversos sustratos formando complejos [4]. La formación de estos complejos puede modificar las propiedades físicas y químicas del sustrato. En consecuencia, los receptores macrocíclicos se han empleado con diferentes objetivos, como incrementar la estabilidad de drogas o la solubilidad de moléculas orgánicas en agua, etc. [5].

Por otra parte, la química analítica es la ciencia que se basa en el desarrollo y la aplicación de conceptos, principios y estrategias experimentales e instrumentales para medir las características de los sistemas y especies químicas [4]. Los avances en este campo tienen como finalidad mejorar los métodos analíticos establecidos, extender el empleo de los mismos a otras muestras y/o desarrollar nuevos métodos. Diversas disciplinas, como la física, la matemática y la química, aportan las herramientas necesarias con el propósito de garantizar que las mediciones se lleven a cabo de manera verídica y representativa. El éxito fundamental de la química analítica radica en la representación de procesos y

matrices reales que son evaluados utilizando los conceptos y fundamentos de la teoría.

Si bien los ingenieros y científicos en el campo de la biología y de la física disponen de una serie de herramientas poderosas y elegantes para obtener información cualitativa y cuantitativa de la composición y estructura de la materia, en los últimos años se han desarrollado metodologías que proponen la aplicación de diversas técnicas analíticas en presencia de sistemas organizados supramoleculares. La química analítica supramolecular es el área que comprende el desarrollo de metodologías analíticas basadas en las interacciones intermoleculares entre especies orgánicas y/o inorgánicas, experimentando reconocimiento molecular y autoensamblado. Son varias las ventajas y beneficios que se obtienen con el uso de sistemas organizados, como el incremento de la selectividad y de la sensibilidad [5]. Consecuentemente, es de esperar que tanto en el presente como a futuro la demanda de estos sistemas aumente dando un futuro prometedor a la química analítica supramolecular.

La combinación de sistemas organizados supramoleculares y métodos luminiscentes estáticos (fluorescencia y fosforescencia) y dinámicos (cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia, etc.), han permitido la determinación y estudio de compuestos orgánicos de interés en diversas disciplinas, como agroquímica, biológica, farmacéutica, ambiental, química de los alimentos, etc. [6]. Anteriormente, en el grupo de investigación en el que se desarrolló este trabajo de tesis, se evaluó el efecto de ciclodextrinas y calixarenos sobre las propiedades espectroscópicas de diferentes fluoróforos. Las señales fluorescentes intensificadas en presencia de estos macrociclos permitió el desarrollo de métodos analíticos para determinar y cuantificar varios sustratos en diferentes matrices, entre ellos los fungicidas benomilo y carbendazim [7], los pesticidas carbamatos, que son poco fluorescentes, bendiocarb y promecarb [8] con calixarenos y derivados de

indoles como 1-metilindol y ácido 3-indolacético con ciclodextrina [9], en diferentes matrices. Los ticalixarenos son macrociclos derivados de los calixarenos en los que el puente de metileno se ha reemplazado por un átomo de azufre manteniendo la cavidad hidrofóbica, su estructura conformacional variable y una alta reactividad que permite su funcionalización. Debido a estas características se considera que estos compuestos orgánicos pueden ser receptores apropiados para su aplicación en el área de la química supramolecular y que podría permitir el desarrollo de nuevas metodologías en el área de la química analítica supramolecular [10].

2. Objetivos

2. 1. Objetivo general

En este trabajo de tesis se propuso estudiar el efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de sustratos inorgánicos y orgánicos que produce la interacción con calixarenos a fin de explorar la posibilidad de desarrollar métodos analíticos sensibles, confiables y simples.

Entre los compuestos orgánicos a estudiar se encuentran algunos contaminantes del suelo provenientes de agroquímicos (carbamatos como Benomilo y Paraquat) y compuestos de origen natural que se utilizan como aditivos en alimentos y fármacos (ácido cafeico, ácido clorogénico, etc), como así también moléculas biológicas derivadas de metabolitos (6-hidroximelatonina derivada de la melatonina). Este estudio se basa en los cambios físicos y químicos producidos por sistemas organizados (receptores macrocíclicos) que presentan cavidades permanentes o dinámicas, actuando como nanoreactores y nanocompartimentos [3].

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos se mencionan a continuación.

- Determinar la influencia del catión metálico de la base alcalina sobre las constantes de disociación ácido-base de los receptores macrocíclicos *p*-*tert*-butiltiacalix[4]areno, *p*-*tert*-butil-calix[4]areno y *p*-*tert*-butil-calix[6]areno.
- Estudiar la influencia de receptores macrocíclicos tales como los calixarenos (CA) y los tiacalixarenos (TCA) sobre las propiedades espectroscópicas (fluorescencia y UV-Visible) de ácido cafeico (AC) y paraquat (PQ).
- Establecer los parámetros analíticos de validación dando énfasis a la determinación del límite de detección y la cuantificación de los analitos por técnicas de luminiscencia supramolecular en sistemas previamente estudiados en el laboratorio, para la determinación de 6-hidroximelatonina (6M) y benomilo (BY) basado en los cambios espectrofluorimétricos, estableciendo los correspondientes parámetros estadísticos y evaluando el efecto de especies potencialmente interferentes y la aplicabilidad del método en matrices reales.

3. Bibliografia

- [1] J. Lehn, "Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices(Nobel Lecture)," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 27, pp. 89–112, 1988.
- [2] J. W. Steed and J. L. Atwood, "Supramolecular Chemistry," 2nd ed. John Wiley & Sons, 2009.
- [3] K. Kalyanasundaran, "Photochemistry in microheterogeneous systems," 4th ed. London: Academic Press inc., 1989.
- [4] R. Murray, "Analytical chemistry is still the science of chemical measurements," *Anal. Chem.*, p. 1765, 2007.
- [5] H. Babu, J. Nagendra; Bhalla, Vandana; Kumar, Manoj; Singh, "Selective Colorimetric Sensing of Cyanide Ions Over Fluoride Ions by Calix[4]arene Containing Thiourea Moieties," *Lett. Org. Chem.*, vol. 3, no. 10, pp. 787–793, 2006.
- [6] C. Schalley, "Analytical Methods in Supramolecular Chemistry." Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- [7] N. L. Pacioni, V. N. Sueldo Ocello, M. Lazzarotto, and A. V. Veglia, "Spectrofluorimetric determination of benzoimidazolic pesticides: effect of p-sulfonatocalix[6]arene and cyclodextrins.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 624, no. 1, pp. 133–40, 2008.
- [8] N. L. Pacioni, A. G. Bracamonte, and A. V. Veglia, "Comparative effect of cyclodextrin nanocavities versus organic solvents on the fluorescence of carbamate and indole compounds," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 198, no. 2–3, pp. 179–185, 2008.
- [9] R. E. Galian, a. G. Bracamonte, and A. V. Veglia, "Hydroxypropyl- β -cyclodextrin effect on the fluorescence of auxin and skatole and on the simultaneous determination of binary mixtures of indole compounds in urine by first derivative spectrofluorimetry," *Anal. Chim. Acta*, vol. 540, no. 2, pp. 393–401, 2005.
- [10] E. V Anslyn, "Supramolecular analytical chemistry.," *J. Org. Chem.*, vol. 72, no. 3, pp. 687–699, 2007.

Capítulo II

INTRODUCCIÓN TEMÁTICA

1. Receptores Macrocíclicos

En este trabajo de tesis se han empleado receptores macrocíclicos (Figura 1) como ciclodextrinas (CD), calixarenos (CA) y tialcalixarenos (TCA).

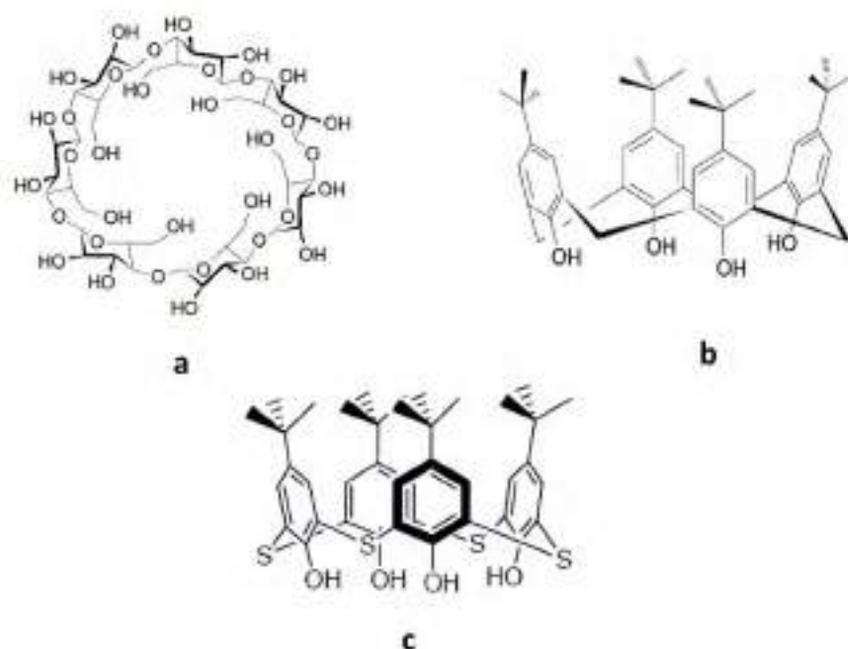


Figura 1. a) β -ciclodextrina; b) *p*-*tert*-butilcalix[4]areno y c) *p*-*tert*-butiltialcalix[4]areno.

El descubrimiento de los éteres corona (Figura 2) por C. J. Pedersen fue estimulante para que un gran número de científicos enfocaran su labor en el diseño y la síntesis de una variedad de moléculas hospedantes debido a las nuevas y potenciales propiedades de estos compuestos por su capacidad para formar complejos supramoleculares (huésped-receptor) [1]. Con la aparición de estos nuevos compuestos se generaron materiales avanzados altamente funcionalizados como catalizadores de alto rendimiento [2] [3] sensores altamente sensibles, filtros o separadores de materiales ultra finos [4], entre otros. Para que un compuesto sea útil como receptor es necesario que interacte o reconozca a la molécula de interés. Ésta habilidad para el reconocimiento se hace posible mediante grupos complementarios en la

molécula hospedante. Es deseable que el compuesto que se selecciona como potencial receptor no sólo sea fácil de sintetizar y con elevado rendimiento, sino que también debe ser capaz de ser modificado químicamente de manera de poder mejorar el reconocimiento molecular y así aumentar la selectividad por la molécula huésped [1].

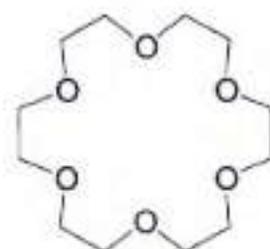


Figura 2. Estructura de [18]-corona-6.

Una familia de moléculas hospedantes que cumple con estos requisitos son los calixarenos, compuestos macrocíclicos formados por unidades fenólicas enlazadas entre sí mediante grupos de metileno en las posiciones 2, 6 de los fenoles. El principal atractivo de estos compuestos es su uso como receptores, tales como los éteres corona y las ciclodextrinas (Figuras 2 y 1a) [5]. Es por esto que la principal estrategia para potenciar la reactividad de estos compuestos se basa en la modificación de los grupos hidroxifenólicos y/o las posiciones *para* a éstos.

Durante el desarrollo de nuevos compuestos hospedantes, se sintetizó al tiacalix[4]areno, como se describirá en el transcurso de esta tesis. En este nuevo compuesto, los grupos metileno del calix[4]areno se hayan sustituidos por puentes de sulfuro [2]. La presencia del átomo de azufre le confiere al compuesto características electrónicas y estructurales diferentes a las del macrociclo precursor. Por ello, se considera a los tiacalixarenos como los fundadores de una nueva era la de la “segunda generación” química de calixareno [2].

2. Química huésped-receptor

Donald Cram definió: *“Los complejos están compuestos por dos o más moléculas o iones que permanecen juntos en una relación estructural única- Un complejo molecular altamente estructurado está compuesto al menos por un receptor y un huésped. . .”* Por lo tanto un complejo huésped-receptor o supramolécula está constituido por una molécula, el huésped, que interacciona con una segunda molécula, el receptor.

Generalmente el receptor es una molécula grande o un agregado de moléculas que posee una cavidad o hueco central de un determinado tamaño. El huésped puede ser un ión, una molécula pequeña o moléculas complejas como por ejemplo las hormonas, entre otras [6].

2.1 Reconocimiento molecular

La unión de un huésped y un receptor conforma una supermolécula, que se caracteriza por su estabilidad y su selectividad cinética y termodinámica. J. M. Lehn utilizó este término para denotar una entidad compleja y organizada que fue creada a partir de dos o más especies químicas que se unen a través de fuerzas intermoleculares. Estas estructuras supramoleculares presentan propiedades que son diferentes (con frecuencias mejores) que la simple suma de las propiedades de cada componente en forma individual [7]. El reconocimiento molecular sucede mediante los sitios de unión del receptor, región específica de la molécula que posee tamaño, geometría y/o funcionalidad adecuados para asociar otra molécula. Esta asociación molecular es un proceso que involucra un enlace no covalente y la elección del sustrato por una dada molécula o sitio del receptor [8].

Los principales conceptos que describen los diferentes procesos y factores que participan en la formación de los sistemas supramoleculares son los que se enumeran a continuación.

La selectividad se basa en los principios de la complementariedad química, representados comúnmente por afinidad de forma y tamaño, como ejemplo está el principio de Paul Ehrlich de llave-cerradura (Figura 3) entre otras [9].

La complementariedad se da cuando en ambos, receptor y huésped, existen sitios que son electrónica y espacialmente complementarios, en si involucra fuerzas intermoleculares no covalentes (interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals, puente hidrógeno, etc.) [10].

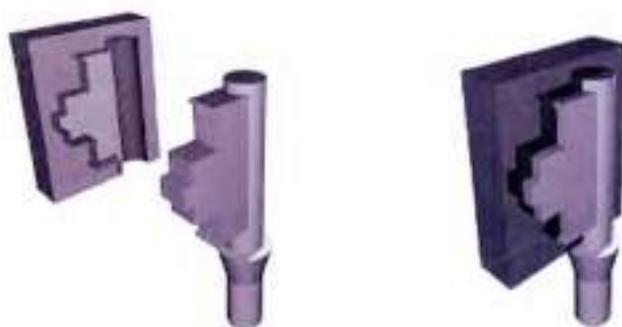


Figura 3. Principio de llave-cerradura, donde el receptor es representado por la cerradura que posee ranuras que coinciden con el huésped representado por la llave [9].

El efecto quelato hace referencia al aumento en la estabilidad de los complejos formados con receptores multidentados, es decir, presentan más de un sitio de unión.

El término cooperatividad denota la interacción producida cuando dos o más sitios de unión del receptor actúan de manera concertada, o bien el efecto sobre la afinidad de un receptor hacia un dado huésped, como resultados de la unión previa de otro sustrato.

Por otra parte si el receptor no sufre grandes cambios conformacionales al unirse al huésped, se dice que existe una 'preorganización'. Este concepto es

muy importante debido a que es el factor que más contribuye a la energía libre total de formación del complejo. El principio de preorganización establece que mientras mayor sea la organización del huésped y el receptor para formar el enlace intermolecular, más estable será el complejo formado.

2.1.1. Naturaleza de las interacciones

Los principales tipos de interacciones no covalentes que mantienen unidas las entidades supramoleculares se especifican en la Tabla 1[10] [11] [12][13]. Generalmente las reacciones de formación de complejos huésped-receptor se dan rápidamente, a no ser que sobre los procesos de asociación y disociación primen otros factores como por ejemplo, efectos de impedimento estérico [10].

Tabla 1. Interacciones supramoleculares.

Tipo de interacción	Energía, kJ mol^{-1}	Ejemplos
ión-ión	50 – 380	Tiocianato de astato (III) $\text{AtO}(\text{SCN})_2^-$
ión-dipolo	50 – 200	Complejo ión K – éter 18-corona-6
dipolo-dipolo	5 – 50	Acetona
cación- π	< 5 – 80	Ión K^+ – benceno
π - π stacking	< 0 – 50	Benceno
Anión- π	10	Complejo ión I^- – calixpirrol
van der Waals	< 5 (a)	Empaquetamiento en cristales moleculares
efectos del solvente	(b)	Compuestos de inclusión formados con cavitandos con interior hidrofóbico
puente hidrógeno	4 – 120	ADN; etanol ; H_2O

(a) Valor variable dependiendo del área superficial.

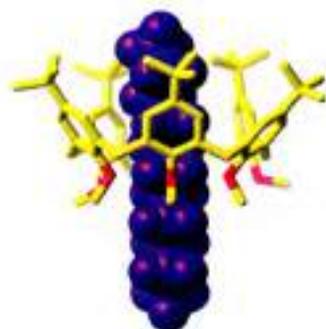
(b) El rango de energía es amplio ($5\text{-}380 \text{ kJ mol}^{-1}$), los valores dependen de la energía de interacción solvente-solvente.

La estabilidad de las asociaciones huésped -receptor depende en un alto grado de las energías de solvatación del receptor, del huésped y del complejo huésped-receptor. Dependiendo de las contribuciones relativas de estas energías de solvatación, la constante de equilibrio puede variar dramáticamente de un solvente a otro [10].

El enlace puente hidrógeno es la interacción no covalente más importante en el diseño de arquitecturas supramoleculares por el alto grado de direccionalidad y los valores de energía asociados a la misma. Las interacciones involucradas en los procesos de solvatación o desolvatación de los compuestos implicados en la complejación también afectan la estabilidad del complejo o la supramolécula (o supermolécula) [5]. Si el solvente es polar, especialmente agua, las moléculas del solvente interaccionan preferencialmente entre sí o con otras moléculas o grupos polares, produciéndose la separación de moléculas o grupos no polares [1] [5]. Por lo general, este efecto denominado hidrofóbico es la principal contribución en la unión entre sustratos orgánicos y receptores con interior hidrofóbico en solventes polares [1].

2.2 Clasificación de los compuestos supramoleculares huésped-receptor

Generalmente los receptores se clasifican en *cavitandos* y *clatrandos* de acuerdo a la relación topológica que existe entre el huésped y el receptor. Los *cavitandos* presentan una cavidad intramolecular donde se lleva a cabo la interacción, formando el complejo supramolecular *cavitato*. En los *clatrandos* el reconocimiento se lleva a cabo en cavidades extramoleculares, éstas entidades se forman sólo en estado cristalino o sólido y el agregado huésped-receptor formado se denomina *clatrato* (Figura 4 a [14] y b [15]) [6].



a



b

Figura 4. a) Cavitato de un receptor sintético, calixareno (cavitando) con una alquil amina incluida, b) Clatrato de silicio confinando a átomos metálicos (esferas) en cajas [15].

2.2.1. Cavitandos

Como se mencionó en el Capítulo I, en este trabajo de tesis se emplearon como receptores macromoleculares del tipo cavitandos, como los calixarenos, tiacalixarenos, y ciclodextrinas. 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.

Ciclodextrinas

Las CD son oligómeros cíclicos constituidos por unidades de α -D-(+)-glucopiranosas unidas mediante enlaces α -(1,4')-glicosídicos (Figura 5). Estos macrociclos presentan una estructura ligeramente cónica con una cavidad hidrofóbica y dos aberturas de diferentes dimensiones: la mayor rodeada por grupos hidroxilos secundarios, y la menor, por grupos primarios. Las CD nativas

denominadas α CD, β CD y γ CD presentan 6, 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente.



Figura 5. Estructura de α -ciclodextrina.

El número de unidades de glucosa determinan las dimensiones y el tamaño de la cavidad (Figura 6).

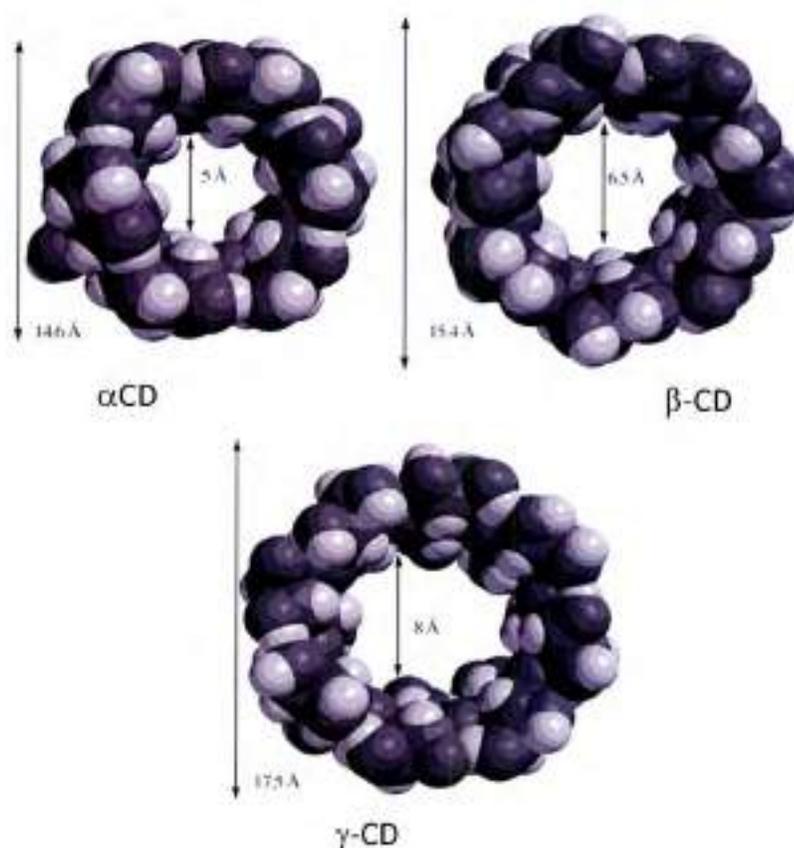


Figura 6. Estructura en esfera en 3D de las ciclodextrinas nativas.

Todas las unidades de glucosa tienen la conformación silla C1 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. En el interior de la CD se encuentran las cadenas de $-CH_2-$ y los oxígenos glicosídicos. Como resultado de la ubicación de los grupos funcionales o de los átomos que lo formen, el interior de la cavidad es apolar relativa al agua y el exterior es hidrofílico [6].

Calixarenos

Los CA son macrociclos de gran interés por su sencilla síntesis y funcionalización. Se obtienen mediante la condensación, catalizada por bases y/o ácidos, de fenoles *para*-sustituídos y formaldehído. En estas moléculas se distinguen dos regiones: un aro angosto, donde se sitúan los oxígenos de los fenoles y un aro ancho ocupado por los sustituyentes en las posiciones *para* a los hidroxilos fenólicos. Por el arreglo en canasta de estos compuestos es que es posible funcionalizarlos en ambas caras de la estructura, de forma regio y estereo controlada, para así organizar y orientar el espacio del sitio de inclusión de manera de incrementar la selectividad por el sustrato [6].

En relación al nombre trivial calixareno, el prefijo *calix* denota la semejanza entre la forma del tetrámero cíclico y la vasija griega conocida como *calyx krater* (Figura 7); el sufijo *areno* se refiere a los grupos arilos y, entre estos términos, se especifica el número de monómeros que forman la estructura macrocíclica con una unidad repetitiva, $n = (4 \text{ a } 20)$ [13].



Figura 7. Analogía entre la estructura de *p-tert*-metilfenileter-calix[4]areno y la vasija griega [13] .

Estos oligómeros cíclicos sintéticos se obtienen mediante la reacción de condensación en un paso entre fenoles sustituidos y formaldehído catalizada por base o ácido, o por la condensación convergente entre fragmentos. En comparación a otros macrociclos, la fácil y versátil derivatización de estos compuestos es una característica interesante debido a que permite la obtención de calixarenos con propiedades físicas, químicas y de reconocimiento molecular marcadamente diferentes. Diversos grupos funcionales pueden introducirse por sustitución de los átomos de hidrógeno del grupo hidroxilo o de la posición *para* respecto a este grupo, o por reemplazo del grupo hidroxilo. En la Figura 8 se presenta la estructura del calix[n]areno y las regiones donde se llevan a cabo las reacciones de sustitución con diversos grupos funcionales. Las posiciones *para* se hallan en la boca ancha o 'exo' en tanto que los grupos hidroxilo se hallan en la boca angosta o 'endo'.

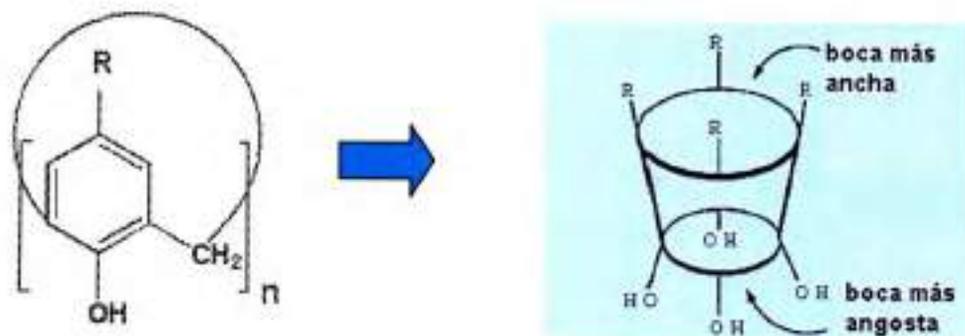


Figura 8. Calix[n]areno y el modelo de 'balde' para un *p*-alquilcalix[4]areno.

Los puntos de fusión de los CA son elevados ($> 260\text{ }^{\circ}\text{C}$) [13] y varían considerablemente dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes. En la Figura 9 se muestran ejemplos de calixarenos derivatizados.

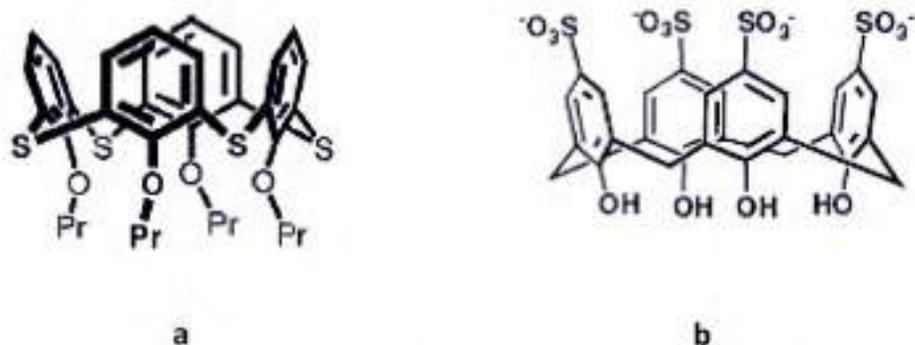


Figura 9. a) ENDO sustituido, calix[4]areno propano éter; b) EXO sustituido, *p*-calix[4]areno sulfonato.

En solución, los grupos arilos de los calixarenos rotan respecto a los grupos metilenos orientándose *syn* o *anti* unos en relación a otros, generando distintos conformeros [16]. El número posible de conformeros incrementa con el número de unidades monoméricas y la estabilidad de los mismos depende de diversos factores, como del tamaño de los sustituyentes, de la naturaleza del solvente y del huésped.

En la Figura 10 se presentan las diferentes orientaciones de *p-tert*-butilcalix[4]areno: cono, que define una cavidad intramolecular (a); cono parcial (b); 1,2-alternada (c) y 1,3-alternada (d). El conformero más estable de este derivado es el tipo cono, que es favorecido por la formación de enlaces puente hidrógeno intramoleculares entre los grupos hidroxilos.

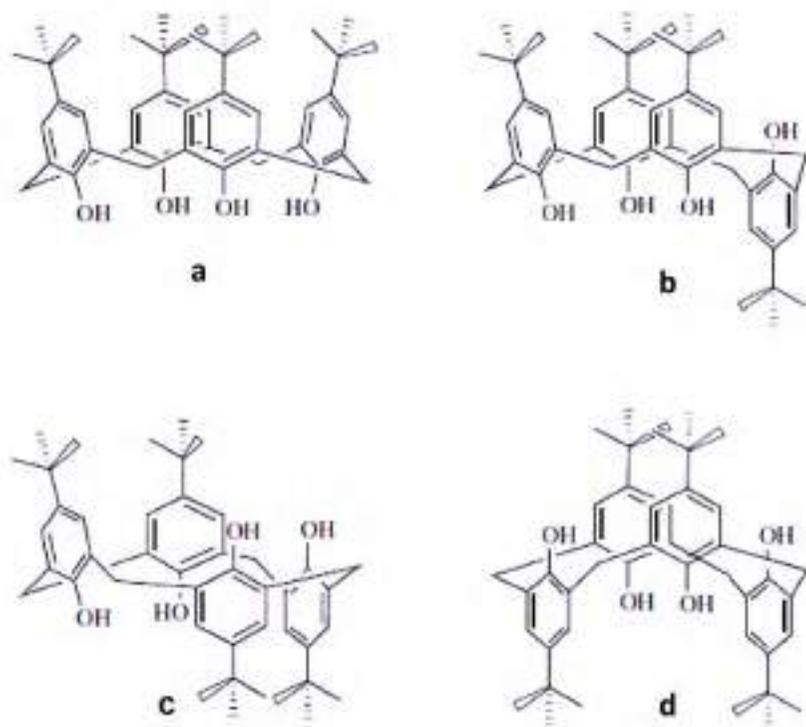


Figura 10. Conformeros de *p-tert*-butilcalix[4]areno: (a) cono; (b) cono parcial; (c) 1,2- alternado y (d) 1,3-alternado [13].

Debido a que una de las principales características de los calixarenos es su insolubilidad en agua, se puso gran interés en la síntesis de derivados que sean solubles en medio acuoso. Uno de los primeros calixarenos de este tipo contenía grupos carboxílicos y alcanzaba solubilidad en agua del orden 1 mM [17].

Posteriormente Shinkai describió la síntesis de calixarenos que contenían grupos sulfonatos como sustituyentes lo que les confería mayor solubilidad que los mencionados anteriormente [18], alcanzándose una concentración en agua

de 100 mM [19] [20]. También, hay reportes de otros amino calixarenos solubles en medio ácido y carboxicalixarenos solubles en medio básico [17].

Los ácidos *p*-sulfónicos de los calix[*n*]arenos (*n* = 4, 6 u 8) son altamente higroscópicos. Estos compuestos al absorber agua del ambiente generaban los respectivos compuestos estables, tales como el ácido *p*-sulfónico del calix[4]areno con 13 moléculas de H₂O, el ácido *p*-sulfónico del calix[6]areno con 16 moléculas de H₂O y el ácido *p*-sulfónico del calix[8]areno con 28 moléculas de H₂O [17]. La disociación del ácido sulfónico en agua se lleva a cabo por completo. Por otro lado la disociación de los hidroxilos fenólicos presenta diferentes pKa dependiendo del macrociclo, algunos se detallan en la Tabla 2 [19].

Tabla 2. Valores de pKa para los diferentes ácidos *p*-sulfónicos de los calix[*n*]arenos [19].

Compuesto	Propiedades ácido-base	
	N° de grupos SO ₃ H	grupos OH
Monómero: ácido <i>p</i> -hidroxibencenosulfónico	1 / muy ácido	pKa1 = 8,68
Ácido <i>p</i> -sulfónico del calix[4]areno (a)	4 / muy ácidos	pKa1 muy ácido; pKa2 > 11
Ácido <i>p</i> -sulfónico del calix[6]areno	6 / muy ácidos	pKa1 = 3,45; pKa2 = 5,02; pKa3 > 11
Ácido <i>p</i> -sulfónico del calix[8]areno	6 / muy ácidos; pKa ₇ = 4,10; pKa ₈ = 4,84	pKa1= 7,70; pKa2 = 9,10; pKa3 > 11

(a) Shinkai ha informado otros valores para pKa1 = 3,26; pKa2= 11,8; pKa3 = 12,8 y pKa4 ~ 14,0[13] [17]. Otros valores informados en literatura son 3,08 y 12,02 para pKa1 y pKa2 respectivamente [13] [20].

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. Sin embargo, las siguientes disociaciones son menos favorables porque a medida que aumenta el número de grupos ionizados, la repulsión electrostática entre los mismos es el efecto predominante.

Los tialcalixarenos (Figura 11 b), oligómeros cíclicos sintéticos similares a los calixarenos (Figura 11 a), se obtienen mediante la reacción de condensación en un paso, entre fenoles sustituidos y azufre molecular, catalizada por base como se detallará en el Capítulo III. Al igual que los calixarenos de los que provienen, estos macrocilos son de fácil y versátil derivatización lo que permite la obtención de tialcalixarenos con propiedades físicas, químicas y de reconocimiento molecular diferente.



Figura 11. a) calixarenos y b) tialcalixarenos.

La rotación sobre el puente de sulfuro también le confiere a los tialcalixarenos la posibilidad de presentar diferentes conformaciones (Figura 12).

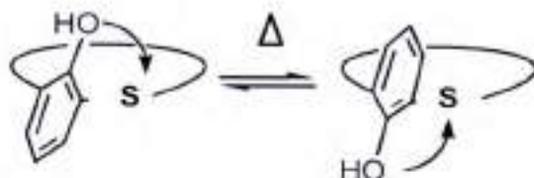


Figura 12. Equilibrio conformacional por la libre rotación del enlace de sulfuro.

Al igual que sus homólogos son insolubles en agua, pero su versatilidad en las reacciones de sustitución permitió la obtención de especies sulfonadas altamente solubles en medios acuosos como se describe en la Figura 13. Existen reacciones químicas específicas debidas a la presencia del puente de sulfuro que son la oxidación a sulfinilo y/o sulfóxido como se muestra en la Figura 13.

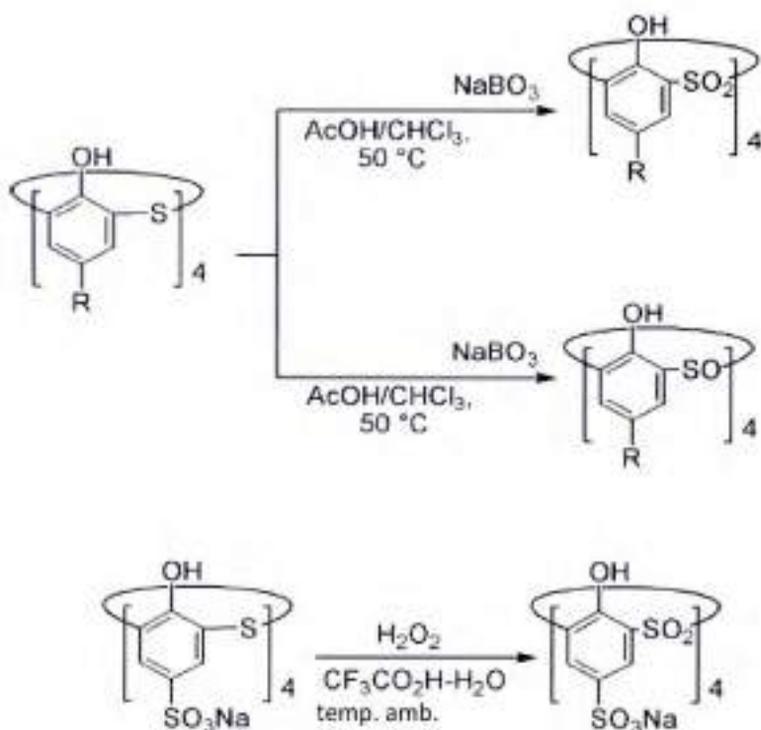
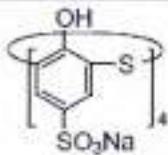
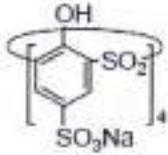
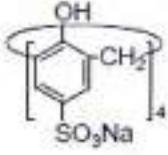
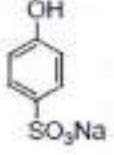


Figura 13. Reacciones específicas del sulfuro.

Las disociaciones de los protones de los hidroxilos del grupo fenol en estos macrociclos se llevan a cabo, en principio, por los mismos factores que para los calixarenos, es decir por la estabilidad que le confieren la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares.

A continuación en la Tabla 3 se detallan algunos valores de pKa de calix[4]arenos en los que se pueden comparar dos efectos: el efecto macrocíclico respecto al monómero y la presencia del puente de sulfuro ante el del metileno en el calix[4]areno [2].

Tabla 3. Comparación de valores de pKa en *p*-sulfonato calixareno

Compuesto	pKa1	pKa2	pKa3	pKa4
A 	2.18 ± 0.05	8.45 ± 0.10	11.19 ± 0.15	11.62 ± 0.12
B 	(a)	1.28 ± 0.09	4.60 ± 0.11	4.42 ± 0.13
C 	3.08 ± 0.05	12.02 ± 0.02	(b)	(b)
D 	8.9			

(a) pKa₁ no puede ser medido, aunque se estime en el rango -2 a 0 [2].

(b) Los valores de pKa₃ y pKa₄ no pueden evaluarse experimentalmente, pero se estima que son mayores a 13 [2].

La acidez del hidroxilo fenólico para A es mucho mayor que para C especialmente en el valor de pK_a2 . Estas diferencias pueden ser atribuidas al efecto electrónico del sulfuro, así como también a los cambios en la interacción de puente hidrógeno debido al aumento del tamaño del anillo. Además la conversión de sulfuro (A) a sulfona (B) aumenta todavía más la acidez.

Propiedades de reconocimiento molecular y aplicaciones de los calixarenos

Los calixarenos actúan como receptores macrocíclicos formando complejos y estructuras auto-ensambladas con una amplia variedad de sustratos neutros e iónicos mediante diversos tipos de interacciones [16]. Los grupos arilos de los calix[n]arenos favorecen las interacciones π - π , catión- π y anión- π , mientras que los grupos hidroxilos permiten interacciones ión-ión, ión-dipolo y puente hidrógeno [13]. En relación a la aplicabilidad de estos compuestos orgánicos se publicaron más de mil patentes que describen moléculas basadas en calixarenos con diversas aplicaciones prácticas, como promotores de adhesión, fotoreceptores, tinturas para el cabello, aditivos para combustible, agentes de curado, antioxidantes, antibacterianos, dispositivos para el control de la temperatura, catalizadores, etc.[21]

Los calixarenos se han empleado para el reconocimiento, la cuantificación analítica y la separación de iones alcalinos, alcalinos térreos, amonio, de metales de transición, de algunos aniones inorgánicos y moléculas orgánicas, etc. [18]. Por ejemplo, el calixareno derivatizado de la Figura 14 se acompleja con Pb^{2+} generando un quenching en la fluorescencia que es reversible en presencia de K^+ [22].

Los complejos supramoleculares con tiacalixarenos también se forman mediante interacciones no covalentes como las descritas anteriormente. Como ejemplo de la interacciones catión- π se puede citar la aplicación de tiacalix[4]areno con Ce^+ [23]. Se han realizado extracciones líquido-líquido desde agua con diclorometano de metales alcalinos, alcalinos térreos y algunos

metales de transición como Ag^+ , Cu^{2+} y Cu^+ con tiacalixarenos *p*-sustituídos con amidas [24], compuesto de la Figura 15.

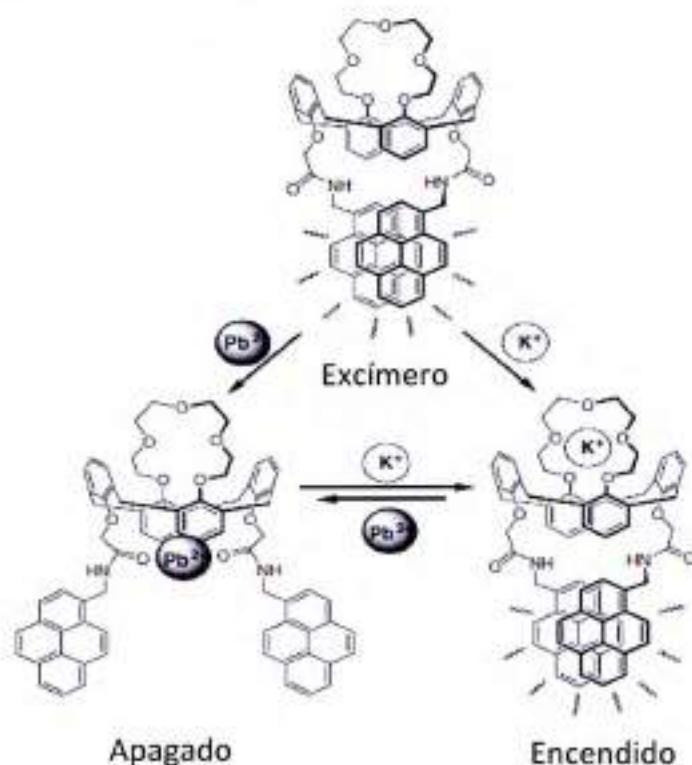


Figura 14. Esquema del mecanismo de encendido-apagado de la fluorescencia del complejo con Pb^{2+} en presencia de K^+ con fuerte emisión del excímero.

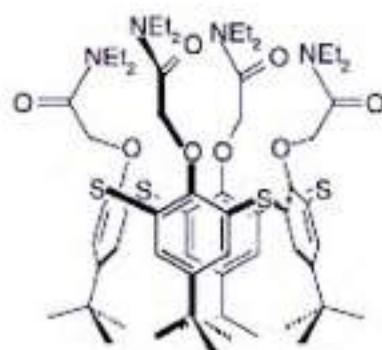


Figura 15. Tiacalix[4]areno sustituido con amidas en los hidroxilos fenólicos.

3. Sustratos: Compuestos de interés biológico, farmacéutico y ambiental

Existen diversos y numerosos compuestos orgánicos de interés biológico por su función y relación con enfermedades o efectos beneficiosos en el organismo del ser humano y otros, por ser importantes contaminantes ambientales que pueden afectar la salud del ser humano. En ambos casos es importante poder identificarlos, cuantificarlos y conocer sus efectos. Determinados núcleos aromáticos como los bencénicos, los fenólicos, los indólicos o los benzoimidazólicos son constituyentes de los compuestos orgánicos mencionados [25].

En este trabajo de tesis se han empleado como sustratos ácido cafeico, paraquat, 6-hidroximelatonina y benomilo. Las características de estos compuestos y de las familias de las que provienen serán descritos a continuación.

3.1 Indoles

Uno de los compuestos de interés biológico y farmacéutico utilizado en esta tesis es la 6-hidroximelatonina (6M), por ello en este apartado se describen algunas características de los compuestos indólicos.

Algunas aminas biogénicas que llevan a cabo la función de transmisores neuronales u hormonales en un amplio número de procesos fisiológicos son las indolaminas. Estas son sintetizadas naturalmente en el organismo, mediante el metabolismo de la tirosina y del triptófano. La estructura química de la serotonina se muestra en la Figura 16. Su producción en cantidades anormales puede estar relacionado con tumores neuroendocrino en donde los síntomas y signos clínicos reflejan las importantes propiedades farmacológicas de las aminas excretadas [26].

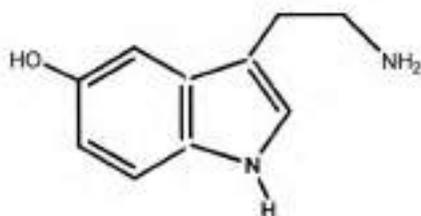


Figura 16. Estructura de la serotonina (5-hidroxi-3-(2-aminoetil)-indol).

Es por esta razón que se requiere de las determinaciones clínicas de estas aminas biogénicas o de sus metabolitos haciéndose de vital importancia en la detección y control de tumores [27]. Actualmente existen métodos específicos de laboratorio para su cuantificación pero debido a la gran variación en el organismo entre individuos es necesario desarrollar nuevas metodologías con mejores parámetros analíticos que permitan contemplar esas diferencias.

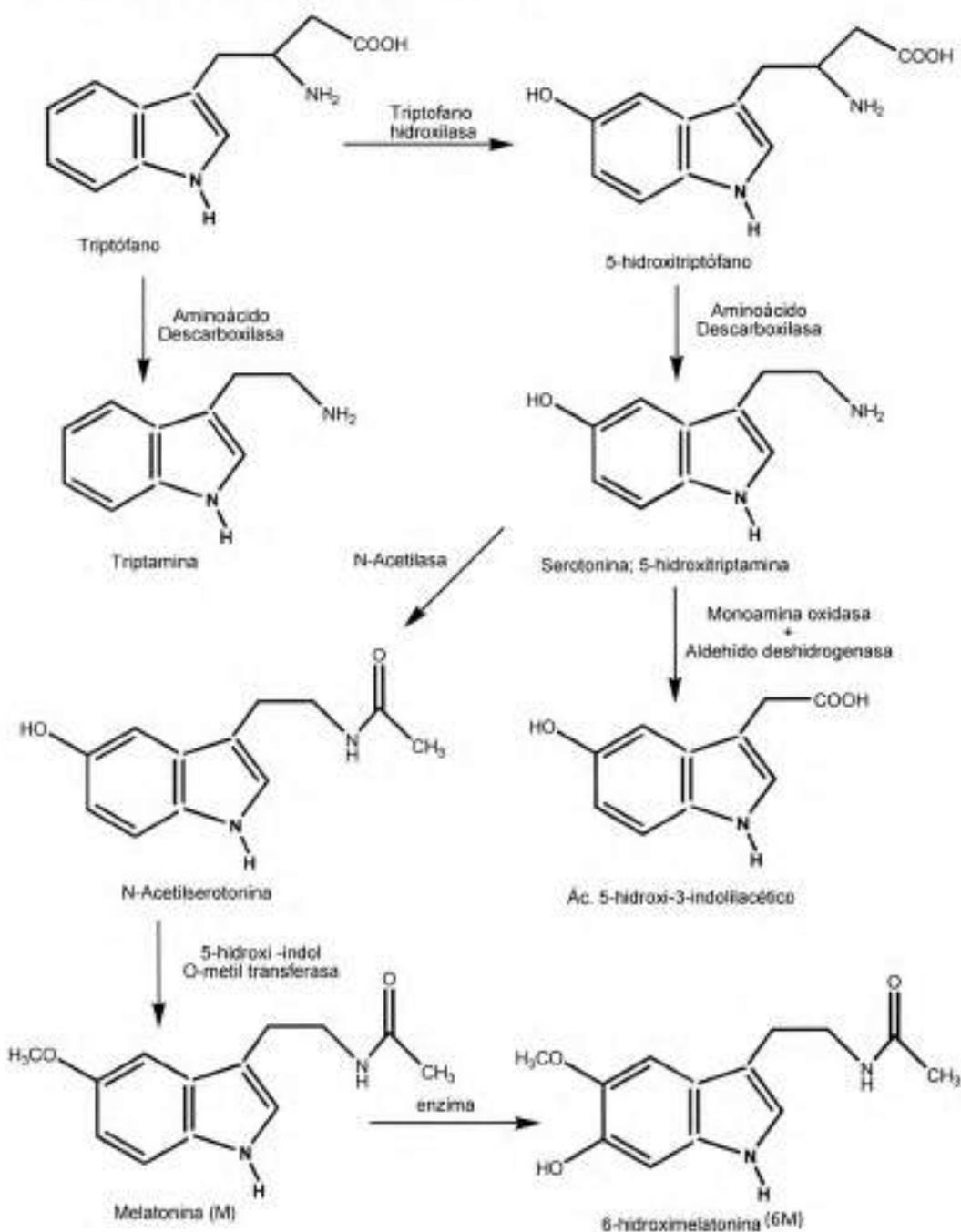
La serotonina es producida tanto en el reino animal como en el vegetal y tiene como principal metabolito a la melatonina (M), la principal indolamina producida por la glándula pineal. La melatonina es una hormona natural del cerebro cuya principal función en el organismo del ser humano es regular los ritmos circadianos, sueño – vigilia [26].

En el Esquema 1 se puede observar como en la ruta metabólica, a partir de la serotonina se sintetiza la melatonina, la cual es una hormona que participa en una gran variedad de procesos celulares de vital importancia. Usualmente las cantidades excesivas excretadas de serotonina y sus metabolitos en fluidos corporales y en tejidos, son utilizados como diagnóstico de tumores carcinoides [27].

La glándula pineal es un órgano que se encuentra localizada próxima al tercer ventrículo cerebral en el hombre. Las células de la glándula pineal pueden sintetizar melatonina mediante dos mecanismos. En el primer caso, están estimuladas directamente por la luz y poseen mecanismos adecuados para traducir una señal luminosa en una señal hormonal. En el segundo caso, la información lumínica es recibida por la retina y transferida por vía nerviosa

hacia las células productoras, las cuales se encargan de la secreción directa de melatonina al sistema circulatorio. Debido a esto la biosíntesis pineal de la melatonina es variable a lo largo del ciclo de 24 horas, y su funcionamiento responde a estímulos lumínicos. Una de las principales funciones de esta hormona en el ser humano es la de la inducción del sueño [28].

Esquema 1. Metabolismo del triptófano.



Diversas alteraciones y enfermedades han sido relacionadas con esta hormona. Se ha observado que una disminución de las variaciones circadianas de M y su metabolito principal 6M, está relacionada con la neuropatía autónoma. La metabolización de M ocurre fundamentalmente en el hígado y lo hace por hidroxilación formando 6M. Esta especie es conjugada con sulfato o glucuronato y es excretada por orina [28].

Se ha determinado que la disminución en la excreción nocturna en orina de 6M está correlacionada con niveles de concentración de M en plasma por debajo de los niveles normales. Estos resultados son interpretados considerando que la cantidad excretada de 6M es una medida de la secreción de M bajo condiciones de una disminución de la función de serotonina. Es de vital importancia su valoración por la relación de estos compuestos con desórdenes psiquiátricos [29].

Por otra parte a la 6M se le han atribuido diversas propiedades, como su capacidad de proteger del estrés oxidativo inducido por cianuro en homogenatos de cerebro de rata, y también las propiedades reductoras del Fe^{+3} a Fe^{+2} , el cual es una especie más biocompatible y de esta manera protegería de la hepatotoxicidad producida por la acumulación de Fe^{+3} [30].

Como se ha mencionado anteriormente, es conocido el efecto de M y de 6M como atrapadores de radicales libres y anticancerígenos; pero por otra parte también existen estudios referidos a la incidencia en la aparición de tumores malignos por administración nocturna de M sin interrupción durante un largo período. Mientras que con 6M se ha demostrado que puede causar lesiones oxidativas en determinadas secuencias del ADN, pudiendo traducirse en una mutación o cáncer [31].

La determinación de M y de 6M en diversas matrices biológicas es un gran desafío debido a la baja concentración de los mismos. Para M la metodología más aceptada y usual para su determinación es mediante radioinmunoanálisis (RIA), que es específico y con el cual se han logrado

obtener bajos límites de detección en suero humano y en glándula pineal de ratas [32].

En trabajos previos en nuestro laboratorio se ha desarrollado un método fluorimétrico intensificado con hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) para la determinación de M [33]. Se observó un incremento de la señal fluorescente de M del 200 % en presencia de HP β CD, debido al cambio en las propiedades luminiscentes del sustrato por la formación de un complejo de inclusión. Se alcanzó un límite de detección de 0,37 ng/mL.

Otros autores, han descrito la determinación de melatonina y sus derivados usando reacciones quimioluminiscentes. Por ejemplo una reacción entre M y H₂O₂ en acetonitrilo y un sistema de inyección en flujo con permanganato de potasio y formaldehído alcanzando un límite de detección de 4,61 ng/mL [34].

Estos métodos fluorescentes y quimioluminiscentes en general son rápidos, sencillos, con amplios intervalos lineales y con bajos límites de detección. Muchos métodos cromatográficos, como cromatografía gaseosa (CG) acoplada a espectrometría de masas y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) han sido utilizados para determinar indolaminas. Las técnicas de HPLC con diferentes técnicas de detección son más utilizadas respecto a CG [35].

En estudios previos se concluyó que mediante HPLC con fase reversa con detección fluorescente es posible cuantificar M en plasma, y con fase reversa con interacción iónica se puede cuantificar a M, 6M y otros compuestos relacionados en glándula pineal de rata [36]. Esta técnica en conjunto con una derivatización fluorescente precolumna de M o postcolumn para M y 6HM han sido desarrolladas para sus determinaciones en diversas matrices.

3.2. Ácidos hidroxicinámicos

Otro de los sustratos empleados en esta tesis es el ácido cafeico (AC), ácido (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoico o ácido 3,4-dihydroxicinámico, que pertenece a la familia de los ácidos hidroxicinámicos, grupo de compuestos presentes en la pared celular vegetal, cuyos principales representantes son los ácidos ferúlico, *p*-cumárico, cafeico y sinapínico, de los cuales el ferúlico y *p*-cumárico son los de mayor abundancia en la naturaleza. Los ácidos hidroxicinámicos están formados por un grupo hidroxifenilacrílico con un ácido carboxílico terminal (Figura 17).

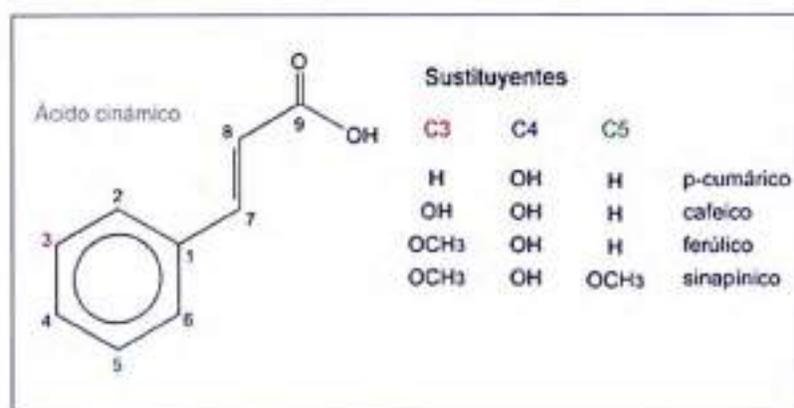


Figura 17. Ácidos hidroxicinámicos de mayor recurrencia en la naturaleza.

Por lo general este tipo de compuestos se encuentran esterificados en la pared celular vegetal, por lo tanto, poseen una baja solubilidad. Otra forma en la que se encuentran presentes es como ácido clorogénico (éster glucosídico del ácido cafeico). Son solubles y se presentan en altas concentraciones en bebidas como el café y el jugo de manzana y son benéficas para el organismo.

Existe un grupo de enzimas secretadas por bacterias y hongos capaces de hidrolizar el enlace éster de los polisacáridos o del ácido clorogénico. Este grupo de enzimas se denomina cinamoil esterases, cuyos principales representantes son la feruloil esterasa y la ácido clorogénico hidrolasa [37].

En general los ácidos hidroxicinámicos son agentes antioxidantes y por ello se ha descrito su rol en la prevención del cáncer de estomago [38]. Por otro lado, se han llevado a cabo intentos de introducir por ingeniería genética genes que codifiquen cinamoil esterases en cepas de bacterias (para su utilización como probiótico), a fin de aumentar la cantidad de antioxidantes en el plasma por la acción de estas bacterias.

El AC (Figura 18) es un compuesto orgánico que es clasificado como un ácido hidroxicinámico. Este sólido amarillo contiene grupos funcionales fenólico y acrílico. Algunas propiedades químicas a tener en cuenta son su acidez (pKa 4,62 a 25 °C) y su solubilidad en agua (54,1 g/L en agua a 25 °C).

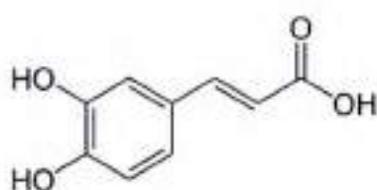


Figura 18. Estructura del AC.

El AC se encuentra en todas las plantas debido a que es un intermediario clave en la biosíntesis de la lignina, una de las principales fuentes de biomasa. Puede encontrarse en la corteza de *Eucalyptus globulus* [39] también en el helecho de agua dulce *Salvinia molesta* [40] o en el hongo *Phellinus linteus* [41].

El AC es uno de los principales fenoles naturales en el aceite de Argán [42], el cual no está relacionado con la cafeína y es biosintetizado mediante la hidroxilación del cumaroil éster del éster quínico. Esta hidroxilación produce el éster cafeico del ácido shikímico, el cual se convierte a ácido clorogénico. Es el precursor del ácido ferúlico, alcohol coniferílico, y alcohol sinapílico, todos ellos pilares significativos en la lignina [43]. La transformación a ácido ferúlico es catalizada por la enzima ácido cafeico-*o*-metiltransferasa.

En las plantas, el ácido cafeico (Figura 19 centro) es formado a partir del ácido 4-hidroxicinámico (Figura 19 izquierda) y es transformado a ácido ferúlico (Figura 19 derecha). La cafeato *o*-metiltransferasa es la enzima responsable de la transformación del ácido cafeico en ácido ferúlico.

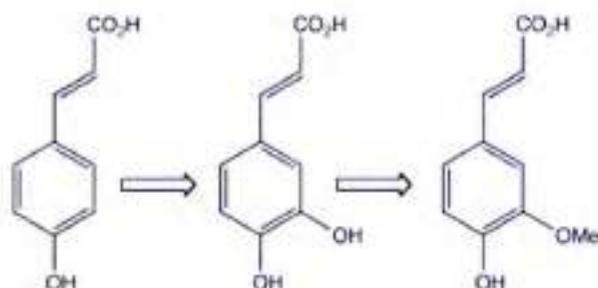


Figura 19. Metabolismo del ácido cafeico en las plantas.

El AC tiene una variedad de efectos farmacológicos potenciales en estudios *in vitro* y en modelos animales, pero no han sido demostrados efectos clínicos en humanos. Es un antioxidante *in vitro* y también *in vivo*. También muestra actividad inmunomodulatoria y antiinflamatoria [44].

El AC superó a los otros antioxidantes, reduciendo la producción de aflatoxinas en más del 95 por ciento. Estos estudios son los primeros en mostrar que el estrés oxidativo que de otra manera habría provocado o mejorado la producción de aflatoxinas del *Aspergillus flavus*, puede ser obstaculizado por el AC. Esto abre la puerta para utilizar métodos fungicidas naturales mediante el suplemento de árboles con antioxidantes.

Estudios de la carcinogenicidad del ácido cafeico tienen resultados mixtos. Algunos han mostrado que inhibe la carcinogénesis, y otros experimentos muestran efectos carcinogénicos [45]. La administración oral de altas dosis de ácido cafeico en ratas ha causado papilomas estomacales [45]. En el mismo estudio, altas dosis de antioxidantes combinados, incluyendo al ácido cafeico, mostraron una disminución significativa en el crecimiento de tumores

de colon en esas mismas ratas. Ningún efecto significativo fue notado aparte de eso. El AC está reportado en algunas Hojas de Datos de Riesgo como carcinógeno potencial, tal como ha sido mencionado por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) carcinógeno del Grupo 2B, "posiblemente carcinógeno para los humanos". Datos más recientes muestran que las bacterias en los intestinos de ratas pueden alterar la formación de metabolitos del ácido cafeico [46] [47]. No ha habido efectos nocivos conocidos del ácido cafeico en humanos. El AC puede ser el ingrediente activo en el cafenol, un revelador fotográfico para blanco y negro artesanal hecho a partir de café instantáneo. La química del revelado es similar a la del catecol o el pirogallol.

Por otro lado se ha estudiado el efecto que tiene el AC, fuerte antioxidante, sobre el estrés oxidativo y algunos tipos de cáncer generados en ratas por paraquat (metilviológico, PQ) [47] [[48].

3.3. Benzoimidazoles y biperidinas

En esta tesis también se emplearon como sustratos de interés ambiental el benomilo (o benomyl, BY) y el PQ que pertenecen a la familia de los benzoimidazoles y a las biperidinas, respectivamente. A continuación se describen algunas características relevantes de estos compuestos.

3.3.1. Benzoimidazoles

Los benzimidazoles (Figura 20) son hidrocarburos aromáticos y heterocíclicos, caracterizados por la fusión de benceno e imidazol. Se ha empleado como esqueletos de carbono para los N-carbenos heterocíclicos, utilizados generalmente como ligandos para complejos con los metales de transición. La mayoría de los benzoimidazoles son ampliamente empleados como drogas veterinarias para la prevención y tratamiento de infecciones parasitarias.

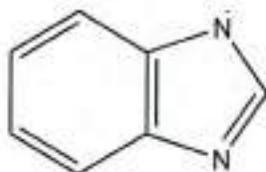


Figura 20. Estructura del benzoimidazol.

El BY (Figura 21) es un plaguicida que posee actividad acaricida (grupo de los carbamatos); fungicida sistémico (grupo de los benzimidazoles; grupo de los benzimidazolilcarbamatos) y nematocida (grupo de los carbamatos). Puede interferir en el metabolismo de las hormonas y su uso ha sido restringido en Suecia por razones de salud y ambientales [49].

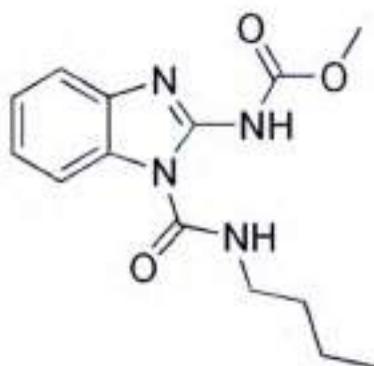


Figura 21. Estructura del benomilo.

Presenta en su estructura un sistema de benzoimidazol. Otros ejemplos de benzoimidazoles usados en la agronomía son el carbendazol y el tiabendazol usado durante el transporte y almacenamiento de frutas para su protección [50].

3.3.2 Bpiridinas

El 2,2'-bipiridina es un compuesto químico de fórmula $(C_5H_4N)_2$. Es uno de los posibles dímeros de piridina, comúnmente abreviado *bipi*. Es un ligante bidentado que forma complejos con muchos metales de transición. Los complejos de rutenio y platino con el *bipi* aglutinante son fuertemente luminiscentes, y tienen algunas aplicaciones prácticas. A temperatura ambiente aparece como un sólido incoloro, y posee ligero olor característico. Es un compuesto tóxico.

La 4,4'-Bipiridina (4,4'-*bipi*) es uno de los isómeros bipiridina utilizado principalmente como el precursor de catión N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinio $[(C_5H_4NCH_3)_2]^{2+}$, que es el PQ (Figura 22).

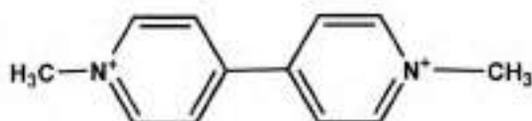


Figura 22. Estructura molecular del paraquat.

Las personas expuestas o contaminadas con PQ, con sospecha de ingestión o absorción, deben ser tratadas inmediatamente por un servicio médico de urgencias. Los primeros auxilios deben de guardar las siguientes indicaciones:

- Aislar al paciente de cualquier fuente de contacto con la sustancia.
- Descontaminar lavando con grandes volúmenes de agua y remover las ropas del paciente.
- Evitar contaminación secundaria por contacto.
- Estabilizar al paciente manteniéndolo bien ventilado.

- La administración de oxígeno sin dosificar no es aconsejable, por tanto, el cuidado prudente dicta que no debe administrarse a personas que no presentan síntomas de hipoxia. Solamente el personal médico especializado es el indicado para decidir en cada caso específico.
- Generalmente se indica la dosis de oxígeno necesaria para mantener la presión de oxígeno alrededor de 60 mmHg.
- Proporcionar el tratamiento conveniente como sea indicado.
- Considerar la evacuación a un hospital apropiado ya sea en helicóptero o en ambulancia.
- En caso de contaminación en los ojos, lavar la zona con una solución salina normal por lo menos durante 15 minutos.

A finales de la década de 1960 un programa gubernamental americano generó polémica al permitir el rociado de campos de cultivo de marihuana ubicados en Sudamérica con PQ. Dado que mucha de esta marihuana fue luego fumada por norteamericanos, el programa "Marihuana Paraquat" [51] generó un intenso debate. Posiblemente en una tentativa de disuadir a quienes usaban dicha sustancia, los representantes del programa advirtieron que era inseguro fumarla debido a su origen. No obstante grupos de investigadores independientes estudiaron el uso del herbicida determinando que "no se ha demostrado daño pulmonar ni de otro tipo en usuarios de marihuana contaminada con PQ". Por otra parte, en los lugares en donde se fumigó con PQ, por ejemplo en unos pueblos en Colombia, durante mucho tiempo nacieron niños con deformidades por causa de este herbicida [52].

Por otro lado, al aplicarse PQ en los campos cae al suelo y es rápida y fuertemente absorbido por las partículas de arcilla de la tierra impidiendo que sea asimilado por las plantas, las lombrices y los microorganismos, en tanto que el que se encuentra en agua está física y químicamente accesible para los

microorganismos del lodo y plantas acuáticas. La vida media del PQ en agua puede ir desde 13 horas a 23 semanas [53].

Los rayos ultravioletas y la luz solar en general descomponen el PQ a productos menos tóxicos, aunque si se encuentra adsorbido en las arcillas del suelo estas moléculas se hacen más resistentes a la fotodescomposición. Estudios recientes sobre un suelo arenoso fumigado en la superficie con PQ, indicaron que no se observa degradación de dicho compuesto, incluso luego de dos años de exposición a la luz natural [53].

4. Bibliografía

- [1] D. Parker, *“Macrocyclic Synthesis: A practical approach,”* Ilustrada. Oxford University Press, 1996, p. 252.
- [2] N. Morohashi, F. Narumi, N. Iki, T. Hattori, and S. Miyano, *“Thiacalixarenes,”* *Chem. Rev.*, vol. 106, no. 12, pp. 5291–316, 2006.
- [3] L. Y. Zakharova, V. V. Syakaev, M. a. Voronin, F. V. Valeeva, A. R. Ibragimova, Y. R. Ablakova, E. K. Kazakova, S. K. Latypov, and A. I. Konovalov, *“NMR and Spectrophotometry Study of the Supramolecular Catalytic System Based on Polyethyleneimine and Amphiphilic Sulfonatomethylated Calix[4]Resorcinarene,”* *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 15, pp. 6182–6190, 2009.
- [4] N. Morohashi and S. Miyano, *“Contribution Thiacalixarenes: the development of new host molecules utilizing the characteristics of sulfur,”* *TCIMAIL*, no. 122, 2004.
- [5] C. D. Gutsche, *“Synthesis of Calixarenes and Thiacalixarenes,”* in *Calixarenes 2001 SE - 1*, Z. Asfari, V. Böhmer, J. Harrowfield, J. Vicens, and M. Saadioui, Eds. Springer Netherlands, 2001, pp. 1–25.
- [6] J. W. Steed and J. L. Atwood, *“Supramolecular Chemistry,”* 2nd ed. John Wiley & Sons, 2009.
- [7] J. Lehn, *“Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices(Nobel Lecture),”* *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 27, pp. 89–112, 1988.
- [8] F. Hof and J. Rebek, *“Molecules within molecules: recognition through self-assembly,”* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, pp. 4775–4777, 2002.
- [9] K. J. Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, *“Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry,”* Primera Ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- [10] B. B. A. Goshe, I. Steele, C. Ceccarelli, A. Rheingold, *“Supramolecular recognition: On the kinetic lability of thermodynamically stable host-guest association complexes,”* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 99, p. 4823, 2002.

- [11] J. Champion, C. Alliot, S. Huclier, D. Deniaud, Z. Asfari, and G. Montavon, "Determination of stability constants between complexing agents and At(I) and At(III) species present at ultra-trace concentrations," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 362, no. 8, pp. 2654–2661, 2009.
- [12] C. D. Gutsche, B. Dhawan, K. H. No, and R. Muthukrishnan, "Calixarenes. 4. The synthesis, characterization, and properties of the calixarenes from p-tert-butylphenol," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 103, pp. 3782–3792, 1981.
- [13] C. D. Gutsche, "Calixarenes: An Introduction," Segunda Ed. Cambridge: Publishing, RCS, 2008.
- [14] C. Gaeta, F. Troisi, and P. Neri, "endo-Cavity complexation and through-the-annulus threading of large calixarenes induced by very loose alkylammonium ion pairs," *Org. Lett.*, vol. 12, pp. 2092–2095, 2010.
- [15] "Plus dur que le diamant," *Arch. Quinzième jour du mois, l'Université Liège*, vol. 106, 2001.
- [16] D. R. Stewart, M. Krawiec, R. P. Kashyap, W. H. Watson, and C. D. Gutsche, "Conformational Characteristics of Ethers and Esters of p-tert-Butylcalix[5]arene," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 2, pp. 586–601, 1995.
- [17] R. U. A. Arduini, A. Pochini, S. Reverberi, "p-t-Butyl-calix[4]arene tetracarboxylic acid. A water soluble calixarene in a cone structure," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, p. 981, 1984.
- [18] O. M. S. Shinkai, K. Araki, T. Tsubaki, T. Arimura, "New syntheses of calixarene -p-sulphonates and p-nitrocalixarenes," *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, p. 2297, 1987.
- [19] R. P. J. Scharff, M. Mahjoubi, "Synthesis and acid-base properties of calix[4], calix[6] and calix[8]arene p-sulfonic acids," *New. J. Chem.*, vol. 15, p. 883, 1991.
- [20] S. M. H. Matsumiya, Y. Terazono, N. Iki, "Acid – base properties of sulfur - bridged calix[4]arenes," *J. Chem. Soc.*, vol. 2, p. 1166, 2002.
- [21] F. Miao, J. Zhan, Z. Zou, D. Tian, and H. Li, "A new Hg²⁺ fluorescent sensors based on 1,3-alternate thiacalix[4]arene (L) and the complex of [L+Hg²⁺] as turn-on sensor for cysteine," *Tetrahedron*, vol. 68, no. 10, pp. 2409–2413, 2012.

- [22] B. Valeur and I. Leray, "Ion-responsive supramolecular fluorescent systems based on multichromophoric calixarenes: A review," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 360, no. 3, pp. 765–774, 2007.
- [23] M. Yamada, Y. Shimakawa, and F. Hamada, "Thiacalix[4]arene–alkali metal assemblies: crystal structures and guest-binding capabilities of supramolecular architectures supported by metal coordination and cation– π interactions," *Tetrahedron*, vol. 67, no. 38, pp. 7392–7399, 2011.
- [24] S. Bouhroum, F. Arnaud-Neu, Z. Asfari, and J. Vicens, "Tetra(diethyl)amide- p-tert- butyl-thiacalix[4]arene in Cone Conformation: Synthesis and Binding Properties with Alkali, Alkaline Earth, Heavy and Transition Metal Ions," *Supramol. Chem.*, vol. 17, no. 8, pp. 629–635, 2005.
- [25] E. R. Burtis, C. A.; Ashwood, "Tietz Textbook of Clinical Chemistry," 3th ed. Philadelphia: Company, W. B. Saunders, 1999.
- [26] L. A. Felig, P.; Baxter, J. D.; Frohman, *Endocrinology and metabolism*, Tercera ed. Mc Graw-Hill, INC., 1995.
- [27] L. A. Kaplan, A. J. Pesce, and S. C. Kazmierczak, "Examination of urine," *Clin. Chem. Theory, Anal. Correl. 4th Ed., Kaplan, LA, Pesce, AJ, Kazmierczak, SC, (Mosby Inc. eds St Louis USA)*, vol. 1092, 2003.
- [28] R. H. Unger, D. W. Foster, J. D. Wilson, H. M. Kronenberg, and P. R. Larsen, *Williams textbook of endocrinology*. Saunders Philadelphia, 1998.
- [29] R. C. Zimmermann, C. J. McDougale, M. Schumacher, J. Olcese, G. R. Heninger, and L. H. Price, "Urinary 6-hydroxymelatonin sulfate as a measure of melatonin secretion during acute tryptophan depletion," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 18, no. 8, pp. 567–578, 1993.
- [30] D. S. Maharaj, J. L. Limson, and S. Daya, "6-Hydroxymelatonin converts Fe (III) to Fe (II) and reduces iron-induced lipid peroxidation," *Life Sci.*, vol. 72, no. 12, pp. 1367–1375, 2003.
- [31] K. Sakano, S. Oikawa, Y. Hiraku, and S. Kawanishi, "Oxidative DNA damage induced by a melatonin metabolite, 6-hydroxymelatonin, via a unique non- α -quinone type of redox cycle," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 68, no. 9, pp. 1869–1878, 2004.
- [32] G. Simonin, L. Bru, E. Lelievre, J.-P. Jeanniot, N. Bromet, B. Walther, and C. Boursier-Neyret, "Determination of melatonin in biological fluids in the presence of the melatonin agonist S 20098: comparison of immunological

techniques and GC-MS methods," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 21, no. 3, pp. 591–601, 1999.

- [33] N. L. Pacioni, A. G. Bracamonte, and A. V. Veglia, "Comparative effect of cyclodextrin nanocavities versus organic solvents on the fluorescence of carbamate and indole compounds," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 198, no. 2–3, pp. 179–185, 2008.
- [34] J. Lu, C. Lau, M. K. Lee, and M. Kai, "Simple and convenient chemiluminescence method for the determination of melatonin," *Anal. Chim. Acta*, vol. 455, pp. 193–198, 2002.
- [35] T. Harumi and S. Matsushima, "Separation and assay methods for melatonin and its precursors," *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 747, no. 1–2, pp. 95–110, 2000.
- [36] K. Eriksson, A. Ostin, and J.-O. Levin, "Quantification of melatonin in human saliva by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using stable isotope dilution," *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 794, pp. 115–123, 2003.
- [37] I. Benoit, M. Asther, Y. Bourne, D. Navarro, S. Canaan, L. Lesage-Meessen, M. Herweijer, P. M. Coutinho, M. Asther, and E. Record, "Gene overexpression and biochemical characterization of the biotechnologically relevant chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 17, pp. 5624–32, 2007.
- [38] S. Fulda, "Betulinic Acid for cancer treatment and prevention," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 9, pp. 1096–1107, 2008.
- [39] S. A. O. Santos, C. S. R. Freire, M. R. M. Domingues, A. J. D. Silvestre, and C. P. Neto, "Characterization of Phenolic Components in Polar Extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. Bark by High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 17, pp. 9386–9393, 2011.
- [40] M. I. Choudhary, N. Naheed, A. Abbaskhan, S. G. Musharraf, H. Siddiqui, and Atta-Ur-Rahman, "Phenolic and other constituents of fresh water fern *Salvinia molesta*," *Phytochemistry*, vol. 69, no. 4, pp. 1018–23, 2008.
- [41] Y. S. Lee, Y.-H. Kang, J.-Y. Jung, S. Lee, K. Ohuchi, K. H. Shin, I.-J. Kang, J. H. Y. Park, H.-K. Shin, and S. S. Lim, "Protein glycation inhibitors from the fruiting body of *Phellinus linteus*," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 31, no. 10, pp. 1968–72, 2008.

- [42] Z. Charrouf and D. Guillaume, "Phenols and Polyphenols from *Argania spinosa*," *Am. J. Food Technol.*, vol. 2, no. 7, pp. 679–683, 2007.
- [43] W. Boerjan, J. Ralph, and M. Baucher, "Lignin biosynthesis.," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 54, pp. 519–46, 2003.
- [44] M. R. Olthof, P. C. H. Hollman, and M. B. Katan, "Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans," *J. Nutr.*, vol. 131, no. 1, pp. 66–71, 2001.
- [45] M. Hirose, Y. Takesada, H. Tanaka, S. Tamano, T. Kato, and T. Shirai, "Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model.," *Carcinogenesis*, vol. 19, no. 1, pp. 207–12, 1998.
- [46] M. A. Peppercorn and P. Goldman, "Caffeic Acid Metabolism by Gnotobiotic Rats and Their Intestinal Bacteria," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 69, no. 6, pp. 1413–1415, 1972.
- [47] M.-P. Gonthier, M.-A. Verny, C. Besson, C. Rémésy, and A. Scalbert, "Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats.," *J. Nutr.*, vol. 133, pp. 1853–1859, 2003.
- [48] S. Lafay and C. Morand, "Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats," *Br. J. Nutr.*, pp. 39–46, 2006.
- [49] P. de la C. Europea, "Posición de la Comunidad Europea para la trigésimotercera reunión del Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas," La Haya, 2001.
- [50] M. Danaher, H. De Ruyck, S. R. H. Crooks, G. Dowling, and M. O'Keeffe, "Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices," *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 845, pp. 1–37, 2007.
- [51] <http://www.epa.gov/pesticides/safety/healthcare/handbook/Chap12.pdf>.
- [52] <http://www.infoplease.com/encyclopedia/science/marijuana-history-marijuana-use.html>.
- [53] U. Merari and G. Cardona, "Degradación fotocatalítica de metil paratión y paraquat Photocatalytic degradation of methyl parathion and paraquat

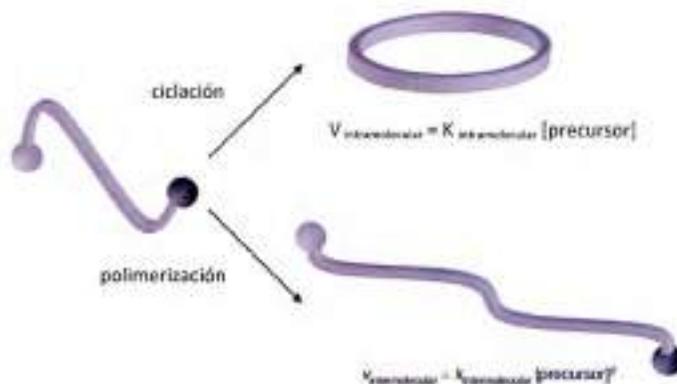
**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
MACROCICLOS: TIACALIXARENOS,
CALIXARENOS Y DERIVADOS**

1. Introducción

En estos años, ha crecido el interés en la síntesis y el estudio de las propiedades físicas y químicas de compuestos macrocíclicos conteniendo cavidades. Éstos participan en lo que se conoce como química "sustrato-receptor" dentro de los sistemas organizados o supramoleculares, por su capacidad de formar complejos de inclusión con átomos, iones e incluso pequeñas moléculas. La presencia de moléculas con cavidades o poros de tamaño definido le confieren selectividad a estos sistemas además de modificar la sensibilidad de las técnicas espectroscópicas con que se estudian los procesos de acomplejamiento [1].

Los receptores macrocíclicos presentan mayor rigidez respecto de sus análogos acíclicos. Esta diferencia es la que contribuye a la formación de complejos termodinámicamente más estables debido a su mayor preorganización y por lo tanto a que los cambios conformacionales que presentan durante el acomplejamiento sean menores. Si bien la formación de complejos con receptores macrocíclicos tiene un consumo energético menor que el proceso con los análogos acíclicos, la síntesis y posterior obtención de un sistema macrocíclico tiene un costo energético mayor.

Se han desarrollado o mejorado diversas estrategias de síntesis con el objeto de favorecer la ciclación respecto a la principal reacción con la que compite, la polimerización. La síntesis en alta dilución es un claro ejemplo, en la misma se mezclan simultáneamente pequeñas cantidades de los reactivos a una velocidad controlada y agitación continua en un gran volumen de solvente [2]. Es esta condición de baja concentración de reactantes la que favorece la reacción intramolecular de cierre de anillo o ciclación frente a la polimerización (Esquema 1).



$$\frac{V_{\text{intramolecular}}}{V_{\text{intermolecular}}} = \frac{K_{\text{intramolecular}} [\text{precursor}]}{K_{\text{intermolecular}} [\text{precursor}]^2} = \frac{K_{\text{intramolecular}}}{K_{\text{intermolecular}} [\text{precursor}]}$$

Esquema 1. Representación de las reacciones que compiten: macrociclación intramoleculares y polimerización.

Una de las estrategias ampliamente usada en la síntesis de macrociclos se basa en el uso de un agente plantilla o molde cuya función es la de organización de los átomos en un ensamblaje específico favoreciendo la unión entre los mismos con una relación espacial, topología y/o geometría que se mantiene en la estructura de la macromolécula final formada. Este efecto se denomina *template* o molde [2], y se lo puede clasificar como: termodinámico y cinético. En el termodinámico el compuesto *template* interacciona con la mezcla en equilibrio de los productos que se formaron en una reacción, sin intervención del *template*, y desplaza el equilibrio hacia la formación del producto con el que tiene mayor complementariedad [3] [4]. En el efecto *template* cinético la formación del producto es irreversible y la reacción es controlada cinéticamente, el rol del *template* es aumentar la velocidad de formación del producto cíclico por estabilización del intermediario que lleva a su formación. Como ejemplo, en la Figura 1 se muestra como se ‘acomoda’ la cadena molecular en torno al catión metálico que en este caso actúa como *template* durante la síntesis [2].

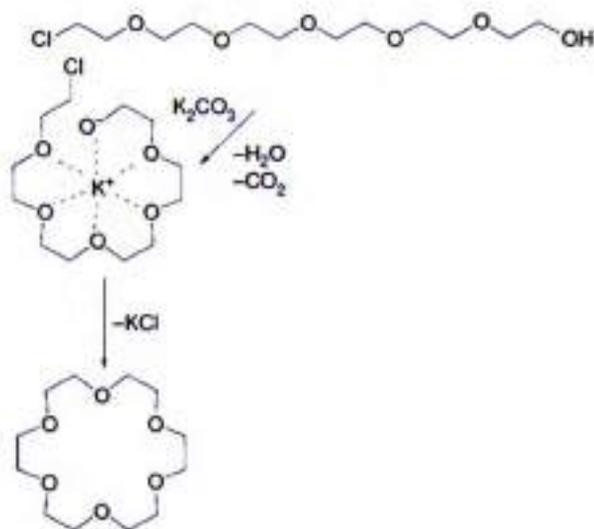
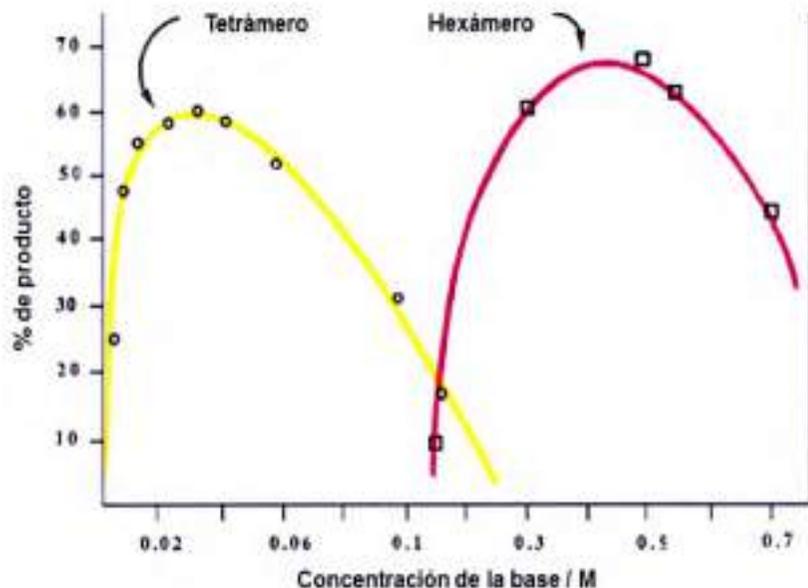


Figura 1. Efecto template cinético para la síntesis del [18]-corona-6.

El template en la síntesis de calixarenos catalizada por base es el catión metálico (metal alcalino o alcalino térreo). Por otro, lado se descubrió que controlando la proporción de la base respecto a la del monómero también se puede controlar el producto de la reacción (Esquema 2) [5].



Esquema 2. Efecto de la concentración de la base en la formación de *p*-*tert*-butilcalix[4]areno.

La rama de la química en la que estos macrociclos han sido empleados fundamentalmente es la química de los enlaces no-covalentes o química supramolecular [2]. En estos sistemas se establecen interacciones por cambios de polaridad, enlaces puente de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y electrostáticas, como ión-ión o ión dipolo. Son esas interacciones los principales factores determinantes de los cambios físicos y químicos que presentan los sustratos con los que interactúan. La Figura 2 muestra como el tratamiento del *p*-*tert*-butilcalix[8]areno puenteado en las posiciones 1, 5 con carbonatos de metales alcalinos produce sales en las cuáles el catión incluido actúa como template conformacional. Éste induce el plegamiento del esqueleto del calixareno en una conformación en la cual las triadas de hidroxilos contiguos del anillo adoptan la conformación de cono donde todos ellos convergen hacia el mismo centro, el catión metálico, estabilizándose mediante interacciones catión-dipolo [6].

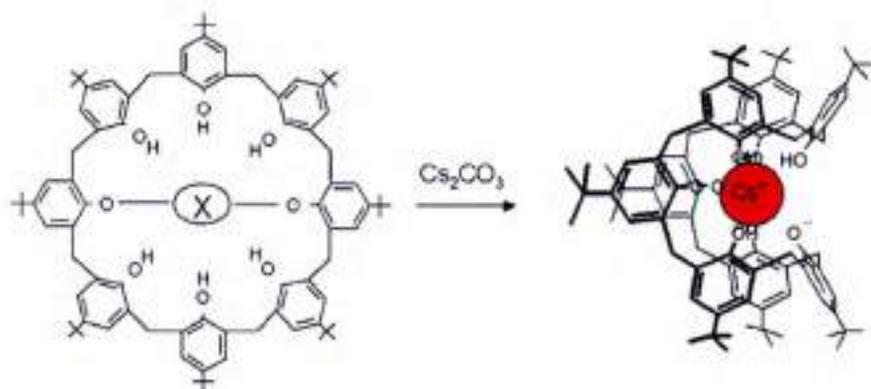


Figura 2. Conformación que adopta el *p-tert*-butilcalix[8]areno puenteado en las posiciones 1,5 en presencia de Cs^+ .

Los CA son *meta*-ciclofanos, formados por n unidades de fenol *p*-sustituido las cuales están unidas por puentes metileno (uniones puentes alifáticos). Espacialmente, adoptan forma de canasta de basket. La síntesis de estos compuestos es simple y dada su versátil funcionalización, el número de compuestos macrocíclicos creció considerablemente desde 1970 hasta la fecha. Además, se han descubierto numerosos compuestos macrocíclicos de origen natural. No fue hasta 1980 que se publicó la reproducibilidad en el proceso y la asignación estructural inequívoca por el químico Gutsche quien les dio el nombre de *calixareno* (derivado del vocablo griego *calix*: copa, y *areno* para indicar la incorporación de unidades aromáticas) [4].

Los CA (Figura 2) son los macrociclos que se obtienen mediante la condensación, catalizada por bases y/o ácidos de fenoles *para*-sustituidos y formaldehído. En estas moléculas se distinguen dos regiones: un aro de abertura pequeña, donde se sitúan los oxígenos de los fenoles, y un aro de mayor dimensión ocupado por los sustituyentes en las posiciones *para* con respecto al hidroxilo del núcleo aromático. Por el arreglo en canasta de estos compuestos es que es posible funcionalizarlos en ambas caras de la estructura,

de forma regio y estereo controlada, para así organizar y orientar el espacio del sitio de inclusión de manera de incrementar la selectividad por el sustrato [7].

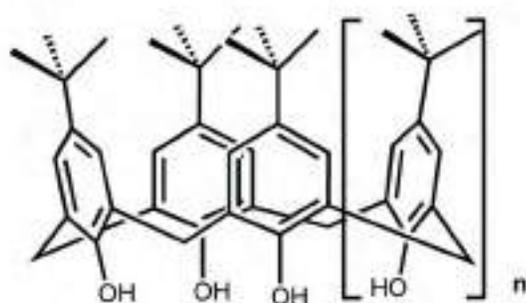


Figura 2. Estructura de *p*-*tert*-butilcalix[n]areno.

2. Objetivos

2.1. General

Adquirir destreza en las metodologías de síntesis, purificación y caracterización de calixarenos.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar *para-tert*-butilcalix[4]areno (TCA4).
- Sintetizar ácidos *para*-alquil-calix[4]areno sulfónicos.
- Llevar a cabo la sustitución de los ácidos *para*-alquil-calix[4]areno sulfónicos con alcanos de cadena de diferente longitud.

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos

- *tert*-butilfenol (Aldrich)
- Azufre molecular (Merck)
- NaOH (J. T. Baker)
- Tetraetilenglicol dimetil éter
- Difeniléter (Sintorgan)

- Tolueno (Cicarelli)
- H₂SO₄ (Cicarelli)
- N₂ (g)
- Formaldehído
- Acetonitrilo
- Bromuro de hexilo
- Bromuro de decilo
- Ioduro de propilo
- Ácido acético
- Acetato de etilo
- Hexano
- Cloroformo

Se verificó la pureza de todas las drogas y solventes mediante controles por UV-Visible, previamente todas las sustancias sólidas fueron controladas midiendo su punto de fusión.

3.2. Instrumentos

- Plancha de agitación
- EI-MS
- NMR 400 MHz
- IR
- ESI-MS-QQQ
- ESI micrOTOF-Q
- Espectrofotómetro UV-2101PC

3. 3. Metodología

3.3.1. Síntesis de *para-tert*-butiltiacalix[4]areno

Siguiendo la siguiente reacción (Figura 3) de un solo paso [8] se realizó

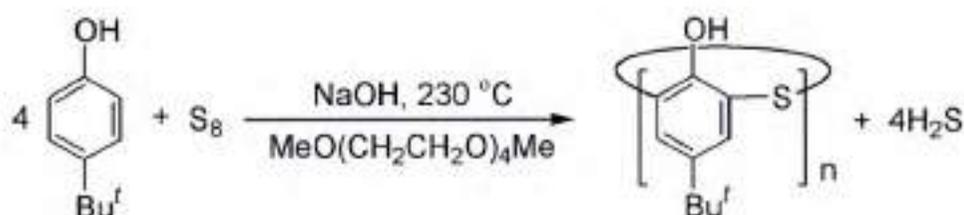


Figura 3. Síntesis en un paso de *p-tert*-butiltiacalix[4]areno.

la síntesis mediante catálisis básica a partir de 4-*tert*-butilfenol (masa = 50 g) y azufre molecular (masa = 13 g) en presencia de hidróxido de sodio (masa = 4 g) y tetraetilenglicol dimetil éter (tetraglime) 13 mL. La mezcla se calentó para favorecer la eliminación de agua manteniendo la temperatura a 230 °C durante 6 horas. Durante el calentamiento, la mezcla adquirió una apariencia homogénea, rojiza y viscosa y luego la consistencia viscosa incrementó de manera progresiva hasta que repentinamente se originó un sólido gomoso. Se dejó enfriar el sólido y posteriormente se le agregó una mezcla de solventes conteniendo: 25 mL de tolueno y 100 mL de dietiléter que disolvió el sólido y con el agregado posterior de 100 mL de ácido sulfúrico 4 M se formó una suspensión. El producto formado se recolectó filtrando al vacío para posteriormente purificarlo por recristalización en cloroformo y secando al vacío (100 °C durante 4 horas). (Rendimiento de la reacción: 54 %).

3.3.2. Síntesis del *para-tert*-butilcalix[4]areno, sulfonación y sustitución

Síntesis del *para-tert*-butilcalix[4]areno [5]

El macrociclo *p-tert*-butilcalix[4]areno se sintetizó mediante la condensación entre 4-*tert*-butilfenol y formaldehído catalizada por base (Figura 4). Esta síntesis se realizó considerando los efectos de diversos factores que afectan la distribución de los productos en la síntesis de los *p-tert*-butilcalix[n]arenos, como de la naturaleza del fenol, de la base y/o del solvente.

Se llevó a cabo la reacción de síntesis en un solo paso [3], a partir de 4-*tert*-butilfenol porque el grupo sustituyente alquílico impide que una unidad de formaldehído reaccione con el átomo de carbono de la posición *para* respecto al grupo hidroxilo y, en consecuencia, se generan productos poliméricos con hidróxido de sodio como catalizador y como template para la obtención del tetrámero y 1,1'-oxidibenceno (Ph_2O) como solvente de reacción. La mezcla se calentó para favorecer la eliminación de agua manteniendo la temperatura a 250 °C. La reacción compite con la formación del producto cinético *p-tert*-butilcalix[8]areno [4], la obtención de uno u otro compuesto macrocíclico depende del solvente usado, por ejemplo, empleando *o*-xileno (punto de ebullición: 144,5 °C [9]). En consecuencia, en la síntesis realizada se utilizó NaOH y Ph_2O , solvente de punto de ebullición alto (257,9 °C [9]), que permite obtener *p-tert*-butilcalix[4]areno, el producto termodinámico.

En relación a la concentración de la base, se mantuvo la relación del 2 % de hidróxido de sodio respecto a la concentración de 4-*tert*-butilfenol para favorecer la formación del tetrámero. (Rendimiento de la reacción 32%)

[5] Las actividades experimentales descritas en esta sección se realizaron bajo la orientación del Dr. Marcio Lazzarotto en los laboratorios del Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Esta misión de trabajo se desarrolló en el marco del Programa de Centros Asociados de Posgrado Brasil/Argentina (CAPES SPU, CAPG-BA 025/05, 26-27/09/05).

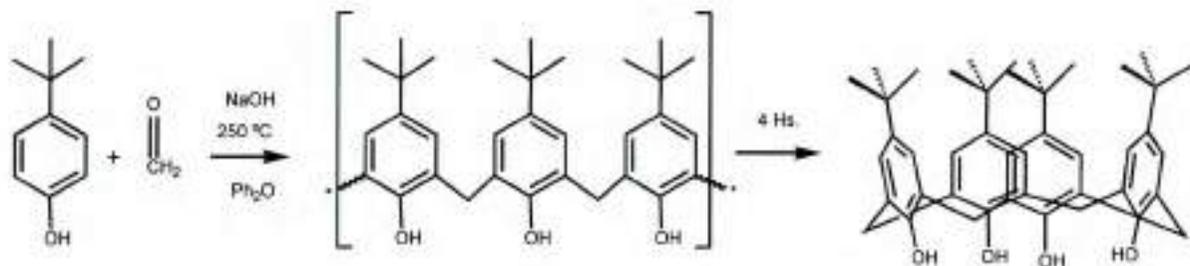


Figura 4. Síntesis en un paso del *p*-*tert*-buticalix[4]areno.

Reacción de sulfonación en un paso

Con el producto de la reacción anterior se procedió a sustituir los grupos *tert*-butilo con grupos sulfonato [10], esta funcionalización le confiere, a estos compuestos, mayor solubilidad en agua.

La síntesis se realizó como se detalla en la Figura 5, en un matraz equipado con un condensador de reflujo y un agitador magnético. Se colocaron $(5,00 \pm 0,02)$ g *p*-*tert*-butilcalix[4]areno y se añadieron cuidadosamente, en pequeñas alícuotas y bajo agitación, $(20,00 \pm 0,01)$ mL de ácido sulfúrico concentrado (95 a 97 %, Merck). La suspensión formada se calienta durante 4 horas a aproximadamente 80 °C. (Rendimiento 80 %)

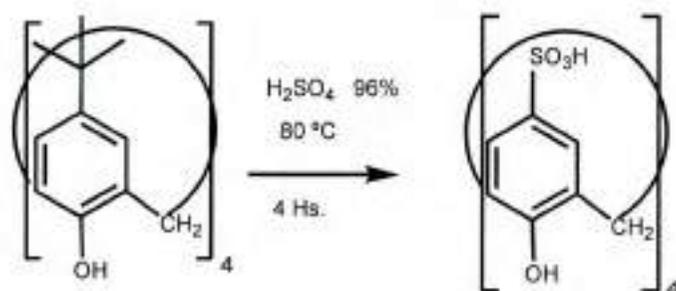


Figura 5. Reacción de sulfonación en un paso.

Reacciones de alquilación en un paso

Partiendo del producto de sulfonación se procedió a sustituir los hidroxilos con cadenas carbonadas de diferentes longitudes [3]. El procedimiento que se llevó a cabo para la alquilación (Figura 6 a, b y c) fue el mismo en los 3 casos que se presentan a continuación, en balón con sistema de reflujo se colocó la masa del ácido *p*-tert-calix[4]areno sulfonato (CA4S) ($2,00 \pm 0,02$) g con exceso del halogenuro de alquilo, NaOH 2 % respecto de la masa de CA4S y acetonitrilo como solvente. Se mantuvo el sistema con agitación a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

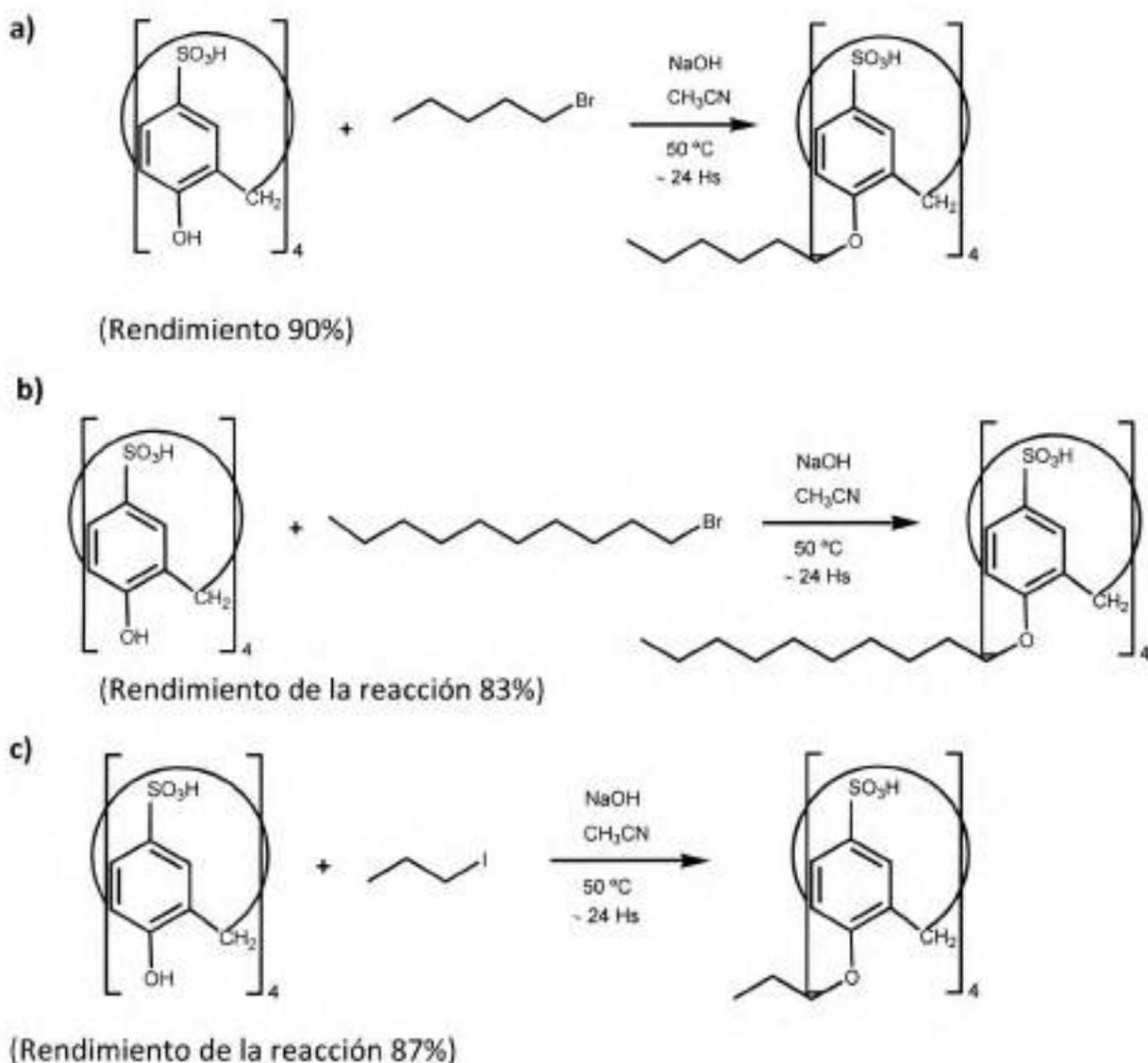


Figura 6. Reacción de alquilación en un paso con halogenuro de alquilo a) bromuro de hexilo, b) bromuro de decilo y c) ioduro de propilo.

A partir de mediciones espectroscópicas y cromatográficas que se detallan más abajo, se confirmó la formación de un sólo producto calixareno alquilsustituído con alto grado de pureza en cada uno de los casos.

4. Resultados y discusión

Posteriormente a todos los productos obtenidos por síntesis se le realizaron estudios de caracterización por las diferentes técnicas disponibles en cada caso.

4.1. Caracterización de *p*-tert-butiltiacalix[4]areno

La caracterización de los productos obtenidos en las distintas etapas de síntesis y purificación se realizó por espectrometría de masas con ionización electrónica (EI-MS) y con ionización por electronebulización de baja resolución (ESI-MS) y de alta resolución (ESI-MS-HR). Otras técnicas utilizadas con el fin de completar la caracterización fueron resonancia magnética nuclear de protones (RMN - ^1H), espectroscopias de absorción infrarroja (IR) y ultravioleta visible (UV-Visible) (Capítulo IV). En las siguientes secciones se detalla el análisis y la interpretación de las señales obtenidas mediante estas técnicas.

Identificación por punto de fusión

El punto de fusión determinado experimentalmente para TCA4 fue (323 – 329 °C) concordante con el valor de literatura (320 – 322 °C) [11]. El valor alto del punto de fusión es característico de estos macrociclos. Se obtuvo reproducibilidad para el producto de las dos síntesis de TCA4 realizadas.

Caracterización por cromatografía en placa delgada (TLC).

En la Tabla 1 se muestran los resultados de las TLC para el producto de las dos síntesis de TCA4 (P1 y P2), comparando los valores de las relaciones de frente (R.F) se puede observar que se logró reproducibilidad y buen grado de pureza.

Tabla 1. Relación de frentes para las síntesis del TCA4.

Cosolvente	R.F		R.F
	Producto TCA4		Testigo
	P1	P2	<i>p-tert-butilfenol</i>
CHCl₃:hexano 2:1	0,86	0,88	0,200
CHCl₃:hexano 4:6	0,96	0,96	0,075
Acetato de etilo:hexano 2:1	0,64	0,63	0,780
Acetato de etilo:hexano 1:2	0,82	0,82	0,870

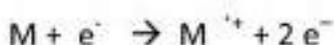
Caracterización por espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica de análisis que permite la medición de iones derivados de moléculas. Permite analizar con gran precisión la presencia de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los iones moleculares en función de su relación masa/carga (m/z). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. El espectrómetro de masas mide relaciones masa/carga de iones de un haz de material del compuesto vaporizado que se ioniza y el haz de iones produce un patrón específico en el detector, que permite analizar el compuesto [12].

Se puede optar por diferentes fuentes de ionización para generar el ión molecular como se detalla a continuación.

Espectrometría de masas con ionización por impacto electrónico (EI) [Ж]

Por esta técnica la muestra se encuentra en estado gaseoso y la ionización es un haz de electrones de alta energía que impacta en las moléculas gaseosas de la muestra a alta velocidad. Del impacto se remueve un electrón de la molécula por lo que el ión molecular es un ión radical (Esquema 3). Así, el grado de fragmentación es elevado [13].



Esquema 3. Generación del ión molecular.

Se fijaron dos condiciones de temperatura diferentes con igual potencia del haz de ionización a 70 eV, obteniéndose los siguientes resultados. En la Figura 7 se muestra el espectro de masas correspondiente al producto P1, en el cual la señal de elevada intensidad corresponde al ión molecular $m/z = 720$. También se observan señales correspondientes a fragmentaciones que presentan compuestos orgánicos que contienen al átomo de azufre [12] como por ejemplo $m/z = 44$ correspondiente al $[CS]^{\cdot+}$, $m/z = 57$ correspondiente a $[C(CH_3)_3]^{\cdot+}$, $m/z = 663$ corresponde al producto ciclado que ha perdido el radical $[C(CH_3)_3]^{\cdot}$.

[Ж] Facultad de Ciencias Químicas- UNC-Espectrómetro de Masas Finningan.

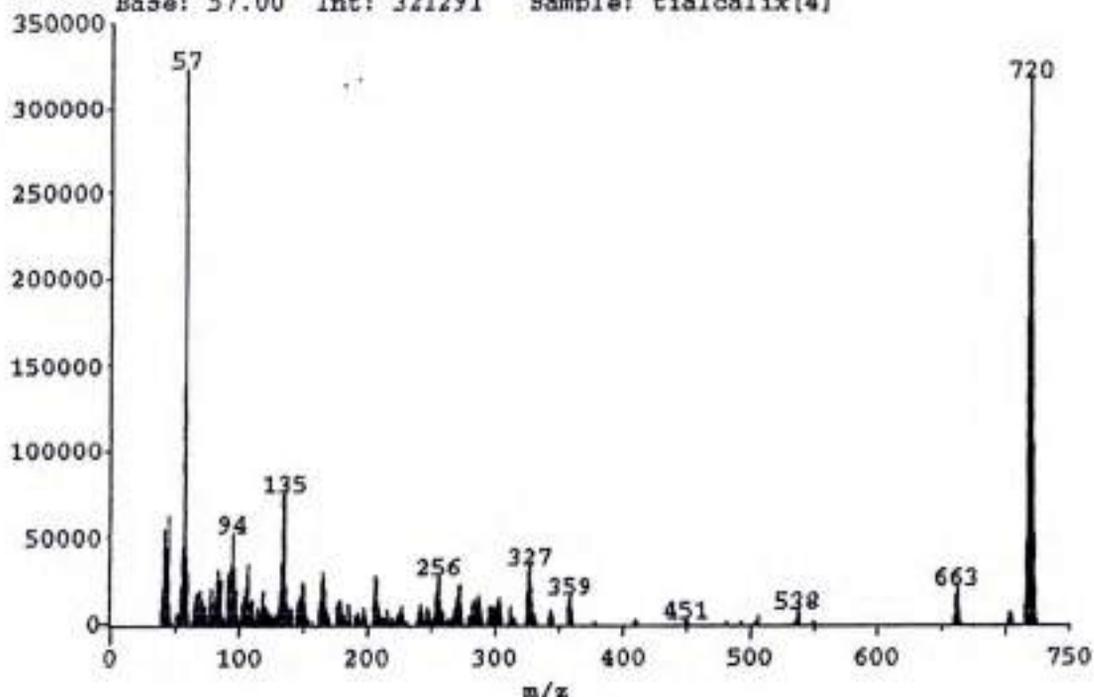


Figura 7. Espectro de masas de TCA4 por ionización electrónico (310 °C y 70 eV).

En la Figura 8 se muestra el espectro de masas para el producto proveniente de la síntesis realizada por segunda vez (P2). También se observan señales correspondientes a fragmentaciones que presentan compuestos orgánicos que contienen al grupo terbutilo $m/z = 57$ correspondiente a $[C(CH_3)_3]^+$.

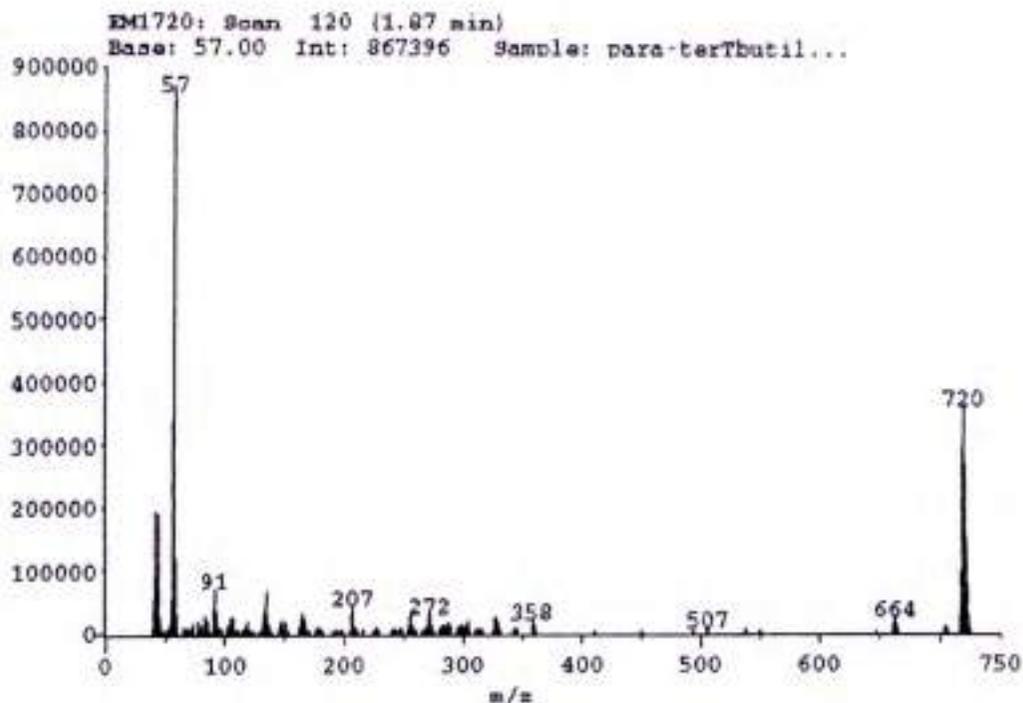


Figura 8. Espectro de masas de TCA4 por EI (320 °C y 70 eV).

Los espectros evidencian la presencia del ión molecular m/z : 720 corroborando que se obtuvo el producto en ambas experiencias.

Espectroscopia de masas con ionización por electronebulización

La principal ventaja de esta técnica es que se generan iones moleculares desde macromoléculas, ya que se fragmentan poco cuando se ionizan. En esta clase de análisis es común encontrar al ión molecular protonado ($[M+H]^+$ en el modo positivo o $[M-H]^-$ en el modo negativo) o el aducto del ión molecular con por ejemplo Na^+ , K^+ o NH_4^+ [14].

Por espectrometría de masas de ionización por electronebulización de baja resolución [3]

El producto proveniente de P1 y P2, por ser insoluble en agua, se preparó en soluciones etanólicas, medio en el que es muy poco soluble. Por esta técnica

se logró observar al $[M+H]^+$ pero en muy baja intensidad. En las figuras 9 a 12 se muestran los espectros resultantes, en ellos se amplía la zona donde se observa el ión molecular.

En la Figura 10 se muestra el segmento ampliado del intervalo donde debería salir el ión molecular para la determinación en modo positivo de la Figura 9. Se observó el ión 721,7 correspondiente al $[M+H]^+$ con una baja intensidad.

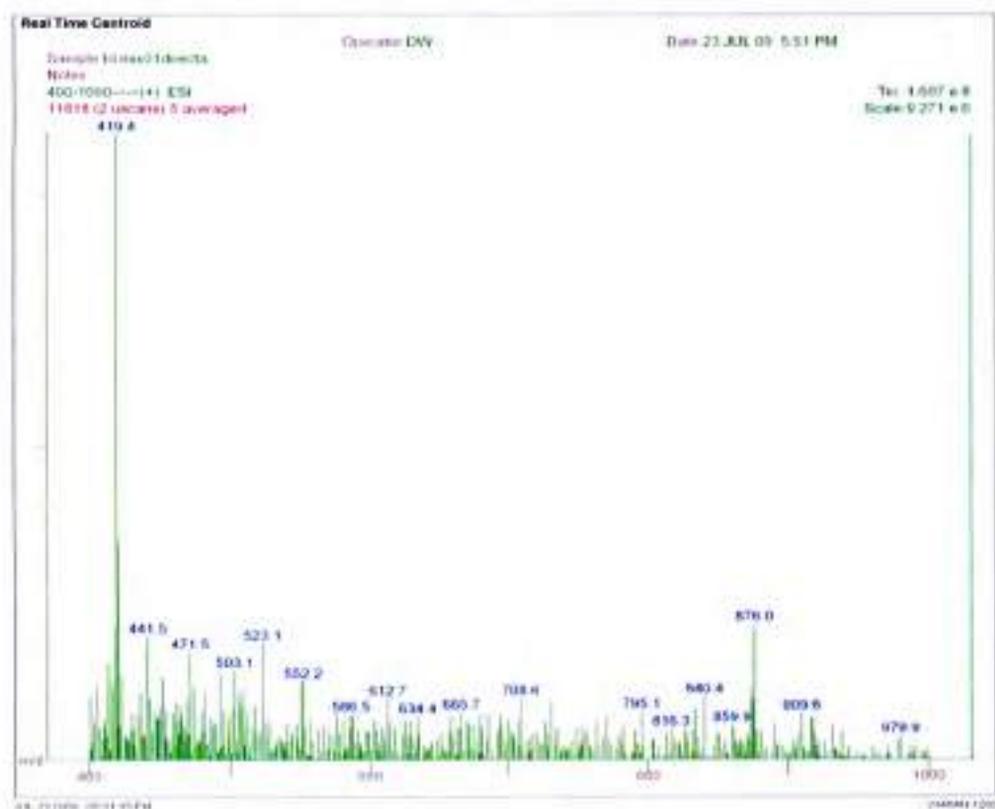


Figura 9. Ión $[M+H]^+$ en etanol HPLC.

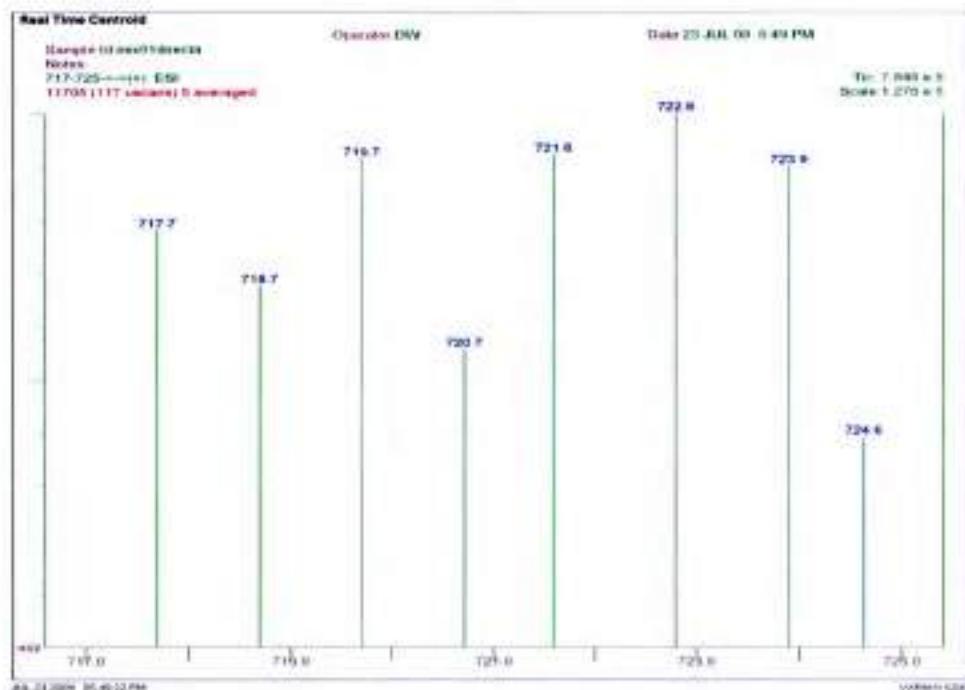


Figura 10. Ampliación del rango en donde se observa al $[M+H]^+$ $z/m=721,6$.

En la Figura 11 se muestra el espectro que resulta de la remoción de un H^+ de la molécula pero no se logró la cantidad suficiente del ión $[M-H]^-$ con la intensidad necesaria para ser observado en estas condiciones.

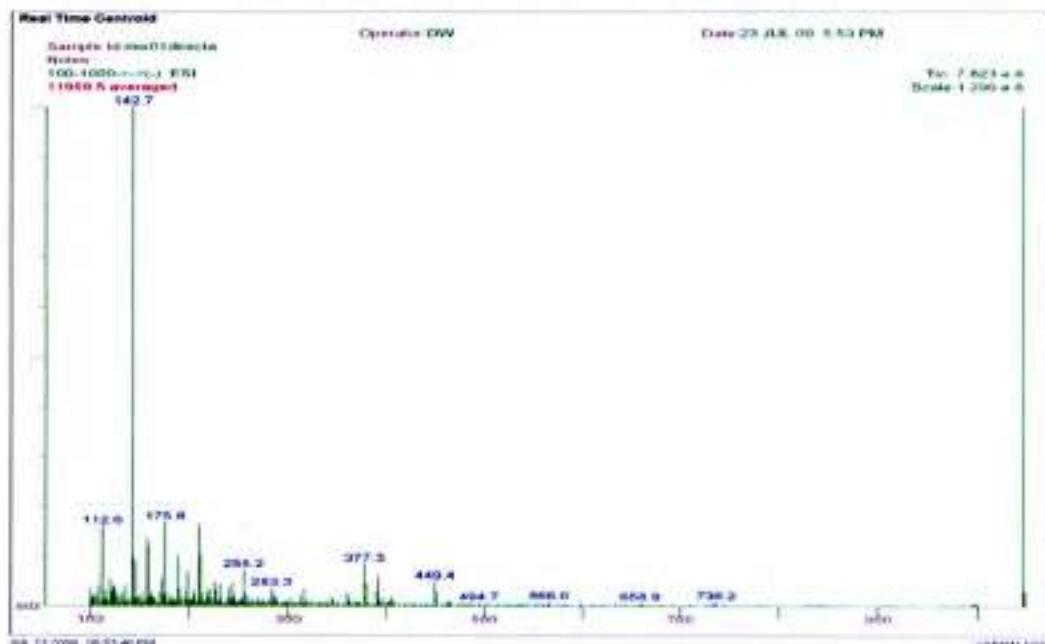


Figura 11. Ión $[M-H]^-$ en etanol HPLC.

En la Figura 12 se muestra el segmento ampliado del rango donde se observa el ión $[M-H]^+$.

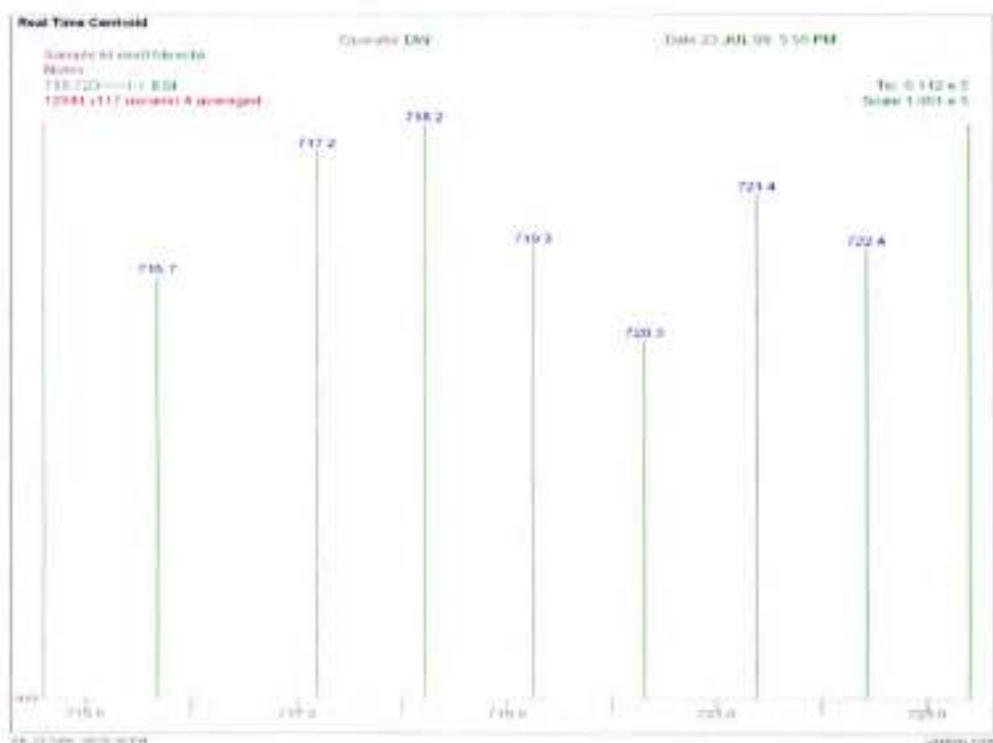


Figura 12. Ión $[M-1]^+$ $m/z=719,3$ en etanol HPLC.

[3] ISIDSA-SECyT-UNC-Espectrómetro de masa triple cuadrupolo-QQQ.
<http://www.unc.edu.ar/investigacion/cienciaytecnologia/novedades-informacion-cyt/el-isidsa-ofrece-servicios-con-espectrometria-de-masas>

Espectroscopia de masas con ionización por electronebulización de alta resolución [4]

En este caso, se carga la molécula adicionando el catión sodio (Na^+) a la masa del compuesto [12]. En la Figura 13 y 14 se muestra el espectro que resulta de la ionización mediante electronebulización del *p-tert-butiltiacalix[4]areno* para P1 y P2 respectivamente.

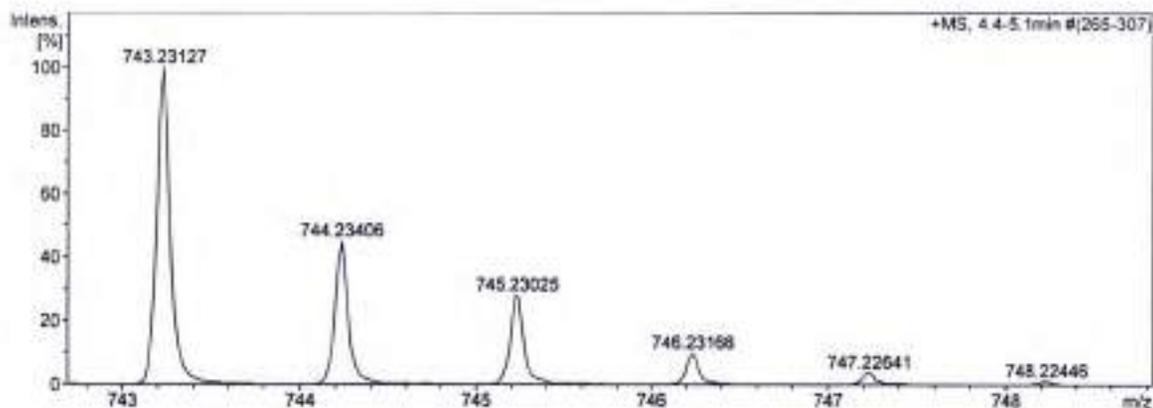


Figura 13. Espectro ESI microTOF-Q del *p*-*tert*-butylcalix[4]areno P1.

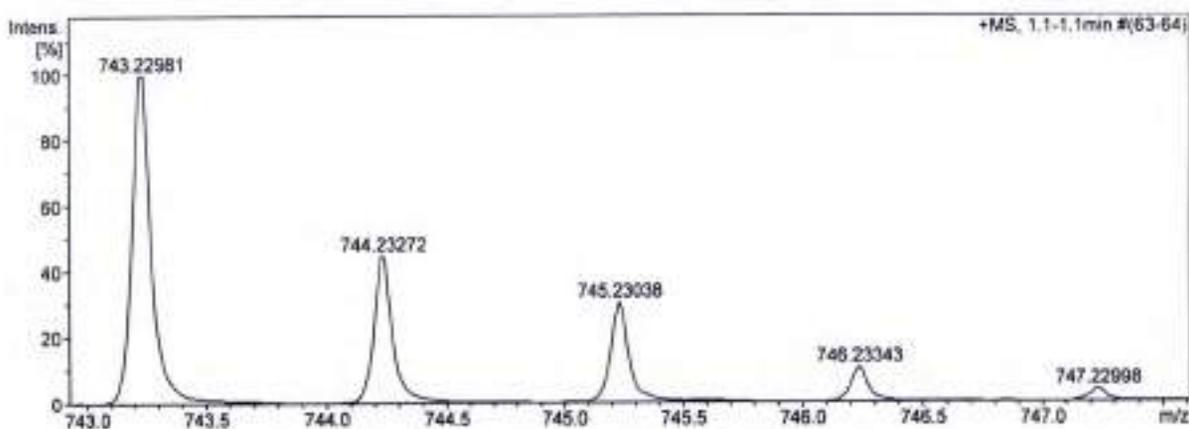


Figura 14. Espectro ESI microTOF-Q del *p*-*tert*-butylcalix[4]areno P2.

Por esta técnica se logró verificar la presencia del ión $[M+Na]^+$ (743,22981) para P1 y P2 que se detecta adicionando la masa del ión Na^+ (22,9897) a la masa de TCA4. La precisión de esta técnica permite corroborar la obtención del producto deseado con una concordancia del 99,9999 %.

[Y] UNIDAD DE MICROANÁLISIS Y MÉTODOS FÍSICOS APLICADOS A LA QUÍMICA ORGÁNICA. CONICET-UMYMFOR-FCEN - UBA. <http://www.umymfor.fcen.uba.ar/frppal7.htm>

Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear [Y]

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se puede emplear con fines cuantitativos y en estudios cinéticos y termodinámicos.

Algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región de las frecuencias de radio o radiofrecuencias. Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos, se puede emplear para determinar la estructura de la molécula en donde se encuentran éstos.

Para que se pueda emplear la técnica de RMN los núcleos deben tener un momento magnético distinto de cero. Esta condición no la cumplen los núcleos con número másico y número atómico par (como el ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S). Los núcleos más importantes que se analizan en química orgánica por RMN son: ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F y N .

En la Figura 15 se indican las posiciones de los protones y en la Figura 16 se presenta el espectro de RMN del TCA4, entre paréntesis se informan los valores de literatura del TCA4 [8]. En el espectro de la Figura 16 se observan los protones alifáticos a δ ppm = 1,22 (1,22), la señal de los H 3-5 a δ ppm = 7,60 (7,64) y la señal de los hidroxilos a δ ppm = 9,56 (9,60). La relación de integraciones de estas señales es 9:2:1. La señal observada a 7,22 es la del CDCl_3 .

[Y] Instituto de investigaciones en Físico-Química de Córdoba-Facultad de Ciencias Químicas-UNC-NMR-Bruker 400MHz

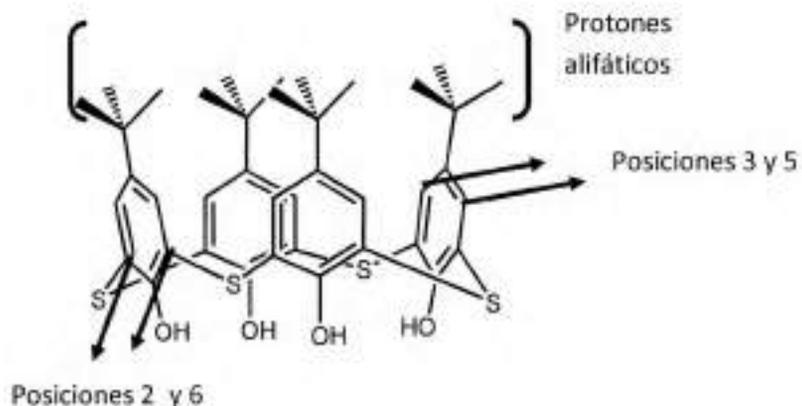


Figura 15. Estructura del TCA4.

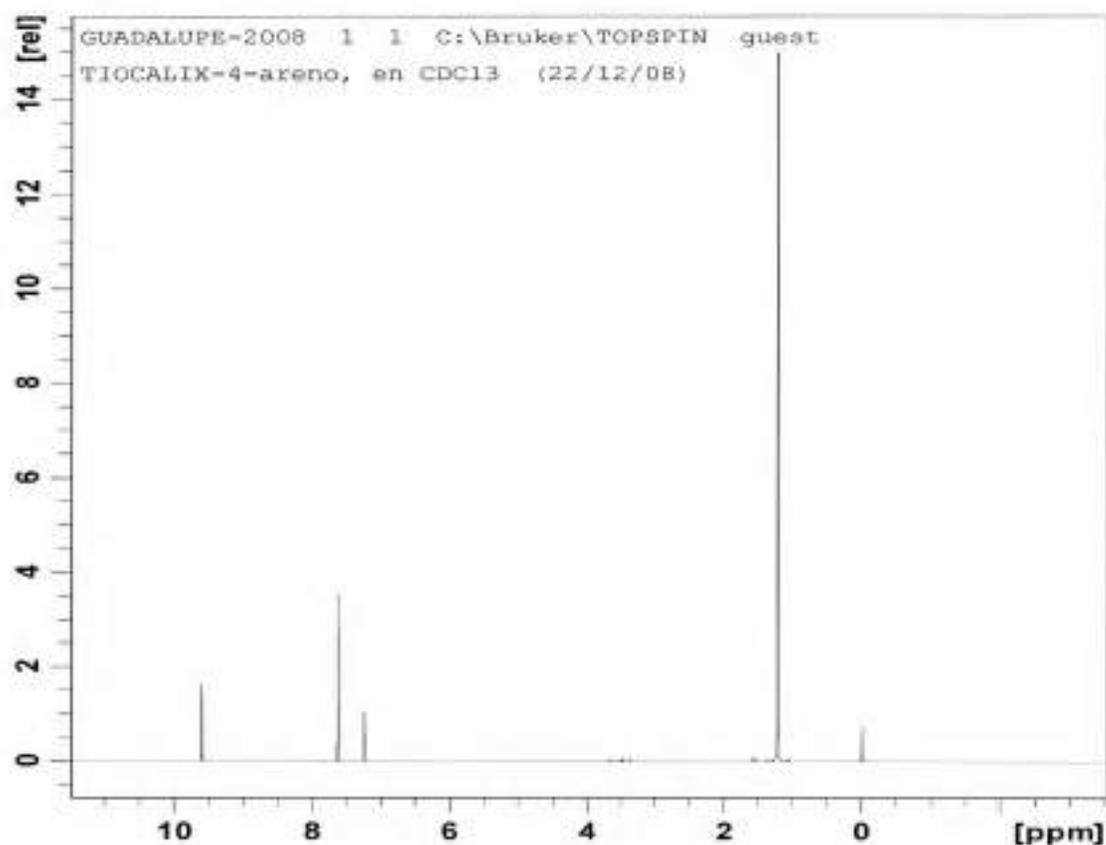


Figura 16. RMN del TCA4 en CDCl₃.

En la Figura 17 se muestra la estructura del *para-tert*-butilfenol unidad monomérica en el TCA4 y en la Figura 18 el espectro RMN correspondiente. La señal de los hidrógenos aromáticos se observa la señal de los protones alifáticos

a δ ppm = 1,22, los hidrógenos aromáticos como un doblete centrado en δ ppm = 6,48 y la señal del hidroxilo se observan a δ ppm = 9,56. La relación de integraciones es 9:4:1. La señal a δ ppm = 7,22 corresponde al CDCl_3 .

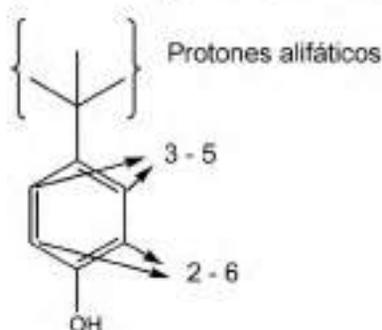


Figura 17. *p-tert*-butilfenol

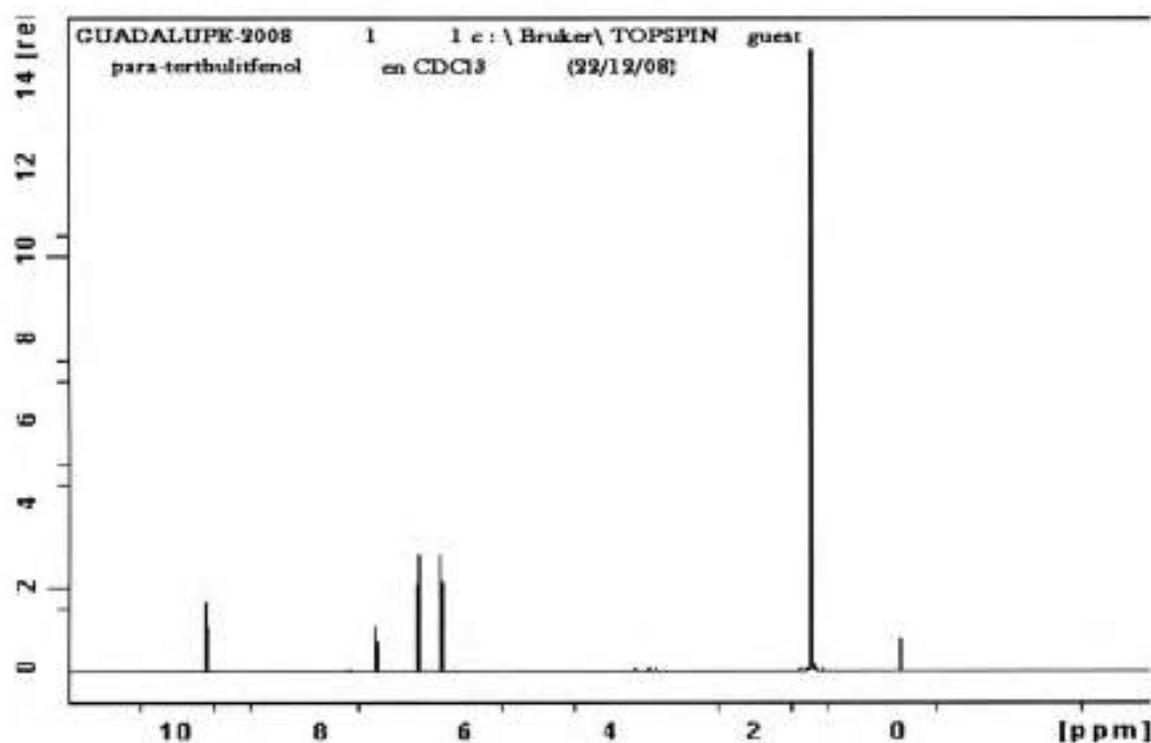


Figura 18. RMN del *p-ter*-butilfenol

Las diferente relación de integraciones de los espectros de las Figuras 16 y 18 indica que se ha sintetizado el macrociclo.

4.2. Caracterización del *para-tert*-butilcalix[4]areno y los productos de sulfonación y sustitución.

Caracterización por espectroscopia infrarroja.

En las Figuras a continuación se detallan las señales que se tuvieron en cuenta para confirmar que se estaba llevando a cabo la reacción.

Los controles que se realizaron a medida que se generaba el producto era por medio de espectroscopia infrarroja (IR), lo que se buscó principalmente fue la aparición y ausencia de señales para cada paso de funcionalización.

En la Figura 19 se muestra el espectro IR del CA4. Se visualiza la absorción debida a la vibraciones del enlace O-H ($\nu = 3200 \text{ cm}^{-1}$) teniendo en cuenta la asociación intramolecular, las señales de los C-H aromáticos ($\nu = 2950 \text{ cm}^{-1}$) y la señal C-H alifáticos ($\nu = 2859 \text{ cm}^{-1}$). Para el control de la síntesis se comparó el IR del CA4 con los IR de los productos de sustitución.

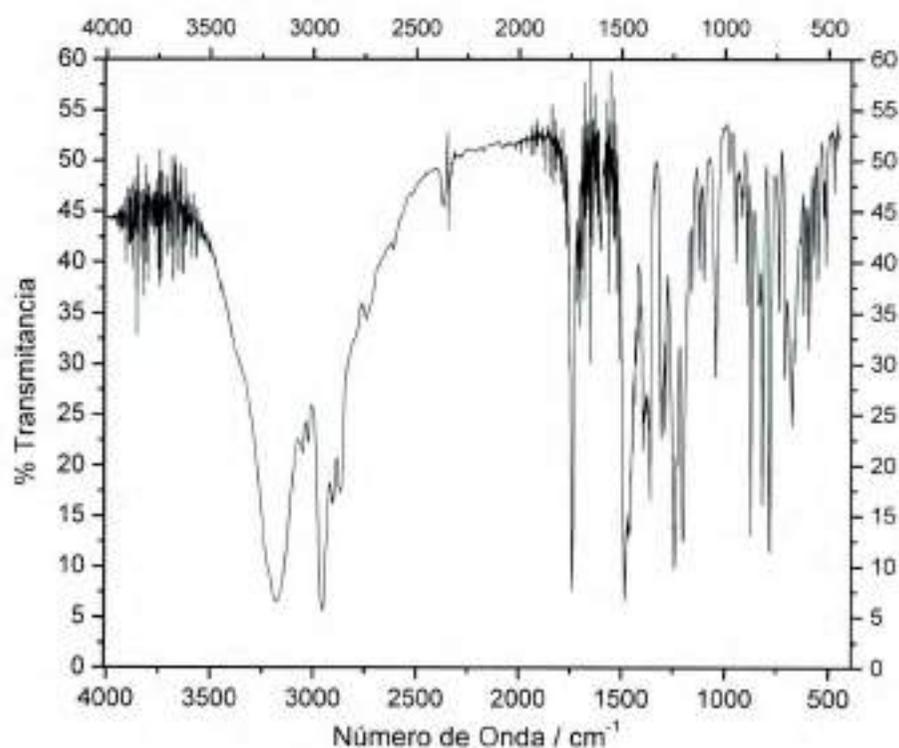


Figura 19. Espectro de IR en KCl del CA4.

En la Figura 20 se muestra el IR del producto de sulfonación del CA4. Se evidencia la ausencia de la señal C-H de los grupos alifáticos. Se observa la aparición de señal intensa del SO_2 ($\nu = 1300 - 1100 \text{ cm}^{-1}$) del grupo sulfonato corroborando que se llevó a cabo la *para* sustitución del *ter*butilo.

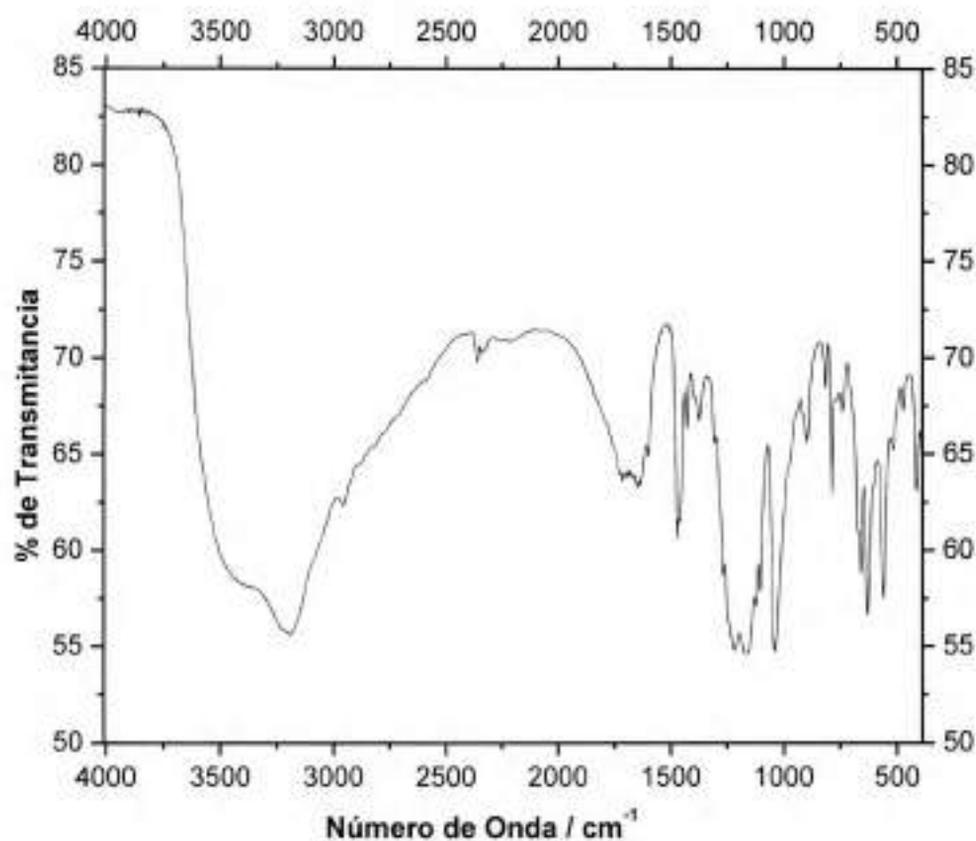


Figura 20. Espectro de IR en KCl del *para-tert*-sulfonatocalix[4]areno.

En las reacciones de alquilación (Figuras 21 a y b) se observa la aparición de la señal de vibración de C-H alifático $\nu = 2900 \text{ cm}^{-1}$ y desaparición de la señal del grupo SO_2 ($\nu = 1300 - 1100 \text{ cm}^{-1}$) del producto de partida. A modo de ejemplo, se presentan los IR de los productos de sustitución con bromuro de decilo y bromuro de hexilo.

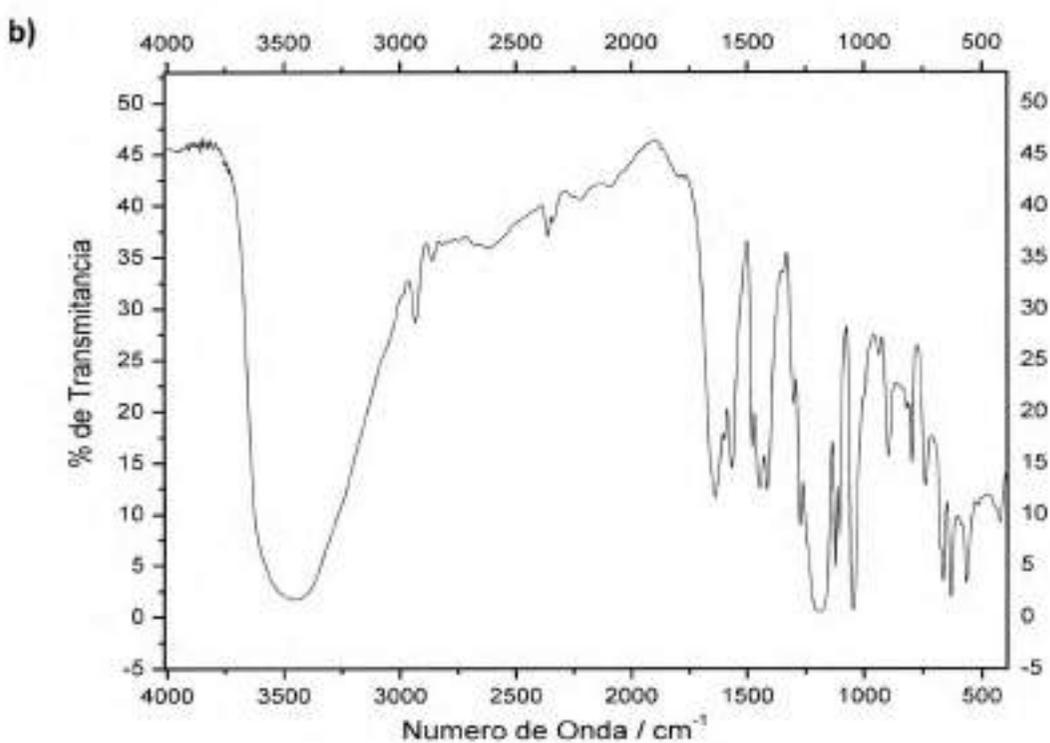
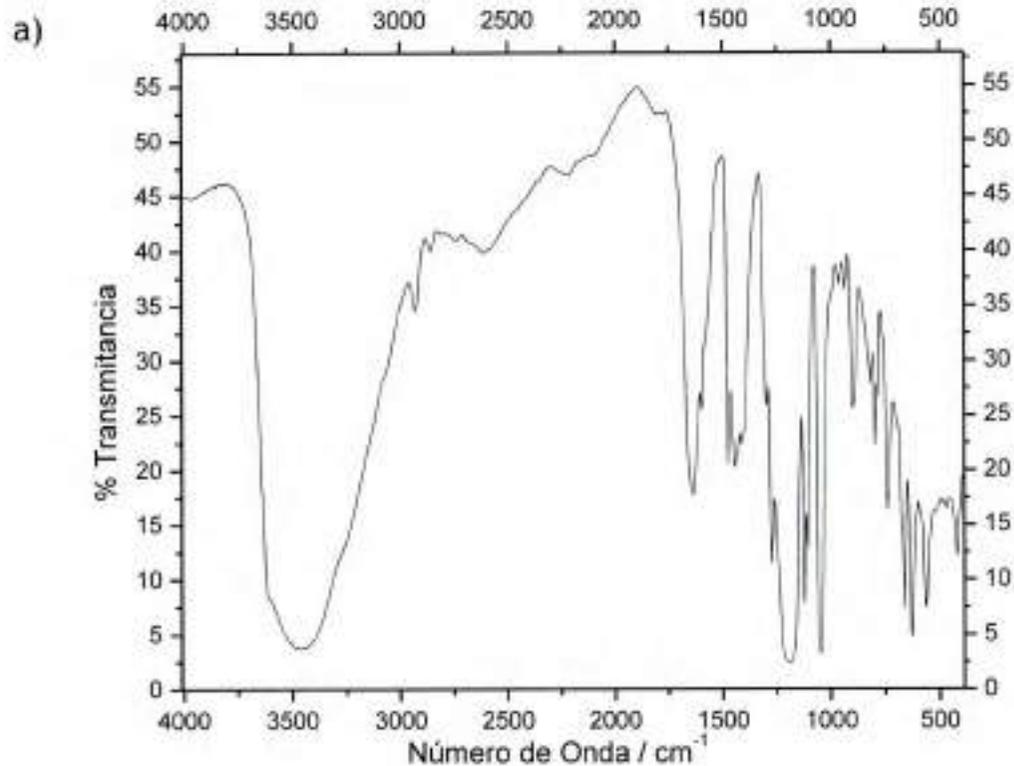


Figura 21. CA4S alquilados a) *p*-hexil-éter-calix[4]areno sulfonato; b) *p*-decil-éter-calix[4]areno sulfonato

5. Conclusiones

En esta parte del trabajo de tesis se adquirió destreza en la síntesis de sistemas macrocíclicos y se amplió el conocimiento de técnicas y uso de instrumental espectroscópico para la caracterización de los compuestos sintetizados.

En la síntesis del TCA4 se alcanzó buen rendimiento (53%) y por espectroscopia de masas (ESI-MS y ESI-MS-HR) y RMN-H se corroboró la formación del compuesto.

En la síntesis de calixarenos sulfonados y calixarenos sulfonados alquilados se confirmó la formación de un solo producto con buen grado de pureza a partir de TLC y espectroscopia IR.

6. Bibliografía

- [1] J. L. Atwood and J. W. Steed, *“Encyclopedia of Supramolecular Chemistry,”* Segunda Ed., no. v. 1. M. Dekker, 2004.
- [2] J. W. Steed, D. R. Turner, and K. J. Wallace, *“Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry.”* Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- [3] D. Parker, *“Macrocyclic Synthesis: A practical approach.”* Oxford University Press, 1996, p. 252.
- [4] C. D. Gutsche, *“Calixarenes: An Introduction,”* Segunda Ed. Cambridge: Publishing, RCS, 2008.
- [5] D. R. Stewart and C. D. Gutsche, “Isolation, Characterization, and Conformational Characteristics of p-tert-Butylcalix[9-20]arenes,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, pp. 4136–4146, 1999.
- [6] P. N. Grazia M. L. Consoli, Francesca Cunsolo, Corrada Geraci, “Remarkable Alkali Cation Template Effect in 1,5-Bridged Calix[8]arenes,” *Org. Lett.*, vol. 3, no. 11, pp. 1605–1608, 2001.
- [7] D. R. Stewart, M. Krawiec, R. P. Kashyap, W. H. Watson, and C. D. Gutsche, “Conformational characteristics of ethers and esters of p-tert-butylcalix arene,” *J. Am. Chem. Soc.*, no. d, pp. 586–601, 1995.
- [8] H. Kumagai, M. Hasegawa, S. Miyanari, Y. Sugawa, Y. Sato, T. Hori, S. Ueda, H. Kamiyama, and S. Miyano, “Facile synthesis of p-tert-butylthiacalix[4]arene by the reaction of p-tert-butylphenol with elemental sulfur in the presence of a base,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 38, no. 22, pp. 3971–3972, 1997.
- [9] D. R. Lide, *“Handbook of chemistry and physics,”* 85ta Ed. Boca Raton: Press, CRC, 2005.
- [10] P. Choquard, J. B. R. de Vains, R. Lamartine, and A. Marcillac, “Process for the dealkylating sulfonation of p-alkyl calixarenes,” Patente: US 5952526 A1999.
- [11] N. Iki and S. Miyano, “Can thiacalixarene surpass calixarene?,” *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, vol. 41, no. 1–4, pp. 99–105, 2001.
- [12] C. E. Prestich; Bühlmann, P; Affolter, *“Determinación estructural de compuestos orgánicos.”* Barcelona: Masson, 2005.
- [13] I. A. Kaltashov and R. R. Abzalimov, “Do ionic charges in ESI MS provide useful information on macromolecular structure?,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 19, pp. 1239–1246, 2008.

- [14] S. Otles, *Handbook of Food Analysis Instruments*, Primera Ed. Taylor & Francis, 2008.

**EFFECTO DEL METAL ALCALINO EN LAS
CONSTANTES DE DISOCIACIÓN
ACIDO-BASE DE CALIXARENOS Y
TIACALIXARENOS**

1. Introducción

Los calixarenos (CA) por ser oligómeros cíclicos son receptores u hospedantes más adecuados para moléculas neutras y especies iónicas con las que pueden llevar a cabo interacciones hidrofóbicas, π - π , catión- π y puentes de hidrógeno principalmente a través de los grupos hidroxilos del anillo inferior [1].

La reactividad química de los calixarenos tiene gran dependencia con la geometría conformacional que adoptan, flexibilidad, dimensiones de la cavidad y selectividad, en esto tienen un rol principal los grupos hidroxilos. En las interacciones de complejamiento huésped-receptor los datos de pKa de los calixarenos permitirían establecer si las fuerzas que prevalecen son electrostáticas, por ejemplo par iónico; o dipolares, por ejemplo puentes de hidrógeno [2].

Las reacciones ácido-base de Brønsted involucran la transferencia de un protón H^+ desde un ácido prótico a un par de electrones de una base, y comúnmente no se tiene en cuenta la identidad del contra ión. En los macrociclos la asociación con el contra ión depende del tamaño de la cavidad, la habilidad de los heteroátomos presentes en la estructura de ceder los pares de electrones no ligantes y de las interacciones metal- π , que tienden a estabilizar las especies químicas, afectando la energía libre total. Los equilibrios ácido-base tienen un importante rol en la conformación de cono y la selectividad por el huésped [2] [3].

Dada la baja solubilidad de estos compuestos tanto en medios acuosos como en solventes orgánicos [4] es que los comportamientos y características de los calixarenos no funcionalizados (Figura 1 a) o alquil sustituidos (Figura 1 b) han sido poco estudiados.

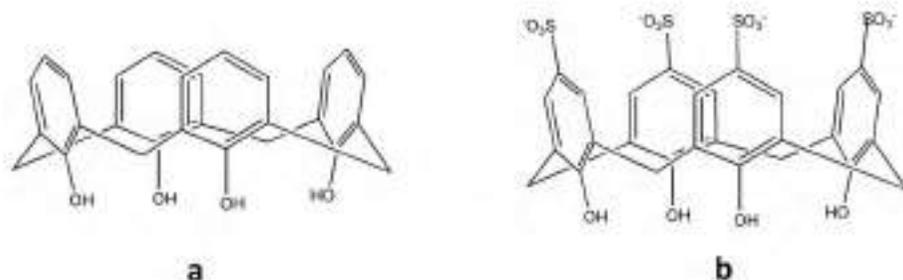


Figura 1. a) CA4 no funcionalizado y b) CA4 *p*-sulfonato

Los líquidos en estado puro que presentan asociaciones entre sus moléculas ya sea en mayor o menor extensión se denominan disolventes moleculares, son líquidos dieléctricos que presentan muy baja o nula conductividad eléctrica debido a que tienen una débil auto-ionización de sus moléculas [5].

Los disolventes moleculares inorgánicos, que tienen como principal representante al agua, pueden ser ácido sulfúrico, fluorhídrico y nítrico, el amoníaco, etc. En tanto que los disolventes moleculares orgánicos más comunes son: alcoholes, cetonas, aminas, etc. La estructura del líquido molecular tiene efecto sobre las propiedades como disolvente. La aparición de posibilidades de desorden entre las moléculas del líquido que le confieren fluidez lleva a la licuefacción, mientras que la cohesión se da por interacciones diversas entre moléculas vecinas como puentes de hidrogeno, para el caso de los disolventes 'protonados' (agua, alcoholes, etc.) o asociación por mediación de otros átomos capaces de formar 'puentes' (oxígeno, halógenos) en el caso de los diferentes disolventes 'apróticos' (del tipo de los halogenuros, óxidos covalentes, etc.), las interacciones dipolo-dipolo e interacciones de van der Waals. Debidos a estas asociaciones que se presentan intermolecularmente en el solvente, principalmente por puentes de hidrógeno, es que constituyen verdaderos polímeros de moléculas sencillas del disolvente.

En el caso del agua pura se considera que forma cúmulos o 'clusters' de moléculas enlazadas tetraédricamente. Debido que el ordenamiento lleva a la formación de una red tridimensional hace que el agua sea el disolvente más estructurado. Para otros disolventes protonados como los alcoholes, en los cuales los enlaces puente de hidrógeno generan asociaciones intermoleculares, se generan cadenas y la organización no es tan pronunciada como en el agua.

La mezcla de un disolvente estructurado con otro produce modificaciones estructurales, más evidentes si se trata de mezclas hidro-orgánicas como es el caso de agua con algún alcohol. A medida que se agrega al agua cantidades crecientes del alcohol, las moléculas de alcohol se incorporan a la red del agua generando mayor 'organización'. Pero cuando la proporción de alcohol supera a la del agua el efecto es más 'desorganizador', prevaleciendo la red de asociación del disolvente que se haya en mayor proporción [6] [7].

Si se busca explorar reacciones químicas en el seno de un disolvente es preciso que las sustancias a estudiar, reactivos, se disuelvan. Para esto es necesario que el soluto, sea como molécula o iones, se disperse entre las moléculas del disolvente generando varios fenómenos de interacción entre las moléculas del soluto y las del disolvente denominados 'fenómeno de solvatación' [5].

Las características del soluto, iónico o molecular, generan 'especies solvatadas' diferentes. Ésta nueva entidad, partícula de soluto rodeada de moléculas del disolvente, se estabiliza mediante interacciones de diferente naturaleza y fuerza. Las fuerzas pueden ser de varios tipos: fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas ión-dipolo o dipolo-dipolo (dependiendo si la especie solvatada es un ión o una molécula polar y el disolvente es dipolar).

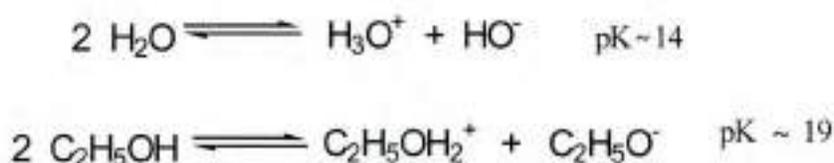
Para los aniones en disolventes dipolares (agua, alcoholes, etc.) las interacciones que predominan son electrostáticas con el extremo positivo de las

moléculas del disolvente más cercanas. La fuerza de solvatación crece inversamente al tamaño del anión [5].

En la solvatación de cationes, por los mismos disolventes dipolares, es el extremo negativo de las moléculas más cercanas que interacciona electrostáticamente. En estos casos la fuerza de la solvatación crece con la presencia de átomos con electrones libres, oxígeno por ejemplo, si la carga negativa está bien localizada.

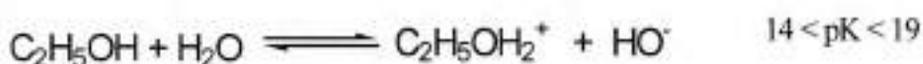
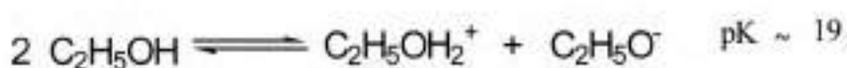
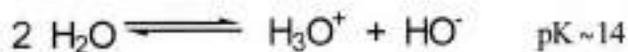
En mezclas de dos solventes que poseen propiedades ácido-base muy parecidas, presentan una transferencia de iones H^+ en la cual pueden intervenir simultáneamente las moléculas de ambos componentes, tanto para ceder iones H^+ como para fijarlos y solvatarlos [7].

En este trabajo de tesis se utilizó una mezcla de alcohol etílico con agua. Los solventes puros pueden representarse mediante los siguientes equilibrios de el Esquema 1.



Esquema 1. Equilibrios del agua y del etanol puros.

El Esquema 1 muestra las especies iónicas que coexisten en los respectivos solventes puros. En una mezcla donde predomina el etanol respecto al agua se esperaría que sean los equilibrios que se detallan en el Esquema 2 los que generan las especies iónicas presentes. Esto significa que la constante de autoprotólisis de este disolvente difiera del conocido $K_w = 10^{-14}$ a 25 °C



Esquema 2. Equilibrios presentes en una mezcla etanol-agua.

Como antecedente, al estudio realizado en esta tesis, puede mencionarse que se observó una disminución de los pKa de los *p*-sulfonatocalix[n]arenos ($n=4, 6, 8$) con el aumento de la concentración de NaCl lo que evidencia el efecto del catión sobre la disociación del protón fenólico de estos receptores [8]. Debido a la formación de los complejos con el catión se establece que la dependencia del pKa con la concentración del electrolito es causada por el cambio del coeficiente de actividad de estos compuestos antes y después de la etapa de deprotonación. También se mostró que las unidades de para-sulfonatofenol o para-sulfonatofenóxido de los calixarenos interactúan independientemente con las atmósferas iónicas formadas alrededor de las unidades fenólicas [9].

2. Objetivos

2.1. General

Estudiar la influencia de los distintos contraiones (Li^+ , Na^+ y K^+) sobre las constantes de disociación ácido-base de los calixarenos.

2.1. Objetivos específicos

- Determinar los valores de pKa del *p*-tert-butiltiacalix[4]areno, *p*-tert-butilcalix[4]areno y *p*-tert-butilcalix[6]areno.
- Determinar el efecto del contra ión sobre el valor del pKa.
- Establecer la identidad de las interacciones que conducen a la formación del complejo macrocilo-catión.

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos

Todos los reactivos que se utilizaron fueron grado analítico

- KPO_4H_2 (Cicarelli)
- $Na_2 PO_4H$ (Merck)
- NaCl (Merck)
- KCl (Anedra)
- NaOH (J.T. Baker)
- KOH (Merck)
- LiOH (Taurus)
- Biftalato de potasio (Anedra)
- $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (Merck)
- Agua MQ
- Cloroformo (Cicarelli)
- Diclometano (Sintorgan)
- Etanol grado HPLC (Sintorgan)
- HCl 36,5-38% (Cicarelli y Anedra)
- *p*-tert-butiltiacalix[4]areno (sintetizado)
- *p*-tert-butil-calix[4]areno y *p*-tert-butil-calix[6]areno (Aldrich
Chemica Company, Inc)

La calidad de los solventes fue controlada por espectrofotometría y la pureza de los calixarenos fue controlada por diferentes técnicas detalladas en el Capítulo III.

Soluciones

Soluciones buffer: se prepararon tres buffers estándar con los que se calibraba el electrodo $\text{pH}=4,008$, $\text{pH}=6,994$ y $\text{pH}=9,156$ [10].

Soluciones madre de calixarenos: Para todas las soluciones de *p*-tert-butiltiacalix[4]areno (PM = 720,10 g) y *p*-tert-butilcalix[6]areno (PM = 973,40) se procedió de igual forma, se tomaron masas de aproximadamente $(0,0100 \pm 0,0002)$ g y se las disolvió en cloroformo llevando a un volumen final de $(5,00 \pm 0,02)$ mL. La concentración final para ambos calixarenos fue $[0,5-6] \mu\text{M}$.

Para el *p*-tert-butil-calix[4]areno (PM = 648,94) se procedió de igual manera, pero usando como disolvente diclorometano.

Todas las soluciones de calixareno se mantenían en heladera y protegidos de la luz.

Solución madre de hidróxido de sodio: inicialmente $(4,002 \pm 0,002)$ g de NaOH fueron disueltos en 250,00 mL de etanol, se centrifugó y la concentración de solución obtenida fue determinada potenciométricamente titulando con biftalato ácido de potasio. Solución madre de NaOH $(0,37 \pm 0,01)$ M. A partir de la solución madre se realizaron diluciones siguiendo el mismo procedimiento para determinar las concentraciones: $(3,0 \pm 0,1) \times 10^{-2}$ M y $(2,9 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ M de NaOH.

Solución madre de hidróxido de potasio: $(3,003 \pm 0,002)$ g de KOH fueron disueltos en 250,00 mL de etanol, se centrifugó y la concentración de la solución obtenida fue determinada potenciométricamente titulando con biftalato ácido de potasio. Solución madre de KOH $(17,6 \pm 0,4) \times 10^{-2}$ M. A partir de la solución madre se preparó una dilución y las concentración se determinó siguiendo el mismo procedimiento: $(2,50 \pm 0,04) \times 10^{-3}$ M de KOH.

Solución Madre de hidróxido de litio: (2,7532±0,002) g de LiOH fueron disueltos en 250,00 mL de etanol, se centrifugó y la concentración de solución obtenida fue determinada potenciométricamente titulando con biftalato ácido de potasio. Solución madre de LiOH (0,46±0,01) M. A partir de la solución madre se preparó una dilución y las concentración se determinó siguiendo el mismo procedimiento: (5,00±0,04) x10⁻³ M de LiOH.

Soluciones madre de HCl: Se tomaron (7,4±0,2) mL de HCl 36,5-38,0 % y se los llevaron a 250,00 mL con etanol. La concentración se determinó potenciométricamente titulando con Na₂B₄O₇·10H₂O. Con la solución madre de HCl (0,34±0,01) M se prepararon otras dos soluciones a las que se les determinó la concentración de igual manera que a la solución madre: (3,04±0,03) x 10⁻² M de HCl y (3,02±0,03) x 10⁻³ M de HCl.

3.2. Instrumentos

- Baño térmico (Haake y Thermo Orion)
- Plancha de agitación (Ceramag Midi)
- Electrodo de vidrio, calomel saturado(Orion ROSS)
- pH-metro (ORION Modelo 720A y 520 A)
- Espectrofotómetro UV-2101PC (Shimadzu)
- Espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu)

3.3. Metodología

En este trabajo las determinaciones de los pKa se llevaron a cabo por dos métodos:

- potenciométrico
- espectrofotométrico

Tanto el sistema de medición potenciométrico como el expectrofotométrico fueron termostatizados a (25,0 ±0,1) °C.

Método potenciométrico

Para llevar a cabo las titulaciones potenciométricas se realizaron lecturas de pH en el medio de trabajo (etanol:agua), de manera tal que el medio sea lo suficientemente acuoso para que la respuesta del electrodo sea dinámica y no se precipite el calixareno.

Durante la titulación potenciométrica se observó deriva tanto por parte de los equilibrios a nivel de la membrana del electrodo (orgánico:acuoso) como inestabilidades en la red eléctrica que retardaban la respuesta lo que se solucionó conectando el pH- metro a un estabilizador de tensión.

Método espectrofotométrico

Para las determinaciones de los pKa por espectrofotometría UV-Visible se examinaron los espectros de los calixarenos a diferentes pH y se seleccionaron aquellas longitudes de onda de máximo cambio entre pH = 2, 7 y 11.

Titulación Potenciométrica

Dada la hidrofobicidad que presentan los calixarenos alquil sustituidos se probaron distintas mezclas de solventes (etanol:agua) siendo la relación óptima seleccionada 3:1 para que el medio de titulación sea lo suficientemente acuoso, logrando un pronto restablecimiento del equilibrio en el electrodo y compatible con el calixareno haciéndolo más estable en solución.

Al finalizar cada titulación se debió recuperar la membrana del electrodo con HCl 0,1 M y agitando en sonicador unos minutos ya que la calibración del mismo no quedaba dentro del rango aceptado (92-102 %).

Por el cambio de partidas de etanol durante las titulaciones potenciométricas se notó una variación en el pH de inicio, si bien se llevaron a cabo titulaciones en reversa para corroborar los valores de pKa observados se resolvió acidificar hasta pH= 2 y repetir las experiencias desde esta condición inicial.

Determinación de los coeficientes de absorptividad molar

Se utilizaron una cubeta de 1, 4 y 5 cm de paso óptico, paredes enmascaradas y volumen reducido, logrando así establecer el intervalo lineal o de calibración para los receptores y sustratos a las longitudes de onda más adecuadas en cada caso. Debido las características ácido-base de algunos de estos compuestos que se evidencian por los cambios espectroscópicos se decidió fijar el pH a 6 para las determinaciones de estas constantes. Los valores determinados para cada compuesto se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Coeficientes de absorptividad molar de receptores y sustratos.

<i>Coeficiente de Absorptividad Molar (ϵ) $M^{-1} cm^{-1}$ pH=6 y etanol-agua (3:1) a 25 °C</i>				
TC4	$\epsilon_{259 nm} = 13200$	$\epsilon_{301 nm} = 32000$	$\epsilon_{325 nm} = 26400$	$\epsilon_{380 nm} = 1000$
AC	$\epsilon_{325 nm} = 27900$	$\epsilon_{375 nm} = 3200$	$\epsilon_{380 nm} = 700$	
PQ	$\epsilon_{259 nm} = 22600$	$\epsilon_{301 nm} = 1600$	$\epsilon_{325 nm} = 400$	$\epsilon_{380 nm} = 0,05$
C4	$\epsilon_{290 nm} = 3700$			

Titulación Espectrofotométrica

Para las titulaciones espectrofotométricas, debido a la baja concentración de calixareno, y por lo tanto su baja absorbancia, se utilizaron una cubeta de 4 y 5 cm de paso óptico, paredes enmascaradas y volumen reducido, logrando así que la absorbancia medida se encuentre dentro del rango establecido por calibración.

4. Resultados y discusión

4.1. Cambio espectral con el pH

En las Figuras 2 y 3 se presentan los cambios en la absorbancia con el pH para los macrociclos estudiados.

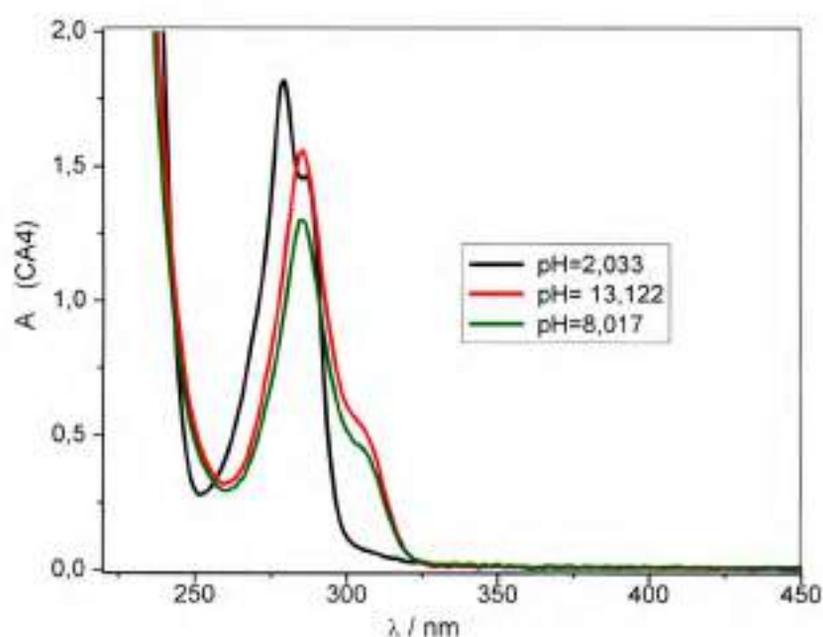


Figura 2. Variación de la absorbancia de CA4 50 μM.

En la Figura 2 se muestran los cambios espectrales con el pH para el CA4, observándose que en medio básico se intensifica la absorbancia en el máximo a 290 nm y en el hombro a 315 nm, con una relación de intensidad mayor que a pH=8,017. Se observa un corrimiento batocrómico de ambas bandas de 20 nm aproximadamente y una marcada disminución en la diferencia de absorbancia entre las mismas.

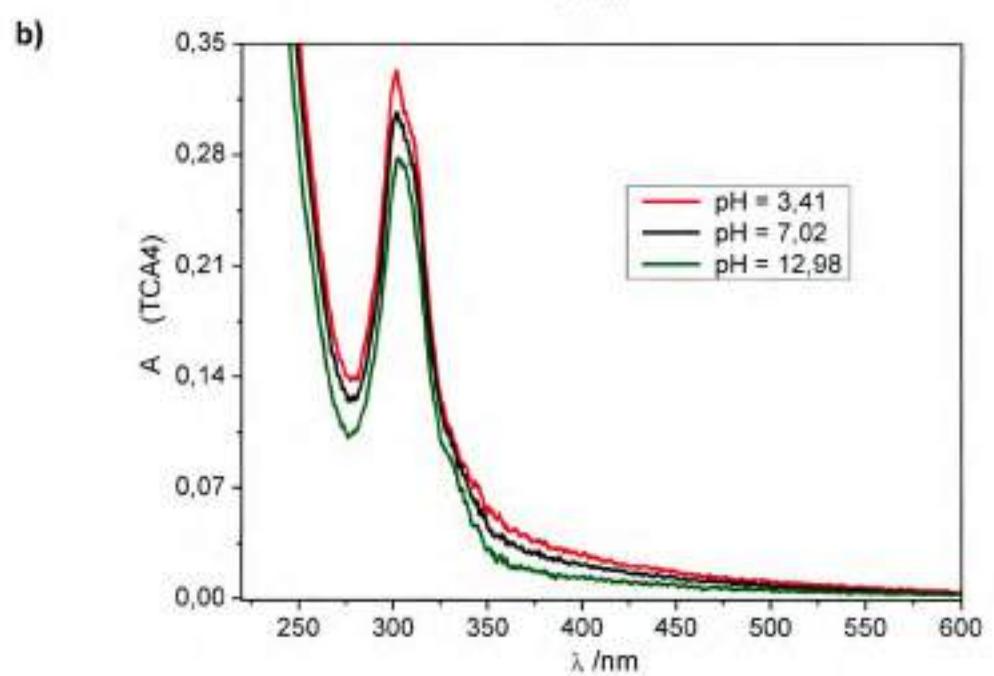
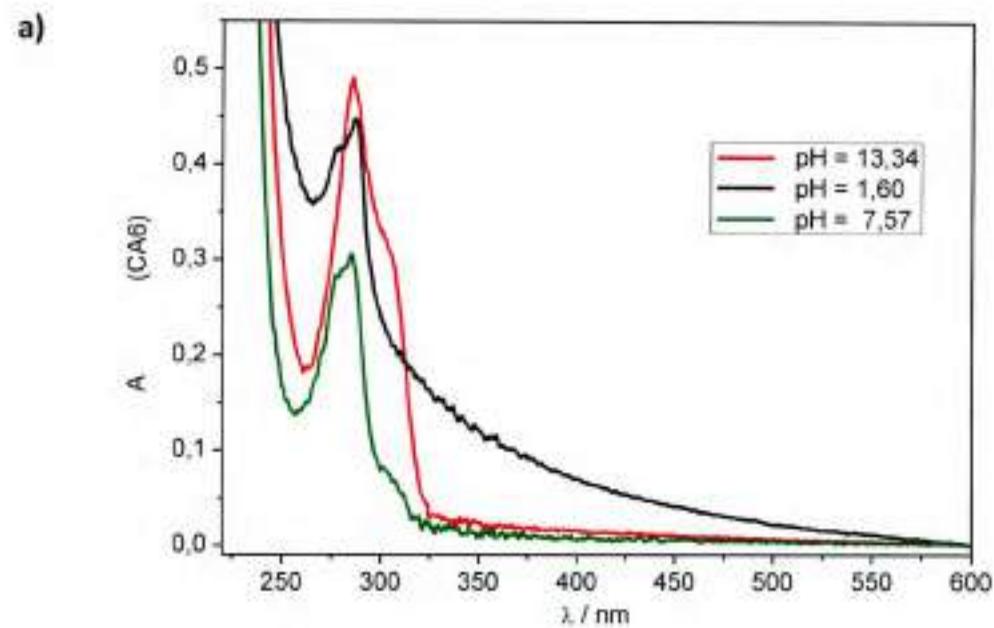


Figura 3. Variación de la absorbancia del a) CA6 2 μ M y b) TCA4 8 μ M con el pH.

En la Figura 3 a) se muestran las variaciones espectrales para el CA6 con el pH, se evidencia que en medio básico se intensifica la absorbancia en los máximos a 285 nm y en el hombro a 307 nm para las condiciones de pH= 7,57 y 13,34, con un aumento en la A > 80%. Del análisis comparativo entre la señal a pH=1,6 y la generada a pH =7,57, donde la intensidad disminuye marcadamente

con el aumento del pH, se puede observar además que con la acidificación del medio se produce aumento de absorbancia con forma de cola desde los 300 nm hacia λ mayores, este perfil disminuye marcadamente en intensidad con el aumento del pH. Estos cambios con el aumento de la concentración de H^+ en el medio podrían estar indicando la formación de alguna especie de agregado entre las moléculas del macrociclo.

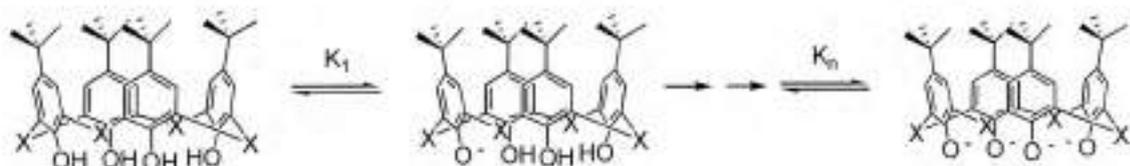
Por otro lado la Figura 3 b) muestra las señales UV-Visible del TCA4 en tres condiciones de pH. Los espectros no muestran cambios tan marcados como para CA4 y CA6 con la acidificación del medio, el mayor cambio en la intensidad de absorción se produce a $\lambda=301$ nm.

La cola de absorción al acidificar que se observa para CA6 no se genera en el perfil de absorción del CA4 ni del TCA4, esta diferencia se podría explicar teniendo en cuenta la disminución de la solubilidad con el incremento de unidades aromáticas en el macrociclo. Además si comparamos las señales generadas por el CA4 y TCA4, la señal a 315 nm en el CA4 aumenta con el pH indicando la formación del fenolato, esta variación no se evidencia en el TCA4 lo que indica que el efecto auxocrómico del hidroxilo ionizado es mayor para el CA4. La presencia del átomo de azufre tendría el efecto opuesto al del hidroxilo por lo que se observa la atenuación del efecto auxocrómico del grupo $-OH$ [11].

Se seleccionaron las longitudes de onda en donde se observaron los mayores cambios de absorbancia con la variación de pH, las mismas son características para cada receptor.

4.2. Efecto del metal en la acidez de ticalixarenos y calixarenos

En el esquema 3 se representan las características polipróticas de los ticalixarenos y calixarenos.



Esquema 3. Equilibrio ácido-base de los macrociclos estudiados. X = CH₂ o S y posibles valores de n=1 hasta 6.

Titulación Potenciométrica

A partir de las diferentes curvas de titulación de pH obtenidas para los receptores *p-tert*-butilticalix[4]areno (TCA4), *p-tert*-butilcalix[4]areno (CA4) y *p-tert*-butilcalix[6]areno (CA6) de pH medido en función de los mL de titulante (LiOH, NaOH, KOH y HCl), se obtuvieron los diferentes valores de pKa, se corroboraron por el método de la segunda derivada, en todas las curvas.

Ya que en el punto final sólo se encuentra presente una de las especies que participa en el equilibrio que se analiza, se considera que las concentraciones de la especie protonada y desprotonada son iguales en el pH correspondiente a la mitad del volumen al cual se observa al punto final, como se indica en la Ecuación 1.

$$\frac{V \text{ del punto final}}{2} = V \text{ correspondiente al pKa}$$

Ecuación 1. Determinación de pKa. Donde V es volumen del titulante.

A modo de ejemplo a continuación se presentan las curvas de titulación potenciométricas para cada macrociclo con cada una de las bases seleccionadas.

Todas las experiencias se realizaron por triplicado.

A) Efecto de Li^+

En las Figuras 4, 5 y 6 se muestran de manera representativa una de las curvas de titulación obtenidas para cada macrociclo. Se distingue claramente el punto de inflexión a partir del cual se obtuvo el valor del punto final de cada titulación y aplicando la Ecuación 1 el correspondiente pKa indicado en los gráficos con una flecha.

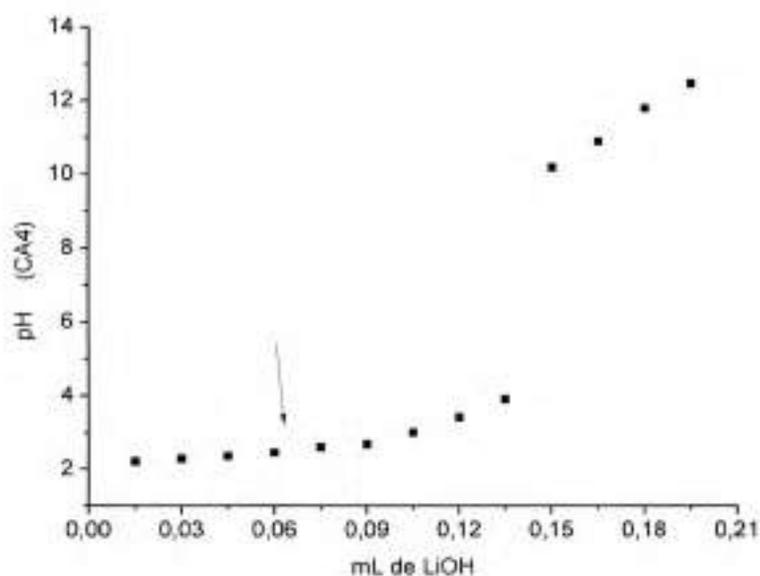


Figura 4. Titulación potenciométrica de CA4 con LiOH, pKa observado 2,3.

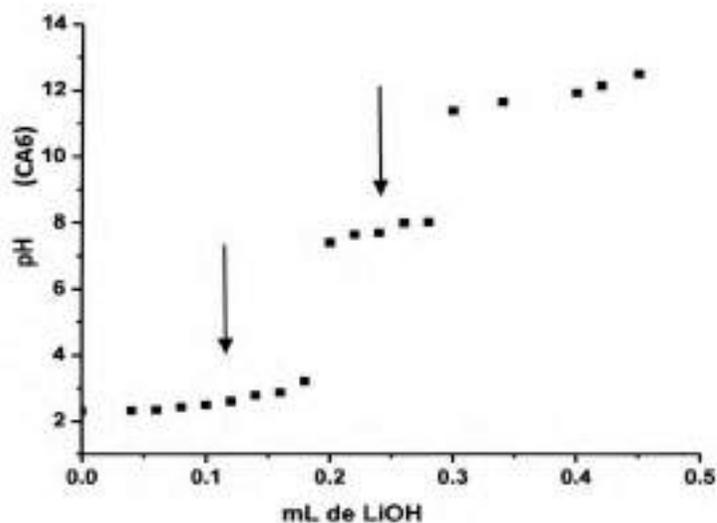


Figura 5. Titulación potenciométrica de CA6 con LiOH, los pKa observados 2,8 y 7,9.

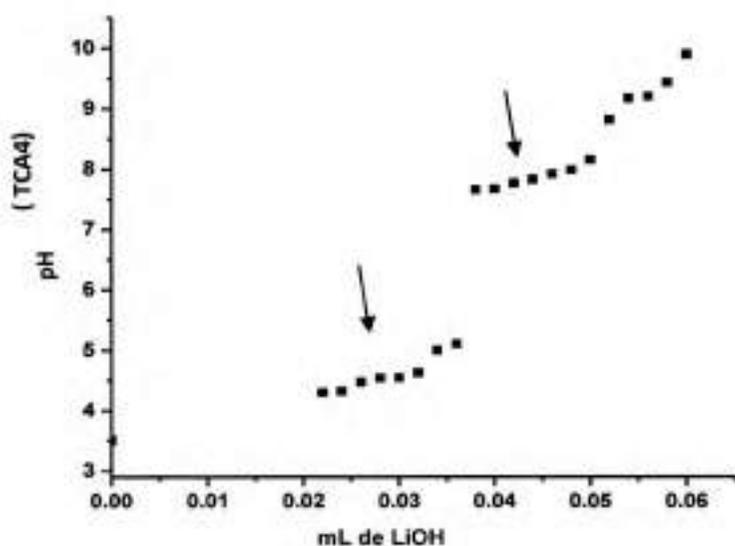


Figura 6. Titulación potenciométrica de TCA4 con LiOH, se observan dos pKa 4,3 y 7,7.

B) Efecto de Na⁺

En las Figuras 7, 8 y 9 se muestran las curvas de titulación correspondientes al efecto del Na⁺ sobre los macrociclos.

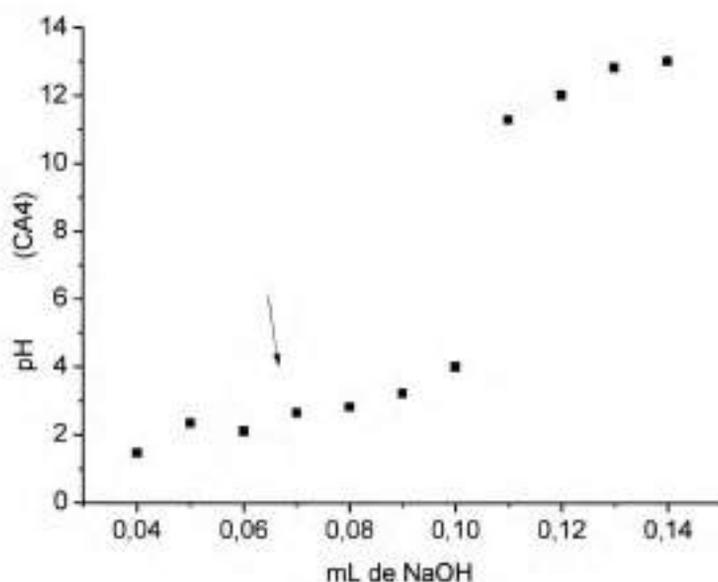


Figura 7. Titulación potenciométrica de CA4 con NaOH, pKa observado 2,4.

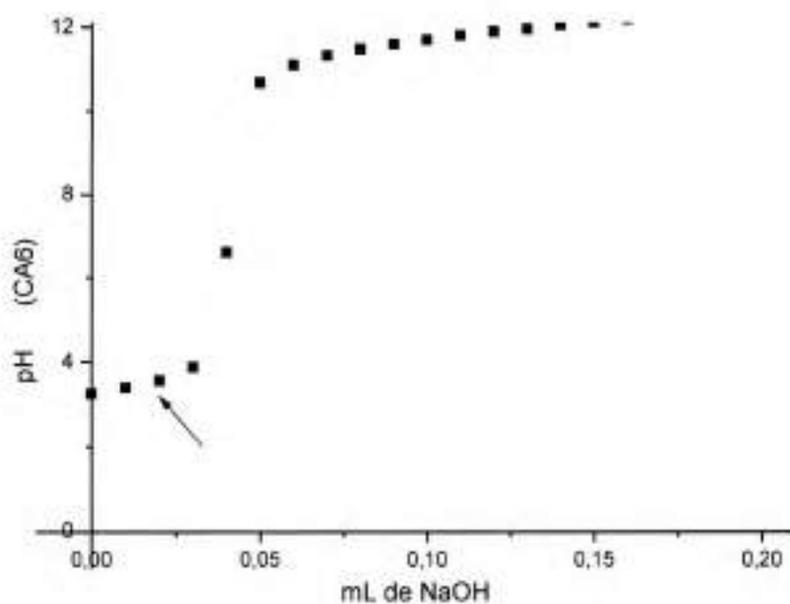


Figura 8. Titulación potenciométrica de CA6 con NaOH, pKa observado 3,1.

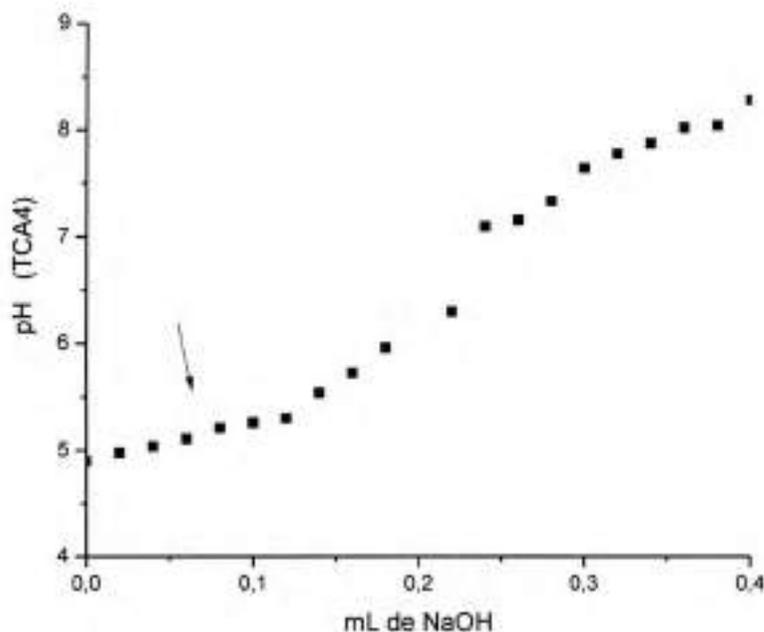


Figura 9. Titulación potenciométrica de TCA4 con NaOH, pKa observado 5,0.

C) Efecto de K^+

Las Figuras 10, 11 y 12 muestran las titulaciones con KOH para los macrociclos estudiados.

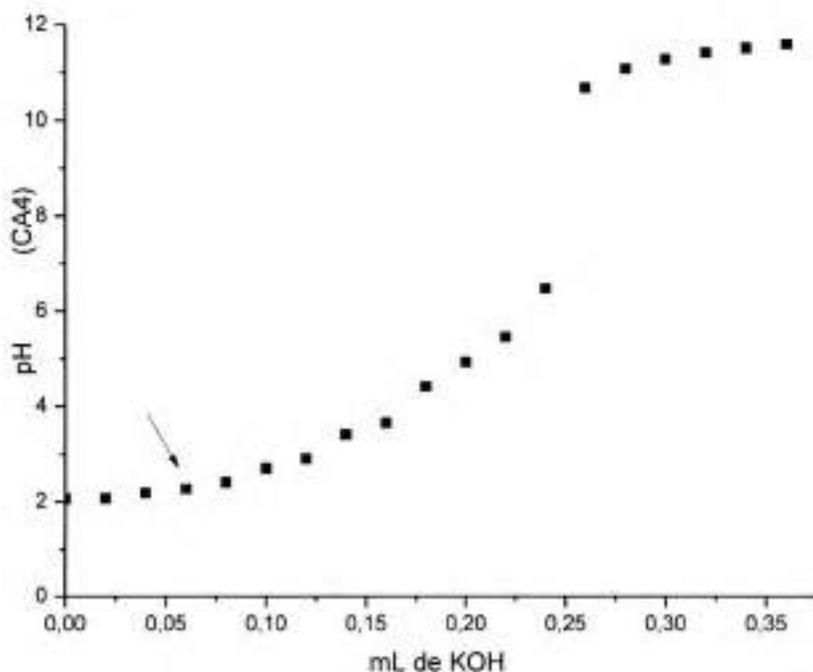


Figura 10. Titulación potenciométrica de CA4 con KOH, pKa observado 2,4.

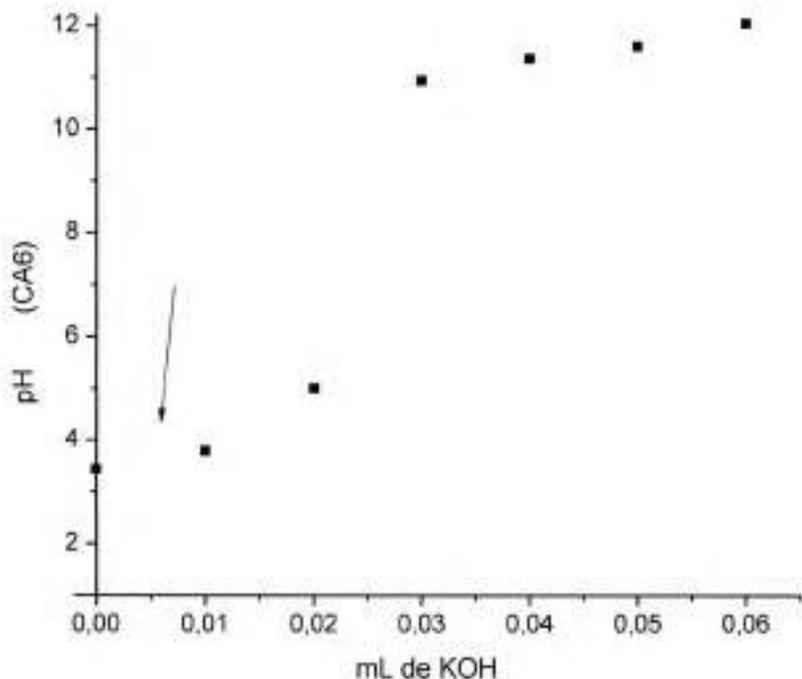


Figura 11. Titulación potenciométrica de CA6 con KOH, pKa observado 3,5.

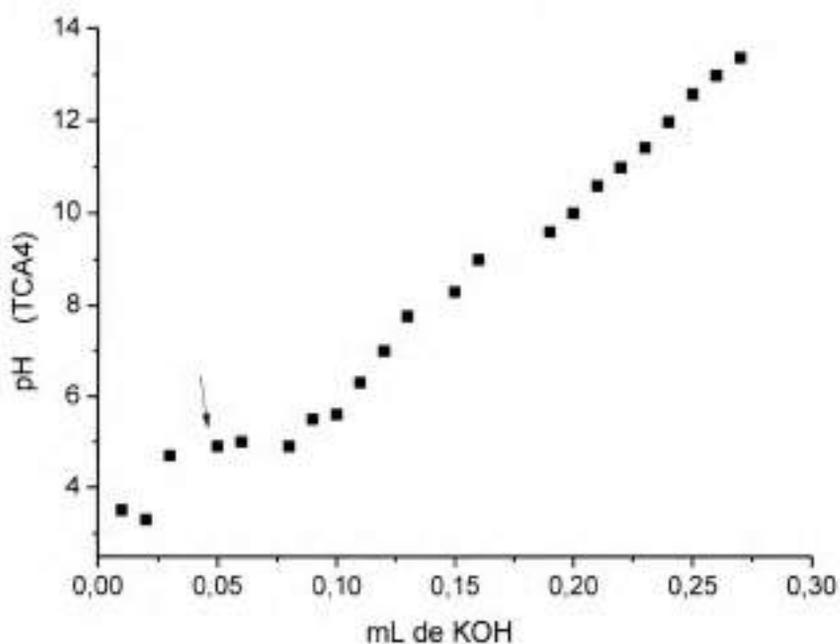


Figura 12. Titulación potenciométrica de TCA4 con KOH, pKa observado 5,3.

Debido a los pequeños volúmenes de las bases (LiOH, NaOH y KOH aproximadamente $3,0 \pm 0,1 \times 10^{-2}$ M) que producen el punto final, se hicieron

titulaciones con soluciones de hidróxidos más diluidas, pudiendo confirmar el valor de pKa obtenido.

De las determinaciones por titulaciones en 'reversa' usando HCl como titulante se obtuvieron valores de pKa diferentes a los determinados con los hidróxidos, lo que corrobora el efecto del contraión. Los valores están informados en la Tabla 2 (ver más adelante).

Titulación Espectrofotométrica

La experiencia se realizó midiendo la absorbancia UV-Visible de soluciones con la misma concentración del macrociclo y ajustando el pH a varios valores, en el intervalo de 2-13 de pH para cada una de las bases. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

La Ecuación 2 permite obtener los valores de pKa a partir de los cambios observados en la absorbancia.

$$A_{\text{pH}} = \frac{[A_{\text{menor}} + A_{\text{mayor}} \times 10^{(\text{pH} - \text{pKa})}]}{(10^{(\text{pH} - \text{pKa})} + 1)}$$

Ecuación 2. Dependencia de la absorbancia con el pH.

La Ecuación 2 tiene en cuenta el equilibrio entre la especie protonada y la especie deprotonada (Esquema 1) y la absorbancia correspondiente a cada una de ellas. El término A_{pH} corresponde a la absorbancia medida a cada uno de los valores de pH que componen el intervalo entre dos planicies A menor y A mayor, que son las absorbancias en los valores de pH extremos en el intervalo analizado asociados a una determinada especie ácida o básica.

Titulación con NaOH

Las Figuras 13, 14 y 15 corresponden a las titulaciones espectrofotométricas (A vs pH) para los macrociclos estudiados. Las curvas mostradas en estos gráficos corresponden a las longitudes de onda para las cuales los cambios en la absorbancia fueron más significativos. Por ejemplo en la Figura 14 se grafica la absorbancia a $\lambda = 294, 298$ y 321 nm en función del pH en el intervalo completo de pH estudiado para CA6. Este mismo procedimiento se llevó a cabo con TCA4 y CA4.

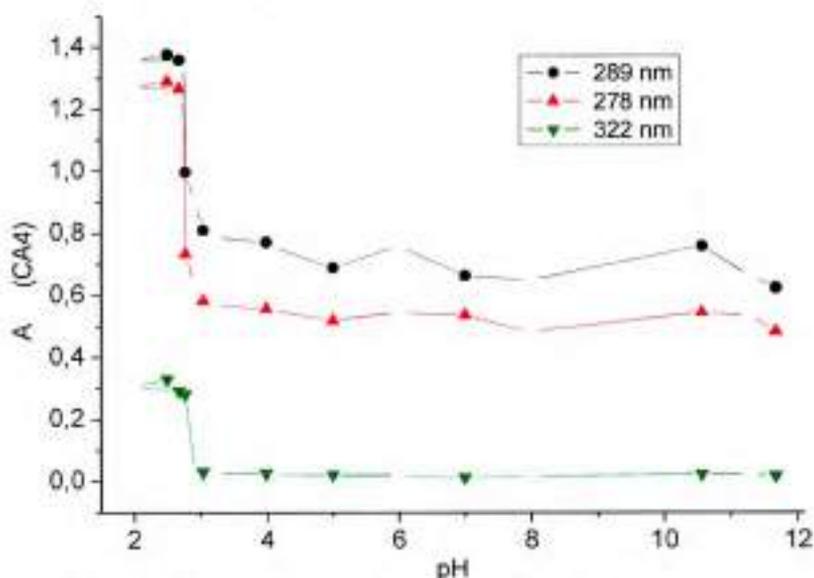


Figura 13. Variación de la absorbancia con el pH para CA4.

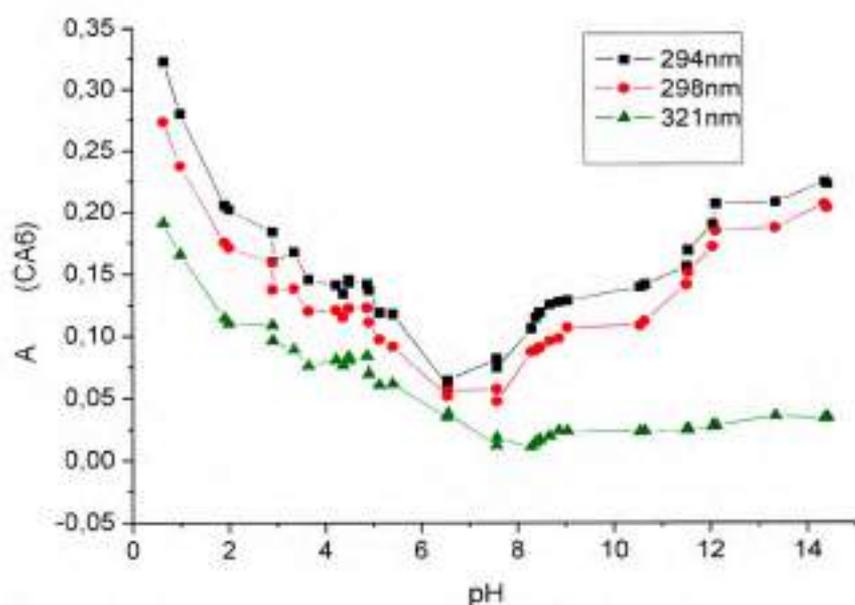


Figura 14. Variación de la absorbancia con el pH para CA6.

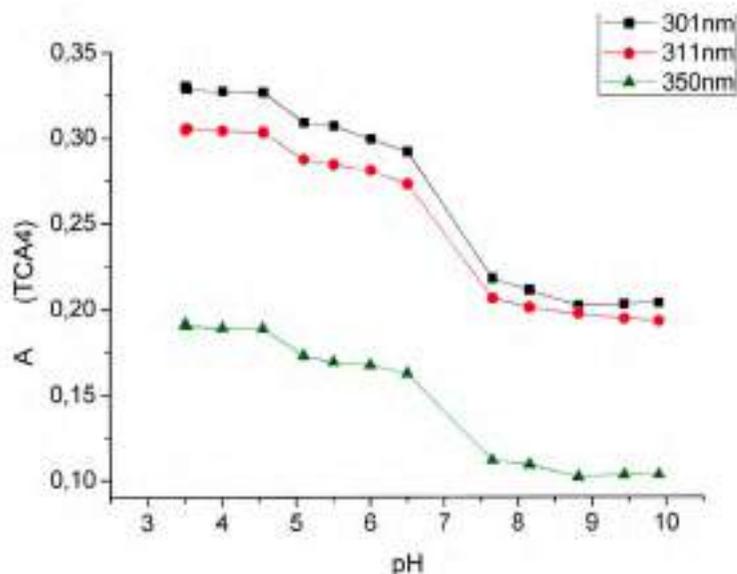


Figura 15. Variación de la absorbancia con el pH para TCA4.

Intervalos parciales de pH fueron explorados con soluciones de hidróxidos más diluidas con el objetivo de obtener mayor cantidad de puntos experimentales y por lo tanto mayor precisión en la determinación del pKa. A modo de ejemplo se muestra en la Figura 16 el intervalo de absorbancia en función del pH, desde 6 a 10, obteniendo las curvas sigmoideas que permiten la estimación del pKa en dicho intervalo de pH.

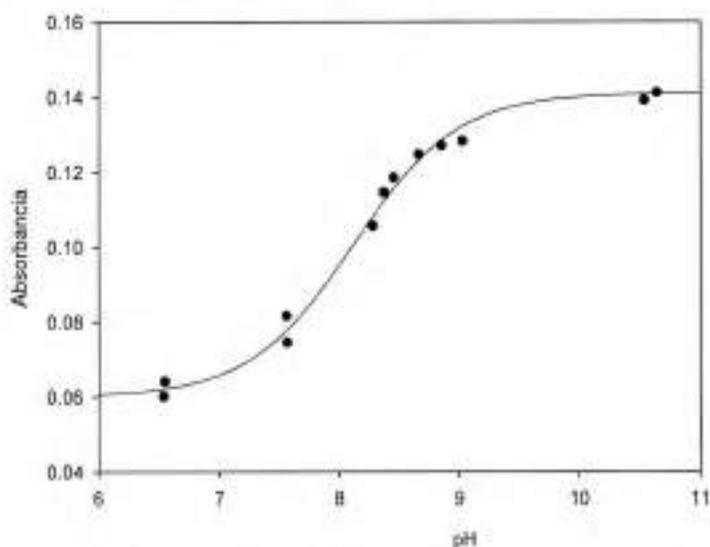


Figura 16. Curva de absorbancia en función del pH en presencia de Na^+ a 294 nm para el CA6. La curva de trazo continuo es generada por la Ecuación 2.

Análisis similares fueron realizados a cada una de las longitudes de onda elegidas en los intervalos de pH seleccionados.

Las experiencias con hidróxido de litio y potasio se realizaron y procesaron de manera similar a las realizadas con hidróxido de sodio para los tres macrocilos.

En la Tabla 2 se muestran los resultados observados para todos los macrocilos en presencia de cada catión metálico.

Tabla 2. Valores de pKa obtenidos por métodos espectrofotométricos (E) y potenciométricos (P) de los macrociclos estudiados a 25 °C.(a)

Ión	TCA4		CA6		CA4	
	E	P	E	P	E	P
Li+	pKa1 4,8 ± 0,5	pKa1 4,8 ± 0,2	pKa1 2,4 ± 0,5	pKa1 2,5 ± 0,8	pKa1 2,3 ± 0,8	pKa1 2,3 ± 0,1
	pKa2 7,6 ± 0,5	pKa2 7,4 ± 0,2		pKa2 7,6 ± 0,1	pKa2 4,1 ± 0,3	
			pKa3 12,18 ± 0,05			
Na+		pKa1 5,1 ± 0,05	pKa1 2,9 ± 0,5	pKa1 2,9 ± 0,1	pKa1 2,8 ± 0,3	pKa1 2,41 ± 0,01
	pKa2 7,35 ± 0,08		pKa2 8,35 ± 0,07	pKa2 8,3 ± 0,1		
			pKa3 11,8 ± 0,1			
K+		pKa1 5,9 ± 0,2	pKa1 2,8 ± 0,2	pKa1 3,49 ± 0,06	pKa1 2,5 ± 0,3	pKa1 2,56 ± 0,08
	pKa2 8,4 ± 0,5		pKa2 7,51 ± 0,01	pKa2 7,6 ± 0,2	pKa2 5,8 ± 0,2	
			pKa3 12,37 ± 0,04			

(a) Los valores corresponden a los promedios a distintas longitudes de onda de experiencias realizadas por triplicado.

Se listan a continuación los pKa observados por titulación reversa.

p-tert-butilcalix[6]areno (CA₆) pKa = 4,9 ± 0,2

p-tert-butiltiacalix[4]areno (TC₄) pKa = 4,2 ± 0,6

p-tert-butilcalix[4]areno (CA₄) pKa = 3,9 ± 0,3

5. Discusión

Estudios cristalográficos de calix[4]arenos y tiacalix[4]arenos que coinciden con los resultados obtenidos mediante análisis por modelado computacional muestran que la estructura más estable que adoptan estas moléculas es la conformación de cono.

Las diferentes conformaciones generan un efecto sobre las interacciones que se pueden llevar a cabo por ejemplo entre los hidroxilos fenólicos. En una conformación de cono la principal interacción es por puentes de hidrógeno intramoleculares [1].

En principio no existe una correlación directa entre los valores de pKa determinados y los tamaños de los cationes alcalinos. La interacción que se estaría dando con cada uno de los cationes sería *endo* para Li⁺ y Na⁺, que por ser muy poco polarizables y fuertemente electropositivos tienen la característica de ser más "ácido" duro que K⁺ [12]. Por lo tanto Li⁺ y Na⁺ interactuarían por la abertura de los hidroxilos fenólicos, en tanto que el K⁺ por ser más polarizable con un carácter de "ácido" más blando interactuaría por la abertura de mayor tamaño o de forma *exo*. En el caso del Na⁺, si bien también se comporta como ácido duro, la dureza es menor debido a que tienen radio iónico mayor respecto al Li⁺ haciéndolo más polarizable.

Por otro lado, la unión iónica entre el hidroxilo de la base y el catión del metal alcalino es más fuerte en el medio de trabajo (etanol: agua 3:1) que en agua. Los valores de pKa determinados reflejan la estabilización de los complejos que forman los macrociclos deprotonados con los cationes alcalinos

estudiados. Esto se ve reflejado en los valores pK_{a1} para TCA4 y CA6 que son más bajos en presencia de Li^+ y Na^+ que con K^+ .

Este comportamiento se observa para la serie alcalina en presencia de TCA4 y CA6 pero no para el CA4. Para este último macrociclo el efecto de las diferentes formas de interacción se refleja en el valor pK_{a2} determinado espectrofotométricamente según se detalla en la Tabla 2. La interacción con K^+ en la primera deprotonación estabiliza el aducto formado produciendo que la segunda constante de disociación se produzca a un valor de pH más elevado.

6. Conclusiones

En esta parte de la tesis se determinó que los valores de pK_a de los macrociclos están afectados por la interacción con Li^+ , Na^+ y K^+ . Los valores de pK_a no evidencian una tendencia directa de interacción considerando el tamaño del catión metálico en la serie Li^+ , Na^+ y K^+ .

Los valores de pK_{a1} y pK_{a2} en presencia de Li^+ y Na^+ son menores a los observados en presencia de K^+ , indicando una mejor interacción de los iones más pequeños con la cavidad del TCA4.

El valor de pK_{a2} en presencia de Li^+ es menor que en presencia de K^+ indicando una mayor interacción entre el K^+ y el CA4 deprotonado, en tanto que para el pK_{a1} no muestran un efecto debido al catión.

El valor de pK_{a2} para CA6 en presencia de K^+ es menor que en presencia de Na^+ y el pK_{a3} en presencia de K^+ es mayor que en presencia de Na^+ indicando la mayor estabilidad del CA6 doblemente deprotonado con K^+ .

La fuerza impulsora para la formación de los complejos de los macrociclos con Li^+ y Na^+ es de naturaleza diferente a la que tiene lugar en la formación del complejo macrociclo con K^+ , dado que se complejaría por caras opuestas.

7. Bibliografía

- [1] C. D. Gutsche, B. Dhawan, and H. Kwang, "Properties of the Calixarenes from p-tert-Butylphenol," *J. Am. Chem. Soc.*, no. 8, pp. 3782–3792, 1981.
- [2] C. D. Gutsche, "*Calixarenes: An Introduction*," Segunda Ed. Cambridge: Publishing, RCS, 2008.
- [3] C. D. Gutsche and I. Alam, "Calixarenes. 23. the complexation and catalytic properties of water soluble calixarenes," *Tetrahedron*, vol. 44, no. 15, pp. 4689–4694, 1988.
- [4] H. J. Schneider, D. Guettes, and U. Schneider, "Host-guest complexes with water-soluble macrocyclic polyphenolates including induced fit and simple elements of a proton pump," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, pp. 6449–6454, 1988.
- [5] B. Tremillón, "*La química de los disolventes no acuosos*." Barcelona: Bella Terra Ediciones SA, 1973.
- [6] N. Gündüz, T. Gündüz, and M. Hayvali, "Titrations in non-aqueous media: potentiometric investigation of symmetrical and unsymmetrical tetra-aryl porphyrins with 4-nitrophenyl and 4-aminophenyl substituents in nitrobenzene solvent.," *Talanta*, vol. 48, no. 1, pp. 71–9, 1999.
- [7] M. Bos and W. E. Van Der Linden, "A knowledge based advisory system for acid/base titrations in non-aqueous solvents," *Anal. Chim. Acta*, vol. 332, pp. 201–211, 1996.
- [8] K. Suga, T. Ohzono, M. Negishi, K. Deuchi, and Y. Morita, "Effect of various cations on the acidity of p-sulfonatocalixarenes," *Supramol. Sci.*, vol. 5, pp. 9–14, 1998.
- [9] M. Faraji, A. Farajtabar, and F. Gharib, "Ionic strength effect on deprotonation of para-sulfonatocalix[4]arene," *J. Serbian Chem. Soc.*, vol. 78, no. 5, pp. 681–688, 2013.
- [10] C. R. N. Strauts, J. H. Gilfillan, H. N. Wilson. "*Analytical Chemistry—The Working Tools*." London: Press, Oxford University, 1958, p. 228.
- [11] I. D. Cunningham and M. Woolfall, "Deprotonation of calixarenes in acetonitrile.," *J. Org. Chem.*, vol. 70, no. 23, pp. 9248–56, 2005.

- [12] E. L. C. Pearson, S. U. Relaci, and C. O. N. L. O. S. I. D. E. Corrosi, "El Concepto de Pearson y su relacion con los inhibidores de corrosion.," *Rev. Quim.*, vol. XI, pp. 7-20, 2000.

Capítulo V

ESTUDIO DE INTERACCIONES SUPRAMOLECULARES



1. Introducción

Muchos compuestos al asociarse con otra molécula presentan variaciones en sus propiedades físicas y en la reactividad como por ejemplo en la asociación de huésped-receptor que genera una entidad supramolecular. La técnica analítica con la que se observan estas variaciones depende de la característica afectada del compuesto o del receptor por efecto de la formación del complejo.

Los espectros de absorción y emisión de una molécula proveen información importante respecto a la estructura, energética y dinámica de los estados electrónicamente excitados [1]. La excitación de una molécula no produce automáticamente la fluorescencia; de hecho, algunos compuestos exhiben una fluorescencia muy débil. Para extender la aplicación de la fluorimetría a aquellos compuestos cuya fluorescencia nativa no es intensa, se han utilizado, generalmente, diversas reacciones químicas para convertir una molécula no fluorescente en un derivado que sí lo sea [2].

La complejación de un compuesto luminóforo con un macrociclo puede inducir cambios en diferentes propiedades fotofísicas y fotoquímicas de este sustrato, como desplazamiento de las longitudes de onda de los máximos de emisión de fluorescencia, fotoestabilización, variación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia y de los tiempos de vida media de emisión, etc. [3].

Como se mencionó en el Capítulo II en este trabajo de tesis la selección de sustratos se realizó en base al interés biológico, farmacéutico y ambiental de encontrar métodos que permitan detectar y/o cuantificar determinadas sustancias.

A continuación se desarrollarán las experiencias realizadas con calixarenos (TCA4 y CA4) como receptores y ácido cafeico (AC) y paraquat (PQ) como sustratos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Observar el efecto de la presencia del macrociclo o del sustrato sobre las propiedades espectroscópicas del otro componente del sistema.

2.2. Objetivos específicos

- Observar por espectroscopia UV-Visible y de fluorescencia el efecto de la presencia de TCA4 en las señales de AC y PQ y/o viceversa.
- Observar el efecto de la presencia de CA4 en las señales de absorción UV-Visible y de emisión de fluorescencia AC y PQ y/o viceversa.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

Reactivos

- NaOH (J.T. Baker)
- KOH (Merck)
- LiOH (Taurus)
- Biftalato de potasio (Anedra)
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Agua MQ
- Cloroformo (Cicarelli)
- Diclorometano (Sintorgan)
- Etanol grado HPLC (Sintorgan)
- HCl 36,5-38% (Cicarelli y Anedra)
- *p*-tert-butiltiacalix[4]areno (sintetizado)
- *p*-tert-butilcalix[4]areno (Aldrich Chemical Company, Inc)

Instrumental

- Baño termostático (Haake y Thermo Orion)
- Electrodo de vidrio, calomel saturado (Orion ROSS)
- pH-metro (ORION Modelo 720A y 520 A)
- Espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu)
- Espectrofluorímetro PerkinElmer modelo LS55

3.2. Métodos y procedimiento

La homogenización de las soluciones se realizó con un sonicador Testlab tb 02. La temperatura de las soluciones y del compartimiento de la celda se controló usando baños termostáticos con circulación Haake.

Las mediciones de pH se realizaron con un pHmetro Orion 720A equipado con electrodo combinado Orion sistema Ross. Este equipo se calibró a 25,0 °C usando soluciones estándares amortiguadoras de pH = 4,008, pH = 6,994, pH = 9,156 y pH = 12,25 preparadas según la metodología descrita en la literatura [4].

Debido a las características físico-químicas de los receptores, principalmente a su baja solubilidad en agua, las mejores condiciones para trabajar con estos compuestos fueron en un medio etanol-agua 3:1 como se detalla en el Capítulo IV. Debido a la baja solubilidad del AC en agua, este medio también resultó óptimo para variar las concentraciones en un rango amplio [0 – 100 μ M] respecto al receptor. Se fijaron tres condiciones de pH ya que tanto los receptores como el AC presentan comportamiento ácido-base.

Los datos se analizaron con los siguientes programas: Sigma Plot versión 8.0 y OriginPro 8.

Las soluciones concentradas de TCA4 y CA4 se prepararon solubilizando 10,0 mg de cada macrociclo en cloroformo y diclorometano respectivamente

(volumen final = 5,0 mL). Las soluciones concentradas de AC y PQ se prepararon solubilizando 10,0 mg de uno de los sustratos en etanol y agua respectivamente (volumen final = 5,0 mL). Estas soluciones se conservaron a 4,0 °C y la estabilidad de las mismas se controló periódicamente mediante espectroscopia UV-Visible. Las soluciones se envolvieron con papel aluminio y no se desgasificaron.

Las soluciones reguladoras de pH = 1,000 ([HCl] = 0,1 M y [NaCl] = 0,024 M); pH=4,008 ([KPO₄H₂] = 0,02 M; [Na₂PO₄H] = 0,03 M y [NaCl] = 0,02 M) de pH = 6,994 ([NaPO₄H₂] = 0,02 M; [NaPO₄H] = 0,03 M y [NaCl] = 0,02 M), pH= 9,156 ([Na₂B₄O₇ · 10H₂O] = 0,01 M; [NaCl] = 0,02 M) y pH= 12,25 ([Ca(OH)₂ = 0,01727) M y [NaCl] = 0,01819 M) se prepararon según el procedimiento descrito en la literatura [4], empleando reactivos de grado analítico. Todos los valores de pH en los que se trabajó, pH= 2, 6 y 11, se determinaron experimentalmente empleándose para su ajuste soluciones acuosas de HCl 1,0 M y NaOH 1,0 M.

Debido al efecto observado del catión metálico de la base utilizada en la deprotonación que se detalla en el Capítulo IV, se decidió emplear NaOH. Primeramente todas las soluciones fueron acidificadas a pH = 2 con HCl y posteriormente se ajustó al valor de pH a estudiar con NaOH.

UV-Visible

Los espectros de absorción se determinaron entre 200 nm y 500 nm usando cubetas de cuarzo de 1 cm o 4 cm de paso óptico, volumen reducido y caras oscuras. Los experimentos se realizaron a (25,0 ± 0,1) °C.

Las curvas de calibración de los sustratos se determinaron para establecer los coeficientes de absorptividad molar a 25,0 °C. Las soluciones de AC se prepararon variando las concentraciones de este sustrato (entre 6,20 × 10⁻⁷ M y 1,00 × 10⁻⁵ M en etanol-agua 3:1 v/v) a partir de la disolución de las

correspondientes soluciones concentradas. Las soluciones de PQ se prepararon variando las concentraciones de este sustrato (entre $5,00 \times 10^{-7}$ M y $1,50 \times 10^{-5}$ M en etanol-agua 3:1 v/v) a partir de la disolución de las correspondientes soluciones concentradas.

Fluorescencia

Las mediciones de fluorescencia se realizaron usando cubetas de cuarzo de (1,0 x 1,0) cm. En todos los casos, se registraron las áreas totales de los espectros de emisión de fluorescencia. Los valores de parámetros instrumentales fijados para determinar los espectros de emisión de fluorescencia del AC fueron: ancho de rendijas de excitación y de emisión de 10 nm, voltaje del fotomultiplicador = 800 y velocidad de barrido 500 nm/min; para el PQ fueron: ancho de rendijas de excitación y de emisión de 10 nm, voltaje del fotomultiplicador = 900 y velocidad de barrido 500 nm/min.

4. Resultados y conclusión

Todos los análisis por UV-Visible y por fluorescencia fueron realizados descontando previamente la señal correspondiente al blanco.

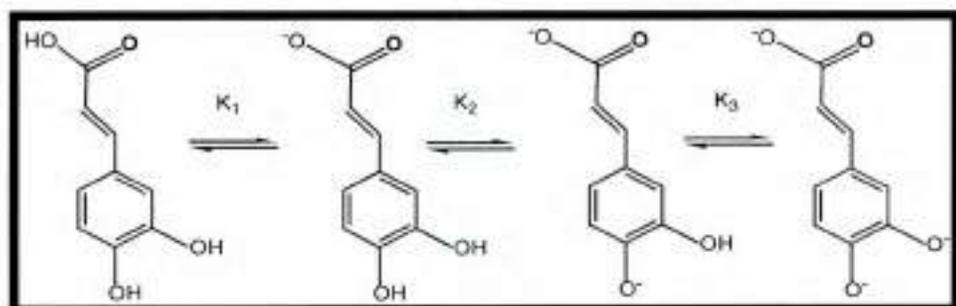
4.1. Efecto del pH y los receptores sobre el AC

Efecto del pH

El estudio espectroscópico se realizó por UV-Visible y fluorescencia. Cada uno de los experimentos se llevó a cabo preparando soluciones en las que se mantuvo constante la concentración del receptor (TCA4 o CA4) y el pH (2, 6 u 11).

El AC al ser un ácido poliprótico presenta un espectro de absorción UV-Visible que varía con el pH como se muestra a continuación (Figura 1).

Como se observa en la Figura 1, debido a la variación de las señales de absorbancia del AC según el pH se debió elegir un valor para llevar a cabo el análisis de la interacción para fijar la especie del AC con la que se está trabajando (Esquema 1).



Esquema 1. Equilibrio ácido-base del AC.

Se caracterizó al AC en el medio elegido (etanol-agua 3:1 v/v). En la Tabla 1 se detallan los valores de las constantes de disociación ácido-básicas determinadas en (etanol-agua 3:1 v/v) espectroscópicamente como se describe en el Capítulo IV para los macrociclos. Existen en literatura valores determinados de pKa en mezclas acetonitrilo-agua 30% v/v [5] (pKa1 y pKa2 5,16 y 9,25 respectivamente) y metanol-agua 20% [6] (pKa1 y pKa2 4,86 y 8,87 respectivamente).

Medio	pKa Espectrofotométrico	
EtOH:H ₂ O 3:1	pKa ₁	5,5 ± 0,2
	pKa ₂	8,7 ± 0,1

Tabla 1. pKa observados para el AC en etanol-agua 3:1 v/v a 25,0 °C.

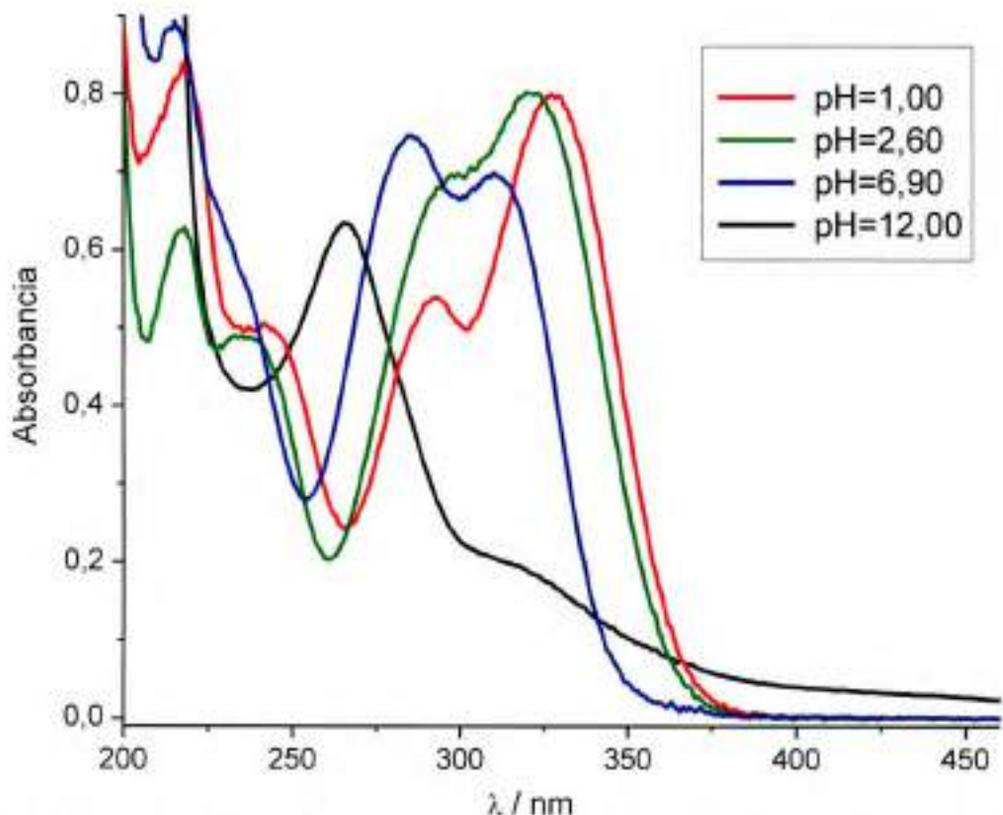


Figura 1. Espectro UV-Visible de AC (8,0 μM) a distintos pH en etanol-agua 3:1 v/v, b= 1 cm y 25,0 $^{\circ}\text{C}$.

La polaridad es la principal propiedad del solvente que interviene en los equilibrios ácido-base que se llevan a cabo en el medio [7], el ordenamiento de las moléculas de agua, especie con mayor capacidad 'donora' de puentes de hidrógeno hace que la especie que pierde el H^+ se estabilice por las interacciones puente de hidrógeno, esta estabilidad es proporcionada en menor medida por los solventes orgánicos [8] donde las propiedades que prevalecen en el proceso son la electronegatividad y polarizabilidad de las especies presentes. Si bien el AC presenta baja solubilidad en agua como se informa en el Capítulo II, en solución acuosa $\text{pK}_{\text{a}1} = (4,46 \pm 0,05)$ [9]. Al observar los valores de los $\text{pK}_{\text{a}1}$ en ambos medios se puede concluir que en agua la primera deprotonación se lleva a cabo más fácilmente que en etanol-agua 3:1 v/v/v esto se condice con el efecto que tiene el solvente en estos procesos [8].

Los coeficientes de absorptividad molar se determinaron experimentalmente basándose en la Ley de Lambert y Beer siguiendo la metodología descrita en el Capítulo IV. Los gráficos de absorbancia en función de la concentración de los sustratos mostraron comportamiento lineal con coeficientes de correlación del orden de 0,99987. En la Tabla 2 se especifican las constantes de absorptividad molar en los máximos observados ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$) en las curvas espectrales junto con otros valores determinados a longitudes de onda donde los receptores no absorben ($> 350 \text{ nm}$) con el objetivo de poder analizar sólo al sustrato durante el experimento.

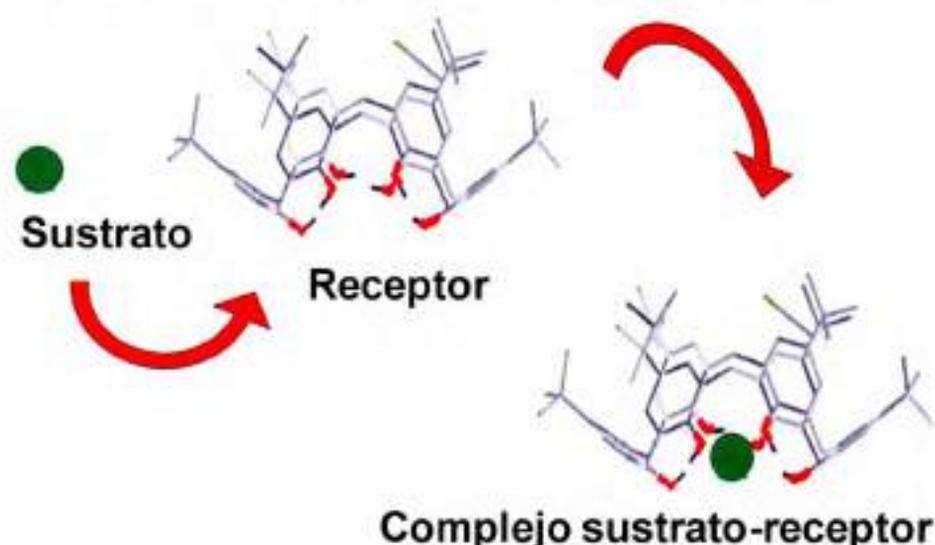
Siendo el AC una especie con comportamiento poliprótico y los receptores también, las especies que se encuentran en equilibrio dependerán del valor de pH. Se fijó $\text{pH} = 6$ para realizar los controles de las concentraciones de las soluciones madres de los compuestos con los que se iba a trabajar. Los correspondientes valores para los receptores se detallaron en el Capítulo IV (TCA4 $\epsilon_{301 \text{ nm}} (32 \pm 2) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y CA4 $\epsilon_{290 \text{ nm}} (3,7 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} \text{ nm}$	$\epsilon, 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
301	$22,5 \pm 0,5$
325	$28,0 \pm 0,7$
340	$21,4 \pm 0,6$
350	$12,5 \pm 0,5$
370	$2,0 \pm 0,2$
375	$0,08 \pm 0,03$

Tabla 2. Longitudes de onda y los respectivos coeficientes de absorptividad molar para el AC en etanol-agua 3:1 v/v, $\text{pH} = 6$ y $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Efecto de la presencia de los receptores sobre la señal espectroscópica del sustrato

Los procesos y/o interacciones en los que se enfocó el estudio se resumen en el Esquema 2, las interacciones que se pueden llevar a cabo dependen del estado electrónico en que se encuentran las especies.



Esquema 2. Posible orientación del sustrato por la abertura endo en el complejo. Otra orientación posible es por la abertura exo.

AC y TCA4 a pH = 2

El TCA4 (Figura 2b) se encuentra sin carga alguna ya que la primera deprotonación de los hidroxilos comienza a pH superiores a $\text{pH} = 4$ ($\text{pK}_{a1} = 4,2 \pm 0,6$) y el AC (Figura 2a) como se mencionó anteriormente se encuentra totalmente protonado (pK_{a1} , Tabla 1).

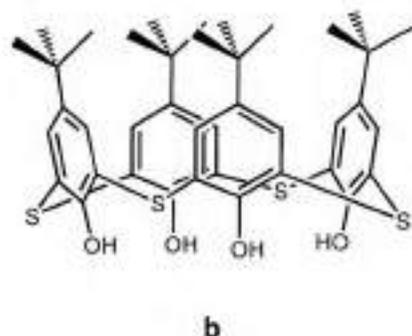
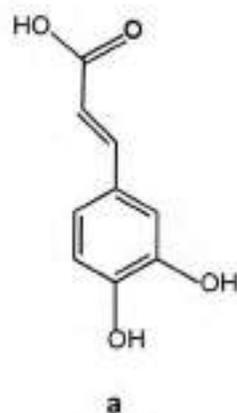


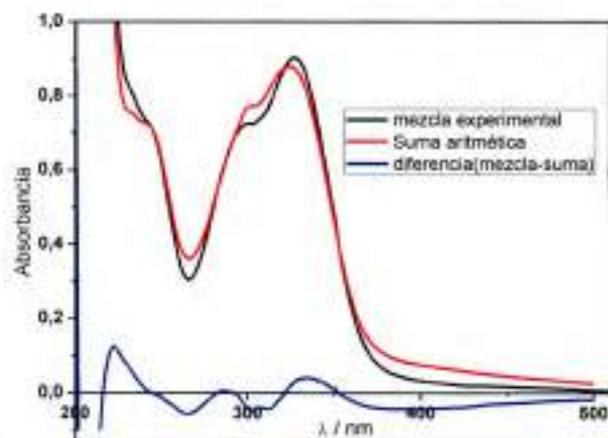
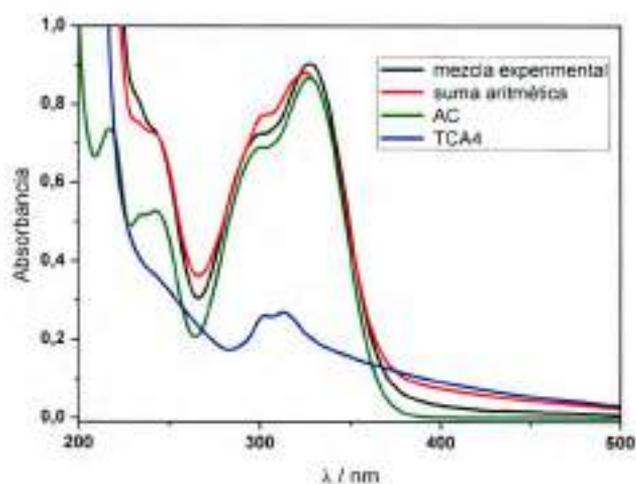
Figura 2. Especie ácido-base de a) AC y b) TCA4 a pH=2.

Tanto en las experiencias por UV-Visible como por fluorescencia no se observaron cambios que indicaran algún tipo de interacción. A continuación, en las Figuras 3a y 3b se muestran las señales obtenidas en ambas técnicas respectivamente. En los espectros UV-Visible (Figura 3a) se observa que la intensidad a la longitud de onda de máxima absorción aumenta ligeramente en la señal de la mezcla respecto a la señal que se obtiene al sumar los espectros generados por los compuestos individuales en iguales condiciones de concentración y pH ($\Delta \text{Abs} = 0,022$) este cambio corresponde al 3 % en la señal por lo que se considera que se encuentra dentro del error de las medida del equipo. Sin embargo, si se comparan las longitudes de onda de los máximos para los mismos espectros se tiene un corrimiento en $\lambda^{\text{abs}}_{\text{máx.}} = 4 \text{ nm}$ (328 a 324 nm), como así también algunos otros cruces a otras λ . La no aditividad de la ley de Lambert y Beer puede indicar algún tipo de interacción pero de escasa magnitud, por lo que no es posible la aplicación de un tratamiento matemático.

Por otro lado, teniendo en cuenta el análisis de las señales de las experiencias realizadas por fluorescencia y debido a la superposición de las bandas de absorción de ambos compuestos (Figura 3 a) se excitó al receptor a $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$. Se observó una variación en la intensidad o forma de los espectros en no más de un 15 % al comparar las áreas totales de las mezclas respecto al

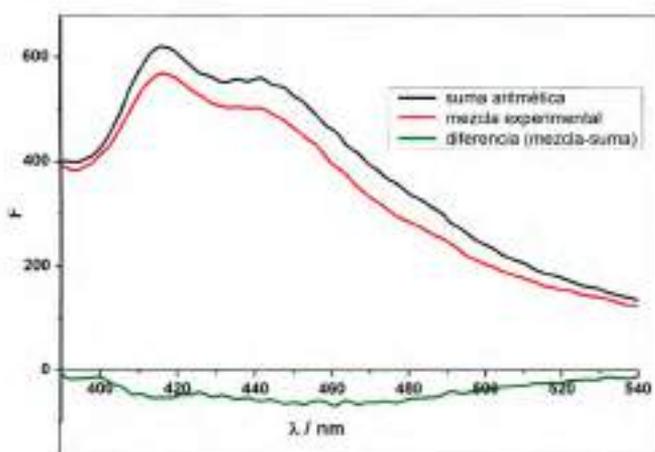
área que se obtiene de la suma de las áreas totales generadas por los compuestos individuales en iguales condiciones de concentración y pH, diferencia escasamente distinguible del error experimental.

a)



b)

1



2

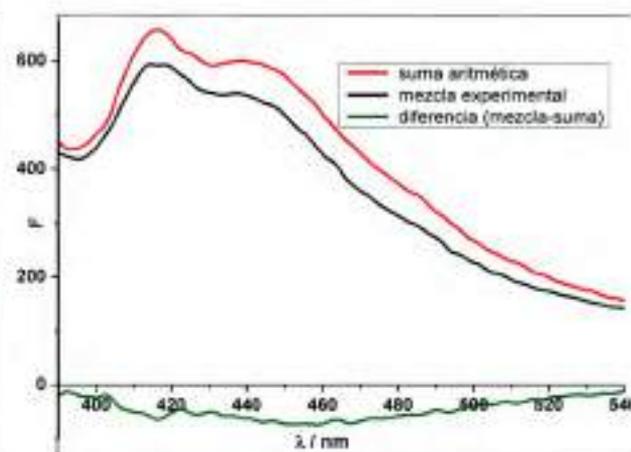


Figura 3. a) Espectro de absorbancia $[AC] = 30 \mu M$ y $[TCA4] = 2,4 \mu M$, $b = 4 \text{ cm}$ y b1) espectro de fluorescencia $[AC] = 1 \mu M$ y $[TCA4] = 0,47 \mu M$ y b2) $[AC] = 1,4 \mu M$ y $[TCA4] = 0,47 \mu M$.

AC y CA4 a pH = 2

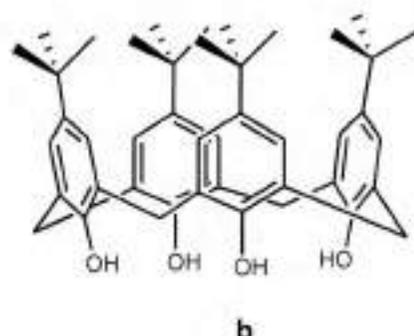
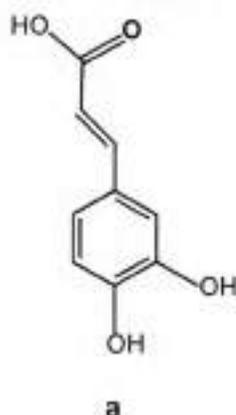
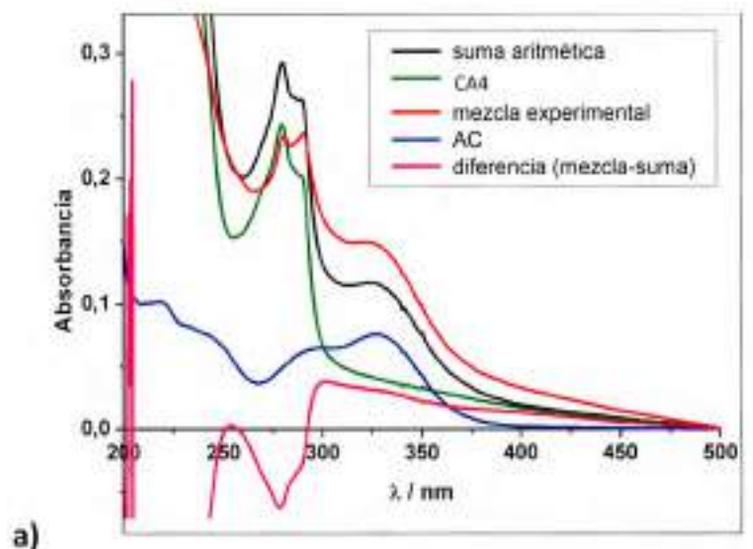


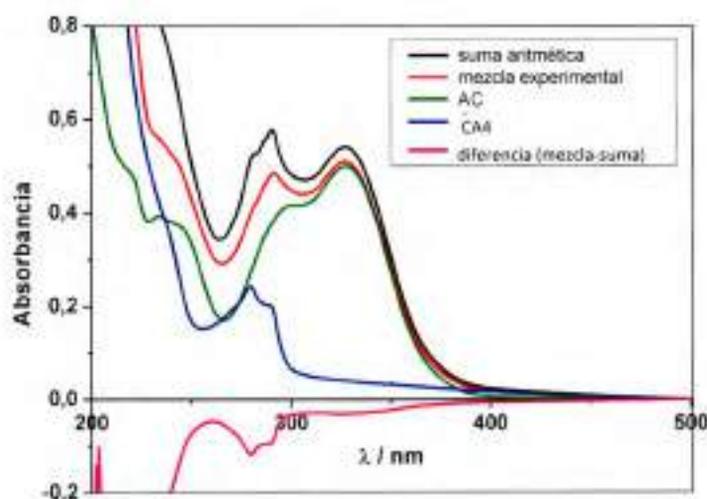
Figura 4. Especie ácido base de a) AC y b) CA4 a pH=2.

El CA4 se haya electrónicamente neutro (Figura 4b) y no cuenta con efecto donador de electrones que posee el homólogo TCA4 por los puentes de sulfuro. Los cambios que se observaron en los espectros UV-Visibles (Figura 5) indicaría que se está llevando a cabo algún tipo de interacción supramolecular ya que se obtiene $\Delta Abs = 0,052$ para una relación de concentración sustrato-receptor 1 a 1 (Figura 5a) en tanto que para una relación de concentración 10 a 1 (Figura 5b) la variación observada es $\Delta Abs = 0,125$, ambas variaciones corresponden a disminuciones de A de la mezcla experimental del orden del 20 % con respecto a la sumatoria de espectros a 275 nm.

En estas condiciones el cambio espectral que se observa es una variación de la intensidad de la absorción en los máximos correspondientes al AC como así también un cambio en la forma del espectro de absorción, lo que estaría indicando que se está llevando a cabo algún tipo de interacción probablemente puente de hidrógeno. Por otro lado las señales de emisión fluorescente, excitando al CA4 a $\lambda_{ex} = 375$ nm, no presentan variaciones relevantes para las dos relaciones de concentración estudiadas (1 a 1 y 10 a 1 de AC a CA4, respectivamente). Estas observaciones indican que la baja luminiscencia de los calixarenos no se ve afectada por la interacción con el sustrato [10] [11] [12].



a)



b)

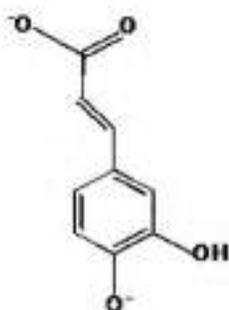
Figura 5. Espectros UV-Visible a) $[AC] = [CA4] = 2 \mu M$, b) $[AC] = 18 \mu M$ y $[CA4] = 2 \mu M$.

En estas condiciones de pH se han estudiados sistemas similares con tialixarenos funcionalizados con grupos aptos para interacciones π - π stacking o grupos que incrementen la habilidad de reconocimiento por la especie del sustratos que se haya en el medio [11][13] [14] [15] obteniendo variaciones en la señal que permiten realizar el tratamiento adecuado para dilucidar las

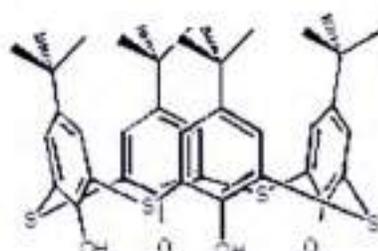
constantes de interacción correspondientes aplicando las ecuaciones adecuadas [16].

AC y TCA4 a pH = 11

A pH 11 el AC (Figura 6a) ha perdido dos protones (Tabla 1) y el TCA4 (Figura 6 b) también presenta dos carga negativas (Capítulo IV, Tabla 1 ($pK_{a2} = 7,35 \pm 0,08$)).



a



b

Figura 6. Especie ácido base de a) AC y b) TCA4 a pH=11.

En estas condiciones de pH por espectroscopia UV-Visible (Figura 7a y 7b) tanto en relaciones similares (1 a 1) y en predominio de AC (10 a 1), no se observaron variaciones en las señales que indiquen algún tipo de interacción.

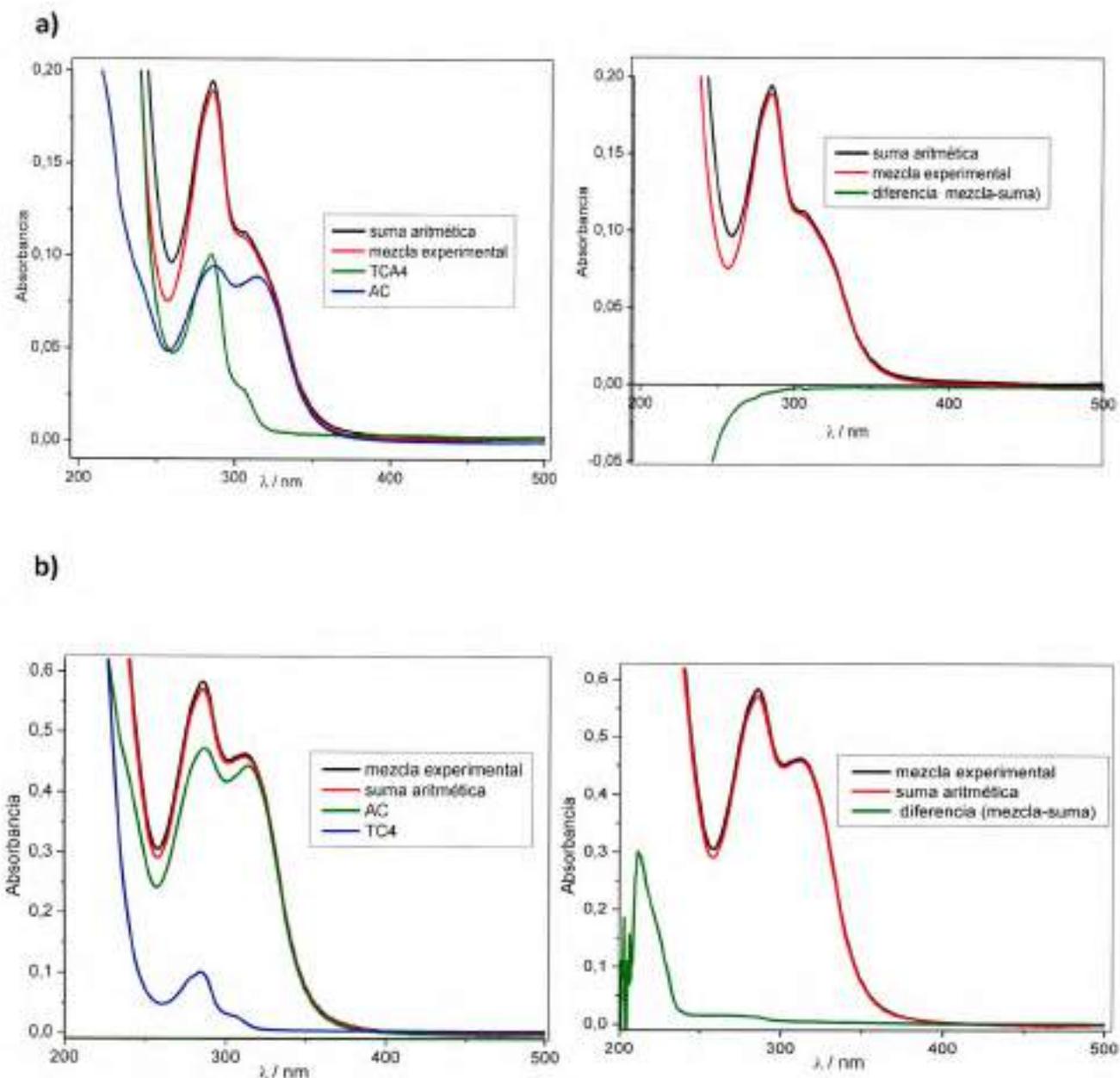
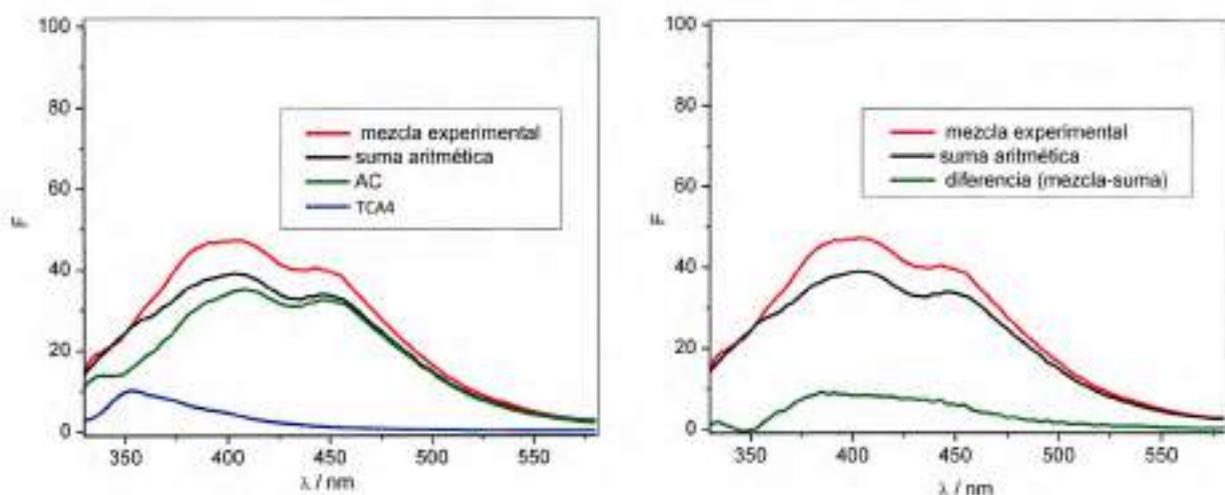


Figura 7. Espectros UV-Visible a) [AC] = 0,6 μM [TCA4] = 0,5 μM y b) [AC] = 61 μM [TCA4] = 6,7 μM.

Por otro lado el análisis de las señales de fluorescencia (Figura 8 a y b) se realizó a λ_{ex} 310 nm para excitar sólo al AC; en las condiciones de concentración equimolares (Figura 8 a) se observa un aumento del 18 % del área total; en tanto que para la relación de concentraciones 10 a 1 de AC:TCA4 se observó una disminución del 30 % de la emisión y un perfil de la señal diferente lo que

indica que además de interacciones supramoleculares se estaría generando otra especie.

a)



b)

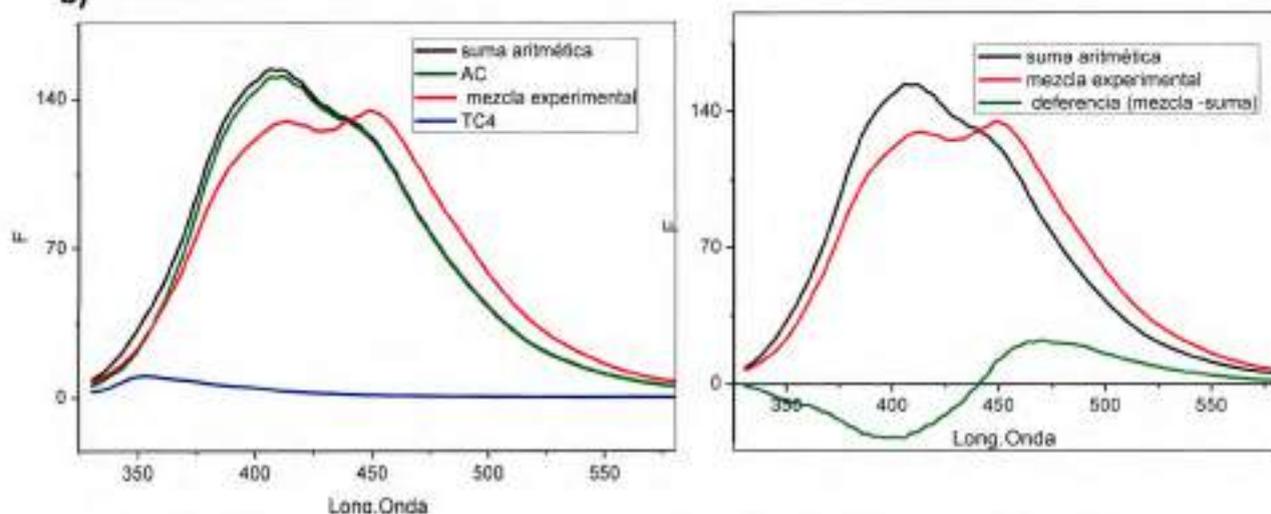


Figura 8. Espectro de emisión de Fluorescencia a) $[AC] = 0,6 \mu M$ $[TCA4] = 0,5 \mu M$ y b) $[AC] = 1 \mu M$ y $[CA4] = 0,15 \mu M$.

Esto se puede explicar si consideramos que a $pH = 11$ el receptor con carga neta negativa -2 compromete a los restantes hidrógenos de los hidroxilos fenólicos a formar puentes de hidrógeno dejando a la región 'endo' con muy

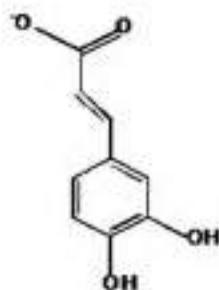
baja posibilidad de llevara a cabo algún tipo de interacción con compuestos cargados negativamente como es el caso del AC. Por lo tanto sería posible que la interacción se diera por la región 'exo' por interacciones $\pi-\pi$ o de van der Waals como CH- π . En estas condiciones el solvente cumple un rol prioritario y se ubica en torno a los compuestos con los dipolos del agua y en menor medida el del etanol direccionados para estabilizar sus cargas [17][18].

AC y CA4 a pH = 11

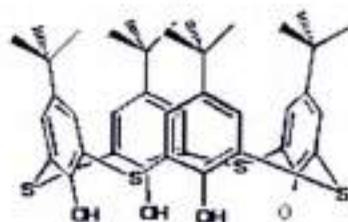
En estas condiciones no se observaron cambios en las señales de absorción UV-Visible y fluorescencia. Por ambas técnicas al comparar los espectros de las mezclas experimentales con los que se obtienen de la suma aritmética de los espectros de los compuestos individuales no hay variación que indique que se está llevando a cabo alguna interacción. La ausencia de interacción se podría atribuir a que en estas condiciones de pH ambos compuestos tienen carga neta negativa por lo que predominarían fuerzas repulsivas entre las especies no permitiendo la formación de un complejo o especie supramolecular entre ellos.

AC y TCA4 a pH= 6

El TCA4 (Figura 9 b) se encuentra en mayor proporción (91%) como la especie con una carga negativa debida a la primera deprotonación y un 9 % aproximadamente conserva los cuatro hidroxilos de la especie neutra, esto es debido a que el pH del sistema se encuentra casi una unidad por encima del valor de pKa1 determinados para el TCA4 en presencia del catión Na⁺ (pKa1 = 5,10± 0,05). Por otra parte el AC (Figura 9 a) según los equilibrios de disociación ácido-base se encuentra mayoritariamente (76 %) con una carga negativa ya que el pH es superior al pKa1 = 5,5 (Tabla 1).



a

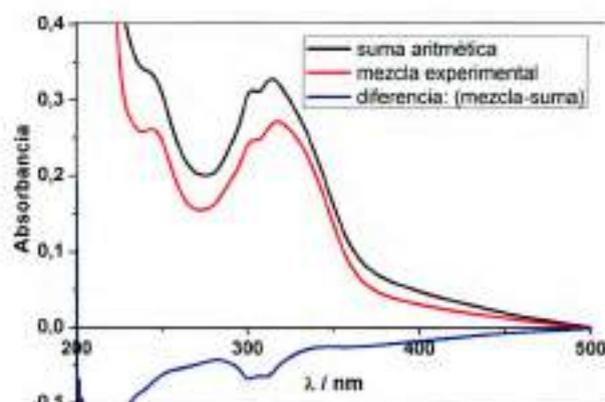
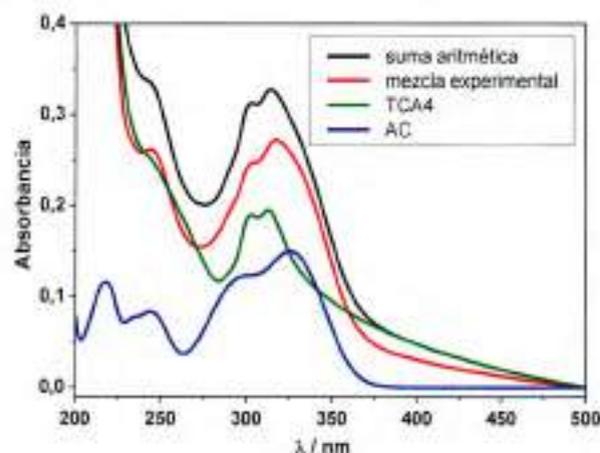


b

Figura 9. Especie ácido-base de a) AC y b) TCA4 predominantes a pH=6.

En los espectros UV-Visible en la Figura 10a1 se observa que la intensidad de la señal a la longitud de onda de máxima absorción disminuye en la mezcla respecto a la que se obtiene al sumar los espectros generados por los compuestos individuales en iguales condiciones de concentración y pH que en la mezcla ($\Delta Abs = 0,050$) esta disminución corresponde a un cambio del 18 % lo que indicaría que se está llevando a cabo algún tipo de interacción. Si se comparan las longitudes de onda (λ) de los máximos para los mismos espectros se tiene un corrimiento en $\lambda^{abs}_{m\acute{o}x} = 3 \text{ nm}$ (317 a 314 nm), este corrimiento se mantuvo con la variación de concentración de AC hasta en una relación de concentración 10 a 1 de AC con TCA4 como se observa en la Figura 10a2.

a1)



a2)

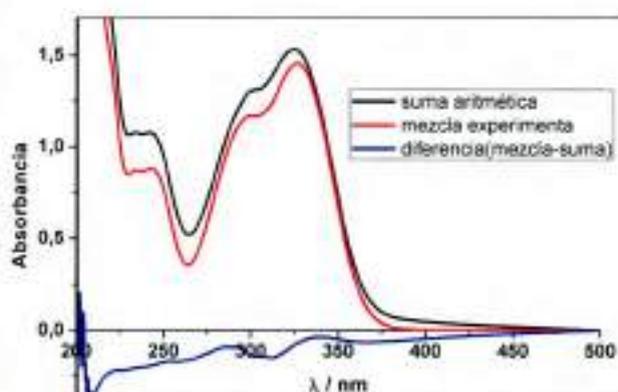
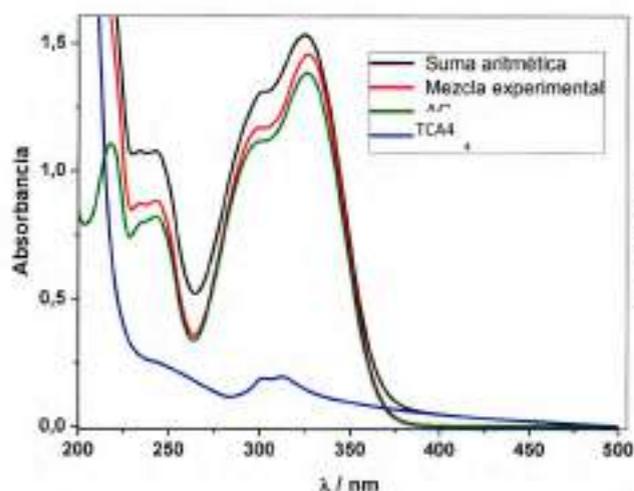


Figura 10. Espectros UV-Visible. a1) $[AC]= 5,3 \mu M$ y $[TCA4]= 5,4 \mu M$ y a2) $[AC]= 61 \mu M$ y $[TCA4]= 5,4 \mu M$.

Mediante el análisis de los espectros de fluorescencia generados por las soluciones mezclas en dos relaciones de niveles de concentración sustrato-receptor 1 a 1 y 10 a 1 (Figura 11a y 11b respectivamente), se buscó una longitud de onda que sólo excitara al TCA4 con $\lambda_{ex} = 375 \text{ nm}$. Se observó para la relación equimolar una disminución de la señal (ΔF área = 16 %) y un leve cambio en la forma del espectro de emisión. En concordancia con estos resultados para la relación de concentraciones 10 a 1 AC a TCA4 también se observó una disminución de las áreas totales de emisión de fluorescencia de

80 % y el cambio en la forma es mayor. En base a estos resultados se decidió realizar un estudio más detallado del *quenching* de fluorescencia observado que podría dilucidar el tipo de interacción sustrato-receptor. El término inglés "quenching", generalmente usado en fotofísica, significa desactivación del estado excitado o atenuación de la emisión de fluorescencia.

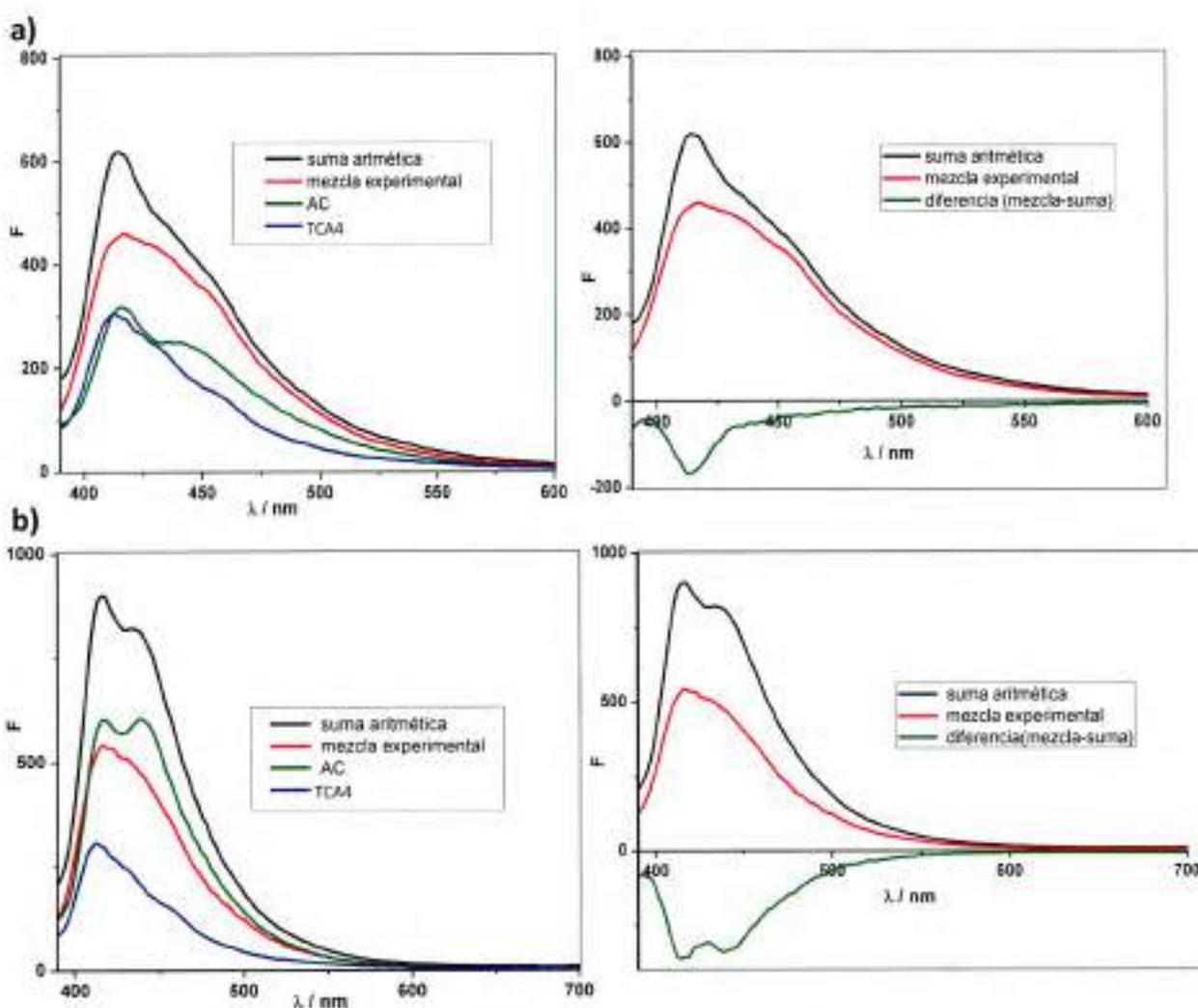


Figura 11. Espectros de Fluorescencia, a1) [AC]= 2,8 μM y [TCA4]= 2,3 μM y a2) [AC]= 5 μM y [TCA4]= 0,5 μM.

AC y CA4 a pH= 6

Con el receptor CA4 (Capítulo IV, Tabla 1 (Figura 12b) en este medio (Na^+) sólo había sido posible experimentalmente determinar un $\text{pKa}_1 = 2,8$; por otro lado en presencia de K^+ y Li^+ se determinaron valores pKa_2 ($\text{pKa}_2 = 5,8$ y $\text{pKa}_2 = 4,1$ respectivamente).

Debido a que en la serie de los metales alcalinos son muy similares en sus características [8], se considera que la especie que prevalece del CA4 sería principalmente dianiónica con una proporción más baja de la especie monoaniónica [17].

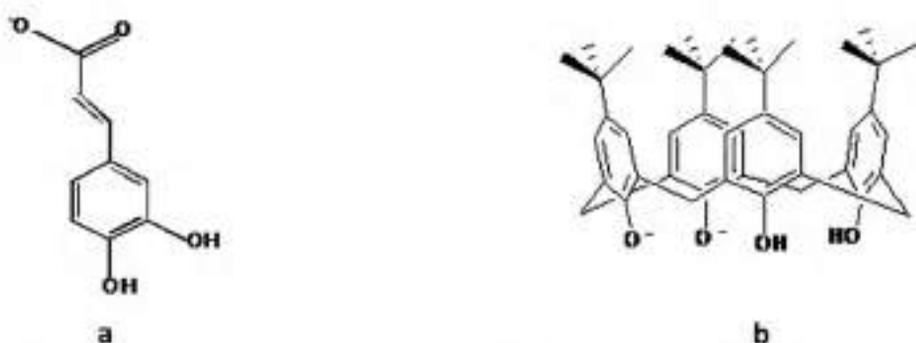


Figura 12. Especie ácido base de a) AC y b) CA4 que prevalece a pH=6.

En los espectros UV-Visible de la Figura 13a se observa que la intensidad de la señal a la longitud de onda de máxima absorción disminuye en la señal de la mezcla respecto a la señal que se obtiene al sumar los espectros generados por los compuesto individuales en iguales condiciones de concentración y pH que en la mezcla ($\Delta\text{Abs} = 0,5$) esta disminución corresponde a un cambio del 50 % en la señal lo que indicaría que algún tipo de interacción. Si se comparan las longitudes de onda de los máximos para los mismos espectros se observan sólo ligeros corrimientos ($\lambda^{\text{abs}}_{\text{máx}} = 328$ a 330 nm, $\lambda^{\text{abs}}_{\text{máx}} = 289,5$ a 290 nm y $\lambda^{\text{abs}}_{\text{máx}} = 279,5$ a 280 nm). Estas variaciones se mantuvieron con la variación de la concentración de AC. Es importante recordar que el coeficiente de absorptividad

molar del CA4 es muy bajo en estas condiciones ($\epsilon_{290\text{ nm}} = 3,7 \pm 0,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), por lo que las relaciones de concentraciones fueron ≥ 1 a 10 AC:CA4.

Por otro lado el estudio de la presencia del CA4 sobre la señal de fluorescencia del AC (Figura 13 b) muestra una disminución de ΔF área = 30 % lo que indica que se están llevando a cabo interacciones entre los compuestos que llevan a formar otra especie que en estas condiciones no presentaría emisión de fluorescencia.

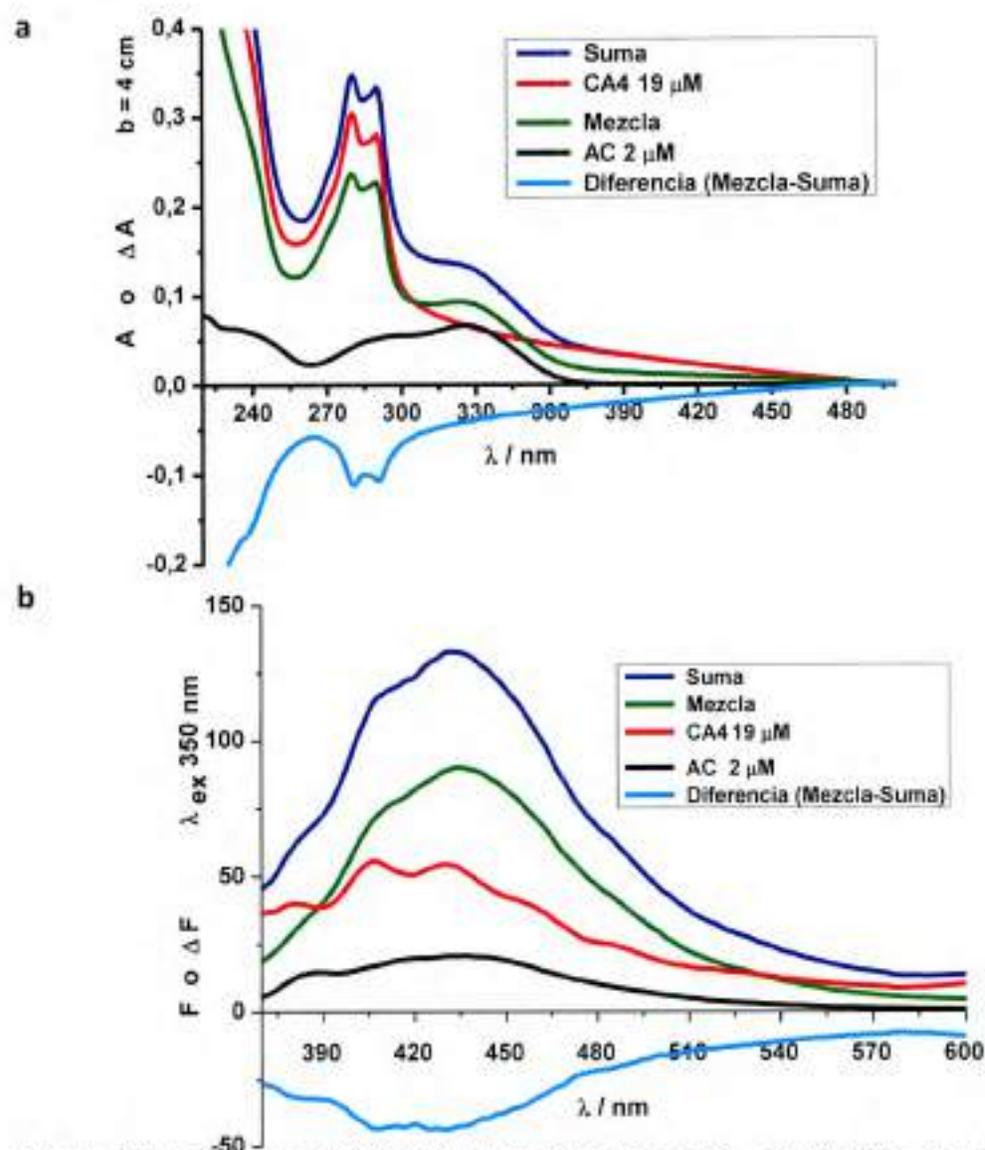


Figura 13. Espectros UV-Visible y de Fluorescencia. a y b) $[\text{AC}] = 2 \mu\text{M}$ y $[\text{CA4}] = 19 \mu\text{M}$.

A partir de las observaciones a los tres pH de trabajo, se decidió explorar experimentalmente en mayor detalle el sistema a pH=6 AC con TCA4 con el objeto de poder explicar las interacciones que se producen en base a la determinación de la constante de interacción de este sistemas.

Determinación de la constante de asociación entre AC y TCA4

Suponiendo que en la reacción se forma un complejo de estequiometria 1:1 (Figura 14), se establece el siguiente equilibrio:

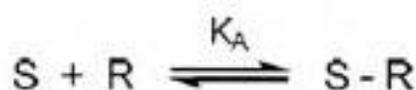


Figura 14. Reacción de complejación huésped-receptor (S representa el sustrato; R, el receptor y S-R, el complejo).

La correspondiente constante de asociación huésped-receptor (K_A) se define como Ecuación 1

$$K_A = \frac{[S-R]}{[S]_1[R]_1} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde $[S - R]$, $[S]_1$ y $[R]_1$ se refieren a las concentraciones en el equilibrio del complejo, del sustrato libre y del receptor libre, respectivamente.

En este trabajo se evaluaron los cambios de las propiedades espectroscópicas cuando se aumenta la concentración del sustrato y se mantiene al receptor constante y si esa variación permite determinar la constante de asociación, K_A . Se realizaron mediciones de absorbancia y de intensidad de emisión de fluorescencia.

Estudio de asociación a partir de las medidas de absorbancia

En la Figura 15 se presentan los espectros de la relación máxima de concentración que se estudió entre el AC y TCA4, y en la Figura 16 se muestra la dependencia del ΔA con la concentración del AC a la longitud de onda de máxima variación ($\lambda = 301 \text{ nm}$). La disminución de la absorbancia de la mezcla experimental con respecto a la sumatoria de los espectros individuales con el aumento de cada concentración de AC a concentración de TCA4 constante, indican que se está formando otra especie que absorbe menos que AC.

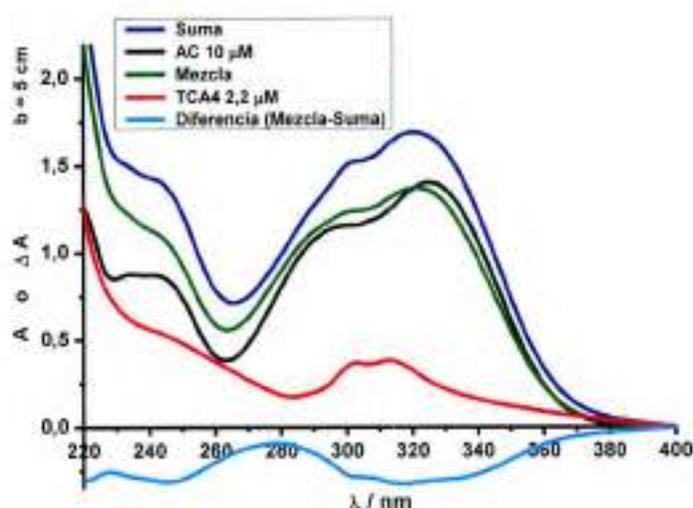


Figura 15. Espectro de absorción: AC = 10 μM ; TCA4=2,2 μM .

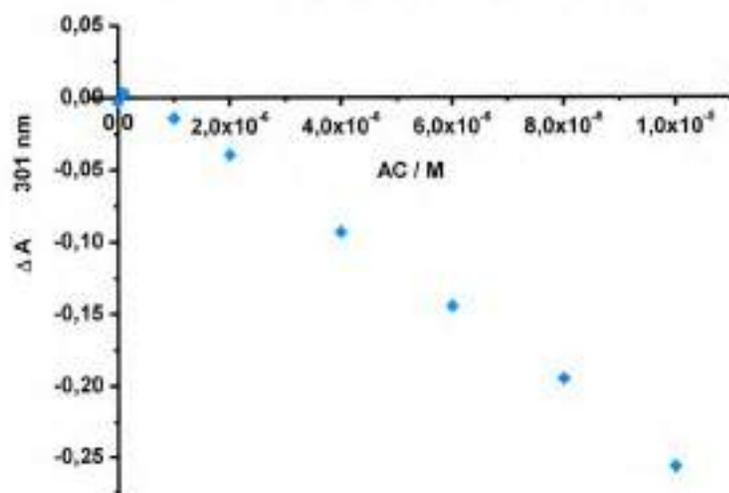


Figura 16. Dependencia del ΔA ($A_{\text{mezcla}} - A_{\text{suma}}$) con la concentración de AC.

Si bien la disminución de la absorbancia es de gran magnitud (Figura 16) no se alcanzó el estado de saturación por lo que no cumple con la condición requerida para llevar a cabo el ajuste de los resultados para la obtención de la constante de asociación [16].

Determinación de la constante de asociación a partir de las medidas de fluorescencia

En la Figura 17 se presentan los espectros de emisión de fluorescencia a la relación máxima de concentración que se estudió entre el AC y TCA4, y en la Figura 18 se muestra la dependencia de la señal con la concentración del AC. La disminución del área total de fluorescencia con el aumento de la concentración de AC indica que se estarían llevando a cabo interacciones que atenúan la señal, porque se estaría originando un complejo en el estado basal que no fluoresce (quenching estático) o porque el AC "quenchea" el estado excitado del TCA4 (quenching dinámico).

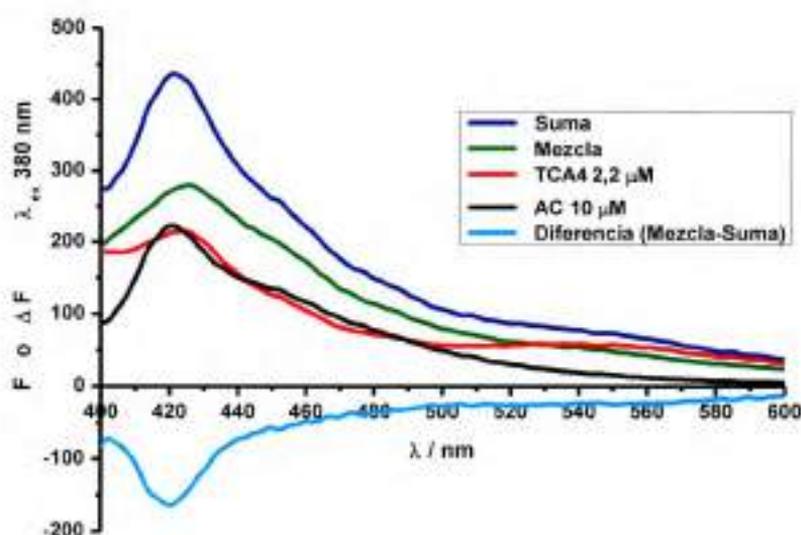
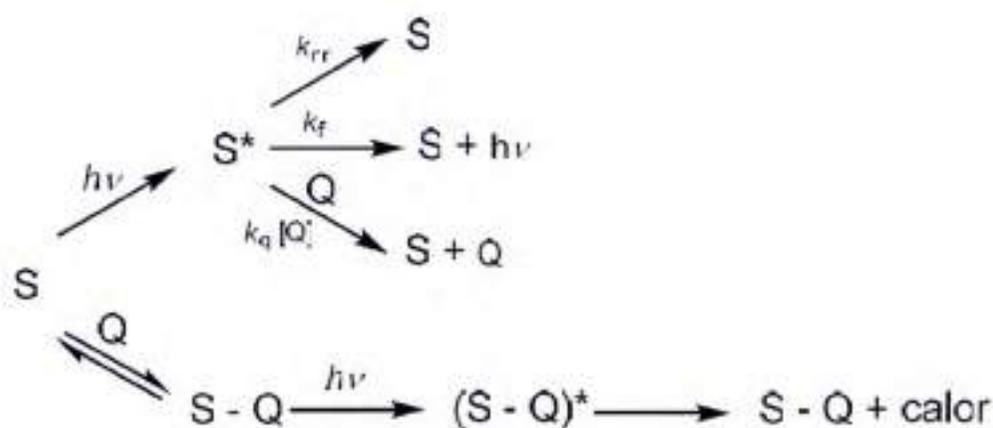


Figura 17. Espectro de emisión de fluorescencia a $[AC] = 10 \mu M$ y $[TCA4] = 2,2 \mu M$ a $pH = 6$.

El efecto de quenching se produce mediante dos mecanismos, por formación de complejos en el estado basal (*desactivación estática*) o por la colisión de la especie desactivante con el estado excitado del fluoróforo (*desactivación dinámica*) Esquema 3. Para el caso que aquí se estudia S es igual a TCA4 y Q es igual a AC.



Esquema 3. Representación esquemática de los procesos de absorción de luz y de desactivación de un fluoróforo (S representa el fluoróforo y Q, la especie desactivadora; k_{nr} , k_f y k_q son las constantes de velocidad de los procesos no radiativos, de fluorescencia y de desactivación del estado excitado del fluoróforo, respectivamente; h , la constante de Planck y ν , la frecuencia).

Teniendo en cuenta la Ecuación 1 y los procesos que llevan a variaciones de la emisión de fluorescencia se tiene la siguiente relación (Ecuación 2) conocida como la ecuación de Stern-Volmer, donde F_0 se refiere a la señal de fluorescencia en ausencia de quencher y F la señal de fluorescencia a concentración de quencher variable.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_Q[Q]$$

Ecuación 2

Estos resultados siguen la dependencia de la Ecuación 2 y a partir de ellos se obtiene una constante de quenching K_Q (AC-TCA4) de $(1,23 \pm 0,08) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ lo que podría indicar que el proceso de atenuación de la señal respondería a un comportamiento de quenching estático, por lo tanto K_Q es igual a K_A . Se han observado constantes de asociación de igual magnitud para formación de complejos con tiacalixarenos [19].

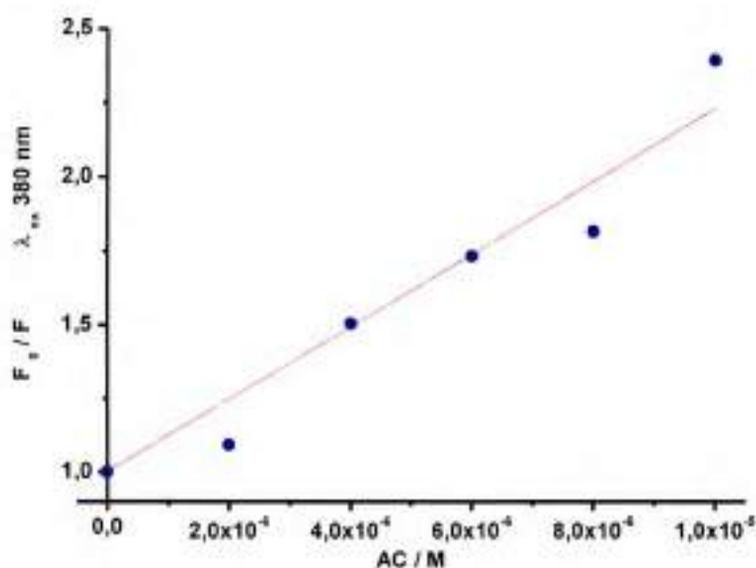


Figura 18. Dependencia de la emisión de fluorescencia con la concentración de AC a pH =6.

Por otra parte, se realizaron experiencias similares pero con concentraciones del monómero *p-tert*-butilfenol equivalente a la cantidad de monómeros que contienen las concentraciones utilizadas de macrociclo. En estas experiencias tanto por UV-Visible como por fluorescencia los cambios

observados estuvieron dentro de los errores experimentales lo que apoya la interpretación de interacciones específicas con el macrociclo.

4-2 Efecto del pH y los receptores sobre el PQ

Efecto del pH

Como se explicó anteriormente, el estado electrónico y la carga de los receptores depende del pH del medio.

En el capítulo II se mencionan las propiedades del PQ, en la Figura 19 se muestran como los perfiles de absorción del PQ a diferentes pH no presentan variaciones, incluso se controló la estabilidad a $\text{pH} > 10$ no observándose variaciones.

El coeficiente de absorptividad molar se determinó según la Ley de Lambert y Beer y el principio de linealidad.

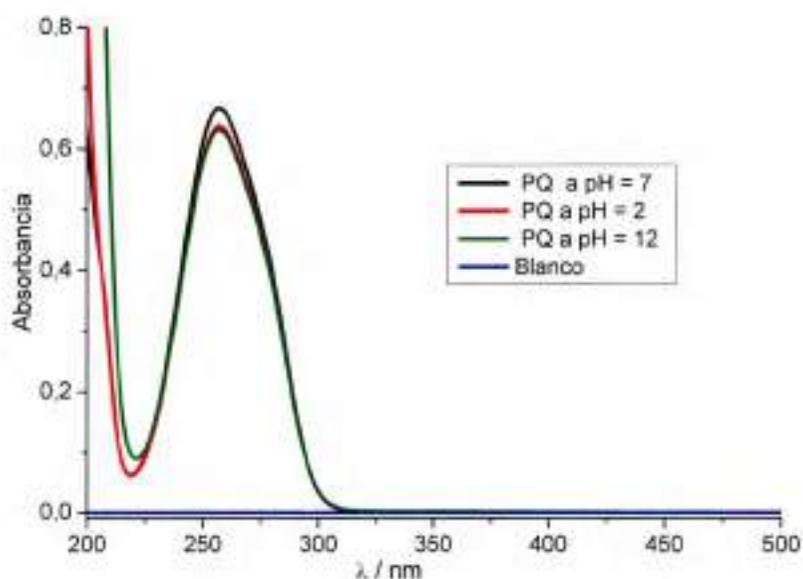


Figura 19. Espectro de absorción de $[\text{PQ}] = (2,9 \pm 0,07) \times 10^{-5} \text{ M}$ a $\text{pH} = 2, 7$ y 12 , $b = 1 \text{ cm}$. $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}}$ 259 nm $(22,6 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

PQ y TCA4 a pH = 2

A pH= 2 el TCA4 (Figura 20 b) es neutro ya que la primera deprotonación de los hidroxilos comienza a pH superiores a pH= 4 ($pK_{a1} = 4,2 \pm 0,6$) y el PQ (Figura 20 a) no tiene protones ácidos que se afecten con el pH del medio.

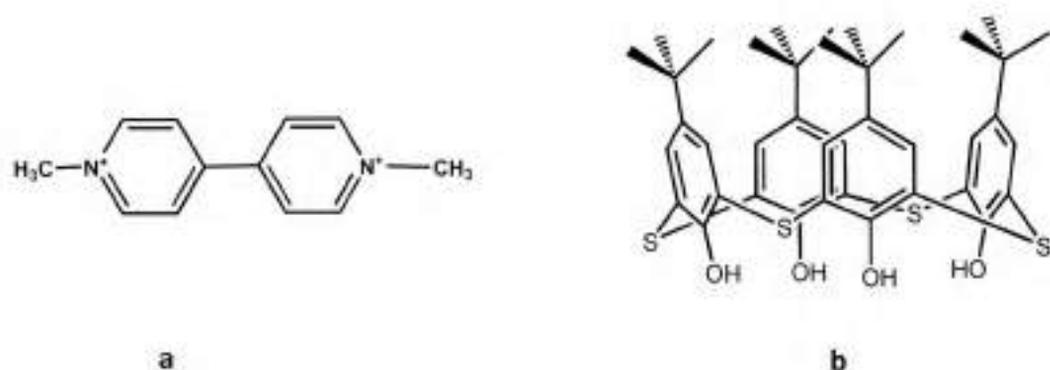


Figura 20. Especie ácido-base a) PQ y b) TCA4 a pH=2.

En las experiencias medidas tanto por UV-Visible como por fluorescencia se observaron cambios que indican que se están produciendo interacciones entre las especies S-R. A continuación, en las Figuras 21a y 21b se muestran los espectros obtenidos por ambas técnicas respectivamente. En los espectros UV-Visible (Figura 21a) se observa que la intensidad a la longitud de onda de máxima absorción aumenta para la mezcla, $\Delta Abs = 0,16$, respecto a la señal que se obtiene al sumar los espectros de los compuesto individuales en iguales condiciones de concentración y pH que en la mezcla. Este cambio corresponde al 10 % en la señal, cambio que no permitiría trabajar a varias concentraciones de PQ con el objeto de aplicar algún procedimiento matemático que permita la determinación de la magnitud de la interacción. Si se comparan las longitudes de onda λ de los máximos para los mismos espectros se tiene un corrimiento en $\lambda_{m\acute{a}x}^{abs} = 2 \text{ nm}$ (303 a 301 nm), este corrimiento estaría indicando la formación de una especie diferente.

Por otro lado el análisis de las experiencias realizadas por fluorescencia, excitando al receptor TCA4 a $\lambda_{ex} = 375$ nm, mostraron un aumento en el área total de fluorescencia $\Delta F \text{ área} = 12 \%$ así como también en la intensidad de la señal a $\lambda_{em} = 550$ nm, $\Delta F = 20 \%$, ambas variaciones no son lo suficientemente grandes como para continuar explorando el sistema por esta técnica.

Una de las complicaciones de trabajar en estas condiciones de pH es la baja solubilidad, y por lo tanto la inestabilidad del sistema en estudio (la solubilidad del TCA4 disminuye con la acidez del medio y el PQ es insoluble en etanol), y debido al compromiso que existe entre la magnitud de los cambios con la concentración de los compuestos, el sistemas no se continuó explorando.

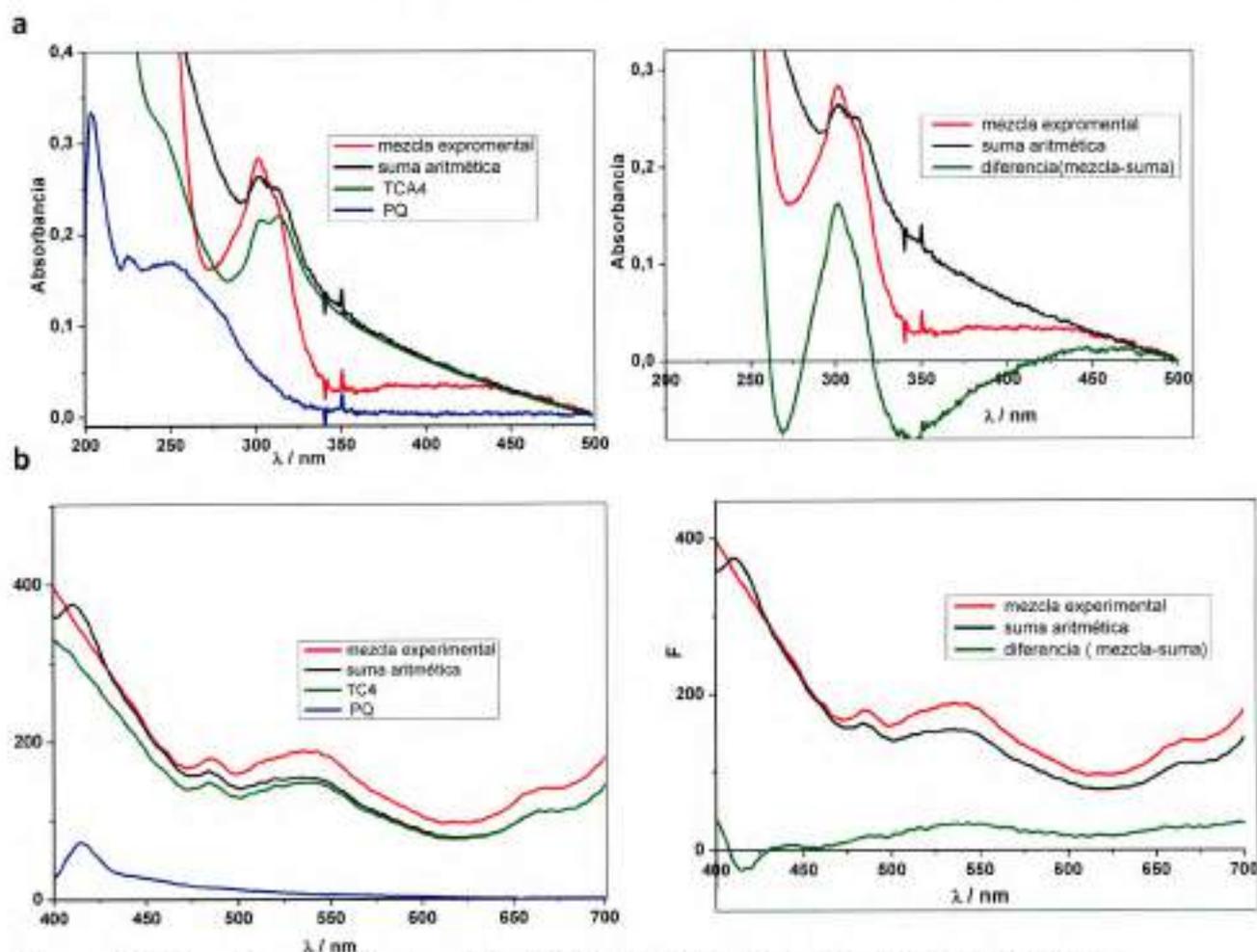


Figura 21. Espectros de a) absorción UV-Visible [PQ]= 7 μ M y [TCA₄]= 2 μ M, b) emisión de fluorescencia [PQ]= 0,5 μ M y [TCA₄]= 0,5 μ M.

PQ y CA4 a pH = 2

Se emplearon dos niveles de concentración para el PQ manteniendo constante la concentración de CA4 para analizar si la señal se modificaba. En todos los casos se comparó el espectro de la mezcla respecto al que se obtiene de la suma de los espectros individuales de los compuestos.

En la Figura 22 se muestran las especies ácido-base presentes en el medio:

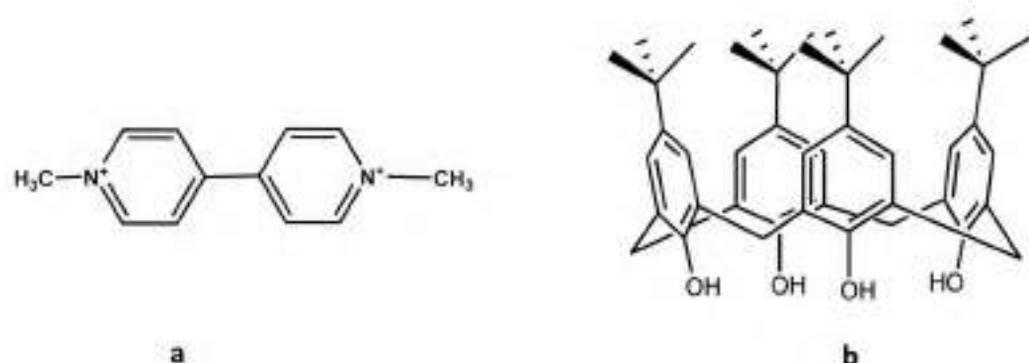


Figura 22. Especie ácido-base de a) PQ y b) CA4 a pH=2.

El CA4 a este pH es electrónicamente neutro, Figura 22 b), y no cuenta con efecto donador de electrones de los puentes de sulfuro del homólogo TCA4. Los cambios que se observaron en los espectros UV-Visibles, Figura 23 y 24 indicarían algún tipo de interacción supramolecular con la formación de una nueva especie. Se obtiene un $\Delta Abs = 0,13$ en la Figura 23 y un $\Delta Abs = 0,2$ en la Figura 24 lo que equivale al 50 % de aumento de absorbancia con respecto a la aditividad de la ley de Lambert Beer para ambas relaciones de sustrato-receptor (1 a 1 y 10 a 1).

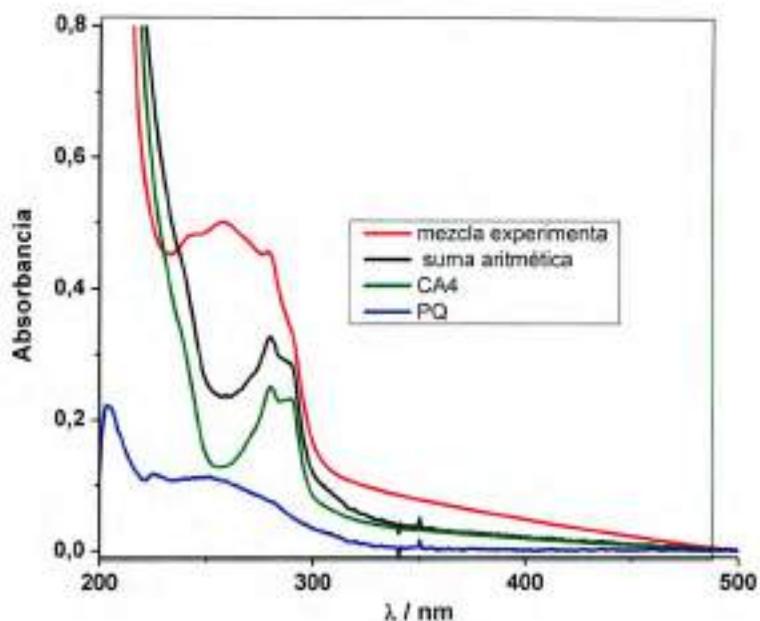


Figura 23. Espectro UV-Visible de $[PQ] = 0,97 \mu\text{M}$ $[CA4] = 9 \mu\text{M}$.

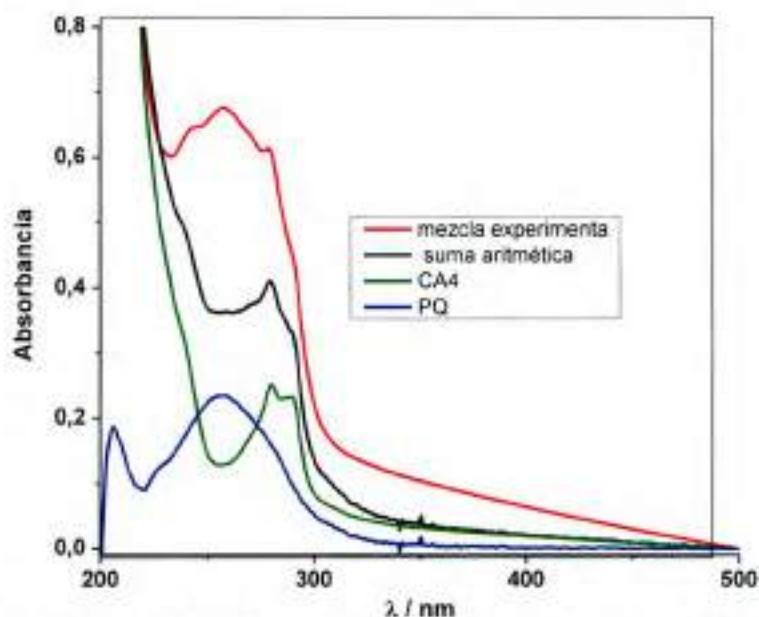


Figura 24. Espectro UV-Visible $[PQ] = 2,2 \mu\text{M}$ y $[CA4] = 9 \mu\text{M}$.

En estas condiciones el cambio espectral que se observa tanto en la intensidad de absorción como en los máximos correspondientes al espectro de la mezcla con respecto a los esperados de la suma aritmética, como así también

el cambio en la forma del espectro indica no sólo que se está llevando a cabo algún tipo de interacción sino que se estaría formando otra especie.

Por otro lado las señales de emisión fluorescente, no presentaron variaciones relevantes en igual condición que la de las empleadas en las experiencias por UV-Visible.

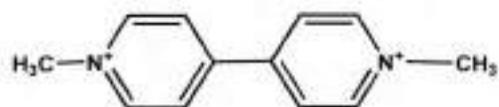
Experimentos reportados a pH ácidos con el CA4 informan que el ordenamiento de los dipolos del solvente compite por los sitios de interacción en torno al macrociclo dificultando la interacción con el sustrato [20] [21] [22].

Al encontrarse los CA4 neutros electrónicamente las interacciones que se podrían desarrollar son catión - π stacking [22] [23]. A pH = 2 el entorno a cada uno de los compuestos los mantiene en condiciones más estables termodinámicamente haciendo que ambas moléculas se comporten como si no se hallaran una en presencia de la otra [23] [24].

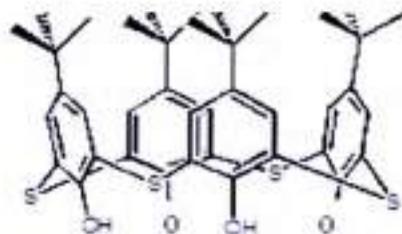
Como se mencionó anteriormente, en literatura se han informado sistemas similares convenientemente funcionalizados para favorecer la habilidad de reconocimiento por la especie de sustrato que se haya en el medio [15] [14]. En estos casos los cambios en la señal pudieron ser ajustados a una constante de asociación mediante el tratamiento matemático [11].

PQ y TCA4 a pH = 11

El PQ (Figura 25 a) presenta dos cargas positivas en tanto que TCA4 (Figura 25 b) se encuentra en mayor proporción con dos carga negativas.



a



b

Figura 25. Especies ácido-base a) PQ y b) TCA4 a pH=11.

En estas condiciones las experiencias por espectroscopia UV-Visible (Figura 26 a y b) muestran variaciones en las señales. Estos cambios indican que se están llevando a cabo interacciones entre los compuestos y que se podría estar generando una nueva especie activa en el UV-Visible ya que se observan aumento y variación en el perfil del espectro de absorbancia.

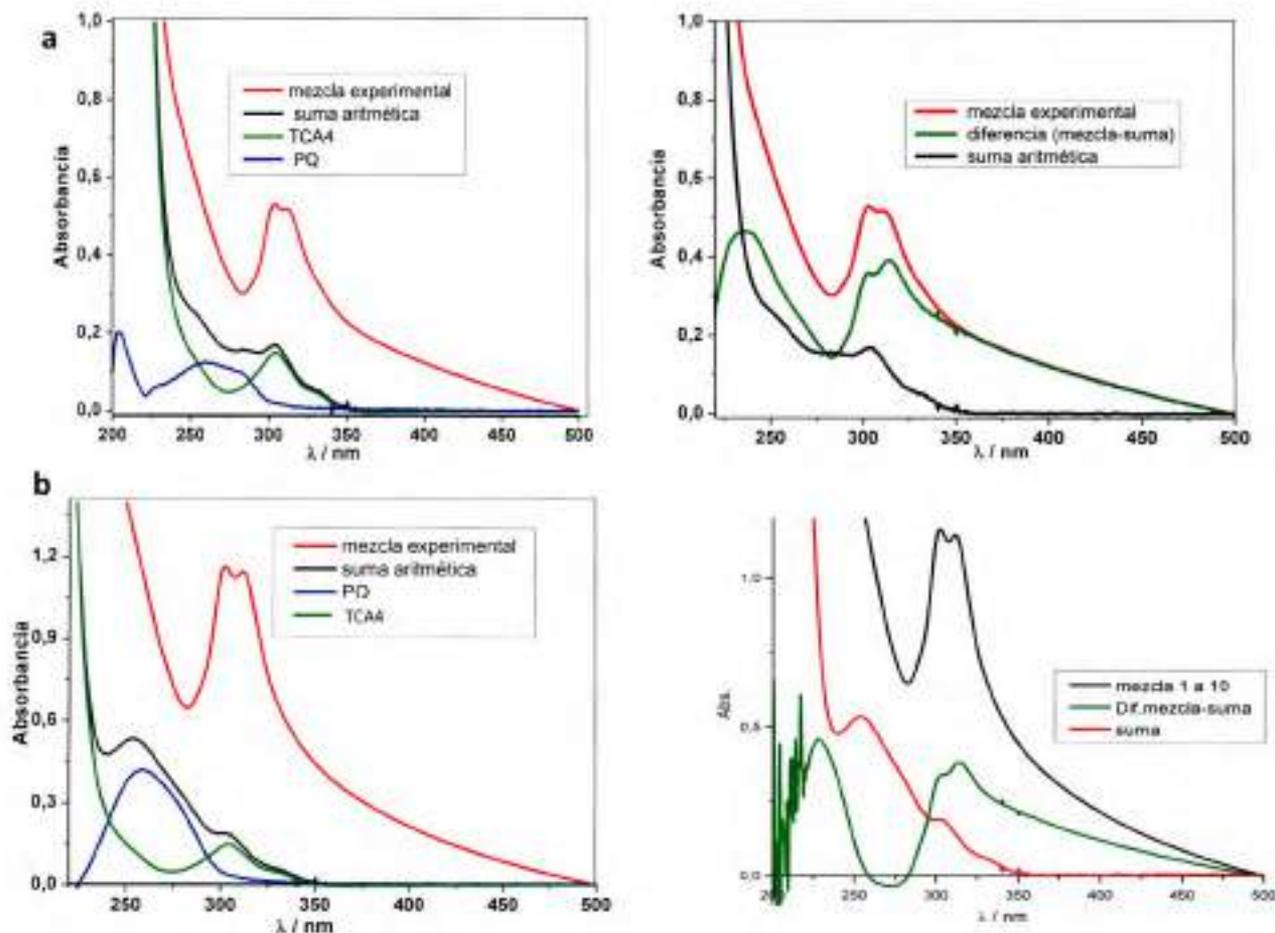


Figura 26. Espectros de absorción UV-Visible a) [PQ] = 10 μM [TCA4] = 11 μM, b) [PQ] = 36 μM [TCA4] = 11 μM.

A pH= 11 el receptor se encuentra con doble carga negativa lo que compromete a los restantes hidrógenos de los hidroxilos fenólicos a formar puentes de hidrógeno dejando a la región 'endo' con capacidad donora de electrones, base de Bronsted [25] que pueden interactuar con la carga positiva del PQ, en este caso las interacciones electrostáticas y catión- π pueden ser más importantes.

Por otro lado del análisis de las señales de las experiencias realizadas por fluorescencia (Figura 27), en las que se excitó al TCA4 a 375 nm, donde PQ no absorbe, en las condiciones de concentración 3 a 1 de PQ a TCA4 se observa una

ligera disminución del área de fluorescencia indistinguible del error experimental.

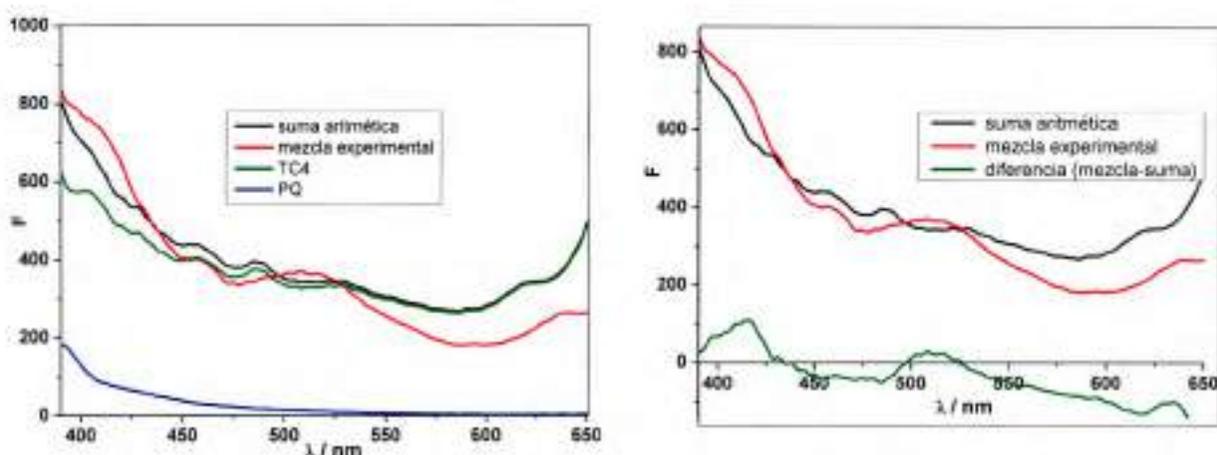


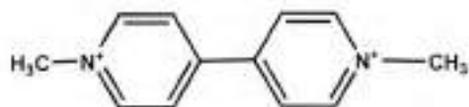
Figura 27. Espectro de emisión de fluorescencia [PQ]= 36 μ M y [TCA4]= 11 μ M.

PQ y CA4 a pH= 11

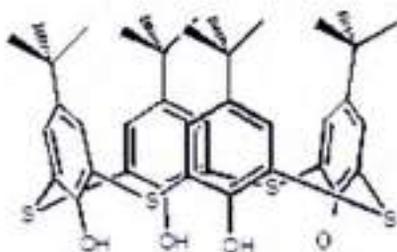
En estas condiciones de pH, variando la concentración de PQ y manteniendo al CA4 constante no se observaron variaciones en la señal de UV-Visible y de emisión de fluorescencia que indicaran algún tipo de interacción. Por lo que se decidió no continuar los estudios en este sistema.

PQ y TCA4 a pH= 6

El TCA4 (Figura 28b) como se informó anteriormente en este Capítulo, se encuentra a este pH 99 % como la especie con una carga negativa debida a la primera deprotonación y un 1 % de la especie neutra, esto es debido a que el pH del sistema es una unidad mayor al de pKa1 determinados para el TCA4 en presencia del catión Na⁺ (pKa1 = 5,10 \pm 0,05) y el PQ (Figura 28a) posee las dos cargas positivas sobre los nitrógenos.



a



b

Figura 28. Especie ácido-base de a) AC y b) TCA4 a pH=6.

En los espectros UV-Visible de la Figura 29a se observa que la intensidad de la señal a la longitud de onda de máxima absorción aumenta en la señal de la mezcla respecto a la señal que se obtiene al sumar los espectros generados por los compuestos individuales en iguales condiciones de concentración y pH que en la mezcla $\Delta\text{Abs} = 0,141$ que corresponde a un incremento del 25 % en la señal lo que indicaría que se está llevando a cabo algún tipo de interacción del tipo S-R.

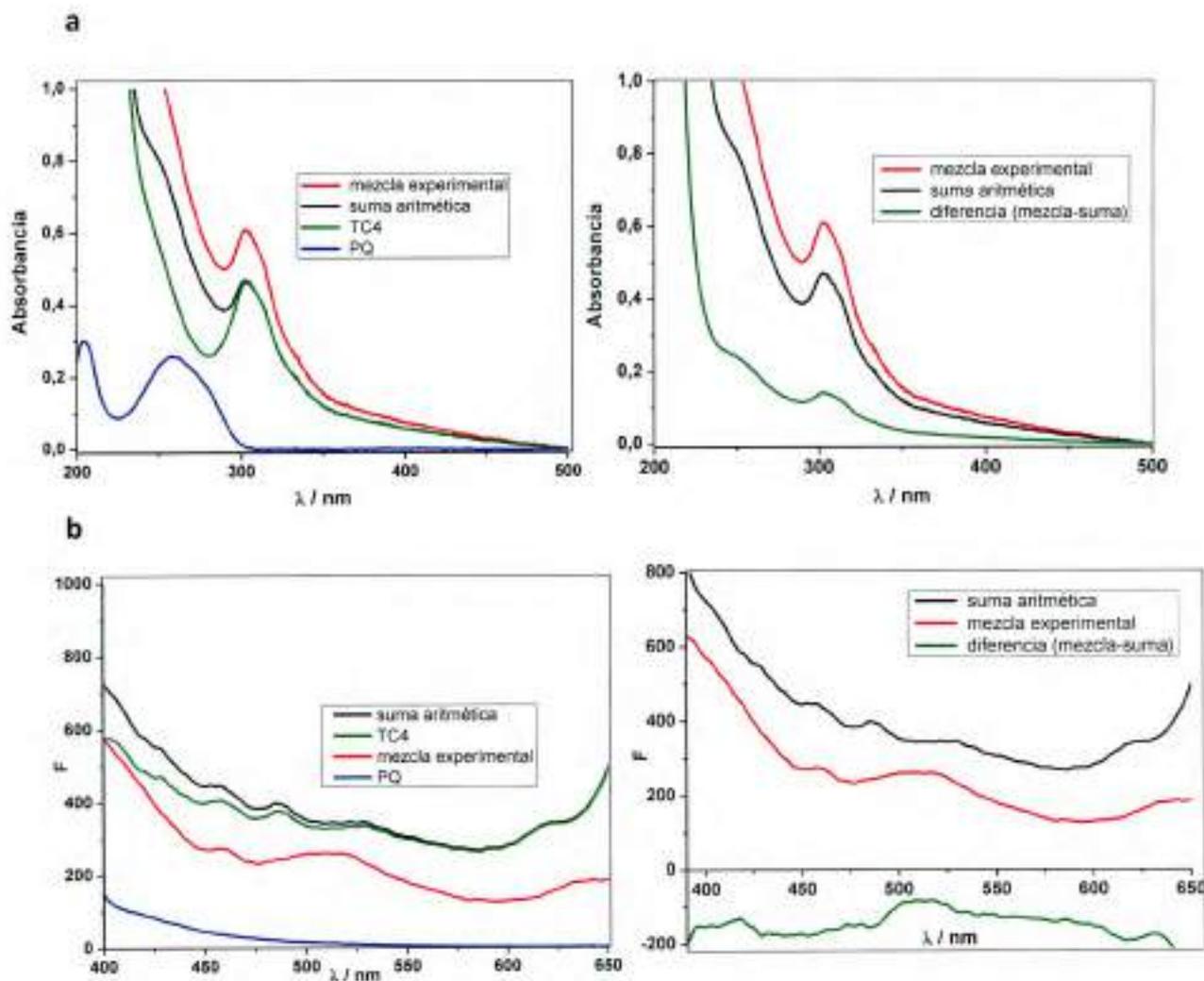


Figura 29. Espectros de a) UV-Visible [PQ]= 10 μM y [TCA4]= 10 μM y b) emisión de fluorescencia [PQ]= 0,5 μM y [TCA4]= 0,5 μM .

En la Figura 29b se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de las soluciones en un nivel de concentración sustrato-receptor 1 a 1 con $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$. Se observó disminución de la señal $\Delta F \text{ área} = 35 \%$ y un leve cambio en la forma del espectro de emisión.

En este caso, los cambios de absorbancia y de fluorescencia observados permiten el estudio más detallado de este sistema. Con el quenching de

fluorescencia observado se podría determinar una constante de interacción sustrato-receptor.

PQ y CA4 a pH= 6

Al receptor CA (Capítulo IV), Figura 30b, en este medio sólo se le pudo determinar un $pK_{a1} = 2,8$. Basándose en la teoría de caracterización 'dura' y 'blando' [8] y debido a que en la serie de los metales alcalinos el Li^+ y el Na^+ son muy similares, como se explicó anteriormente se considera que la especie que prevalece del CA4 es dianiónica [17].

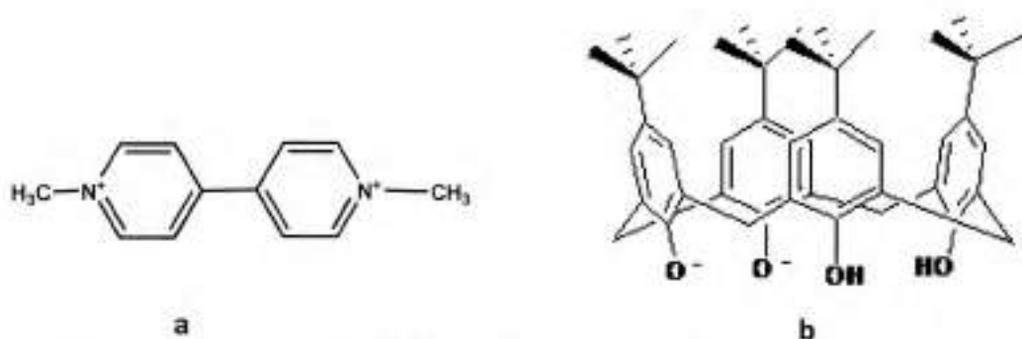
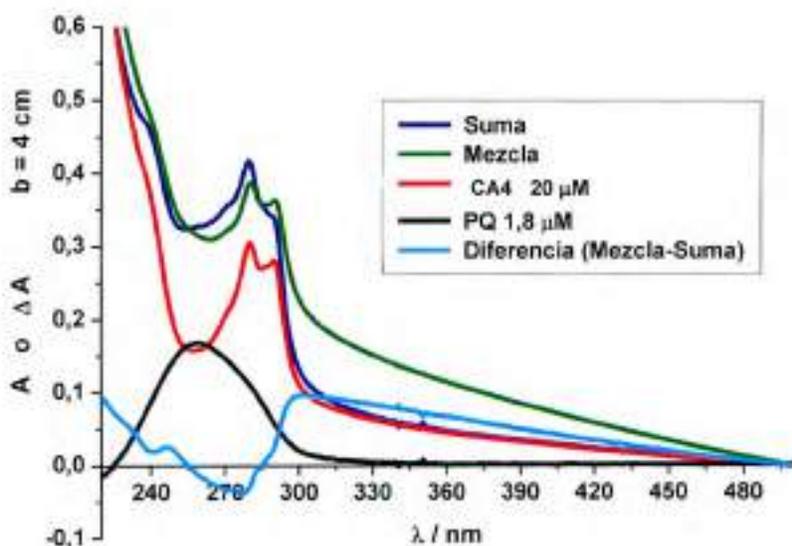


Figura 30. Especie ácido-base de a) PQ y b) CA4 a pH=6.

En los espectros UV-Visible en la Figura 31a la intensidad de la señal a la longitud de onda de máxima absorción disminuye en la señal de la mezcla respecto a la señal que se obtiene al sumar los espectros de los compuestos individuales en iguales condiciones de concentración y pH que en la mezcla $\Delta Abs = 0,05$. Esta disminución corresponde a un cambio sólo del 13 % en la señal. Esto indicaría que se está llevando a cabo algún tipo de interacción. Si se comparan las longitudes de onda de los máximos para los mismos espectros no se observan corrimientos.

a



b

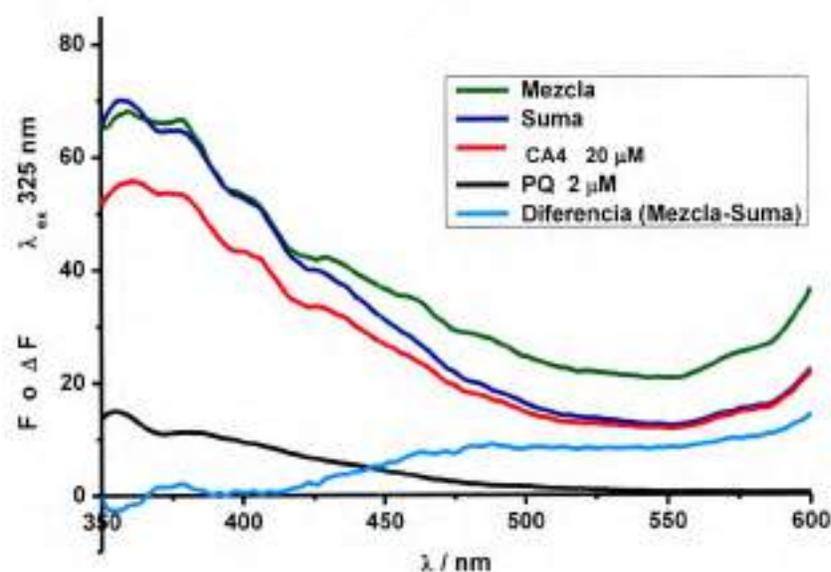


Figura 31. Espectro a)UV-Visible y b) de emisión de fluorescencia. [PQ]= 20 μM y [CA4]= 1,9 μM .

Por otro lado el análisis por fluorescencia en presencia del CA4 sobre la señal de fluorescencia del PQ (Figura 31b) muestra un leve aumento de ΔF área = 30 % lo que indica que indica interacciones entre los compuestos que llevan a formar otra especie que en estas condiciones presentaría mayor emisión de fluorescencia.

Dadas estas observaciones sólo se desarrollaron las experiencias entre PQ y TCA4 a pH = 6 con el propósito de cuantificar y determinar el tipo de interacción entre el sustrato y el receptor.

Determinación de la interacción a partir de las medidas absorbancia

En la Figura 32 se presentan los espectros de la relación máxima de concentración que se estudió entre el PQ y TCA4, y en la Figura 33 se muestra la dependencia de la señal con la concentración del PQ. La disminución de la absorbancia con el aumento de la concentración de PQ a TCA4 constante indica que se está formando otra especie que absorbe menos que PQ.

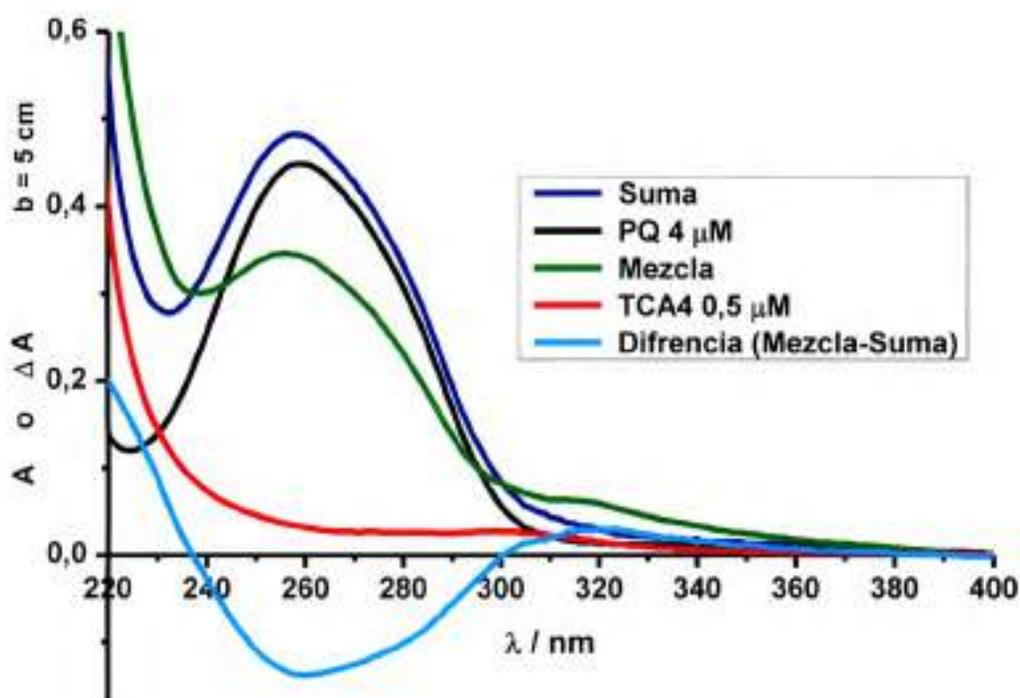


Figura 32. Espectro de absorción UV-Visible de [PQ]= 4 μM, [TCA4]= 0,5 μM a pH = 6.

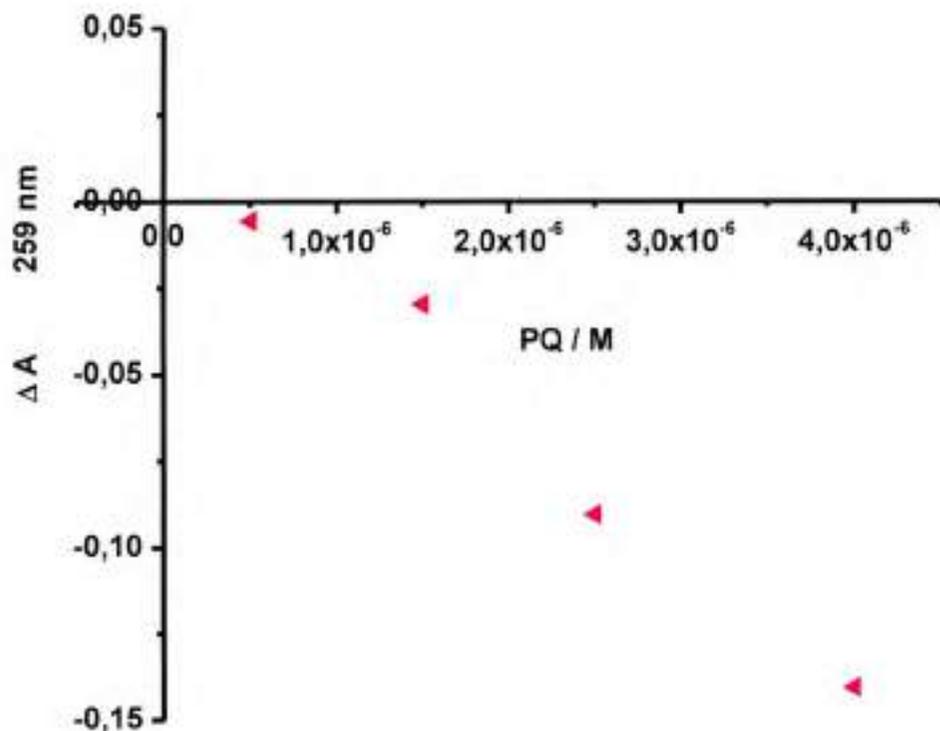


Figura 33. Dependencia de la señal de absorbancia con la concentración de PQ a pH =6.

Estudio de asociación a partir de las medidas de fluorescencia

En la Figura 34 se presentan los espectros de emisión de fluorescencia de la relación máxima de concentración que se estudió entre el PQ y TCA4, y en la Figura 35 se muestra la dependencia del área de fluorescencia con la concentración del PQ. Hay incremento del área total de fluorescencia con el aumento de la concentración de PQ, lo que indica que se producen interacciones que forman un complejo con mayor fluorescencia que los componentes que le dan origen.

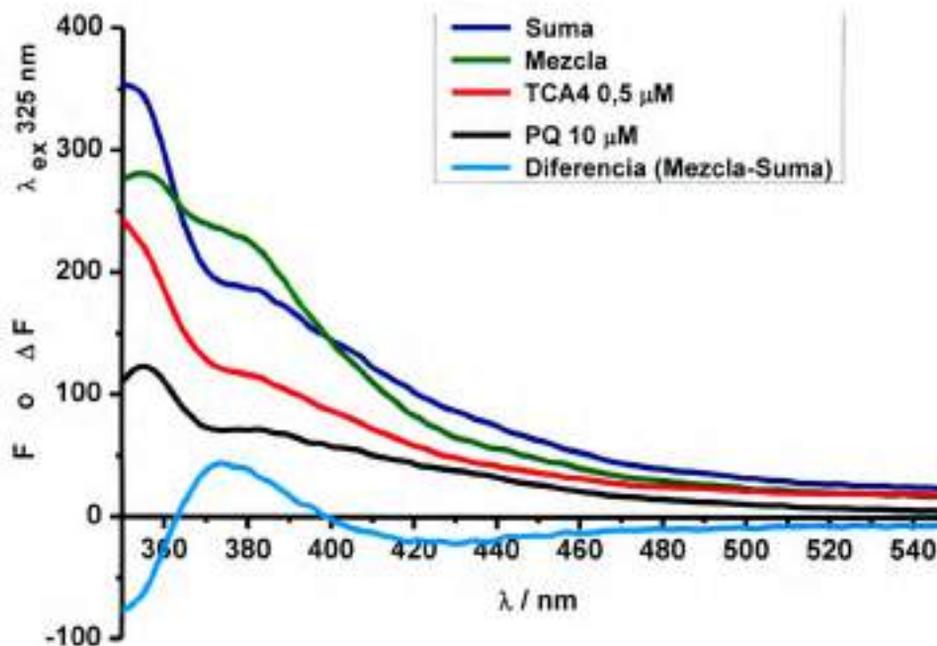


Figura 34. Espectro de emisión de fluorescencia. $[\text{PQ}] = 10 \mu\text{M}$ y $[\text{TCA4}] = 0,5 \mu\text{M}$.

Determinación de la constante de asociación a partir de las medidas de fluorescencia

La exaltación en la emisión de fluorescencia que se muestra en la Figura 35 se correlaciona con la Ecuación 3. En esta ecuación F_R es la relación entre F a distintas concentraciones de sustrato (S) con respecto a F_0 en ausencia de S y Φ es la relación de rendimientos cuánticos de fluorescencia entre el receptor complejo y libre.

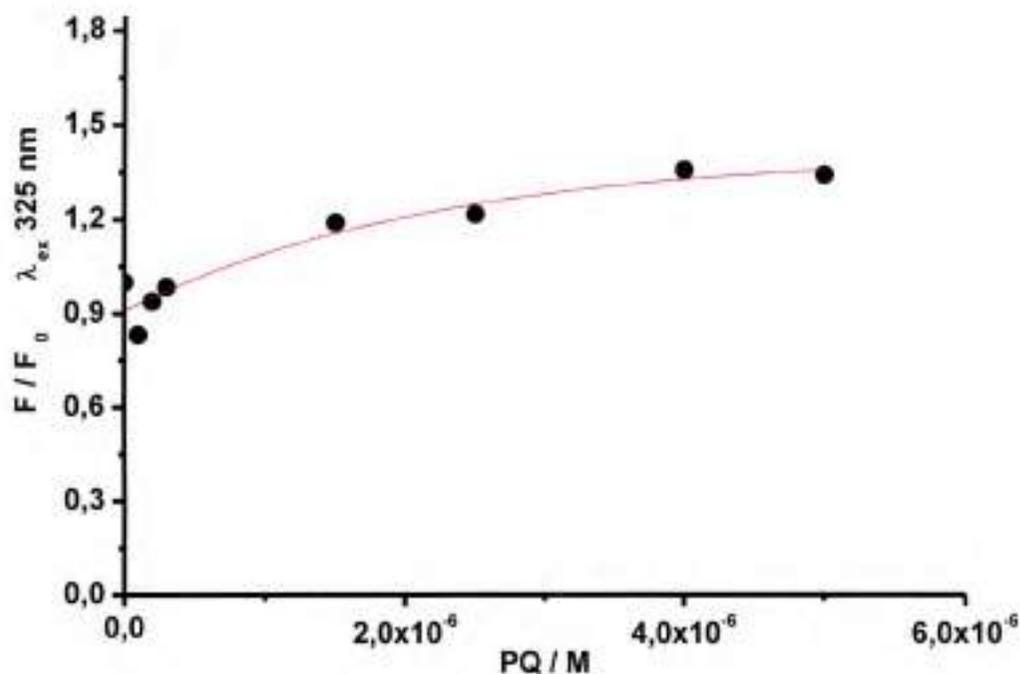


Figura 35. Dependencia de F con la variación de la concentración de PQ. [TCA4]= 0,5 μM y [PQ]= 0,1 – 5 μM.

$$F_R = \frac{1 + \Phi K_A [S]_0}{1 + K_A [S]_0} \quad \text{Ecuación 3}$$

Si bien los datos experimentales muestran la tendencia correspondiente, se obtuvo un valor aproximado de K_A (10^5 M^{-1}) dado que la cantidad de datos no es suficiente para obtener a partir del ajuste de la Ecuación 3 un valor con mayor precisión. Este valor es de magnitud similar al encontrado por quenching de fluorescencia entre el AC y el TCA4. Además, valores similares han sido encontrados con otros sustratos en literatura [19].

Por otra parte, al igual que para el AC, para este sustrato se realizaron experiencias similares con una concentración del monómero *p-tert*-butilfenol equivalente a la que contienen las concentraciones utilizadas de macrociclo. Los cambios observados tanto por UV-Visible como por fluorescencia estuvieron

dentro de los errores experimentales lo que confirma la hipótesis que existen interacciones específicas entre PQ y TCA4.

5. Conclusiones

En esta parte del trabajo de tesis se observó un comportamiento similar para ambos macrociclos, TCA4 y CA4, en la variación de las señales de absorbancia y de fluorescencia en presencia de PQ o AC a los distintos pH estudiados.

Estos cambios denotan interacciones específicas entre los receptores macrocíclicos y los sustratos. En base a ellos se pudieron estimar constantes de asociación del orden 10^5 M^{-1} para los complejos AC-TCA4 y PQ-TCA4 a pH 6.

Como proyección de este trabajo se propone a futuro el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de PQ por exaltación de fluorescencia.

6. Bibliografía

- [1] N. J. Turro, V. Ramamurthy, and J. C. Scaiano, "Modern molecular photochemistry of organic molecules." University Science Books, 2010.
- [2] E. Whery, "Molecular fluorescence and phosphorescence spectrometry," F. Settle, 1997.
- [3] J. R. Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy," Tercera Ed. Springer, 2006.
- [4] C. R. N. Strauts, J. H. Gilfillan, H. N. Wilson, "Analytical Chemistry—The Working Tools." London: Press, Oxford University, 1958, p. 228.
- [5] J. L. Beltrán, N. Sanli, G. Fonrodona, D. Barrón, G. Özkan, and J. Barbosa, "Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic acids in water and acetonitrile–water media," *Anal. Chim. Acta*, vol. 484, no. 2, pp. 253–264, 2003.
- [6] F. Z. Erdemgil, S. Sanli, N. Sanli, G. Ozkan, J. Barbosa, J. Guiteras, and J. L. Beltrán, "Determination of pK(a) values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology and potentiometry.," *Talanta*, vol. 72, pp. 489–496, 2007.
- [7] M. Bos and W. E. Van Der Linden, "A knowledge based advisory system for acid/base titrations in non-aqueous solvents," *Anal. Chim. Acta*, vol. 332, pp. 201–211, 1996.
- [8] E. L. C. Pearson, S. U. Relaci, and C. O. N. L. O. S. I. D. E. Corrosi, "El Concepto de Pearson y su relacion con los inhibidores de corrosion.," *Rev. Quim.*, vol. XI, pp. 7–20, 2000.
- [9] Pergamon, Ed., "Ionization Constants of Organic Acids in Aqueous Solutions". Oxford, 1979.
- [10] R. Dsouza, U. Pischel, and W. Nau, "Fluorescent dyes and their supramolecular host/guest complexes with macrocycles in aqueous solution," *Chem. Rev.*, pp. 7941–7980, 2011.
- [11] D. Guo, X. Su, and Y. Liu, "Benzyl Effects of Supramolecular Architectures Constructed by p -Sulfonatocalix [4] arene and Viologen Guests : from Simple 2 : 1 & DESIGN," *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, pp. 8–11, 2008.

- [12] P. Thordarson, "Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 3, pp. 1305–23, 2011.
- [13] A. Wolff, V. Bohmer, F. Ugozzoli, and G. D. Andreetti, "Dissymmetric Calix[4]arenes with C₂ and C₄ Symmetry," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, vol. 55, no. 22, pp. 5665–5667, 1990.
- [14] J. W. Steed and J. L. Atwood, "Supramolecular Chemistry," 2nd ed. John Wiley & Sons, 2009.
- [15] I. I. Stoikov, A. Y. Zhukov, M. N. Agafonova, R. R. Sitdikov, I. S. Antipin, and A. I. Konovalov, "p-tert-Butyl thiacalix[4]arenes functionalized at the lower rim by o-, m-, p-amido and o-, m-, p-(amidomethyl)pyridine fragments as receptors for α -hydroxy- and dicarboxylic acids," *Tetrahedron*, vol. 66, no. 1, pp. 359–367, 2010.
- [16] P. Thordarson and W. Unsw, "Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry w," vol. 6, pp. 1305–1323, 2011.
- [17] C. D. Gutsche, "Calixarenes: An Introduction," Segunda Ed. Cambridge: Publishing, RCS, 2008.
- [18] J. Kroupa, I. Stibor, M. Pojarová, M. Tkadlecová, and P. Lhoták, "Anion receptors based on ureido-substituted thiacalix arenes and calix arenes," *Tetrahedron*, vol. 64, pp. 10075–10079, 2008.
- [19] R. R. Amirov, A. B. Ziyatdinova, E. A. Burilova, A. Y. Zhukov, I. S. Antipin, and I. I. Stoikov, "Complexation of Gd III with tetra p tert butylthiacalix [4] arenoic acid in micellar media," vol. 58, no. 7, pp. 1400–1407, 2009.
- [20] J. Kroupa, I. Stibor, M. Pojarová, M. Tkadlecová, and P. Lhoták, "Anion receptors based on ureido-substituted thiacalix[4]arenes and calix[4]arenes," *Tetrahedron*, vol. 64, pp. 10075–10079, 2008.
- [21] R. R. Amirov, A. B. Ziyatdinova, E. A. Burilova, A. Y. Zhukov, I. S. Antipin, and I. I. Stoikov, "Complexation of GdIII with tetra-p-tert-butylthiacalix[4]arenoic acid in micellar media," *Russ. Chem. Bull.*, vol. 58, no. 7, pp. 1400–1407, 2009.
- [22] H. Chu, L. He, Q. Jiang, Y. Fang, Y. Jia, X. Yuan, S. Zou, X. Li, W. Feng, Y. Yang, N. Liu, S. Luo, Y. Yang, L. Yang, and L. Yuan, "CMPO-calix[4]arenes with spacer containing intramolecular hydrogen bonding: Effect of local

rigidification on solvent extraction toward f-block elements," *J. Hazard. Mater.*, vol. 264, no. 0, pp. 211–218, 2014.

- [23] D. R. Lide, *Handbook of chemistry and physics*, 85th Ed. Boca Raton: Press, CRC, 2005.
- [24] F. Z. Erdemgil, S. Şanlı, N. Şanlı, G. Özkan, J. Barbosa, J. Guiteras, and J. L. Beltrán, "Determination of pKa values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology and potentiometry," *Talanta*, vol. 72, pp. 489–496, 2007.
- [25] L. C. Groeneme, E. Steinwender, B. T. G. Lutz, J. H. Van Der Maas, and D. N. Reinhoudt, "solvent effects on the conformation and hydrogen bond structure of partially methylated p-tert-Butylcalix[4]arenes," *J. Chem. Soc.*, p. 1893, 1992.

Capítulo VI

MÉTODOS ANALÍTICOS SUPRAMOLECULARES

1. Introducción

En este capítulo se presentarán los conceptos más importantes relacionados con el desarrollo de un método analítico y los subsiguientes pasos para su correspondiente validación.

El método analítico se define como un conjunto de procedimientos que se llevan a cabo para realizar determinaciones cualitativas y cuantitativas de una muestra. Éste abarca en la química analítica desde la recepción de la muestra y todo el tratamiento que esta requiera, para determinar un analito de interés.

Los métodos analíticos se desarrollan generalmente para mejorar la exactitud y precisión de los métodos existentes, para permitir la automatización, reducir los reactivos utilizados, el trabajo realizado y el costo total. Un método analítico en el laboratorio químico primero debe ser verificado o validado experimentalmente de manera de asegurar la calidad del funcionamiento del mismo [1]. Para llevar a cabo esto y el posterior uso del método desarrollado es fundamental la etapa de validación. La validación se define como un conjunto de pruebas utilizadas para establecer que un método es adecuado, demostrando la aplicabilidad y reproducibilidad para una determinada finalidad.

La creciente evolución en el desarrollo de fármacos y de aditivos alimentarios requiere de un seguimiento terapéutico. Para ello, el análisis cuantitativo de cierto número de compuestos que forman parte de medicamentos prescritos por los profesionales es un complemento necesario del examen biológico. Por tanto es necesario que la etapa de validación del método se asuma como un paso común, ya sea aplicado en el área farmacéutica o al área biológica. Esta etapa es un estudio científico que incluye criterios de confiabilidad que aseguran un determinado valor de exactitud y precisión [2]. A continuación se desarrollan algunos de estos elementos de validación.

Elemento de validación de un método analítico

La validación consiste en un conjunto de procedimientos que se realizan para confirmar qué método produce resultados con el grado de precisión y exactitud para lo cual fue diseñado [1] [2].

Con el objetivo de validar un determinado método analítico se utilizan regularmente los siguientes parámetros analíticos que además sirven para comparar sus cualidades analíticas con las provistas por otros métodos:

- Especificidad
- Selectividad
- Sensibilidad de calibración
- Sensibilidad analítica
- Intervalo de linealidad
- Exactitud
- Precisión
- Límite de detección
- Límite de cuantificación

Especificidad

En los análisis químicos es frecuente que muchos compuestos como sustancias endógenas, metabolitos y productos de degradación, puedan potencialmente interferir en la administración de un analito de interés. Es por ello que la especificidad hace referencia a la seguridad sobre la respuesta detectada atribuida sólo al analito a cuantificar. Es por esto que el método deberá tener la capacidad de medir al analito inequívocamente en una mezcla de componentes que podrían interferir en la medida [3].

Selectividad

La selectividad describe la capacidad del método analítico para diferenciar varias sustancias en una muestra compleja [3]. Por ejemplo es común aplicar este término a las técnicas cromatográficas en las cuales componentes de una mezcla son separados y cuantificados en una matriz [4] [5]. También es usada para describir métodos espectroscópicos en los cuales las señales son separadas y obtenidas para diferentes compuestos en una mezcla.

Sensibilidad de calibración y analítica.

La IUPAC [6] define a la calibración como una operación que relaciona una cantidad de un valor medido, como puede ser una señal (y), con la cantidad o concentración (x) de una determinada especie química [7]. La sensibilidad de calibración es igual a la pendiente (dy/dx) de la recta de calibrado (m) (Ecuación 1).

$$m = \frac{dy}{dx} \quad \text{Ecuación 1}$$

Por otra parte m no es adecuada para comparar dos métodos analíticos cuando estos están basados en respuestas diferentes (por ejemplo, absorbancia y fluorescencia, etc.). Para ello hay que utilizar la sensibilidad analítica (γ), definida por la relación entre la sensibilidad (m) y el ruido instrumental (s_y) (Ecuación 2),

$$\gamma = \frac{m}{s_y} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde s_y es una medida conveniente del nivel de ruido en la respuesta.

El modelo de regresión lineal más comúnmente utilizado es el ajuste por cuadrados mínimos [8]; el cual supone las tres siguientes premisas: I) el único error esta dado por la variable y ; II) los errores de la variable y están

normalmente distribuidos; III) el error en la variable y es homogéneo para cada valor de la variable x . Considerar que la fuente de error provenga sólo de la variable y es probable que se cumpla en una gran cantidad de experimentos, con errores en las señales de los instrumentos del 2-3 % (desviación estándar relativa menor al 10 %).

Intervalo de linealidad

Para comprobar que el modelo lineal sea el adecuado para los datos experimentales se deberá verificar los supuestos a partir de los residuales calculados.

Una forma de hacerlo es mediante el análisis de un gráfico de los residuales $(y - \hat{y})$ de la regresión en función de los x_i datos experimentales [8]. Para el comportamiento lineal se espera que la distribución sea al azar, y que la variabilidad interna entre réplicas a cada nivel de concentración sea aproximadamente la misma que la variabilidad global. Si se observa visualmente que los residuos poseen un comportamiento parabólico, es un caso típico de desvíos de la ley lineal. En tanto que si los residuos muestran una variabilidad global significativamente mayor que la que presentan las réplicas a cada nivel, aunque el sistema se comporte linealmente, hay mayor incertidumbre en las concentraciones nominales de los patrones de calibrado que en la señal instrumental.

La prueba estadística que se utiliza para determinar si los datos se ajustan a la ley lineal es el test F [9], el cual se basa en el análisis de la varianza [9] (ANOVA; Analysis of Variance) y consiste en hacer la relación entre la varianza de la regresión $(s_{y/x})^2$ con la del ruido instrumental (s_y^2) . A este valor de F , se lo denomina F experimental ($F_{exp.}$) (Ecuación 3)

$$F_{\text{exp}} = \frac{(s_{y/x})^2}{(s_y)^2}$$

Si se obtiene que $(s_{y/x})^2$ es significativamente mayor que $(s_y)^2$, se supone que hay desvíos al modelo lineal que son estadísticamente superiores al ruido en la respuesta. Para poder emplear el test F se debe cumplir el supuesto de que el error de la variable y es mucho mayor al de x . De otro modo se acumularían en $s_{y/x}^2$ incertidumbres de las concentraciones que no tienen nada relacionado con la pérdida de la linealidad.

Luego de obtener el F_{exp} , se lo compara con el valor crítico del estadístico F (de una cola) de tablas para un dado nivel de confianza (95%), el valor depende para $(s_{y/x})^2$ de $(n1-1)$ y para $(s_y)^2$ de $(n2-1)$ grados de libertad, siendo $n1$ y $n2$ igual al tamaño de la muestra (niveles de concentración, niveles de muestra real, etc. por ejemplo). Si $F_{\text{exp}} < F$, se acepta que los datos experimentales se comportan linealmente.

Por último el intervalo lineal comprende desde la menor concentración que puede cuantificarse hasta la pérdida de la linealidad.

Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) en una técnica analítica está definido como la concentración más baja de analito que da una señal que puede ser distinguida de la señal del blanco con una razonable seguridad [10]. El LD es estimado por la respuesta instrumental, pero se informa en unidades de concentración o de masa.

La definición de la IUPAC [6] establece que el nivel de concentración límite que da una señal (y_L) que es igual a la suma de la señal del blanco promedio (y_{BL}) más el producto de un factor numérico elegido de acuerdo al

nivel de confianza requerido (w) y la desviación estándar del blanco (s_{BL}) [10] (Ecuación 4).

$$y_L = (y_{BL} + w \cdot s_{BL}) \quad \text{Ecuación 4}$$

A partir del modelo lineal (Ecuación 4), el LD en unidades de concentración se pueden expresar por la Ecuación 5:

$$LD = \frac{(y_L - y_{BL})}{m} \quad \text{Ecuación 5}$$

en donde m es la sensibilidad de calibración. Sustituyendo la Ecuación 4 en la 5 se obtiene la definición matemática del LD (Ecuación 6).

$$LD = \frac{w \cdot s_{BL}}{m} \quad \text{Ecuación 6}$$

El LD se calcula mediante una prueba de hipótesis estadística en donde a partir de fijar una concentración llamada nivel crítico (x_c) se toman decisiones respecto a la detección del analito. Para concentraciones superiores de x_c existe una probabilidad α de cometer un error llamado de tipo I o falso positivo. Este consiste en aceptar erróneamente la hipótesis alternativa, admitiendo que el analito está presente cuando en realidad está ausente. De la misma manera existe una probabilidad β de cometer errores del tipo II o falso negativos, en el cual se acepta erróneamente la hipótesis nula admitiendo que el analito está ausente cuando en realidad está presente. Si para ambas probabilidades se asume el valor 0,05, entonces se tendrá un 5 % de probabilidad de cometer ambos errores. Entonces en la práctica asumiendo ambos errores k tiende a $\approx 3,29$ [11] [12] y el LD queda finalmente definido por la Ecuación 7.

$$LD = \frac{3,29 s_{BL}}{m}$$

Ecuación 7

Anteriormente en la definición del LD se utilizaba un valor de $k = 3$, en el cual sólo se contemplaba los errores del tipo I.

Otro aspecto a tener en cuenta es la determinación de la desviación estándar del blanco (s_{BL}). En general puede determinarse a partir de la desviación de los residuales de la curva de calibración y la medición de los blancos químicos correspondientes, en este trabajo de tesis se utilizó la definición del LD de la Ecuación 7, y se realizó la medición directa de los blancos químicos.

Por otra parte el límite de cuantificación (LC) es la mínima concentración cuantificable en forma confiable. En este parámetro se toma el valor de $k=10$ quedando definido el LC por la Ecuación 8.

$$LC = \frac{10 \cdot s_{BL}}{m}$$

Ecuación 8

Para muchas aplicaciones farmacéuticas el LC es generalmente un parámetro más útil que el LD. La Farmacopea de Estados Unidos define al LC de la misma manera anteriormente expuesta y además como “un parámetro de ensayos cuantitativos para bajos niveles de compuestos en muestras de matrices, como impurezas de drogas y productos de degradación de productos farmacéuticos terminados” [13].

Precisión y exactitud

La precisión es una medida de la dispersión de los valores obtenidos de múltiples experimentos de una muestra homogénea. Un parámetro estadístico de la precisión está dado por el coeficiente de variación (CV; desviación

estándar relativa porcentual). En general un valor de CV menor al 5 % corresponde a un método preciso.

Por otra parte la exactitud está definida como la cercanía entre el valor medido del analito en cuestión y el "valor verdadero". En la práctica el valor verdadero de una analito puede ser estimado mediante algunos de los métodos que se detallan a continuación.

Metodología de referencia: muchas organizaciones están comprometidas en el desarrollo de métodos certificados con una gran exactitud, como es el caso de la NRSCL (National Reference System for the Clinical Laboratory). Se comparan los resultados obtenidos con los del método de referencia con el método desarrollado propuesto.

Mediante la utilización de materiales de referencias certificados.

Realizando ensayos de Recuperación [14] en este punto hay que diferenciar el término "Recuperación" de "Recuperación Aparente"; ambos reconocidos por la IUPAC. Sus definiciones se detallan a continuación.

-Recuperación (R): es la relación de la cantidad de analito encontrada a partir de una matriz real fortificada previamente al procedimiento de extracción y la cantidad original agregada a la muestra. Está relacionada con el error sistemático global de todo el proceso analítico.

-Recuperación Aparente (RC): se hace referencia a muestras fortificadas justo antes del proceso de medición y está relacionado con el error sistemático producido por la matriz. Es la relación entre el valor obtenido y el valor adicionado.

Participación en Ensayos periódicos Interlaboratorios [11].

Las dos primeras metodologías, dado su costo elevado junto a la limitada disponibilidad de materiales certificados especialmente en muestras reales, hacen que las otras dos opciones sean elegidas y aplicadas por los laboratorios con mayor frecuencia [6].

En este trabajo de tesis la exactitud de los ensayos de recuperación se realizaron mediante el test 't'.

Para corroborar la exactitud del método se estudió el efecto matriz aplicando el test t [8] a dos colas con niveles de confianza del 95% y el valor obtenido se lo comparó con el valor de t ($t_{(n-1), \alpha=0,05}$) tabulado para los n datos promediados. El valor de t obtenido experimentalmente debe ser menor al valor t tabulado para el nivel de confianza elegido y los n-1 grados de libertad, el valor es satisfactorio para ($t < t_{(n-1), (\alpha=0,05)}$) (Ecuación 9)

$$t = [(\% R - 100) (n)^{1/2}] / s \quad \text{Ecuación 9}$$

siendo n =número de datos promediados utilizados en los ensayos de recuperación con los cuales se calcula el % R y s la desviación estándar para los n ensayos.

2. Objetivos

Objetivo General

Determinar los parámetros de validación analíticos para métodos espectrofluorimétricos supramoleculares que surgen de sistemas huésped-receptor previamente estudiados en el grupo de investigación.

Objetivo Específico

- Desarrollar y validar un método analítico para determinar cuantitativamente el fungicida benomilo (BY) basado en los cambios de las propiedades espectrofluorimétricas inducidos por la adición del macrociclo ácido para sulfonatocalix[8]areno (C8S).
- Desarrollar y validar un método analítico para determinar 6-hidroximelatonina (6M) en base al incremento en la emisión de fluorescencia por la adición de Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD).

3. Organización de los resultados del capítulo

En esta sección se detalla la determinación de los parámetros analíticos y de la validación en muestras reales para los métodos supramoleculares espectrofluorimétricos intensificados para BY con C8S y para 6M con HP β CD. Este estudio se desprende como continuación de los trabajos desarrollados en las tesis doctorales de la Dra. Valeria Sueldo Ocelllo y el Dr. Guillermo Bracamonte, dado que en estos trabajos se determinaron las interacciones entre los compuestos y los macrociclos pero no se habían desarrollado los métodos analíticos.

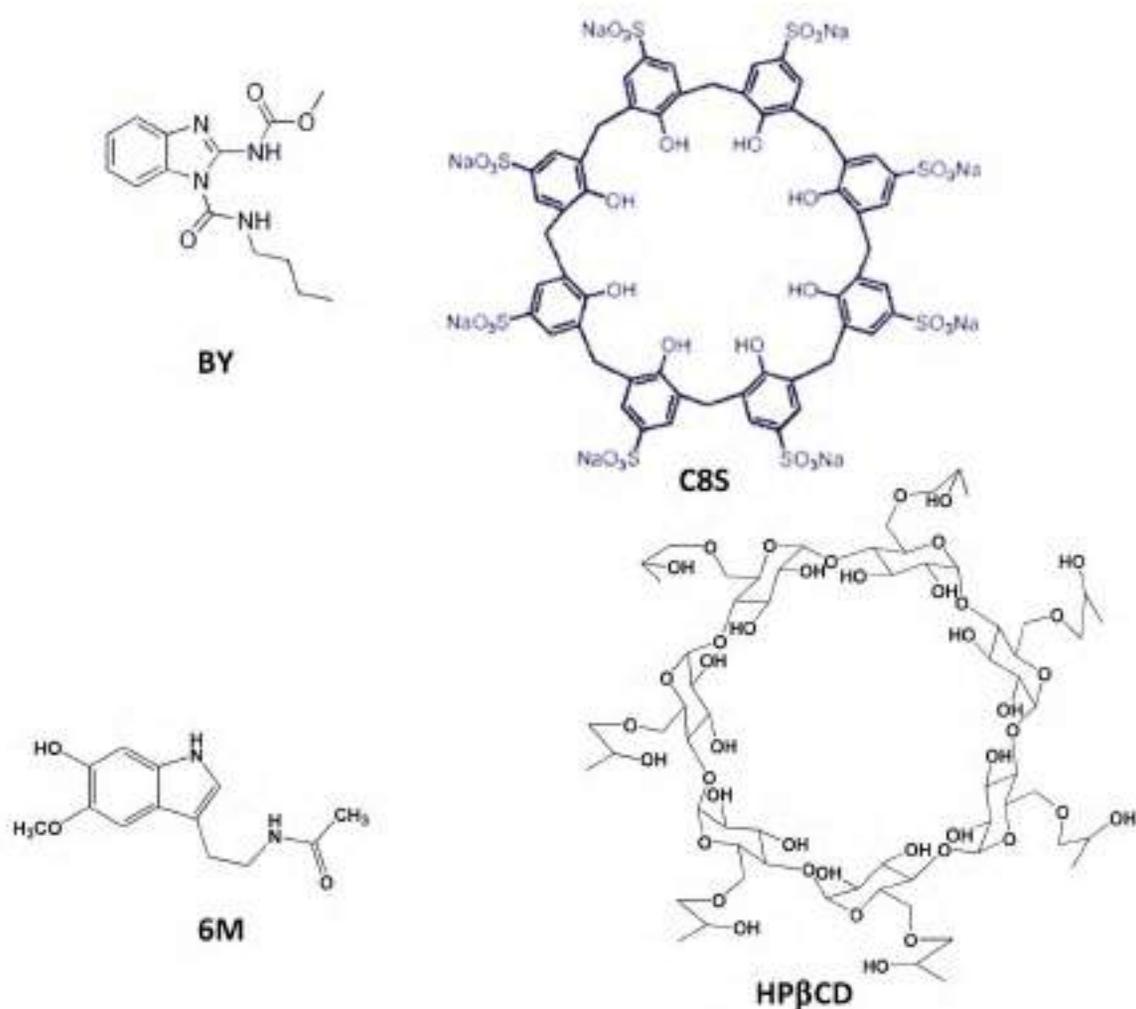


Figura 1. Estructuras de sustratos (BY y 6M) y receptores (C8S y HP β CD)

3. Materiales y métodos

Reactivos

- NaPO_4H_2 (Merck)
- NaCl (Cicarelli)
- $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ (Merck)
- Benomilo (95 % de pureza)
- 6-hidroxi melatonina (99 % pureza-ICNI- ICN Biomedical)
- Hidroxipropil- β -ciclodextrina (grado de sustitución 5.5, Cerestar)
- Agua MQ
- Cloroformo (Cicarelli)
- Eter etílico (Sintorgan)
- Metanol grado HPLC (Sintorgan)
- HCl 36,5-38% (Cicarelli y Anedra)
- Ácido *p*-sulfonónico calix[8]areno (sintetizado por el Dr. Marcio Lazzarotto)

Instrumental

- Baño termostático (Haake y Thermo Orion)
- Microondas de uso doméstico (Eslabón de Lujo)
- Electrodo de vidrio, calomel saturado (Orion ROSS)
- pH-metro (ORION Modelo 720A y 520 A)
- Espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu)
- Espectrofluorímetro Jasco FP-777
- Espectrofluorímetro PerkinElmer modelo LS55

3.2. Métodos y procedimiento

Todas las soluciones con las que se trabajó fueron acuosas; excepto en el método de recuperación de 6M de extractos en metanol la cantidad de solvente orgánico no superó el 2 %. La homogenización de las soluciones se realizó con un sonicador Testlab tb 02. La temperatura de las soluciones y del compartimiento de la celda se controló usando baños termostáticos con circulación Haake. La celda para las medidas de fluorescencia fue de cuarzo con $b = 1$ cm.

Las soluciones reguladoras de $\text{pH} = 1,000$ ($[\text{HCl}] = 0,1$ M y $[\text{NaCl}] = 0,024$ M); $\text{pH} = 6,99$ sist4 ($[\text{NaPO}_4\text{H}_2] = 0,02$ M; $[\text{NaPO}_4\text{H}] = 0,03$ M y $[\text{NaCl}] = 0,02$ M) y $\text{pH} = 9,156$ ($[\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}] = 0,01$ M; $[\text{NaCl}] = 0,02$ M) se prepararon de acuerdo a literatura [15].

En todas las curvas de calibración se lograron ajuste de los datos experimentales y se corroboró la linealidad con el test F.

Las determinaciones analíticas para BY se llevaron a cabo en las mejores condiciones establecidas previamente a este trabajo de tesis. Todas las soluciones fueron acuosas, acidificadas a $\text{pH} = 1,000$ con buffer; la temperatura se mantuvo a $25,0$ °C; $\lambda_{\text{ex}} = 300,0$ nm; ancho de rendijas de excitación y de emisión fue 10 nm; se fijó el voltaje del fotomultiplicador a 900 y $b = 1$ cm. La concentración de BY varió en el intervalo de $[\text{BY}] = 0,5 - 8 \times 10^{-6}$ M.

Las determinaciones analíticas para 6M se realizaron a $\text{pH} = 6,994$; $T = 25,0$ °C; $\lambda_{\text{ex}} = 382,0$ nm; ancho de rendijas de excitación y de emisión fue 10 nm; ganancia = medium; $b = 1$ cm. El concentración de 6M varió en el intervalo de $[\text{6M}] = 0,5 - 6 \times 10^{-6}$ M.

• Método de extracción para pulpa de naranja

La extracción asistida por microondas (*Microwave-assisted Extraction*, MAE), ha sido desarrollada hace algunos años como una nueva técnica para facilitar la extracción de compuestos orgánicos desde matrices complejas [16] [17]. Su empleo se ha aplicado a la extracción de pesticidas, herbicidas, y

sustancias responsables de aromas [18] [19]. En general, la rápida transferencia de calor en el calentamiento por microondas puede facilitar la extracción en un tiempo más corto, en comparación con los métodos tradicionales. Su uso se puede encontrar a presión reducida, presión atmosférica, con microondas diseñados para laboratorio o simples hornos de uso doméstico, empleando solventes orgánicos o agua [19].

Sobre estas bases, se efectuó la extracción de pulpa de naranja en medio ácido (HCl 4,3 M donde es probada la estabilidad del BY) empleando MAE. Para ello se empleó un aparato de microondas comercial de uso doméstico, operando a 850 W de potencia. Luego se agregaron 5,0 mL de HCl (4,8 M) y se llevó al microondas por 30 s en un recipiente convenientemente tapado. Se colocó por 5 minutos en heladera y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. El sobrenadante se trasvasó a un tubo de centrifuga y se centrifugó por 15 minutos a alta velocidad. El clean-up, la etapa de limpieza, se realizó en una columna de carbón activado previamente purificado (diámetro 0,8 cm, altura del relleno 2 cm); la cual fue acondicionada con 5 mL de HCl 4,8 M.

En nuestro laboratorio previamente se había demostrado que el método era exacto para la recuperación de BY en muestras previamente fortificadas antes del proceso de extracción [20].

• **Método de extracción para orina humana**

Luego de realizar dieta durante 48 horas de aquellos alimentos que elevan los niveles de serotonina en el organismo, se recolectó la orina durante 24 horas y se acidificó para frenar toda actividad enzimática basado en protocolos de literatura [21]. Por cada mililitro de orina se realizaron 5 extracciones con 2 mL de éter etílico, obteniéndose un conjunto de extractos de éter, que se dividió: a una parte se le realizaron 2 extracciones con 1 mL de buffer pH =6,994 por mL de éter, se obtuvo un conjunto de extractos a pH=6,994; y a otra se la evaporó, retomó en metanol y se la llevó

posteriormente a pH = 6,994 con buffer. En ambos casos las soluciones finales tenían un 2% de extracto y estaban al 95% de buffer pH = 6,994. EL experimento se realizó con las soluciones por triplicado a un sólo nivel de fortificado.

4. Resultados y discusión

4.1 Determinación de BY por complejación con C8S

Anteriormente en el grupo de investigación se estudió el tipo de interacción entre el C8S y BY, se determinó la K_A y la relación de rendimientos cuánticos de fluorescencia entre el sustrato complejado y el sustrato libre (Φ) [22].

El fungicida BY y C8S forman complejos de diferentes estequiometrías. La formación del complejo 1:1 se observa hasta la relación de estequiometría 1:1 e induce el incremento de las intensidades de emisión de fluorescencia, posteriormente la disminución de la fluorescencia indica la formación de complejos con otras estequiometrías. El valor de la relación de rendimiento cuántico entre BY complejado y libre, para el complejo 1:1, indicarían la disminución de la relajación mediante mecanismos no radiativos. La afinidad entre BY y *p*-sulfonatocalix[8]areno se atribuye a interacciones ión-ión y catión- π .

Los valores determinados fueron $K_A = (6 \pm 2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y $\Phi = (3,1 \pm 0,7)$ para la relación de rendimientos cuánticos de fluorescencia obtenidos por intensificación de la fluorescencia de BY en presencia de C8S.

• Determinación de los parámetros analíticos

Las curvas de calibración para la determinación de los parámetros analíticos se realizaron midiendo las intensidades de emisión de fluorescencia a varias concentraciones de BY en ausencia y en presencia de C8S 7 μ M teniendo en cuenta las mejores condiciones experimentales establecidas previamente. La

solución concentrada de BY se preparó en HCl 5 M. Esta solución es estable durante aproximadamente 15 días. Mientras que las disoluciones de BY a pH = 1,000 empleadas son estables por 24 horas. En estas condiciones, pasado los tiempos especificados, el pesticida se hidroliza mediante un mecanismo de catálisis intramolecular. Las determinaciones se realizaron a 7 niveles de concentración por triplicado. Los intervalos lineales se observaron a concentraciones de BY hasta 8 μM en ausencia de C8S y hasta 6 μM en presencia del receptor macrocíclico. A partir de las curvas de calibración se determinaron las sensibilidades de BY en ausencia y en presencia de C8S (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros analíticos para BY a pH = 1,000.

Especies	S_{BI}^a	$m, 10^4 M^{-1} b$	LD ^c	LC ^c
BY	0,03	$5,5 \pm 0,1$	$(0,526 \pm 0,009) \mu\text{g mL}^{-1}$ $(1,81 \pm 0,03) \mu\text{M}$	$(1,59 \pm 0,03) \mu\text{g mL}^{-1}$ $(5,5 \pm 0,1) \mu\text{M}$
BY - C8S	0,004	$9,8 \pm 0,5$	$(0,039 \pm 0,002) \mu\text{g mL}^{-1}$ $(0,134 \pm 0,007) \mu\text{M}$	$(0,118 \pm 0,006) \mu\text{g mL}^{-1}$ $(0,41 \pm 0,02) \mu\text{M}$

^a La desviación estándar del blanco, s_{BI} , se calculó midiendo 20 o más soluciones blanco independientemente preparadas ($n \geq 20$). Los valores que superaron $2s_{BI}$ la media del blanco a un nivel de confianza del 95 %, se consideraron anómalos.

^b Los errores se determinaron mediante el programa estadístico.

^c Los errores se calcularon por propagación de errores.

El valor del límite de detección de BY (Tabla 1) en ausencia de C8S concuerda, dentro del error experimental, con el valor determinado previamente en el grupo LD = $(0,66 \pm 0,07 \mu\text{g mL}^{-1})$ utilizando otro espectrofluorímetro [4]. La sensibilidad de calibración BY es mayor en presencia de C8S. El límite de detección, calculado según la definición actual de la IUPAC ($3,29 s_{BI}/m$), es menor en presencia del receptor C8S. El porcentaje de

disminución del límite de detección de BY por adición de CBS, establecido mediante la Ecuación 10 presentada a continuación, es 93 %.

$$LD = \frac{LD \text{ mayor} - LD \text{ menor}}{LD \text{ mayor}} 100 \% \quad \text{Ecuación 10}$$

El valor determinado de LD es comparable con los valores establecidos entre BY y otros macrociclos estudiados en el grupo (Hidroxipropil- β -ciclodextrina HP β CD ($17,4 \pm 0,8$) ng mL⁻¹) y menor en comparación con el LD de este pesticida en presencia de *p*-sulfonatocalix[6]areno (128 ± 9) ng mL⁻¹ (C6S) [23].

4.1.1. Aplicabilidad del método propuesto en muestras de agua corriente y extracto de naranja

Los ensayos de recuperación de los analitos sobre matrices reales, agua corriente (10 % v/v y 5 % v/v) y extracto de naranja, se realizaron por triplicado. Los ensayos se determinaron aplicando el método de adiciones de estándar (Method of standard additions, MOSA).

· Muestras de agua corriente

En la siguiente tabla se presentan las recuperaciones determinadas (Tabla 2).

Tabla 2. Recuperaciones de BY en muestras de agua corriente ^a

Cantidad adicionada, μM	Cantidad determinada, μM	R, % ^d
5,50 ^b	5,89	107 (7)
5,40 ^c	5,45	102 (9)

^a [C8S] = 6,90 μM ; solución reguladora de pH = 1,000; 25,0 °C. No se detectó BY en las soluciones blanco.

^b Agua corriente 5 % (v/v).

^c Agua corriente 10 % (v/v).

^d Recuperación. Entre paréntesis se expresa la desviación estándar para las determinaciones por triplicado.

Muestras de extracto de pulpa de naranja

Para el estudio fluorimétrico del BY se utilizó un 2% v/v del extracto de pulpa de naranja obtenido de acuerdo a la metodología del apartado 3.2. [3].

En la Tabla 3 se presentan las recuperaciones realizadas con muestra de extracto de pulpa de naranja.

Tabla 3. Recuperaciones aparentes de BY en muestras de extracto de pulpa de naranja ^a

Cantidad adicionada, μM	Cantidad determinada, μM	RC, % ^b
4,92	4,92	100 (9)

^a [C8S] = 8,00 μM ; solución reguladora de pH = 1,000; 25,0 °C.

^b Recuperación aparente. Entre paréntesis se expresa la desviación estándar para las determinaciones por triplicado.

Luego se aplicó a los valores de las recuperaciones para cada matriz el test t de dos colas de nivel de confianza al 95% para verificar que no existan

diferencias significativas respecto al 100% para las recuperaciones. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Recuperaciones de BY en diferentes matrices para el nivel de fortificado (Tabla 2 y 3)

Exactitud del método		
Matriz	% R ^a	t ^c
Extracto de pulpa de naranja	100 ^b (9)	0,01
Agua corriente 5 % (v/v)	107 (7)	1,00
Agua corriente 10 % (v/v)	102 (9)	0,22

^a Entre paréntesis se expresan la desviación estándar de los triplicados.
^b En este caso es recuperación aparente.
^c Valor del estadístico t experimental según n grados de libertad.

Se comparó el valor teórico del estadístico t (Ecuación 11) correspondiente al número de grados de libertad (2) de los ensayos por triplicados (n) para un nivel de confianza de 95 % (4,30) con todos los t experimentales calculados y se obtuvieron t menores al t teórico (Tabla 4).

Estos resultados validan la determinación de BY en muestras de agua corriente y extracto de pulpa de naranja por el método de fluorescencia intensificado con C8S.

4.2. Validación de un método espectrofluorimétrico supramolecular para la determinación de 6-Hidroximelatonina en presencia de Hidroxipropil-β-ciclodextrina en muestras reales

En nuestro laboratorio se había estudiado el efecto de receptores macrocíclicos en las propiedades espectroscópicas del metabolito de la hormona melatonina, la 6M, a pH = 6,994, $\lambda_{ex} = 300 \text{ nm}$ y $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$. El incremento de la señal fluorescente de la 6M en presencia de β -ciclodextrina (10 mM β CD, 40%) y de Hidroxipropil- β -ciclodextrina (10 mM HP β CD, 210%) con respecto al sustrato sólo en buffer de pH = 6,994, evidencian la estabilización del estado excitado a través de la emisión fluorescente. La constante de asociación determinada fue $K_A^{HP\beta CD} = 60 \pm 2 \text{ M}^{-1}$, en tanto que para β CD los datos experimentales no se correlacionaron con el modelo de la Ecuación 3 del Capítulo V [24].

En éste trabajo de tesis se decidió determinar los parámetros analíticos con HP β CD y β CD (Tabla 5) con el objetivo de comparar con los resultados de otros indoles estudiados previamente a pH = 6,994.

Tabla 5. Parámetros analíticos para 6M con β CD y HP β CD

Parámetros	Medio		
	buffer pH= 6,994	β CD 10 mM	HP β CD 10 mM
$m (10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L})$	$3,60 \pm 0,09$	$5,58 \pm 0,06$	$11,5 \pm 0,2$
$s_{BI} (10^{-3})$	(0,45)	(0,74)	(0,99)
LD (ng mL ⁻¹)	$1,02 \pm 0,02$	$1,09 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,02$

La sensibilidad de calibración obtenida en buffer pH= 6,994 a partir de la pendiente de la respuesta (señal de Fluorescencia) vs concentración de 6M es $m = 3,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ y $11,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ en ausencia y presencia del macrociclo (HP β CD 10 mM) respectivamente, evidenciando la mejora de sensibilidad con el receptor, en tanto que la mejora del límite de detección es un 30 %. En el caso de la β CD (10 mM) si bien se determinó un incremento de sensibilidad del 50 % con respecto al buffer, no hubo una mejora en el límite de detección. El LD

con HP β CD como nanosensor determinado en este trabajo es menor a 1 ng mL⁻¹ lo que indica que es un método muy sensible comparado con otros como la quimioluminiscencia (4-25 ng mL⁻¹) [25], fluorescencia con reacciones de derivatización (2 ng mL⁻¹) [26] o HPLC con detección de fluorescencia, técnicas de preconcentración como cromatografía electrocinética micelar y electroforesis capilar con detector UV (26 – 630 ng mL⁻¹) [27].

4.2.1. Aplicabilidad del método propuesto en muestras de orina de humano adulto sano

A continuación se explica el procedimiento que se llevó a cabo para realizar ensayos de recuperación a partir de una muestra real, orina de humano adulto y sano.

Con el objeto de corroborar la exactitud y precisión del método se estudió el efecto matriz en muestras de orina. La muestra fue recolectada, acondicionada y extraída de acuerdo a protocolos de literatura [21]. La mejor eficiencia en la extracción es generalmente en buffer pH =6,994 (para sustancias iónicas) siendo también más compatible con muestras biológicas. Pero para las sustancias neutras en nuestro laboratorio se había desarrollado un método de extractos en metanol evaporados y re-solubilizados en metanol que dieron buenos resultados para las recuperaciones de sustancias neutras fortificadas en los extractos de orina, como la 6M, como se ha detallado en el Apartado 3.2.

Se determinaron los porcentajes de recuperación aparente (RC) de 6M en los extractos de buffer y metanol tanto en ausencia como en presencia HP β CD, obteniéndose un efecto de la matriz positivo (117 %) y (106 %) para el método en buffer y un efecto negativo (50 %) en ausencia y positivo (200%) en presencia de HP β CD respectivamente para el método con metanol. Dados estos resultados para proporcionalizar este efecto se calculó la sensibilidad en presencia de matriz para el intervalo de 0,24-10,00 μ mol L⁻¹ de 6M en muestras de orina sin y con HP β CD para ambos extractos. Para el método empleando los

extractos de buffer pH= 6,994 se obtuvo $m = (4,1 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ y $m = (5,49 \pm 0,07) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ y para el método con metanol se obtuvieron $m = (18,7 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y $(2,38 \pm 0,03) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ en ausencia y presencia de HP β CD respectivamente. A partir de estas sensibilidades se obtuvieron buenos valores para las recuperaciones (95-109 %) de los fortificados de matrices procesadas.

Se comparó el valor teórico del estadístico t (Ecuación 11) correspondiente al número de niveles de concentración del analito estudiado (n) para un nivel de confianza de 95 %. En éste estudio se trabajó con 5 niveles de concentración, el valor teórico es $t(5) = 2,57$ que al compararlo con todos los t experimentales calculados con las sensibilidades obtenidas con matriz resultó ser mayor.

Estos resultados validan la determinación de 6M en muestras de orina por el método de fluorescencia intensificado con HPBCD.

5. Conclusiones generales

La sensibilidad del método para la determinación de BY empleando medidas de fluorescencia directa aumenta en presencia de C8S. El valor de LD disminuye 93 % en presencia del receptor, siendo comparable con las medidas de LD en presencia de otros macrociclos, por ejemplo por fluorescencia adicionando CD [28]. El método es exacto para determinar BY en muestras de agua potable y extracto de pulpa de naranja a un 95 % de nivel de confianza. La implementación del método analítico propuesto utilizando C8S como sistema supramolecular a temperatura ambiente es simple, rápida y económica.

Se han informado valores de constante de asociación de este sustrato con *p*-sulfonatocalix[6]areno formando un complejo de estequiometría 1:1 en el intervalo de concentraciones entre (0 – 35) μM del macrociclo, $K_A = 2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ [14]. Las constantes de asociación de BY con las ciclodextrinas αCD e HP βCD son menores ($K_A = 170 \text{ M}^{-1}$ y $K_A = 30 \text{ M}^{-1}$, respectivamente) [20].

Por otro lado la formación de los complejos supramoleculares con HP β CD proporcionan un método alternativo espectrofluorimétrico, eficaz y directo para la determinación de 6M. El LD informado aquí para el método de fluorescencia directa de (0,7 ng mL⁻¹) es mejor o del mismo orden que el informado en literatura para otros métodos espectrofotométricos, fluorimétricos y de HPLC con detección fluorescente. Este LD permite la cuantificación (LC) de 6M en los niveles normales de excreción urinaria diaria adultos humanos (10 mg / día). Estos valores son equivalentes a 10 ng mL⁻¹ en la cantidad de extracto diluido de la orina (0,2 mL de extracto de orina en 10 mL de volumen final) que fue el utilizado en los experimentos de recuperación aparente.

Los métodos espectrofluorimétrico desarrollados en presencia de C8S y de HP β CD como nanosensores evitan condiciones experimentales previas potencialmente dañinas, reacciones de derivatización, el uso de solventes peligrosos y simplifican las etapas experimentales en el tratamiento de la muestra.

6. Bibliografía

- [1] K. Danzer and L. A. Currie, "Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 70. pp. 993–1014, 1998.
- [2] J. N. Miller, "Basic statistical methods for Analytical Chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review," *Analyst*, vol. 116, no. 1, pp. 3–14, 1991.
- [3] W. Gardiner, "*Statistical analysis methods for chemists. A software-based approach.*" The Royal Society of Chemistry, 1997.
- [4] G. L. Long and J. D. Winefordner, "Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition," *Anal. Chem.*, vol. 55, no. 7, p. 712A–724A, 1983.
- [5] A. R. Hill and S. L. Reynolds, "Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds.," *Analyst*, vol. 124, pp. 953–958, 1999.
- [6] A. (eds) in Inczédy, J.; Lengyel, T; Ure, A.; Gelencsér, A.; Hulanichi, "*Compendium of analytical nomenclature (definitive rules 1997)*," Third. England, Blackwell Science, 1998.
- [7] K. Danzer and L. A. Currie, "Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 70, no. 4. pp. 993–1014, 1998.
- [8] J. C. Miller, "*Estadística para la Química Analítica*," 2nd ed. Addison-Wesley Iberoamericana, 1993.
- [9] A. K. Y. Hans-Jörg Schneider, "*Principles and methods in supramolecular chemistry.*" Wiley, J. and Sons, 2000, p. 349.
- [10] A. M. Committee, "Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit," *Analyst*, vol. 112, no. 2, pp. 199–204, 1987.
- [11] L. A. Currie, "INTERNATIONAL UNION OF PURE NOMENCLATURE IN EVALUATION OF ANALYTICAL METHODS INCLUDING DETECTION Nomenclature in evaluation of analytical methods , including detection and quantification capabilities ' (IUPAC Recommendations 1995)," vol. 67, no. 10, pp. 1699–1723, 1995.

- [12] L. A. Currie, "Detection and quantification limits: origins and historical overview," *Anal. Chim. Acta*, vol. 391, no. 2, pp. 127–134, 1999.
- [13] S. Chow and J. Liu, "Statistical design and analysis in pharmaceutical science." Dekker, Marcel, 1995.
- [14] I. Union, O. F. Pure, A. Chemistry, A. C. Division, C. On, G. Aspects, O. F. Analytical, D. T. Burns, K. Danzer, and A. Townshend, "COMMISSION ON GENERAL ASPECTS OF ANALYTICAL CHEMISTRY * USE OF THE TERMS ' RECOVERY ' AND ' APPARENT RECOVERY ' IN ANALYTICAL PROCEDURES (IUPAC Recommendations 2002) Use of the terms ' recovery ' and ' apparent recovery ' in analytical procedures (IUPAC," vol. 74, no. 11, pp. 2201–2205, 2002.
- [15] H. N. W. C. R. N. Strauts, J.H. Gilfillan, "Analytical Chemistry—The Working Tools." London: Press, Oxford University, 1958, p. 228.
- [16] A. Zlotorzynski., "The application of microwave radiation to analytical and environmental chemistry' .," *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 25, no. 43, 1995.
- [17] N. T. V. López-Avila, R. Young, "Microwave-assisted extraction as an alternative to Soxhlet, sonication and supercritical fluid extraction," *J. AOAC Int.*, vol. 79, no. 142, 1996.
- [18] M. I. M. H. Pylypiw, Jr., T. Arsenault, C. Thetford, "Suitability of microwave-assisted extraction for multiresidue pesticide analysis of produce," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, no. 3522, 1997.
- [19] Z. Z. G. Xiong, B. Tang, X. He, M. Zhao, Z. Zhang, "Comparison of microwave-assisted extraction of triazines from soils using water and organic solvents as the extractants," *Talanta*, vol. 48, no. 333, 1999.
- [20] 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*, vol. 624, pp. 133–140, 2008.
- [21] N. W. Tietz, "Fundamental of Clinical Chemistry," Thirds., no. v. 564. 1987, p. 607.
- [22] V. N. Sueldo Ocelllo, "Efecto de cucurbiturilos en las propiedades fisicoquímicas de compuestos orgánicos . Aplicaciones analíticas," Universidad Nacional de Córdoba, 2011.

- [23] N. L. Pacioni, "Pesticidas en sistemas organizados: Propiedades Fisicoquímicas y aplicaciones analíticas. Determinación analítica de pesticidas.," Universidad Nacional de Córdoba, 2007.
- [24] A. G. Bracamonte, "Compuestos de Interés Biológico y Farmacéutico en Sistemas Organizados. Reactividad y Aplicaciones Analíticas," Universidad Nacional de Córdoba, 2008.
- [25] J. Lu, C. Lau, M. K. Lee, and M. Kai, "Simple and convenient chemiluminescence method for the determination of melatonin," *Anal. Chim. Acta*, vol. 455, pp. 193–198, 2002.
- [26] M. Minami, H. Takahashi, H. Inagaki, Y. Yamano, S. Onoue, S. Matsumoto, T. Sasaki, and K. Sakai, "Novel tryptamine-related substances, 5-sulphatoxydiacetyltryptamine, 5-hydroxydiacetyltryptamine, and reduced melatonin in human urine and the determination of those compounds, 6-sulphatoxymelatonin, and melatonin with fluorometric HPLC," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, pp. 814–822, 2009.
- [27] J. Musijowski, E. Pobozy, and M. Trojanowicz, "On-line preconcentration techniques in determination of melatonin and its precursors/metabolites using micellar electrokinetic chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1104, pp. 337–345, 2006.
- [28] N. L. Pacioni, V. N. Sueldo Ocelllo, M. Lazzarotto, and A. V. Veglia, "Spectrofluorimetric determination of benzimidazolic pesticides: effect of p-sulfonatocalix[6]arene and cyclodextrins.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 624, no. 1, pp. 133–40, 2008.
-

Conclusiones Generales

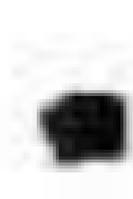


En este trabajo de tesis se abordó el estudio de las propiedades fisicoquímicas de calixarenos y tiacalixarenos.

Se adquirió destreza en la síntesis y caracterización espectroscópica de compuestos macrocíclicos.

Se determinaron las constante de disociación ácido-base de *p*-*tert*-butiltiacalix[4]areno, *p*-*tert*-butilcalix[4]areno y *p*-*tert*-butilcalix[6]areno en mezclas de etanol-agua 3:1 v/v. En estas determinaciones se pudo observar e interpretar la influencia de la interacción con el catión metálico de la base sobre las deprotonaciones de los macrociclos.

Se evaluaron los sistemas de *p*-*tert*-butiltiacalix[4]areno y *p*-*tert*-butilcalix[4]areno con benomilo y paraquat a diferentes pH con el objeto de determinar la interacción de las distintas especies ácido-base de los receptores y los sustratos. A partir de un estudio más detallado a pH=6 se pudo determinar la formación de los complejos de *p*-*tert*-butiltiacalix[4]areno con ácido cafeico por quenching de fluorescencia estático y con paraquat por exaltación de fluorescencia. Como proyección de estos resultados se propone el desarrollo de métodos analíticos con estos sistemas. Se desarrollaron métodos analíticos supramoleculares para los sistemas ácido *p*-sulfonatocalix[8]areno con benomilo y el sistema hidroxipropil- β -ciclodextrina con 6-hidroximelatonina, en ambos métodos los límites de detección obtenidos fueron iguales o menores que otros informados en literatura y se validaron en muestras reales.



Las siguientes publicaciones y trabajos en redacción han sido elaborados en base a resultados parciales presentados en este trabajo de tesis:

- A. G. Bracamonte, G. G. Miñambres y A. V. Veglia, "Supramolecular analytical chemistry: spectrofluorimetric determination of 6-hydroxymelatonin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin"; *Arkivoc*, vii, 439-449, 2011.
- V. N. Sueldo Ocello, G. G. Miñambres, G. Fortunato, A. V. Veglia, "Binding and sensing of fluorescent probes by *p*-sulphonatocalix[8]arene." (En redacción).
- G. G. Miñambres, M. Lazzarotto, A. V. Veglia, "Metal effects on the acid-base constants of *p*-*t*-butyl-thia-calix[4]arene, *p*-*t*-butyl-calix[4]arene and *p*-*t*-butyl-calix[6]arene". (En redacción).

Durante el periodo de esta tesis se publicó el siguiente trabajo con resultados previos al desarrollo de la misma:

- G. G. Miñambres, M. Y. Conles, E. I. Lucini, R. A. Verdenelli, J. M. Meriles, J. A. Zygodlo "Application of thymol and iprodione to control garlic white rot(*Sclerotium cepivorum*) and its effect on soil microbial communities"; *World J Microbiol Biotechnol* 26:161–170, 2010.

