

Departamento de Química Física

FACULTAD DE QUÍMICA / CIQUS

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



**RECONOCIMIENTO Y AUTOENSAMBLAJE
DE SISTEMAS SUPRAMOLECULARES
DERIVADOS DE CALIXARENOS,
CICLODEXTRINAS Y CUCURBITURILOS**

Josefa Fernández Rosas
Santiago de Compostela 2017





Departamento de Química Física

FACULTAD DE QUÍMICA / CIQUS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

**RECONOCIMIENTO Y AUTOENSAMBLAJE
DE SISTEMAS SUPRAMOLECULARES
DERIVADOS DE CALIXARENOS,
CICLODEXTRINAS Y CUCURBITURILOS**

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Memoria que, para optar al Grado de Doctor en Química por la Universidad de Santiago de Compostela, presenta Josefa Fernández Rosas.
Santiago de Compostela 2017

Fdo. Josefa Fernández Rosas





D. Luis García Ríó,

Catedrático de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela

Dña. María Mercedes Parajó Montes,

Profesora Contratada Doctora de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMAN

Que el trabajo descrito en esta memoria con el título "Reconocimiento y autoensamblaje de sistemas supramoleculares derivados de Calixarenos, Ciclodextrinas y Cucurbiturilos" presentado por Dña. Josefa Fernández Rosas para optar al Grado de Doctor en Química, ha sido realizada bajo su dirección en los laboratorios del Departamento de Química Física y del Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS). Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autorizan su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Para que así conste, firman la presente en
Santiago de Compostela a 27 de Junio de 2017

Luis García Ríó

María Mercedes Parajó Montes



Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis Luís García Rí o y Mercedes Parajó Montes, por su orientación y ayuda en el desarrollo de este trabajo. Sin olvidarme de Pedro Rodríguez Dafonte, quien también forma parte de este grupo Reactividad y Catálisis.

Agradezco al Ministerio de Economía y Competitividad por el apoyo concebido a través de la beca FPI (BES-2012-054593) para llevar a cabo mi tesis doctoral.

A todos mis compañeros de laboratorio, a los que ya no están como: Luz, Miguel, Serxio, Silvia, Vitor...y, por supuesto, a mi portuguesa favorita y amiga Márcia, por enseñarme y ayudarme tanto en lo profesional como en lo personal, obligada por todo; a los que vinieron de estancia como Edu, Lucía y Nitin; y a los que quedan como Alba, Álvaro, Ángel, Bea, Borja, Mariña y Roberto, gracias por toda la ayuda prestada, por todos los buenos momentos compartidos, por las infinitas risas y por un ambiente de trabajo inmejorable. Y como no a María, mi fiel compañera, pero sobre todo amiga, gracias por compartir esta aventura conmigo y las que nos quedan por vivir, por las miles de conversaciones, cafés, cenas... pero sobre todo por apoyarme y entenderme solo con una mirada.

A toda la gente que conocí en el lugar de trabajo (CIQUS), Carmen Ferreiro, Carmen Rey, Flora, Juan, Karen, Lucas, Noela, Ramón, Ronald...por tener siempre una sonrisa para mí. En especial a Mencha y Noelia, por los descansos y las risas compartidas. También gracias a la Química, conocí a compañeras de carrera que ahora son amigas, Bea, Sara, Sonia García y Sonia González, gracias por ese comienzo de etapa.

A mis amigas, Alexandra, Estela, Iria, Noelia, Nuria, Rosa y Sandra...por animarme siempre y hacerme desconectar, gracias por entenderme Globos de Helio.

Quiero agradecer en especial a mis padres, por el apoyo y motivación constante, por creer en mí y sentirnos orgullosos, nada de esto sería posible sin vosotros.

A ti Manu, por estar a mi lado, apoyarme y no dejarme caer. Seamos felices!!!



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN

CTQ2014-55208-P



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE CULTURA, EDUCACIÓN
E ORDENACIÓN UNIVERSITARIA

GR 2007/085
IN607C 2016/03
ED431G/09



PROYECTO COFINANCIADO
POR LA UNIÓN EUROPEA
FONDO EUROPEO DE
DESARROLLO REGIONAL





Dedicado a mi abuelo, Manuel Rosas.

“Sempre xuntos meniña”.



Índice General

Prólogo	1
1 Introducción	5
1.1 Química Supramolecular	5
1.2 Complejos <i>host:guest</i>	7
1.2.1 Ciclodextrinas.....	10
1.2.1.1 Introducción, estructura y propiedades	10
1.2.1.2 Química <i>host:guest</i> de las CDs	12
1.2.2 Cucurbit[<i>n</i>]urilos	15
1.2.2.1 Introducción, síntesis y propiedades físico-químicas.....	15
1.2.2.2 Química <i>host:guest</i> de los CB[<i>n</i>].....	18
1.2.3 Calix[<i>n</i>]arenos	24
1.2.3.1 Introducción, síntesis y propiedades físico-químicas.....	24
1.2.3.2 Calix[<i>n</i>]arenos como receptores catiónicos.....	27
1.2.3.3 Calix[<i>n</i>]arenos como receptores aniónicos	30
1.3 Bibliografía	34
2 Modulación de la reactividad química por complejación múltiple con γ-Ciclodextrina	39
2.1 Introducción.....	39
2.2 Sección Experimental	41
2.3 Resultados y Discusión.....	43
2.3.1 Determinación de las constantes de equilibrio para la formación de los complejos 1:1 y 1:2 entre γ -CD y los surfactantes catiónicos (<i>C_nTAB⁺</i>)	44
2.3.1.1 Difusiometría de RMN	44
2.3.2 Determinación de las constantes de equilibrio para la formación de los complejos 1:1 y 1:2, entre γ -CD y los surfactantes catiónicos con la molécula de NPA	51
2.3.2.1 Difusiometría de RMN	51
2.3.3 Caracterización estructural de los complejos múltiples, mediante la adición simultánea de surfactante catiónico y NPA a la γ -CD.....	54
2.3.3.1 Difusiometría de RMN	54
2.3.4 Determinación de las constantes de equilibrio para la formación de los múltiples, mediante la solvólisis del MBSC en presencia de γ -CD.....	57

2.3.4.1	Solvólisis del MBSC en presencia de la γ -CD	57
2.3.4.2	Solvólisis del MBSC en presencia de micelas catiónicas.....	59
2.3.4.2.1	<i>Método conductivimétrico</i>	61
2.3.4.3	Solvólisis del MBSC en presencia del sistema mixto CD/surfactante	62
2.3.4.3.1	<i>Descripción cuantitativa del modelo competitivo</i>	64
2.3.4.3.2	<i>Descripción cualitativa</i>	66
2.3.4.3.3	<i>Método conductivimétrico</i>	67
2.3.4.3.4	<i>Descripción cualitativa de la formación de complejos múltiples de modo cooperativo</i>	68
2.1	Conclusión	74
2.2	Bibliografía	75
3	Influencia del Cucurbit[7]urilo en la hidrólisis del N-picolinoilimidazol	77
3.1	Introducción.....	77
3.2	Sección Experimental.....	79
3.3	Resultados y Discusión.....	82
3.3.1	Hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I) en presencia de CB7	83
3.3.2	Influencia del disolvente en el proceso de hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I)	85
3.3.3	Influencia del pH en la hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I) en presencia de los distintos porcentajes de acetonitrilo	87
3.3.4	Formación del complejo de inclusión entre CB7 y 4-Nitroanilina, en presencia de distintas concentraciones de acetonitrilo.....	90
3.3.5	Caracterización estructural de los complejos formados entre el CB7 y 1-Butilimidazol (II)	94
3.3.5.1	Análisis de los espectros de ^1H RMN	95
3.3.6	Caracterización estructural de los complejos formados entre el CB7 y 1-Butilimidazol (II), en presencia de acetonitrilo	96
3.3.6.1	Análisis de los espectros de ^1H RMN	96
3.4	Conclusión.....	102
3.5	Bibliografía.....	104
4	Nanopartículas supramoleculares derivadas del Cucurbit[7]urilo y Surfactantes zwitteriónicos	105
4.1	Introducción.....	105
4.2	Sección Experimental.....	107
4.3	Resultados y Discusión.....	110

4.3.1	Formación de los complejos <i>host:guest</i> entre Sulfobetainas y CB7	110
4.3.1.1	Determinación de las constantes de equilibrio entre CB7 y las Sulfobetainas	110
4.3.1.2	Caracterización estructural de los complejos <i>host:guest</i> entre CB7 y las Sulfobetainas	115
4.3.1.2.1	<i>Análisis de los espectros de ¹H RMN</i>	116
4.3.1.2.2	<i>¹H TCOSY</i>	117
4.3.2	Influencia del CB7 en el proceso de micelización de las Sulfobetainas	119
4.3.2.1	Tensión superficial.....	119
4.3.3	Caracterización de las nanopartículas supramoleculares (SNPs) basadas en CB7.....	122
4.3.3.1	DLS	122
4.3.3.2	Crio-TEM.....	124
4.3.4	Las SNPs como portadoras de fármacos	129
4.4	Conclusión.....	132
4.5	Bibliografía.....	134
5	Autoagregación de los Calix[4]arenos Catiónicos Anfífilicos e Interacción con el Cucurbit[7]urilo	137
5.1	Introducción.....	137
5.2	Sección Experimental.....	138
5.3	Resultados y Discusión.....	142
5.3.1	Autoagregación de los Calix[4]arenos Catiónicos Anfífilicos	142
5.3.1.1	Método conductivimétrico	143
5.3.1.2	Influencia de la estructura de los surfactantes sobre la energía libre de micelización (ΔG_M^0) en el proceso de agregación	145
5.3.1.3	Influencia de la longitud de la cadena alquílica en el proceso de micelización de los calix[4]arenos catiónicos anfífilicos	146
5.3.2	Fluorescencia de emisión de distintas sondas en presencia de calix[4]arenos catiónicos anfífilicos	149
5.3.2.1	Sonda fluorescente 1,8-ANS.....	149
5.3.2.2	Sonda fluorescente Rojo Nilo	156
5.3.2.3	Sonda fluorescente Prodan.....	158
5.3.3	Caracterización del agregado formado por el Calix[4]areno Catiónico Anfífilico (TMAC4TD).....	159

5.3.3.1	Difusiometría de RMN y DLS.....	159
5.3.4	Caracterización de los agregados basados en la interacción entre el CB7 y el Calix[4]areno Catiónico Anfílico (TMAC4TD)	163
5.3.4.1	DLS y Crio-TEM.....	164
5.3.5	Encapsulación del 1,8-ANS por la vesícula	166
5.4	Conclusión.....	168
5.5	Bibliografía.....	170

6 Capacidad de los Calix[4]arenos Modificados como Receptores Aniónicos en medio acuoso173

6.1	Introducción.....	173
6.2	Sección Experimental.....	175
6.3	Resultados y Discusión.....	181
6.3.1	Complejación del TMAC4TP con su propio contraión (BF_4^-) y con un <i>guest</i> aniónico (TSNa).....	182
6.3.1.1	Complejación del contraión por el macrociclo.....	182
6.3.1.2	Complejación del TMAC4TP con el <i>p</i> -toluensulfonato sódico (TSNa) .184	
6.3.1.2.1	<i>Análisis de los espectros de ^1H RMN</i>	184
6.3.1.2.2	<i>Fluorescencia de emisión del pireno en presencia de TMAC4TP y TSNa</i>	185
6.3.2	Complejación del IC4 con su propio contraión (Cl^-) y con distintos <i>guests</i> aniónicos	187
6.3.2.1	Complejación del contraión por el macrociclo, utilizando un colorante, la lucigenina (LCG)	188
6.3.2.2	Complejación del IC4 con <i>p</i> -toluensulfonato sódico (TSNa).....	191
6.3.2.2.1	<i>Análisis de los espectros de ^1H RMN</i>	191
6.3.2.2.2	<i>Determinación de la constante de equilibrio entre el IC4 y el TSNa</i>	192
6.3.2.3	Complejación del IC4 con 4-HidroxiBenzoato (4-HyBz)	193
6.3.2.3.1	<i>Análisis de los espectros de ^1H RMN</i>	194
6.3.2.3.2	<i>Determinación de la constante de equilibrio entre el IC4 y el 4-HyBz</i>	195
6.3.3	Complejación del TC4 con distintos <i>guests</i> aniónicos	197
6.3.3.1	Complejación del TC4 con <i>p</i> -toluensulfonato sódico (TSNa)	197
6.3.3.1.1	<i>Análisis de los espectros de ^1H RMN</i>	197

6.3.3.2 Complejación del TC4 con el ácido 1,3-Propanodisulfónico disodium sal (PropdSNa).....	198
6.3.3.2.1 <i>Determinación de la constante de equilibrio entre el TC4 y el PropdSNa</i>	198
6.4 Conclusión.....	200
6.5 Bibliografía.....	201
7 Influencia del contraión como factor decisivo en la formación de complejos <i>host:guest</i> entre p-Sulfonatocalix[4]areno y Betaínas	203
7.1 Introducción.....	203
7.2 Sección Experimental.....	204
7.3 Resultados y Discusión.....	207
7.3.1 Formación de los complejos <i>host:guest</i> entre las Betaínas y SC4	207
7.3.1.1 Caracterización estructural y determinación de las constantes de equilibrio de los complejos por ¹ H RMN	207
7.3.1.2 Determinación de las constantes de equilibrio de los complejos por ITC	213
7.3.1.2.1 <i>Influencia de los cationes sodio sobre la constante de equilibrio entre Bet_1 y SC4</i>	214
7.4 Conclusión.....	221
7.5 Bibliografía.....	222



Prólogo

La química supramolecular se puede dividir en dos campos principales: la química *host:guest* y el autoensamblaje molecular. Por tanto, será necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos de formación de complejos *host:guest* desde un punto de vista cinético y termodinámico, así como en las propiedades de autoagregación de los *hosts* hidrofóbicos.

La finalidad a largo plazo de esta tesis es la modulación de la reactividad, el reconocimiento y autoensamblaje de sistemas supramoleculares en medio acuoso. En concreto, se describe la formación de complejos *host:guest* utilizando distintos receptores macrocíclicos (*hosts*) como ciclodextrinas, cucurbiturilos y calixarenos. Las características estructurales de los distintos *hosts* facilitan la incorporación de moléculas neutras, aniones y cationes, lo que los convierte en medios de reacción que pueden catalizar los procesos que en ellas tienen lugar, y también para autoasociarse y conseguir la formación de agregados coloidales.

En el capítulo 2 se ha realizado un estudio sobre el uso de la γ -CD como nuevo medio de reacción en la catálisis supramolecular. Por un lado, se llevó a cabo un estudio cinético de la sonda química cloruro 4-metoxibencenosulfonilo (MBSC) en presencia del sistema mixto formado por: surfactantes catiónicos (C_n TAB $n = 8, 10, 14, 18$) y γ -CD. Mientras que por experimentos de RMN, se estudió la formación de complejos múltiples mediante la adición simultánea del surfactante catiónico y la molécula orgánica *p*-nitrofenilacetato (NPA) a una disolución de γ -CD. Los resultados obtenidos por experimentos cinéticos y de DOSY permiten determinar que la γ -CD puede formar distintos tipos de complejos 1:1, 1:2 y 1:1:1, con los dos *guests* operando simultáneamente. Se ha observado un efecto cooperativo en la formación del complejo triple.

El capítulo 3 se centra en la formación de un complejo de inclusión entre el CB7 y la amida (N-picolinoilimidazol), así como la influencia del disolvente (CH_3CN) en dicho complejo. Se estudió la reacción de hidrólisis del N-picolinoilimidazol en presencia de CB7 a distintos porcentajes de acetonitrilo, y observamos una aceleración de la velocidad de reacción con el aumento del porcentaje de acetonitrilo. Para explicar este aumento de la velocidad, se han realizado estudios para detectar si el acetonitrilo interaccionaba con el N-picolinoilimidazol o se complejaba con el CB7. Finalmente, se observó a través de un estudio de la influencia del acetonitrilo en la complejación del CB7 con la 4-Nitroanilina, que el CH_3CN puede formar complejo con el CB7. A mayores se realizaron experimentos de ^1H RMN, que nos han permitido confirmar que el acetonitrilo forma parte del complejo 1:1 (CB7:N-picolinoilimidazol), dando lugar a la formación del complejo triple 1:1:1 entre CB7:N-picolinoilimidazol: CH_3CN . Por tanto, se ha explicado el aumento de velocidad de reacción al aumentar el porcentaje de acetonitrilo, considerando que el disolvente se introduce en la cavidad del macrociclo y desplaza al N-picolinoilimidazol, situándolo próximo de los portales del CB7 y haciéndolo más accesible al ataque del agua, produciéndose un aumento de la constante de velocidad observada para la hidrólisis del N-picolinoilimidazol.

En el capítulo 4 se ha descrito la formación de complejos de inclusión entre el CB7 y los surfactantes zwitteriónicos (sulfobetainas) con cadenas alquílicas de diez a dieciséis grupos metileno. Los valores de las constantes de equilibrio entre el CB7 y las sulfobetainas se han determinado a través de experimentos competitivos, utilizando el sustrato *trans*-4-[4-(dimetilamino)-estiril]-1-metilpiridinio (DSMI^+) como competidor, y se ha demostrado que los valores de las constantes de equilibrio son independientes de la longitud de la cadena alquílica del surfactante. Los complejos *host:guest* han sido caracterizados por experimentos de RMN, y revelaron que el CB7 interactúa con el grupo catiónico de la sulfobetaina al incluir parte de la cadena alquílica. El motivo de unión tan fuerte está reticulado por moléculas de CB7 adicionales, dando lugar a la formación de nanopartículas supramoleculares (SNPs) con un tamaño de aproximadamente 200 nm y un potencial Z negativo, que han sido confirmadas por experimentos de DLS y CriotEM. La desagregación de las SNPs se llevó a cabo mediante la adición de cationes tetraetilamonio (TEA) dando como resultado una transición de SNPs a micela. Se investigó la encapsulación y liberación de fármacos a partir de SNPs, usando la sonda fluorescente carboxifluoresceína, indicando que tras la interrupción de SNPs por TEA, el

colorante fluorescente se localiza en los agregados micelares que pueden romperse por adición de ciclodextrina.

El capítulo 5 se centra en el estudio de la autoagregación de los calix[4]arenos catiónicos anfifílicos y su interacción con el CB7. En primer lugar, a partir de la técnica de conductividad eléctrica, se determinó el valor de la concentración micelar crítica (cmc) y de la fracción de carga micelar neutralizada (β) para estos macrociclos, y con estos valores se obtuvo la energía libre de micelización (ΔG_M^0) que disminuye con el incremento de la longitud de las cadenas alquílicas. Se ha planteado el comportamiento de estos macrociclos con distintas sondas (1,8-ANS, NR y Prodan) por fluorescencia de emisión. Los resultados obtenidos de los calix[4]arenos con el 1,8-ANS antes de la cmc, indican que la incorporación del grupo anilino en las cadenas alquílicas del macrociclo induciendo el desplazamiento de la banda de emisión (λ_{\max}), mientras que la complejación del grupo naftaleno por las cadenas alquílicas de un segundo macrociclo para dar el complejo 2:1, induce un aumento de la intensidad de fluorescencia.

Los resultados obtenidos sobre la interacción entre el CB7 y los cali[4]arenos catiónicos, permiten la formación de complejos del tipo 1:1, 2:1 y 1:2. A partir de experimentos de DLS se ha confirmado un aumento del tamaño del agregado, lo que supone la existencia de interacciones entre el CB7 y los agregados micelares de los calix[4]arenos. Las imágenes del Crio-TEM, confirman la formación espontánea de vesículas polidispersas para el sistema del CB7 con el TMAC4TD. Se estudió la encapsulación del 1,8-ANS por las vesículas y se confirmó su liberación mediante la adición de TEA, confirmándose también la desagregación de las vesículas por experimentos de DLS.

En el capítulo 6 se describe la formación de complejos de inclusión entre calix[4]arenos modificados, con su propio contraión o distintos *guests* aniónicos en disolución acuosa. La modificación del portal superior con sustituyentes catiónicos distintos, dota a los calix[4]arenos de la ventaja de actuar como receptores aniónicos. Estos cambios estructurales tienen un efecto importante en la complejación y la correcta elección de los grupos funcionales en los sitios de reconocimiento, es un paso crítico en el diseño y la construcción de este tipo de receptores moleculares, como se ha observado a lo largo del capítulo en los distintos procesos de complejación.

Finalmente, en el capítulo 7 se presenta un estudio de la influencia del contraión como factor decisivo en la formación de complejos *host:guest* entre *p*-sulfonatocalix[4]arenos y surfactantes (betaínas). Los resultados obtenidos por

experimentos de ITC y ^1H RMN, han permitido confirmar el efecto de los cationes Na^+ (añadidos o como contracción del macrociclo) sobre la formación de complejos de inclusión entre el SC4 y las betaínas de dos maneras distintas dependiendo de la longitud del espaciador de la betaína. Es decir, los cationes Na^+ pueden competir con las betaínas por la cavidad del calixareno dando lugar a un complejo binario SC4-Bet (modelo competitivo) o pueden formar un complejo triple SC4-Na-Bet (modelo competitivo-cooperativo), dependiendo de la longitud del espaciador de las betaínas.



1 Introducción

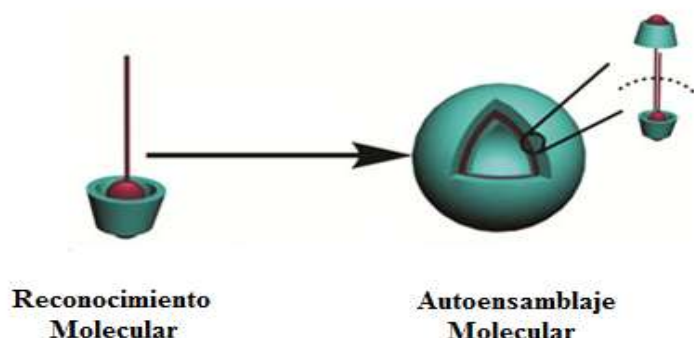
1.1 Química Supramolecular

La importancia de la química supramolecular fue establecida por el Premio Nobel de Química de 1987, otorgado a Donald J. Cram¹, Jean-Marie Lehn² y Charles J. Pedersen³ en reconocimiento a sus pioneros logros en este campo de la química. Hoy en día, la química supramolecular⁴⁻⁶ ha sido considerada como una importante subdisciplina de la química, se define como “la química más allá de las moléculas” o como “la química del ensamblado molecular y del enlace intermolecular”. Según Jean-Marie Lehn⁷, es el resultado de la asociación de dos o más especies químicas por medio de interacciones intermoleculares, de tal modo que la especie supramolecular o supermolécula resultante tiene unas propiedades diferentes, y a menudo mejores que las propiedades de los componentes individuales. Sobre la base de los distintos tipos de interacciones intermoleculares no covalentes se incluyen los enlaces de hidrógeno, las interacciones electrostáticas, las interacciones de van der Waals, los enlaces π - π , las interacciones hidrofóbicas, etc. Este tipo de interacciones presentan una ventaja en comparación con los enlaces covalentes, son más débiles y se caracterizan por su naturaleza reversible.

El campo de investigación de la química supramolecular se basa principalmente en dos campos: la química de reconocimiento molecular y el autoensamblaje molecular (Esquema 1.1).

El proceso de reconocimiento molecular se asocia generalmente, a la complejación y reconocimiento de especies, denominadas *guests* o huéspedes, por moléculas mayores, denominadas *hosts* o anfitriones, dando lugar a formación de complejos *host:guest* supramoleculares. Por otro lado, el autoensamblaje molecular se puede definir como el proceso de asociación espontánea de moléculas, originando agregados supramoleculares, con estructuras ordenadas de gran tamaño y bien definidas,

mediante las interacciones intermoleculares no covalentes entre las subunidades que los forman.



Esquema 1.1

En general, se puede destacar diferencias entre los procesos de autoensamblaje molecular y los complejos *host:guest*. La principal diferencia entre estos sistemas, reside en el tamaño y geometría de las especies químicas que intervienen en el proceso, en el caso del autoensamblaje molecular las especies que forman el agregado supramolecular presentan tamaños y geometrías similares. Otra de las diferencias es que, en los sistemas *host:guest*, por lo general, no sobrepasan las 2 o 3 especies involucradas en el proceso, mientras que en los procesos de autoensamblaje molecular suelen estar involucradas un gran número de subunidades moleculares.

En la naturaleza se pueden encontrar muchos ejemplos de sistemas supramoleculares. Se sabe que muchos de los procesos biológicos más importantes tienen lugar en agua e implican interacciones reversibles y no covalentes débiles entre las especies moleculares. Uno de los ejemplos más importantes es la estructura de la doble hélice del ADN (ácido desoxirribonucleico) que está formada por dos cadenas distintas de nucleótidos conectadas a través de enlaces de hidrógeno. El uso de enlaces no covalentes es esencial para la replicación, debido a que permiten que las hebras se separen y se utilizan para una nueva plantilla de ADN de doble cadena. Es de gran importancia que los químicos supramoleculares comprendan las interacciones intermoleculares y controlen el autoensamblaje de moléculas, como lo hacen los organismos biológicos en la naturaleza.

1.2 Complejos *host:guest*

La formación de complejos *host:guest*, también conocidos como complejos de inclusión, es el área más estudiada de la química supramolecular¹. Los complejos *host:guest* se forman cuando se produce la encapsulación de una molécula o ion (*guest*) por una molécula mayor (*host*) mediante interacciones no covalentes entre ambas. Cuando un determinado *host* presenta una afinidad superior para unirse a un determinado *guest* o familia de *guests*, recibe el nombre de selectivo⁸. La constante de equilibrio (*K*) para la formación de este tipo de complejos, dada por la ecuación (1.1), es una medida cuantitativa de la afinidad que existe entre un *guest* y un *host* determinados. En el caso de que haya más de un *guest*, la selectividad es una medida de la afinidad relativa que un *host* tiene para unirse a un *guest* frente a otro, y se determina a partir del cociente entre las constantes de equilibrio de cada *guest*, como se representa en la ecuación (1.2).

$$K = \frac{[Host:Guest]}{[Host][Guest]} \quad (1.1)$$

$$Selectividad = \frac{K(Guest_1)}{K(Guest_2)} \quad (1.2)$$

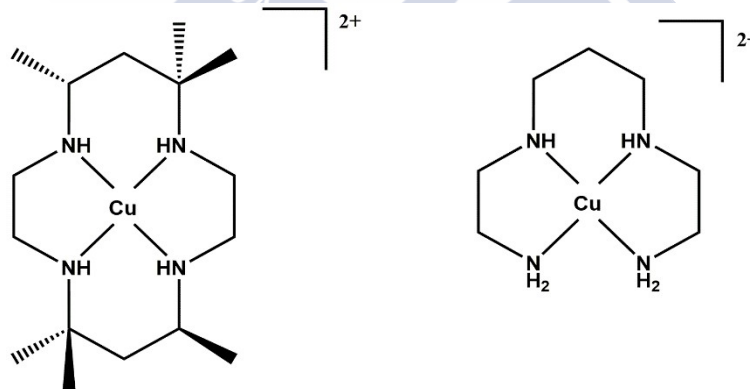
Para determinar la afinidad entre el *host* y las moléculas *guest*, en la formación de este tipo de complejos, debemos tener en cuenta diversos factores, tales como: la complementariedad entre los sitios de unión del *host* y del *guest*, la preorganización de la conformación del *host* y la cooperatividad de los grupos de unión.

Las condiciones óptimas para que el complejo de inclusión sea estable y se forme de manera selectiva, es necesario que el *guest* presente un tamaño, geometría y grupos funcionales complementarios con el sitio de unión del *host*. Por tanto, la complementariedad entre el tamaño del *guest* y del *host* es una condición necesaria pero no suficiente para que se produzca una unión eficaz entre ambos.

Por otro lado, debido a que sabemos que este tipo de complejos se obtienen por enlaces no covalentes (carácter débil), para obtener un complejo estable se requiere múltiples sitios de unión, ya que un solo enlace no covalente es débil, pero varios enlaces de este tipo entre el *host* y el *guest* pueden estabilizar el complejo *host:guest*. El origen termodinámico⁹ de la estabilización de los complejos de inclusión es similar al efecto

quelato que se da en la formación de complejos metálicos con ligandos n -dentados. El efecto quelato consiste en un aumento de la estabilidad de los complejos, cuantas más uniones presente un mismo ligando con el catión central, más difícil será romperlas, y por tanto, más estable será el complejo. Por tanto, si se sustituyen n ligandos monodentados por un ligando n -dentado, se produce un incremento de la estabilidad de los complejos que proviene principalmente de un efecto entrópico. En resumen, podemos decir que el efecto quelato es un claro ejemplo de cooperatividad entre sitios de unión individuales en la estructura de un ligando.

Por último, el factor que es esencial en los procesos de reconocimiento molecular para la formación de los complejos *host:guest*, es la preorganización de la estructura del *host*. A partir de este factor, conocemos el término efecto macrociclo^{10,11}, que consiste en el aumento de la estabilidad para los complejos formados a partir de análogos cíclicos, en comparación con los complejos formados por el mismo análogo pero de cadena abierta. Como ejemplo, en el Esquema 1.2 se muestra la complejación del catión Cu^{2+} por un análogo cíclico (izquierda) que es sobre 10^4 veces más estable que la complejación del mismo catión con el análogo de cadena abierta (derecha)¹⁰.

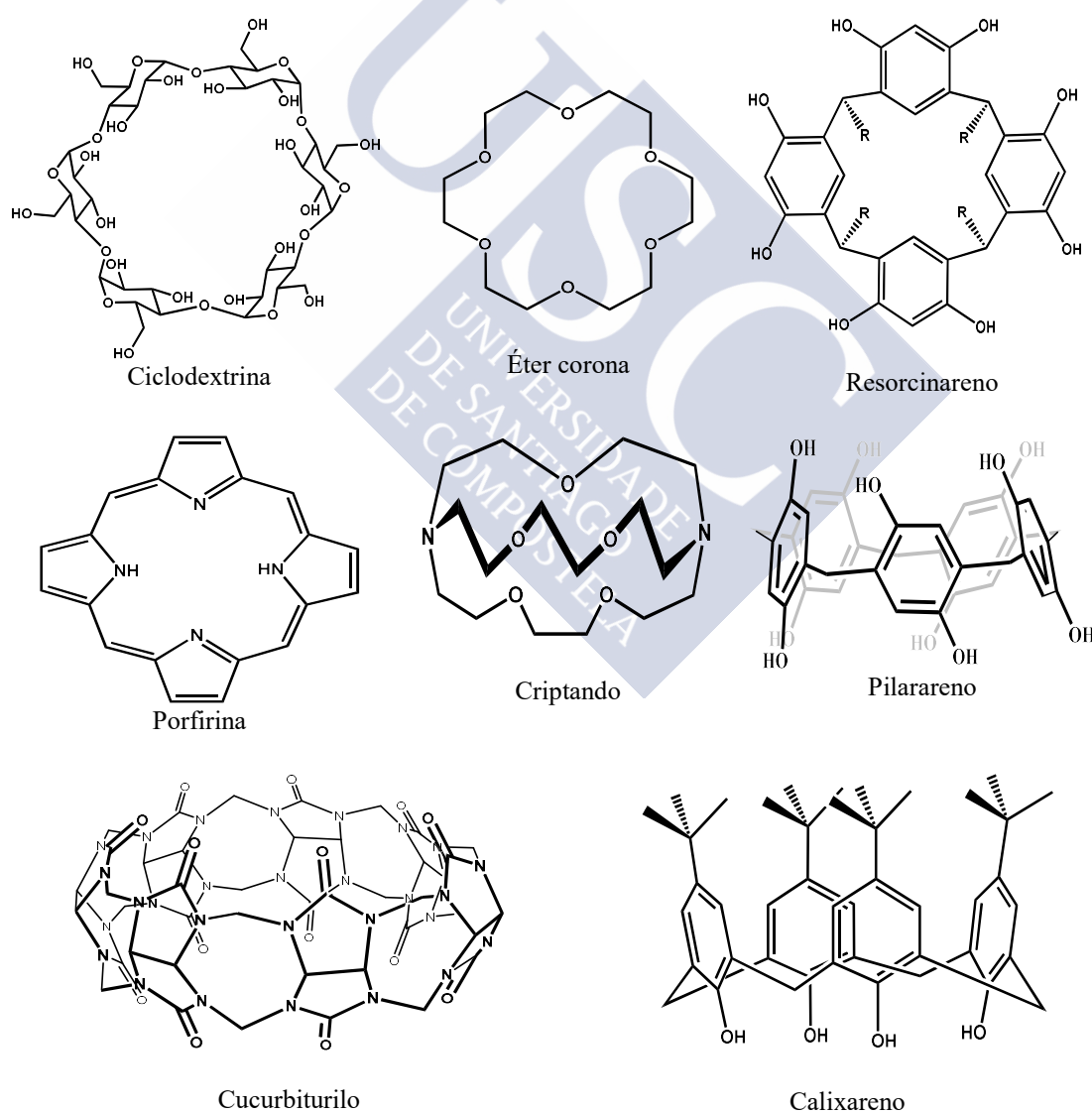


Esquema 1.2

El efecto macrociclo está relacionado con la organización de los sitios de unión del *host* antes de complejarse con el *guest*. Es decir, si tenemos un *host* preorganizado debe presentar una geometría bien definida, con los sitios de unión en la disposición espacial adecuada para complejarse con el *guest* y, por tanto, no necesita experimentar cambios conformacionales apreciables cuando se produce la complejación con el *guest*. La preorganización, se puede conseguir mediante la síntesis de *hosts* con estructuras

rígidas y bien definidas, además de poseer un tamaño y sitios de unión adecuados para poder encapsular una determinada molécula *guest*.

En términos termodinámicos, la formación de complejos entre *guests* y *hosts* preorganizados está favorecida. Un macrociclo preorganizado es más rígido, por lo que al formar los complejos *host:guest* el cambio conformacional que va a experimentar el *host* es mínimo, dando como resultado una menor pérdida de grados de libertad y haciendo que la complejación sea más favorable entrópicamente. En términos entálpicos, que el *host* esté preorganizado hace que presente una estructura rígida y obliga a los grupos que posee a interactuar antes de la complejación, por tanto, este factor no va a suponer un aumento importante de la entalpía en el proceso de formación de los complejos *host:guest*.



Esquema 1.3

Para conseguir moléculas *host* que den lugar a complejos de inclusión estables, se ha centrado la investigación en el diseño y síntesis de distintos macrociclos con propiedades y funciones específicas, para incrementar la capacidad de formar complejos con distintos tipos de *guest*. Después de las primeras moléculas *host* artificiales descubiertas, los éteres corona¹², los cuales son conocidos por su capacidad de complejar cationes metálicos, se sintetizaron otros macrociclos.

En el Esquema 1.3 se muestran las estructuras más comunes que se encuentran en la bibliografía de una gran variedad de moléculas macrocíclicas con distintos tamaños, flexibilidad, densidad de carga y grupos funcionales, cuyas características son determinantes en el proceso de reconocimiento molecular.

En esta tesis se presenta varios estudios de la química *host:guest* con los distintos macrociclos utilizados: ciclodextrinas, cucurbiturilos y calixarenos. A continuación, se presentará una introducción general y la complejación *host:guest* de cada macrociclo.

1.2.1 Ciclodextrinas

1.2.1.1 Introducción, estructura y propiedades

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos formados por 6 (α -CD), 7 (β -CD), 8 (γ -CD) o más unidades de α -D-glucopiranosas unidas por enlaces α -(1,4) y se obtienen por la degradación enzimática del almidón. A estos tres tipos se le conocen como CD nativas y son sustancias cristalinas, homogéneas y no higroscópicas, y pueden ser modificadas variando sus propiedades.

En 1891, el químico francés A. Villiers hizo la primera publicación sobre las ciclodextrinas¹³, donde las describió como una serie de sustancias cristalinas obtenidas a partir de la degradación enzimática del almidón con *Bacillus amylobacter*. Pero fue entre 1903 y 1911 cuando el químico austriaco Franz Schärddinger, estableció las bases de la química de las ciclodextrinas e identificó las α y β -ciclodextrinas. En la década de los treinta, Freundberg y colaboradores identificaron la estructura de la γ -ciclodextrina por cristalografía de Rayos-X, y sugirieron la existencia de ciclodextrinas mayores^{14,15}. A principios de los años 50, los grupos de investigación de French y de Cramer identificaron las características tanto físicas como químicas de las ciclodextrinas. En 1953, fue hecha la primera patente relacionada con las ciclodextrinas por Freundberg, Cramer y Plieninger.

En la Figura 1.1 se muestra la estructura cíclica de las ciclodextrinas, que es rígida y debido a la estructura en forma de silla de las glucosas que las componen¹⁶ adoptan una conformación de cono truncado. En esta estructura la conformación de la glucosa sitúa los grupos hidroxilo secundarios (C2 y C3) orientados hacia el borde ancho de la estructura troncocónica, mientras que los hidroxilos primarios (C6) se sitúan hacia el borde estrecho, quedando orientados los grupos CH₂OH hacia la superficie externa del cono. El interior de la ciclodextrina consiste en un anillo de grupos C-H (de los carbonos C3 y C5) y de oxígenos glicosídicos, que hace que el interior de la ciclodextrina sea relativamente apolar en comparación con el agua. Por otro lado, los hidroxilos de los carbonos C2 y C3 forman enlaces de hidrógeno que estabilizan la molécula e influyen en su solubilidad. Por tanto, debido a la orientación específica de los grupos hidroxilos de las CDs, podemos concluir que presentan un revestimiento externo de carácter hidrofílico y una cavidad interna de carácter hidrofóbico y apolar.

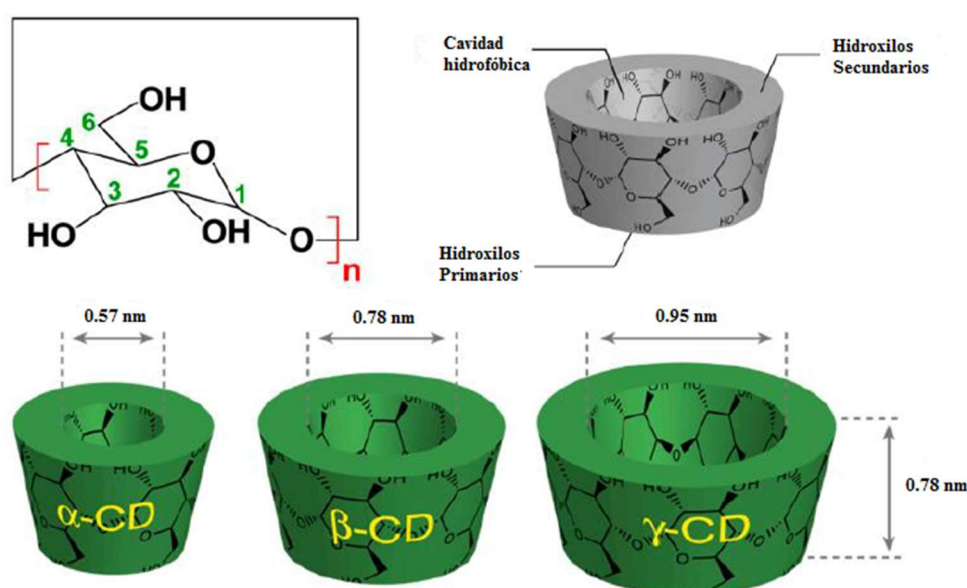


Figura 1.1 : Esquema estructural y dimensiones geométricas de α -CD ($n=6$), β -CD ($n=7$) y γ -CD ($n=8$).

La profundidad de la cavidad es para todas las ciclodextrinas la misma (7.8 Å) ya que viene determinada por el tamaño de las moléculas de glucosa, sin embargo, el diámetro de la cavidad es para cada tipo de ciclodextrina diferente ya que depende del número de unidades de glucosa que lo compongan. En la Tabla 1.1 se recogen las principales propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas¹⁷ α , β y γ .

Tabla 1.1 : Características y propiedades de las α -, β - y γ -CDs.

PROPIEDAD	α -CD	β -CD	γ -CD
Nº unidades de glucosa	6	7	8
Peso Molecular (g/mol)	973	1135	1297
Diámetro interno (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Diámetro externo (Å)	14.6	15.4	17.5
Volumen cavidad (Å ³)	174	262	427
[α] _D a 25°C	150±0.5	162.5±0.5	177.4±0.5
Rango T ^a fusión (°C)	255-260	255-265	240-245
Contenido en agua (%peso)	10.2	13-15	8-18
Nº moléculas de agua	6	11	17
Solubilidad en agua (g/100mL)	14.5	1.85	23.2

Las ciclodextrinas son solubles en agua (solubilidad no muy elevada) y en disolventes polares apróticos como el dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF) y prácticamente insolubles en la mayoría de los disolventes orgánicos comunes (metanol, etanol, acetona...etc). La β -CD es la más insoluble de las tres, ya que forma un cinturón de enlaces de hidrógeno intramoleculares que le confiere una gran estabilidad. La α -CD sólo forma cuatro de los seis posibles enlaces de hidrógeno, pues la tensión del anillo distorsiona las unidades de glucosa. Mientras que la γ -CD es la menos distorsionada de las tres, lo que le confiere mayor flexibilidad y solubilidad en agua, debido a su mayor tamaño.

1.2.1.2 Química *host:guest* de las CDs

Las ciclodextrinas (CDs) son capaces de formar complejos de inclusión, donde una determinada molécula *guest* se aloja en el interior de su cavidad, actuando la ciclodextrina como *host*, de ahí que se puedan nombrar también complejos *host:guest*. Debido a la estructura de las CDs pueden formar complejos a través de interacciones no covalentes con moléculas de tamaño, forma y polaridad adecuadas¹⁸. En el proceso de complejación, los factores geométricos pueden ser más importantes que los químicos para determinar el tipo de moléculas *guest* que pueden penetrar al interior de la cavidad. Otro

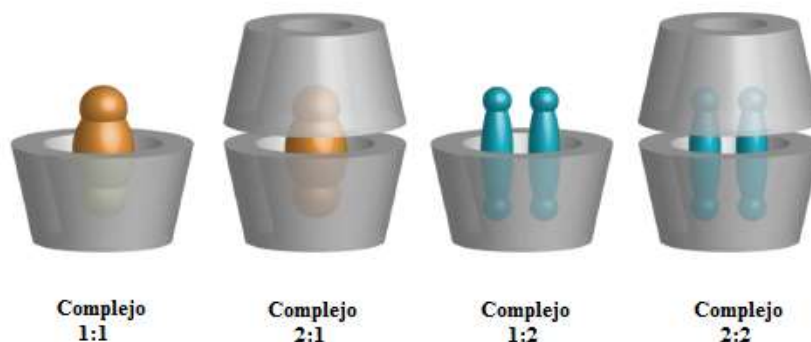
factor que influye en el proceso de formación del complejo *host:guest* son las dos fuerzas que están implicadas, las interacciones hidrofóbicas y las interacciones de van der Waals, actuando entre la superficie interna de la cavidad de la ciclodextrina y los grupos hidrofóbicos del *guest*. Varios estudios han demostrado que, tras la complejación, la parte más hidrófoba de las moléculas *guests* están incluidas en la cavidad de la CD y orientadas de tal manera que maximizan el contacto entre sus partes hidrófobas y la cavidad apolar de la CD. De esta manera, cuanto más hidrofóbica sea la molécula *guest*, más estable será el complejo. La formación de este tipo de complejos produce cambios importantes en la solubilidad y reactividad de las moléculas *guest* encapsuladas, pero sin darse alteraciones químicas¹⁹.

El mecanismo de la formación de los complejos *host:guest*, puede dividirse en varias etapas²⁰: (1) la aproximación del *guest* a la ciclodextrina; (2) rotura de la estructura del agua dentro de la cavidad de la CD y eliminación de algunas moléculas de agua fuera de la cavidad; (3) rotura de la estructura de agua alrededor de la molécula *guest* que se va a incluir en la ciclodextrina, y transporte de algunas moléculas de agua a la disolución; (4) interacción de los sustituyentes de las moléculas *guest* con los grupos en el borde o en el interior de la cavidad de la CD; (5) la posible formación de enlaces de hidrógeno entre el *guest* y la ciclodextrina (la formación de enlaces de hidrógeno ha demostrado ser un proceso extremadamente rápido, y por lo tanto, no puede determinarse la velocidad para la reacción de inclusión) y (6) el reordenamiento de la estructura del agua alrededor del *guest* sobresaliendo de la cavidad de la CD después del proceso de inclusión.

En la mayoría de los casos, las CDs forman complejos *host:guest* con una estequiometría 1:1, donde una molécula *guest* es complejada por una CD. Sin embargo, con algunos compuestos aromáticos, azocompuestos y surfactantes de cadena alquílica larga, pueden obtenerse complejos de estequiometría 2:1, donde dos moléculas de CD pueden complejar a una misma molécula *guest*, o incluso una única CD puede ser capaz de acomodar en el interior de su cavidad a dos moléculas *guest* distintas, dando lugar a complejos con estequiometría 1:1:1 o dos moléculas iguales dando complejos 1:2. Dentro del amplio grupo de moléculas que pueden actuar como *guest* se encuentran los surfactantes. La formación del complejo CD-surfactante implica la retirada de monómeros de la disolución, por ello la presencia de CDs resulta tan interesante en presencia de surfactantes, ya que se introduce un nuevo equilibrio en el medio que compite con la agregación del surfactante^{21,22}. La mayoría de los estudios realizados en

sistemas mixtos de CD-surfactante tienen como objetivo la determinación de la constante de equilibrio y la estequiometría del complejo formado²³.

En el Esquema 1.4 se muestran algunos ejemplos de las estequiometrías de los complejos formados por ciclodextrinas¹⁶.



Esquema 1.4

A partir de las ciclodextrinas naturales se han sintetizado otro tipo de CDs, conocidas como derivadas o modificadas, con el fin de poder modificar sus propiedades físico-químicas. Las CDs modificadas poseen por norma general una mayor capacidad de formación de complejos de inclusión, debido a la incorporación de nuevos grupos funcionales y una mayor solubilidad en agua. Las modificaciones para obtener los derivados de CDs tienen lugar en los grupos hidroxilos (los C6-OH son los más básicos, los C2-OH los más ácidos y los C3-OH los más inaccesibles) de las CD naturales, y vienen determinadas por su carácter nucleófilo y su capacidad para formar complejos²⁴.

La síntesis de las CDs anfífilicas²⁵, que constan de un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico, obtenidas a partir de las modificaciones oportunas con distintos grupos, se pueden clasificar en CDs anfífilicas neutras, aniónicas (carboxilato o sulfonato) y catiónicas (animas protonadas). Los objetivos de sintetizar este tipo de ciclodextrinas han sido dos: conseguir aumentar las interacciones de las CDs con las membranas biológicas y potenciar su capacidad de autoensamblaje en disoluciones acuosas. Una gran variedad de CDs anfífilicas²⁶ tienen la capacidad de autoensamblarse en medio acuoso y dan lugar a estructuras supramoleculares como vesículas, micelas, nanobastones...etc.

Las ciclodextrinas y sus derivados tienen una amplia variedad de aplicaciones prácticas¹⁶ en: farmacia, medicina, alimentación, cosmética, química, catálisis, biotecnología, industria textil, agroquímica...etc. La gran mayoría de estas aplicaciones

químicas y biológicas se basan en la capacidad de las ciclodextrinas en formar complejos de inclusión, reuniendo una serie de características que las hace únicas, como su bajo coste debido a que su proceso de síntesis es una simple conversión enzimática, no producen contaminación ambiental, no son tóxicas...etc.

1.2.2 Cucurbit[n]urilos

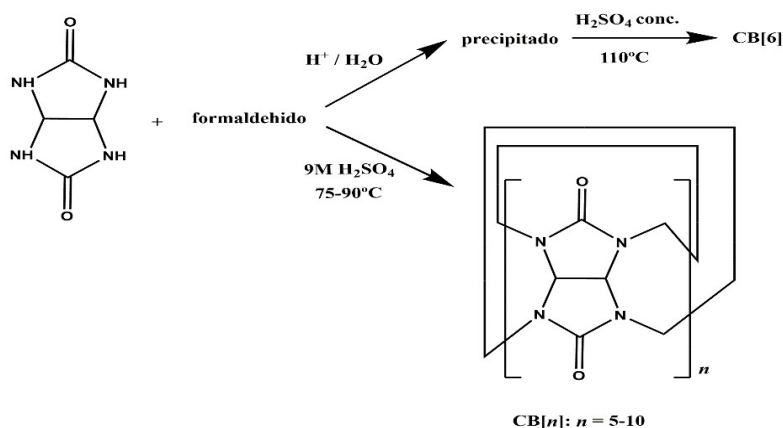
1.2.2.1 Introducción, síntesis y propiedades físico-químicas

Los cucurbit[n]urilos (CB[n]) son macromoléculas cíclicas constituidas por n unidades repetidas de glicolurilo ($n = 5-10$) enlazadas entre sí por un par de grupos metileno. El nombre de estos macrociclos se debe a su forma molecular similar a la de una calabaza, deriva del latín “*cucurbitaceae*”.

En 1905 fue publicada la primera síntesis de cucurbit[6]urilo por Behrend *et al.*²⁷, a partir de la condensación de glicolurilo con formaldehído en ácido clorhídrico concentrado, obteniéndose un polímero insoluble, nombrado como polímero de Behrend. La constitución de este polímero permaneció incierta hasta 1981, que fue cuando Mock *et al.*²⁸ caracterizaron estructuralmente el CB[6], donde revelaron una estructura macrocíclica formada por seis unidades de glicolurilo y doce puentes de metileno.

En comparación con otros macrociclos donde el tamaño puede ser ajustado por el número de unidades repetitivas, cuando Behrend como Mock sintetizaron el CB[6] no detectaron otros análogos de CB[n]. Pero fue a principios de los años 2000, cuando el trabajo realizado por Kim²⁹ y Day^{30,31}, permitió sintetizar los diferentes cuatro nuevos homólogos de CB[n] (CB[5], CB[7], CB[8] y CB[10]).

El protocolo de síntesis de los homólogos de CB[n] es similar a la síntesis convencional de CB[6], siendo la temperatura de reacción y las concentraciones de ácido utilizadas la clave principal para distinguir ambos protocolos de síntesis. En el Esquema 1.5 podemos observar como el CB[6] se obtiene a temperaturas superiores a 110°C y ácido sulfúrico concentrado, mientras que para obtener los CB[n] ($n = 5,7,8$ y 10) Kim²⁹ propuso una síntesis donde se utiliza ácido sulfúrico 9M y un rango de temperatura de reacción entre 75-90°C.



Esquema 1.5

El tamaño de la cavidad de los CB[n] varía con el valor de n , que son las unidades de glicolurilo por cucurbiturilo. Sin embargo, no solo afecta al tamaño de la cavidad del macrociclo, sino que también influye en la solubilidad en agua, afinidad de los *guests* y estequiometría de complejación. Los cucurbit[n]urilos con un valor de n par, como el CB[6] y CB[8] son prácticamente insolubles en agua, mientras que los compuestos con un valor de n impar, como el CB[5] y CB[7] tienen una mejor solubilidad en agua. Si nos fijamos en la estructura de los CB[n], los grupos carbonilos que se encuentran en los portales actúan como bases débiles y poseen afinidad por cationes, lo que hace que la solubilidad de los macrociclos aumente en medio ácido o en disolución con iones de metales alcalinos.

Los cucurbit[n]urilos (CB[n]) se pueden definir estructuralmente como polímeros cíclicos que presentan una geometría simétrica, con grupos carbonilos electronegativos alineados en la entrada de los dos portales y con “ n ” unidades de glicolurilo enlazadas entre sí por un par de grupos metileno, además de poseer una cavidad vacía y de carácter hidrofóbico.

Con frecuencia, los CB[n] se suelen comparar con otro tipo de macrociclo, las ciclodextrinas (CDs), de las cuales hablamos anteriormente en este capítulo. Estos dos macrociclos comparten características en común, como el tamaño y la hidrofobicidad de sus cavidades. En términos de tamaño de la cavidad el CB[6], CB[7] y CB[8] son análogos a la α , β y γ -CD como se puede observar en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 : Comparación de las dimensiones de la cavidad de ciclodextrinas y cucurbit[*n*]urilos^{17,32}.

	Diámetro portal (Å)	Diámetro cavidad (Å)	Altura (Å)	Volumen cavidad (Å ³)
CB[6]	3.9	5.8	9.1	164
CB[7]	5.4	7.3	9.1	279
CB[8]	6.9	8.8	9.1	479
α-CD	4.7	5.3	7.8	174
β-CD	6.0	6.5	7.8	262
γ-CD	7.5	8.3	7.8	427

Estas dos familias de macrociclos presentan una serie de diferencias, como la simetría, donde los CB[*n*] presentan mayor simetría por los grupos carbonilo en ambos portales, mientras que las CDs tienen una menor simetría, porque en un portal tiene grupos hidroxilo primarios y en otro grupos hidroxilo secundarios, proporcionando a las CDs una estructura más flexible. Debido a que poseen distintos grupos funcionales en la entrada de los portales, existen diferentes comportamientos en los procesos de reconocimiento molecular, es decir, que las interacciones intermoleculares principales entre los *guests* y estas dos clases de *hosts* son diferentes. En el caso de los CB[*n*], los grupos carbonilo alineados en la entrada de los portales, actúan como centro electronegativo permitiendo la complejación de compuestos cargados positivamente o cationes, a través de interacciones ion-dipolo o dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno. La combinación de dichas interacciones con las interacciones hidrofóbicas, que se dan en el interior de la cavidad, permiten a los cucurbiturilos formar complejos estables. Mientras que las CDs, debido a los grupos hidroxilo de sus portales pueden establecer enlaces de hidrógeno con determinados *guests*, pero son principalmente las interacciones hidrofóbicas las responsables de la estabilización de los complejos de inclusión formados entre las CDs y la mayoría de *guests* orgánicos y organometálicos^{17,18,33}.

Los efectos electrostáticos pueden desempeñar un papel crucial en los procesos de reconocimiento molecular tanto en disolución acuosa como en orgánica³⁴. En la Figura 1.2 se muestra un mapa de potencial electrostático que compara la familia de CB[*n*] con la de las CDs³⁵. Como se puede observar el potencial electrostático tanto en los portales como en el interior de la cavidad para los CB[*n*] es significativamente más negativo que para las CDs. Por tanto, esta diferencia en el potencial electrostático tiene consecuencias

para su comportamiento en el proceso de reconocimiento molecular: los cucurbiturilos muestran preferencia para interactuar con *guests* catiónicos, mientras que las ciclodextrinas prefieren *guests* neutros o aniónicos.

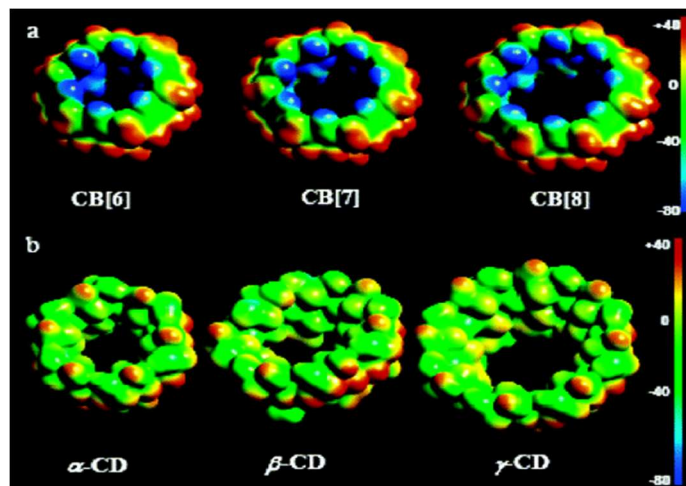


Figura 1.2 : Mapa del potencial electrostático calculado para los macrociclos: (a) CB[*n*] y (b) CDs. El rango de color azul a rojo se extiende desde -80 a 40 kcal mol⁻¹.³⁵

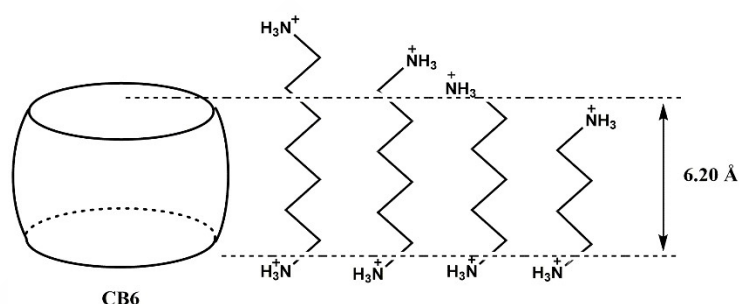
Por tanto, a partir de la síntesis y aislamiento de los distintos homólogos, la popularidad de los CB[*n*] se ha incrementado considerablemente, debido a su capacidad como *host* y a su variedad de tamaños.

1.2.2.2 Química *host:guest* de los CB[*n*]

Los cucurbiturilos son moléculas *host* supramoleculares y tiene una alta afinidad principalmente por compuestos cargados positivamente. El efecto hidrófobo, con especial énfasis en la liberación del agua, así como las interacciones ión-dipolo y dipolo-dipolo han sido consideradas como las principales fuerzas impulsoras para la complejación de los distintos *guests* por los CB[*n*].

En 1983, Mock y sus colaboradores³⁶ fueron los primeros en estudiar la complejación del CB[6] con una serie de cationes derivados de alquilamonio y de alquildiamonio con distintas longitudes de cadena en ácido fórmico acuoso y determinar sus constantes de complejación. En el Esquema 1.6, se muestran los estudios de complejación realizados con CB[6] y distintos alquildiamonios protonados^{37,38} (${}^+\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_3^+$ $n = 4-7$ $K > 10^5 \text{ M}^{-1}$), donde la cadena hidrofóbica se aloja dentro de la cavidad del *host* y los grupos amonio se sitúan en las entradas de los portales, donde se

dan las interacciones por enlace de hidrógeno y sobre todo las interacciones ión-dipolo con los átomos de oxígeno de cucurbit[6]urilo. También se observó que el CB[6] muestra una selectividad dependiente de la longitud de la cadena de los derivados de alquildiamonio. Los complejos formados por un puente pentano o hexano se unen significativamente más fuerte con el CB[6], en comparación con los de cadena de longitudes más cortas o más largas. Por ejemplo, para el 1,6-diammoniohexano, la cadena alquílica se contrae para adoptar una conformación ligeramente plegada con el fin de optimizar el relleno de la cavidad y las interacciones ion-dipolo, con un valor para la constante de equilibrio de $2.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.



Esquema 1.6 : Comparación dimensional entre el CB[6] y varios diamonioalcanos protonados.

El cucurbit[6]urilo con un volumen de cavidad de 164 \AA^3 , es selectivo tanto al tamaño como a la geometría del *guest* y puede formar también complejos moderadamente estables con aminas aromáticas protonadas como *p*-metilbencilamina ($K \approx 3 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$), mientras que los isómeros en posición *orto* y *meta* difícilmente se pueden complejar con CB[6]. Del mismo modo, se demostró que aunque el *n*-pentano, el isopentano y el neopentano son de un tamaño similar (todos de aproximadamente 96 \AA^3), sólo los dos primeros *guests* mostraron una unión importante con CB[6], mientras que el neopentano no forma un complejo de inclusión con CB[6], probablemente por razones cinéticas (entrada lenta a través de los portales)³⁹. También puede encapsular moléculas neutras como tetrahidrofurano ($K \approx 1700 \text{ M}^{-1}$) o Xe ($K \approx 200 \text{ M}^{-1}$)⁴⁰, en disolución acuosa de Na_2SO_4 .

Los principios básicos de la formación de complejos *host:guest* con el CB[6], se puede extrapolar a los demás homólogos de la CB[*n*]. Podemos destacar que los distintos miembros de la familia de CB[*n*] presentan diferencias en el proceso de reconocimiento molecular, debido a que presentan distintos tamaños de cavidad y de portal, pero todos

tienen en común la cavidad hidrofóbica y los portales con potencial electrostático negativo.

El homólogo más pequeño de la familia de CB[*n*], el CB[5] que está limitado por el tamaño de su cavidad y sus portales, puede encapsular pequeñas moléculas en su cavidad como N₂, O₂ o Ar y también se une fuertemente a cationes como NH₄⁺ y Pb₂⁺ fuertemente en sus portales^{41,42}. Dos iones NH₄⁺ pueden sellar completamente ambas aberturas del CB[5].

El CB[7] es el homólogo estudiado más popular, debido no sólo a que posee un tamaño de cavidad más grande y puede acomodar a otro tipo de *guest*, sino también a su mayor solubilidad en agua en comparación con el CB[6]. El CB[7] presenta una elevada afinidad por sustratos derivados de ferroceno^{35,43} y adamantano⁴⁴. La estructura cristalina obtenida por rayos X del complejo del tipo 1:1 formado entre el CB[7] y ferroceno, reveló que el *guest* se puede encontrar dentro de la cavidad en dos orientaciones distintas. Se estudió la complejación de distintos derivados de ferroceno solubles en agua con el CB[7], y los resultados indican que todos los derivados neutros y catiónicos del ferroceno forman complejos de inclusión altamente estables con el CB[7], con constantes de equilibrio que pueden alcanzar valores excepcionalmente altos de hasta 10¹³ M⁻¹. Los valores de las constantes de equilibrio para la interacción del CB[7] con los derivados de adamantano también son elevados de aproximadamente 10¹² M⁻¹.

El CB[7] tiene una elevada afinidad por sustratos catiónicos, debido a interacciones electrostáticas en sus portales, por tanto, puede formar complejos 1:1 con moléculas como el 2,6-bis(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)naftaleno (BDIN) o con un metilvilógeno dicatiónico (1,1-dimetil-N,N'-dipiridinio, MV²⁺). Se hizo un estudio comparativo del comportamiento electroquímico del metilvilógeno dicatiónico (MV²⁺) en presencia de CB[7]^{45,46} y la β-CD⁴⁷, ya que poseen un tamaño de cavidad similar. En primer lugar, CB[7] se une fuertemente a la especie dicatiónica MV²⁺ (K²⁺ = 2x10⁵ M⁻¹). La reducción de un electrón de la especie dicatiónica MV²⁺, conduce a la especie con una sola carga MV⁺, que se compleja con el CB[7] pero con un valor de la constante de equilibrio ligeramente inferior, aproximadamente la mitad (K⁺ = 1x10⁵ M⁻¹). Sin embargo, una reducción adicional del *guest* a su forma neutra, MV⁰, hace que la constante de equilibrio con el CB[7] disminuya drásticamente (K⁰ = 2x10² M⁻¹). Por tanto, las constantes de equilibrio de los complejos formados entre CB[7] y las tres especies (MV²⁺, MV⁺, MV⁰) sigue el orden K²⁺ > K⁺ > K⁰, disminuye con la disminución de la carga catiónica, lo que refleja la importancia de las interacciones electrostáticas en la formación

de complejos *host:guest* con el CB[7]. Sin embargo, en este mismo estudio con la β -CD, se observa una tendencia totalmente opuesta. Los resultados nos indican que la β -CD no forma complejo con la especie MV^{2+} , presenta una mayor afinidad por la especie MV^+ , aunque la constante de equilibrio es pequeña ($K^+ = 30 \text{ M}^{-1}$), mientras que con la especie neutra MV^0 , se produce un aumento considerable del valor de constante de equilibrio ($K^0 = 1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) incluso más elevada que con el CB[7]. Por tanto, con este estudio se demuestra que el proceso de reconocimiento molecular por parte de las CDs está controlado por interacciones hidrofóbicas, mientras que en el caso de los CB[*n*] está controlado por interacciones ion-dipolo.

La cavidad del CB[8] es similar en términos de volumen a la γ -CD, pero con una conformación menos flexible. En comparación con sus homólogos (CB[5], CB[6] y CB[7]) también posee una fuerte capacidad para complejar *guests* cargados positivamente por interacciones ion-dipolo, aunque se diferencia en que presenta un tamaño de cavidad superior. La cavidad del CB[8] es lo suficientemente grande para encapsular dos sustratos al mismo tiempo, dando lugar a la formación de complejos *host:guest* del tipo 1:2 cuando son dos sustratos idénticos, como con derivados de naftaleno (BDIN)^{29,48} y viológeno (MV^{+2})⁴⁹, o como complejos *host:guest* del tipo 1:1:1, donde se encapsulan dos sustratos distintos, por ejemplo combinando derivados de naftaleno (2,6-dihidroxinaftaleno, HN) y viológeno (MV^{+2})⁵⁰.

Kim *et al.*²⁹ demostraron que la cavidad voluminosa del CB[8] es capaz de albergar simultáneamente dos anillos aromáticos, como se muestra con la formación del complejo 1:2 con el sustrato 2,6-bis(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)naftaleno (BDIN). Un cálculo mecánico molecular sugirió que el BDIN protonado era demasiado grande para formar un complejo *host:guest* con CB[6], pero podría formar un complejo 1:1 con CB[7] y un complejo 1:2 con CB[8]. Estos resultados fueron confirmados por espectroscopía de ^1H RMN y espectrometría de masas. Curiosamente, cuando el CB[8] y el BDIN se mezclan con una estequiometría 1:1, sólo el complejo 1:2 se observa por espectroscopía de RMN. Este resultado demuestra que hay cooperatividad entre la complejación del primer y del segundo *guest*. La estructura del complejo *host:guest* 1:2 se ha determinado por cristalografía de rayos X, y se observa que los restos de naftaleno están situados dentro de la cavidad mientras que los anillos de dihidroimidazol protonados se sitúan fuera del portal para formar enlaces de hidrógeno con los átomos de oxígeno del cucurbit[8]urilo. Las dos moléculas *guests* están relacionadas entre sí por un centro de

inversión situado en el centro del *host*, y se pueden dar dos orientaciones posibles de los anillos de naftaleno: en orientación “*syn*” o en orientación “*anti*”.

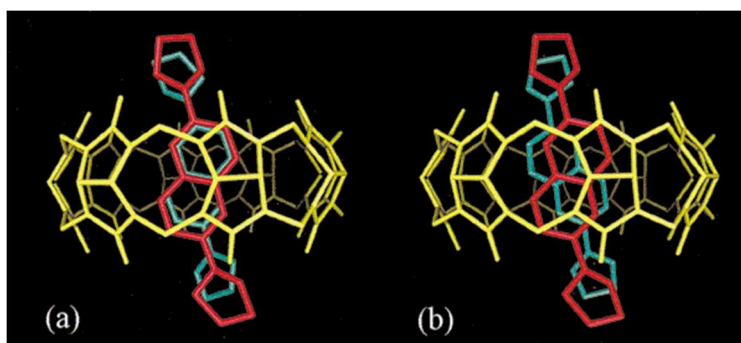
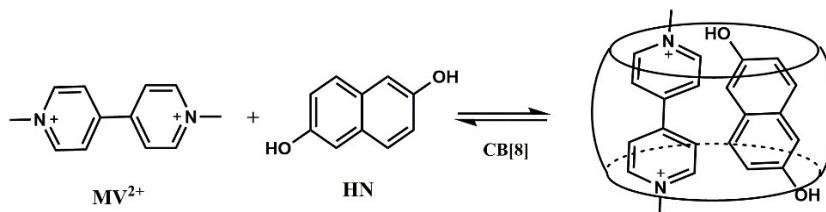


Figura 1.3 : Estructura de rayos-X del complejo 1:2 formado entre CB[8] y BDIN. Se muestran las dos posibles orientaciones de los anillos de naftaleno en: (a) orientación “*syn*” y (b) orientación “*anti*”.²⁹

En otro estudio realizado por Kim *et al.*⁴⁹ demostraron que el CB[8] podía acomodar una o dos moléculas de metilviológeno y que la estequiometría del complejo estaba controlada por la química redox del *guest*. Cuando el *guest* se encuentra en forma dicatiónica (MV^{2+}) forma un complejo 1:1 con el CB[8] con una constante de equilibrio de $1.1 \times 10^5 M^{-1}$. Sin embargo, una reducción del *guest* a la forma monocatiónica (MV^+) da lugar a la formación del complejo 1:2, lo cual puede ser debido al resultado de las repulsiones electrostáticas entre los *guests*. En conclusión, este control redox de la estequiometría en la complejación *host:guest* puede proporcionar un principio de trabajo para máquinas moleculares controlables electroquímicamente.

En el Esquema 1.7 se muestra la formación selectiva de un complejo heterotermolecular del tipo 1:1:1, entre el CB[8] y dos *guests* distintos: MV^{2+} y 2,6-dihidroxinaftaleno (HN)⁵⁰.



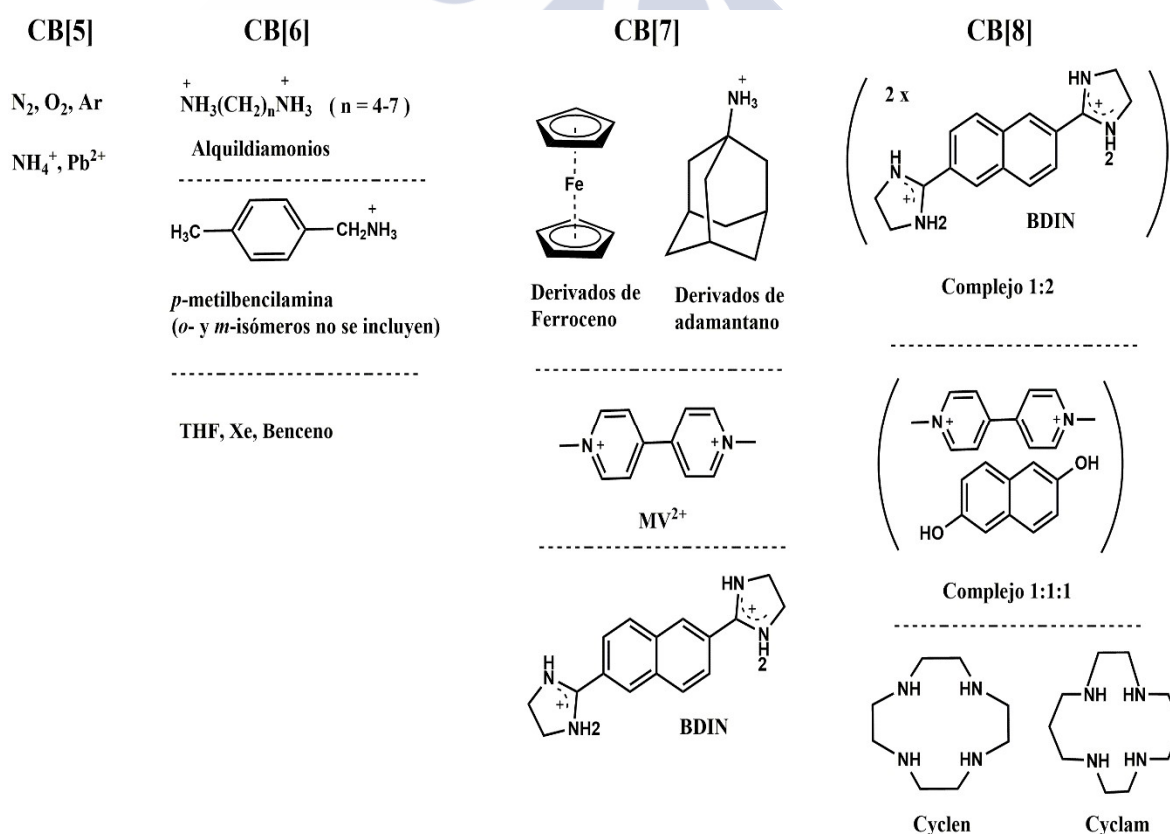
Esquema 1.7

Este tipo de complejo es impulsado y estabilizado por las interacciones de transferencia de carga, entre un *guest* rico en electrones (HN) y otro *guest* deficiente en electrones (MV^{2+}) dentro de la cavidad hidrofóbica del cucurbit[8]urilo. Sabemos que los

compuestos ricos en electrones por si solos no se complejan fácilmente con el CB[8], pero si lo hacen en presencia de compuestos pobres en electrones. La capacidad del cucurbit[8]urilo para encapsular dos moléculas *guests*, ha dado como resultado que el CB[8] pueda actuar como un recipiente de reacción nanométrico^{51,52} y como un componente de máquinas moleculares en agua^{53,54}.

Además el CB[8] es capaz incluso de encapsular sustratos voluminosos o macrociclos, como el cyclen o cyclam⁵⁵. La química *host:guest* en este caso involucra múltiples pasos de complejación: un macrociclo es encapsulado primero por el CB[8], y un ion de metal de transición se introduce posteriormente en el macrociclo interior, lo que da como resultado un complejo de “macrociclo dentro de macrociclo” que se parecen a las muñecas rusas Matrioshka.

En el Esquema 1.8 se muestra un resumen de la química *host:guest* de la familia de los CB[*n*], teniendo en cuenta su variación en el tamaño de la cavidad y de los portales que conducen a distintas propiedades de reconocimiento molecular.

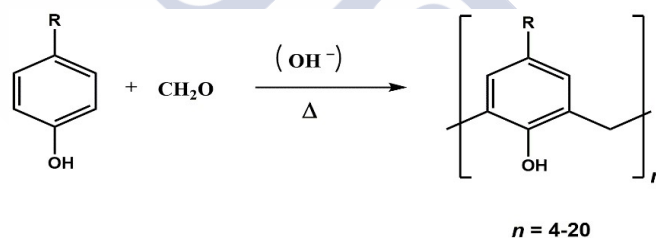


Esquema 1.8

1.2.3 Calix[n]arenos

1.2.3.1 Introducción, síntesis y propiedades físico-químicas

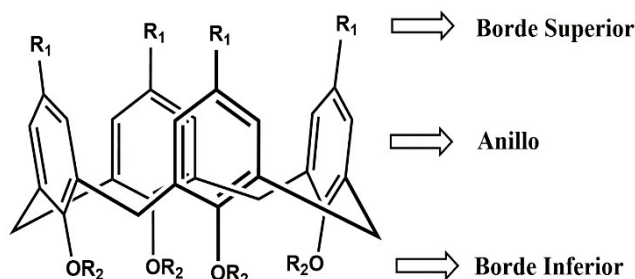
Los calix[n]arenos son moléculas macrocíclicas compuestas por “n” unidades fenólicas unidas entre sí por puentes de metileno en posición *orto*.^{56,57} El nombre de calixareno fue introducido por Gutsche⁵⁸⁻⁶¹, quien percibe una similitud entre las formas de estos tetrámeros cíclicos (que adoptan normalmente conformación de cono) y un tipo de jarrón griego conocido como “calix cráter”. Estos compuestos son obtenidos a partir de la condensación de fenoles sustituidos en posición *para* (normalmente por grupos *tert*-butilo) con formaldehído en medio básico. Dependiendo de las condiciones de reacción, se pueden obtener calixarenos con distintos números de unidades fenólicas, siendo los más comunes aquellos con 4, 6 o 8 unidades, aunque es posible obtener calixarenos con hasta 20 unidades fenólicas⁶² (Esquema 1.9).



Esquema 1.9

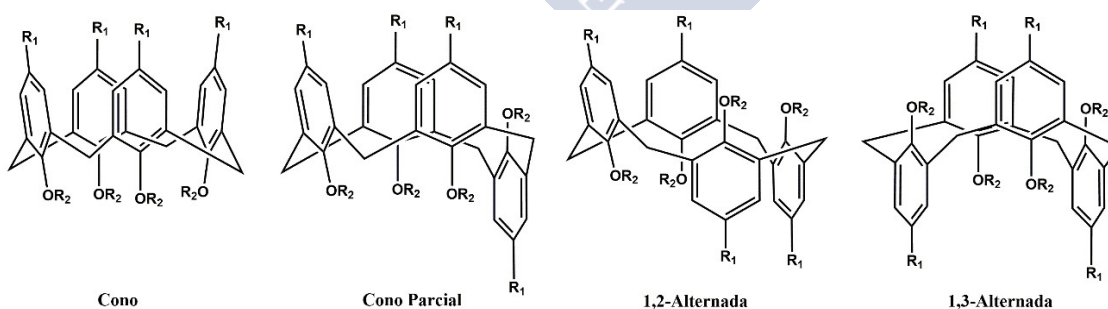
Los calixarenos son muy populares en la química supramolecular, debido a su fácil funcionalización química, es decir, pueden ser modificados fácilmente en sus portales convirtiéndose en *hosts* selectivos y mejorando su capacidad receptora de cationes, aniones y moléculas neutras. La modificación de la estructura del calixareno con una gran variedad de grupos funcionales se centró en el borde superior, debido a la fácil eliminación de los grupos *tert*-butilos con ayuda de AlCl_3 en tolueno seco. A continuación, pueden ser funcionalizados en las posiciones *para* y en el borde inferior donde tienen los grupos hidroxilos, debido a la diferente reactividad química de estos grupos⁵⁶ (Esquema 1.10). La funcionalización selectiva de los calixarenos además de mejorar su capacidad de reconocimiento molecular se prestan a su uso en muchas aplicaciones, por lo que se utilizaron en sistemas supramoleculares más sofisticados y con funciones más complejas como la formación de rotaxanos y máquinas moleculares^{63,64},

el autoensamblaje en nanopartículas^{65,66} y monocapas⁶⁷, sistemas de suministro de fármacos⁶⁸, polímeros supramoleculares,^{69,70} etc.



Esquema 1.10 : División del calix[4]areno en partes (aplicable a todos los calixarenos).

Uno de los aspectos más interesantes y fascinantes de los calixarenos reside en el hecho de que pueden adoptar distintas conformaciones, proporcionando así un gran número de cavidades con diferente tamaño y forma. El hecho de esta variedad conformacional de los calixarenos es debido a dos posibles modos de rotación de las unidades de fenol a través del anillo: la rotación del oxígeno a través del anillo y la rotación del sustituyente *para* a través del anillo. En el caso del calix[4]areno, son posibles cuatro conformaciones distintas: cono, cono parcial, 1,2-alternada y 1,3-alternada, que fueron sugeridas por Cornforth y posteriormente asignadas por Gutche⁷¹ (Esquema 1.11). Sin embargo, el calix[6]areno y calix[8]areno son mucho más flexibles comparados con el calix[4]areno, y pueden tener ocho y dieciséis conformaciones distintas^{57,72}, respectivamente.



Esquema 1.11

Para el caso del calix[4]areno la rotación del sustituyente *para* no es posible, pero el intercambio conformacional de dicho calixareno puede ser bloqueado mediante la alquilación del grupo hidroxilo con grupos sustituyentes iguales o mayores al grupo etilo, pudiendo así, aislar los cuatro estereoisómeros. Sin embargo, para los casos de

calix[6]areno y calix[8]areno, debemos tener en cuenta que además de las conformaciones “*up-down*” pueden ser posibles otras conformaciones donde los anillos arilo adoptan orientaciones planas, por tanto debido a su flexibilidad su inmovilización en una conformación específica es mucho más compleja, si los comparamos con el calix[4]areno, pero se han exploraron varias estrategias mediante las cuales se puede inmovilizar también la conformación de los calix[6]arenos y calix[8]arenos⁵⁷.

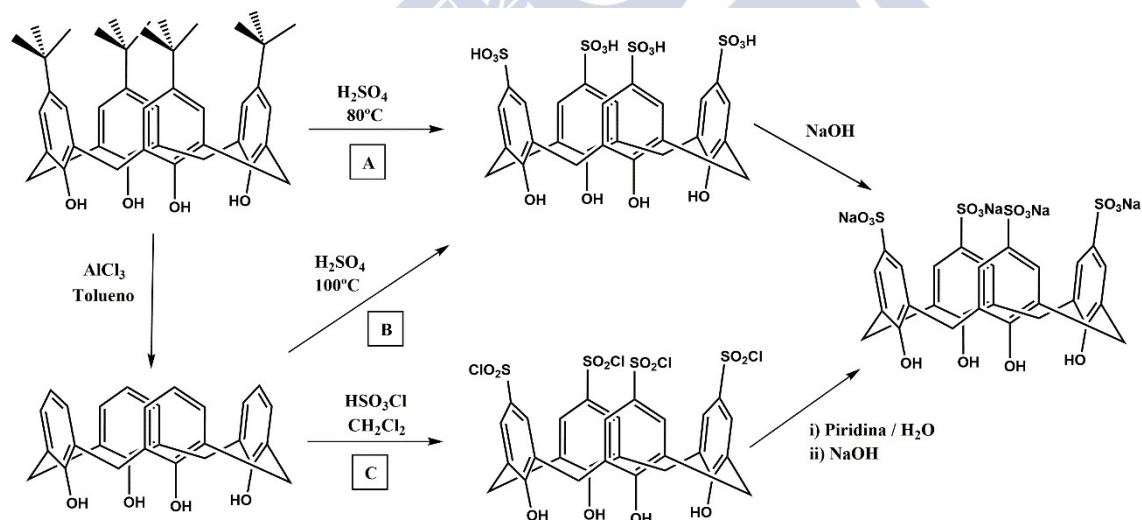
En los espectros de ¹H RMN de los calixarenos, la multiplicidad de las señales nos aporta información para identificar la conformación en la que se encuentra el macrociclo. Para el caso de los calix[4]arenos bloqueados en una determinada conformación o en el caso de que no estén conformacionalmente bloqueados, a partir de la multiplicidad de las señales de los protones del puente metileno (Ar-CH₂-Ar) podemos saber en qué conformación se encuentra el macrociclo⁵⁶. Por tanto, para la conformación *cono* se observan en el espectro de ¹H un par de dobletes para las señales Ar-CH₂-Ar, para la conformación de *cono parcial* se observa un par de dobletes y un singlete o dos pares de dobletes, en la conformación *1,2-alternada* se distingue un singlete y dos dobletes, y por último, para la *1,3-alternada* aparece solo un singlete para la señal de los protones del puente metileno (Ar-CH₂-Ar). Para el caso de los calix[6]arenos y calix[8]arenos el análisis de la multiplicidad de las señales de los espectros de ¹H RMN también nos aporta información para identificar la conformación en la que se encuentra el macrociclo⁷², pero por norma general no da la suficiente información y es necesario recurrir a otras técnicas más completas, como RMN bidimensionales.

Debido a la estructura del macrociclo extremadamente versátil y a su elevado grado de funcionalización, podemos aumentar la solubilidad de los calixarenos en agua modificándolos con grupos iónicos o neutros altamente hidrofílicos, ya que por sí solos sin funcionalizar su solubilidad en agua es limitada. La gran variedad de calixarenos funcionalizados con grupos específicos (catiónicos, aniónicos o neutros) implican la posible formación de complejos de inclusión con cationes, aniones o moléculas neutras, actuando como receptores moleculares. De hecho, las primeras evidencias de la formación de complejos *host:guest* con calixarenos fueron obtenidas con calixarenos solubles en agua, concretamente con el *p*-sulfonatocalix[6]areno^{73,74}. Además, la funcionalización de calixarenos, tanto en el borde superior como en el inferior, nos permite obtener compuestos anfífilicos⁷⁰, capaces de autoasociarse para formar micelas o vesículas, y constar también de cavidades para formar complejos de inclusión. Entre los diversos tipos de calixarenos estudiados en la literatura, nos vamos a centrar en los

calixarenos que actúan como receptores catiónicos (en concreto, los *p*-sulfonatocalix[*n*]arenos) y como receptores aniónicos en medio acuoso, describiendo brevemente las propiedades de estos *hosts*.

1.2.3.2 Calix[*n*]arenos como receptores catiónicos

La gran mayoría de los estudios descritos en la literatura de calixarenos solubles en agua se han realizado con los *p*-sulfonatocalix[*n*]arenos (SC_{*n*}), que son calixarenos funcionalizados con grupos sulfonato en el borde superior del macrociclo. Los más estudiados son los *p*-sulfonatocalix[*n*]arenos con cuatro, seis y ocho unidades monoméricas, nombrados como SC₄, SC₆ y SC₈, respectivamente. Estos macrociclos fueron sintetizados por primera vez en 1984 por Shinkai *et al.*^{73,74} a partir de la sulfonación. A parte del método Shinkai, se pueden obtener también a partir de otros dos métodos: el primero consiste en la *ipso*-sulfonación del *p*-*tert*-butilcalix[*n*]areno⁷⁵ y se trata de un método fácil y económico, mientras que el segundo consiste en la cloro-sulfonación de calix[*n*]arenos⁷⁶ no sustituidos. Estas tres rutas sintéticas se muestran en el Esquema 1.12.



Esquema 1.12 : Rutas de síntesis para obtener el *p*-sulfonatocalix[4]areno. (A) *ipso*-sulfonación directa, (B) *ipso*-sulfonación, (C) Cloro-sulfonación.

En disolución acuosa, los grupos sulfonato del borde superior se desprotonan fácilmente debido a que son grupos fuertemente ácidos, mientras que los grupos fenólicos del borde inferior se desprotonan dependiendo del pH de la disolución. En comparación con el monómero correspondiente, el *p*-hidroxibencenosulfonato ($pK_a \approx 9$)⁷⁷, los tres

macrociclos tienen al menos un grupo OH desprotonado, debido a la estabilización del fenolato mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares. Los valores de pK_a obtenidos para la desprotonación de los tres SCn más comunes se presentan en la Tabla 1.3. La mayoría de los experimentos que se encuentran en la bibliografía con estos macrociclos se realizan en condiciones ácidas ($pH \approx 2$) o en condiciones neutras ($pH \approx 7$). Por tanto, esto nos indica que a pH bajo sólo los grupos sulfonatos serán desprotonados, mientras que en condiciones acuosas a pH neutro, los *p*-sulfonatocalix[n]arenos (SC4, SC6 y SC8) tienen cinco, ocho y diez cargas negativas, respectivamente.

Tabla 1.3 : Valores de pK_a para los grupos OH de los SCn.⁷⁷

SCn	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a4}
SC4	3.28	11.5		
SC6	3.29	4.91	12.5	
SC8	3.44	4.26	7.78	10.3

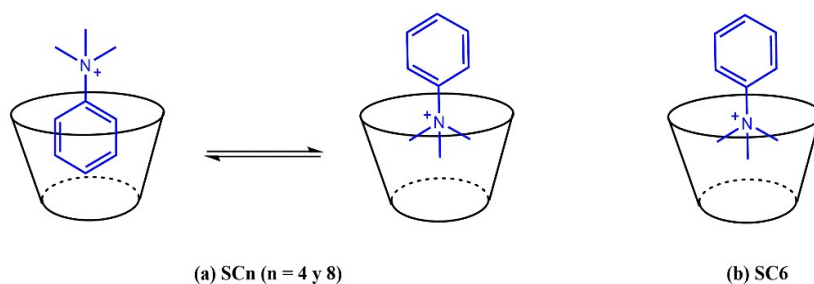
Los SCn son macrociclos flexibles que pueden adoptar distintas conformaciones en disolución, debido a la rotación del oxígeno a través del anillo. Sin embargo, dentro del grupo de los homólogos, el SC4 es mucho menos flexible que el SC6 y SC8, por tanto tiene menos conformaciones posibles que las ocho o dieciséis conformaciones que se dan en el caso de SC6 y SC8, respectivamente. En estado sólido, el SC4 adopta una conformación de cono⁷⁸, mientras que el SC6 presenta una conformación 1,2,3-alternada⁷⁹, aunque puede adoptar otro tipo de conformación dependiendo de las moléculas *guests* presentes. Sin embargo, el SC8 mucho más flexible en estado sólido adopta una conformación nombrada como *loop* plegado (*pleated loop*)⁸⁰, pero al igual que el SC6 puede adoptar otras conformaciones en presencia de *guests*, como una conformación plana o en doble cono invertido⁸¹. En disolución, el SC4 presenta la misma conformación de cono^{82,83}, pero debido a su mayor flexibilidad en disolución acuosa experimenta una inversión del anillo, donde la velocidad de conversión depende del pH y de la presencia de distintas moléculas *guests*. También el SC6 en disolución acuosa adopta la misma conformación que en estado sólido, debido al alto nivel de hidratación del cristal. Sin embargo, el SC8 en disolución se puede interconvertir rápidamente entre las diferentes conformaciones posibles, aunque en un trabajo reciente de Kaliappan *et*

*al.*⁸⁴ se consiguió bloquear una conformación específica del SC8 en disolución, gracias a la formación de un complejo de inclusión con bipyridílicos, aunque no fueron capaces de identificar el conformero.

La química *host:guest* de los *p*-sulfonatocalix[n]arenos ha sido ampliamente estudiada, debido a que una de las características más importantes de estos macrociclos son las fuerzas no covalentes, entre el macrociclo y los distintos sustratos, tales como los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas, de tipo π - π , CH- π y metal-ligando. La formación de complejos *host:guest* de los SCn con cationes metálicos, moléculas orgánicas, moléculas neutras...son algunos de los *guests* estudiados por los diferentes grupos de investigación.

En 2005, Nau *et al.*⁸⁵ realizaron un estudio para detectar la complejación de distintos cationes metálicos inorgánicos por SC4 en agua a diferentes pH, mediante el desplazamiento de un azoalcano fluorescente de la cavidad del SC4 hacia el seno de la disolución, debido a una complejación competitiva entre el catión metálico y la molécula fluorescente. Se detectó y cuantificó por primera vez las constantes de asociación entre SC4 y cationes metálicos monovalentes, y posteriormente nuestro grupo de investigación confirmó los resultados mediante técnicas de relajación y de difusión de ²³Na obtenidas por técnicas de RMN, donde se observa que en ausencia de sales añadidas y a pH neutro, la cavidad del SC4 puede complejar a un catión Na^+ .⁸⁶

La complejación de cationes orgánicos, principalmente los cationes de amonio, con los distintos homólogos de SCn fue estudiado por Shinkai *et al.*⁸², donde mediante técnicas de RMN se observó que el SC4 y SC6 forman complejos con estequiometría 1:1 con las distintas moléculas *guest* (el cloruro de trimetilaminio (TMA) y el 1-adamantiltrimetilamonio (ATMA)), mientras que el SC8 puede complejar dos moléculas *guest* dando lugar a la formación de complejos con estequiometría 1:2. Si comparamos ambos *guest* catiónicos, podemos destacar que debido al carácter más hidrofóbico del ATMA se forman complejos más estables con los SCn que con el TMA. A partir de los datos de ¹H RMN observaron que el TMA se compleja con el SC4 y SC8 de forma no selectiva (Esquema 1.13-(a)), interaccionando simultáneamente con el grupo amonio y con el anillo aromático, mientras que con el SC6 la complejación es selectiva incorporando el grupo amonio del TMA en la cavidad (Esquema 1.13-(b)).



Esquema 1.13

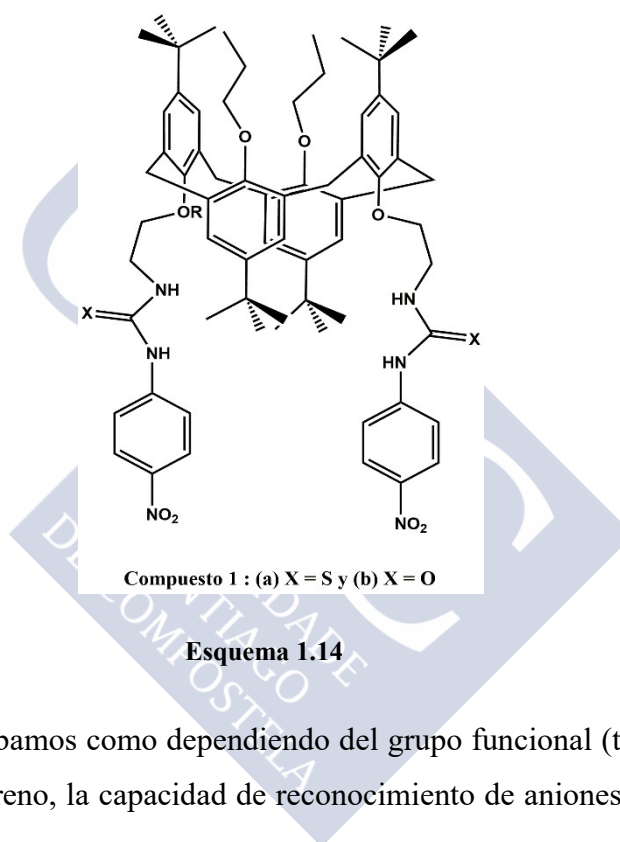
1.2.3.3 Calix[*n*]arenos como receptores aniónicos

El desarrollo de calixarenos como receptores aniónicos constituyen un área de especial importancia en los procesos químicos y biológicos. El desarrollo de receptores aniónicos sintéticos, ha sido más lento en comparación con los receptores catiónicos, debido a las propiedades únicas de los aniones, como la carga negativa que a menudo está deslocalizada, el tamaño y la forma de dichos aniones, que interfiere en el diseño de los receptores aniónicos⁸⁷.

Los calixarenos que actúan como receptores aniónicos, se obtienen con la funcionalización de los bordes superiores e inferiores del macrociclo con grupos como ureas⁸⁸, tio-ureas^{87,89} y animas⁹⁰⁻⁹², principalmente. La funcionalización de calixarenos nos permite obtener macrociclos anfifílicos, que son capaces de autoasociarse para formar agregados micelares o vesiculares, provistos de cavidades para formar complejos *host:guest* con moléculas o iones, y así poder manipular las propiedades de los agregados de calixareno. Las interacciones que se dan en este tipo de macrociclos con distintos *guests* son principalmente por puentes de hidrógeno, pero también a través de interacciones hidrofóbicas e interacciones ion-ligando.

En el grupo de Manoj Kumar *et al.*⁸⁹ han sintetizado un nuevo derivado de calix[4]areno de conformación 1,3-alternada que contiene restos de tiourea (Esquema 1.14-1(a)) y examinaron su capacidad de unión a aniones mediante estudios de espectroscopía UV-Vis y ¹H RMN. Los resultados muestran que el receptor actúa como un sensor colorimétrico, produciéndose una detección colorimétrica selectiva con aniones cianuro, observándose un cambio de color a simple vista, mientras que con otros aniones como fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, sulfato de hidrógeno, dihidrogenofosfato y acetato no sucede este comportamiento. El sensor funciona mediante un mecanismo de transferencia de protones intermoleculares, y dicho cambio de color se debe a la desprotonación de los protones de la tiourea, y este proceso es

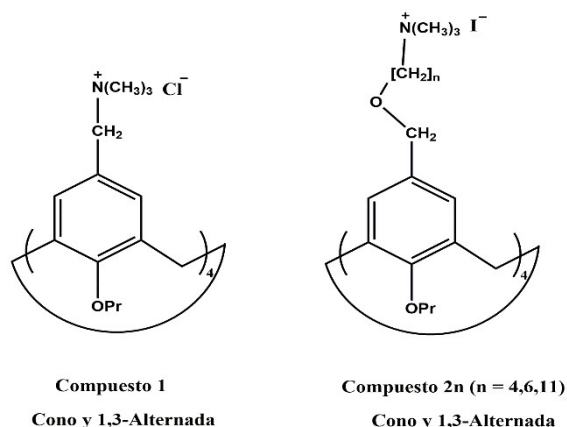
reconocido en muchos casos por un cambio de color distinto⁹³. En un artículo posterior⁸⁸, el mismo grupo sintetizó un nuevo derivado de calix[4]areno de conformación 1,3-alternada pero esta vez con restos de urea (Esquema 1.14-1(b)) y examinaron su capacidad de reconocimiento de aniones tales como fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato y acetato. Los estudios de complejación obtenidos por espectroscopía UV-Vis y ¹H RMN se llevaron a cabo con los distintos aniones, y observaron que el calixareno muestra especial selectividad para los iones cloruro. Esta selectividad se debe a la formación de puentes de hidrógeno fuertes entre los restos de urea y los iones cloruro.



Esquema 1.14

Por tanto, comprobamos como dependiendo del grupo funcional (tiourea o urea) que modifica el calix[4]areno, la capacidad de reconocimiento de aniones es distinta en ambos casos.

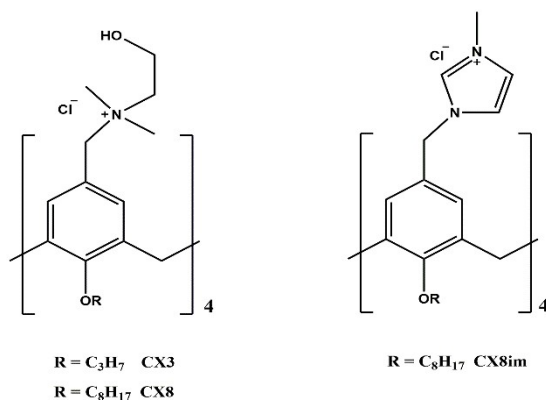
Como se mencionó anteriormente, los calixarenos anfífilicos pueden autoagregarse en diferentes estructuras, en el grupo de Shinkai⁹⁴ investigaron la influencia de la conformación en la que se encuentran los calixarenos y como esto puede afectar en sus procesos de autoagregación. Para probar esta hipótesis, sintetizaron calix[4]arenos anfífilicos modificados en la posición *para* del fenilo con grupos $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2$ (Compuesto 1) y con grupos $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+[\text{CH}_2]_n\text{OCH}_2$ (Compuesto 2n, n = 4, 6 y 11), con conformación de cono o con una conformación 1,3-alternada solubles en agua, y conformacionalmente inmovilizados (Esquema 1.15).



Esquema 1.15

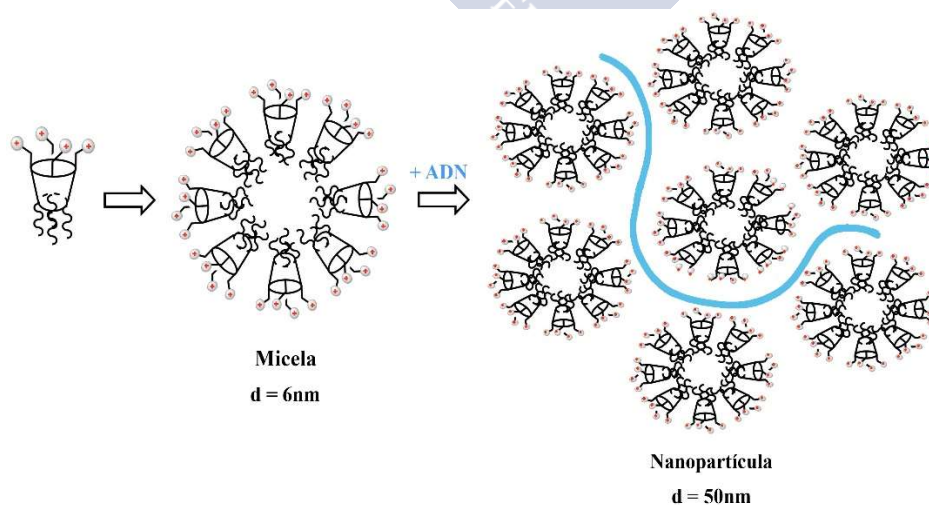
Los resultados que obtuvieron demuestran que el compuesto 1-cono se agrega para forman micelas mientras que con la conformación 1,3-alternada no se forman tales agregados micelares. Por otra parte, los resultados que obtuvieron para el compuesto 2n muestran que tanto para la conformación cono como para la 1,3-alternada forman agregados en agua, demostrando que los isómeros con estructura cónica forman favorablemente micelas globulares mientras que los isómeros 1,3-alternados presentan una geometría cilíndrica, y sólo el 1,3-alternado-2n (n = 11) puede formar agregados vesiculares estables con un diámetro de 1000-2000 Å. Estos resultados demostraron que las propiedades de agregación de los calix[4]arenos anfífilicos pueden verse afectadas por el cambio conformacional del macrociclo.

En los últimos años, Klymchenko y colaboradores⁹² realizaron un estudio donde las moléculas anfífilicas macrocíclicas basadas en calix[4]arenos son altamente atractivas para controlar el montaje supramolecular de ADN en pequeñas nanopartículas, ya que presentan una arquitectura cónica única y pueden soportar múltiples grupos cargados. En este trabajo, sintetizaron dos nuevos calixarenos anfífilicos con grupos catiónicos (N,N-dimetiletanolamina y N-metilimidazol) en el borde superior y cadenas alquílicas de ocho átomos de carbono (octil) en el borde inferior, nombrados como CX8 y CX8im, respectivamente; y se compara con un calixareno análogo al formado por N,N-dimetiletanolamina pero con cadenas alquílicas de tres átomos de carbono (CX3)⁹⁵ (Esquema 1.16).



Esquema 1.16

Los resultados que obtuvieron muestran que los calix[4]arenos con cadenas alquílicas largas (CX8 y CX8im) se autoagregan formando micelas de 6 nm de diámetro y tienen una cmc baja, además presentan la capacidad de interactuar cooperativamente con el ADN formando pequeñas nanopartículas de 50 nm de diámetro. Por el contrario, el análogo de cadena alquílica corta (CX3) que no puede formar micelas a bajas concentraciones falló en condensar el ADN en complejos compactos, dando lugar a complejos polidispersos grandes de ADN. Por tanto, la preorganización en micelas es un requisito importante para la compactación eficaz del ADN en nanopartículas pequeñas. En el Esquema 1.17 se muestra como el ADN cargado negativamente actúa como una cinta adhesiva que envuelve y reúne las micelas catiónicas formadas por los calixarenos (CX8 o CX8im). Además, consideraron que la forma esférica de las micelas de calixareno probablemente favorece su empaquetamiento compacto en pequeñas nanopartículas.



Esquema 1.17

1.3 Bibliografía

- (1) Cram, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 1009–1112.
- (2) Lehn, J. M. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1988**, *27*, 89–112.
- (3) Pedersen, C. J. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1988**, *27*, 1021–1027.
- (4) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramol. Chem. 2nd Ed. 2009, John Wiley Sons* **2009**.
- (5) Ariga, K.; Kunitake, T. *Supramol. Chem. – Fundam. Appl. Springer – Verlag Heidelberg, Berlin, Ger.* **2006**.
- (6) Steed, J. W. *Supramolecular Chem.* **2015**, *27*, 731–733.
- (7) Lehn, J.-M. *Supramol. Chem. Concepts Perspect. VCH, Weinheim*, **1995**.
- (8) Schneider, H.-J.; Yatsimirsky, A. K. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 263–277.
- (9) Hancock, R. D. *J. Chem. Educ.* **1992**, *69*, 615–621.
- (10) Cabbiness, D. K.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6540–6541.
- (11) Cabbiness, D. K.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 2151–2153.
- (12) Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017–7036.
- (13) Villiers, A. C. *R. Acad. Sci.* **1891**, *112*, 435–438.
- (14) Bender, M. L.; Komiyama, M. *Z. Naturforsch.* **1948**, *3b*, 464.
- (15) Freudenberg, K.; Cramer, F. *Z. Naturforsch.* **1948**, *3b*, 464.
- (16) Crini, G. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10940–10975.
- (17) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743–1753.
- (18) Connors, K. A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1325–1357.
- (19) Hu, J.; Tao, Z.; Li, S.; Liu, B. *J. Mater. Sci.* **2005**, *40*, 6057–6061.
- (20) Cramer, F.; Saenger, W.; Spatz, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 14–20.
- (21) Garcia-Rio, L.; Leis, J. R.; Mejuto, J. C.; Pérez-Juste, J. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 7383–7389.
- (22) Garcia-Rio, L.; Leis, J. R.; Mejuto, J. C.; Pérez-Juste, J. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 4581–4587.
- (23) Valente, A. J. M.; Söderman, O. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *205*, 156–176.
- (24) Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D’Souza, V. T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977–1996.
- (25) Zhang, J.; Ma, P. X. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1215–1233.
- (26) Zerkoune, L.; Angelova, A.; Lesieur, S. *Nanomaterials* **2014**, *4*, 741–765.
- (27) R. Behrend, E. Meyer, F. R. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1905**, *339*, 1–37.
- (28) Freeman, W. A.; Mock, W. L.; Shih, N. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7367–7368.
- (29) Kim, J.; Jung, I. S.; Kim, S. Y.; Lee, E.; Kang, J. K.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 540–541.
- (30) Day, A.; Arnold, A. P.; Blanch, R. J.; Snushall, B. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8094–8100.
- (31) Day, A. I.; Blanch, R. J.; Arnold, A. P.; Lorenzo, S.; Lewis, G. R.; Dance, I. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41*, 275–277.
- (32) Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H.-J.; Kim, K. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 621–630.
- (33) Inoue, Y.; Jing, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10637–10644.

- (34) Honig, B.; Nicholls, A. *Science* **1995**, *268*, 1144–1149.
- (35) Jeon, W. S.; Moon, K.; Park, S. H.; Chun, H.; Ko, Y. H.; Lee, J. Y.; Lee, E. S.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Rekharsky, M. V.; Sindelar, V.; Sobransingh, D.; Inoue, Y.; Kaifer, A. E.; Kim, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12984–12989.
- (36) Mock, W. L.; Shih, N. Y. *J. Org. Chem* **1983**, *48*, 3618–3619.
- (37) Mock, W. L.; Shih, N.-Y. *J. Org. Chem* **1986**, *51*, 4440–4446.
- (38) Mock, W. L.; Shih, N.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4706–4710.
- (39) Florea, M.; Nau, W. M. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 9338–9342.
- (40) El Haouaj, M.; Ho Ko, Y.; Luhmer, M.; Kim, K.; Bartik, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, *11*, 2104–2107.
- (41) Zhang, X. X.; Krakowiak, K. E.; Xue, G. P.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, *39*, 3516–3520.
- (42) Zhao, J.; Kim, H. J.; Oh, J.; Kim, S. Y.; Lee, J. W.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, O. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40*, 4233–4235.
- (43) Moghaddam, S.; Inoue, Y.; Gilson, M. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4012–4021.
- (44) Liu, S.; Ruspic, C.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Zavalij, P. Y.; Isaacs, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15959–15967.
- (45) Kim, H.-J.; Jeon, W. S.; Ko, Y. H.; Kim, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 5007–5011.
- (46) Ong, W.; Gómez-Kaifer, M.; Kaifer, A. E. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1791–1794.
- (47) Mirzoian, A.; Kaifer, A. E. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1052–1058.
- (48) Mu, Ting Wei; Liu, Lei; Zhang, Ke Chun; Guo, Q. X. *Chinese Chem. Lett.* **2001**, *12*, 783–786.
- (49) Jeon, W. S.; Kim, H.-J.; Lee, C.; Kim, K. *Chem. Commun. (Camb)*. **2002**, *17*, 1828–1829.
- (50) Jeon, Y. J.; Bharadwaj, P. K.; Choi, S.; Lee, J. W.; Kim, K. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41*, 4474–4476.
- (51) Jon, S. Y.; Ko, Y. H.; Park, S. H.; Kim, H.-J.; Kim, K. *Chem. Commun.* **2001**, *19*, 1938–1939.
- (52) Pattabiraman, M.; Natarajan, A.; Kaliappan, R.; Mague, J. T.; Ramamurthy, V. *Chem. Commun.* **2005**, *36*, 4542–4544.
- (53) Jeon, W. S.; Ziganshina, A. Y.; Wook Lee, J.; Ko, Y. H.; Kang, J. K.; Lee, C.; Kim, K. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42*, 4097–4100.
- (54) Woo, S. J.; Kim, E.; Young, H. K.; Hwang, I.; Jae, W. L.; Kim, S. Y.; Kim, H. J.; Kim, K. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44*, 87–91.
- (55) Kim, S.-Y.; Jung, I.-S.; Lee, E.; Kim, J.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40*, 2119–2121.
- (56) Böhmer, V. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1995**, *34*, 713–745.
- (57) Ikeda, A.; Shinkai, S. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1713–1734.
- (58) Gutsche, C. D. *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 161–170.
- (59) Gutsche, C. D.; Iqbal, M. *Org. Synth.* **1990**, *68*, 234–237.
- (60) Gutsche, C. D.; Dhawan, B. . L.; M.; Stewart, D. R. *Org. Synth.* **1990**, *68*, 238–242.
- (61) Munch, J. H.; Gutsche, C. D. *Org. Synth.* **1990**, *68*, 243–246.
- (62) Stewart, D. R.; Gutsche, C. D. *J. Am. Chem. Soc* **1999**, *121*, 4136–4146.

- (63) Arduini, A.; Ciesa, F.; Fragassi, M.; Pochini, A.; Secchi, A. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44*, 278–281.
- (64) Talotta, C.; Gaeta, C.; Pierro, T.; Neri, P. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2098–2101.
- (65) Arduini, A.; Demuru, D.; Pochini, A.; Secchi, A. *Chem. Commun. (Camb)*. **2005**, *5*, 645–647.
- (66) Wei, A. *Chem. Commun. (Camb)*. **2006**, *15*, 1581–1591.
- (67) Mulder, A.; Auletta, T.; Sartori, A.; Del Ciotto, S.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6627–6636.
- (68) Ghosh, I.; Nau, W. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 764–783.
- (69) Guo, D.-S.; Liu, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5907.
- (70) Helttunen, K.; Shahgaldian, P. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2704.
- (71) Gutsche, C. D. *R. Soc. Chem. Cambridge. England.* **1989**.
- (72) Gutsche, C. D.; Bauer, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6052–6059.
- (73) Shinkai, S.; Mori, S.; Tsubaki, T.; Sone, T.; Manabe, O. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5315–5318.
- (74) Shinkai, S.; Mori, S.; Koreishi, H.; Tsubaki, T.; Manabe, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2409–2416.
- (75) Lamartine, R.; Regnouf-de-Vains, J.-B.; Choquar, P.; Marcillac, A. . *World Patent, WO 97/49677*, **1997**.
- (76) Morzherin, Y.; Rudkevich, D. M.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7602–7605.
- (77) Suga, K.; Ohzono, T.; Negishi, M.; Deuchi, K.; Morita, Y. *Supramol. Sci.* **1998**, *5*, 9–14.
- (78) Shinkai, S.; Araki, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9053–9058.
- (79) Atwood, J. L.; Clark, D. L.; Juneja, R. K.; Orr, I. G. W.; Robinson, K. D.; Vincentia, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7558–7559.
- (80) Dalgarno, S. J.; Hardie, M. J.; Atwood, J. L.; Warren, J. E.; Raston, C. L. *New J. Chem.* **2005**, *29*, 649–652.
- (81) Perret, F.; Bonnard, V.; Danylyuk, O.; Suwinska, K.; Coleman, A. W. *New J. Chem.* **2006**, *30*, 987–990.
- (82) Shinkai, S.; Araki, K.; Matsuda, T.; Manabe, O. *Bulletin of the Chemical Society of Japan.* **1989**, 3856–3862.
- (83) Shinkai, S.; Araki, K.; Kubota, M.; Arimura, T.; Matsuda, T. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 295–300.
- (84) Kaliappan, R.; Ling, Y.; Kaifer, A. E.; Ramamurthy, V. *Langmuir* **2009**, *25*, 8982–8992.
- (85) Bakirci, H.; Koner, A. L.; Nau, W. M. *Chem. Commun. (Camb)*. **2005**, *43*, 5411–5413.
- (86) Basilio, N.; García-Río, L.; Martín-Pastor, M. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 7201–7206.
- (87) Babu, J. N.; Bhalla, V.; Kumar, M.; Puri, R. K.; Mahajan, R. K. *New J. Chem.* **2009**, *33*, 675–681.
- (88) Babu, J. N.; Bhalla, V.; Kumar, M.; Mahajan, R. K.; Puri, R. K. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2772–2775.
- (89) Babu, J. N.; Bhalla, V.; Kumar, M.; Singh, H. *Lett. Org. Chem.* **2006**, *3*, 787–793.
- (90) Shi, Y.; Schneider, H.-J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, *8*, 1797–1804.
- (91) Shahgaldian, P.; Sciotti, M. A.; Pielec, U. *Langmuir* **2008**, *24*, 8522–8526.

- (92) Rodik, R. V.; Klymchenko, A. S.; Jain, N.; Miroshnichenko, S. I.; Richert, L.; Kalchenko, V. I.; Mély, Y. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17*, 5526–5538.
- (93) Evans, L. S.; Gale, P. A.; Light, M. E.; Quesada, R. *Chem. Commun.* **2006**, *9*, 965–967.
- (94) Arimori, S.; Nagasaki, T.; Shinkai, S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, *887*, 679–683.
- (95) Mchedlov-Petrossyan, N. O.; Vilkova, L. N.; Vodolazkaya, N. a.; Yakubovskaya, a. G.; Rodik, R. V.; Boyko, V. I.; Kalchenko, V. I. *Sensors* **2006**, *6*, 962–977.





2 Modulación de la reactividad química por complejación múltiple con γ -Ciclodextrina

2.1 Introducción

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos compuestos por unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces α ($1 \rightarrow 4$), que tienen forma de un cono truncado con una cavidad de carácter hidrofóbica¹. Las ciclodextrinas más comunes, que además se encuentran disponibles comercialmente, son la α , β , y γ -CD que tienen seis, siete, y ocho unidades de D-glucopiranosas, respectivamente. Las CDs tienen una cavidad hidrofóbica y, como consecuencia, una molécula orgánica con dimensiones apropiadas puede ser incorporada en su cavidad, originando un complejo de inclusión. La formación de este tipo de complejos, donde las CD nativas pueden albergar *guests* orgánicos, se ha discutido en términos hidrofóbicos y de interacciones de van der Waals, el enlace de hidrógeno, la liberación de moléculas de agua de alta energía, y la tensión estérica - todos los efectos que a menudo no son suficientes para lograr una complejación fuerte y selectiva^{1,2}. Los múltiples sitios y los modos de interacción son requisitos previos para mejorar la afinidad de unión y manipular la disposición de las moléculas *guests* dentro de la cavidad de la CD. Las interacciones *host:guest*, que implican CDs y moléculas orgánicas predominantemente pequeñas, producen complejos de inclusión con estequiometría 1:1². Sin embargo, se pueden unir dos moléculas de CD a una única molécula *guest* para formar un complejo de inclusión CD-*guest* 2:1³⁻⁹. En algunos casos, una sola molécula de CD puede acomodar dos moléculas *guest* para formar un complejo de inclusión CD-*guest* 1:2¹⁰⁻¹⁶.

Los surfactantes, son *guests* adecuados para llevar a cabo un modelo detallado sobre las investigaciones de las interacciones *host:guest* con las ciclodextrinas, debido a que sus propiedades estructurales se pueden modificar fácilmente. Modificando la longitud y el número de cadenas alquílicas, al igual que la carga y tamaño del grupo de cabeza, se pueden obtener diferentes estructuras y estequiometrías para el complejo

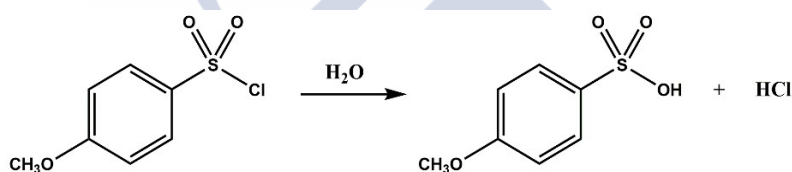
adquirido. La interacción de β -CD con alquilsulfonatos de sodio¹⁷, dodeciltrimetilsulfato sódico (SDS) o bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TTABr)¹⁸, forma complejos con estequiometría 1:1. En cambio, desde el cloruro de cetil (C_{16} TACl) al octadeciltrimetilamonio (C_{18} TACl), se pueden formar complejos 1:1 y 2:1 con β -CD,¹⁹ respectivamente.

En comparación con otras ciclodextrinas nativas, la γ -CD tiene una gran cavidad que puede permitir acomodar dos moléculas de tamaño y forma adecuados²⁰. Cuando dos moléculas *guest* se encuentran dentro de la cavidad de la CD, uno esperaría que pueden interactuar unas con otras. Este fenómeno de inclusión de dos *guests*, se mostró por primera vez en el caso de γ -CD, induciendo la formación de excímeros de fluorescencia²¹. Debemos considerar también la posibilidad de la formación simultánea de complejos con distintas estequiometrías. Por ejemplo, la γ -CD facilitó la formación de un complejo ternario de catalizador-sustrato- γ -CD 1:1:1, llevándose a cabo una reacción redox en este sistema^{21,22}. Se han investigado las interacciones moleculares entre un anión orgánico con γ -CD y varios cationes orgánicos por medio de espectroscopía de absorción y fluorescencia¹³ y electroforesis capilar²³. La asociación entre la γ -CD y un anión orgánico produjo un complejo de inclusión 1:1 cargado negativamente, con una mejor afinidad por la inclusión de un segundo *guest* catiónico. Los resultados sugieren que la formación del complejo ternario es favorecida con cationes orgánicos que tienen cadenas alquílicas largas.

Nuestro interés en este estudio, se centra en el uso de ciclodextrinas como reactores moleculares, que son esencialmente medios de reacción adecuados para el ensamblaje de reactivos a nivel molecular. El uso de moléculas *host* en la catálisis supramolecular introducirán nuevas interacciones que se pueden clasificar según su naturaleza: (i) las interacciones moleculares responsables de la formación de complejos *host:guest* pueden afectar a la reactividad química mediante la estabilización de productos intermedios y/o estados de transición. (ii) receptores moleculares, que simplemente puede actuar como recipientes de reacción de escala nanométrica, aumentando las concentraciones locales de los reactivos y, de este modo, la velocidad de reacción.

El objetivo de este trabajo es obtener evidencia de la formación de complejos de inclusión de tres componentes y estudiar el papel que el tercer componente podría desempeñar en la reactividad química. Con este objetivo, se llevó a cabo un estudio cinético utilizando una sonda química cloruro de 4-metoxibencenosulfonilo (MBSC,

véase el Esquema 2.1), que es una molécula que tiene una geometría y polaridad adecuada para la formación de complejos de inclusión con la γ -CD. Una combinación de experimentos cinéticos y de DOSY (Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy) nos proporcionan la evidencia para la formación de diferentes tipos de complejos en presencia de un surfactante, C_n TAB ($n = 8, 10, 14, 18$) como tercer componente. Se observaron distintos mecanismos de asociación de la ciclodextrina con el MBSC en presencia de un tercer componente: el mecanismo competitivo con β -CD y el cooperativo con γ -CD que conducen a distintas reactividades químicas. La cavidad más grande de la γ -CD en comparación con la β -CD, es responsable del cambio desde un mecanismo de complejación competitiva predominante con la β -CD a un mecanismo mixto de cooperación/competición que se produce para la γ -CD. El tamaño de la cavidad de la γ -CD es lo suficientemente grande como para incluir dos cadenas alquílicas de surfactante con un efecto cooperativo.



Esquema 2.1

2.2 Sección Experimental

Materiales. Todos los reactivos químicos comerciales fueron adquiridos de la mayor pureza disponible en el mercado y ninguno requiere purificación adicional. La γ -CD fue suministrada por Cyclolab.

Estudio espectrofotométrico. Las disoluciones de partida de MBSC se prepararon en acetonitrilo, debido a su inestabilidad y baja solubilidad en agua. La concentración final de acetonitrilo en el medio de reacción era de 1% (v/v). Las disoluciones del sistema γ -CD/surfactante se prepararon mezclando volúmenes apropiados de las disoluciones acuosas madre de γ -CD y surfactante, en una cubeta de cuarzo de 1cm de paso de luz. Los experimentos cinéticos se iniciaron al adicionar un pequeño volumen de la disolución de partida de MBSC, cuya concentración fue de 1×10^{-4} M en cubeta, a la disolución del sistema correspondiente, previamente termostatizada a 25°C. Las

reacciones se estudiaron cinéticamente siguiendo el cambio de absorbancia observado a 270 nm, máximo de absorción del MBSC, en un espectrofotómetro Cary 50 UV-Vis. La Figura 2.1, muestra el espectro de la mezcla de reacción. Los datos absorbancia-tiempo de todos los experimentos cinéticos se ajustaron a la ecuación integrada de primer orden, ecuación (2.1), y los valores de las constantes de velocidad de pseudo-primer orden, k_{obs} , fueron reproducibles con un margen de error del 3%.

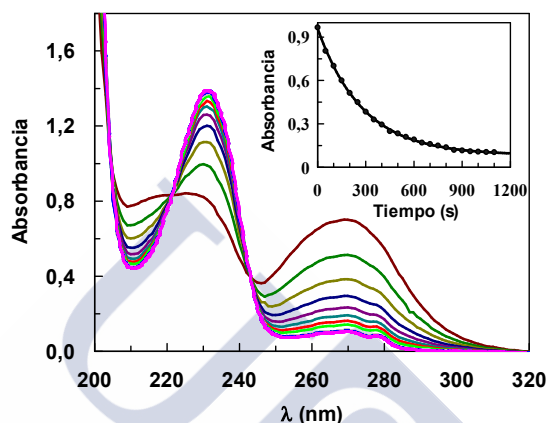


Figura 2.1 : Espectro UV-Vis para la reacción de solvólisis del MBSC en función del tiempo, $[MBSC]=1 \times 10^{-4}$ M, y un ejemplo del ajuste de los datos experimentales a la ecuación de primer orden, $[MBSC]=1 \times 10^{-4}$ M y $[C_{10}TAB]=1 \times 10^{-3}$ M.

$$A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty)e^{-k_{obs}t} \quad (2.1)$$

Conductividad. La conductividad eléctrica (κ) se midió con un conductímetro Crison GLP 32, calibrado usando dos soluciones estándar de conductividad KCl, suministrados por Crison ($[KCl] = 0.01$ M, $\kappa = 1413 \mu\text{Scm}^{-1}$ y $[KCl] = 0.1$ M, $\kappa = 12.88 \text{mScm}^{-1}$ a 25°C). El error en la exactitud de las medidas fue del 0.5%. Durante las mediciones de conductividad eléctrica, la temperatura se mantiene constante por medio de un baño de agua termostatzado a 25°C . Las disoluciones se prepararon con agua Milli-Q ($\kappa = 0.1$ - $0.50 \mu\text{Scm}^{-1}$) y el estudio de la variación de la conductividad eléctrica con la concentración, ha sido realizado mediante la adición de volúmenes conocidos de una disolución concentrada de surfactante. La conductividad eléctrica se utilizó para la determinación de valores de la concentración micelar crítica (cmc).

Experimentos de RMN. Las disoluciones madre de γ -CD y $C_{10}TAB$ se prepararon en D_2O (99.9%) y el *p*-nitrofenilacetato (NPA) se preparó en $DMSO-d_6$. El estudio de

complejación de NPA por γ -CD, se realizó manteniendo constante la concentración $[NPA] = 1 \text{ mM}$, y variando la concentración de γ -CD. Los sistemas de $C_{10}TAB/\gamma$ -CD se prepararon mezclando los volúmenes apropiados de disoluciones madre de γ -CD y $C_{10}TAB$. En todos los casos la concentración de $C_{10}TAB$ (12,5 mM) se mantuvo constante, por debajo de la concentración micelar crítica (cmc), y se fue variando la concentración de γ -CD. En el proceso de formación de complejos de NPA en presencia del sistema mixto $C_{10}TAB/\gamma$ -CD, se mantuvieron constantes las concentraciones de NPA (1 mM) y γ -CD (27 mM), y se fue variando la concentración de $C_{10}TAB$.

Los espectros de 1H RMN y de DOSY se llevaron a cabo a $25^\circ C$ en un espectrómetro Varian Inova 400. Los espectros de difusión se obtuvieron mediante experimentos de eco spin con pulsos de gradientes bipolares²⁴. Se aplicaron gradientes rectangulares (G) con 2 ms de duración (δ), variando la potencia de los mismos entre 2 a 64.3 cm^{-1} en 20 pasos. Para obtener resultados fiables para el coeficiente de difusión, D , el tiempo de difusión, Δ , de los experimentos fue optimizado para cada muestra en un valor entre 50 y 200 ms, de forma que la intensidad de las señales disminuyera cerca del 95% para el gradiente máximo. Los datos fueron procesados mediante el programa MestReC (*Mestrelab Research Inc.*).

2.3 Resultados y Discusión

El uso de la γ -CD como un nuevo medio de reacción en la catálisis supramolecular, requiere el conocimiento de las constantes de equilibrio y estequiometrías de las especies que actúan como *guest*. Debido al gran tamaño de la cavidad de la γ -CD en comparación con la cavidad de α - o β -CD, se debería considerar la posibilidad de la formación de complejos *host:guest* 1:2, donde los *guests* se deben considerar dos moléculas del mismo *guest* o, más importante desde el punto de vista de la catálisis, dos moléculas de distintos *guests* pueden ser incluidas de forma simultánea. Con el fin de evaluar esta posibilidad y su influencia en la reactividad química se ha diseñado un sistema con dos *guests* potenciales: una pequeña molécula orgánica (NPA o MBSC) y un surfactante catiónico. La preparación de distintas combinaciones de NPA y el surfactante catiónico nos permitirán cuantificar la inclusión simultánea de dos *guests* distintos por la γ -CD. Por otra parte, mediante el uso del MBSC podemos estudiar el efecto cinético que la formación de complejos con diferente estequiometría tiene sobre la reactividad química.

Los estudios descritos en este capítulo se presentarán en el siguiente orden: (i) en primer lugar vamos a analizar la formación de los complejos *host:guest*, 1:1 y 1:2, de los sistemas individuales formados por γ -CD y el surfactante catiónico y de γ -CD con la pequeña molécula orgánica (NPA). (ii) El segundo paso es investigar la formación de complejos múltiples mediante la adición simultánea del surfactante catiónico y NPA a una disolución de γ -CD. Se discutirá la formación de distintos complejos *host:guest*, denominados como CD-NPA; CD-surfactante; CD-surfactante-surfactante y CD-NPA-surfactante y se informará de su interconversión. (iii) Y por último, la formación de distintos complejos tendrá consecuencias importantes sobre la reactividad química mediante el uso de MBSC como una sonda química.

2.3.1 Determinación de las constantes de equilibrio para la formación de los complejos individuales 1:1 y 1:2 entre γ -CD y los surfactantes catiónicos (C_nTAB^+)

La habilidad de la γ -CD para acomodar dos moléculas de surfactante con el fin de formar complejos 1:2 está extensamente descrita en la bibliografía²⁵⁻²⁷.

Con el fin de cuantificar este proceso se han analizado los coeficientes de difusión del surfactante catiónico $C_{10}TAB$, y de la ciclodextrina. La formación de los complejos de inclusión se estudió mediante la variación de la concentración de γ -CD, manteniendo constante la concentración de surfactante a un valor muy por debajo de su concentración micelar crítica, cmc, con el fin de garantizar que sólo los monómeros están presentes en disolución.

2.3.1.1 Difusimetría de RMN

La difusimetría de RMN o DOSY (Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy) es una técnica que permite determinar los coeficientes de difusión (D) de una o varias especies en disolución a partir de sus señales en el espectro de RMN. A partir del coeficiente de difusión se puede obtener información acerca del tamaño y forma de moléculas y/o agregados supramoleculares²⁸. Entre las diversas aplicaciones, se encuentran la determinación de constantes de asociación, investigación de fenómenos

de autoagregación, pares iónicos, encapsulación, tamaño y estructura de sistemas lábiles.

El análisis cuantitativo de la intensidad de un pico de eco correspondiente en el espectro de difusión, proporciona el respectivo coeficiente de difusión de translación de la molécula y/o agregado correspondiente. Esto se logró mediante ajuste no lineal de la intensidad de la señal a la ecuación de Stejskal-Tanner²⁹.

$$I = I_0 \exp \left[-D\gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \right] \quad (2.2)$$

donde I es la intensidad de la señal medida, I_0 es la intensidad o integral de la señal con el pulso de gradiente más bajo, γ es la constante giromagnética del núcleo observado, y el resto de los parámetros se han definido anteriormente. En todos los experimentos, el decaimiento de la intensidad de las señales se ajustaron a la ecuación (2.2), lo que demuestra que representan un único coeficiente de difusión. Un diagrama típico de la caída de la intensidad de la señal de ^1H vs $\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ y el ajuste no lineal a la ecuación (2.2) se muestra en la Figura 2.2 .

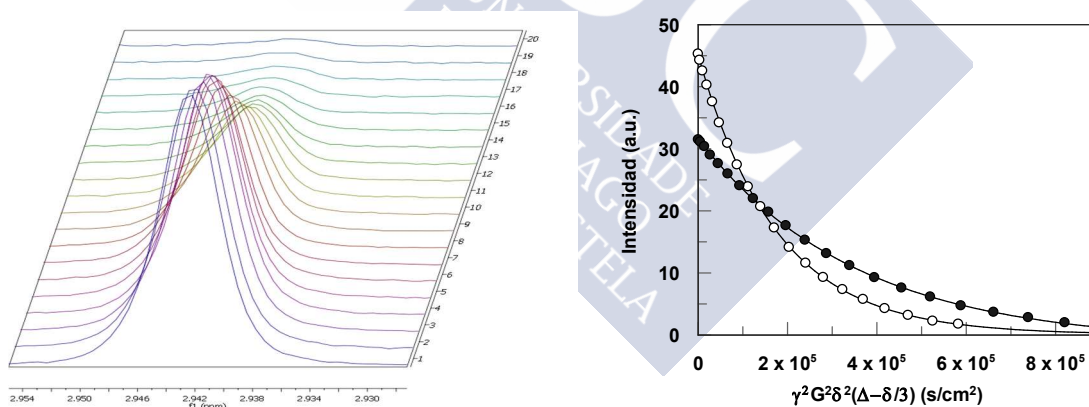


Figura 2.2 : Decaimiento de la intensidad de la señal de ^1H DOSY de RMN del C_{10}TAB en ausencia (\circ) y en presencia de γ -CD (30 mM) (\bullet). Los datos se ajustaron a una función exponencial (líneas continuas), ajuste a la ecuación (2.2).

Se analizaron las intensidades del pico de los protones metilo del grupo de cabeza del surfactante, C_{10}TAB . La Figura 2.3 muestra los coeficientes de difusión para C_{10}TAB variando las concentraciones de γ -CD. Debe tenerse en cuenta que el coeficiente de difusión para γ -CD, no se ve muy afectado por la adición de surfactante, en concordancia con los datos bibliográficos obtenidos del estudio realizado con β -

CD^{30,31}. Como se puede observar, los coeficientes de difusión de C₁₀TAB disminuyen a medida que aumenta la concentración de γ -CD, debido a la formación de un complejo de inclusión con la γ -CD.

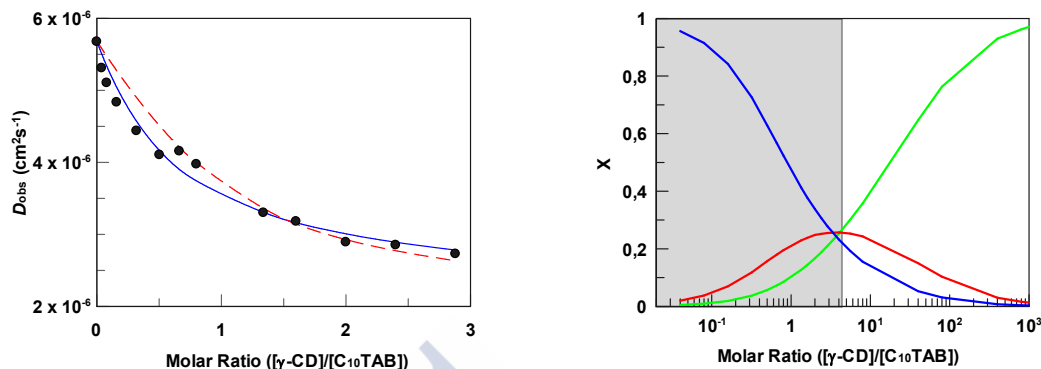


Figura 2.3 : (Izquierda) Coeficientes de difusión observados de [C₁₀TAB]= 12,5 mM, variando la concentración de γ -CD. Las líneas muestran el ajuste de los datos al modelo de los coeficientes de difusión para complejo 1:1 (línea discontinua) y al modelo para los complejos 1:1 y 1:2 (línea continua). (Derecha) Distribución de las fracciones molares (X) C₁₀TAB libre (línea azul), complejo 1:1 (línea verde) y complejo 1:2 (línea roja). Debe tenerse en cuenta que las condiciones experimentales en la figura izquierda corresponden a la región oscura en la figura derecha.

Con el fin de llevar a cabo un análisis cuantitativo, los datos experimentales se ajustaron a un modelo para la determinación de complejos 1:1.

Modelo para la determinación de los coeficientes de difusión en complejos 1:1

El modelo utilizado se basa en el supuesto de que se forma un complejo 1:1 entre la γ -CD y el surfactante (S).



Esquema 2.2

La estabilidad del complejo de inclusión puede ser descrita como una constante de equilibrio, $K_{1:1}$:

$$K_{1:1} = \frac{[CD:S]}{[CD]_f[S]_f} \tag{2.3}$$

Donde $[CD]_f$ y $[S]_f$ representan la concentración de especies no complejadas o libres, de CD y de surfactante, respectivamente, y $[CD:S]$ es la concentración del complejo 1:1.

El procedimiento para interpretar los datos de D_{obs} vs Concentración se basa en un modelo de intercambio n -sitios, en la que se identifican el número y la naturaleza de los sitios y el coeficiente de difusión observado se expresa como un promedio ponderado de la distribución entre los sitios. En el presente estudio, para el caso del surfactante se pueden identificar dos sitios distintos: surfactante libre y surfactante complejoado. Por lo tanto, el coeficiente de difusión observado para el surfactante, $D_{S,obs}$, viene dado por la siguiente ecuación:

$$D_{S,obs} = (1 - \chi_{CD:S})D_{S,f} + \chi_{CD:S}D_{CD:S} \quad (2.4)$$

donde $D_{S,f}$ es el coeficiente de difusión del surfactante libre, $D_{CD:S}$ es el coeficiente de difusión del complejo 1:1 y $\chi_{CD:S}$ es la fracción molar del surfactante complejoado, que viene dada por:

$$\chi_{CD:S} = \frac{C_S - [S]_f}{C_S} \quad (2.5)$$

donde C_S es la concentración total del surfactante y $[S]_f$ es la concentración de surfactante libre.

Las moléculas de CD, por otro lado, pueden intercambiarse entre dos sitios distintos, y el coeficiente de difusión observado para CD, $D_{CD,obs}$, viene dado por:

$$D_{CD,obs} = (1 - \chi_{CD:S})D_{CD,f} + \chi_{CD:S}D_{CD:S} \quad (2.6)$$

$$\chi_{CD:S} = \frac{C_{CD} + [CD]_f}{C_{CD}} \quad (2.7)$$

donde $D_{CD,f}$ es el coeficiente de difusión de la CD libre. El coeficiente de difusión observado para el surfactante (ecuación (2.4)) definido anteriormente se puede expresar en términos de la constante de equilibrio y las concentraciones totales de CD y de surfactante:

$$D_{S,obs} = \frac{D_{S,f} + K_{1:1}D_{CD:S}[CD]}{1 + K_{1:1}[CD]} \quad (2.8)$$

La constante de equilibrio para la formación de complejos entre la CD y el surfactante se expresan como:

$$K_{1:1} = \frac{[CD:S]}{[CD][S]} \quad (2.9)$$

El balance de materia para las concentraciones totales de CD y surfactante vienen dadas por:

$$[CD]_T = [CD]_f + [CD:S] \quad (2.10)$$

$$[S]_T = [S] + [CD:S] \quad (2.11)$$

La combinación de estas ecuaciones con la constante de equilibrio, nos proporciona una ecuación de segundo orden para la concentración de CD libre (ecuación (2.12)):

$$a[CD]_f^2 + b[CD]_f + c = 0 \quad (2.12)$$

dónde:

$$a = K_{1:1} \quad (2.13)$$

$$b = 1 + K_{1:1}([S]_T - [CD]_T) \quad (2.14)$$

$$c = -[CD]_T \quad (2.15)$$

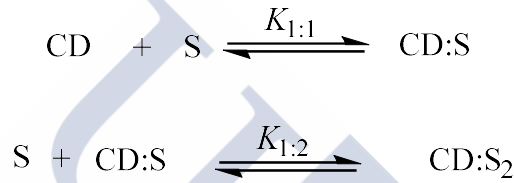
Los datos experimentales se ajustaron al modelo anterior, que únicamente contemplaba la formación de complejos 1:1, dando una constante de equilibrio $K_{1:1}^{C_{10}TAB} = (225 \pm 25) \text{ M}^{-1}$. Como puede verse en la Figura 2.3, es evidente que este modelo (línea discontinua) no reproduce el comportamiento experimental observado,

principalmente en relaciones molares bajas, donde el porcentaje del complejo 1:2 será importante.

Por tanto, es necesario desarrollar un nuevo modelo que contemple la formación simultánea de complejos del tipo 1:1 y 1:2, con el objetivo de explicar cuantitativamente los resultados experimentales.

Modelo para la determinación de los coeficientes de difusión en complejos 1:1 y 1:2

Considerando que se forman complejos de orden superior al 1:1, se establece un segundo equilibrio.



Esquema 2.3

Como en el caso anterior, los coeficientes de difusión observados se pueden definir para el surfactante (S) y para la CD:

$$D_{S,obs} = \chi_{S,f} D_{S,f} + \chi_{CD:S} D_{CD:S} + 2\chi_{CD:S_2} D_{CD:S_2} \quad (2.16)$$

$$D_{CD,obs} = \chi_{CD,f} D_{CD,f} + \chi_{CD:S} D_{CD:S} + \chi_{CD:S_2} D_{CD:S_2} \quad (2.17)$$

donde $D_{S,f}$, $D_{CD,f}$, $D_{CD:S}$ y $D_{CD:S_2}$ son los coeficientes de difusión del surfactante libre, CD libre, complejo 1:1 y 1:2, respectivamente. Las fracciones molares para las diferentes especies están relacionadas con las concentraciones totales de surfactante:

$$\chi_{S,f} = \frac{[S]_f}{C_S} \quad \chi_{CD:S} = \frac{[CD:S]}{C_S} \quad \chi_{CD:S_2} = \frac{[CD:S_2]}{C_S} \quad (2.18)$$

O con las concentraciones de CD:

$$\chi_{CD,f} = \frac{[S]_f}{C_{CD}} \quad \chi_{CD:S} = \frac{[CD:S]}{C_{CD}} \quad \chi_{CD:S_2} = \frac{[CD:S_2]}{C_{CD}} \quad (2.19)$$

Las constantes de equilibrio para ambos complejos 1:1 y 1:2, se expresan como:

$$K_{1:1} = \frac{[CD:S]}{[CD][S]} \quad K_{1:2} = \frac{[CD:S_2]}{[CD:S][S]} \quad (2.20)$$

En primer lugar, cuando la concentración de γ -CD aumenta, los coeficientes de difusión del surfactante muestran una disminución significativa, debido principalmente a la formación de un complejo de inclusión 1:2 con la γ -CD (Figura 2.3-derecha, línea roja). Se observa una disminución continua de los coeficientes de difusión y esta bajada de pendiente indica un aumento de la fracción molar del complejo 1:1 (Figura 2.3-derecha, línea verde). Con el fin de obtener las fracciones molares de las diferentes especies: surfactante libre, $\chi_{S,f}$, complejo 1:1 CD-Surfactante, $\chi_{CD:S}$, y complejo 1:2 CD-(Surfactante)₂, $\chi_{CD:S_2}$; es necesario conocer los valores de las constantes de equilibrio entre γ -CD y C₁₀TAB ($K_{1:1}$ y $K_{1:2}$).

La ecuación (2.16) se resuelve para diferentes valores de $K_{1:1}$ y $K_{1:2}$, que nos permite obtener las fracciones molares de las diferentes especies para cada concentración de γ -CD. Los valores de $K_{1:1}$ y $K_{1:2}$, para los que se obtiene la mejor desviación de la raíz cuadrada media (χ^2) del ajuste de los datos experimentales a la ecuación (2.16), se consideraron como óptimos (véase la curva en la Figura 2.3-izquierda). A partir de este método se obtienen como valores óptimos $K_{1:1}^{C_{10}TAB} = (25 \pm 3) M^{-1}$ y $K_{1:2}^{C_{10}TAB} = (350 \pm 40) M^{-1}$.

A partir del modelo propuesto, y de la ecuación (2.16), se obtuvieron los valores de los parámetros $D_{S,f}$, $D_{CD:S}$ y $D_{CD:S_2}$, que se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 : Valores de los coeficientes de difusión para el complejo 1:1 y 1:2 para C₁₀TAB.

Surfactante	$10^6 D_{S,f}(\text{cm}^2/\text{s})$	$10^6 D_{CD:S}(\text{cm}^2/\text{s})$	$10^6 D_{CD:S_2}(\text{cm}^2/\text{s})$
C ₁₀ TAB	5.68±0.09	2.0±0.1	1.5±0.1

Estos resultados son compatibles con un incremento del peso molecular, debido a la formación de los complejos *host:guest*.

A partir de este experimento, se encontró evidencia experimental para la formación de complejos de inclusión 1:1 y 1:2 entre γ -CD y C₁₀TAB, de tal modo que la formación de complejos 1:2 se produce en un modo cooperativo. La formación de

complejos *host:guest* por ciclodextrinas, se debe principalmente a los efectos hidrofóbicos y a las interacciones de Van der Waals. El efecto cooperativo observado en la formación de complejo 1:2, puede explicarse debido al incremento del carácter hidrófobo de la cavidad de la γ -CD, por la formación anterior del complejo de inclusión 1:1³². La formación de complejos de inclusión en ciclodextrinas, conduce a la liberación de moléculas de agua de su cavidad y por consecuencia el incremento de su carácter hidrófobo. Simulaciones de dinámica molecular también apoyan la formación de complejos de inclusión 1:1 y 1:2 entre el γ -CD y un surfactante aniónico³³.

2.3.2 Determinación de las constantes de equilibrio de la formación de complejos 1:1 y 1:2, entre γ -CD y surfactantes catiónicos (C_nTA^+) con la molécula orgánica NPA

El comportamiento de inclusión de las moléculas orgánicas pequeñas en presencia de ciclodextrinas, tendrá desde un punto de vista cuantitativo importantes consecuencias en el modelado de su reactividad. Con el objetivo de modelar el comportamiento de la cavidad de la ciclodextrina, como un medio de reacción usaremos la solvólisis de MBSC, pero su inestabilidad impide el estudio de su comportamiento de inclusión por RMN. Como alternativa utilizamos NPA, una molécula con un tamaño, estructura e hidrofobicidad similar.

2.3.2.1 Difusiometría de RMN

En la Figura 2.4 se muestra la influencia de la $[\gamma\text{-CD}]$ en el coeficiente de difusión de NPA. El proceso de formación de complejos se investigó manteniendo constante la concentración de NPA (1 mM) y variando la concentración de γ -CD. Como se puede observar los coeficientes de difusión de NPA disminuyen en función de la concentración de ciclodextrina debido a la formación de un complejo de inclusión.

Usando un procedimiento similar al de $C_{10}TAB$, podemos ajustar los datos de la Figura 2.4 a la formación de un complejo *host:guest* 1:1. Bajo este supuesto se obtiene un valor de $K_{1:1}^{NPA} = (25 \pm 3) M^{-1}$ para la constante de equilibrio y el coeficiente de difusión $D_{1:1}^{NPA} = (2.0 \pm 0.1) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para del complejo *host:guest*.

Debido a la formación simultánea de los complejos 1:1 y 1:2 que se observa con $C_{10}TAB$, hemos comprobado esta posibilidad en el caso del NPA. Por tanto, los datos

experimentales se ajustaron igualmente a un modelo que tiene en cuenta la formación de complejos de inclusión 1:1 y 1:2, utilizando los valores de las constantes de equilibrio obtenidas para el C₁₀TAB, $K_{1:1}^{C_{10}TAB} = (25 \pm 3) \text{ M}^{-1}$ y $K_{1:2}^{C_{10}TAB} = (350 \pm 40) \text{ M}^{-1}$, como enfoque inicial (Figura 2.4).

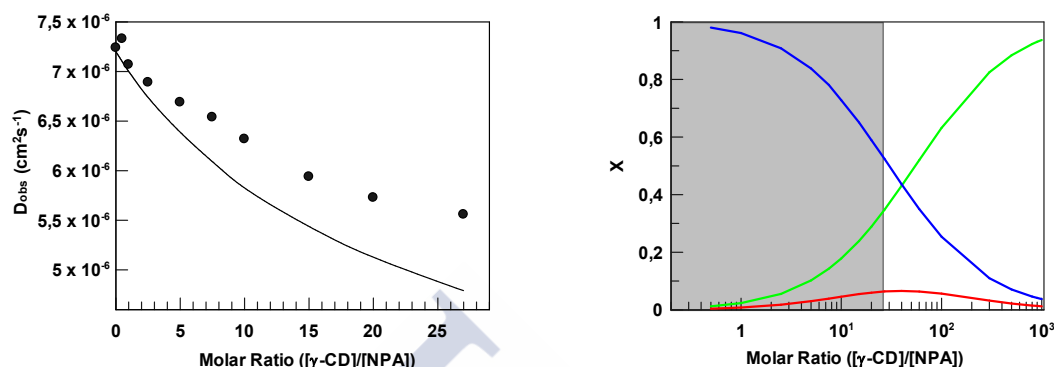


Figura 2.4 : (Izquierda) Coeficientes de difusión de $[\text{NPA}] = 1 \text{ mM}$ variando las concentraciones de γ -CD. La línea negra muestra el ajuste al modelo de complejos 1:1 y 1:2, usando $K_{1:1}^{C_{10}TAB} = (25 \pm 3) \text{ M}^{-1}$ y $K_{1:2}^{C_{10}TAB} = (350 \pm 40) \text{ M}^{-1}$. (Derecha) Distribución de las fracciones molares (X) NPA libre (línea azul), complejo 1:1 (línea verde) y complejo 1:2 (línea roja). Debe tenerse en cuenta que las condiciones experimentales en la figura izquierda corresponden a la región oscura en la figura derecha.

Como se puede ver en la Figura 2.4, es evidente que estas constantes de equilibrio utilizadas para el C₁₀TAB no reproducen el comportamiento experimental observado para el NPA. Bajo este supuesto, el coeficiente de difusión calculado es más pequeño que el experimental, lo que indica que la fracción de NPA complejada podría ser menos que la predicha. Esta discrepancia es una consecuencia, debido al gran volumen de molécula NPA en comparación con la cadena alquílica de C₁₀TAB. Las moléculas de agua que se liberan de la cavidad de CD después de la formación de complejos 1:1 producen una cavidad más hidrofóbica que aumenta su tendencia a unirse a un segundo *guest* de forma cooperativa. Mientras tanto, la formación del complejo 1:1 reduce el volumen vacío disponible en la CD para unirse a un segundo *guest* (1:2) y por lo tanto la reducción de su constante de equilibrio. El equilibrio entre estos dos efectos es responsable por el comportamiento observado. El alojamiento de dos moléculas NPA dentro de la cavidad no es tan favorable como en el caso de C₁₀TAB, debido al mayor volumen ocupado por el anillo aromático del éster en comparación con la cadena alquílica.

Un procedimiento de simulación similar al descrito anteriormente para C₁₀TAB nos permite obtener los valores óptimos (ver Figura 2.5) para las constantes de

equilibrio del NPA: $K_{1:1}^{NPA} = (20 \pm 3) \text{ M}^{-1}$ y $K_{1:2}^{NPA} = (30 \pm 4) \text{ M}^{-1}$. Ajustando los datos experimentales a la ecuación (2.16), también obtenemos los valores de los coeficientes de difusión $D_{NPA,f}$, $D_{CD:NPA}$ y $D_{CD:NPA_2}$. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 : Valores de los coeficientes de difusión para el complejo 1:1 y 1:2 para NPA.

Surfactante	$10^6 D_{NPA,f}(\text{cm}^2/\text{s})$	$10^6 D_{CD:NPA}(\text{cm}^2/\text{s})$	$10^6 D_{CD:NPA_2}(\text{cm}^2/\text{s})$
NPA	7.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1

Estos resultados son compatibles con el incremento del peso molecular debido a la formación de los complejos *host:guest*.

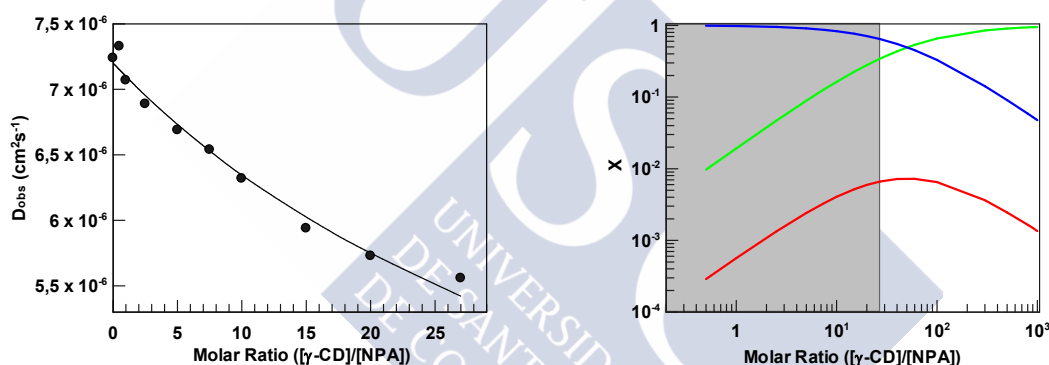


Figura 2.5 : (Izquierda) Coeficientes de difusión observados para $[NPA] = 1 \text{ mM}$, variando la concentración de γ -CD. La línea muestra el ajuste de los datos al modelo de los coeficientes de difusión para complejo 1:1 y 1:2 (línea continua). (Derecha) Distribución de las fracciones molares (X) de NPA libre (línea azul), complejo 1:1 (línea verde) y complejo 1:2 (línea roja). Debe tenerse en cuenta que las condiciones experimentales en la figura izquierda corresponden a la región oscura en la figura derecha.

A partir de las constantes de equilibrio se puede calcular la distribución de las especies, que se muestran en la Figura 2.5-derecha. Como se puede observar la fracción máxima de 1:2 complejo es inferior al 1% y es casi insignificante en las condiciones experimentales utilizadas en este estudio. Como consecuencia de este pequeño porcentaje del complejo 1:2, los resultados experimentales se pueden ajustar tanto a la formación exclusiva del complejo de inclusión 1:1 o la inclusión simultánea de uno y dos *guests*.

2.3.3 Caracterización estructural de complejos múltiples, mediante la adición simultánea de surfactante catiónico y NPA a la γ -CD

Considerando que, tanto el C₁₀TAB como el NPA forman complejos con la γ -CD, es posible obtener estructuras mixtas donde se obtienen complejos ternarios 1:1:1, además de complejos 1:1 y 1:2, previamente descritos. Con el objetivo de estudiar este sistema mixto, hemos determinado los coeficientes de difusión, manteniendo constantes las concentraciones de NPA (1 mM) y γ -CD (27 mM) y variando la concentración del surfactante catiónico. La Figura 2.6 muestra los coeficientes de difusión observados del NPA y C₁₀TAB, en el sistema mixto formado por γ -CD/C₁₀TAB/NPA.

2.3.3.1 Difusimetría de RMN

Desde un punto de vista cualitativo, los datos experimentales de los coeficientes de difusión observados del C₁₀TAB se pueden dividir en cuatro regiones distintas. A bajas concentraciones de C₁₀TAB, $[C_{10}TAB] = 1 \times 10^{-3}$ M, su coeficiente de difusión es mucho más bajo ($D_{obs}^{C_{10}TAB} = 3.5 \times 10^{-6}$ cm²s⁻¹) que el valor obtenido en agua pura ($D_f^{C_{10}TAB} = 5.68 \times 10^{-6}$ cm²s⁻¹) debido a su inclusión en la cavidad de la ciclodextrina. En estas condiciones experimentales, $[\gamma\text{-CD}]/[C_{10}TAB] = 27$, más del 90% de C₁₀TAB está unido a la ciclodextrina en una forma tal que el 55% del surfactante está formando complejos 1:1 y el 35% se encuentra en forma de complejos 1:2 (ver la Figura 2.3-derecha). Al aumentar la concentración de C₁₀TAB (región I y II en la Figura 2.6-izquierda) aumenta el porcentaje de surfactante no complejoado pero sus coeficientes de difusión continúan disminuyendo. Este efecto es una consecuencia de la formación de complejos 1:2 (Figura 2.3-derecha esperamos una fracción máxima de complejo 1:2 en una relación molar $[\gamma\text{-CD}]/[C_{10}TAB] = 4$, correspondiente a una $[C_{10}TAB] = 7 \times 10^{-3}$ M en la Figura 2.6-izquierda).

La región III de la Figura 2.6-izquierda se corresponde con una situación en la que existe un exceso de surfactante respecto a la ciclodextrina, aumenta el porcentaje de surfactante no complejoado 50-75% lo que sugiere un aumento del coeficiente de difusión observado para el surfactante. Sin embargo, a partir de la Figura 2.3-izquierda, vemos que en esta región la fracción de complejo 1:2 predomina sobre el complejo 1:1. De este modo sería de esperar un pequeño incremento del coeficiente de difusión

observado, porque la difusión es menor para el complejo 1:2 que para el complejo 1:1. Pero se observa un aumento en el coeficiente de difusión observado debido al gran porcentaje de surfactante libre.

En la región IV, un nuevo incremento en la concentración de surfactante (Figura 2.6-izquierda) induce la formación de micelas y el coeficiente de difusión del surfactante cae muy rápido debido a su agregación.

Desde un punto de vista cualitativo, los datos experimentales del coeficiente de difusión para el NPA, en función de la concentración de $C_{10}TAB$ en presencia de γ -CD, se muestran en la Figura 2.6-derecha, se pueden dividir en cuatro regiones distintas. A muy baja concentración de surfactante, $[C_{10}TAB] = 1 \times 10^{-3}$ M, el coeficiente de difusión observado para NPA, $D_{obs}^{NPA} \approx 5.0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, es menor que su valor en agua, $D_f^{NPA} \approx 7.25 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, pero es compatible con el valor esperado para su complejación por γ -CD (ver la Figura 2.4-izquierda). El aumento de la concentración $C_{10}TAB$ en el sistema mixto disminuirá la concentración de ciclodextrina disponible para unirse al NPA, debido a la unión competitiva del surfactante (produciendo complejos 1:1 y 1:2). Al tener en cuenta la distribución de las especies mostrada en la Figura 2.3-derecha, se puede estimar la concentración de ciclodextrina no complejada, $[CD]_f$, a disposición de NPA para diferentes concentraciones de surfactante. Para $[C_{10}TAB] = 1; 7$ y 27 mM obtenemos $[CD]_f = 26.8; 22.4$ y 19 mM, respectivamente. Como consecuencia de la unión competitiva, cabría esperar que el coeficiente de difusión del NPA aumentase con el aumento de $[C_{10}TAB]$. Los resultados experimentales muestran un comportamiento opuesto, consecuencia de la formación de complejos adicionales en el sistema mixto. La hidrofobicidad de la cavidad de la ciclodextrina aumenta por la inclusión de surfactante para la formación de complejos 1:1, debido a la liberación de agua. Como consecuencia de ello, la capacidad de secuestrar NPA es mucho mayor en el caso de complejo γ -CD:Surfactante, que por la ciclodextrina pura. Esto implica la formación de un complejo ternario 1:1:1, en el cual tanto surfactante como el NPA se complejan simultáneamente con la γ -CD. En las regiones II y III, donde la $[C_{10}TAB]$ se encuentra en el rango desde 7 a 50 mM (Figura 2.6-derecha) el porcentaje del complejo Ciclodextrina:Surfactante con estequiometría 1:2 disminuye del 25% a 18%, lo que permite la posibilidad de incluir NPA como un tercer componente. Como podemos ver en la Región III en la Figura 2.6-derecha, el coeficiente de difusión de NPA aumenta

para concentraciones de surfactante cerca de 100 mM. En estas condiciones se puede estimar que casi el 55% de la ciclodextrina está ocupada por el surfactante. Esta reducción en la cantidad de ciclodextrina disponible para unir el NPA, provoca una reducción en la fracción de NPA complejada y, en consecuencia, se observa un aumento del coeficiente de difusión observado. Un nuevo aumento de la concentración de surfactante (región IV de la Figura 2.6-derecha) induce la autoagregación para formar micelas, con la consiguiente solubilización de NPA en el interior de las micelas y como consecuencia la disminución de su coeficiente de difusión.

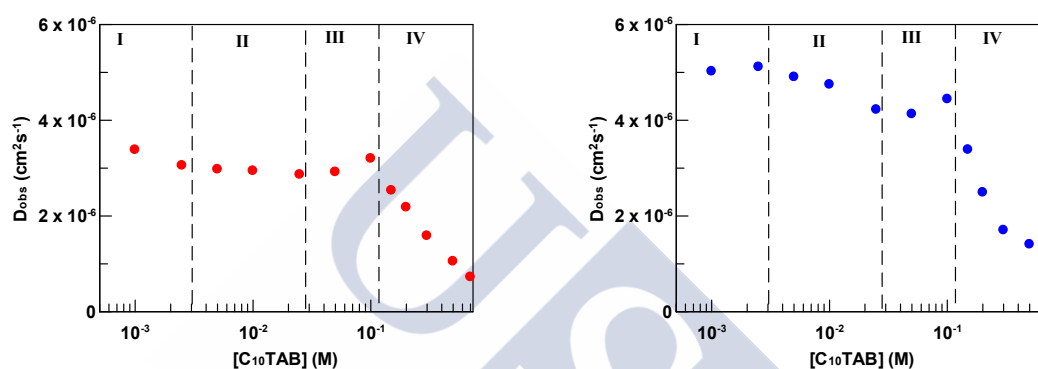


Figura 2.6 : Coeficientes de difusión observados de (●) C₁₀TAB y (●) NPA variando la concentración de C₁₀TAB y con [NPA] = 1 mM y [γ -CD] = 27 mM.

Cabe destacar que el coeficiente de difusión observado para el NPA es mayor que para C₁₀TAB en las zonas I, II y III de la Figura 2.6 debido al distinto tamaño y peso molecular de los complejos formados. Sin embargo, estos coeficientes de difusión son casi iguales en la presencia de grandes concentraciones de surfactante (grandes concentraciones en la región IV de la Figura 2.6). Este efecto se debe a que, la mayor parte de surfactante se agrega para la formación de las micelas, donde NPA se disuelve y tanto la micela como el NPA disuelto tienen el mismo comportamiento difusivo.

2.3.4 Determinación de las constantes de equilibrio para la formación de complejos múltiples, mediante la solvólisis del MBSC en presencia de γ -CD

El objetivo de este trabajo es tratar de evaluar de forma cuantitativa la cavidad de la γ -CD como medio de reacción y la influencia de la formación de complejos múltiples. Para este fin se utiliza la solvólisis del cloruro de 4-metoxibencenosulfonilo, MBSC, como una sonda química. Esta reacción es adecuada, debido a que el tamaño de MBSC permite complejaciones múltiples y que su proceso de solvólisis se ve afectado por los cambios en la polaridad del medio, de tal modo que la velocidad de reacción disminuye en un factor cercano a 10^2 al pasar de agua a un 90% de etanol:agua³⁴⁻³⁶.

2.3.4.1 Solvólisis del MBSC en presencia de la γ -CD

La constante de velocidad observada, k_{obs} , nos permite estudiar el proceso de formación de complejos de MBSC con γ -CD. La constante de velocidad observada se obtuvo experimentalmente en una serie de experimentos manteniendo constante la concentración de MBSC (0.1 mM) y variando la concentración de γ -CD, desde $[\gamma\text{-CD}] = 2$ mM a 100 mM. Como se puede observar en la Figura 2.7, las constantes de velocidad observadas disminuyen a medida que aumentamos la concentración de ciclodextrina, es decir se produce una inhibición en la hidrólisis del MBSC. Este comportamiento es debido a la incorporación del MBSC en la cavidad de la ciclodextrina (γ -CD:MBSC), donde la reacción de solvólisis es mucho más lenta que en el medio acuoso, como consecuencia de su menor polaridad.

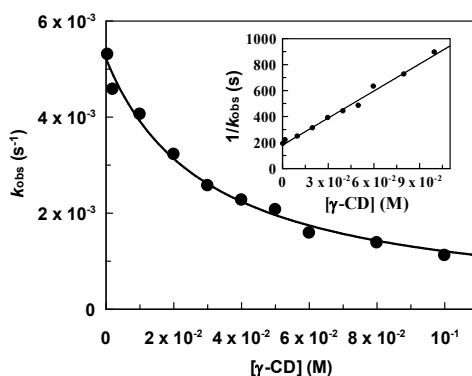
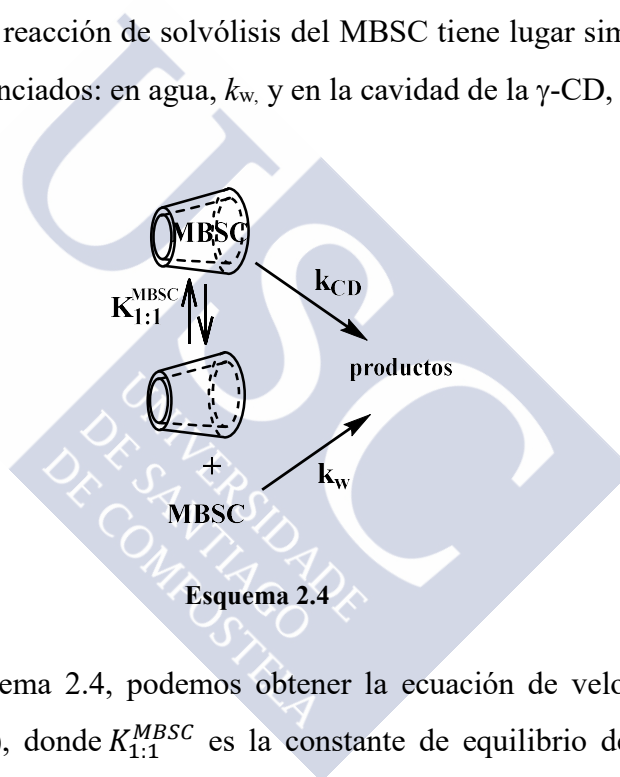


Figura 2.7: Influencia de la concentración γ -CD sobre k_{obs} para la solvólisis del MBSC a 25°C. La curva representa el ajuste de los datos experimentales a la ecuación (2.21).

Para un análisis cuantitativo de los resultados de la Figura 2.7, es necesario proponer un esquema de la complejación entre MBSC y γ -CD. Se mostrará no sólo que el tamaño, sino también las constantes de equilibrio de NPA y MBSC son similares. Bajo esta consideración se esperaría la posibilidad de una o dos moléculas de MBSC dentro de la cavidad de la ciclodextrina. Sin embargo, un examen detallado de la distribución de especies que se mostró en la Figura 2.4-derecha, nos permite descartar el porcentaje mínimo de complejo de inclusión con estequiometría 1:2. En las condiciones cinéticas experimentales la relación $[\gamma\text{-CD}]/[\text{MBSC}]$ se encuentra en el rango desde 20 a 10^3 , condiciones en las que el porcentaje del complejo 1:2 es menor que 0.5%. Con esta información y con el fin de explicar el comportamiento cinético, podemos proponer el Esquema 2.4, donde la reacción de solvólisis del MBSC tiene lugar simultáneamente en dos medios bien diferenciados: en agua, k_w , y en la cavidad de la γ -CD, k_{CD} .



Esquema 2.4

A partir del Esquema 2.4, podemos obtener la ecuación de velocidad para el sistema (ecuación (2.21)), donde $K_{1:1}^{MBSC}$ es la constante de equilibrio del MBSC con la γ -CD, k_{CD} es la constante de velocidad para la reacción en la cavidad de la γ -CD y k_w es la constante de velocidad para la solvólisis del MBSC en el medio acuoso.

$$k_{obs} = \frac{k_w + K_{1:1}^{MBSC} k_{CD} [CD]}{1 + K_{1:1}^{MBSC} [CD]} \quad (2.21)$$

Debemos tener en cuenta que la constante de velocidad de solvólisis es mucho mayor en agua que en la cavidad de la ciclodextrina y que la constante de equilibrio es pequeña, con lo que se puede considerar ($k_w \gg K_{1:1}^{MBSC} k_{CD} [CD]$). Teniendo en cuenta este supuesto, se simplifica la ecuación (2.21) obteniéndose la ecuación (2.22), que se

puede escribir como una función de su inversa. Esta última ecuación predice una dependencia lineal entre $1/k_{obs}$ y $[CD]$ (Figura 2.7-recuadro).

$$k_{obs} = \frac{k_w}{1 + K_{1:1}^{MBSC}[CD]} \quad o \quad \frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k_w} + \frac{K_{1:1}^{MBSC}}{k_w} [CD] \quad (2.22)$$

La ecuación (2.22) ajusta perfectamente los datos experimentales mostrados en la Figura 2.7, la cual nos permitió obtener los parámetros $k_w = (5.7 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y $K_{1:1}^{MBSC} = (38 \pm 2) \text{ M}^{-1}$, similar al valor observado para NPA ($K_{1:1}^{NPA} = 20 \text{ M}^{-1}$).

2.3.4.2 Solvólisis del MBSC en presencia de micelas catiónicas

Antes del estudio de reactividad para el sistema de tres componentes (γ -CD/surfactante/MBSC) es necesario analizar la influencia de la concentración de surfactante sobre la constante de velocidad de solvólisis del MBSC.

La influencia de la concentración de surfactante sobre la constante de velocidad de solvólisis del MBSC, k_{obs} , se ha estudiado en un amplio rango de concentraciones de surfactante que incluían la región antes de la cmc, donde las moléculas de los surfactantes se encuentran como monómeros dispersos en la disolución, y la región después de la cmc, donde las moléculas de surfactante se asocian para formar micelas. El efecto de la concentración de surfactante en la constante de velocidad de pseudo-primer orden, k_{obs} , para la hidrólisis de MBSC se muestra en la Figura 2.8.

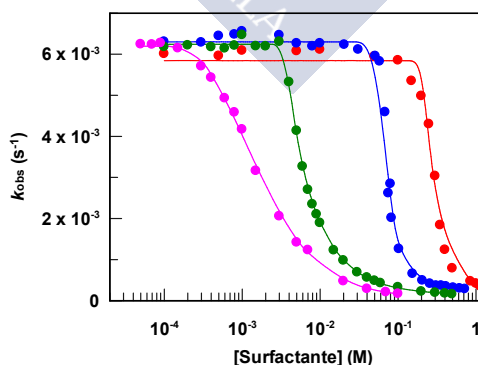
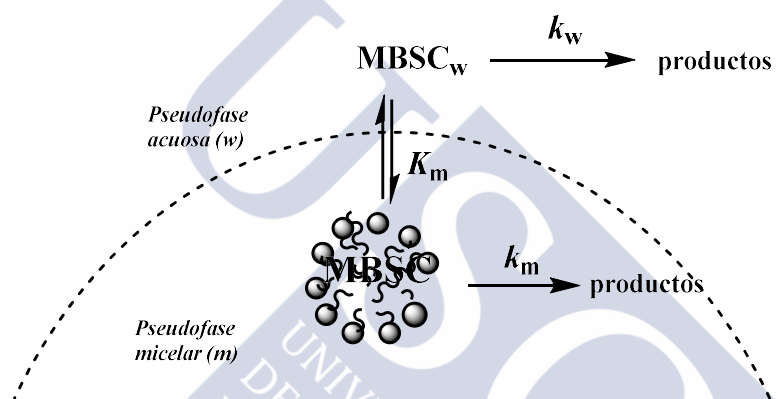


Figura 2.8 : Influencia de la concentración de surfactante sobre la constante de velocidad observada para la hidrólisis de MBSC a 25°C. (●) C₈TAB, (●) C₁₀TAB, (●) C₁₄TAB y (●) C₁₈TAB.

Como se puede observar, la constante de velocidad observada se mantiene prácticamente constante con el aumento de la concentración de surfactante hasta la cmc,

pero a concentraciones mayores que la cmc se puede observar una clara disminución de k_{obs} . Esto es debido a que, en este punto, los surfactantes se encuentran en forma de agregados micelares y la sonda se incorpora al interior de los mismos, donde la constante de velocidad de la reacción observada es menor que en el medio acuoso, debido a su menor polaridad.

Con el fin de obtener una interpretación cuantitativa de los resultados experimentales para la solvólisis del MBSC en presencia de micelas catiónicas, se aplicó el *modelo de pseudofase*. En este modelo se consideraron dos ambientes bien diferenciados: agua y un pseudofase micelar, entre los que se distribuye el MBSC (Esquema 2.5).



Esquema 2.5

Al tener en cuenta que la solvólisis puede tener lugar simultáneamente en agua, k_w , y en la pseudofase micelar, k_m , es posible obtener la siguiente ecuación de velocidad, que relaciona la constante de velocidad observada con la concentración de surfactante:

$$k_{obs} = \frac{k_w + k_m K_m [Dn]}{1 + K_m [Dn]} \quad (2.23)$$

donde la K_m es la constante de distribución de MBSC entre el agua y la pseudofase micelar, $[Dn]$ es la concentración de surfactante micelizado, $[Dn] = [\text{Surfactante}]_T - \text{cmc}$, y k_m es la constante de velocidad en la pseudofase micelar. Los valores de la concentración micelar crítica (cmc) son necesarios para ajustar los resultados experimentales a la ecuación (2.23) y estos valores se pueden obtener cinéticamente, como la concentración mínima de surfactante necesaria para observar un cambio

significativo en la k_{obs} . A partir del ajuste de los datos experimentales a la ecuación (2.23), que se muestran como líneas de ajuste en la Figura 2.8, se pueden obtener los valores de todos los parámetros que se recogen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 : Valores de la concentración micelar crítica, de la constante de equilibrio entre MBSC y micelas catiónicas y las constantes de velocidad en agua y en el interior de los agregados micelares, obtenidos mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación (2.23).

Surfactante	cmc (M)	K_m (M ⁻¹)	$10^3 k_w$ (s ⁻¹)	$10^4 k_m$ (s ⁻¹)
C ₈ TAB	0.20	15±2	5.9±0.1	0.6±0.1
C ₁₀ TAB	6.00×10 ⁻²	106±10	6.3±0.1	1.7±0.4
C ₁₄ TAB	3.50×10 ⁻³	379±9	6.24±0.02	1.4±0.1
C ₁₈ TAC	2.25×10 ⁻⁴	705±31	6.19±0.04	0.8±0.5

Como se puede observar en la Tabla 2.3, los valores de las constantes de equilibrio, K_m , aumentan con la longitud de la cadena alquílica del surfactante (C₈TAB; C₁₀TAB; C₁₄TAB; C₁₈TAC). Este comportamiento está bien documentado en la bibliografía^{37,38}, como consecuencia del aumento de la hidrofobicidad del surfactante, los valores de k_m no presentan ninguna variación clara, que es probablemente debido a la incertidumbre de su determinación, como consecuencia del pequeño porcentaje de solvólisis que tiene lugar en los agregados micelares.

El mismo comportamiento se espera en el caso de NPA en presencia de micelas catiónicas, debido a su polaridad adecuada para enlazarse a micelas catiónicas.

2.3.4.2.1 Método conductivimétrico

El uso de medidas conductimétricas para estudiar la autoagregación de surfactantes iónicos es una de las técnicas más comunes. Utilizando este método, se puede obtener directamente una de las propiedades más importantes de los agregados micelares: la concentración micelar crítica, comúnmente conocida como, cmc. Ésta puede ser determinada a través de la intersección entre dos rectas trazadas a partir de las medidas conductivimétricas obtenidas a concentraciones por debajo y por encima de la concentración micelar crítica.

Los valores de cmc, que se han obtenido por medidas de conductividad en nuestras condiciones experimentales, son compatibles con los obtenidos por el estudio cinético. Como un ejemplo, el valor de la cmc para C₁₀TAB obtenido por el método conductimétrico (Figura 2.9), $cmc = (6.00 \pm 0.02) \times 10^{-2}$ M, es equivalente a obtenido cinéticamente mostrado en la Tabla 2.3.

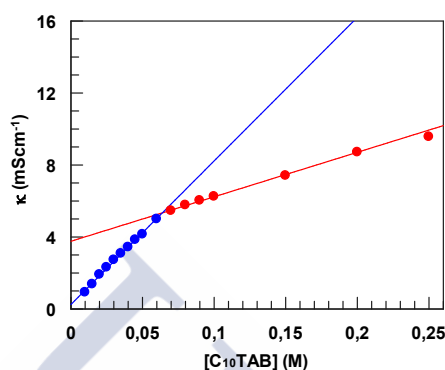


Figura 2.9 : Determinación de la cmc para C₁₀TAB. La gráfica representa la Conductividad vs [C₁₀TAB].

2.3.4.3 Solvólisis del MBSC en presencia del sistema mixto CD/surfactante

La solvólisis del MBSC en un sistema de tres componentes (γ -CD/surfactante/MBSC) se estudió manteniendo constante la concentración del MBSC y la γ -CD, 0.1 y 20 mM, respectivamente, y variando la concentración de surfactante. Los resultados obtenidos para los distintos surfactantes en presencia de γ -CD, se muestran en la Figura 2.10. El estudio se realizó para surfactantes catiónicos con diferente longitud de cadena (C₈TAB; C₁₀TAB; C₁₄TAB; C₁₈TAC). El comportamiento observado para el complejo cinético, es cualitativamente el mismo independientemente de la longitud de la cadena alquílica del surfactante.

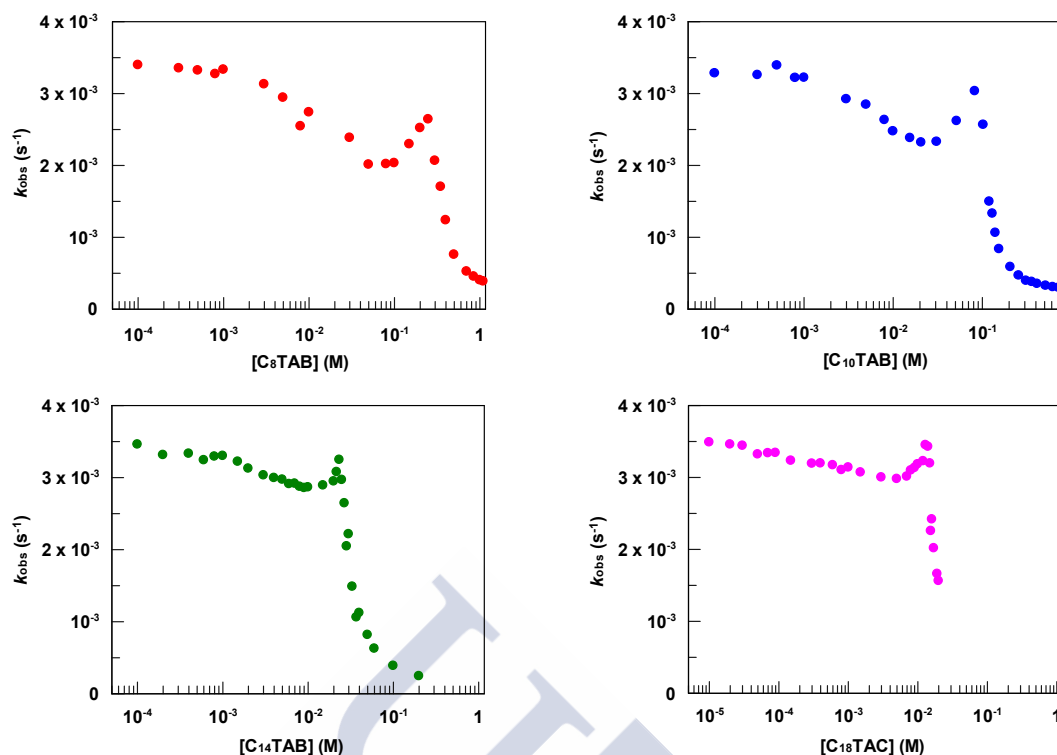
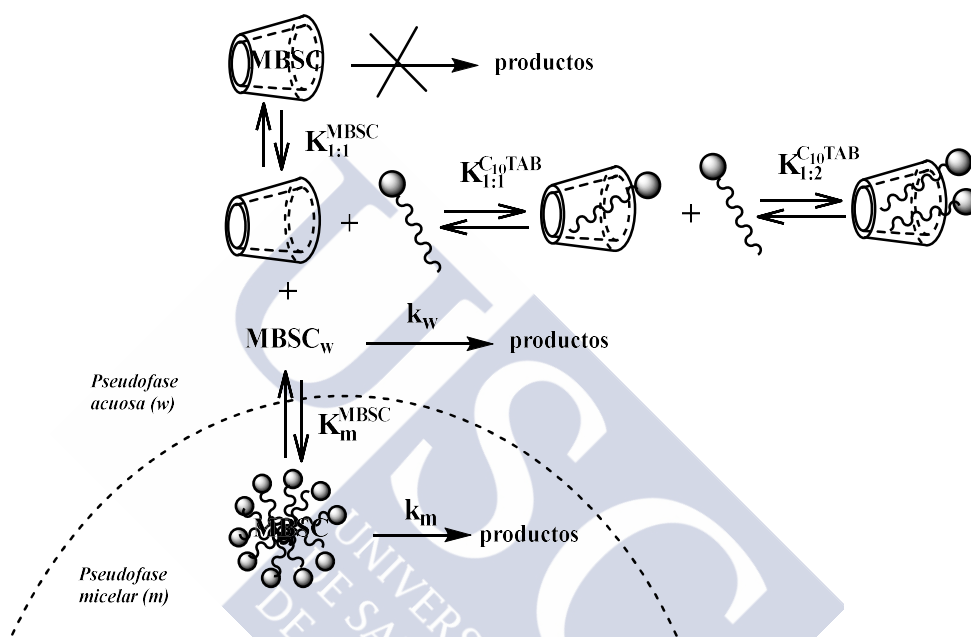


Figura 2.10 : Influencia de la concentración de surfactante sobre la k_{obs} para la hidrólisis de MBSC en presencia de γ -CD a 25°C. $[\gamma\text{-CD}] = 2 \times 10^{-2}$ M; $[\text{MBSC}] = 1 \times 10^{-4}$ M. (●) $C_8\text{TAB}$, (●) $C_{10}\text{TAC}$, (●) $C_{14}\text{TAB}$, (●) $C_{18}\text{TAC}$.

Un modelo cinético para explicar la reactividad en el sistema mixto de Ciclodextrina/Surfactante ha sido recientemente desarrollado en nuestro grupo^{39,40}. El modelo cinético propuesto es una combinación del modelo de pseudophase tradicional, el cual incluye un intercambio iónico, y un modelo de complejación competitiva para la reacción catalizada por CD. Podemos destacar algunas características de los sistemas mixtos de CD-Surfactante: (i) se puede establecer un equilibrio de complejación entre el surfactante y la ciclodextrina. Cuando aumenta la concentración de surfactante, la concentración de monómeros de surfactante no complejados en equilibrio con CD es suficiente para que comience el proceso micelización. (ii) El valor de la concentración micelar crítica (cmc) cambia a valores más altos en presencia de CD. (iii) Una vez que la micelización ha comenzado, no se establecen interacciones entre la CD y el sistema micelar. (iv) En el punto de micelización, podemos decir que existe una concentración apreciable de CD no complejada, $[CD]_f$.

2.3.4.3.1 Descripción cuantitativa del modelo competitivo

Con el objetivo de proponer un modelo cinético que explique el comportamiento experimental observado, proponemos el modelo competitivo. Se considera la ausencia de interacciones entre las micelas y CD, así como la existencia de dos vías de reacción simultáneas para el proceso de solvólisis del MBSC: la reacción de la sonda libre en el medio acuoso y la reacción de la sonda asociada con la micela (Esquema 2.6).



Esquema 2.6

El Esquema 2.6 nos permite obtener la siguiente expresión para la constante de velocidad observada:

$$k_{obs} = \frac{k_w + k_m K_m^{MBSC} [D_n]}{1 + K_m^{MBSC} [D_n] + K_{1:1}^{MBSC} [CD]_f + K_{1:2}^{C_{10}TAB} [C_{10}TAB][CD]_f} \quad (2.24)$$

Para resolver la ecuación anterior, es necesario conocer los valores de cmc, que se obtuvieron cinéticamente como la concentración de surfactante mínimo en el que se observó un cambio apreciable en k_{obs} (Figura 2.10), así como la concentración de la CD no complejada para cada concentración de surfactante. Los valores de $[CD]_f$ se determinan a partir de constantes de equilibrio. El método para el cálculo de CD libre a partir de las constantes de equilibrio, tiene en cuenta la formación simultánea de

complejos del sustrato con CD, $K_{1:1}^{MBSC}$, complejos con el surfactante estequiometría 1:1, $K_{1:1}^{C_{10}TAB}$, y estequiometría 1:2, $K_{1:2}^{C_{10}TAB}$.

$$K_{1:1}^{MBSC} = \frac{[CD:MBSC]}{[MBSC]_w[CD]_f} \quad K_{1:1}^{C_{10}TAB} = \frac{[CD:C_{10}TAB]}{[CD]_f[C_{10}TAB]}$$

$$K_{1:2}^{C_{10}TAB} = \frac{[CD:(C_{10}TAB)_2]}{[CD:C_{10}TAB][C_{10}TAB]} \quad (2.25)$$

Los balances de materia para las concentraciones totales de CD, sustrato y surfactante, en concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica son:

$$[CD]_T = [CD]_f + [CD:MBSC] + [CD:C_{10}TAB] + [CD:(C_{10}TAB)_2] \quad (2.26)$$

$$[S]_T = [S]_f + [CD:C_{10}TAB] + 2[CD:(C_{10}TAB)_2] \quad (2.27)$$

$$[MBSC]_T = [MBSC]_f + [CD:MBSC] \quad (2.28)$$

Los valores previamente obtenidos ($K_{1:1}^{MBSC} = 38 \text{ M}^{-1}$, $K_{1:1}^{C_{10}TAB} = 25 \text{ M}^{-1}$; $K_{1:2}^{C_{10}TAB} = 350 \text{ M}^{-1}$; $k_w = 5.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $k_m = 1.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) de las constantes de equilibrio y de las constantes de velocidad, han sido utilizados con el fin de resolver las ecuaciones desde (2.24) a (2.28).

La línea continua en la Figura 2.11 muestra que el modelo competitivo no puede explicar el comportamiento cinético. El modelo competitivo, no tiene en cuenta la formación de complejos mixtos, es decir, que sólo tiene en cuenta la formación de complejos individuales 1:1 y 1:2 con $C_{10}TAB$, y una complejación competitiva de MBSC desplazando el $C_{10}TAB$ al medio acuoso. El modelo de complejación competitivo predice que los valores de k_{obs} aumentan al aumentar la $[C_{10}TAB]$ debido a la complejación competitiva y a la liberación de MBSC al medio acuoso, donde su constante de velocidad es mucho mayor que en el interior de la cavidad de la ciclodextrina. La constante de velocidad observada aumenta hasta un valor máximo, donde la concentración de monómeros de surfactante libre es suficiente para que se produzca la formación de micelas. Un aumento de la concentración $C_{10}TAB$, aumenta el número de micelas disponible para que se produzca la solubilización del MBSC, de tal

modo que el comportamiento cinético es similar al observado en presencia de agregados micelares puros. Como se puede observar, hay una gran discrepancia entre el valor de las constantes de velocidad calculadas y los valores obtenidos experimentalmente; los valores calculados son mucho mayores que los valores obtenidos experimentalmente. Como se mostrará más adelante, esta discrepancia se debe principalmente a la aparición de un complejo cooperativo 1:1:1 MBSC:CD:C₁₀TAB en el esquema de reacción.

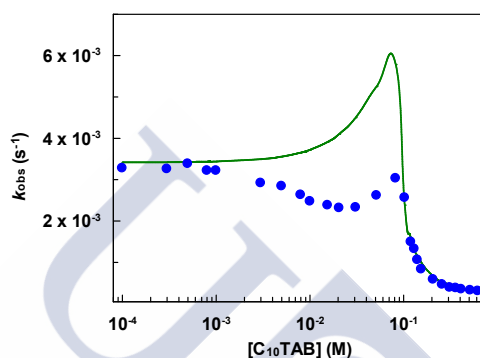


Figura 2.11 : Influencia de la concentración de surfactante sobre la k_{obs} para la hidrólisis de MBSC en presencia de γ -CD y C₁₀TAB a 25°C. $[\gamma\text{-CD}] = 2 \times 10^{-2}$ M; $[\text{MBSC}] = 1 \times 10^{-4}$ M. La línea continua corresponde a los valores calculados correspondientes a una complejación competitiva por la ciclodextrina.

2.3.4.3.2 Descripción cualitativa

Basándose en los resultados obtenidos previamente por los experimentos de DOSY, es fácil de entender desde un punto de vista cualitativo el comportamiento experimental que se muestra en las Figura 2.11 y Figura 2.12, nos centramos en el caso del surfactante, C₁₀TAB. En la Figura 2.12 se pueden diferenciar cinco regiones (A, B, C, D y E), con el fin de explicar la influencia del [C₁₀TAB] sobre k_{obs} : (i) Para bajas [C₁₀TAB] (región A y B) hay un gran exceso de γ -CD y el comportamiento cinético observado se debe a la inclusión del MBSC y C₁₀TAB en la cavidad de la ciclodextrina. Debido al gran exceso de γ -CD en comparación con los *guests* disponibles, la magnitud de k_{obs} no se ve afectada. (ii) Para [C₁₀TAB] que van desde (1-20) mM, disminuye la constante de velocidad observada a medida que aumenta la concentración de surfactante. La formación del complejo 1:1:1 tiene lugar en esta región (región C), se produce el aumento de la cantidad total de MBSC incorporado en la cavidad de la ciclodextrina y, como consecuencia, disminuye la velocidad de reacción de solvólisis. (iii) Un aumento de k_{obs} con la concentración de surfactante se observa en

la región de $[C_{10}TAB] = (20-90)$ mM. En este rango de concentraciones se observa la formación del complejo 1:2 entre γ -CD y $C_{10}TAB$, con la consiguiente liberación de MBSC al medio acuoso desde el complejo 1:1:1, resultando un aumento en k_{obs} . (iv) Un aumento adicional de la concentración de surfactante, $[C_{10}TAB] > 100$ mM, induce a la formación de micelas (región E), con la consecuente disminución de k_{obs} , debido a que el MBSC se incorpora en el núcleo micelar hidrófobo.

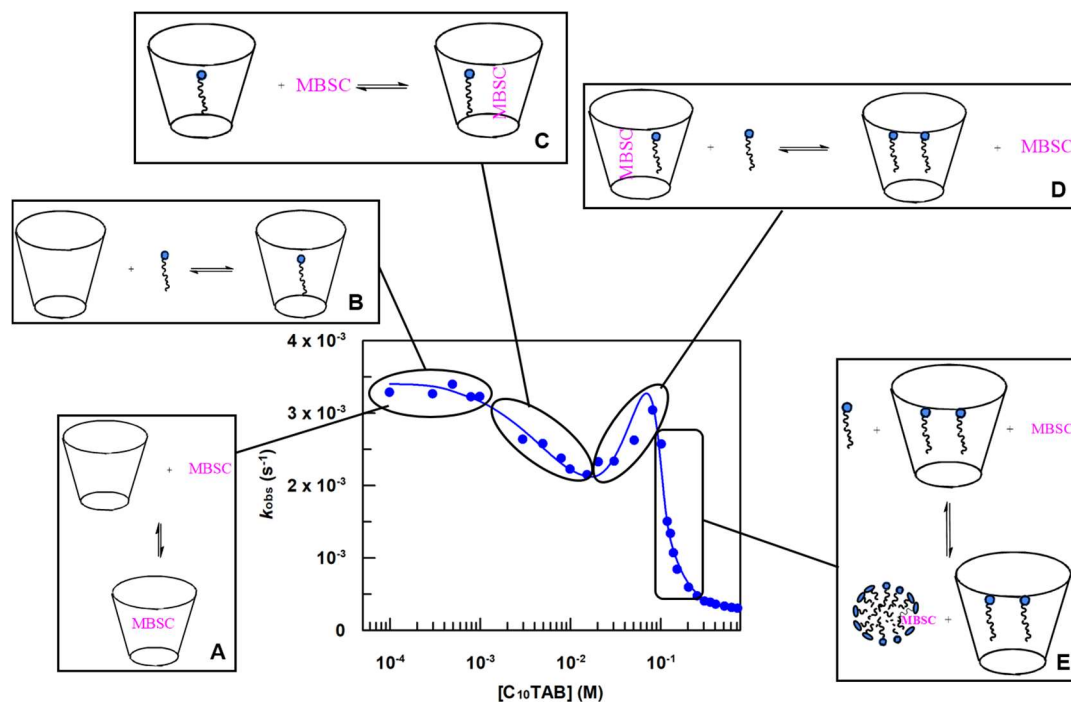


Figura 2.12 : Influencia de la concentración de surfactante sobre la k_{obs} para la hidrólisis de MBSC en presencia de γ -CD y $C_{10}TAB$ a 25 °C. $[\gamma\text{-CD}] = 2 \times 10^{-2}$ M; $[\text{MBSC}] = 1 \times 10^{-4}$ M. La línea sólida corresponde al ajuste de los datos experimentales a la ecuación (2.29).

Por lo tanto, la concentración de surfactante mínima necesaria para observar un cambio apreciable en el máximo de k_{obs} , se atribuye al punto micelización. Es importante mencionar que experimentos independientes confirman que el máximo en la Figura 2.12 (observado para $[C_{10}TAB]$ cerca de 100 mM) corresponde a la formación de micelas del surfactante en las condiciones de reacción.

2.3.4.3.3 Método conductimétrico

En estas condiciones experimentales, para el sistema mixto de CD/Surfactante, se obtuvo la concentración micelar crítica, a partir de experimentos de conductividad

(Figura 2.13) obteniendo un valor de $cmc = 100 \text{ mM}$, que coincide con el observado en el estudio cinético.

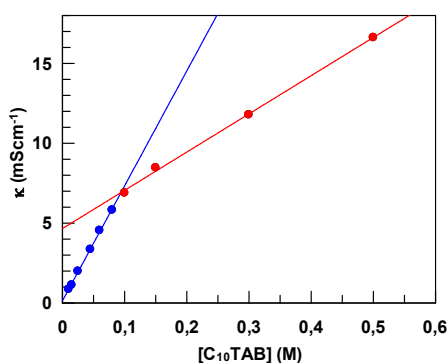


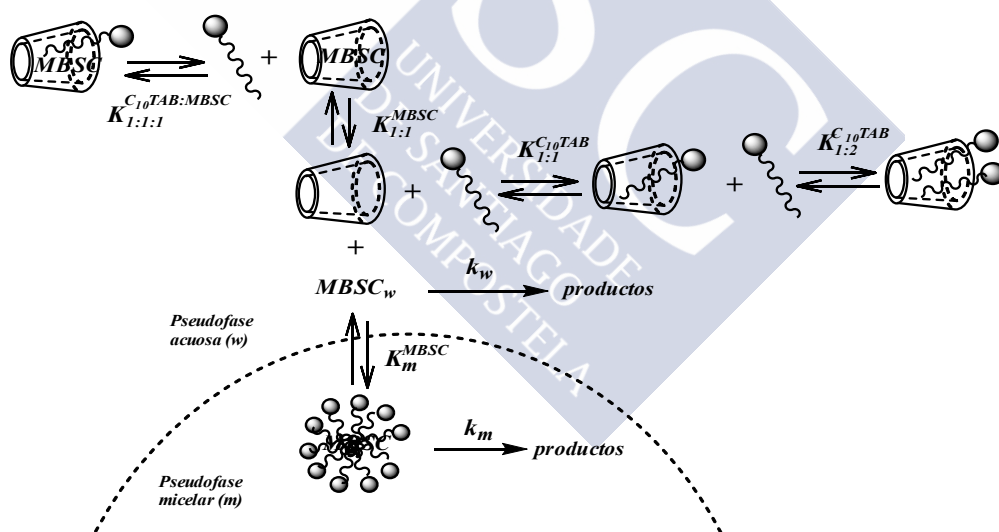
Figura 2.13 : Determinación de la cmc para la solvólisis del MBSC en presencia del sistema mixto de $C_{10}TAB/\gamma\text{-CD}$. La gráfica representa la Conductividad vs $[C_{10}TAB]$. $[\gamma\text{-CD}] = 2 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{MBSC}] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$.

El máximo observado en la gráfica de k_{obs} vs concentración de surfactante (Figura 2.12) se debe a la formación de micelas de surfactante. Como se puede observar en la Figura 2.10, la cantidad de surfactante necesario para la formación de micelas en presencia de $[\gamma\text{-CD}] = 20 \text{ mM}$, aumenta en el orden de $C_{18}TAC$ (15 mM); $C_{14}TAB$ (22 mM); $C_{10}TAB$ (100 mM) y C_8TAB (250 mM). Estos valores siguen la misma tendencia que las concentraciones micelares críticas en ausencia de ciclodextrina, ver Figura 2.8: $C_{18}TAC$ (0.22 mM); $C_{14}TAB$ (3.5 mM); $C_{10}TAB$ (60 mM) y C_8TAB (200 mM). Además, la adición de ciclodextrina a la disolución de surfactante, aumenta la concentración micelar crítica debido a la inclusión del surfactante en la cavidad de la CD. Este efecto en la concentración micelar crítica, depende del balance entre la formación de complejos con la ciclodextrina y la agregación del surfactante, de tal modo que una fracción importante de la ciclodextrina libre coexiste con el sistema micelar.

2.3.4.3.4 Descripción cuantitativa de la formación de complejos múltiples de modo cooperativo

En estudios anteriores de sistemas mixtos formados por $\beta\text{-CD}$ y surfactantes se ha demostrado que la formación de complejos transcurre a través de un mecanismo competitivo. En estos estudios^{41,42}, la formación competitiva de un complejo de inclusión entre el surfactante y la $\beta\text{-CD}$, conduce a la liberación del MBSC al sistema

acuoso, observándose un aumento en la constante de velocidad observada. En base a la información descrita en la Figura 2.11, esta posibilidad se puede descartar en el caso de γ -CD, porque el gran tamaño de la cavidad permite una complejación múltiple. En este caso, debemos ampliar el modelo cinético con el fin de tener en cuenta la posibilidad de la formación de complejos múltiples de un modo cooperativo. Por tanto, se propone el modelo cinético que se muestra en el Esquema 2.7, donde se considera la ausencia de interacciones entre las micelas y γ -CD, así como la existencia de dos rutas de reacción simultáneas: la reacción de la sonda libre en el medio acuoso, k_w , y la reacción de la sonda asociada con la micela, k_m . Como hemos demostrado previamente, la reacción de la sonda complejada por la γ -CD, puede despreciarse debido a la baja polaridad de su cavidad. La liberación del agua desde la cavidad de la ciclodextrina en la formación de complejos múltiples (1:1:1) es mayor que para los complejos binarios, resultado de una cavidad con menor polaridad. La constante de velocidad de solvólisis en el complejo ternario 1:1:1 se espera que sea mucho menor que en el complejo 1:1 y, en consecuencia, se puede despreciar.



Esquema 2.7

El Esquema 2.7 nos permite derivar la siguiente expresión para la constante de velocidad observada:

$$k_{obs} = \frac{k_w + k_m K_m^{MBSC} [D_n]}{1 + K_m^{MBSC} [D_n] + K_{1:1}^{MBSC} [CD]_f + K_{1:1}^{C_{10}TAB} K_{1:1:1}^{C_{10}TAB:MBSC} [C_{10}TAB][CD]_f} \quad (2.29)$$

Para resolver la ecuación anterior, es necesario conocer la concentración de surfactante micelizado en el sistema mixto, $[D_n]$, que se obtiene como la concentración de surfactante total menos la concentración micelar crítica del sistema mixto. La concentración micelar crítica se supone que es la concentración de surfactante que corresponde al valor máximo de k_{obs} en la Figura 2.12 (cerca de 100 Mm para el $C_{10}TAB$). Es importante recordar que esta hipótesis ha sido confirmada por medidas de conductividad de la cmc (ver Figura 2.9 y Figura 2.13). Por otra parte, es necesario determinar la concentración de ciclodextrina no complejada, $[CD]_f$, para cada concentración de surfactante. Este valor se puede obtener a partir de las constantes de equilibrio, teniendo en cuenta la complejación simultánea del sustrato por CD, $K_{1:1}^{MBSC}$, complejación del surfactante con estequiometría 1:1, $K_{1:1}^{C_{10}TAB}$, y estequiometría 1:2, $K_{1:2}^{C_{10}TAB}$, así como complejos ternarios con inclusión simultánea de MBSC y surfactante, $K_{1:1:1}^{C_{10}TAB:MBSC}$.

$$K_{1:1}^{MBSC} = \frac{[CD:MBSC]}{[MBSC]_w[CD]_f} K_{1:1}^{C_{10}TAB} = \frac{[CD:C_{10}TAB]}{[CD]_f[C_{10}TAB]} \quad (2.30)$$

$$K_{1:2}^{C_{10}TAB} = \frac{[CD:(C_{10}TAB)_2]}{[CD:C_{10}TAB][C_{10}TAB]} K_{1:1:1}^{C_{10}TAB:MBSC} = \frac{[MBSC:CD:C_{10}TAB]}{[MBSC][CD:C_{10}TAB]}$$

Los balances de materia para las concentraciones totales de γ -CD, surfactante, y sustrato para concentraciones de surfactante por debajo de la concentración micelar crítica vienen dados por:

$$[CD]_T = [CD]_f + [CD:MBSC] + [CD:C_{10}TAB] + [CD:(C_{10}TAB)_2] + [MBSC:CD:C_{10}TAB] \quad (2.31)$$

$$[S]_T = [S]_f + [CD:C_{10}TAB] + 2[CD:(C_{10}TAB)_2] + [MBSC:CD:C_{10}TAB] \quad (2.32)$$

$$[MBSC]_T = [MBSC]_f + [CD:MBSC] + [MBSC:CD:C_{10}TAB] \quad (2.33)$$

Para obtener $[CD]_f$, es necesario conocer los valores de $K_{1:1}^{MBSC}$, $K_{1:1}^{C_{10}TAB}$, $K_{1:2}^{C_{10}TAB}$ y $K_{1:1:1}^{C_{10}TAB:MBSC}$. Los valores de $K_{1:1}^{C_{10}TAB}$ y $K_{1:2}^{C_{10}TAB}$ se determinaron previamente mediante experimentos DOSY. La constante de equilibrio del MBSC con

γ -CD, $K_{1:1}^{MBSC}$, ha sido previamente obtenida a partir de experimentos cinéticos llevados a cabo en ausencia de $C_{10}TAB$. Con el fin de obtener el valor de $K_{1:1:1}^{C_{10}TAB:MBSC}$, las ecuaciones anteriores se resolvieron para distintos valores de $K_{1:1:1}^{C_{10}TAB:MBSC}$, y esto proporcionó la concentración de γ -CD no complejada, para cada concentración de surfactante. Los valores de $[CD]_f$ y $[D_n]$, se pueden usar para ajustar los valores experimentales de k_{obs} a la ecuación (2.29) (curva de línea continua en la Figura 2.12). El valor de $K_{1:1:1}^{C_{10}TAB:MBSC}$, para el cual se obtiene los mejores valores para la desviación de la raíz cuadrada media (χ^2) del ajuste de los resultados experimentales a la ecuación (2.29), se tomó como óptimo. A partir de este método se obtiene como valor óptimo, $K_{1:1:1}^{C_{10}TAB:MBSC} = 585 \text{ M}^{-1}$. Además, el ajuste de los resultados experimentales a la ecuación (2.29), por un método de regresión no lineal, nos proporciona los valores para la constante de distribución del MBSC entre el agua y la pseudofase micelar, $K_m = 90 \text{ M}^{-1}$, la constante de velocidad en la pseudofase micelar, $k_m = 1.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y la constante de velocidad en agua, $k_w = 5.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Se debe mencionar que el valor de la constante de equilibrio para el complejo ternario, $K_{1:1:1}^{C_{10}TAB:MBSC} = 585 \text{ M}^{-1}$, es mucho mayor que la obtenida cuando ambos *guests* son los mismos. En caso del surfactante $C_{10}TAB$, el valor que se ha obtenido es $K_{1:2}^{C_{10}TAB} = 350 \text{ M}^{-1}$ y para el NPA, un *guest* con estructura similar al MBSC, se obtiene un valor de $K_{1:2}^{NPA} = 30 \text{ M}^{-1}$. Este resultado debe ser una consecuencia del ajuste perfecto en la cavidad de la γ -CD, de la cadena alquílica del surfactante y del MBSC.

La formación de un complejo ternario es de gran importancia en el mecanismo de reacción. Los valores de k_{obs} son muy útiles para obtener $[CD]_f$, en los casos en los que se produce un mecanismo de complejación competitiva¹⁷⁻¹⁹. En esta situación la curva de calibrado se puede obtener mediante la reagrupación de la ecuación (2.22) utilizando los valores obtenidos previamente para $K_{1:1}^{MBSC}$ y k_w . De acuerdo con este procedimiento, y usando los valores de k_{obs} en el máximo, $k_{obs} = 3.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, podemos calcular el valor de $[CD]_f = 11.5 \text{ mM}$, de tal modo que existe casi el 57% de la ciclodextrina libre, en equilibrio con los sistemas micelares formados por $C_{10}TAB$. Este valor es mucho mayor que el obtenido a partir de las constantes de equilibrio, $[CD]_f = 0.54 \text{ mM}$, que corresponde al 2.7% de ciclodextrina libre. La principal razón de esta discrepancia, es que el procedimiento de calibrado no tiene en cuenta la formación de complejos ternarios 1:1:1.

De las ecuaciones (2.30)-(2.33), se puede calcular la distribución de la concentración de las diferentes especies que están presentes en el sistema mixto (ver Figura 2.14) antes de la cmc ($[C_{10}TAB] = 0.1 \text{ M}$). En primer lugar, hay que mencionar que existe una concentración apreciable de γ -CD no complejada. Este resultado está de acuerdo con estudios previos realizados en nuestro laboratorio, que muestran que la saturación de la capacidad de formación de complejos de ciclodextrina no es necesaria antes de la formación de micelas. En lugar de ello, la formación de complejos con la ciclodextrina y la autoagregación del surfactante, son procesos que tienen lugar simultáneamente y el equilibrio entre ellos debe ser el responsable de la existencia de una $[CD]_f$ en equilibrio con el sistema micelar. El porcentaje de ciclodextrina no complejada¹⁹ aumenta, tanto con la disminución y el aumento de la hidrofobicidad del surfactante, alcanzando un valor mínimo con cadenas alquílicas cerca de 10 átomos de carbono. Al disminuir la hidrofobicidad, el efecto predominante es la baja tendencia a formar complejos con la cavidad de la ciclodextrina. Los surfactantes con una gran hidrofobicidad se unen fuertemente a las ciclodextrinas, pero su capacidad de autoagregación también aumenta, de tal modo que predomina la formación de micelas sobre la formación de complejos con la ciclodextrina.

Como podemos ver en la Figura 2.14-izquierda, el complejo 1:1 CD: $C_{10}TAB$ predomina sobre el complejo 1:2 CD:($C_{10}TAB$)₂ para las regiones con gran exceso de ciclodextrina sobre el surfactante. Cuando la relación $[CD]/[C_{10}TAB]$ se acerca a la unidad o aumenta, predominan los complejos con estequiometría superiores. Podemos señalar que la concentración de complejo 1:2, alcanza un valor límite al aumentar la concentración de surfactante, debido a que casi toda la ciclodextrina se compleja. Bajo estas condiciones, al aumentar aún más la concentración de $C_{10}TAB$ no se puede producir más complejo debido a la ausencia de ciclodextrina disponible. Más relevante para el presente estudio es que la evolución del complejo 1:1:1, aumenta con la concentración de $C_{10}TAB$ hasta un valor máximo, después del cual disminuye en presencia de un gran exceso de surfactante cuando predomina el complejo 1:2. La concentración de este complejo es mucho menor que la de los complejos 1:1 CD: $C_{10}TAB$ y complejos 1:2 CD:($C_{10}TAB$)₂, debido al gran exceso de γ -CD (20 mM) en comparación con el MBSC (0.1 mM).

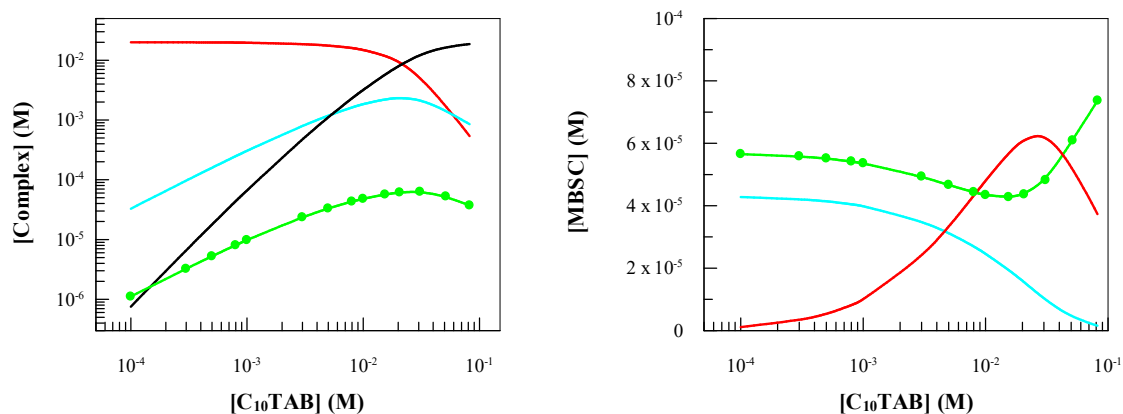


Figura 2.14 : (Izquierda) Distribución de la concentración de $[\text{CD}]_f$ (línea roja); complejo $\text{CD}:\text{C}_{10}\text{TAB}$ (línea azul); complejo $\text{CD}:(\text{C}_{10}\text{TAB})_2$ (línea negra) y complejo ternario $\text{MBSC}:\text{CD}:\text{C}_{10}\text{TAB}$ (línea verde) en función de $[\text{C}_{10}\text{TAB}]$ en presencia de $[\gamma\text{-CD}] = 2 \times 10^{-2} \text{ M}$. (Derecha) Distribución de la concentración de MBSC no complejado (línea verde); complejo de $\text{CD}:\text{MBSC}$ (línea azul) y complejo ternario de $\text{MBSC}:\text{CD}:\text{C}_{10}\text{TAB}$ (línea roja) en función de $[\text{C}_{10}\text{TAB}]$ en presencia de $[\gamma\text{-CD}] = 2 \times 10^{-2} \text{ M}$.

La situación descrita en la Figura 2.14-derecha, tiene una implicación mayor en los resultados de la reactividad química, ya que se muestran los diferentes estados del MBSC. Desde un punto de vista cinético, se debe mencionar que sólo el MBSC no complejado contribuye a la constante de velocidad de solvólisis. De hecho, se puede observar que el perfil cinético mostrado en la Figura 2.12, es similar al perfil de la concentración de MBSC no complejado que se muestra en la Figura 2.14. Debe tenerse en cuenta que casi el 60% del MBSC no complejado está presente a concentraciones muy bajas de C_{10}TAB . Al aumentar la concentración de surfactante disminuye el porcentaje del complejo 1:1 $\text{CD}:\text{MBSC}$, como se espera en una complejación competitiva, pero la fracción molar de $\text{MBSC}:\text{CD}:\text{C}_{10}\text{TAB}$ aumenta debido a una complejación cooperativa. Como consecuencia de la complejación cooperativa, el complejo 1:1:1 es la especie predominante hasta que la $[\text{C}_{10}\text{TAB}]$ es igual a 30 mM. El aumento adicional en la concentración de surfactante aumenta el porcentaje del complejo 1:2 $\text{CD}:(\text{C}_{10}\text{TAB})_2$ y la disminución de la concentración del complejo ternario 1:1:1, con el consiguiente incremento de la concentración de MBSC no complejado. Este aumento de la concentración de MBSC no complejado, es la razón de que k_{obs} aumente antes de la micelización del surfactante, Figura 2.12. Hemos demostrado previamente que el método de calibrado falló en el cálculo de la fracción de la ciclodextrina no complejada en el sistema micelar. Este fallo es debido a una limitación inherente en el método de calibrado, porque tanto el complejo 1:1 $\text{CD}:\text{MBSC}$ como el 1:1:1 $\text{MBSC}:\text{CD}:\text{C}_{10}\text{TAB}$ se pueden despreciar, desde el punto de vista de la reactividad solvolítica. Como consecuencia, el valor de la constante de velocidad

observada en el punto de micelización se atribuye al equilibrio entre MBSC libre y complejo 1:1, pero se ignora la existencia del complejo ternario 1:1:1.

2.4 Conclusión

Los resultados obtenidos de experimentos cinéticos y DOSY, nos permiten concluir que las moléculas de γ -CD pueden formar distintos tipos de complejos (1:1, 1:2 y 1:1:1) con dos *guests* operando simultáneamente. Se observa un efecto cooperativo en la formación del complejo ternario mixto (1:1:1) así como en el caso de la complejación del surfactante. Este comportamiento diferente al observado con la β -CD, donde se observa una formación competitiva de los complejos de inclusión de β -CD:Surfactante. En el caso de β -CD, la formación de estos complejos de inclusión desplaza el MBSC hacia el medio acuoso. Sin embargo, en el caso de γ -CD en primer lugar, se observa un complejo de inclusión binario γ -CD:MBSC (complejo 1:1), y un aumento en la concentración de surfactante induce la formación de un complejo de inclusión triple formado por γ -CD:Surfactante:MBSC (complejo 1:1:1). Por último, un aumento posterior en la concentración de surfactante origina la formación de un γ -CD:(surfactante)₂ (complejo 1:2) de un modo competitivo, desplazando el MBSC al medio acuoso. Como consecuencia de esta complejación múltiple, la reactividad química muestra un comportamiento muy complejo.

2.5 Bibliografía

- (1) Saenger, W. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1980**, *19*, 344–362.
- (2) Komiyama M., B. M. L. *Reactivity and Structure Concepts in Organic Chemistry*; **1978**.
- (3) Park, H.; Mayer, B.; Wolschann, P. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 6158–6166.
- (4) Fraiji, E. K.; Cregan, T. R.; Werner, T. C. *Appl. Spectrosc.* **1994**, *48*, 79–84.
- (5) Ribó, J. M.; Farrera, J. A.; Valero, M. L.; Virgili, A. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3705–3712.
- (6) Escandar, G. M. *Analyst* **1999**, *124*, 587–591.
- (7) Hamai, S. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 12109–12114.
- (8) Hamai, S. **1997**, *101*, 1707–1712.
- (9) Hamai, S.; Kudou, T. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1998**, *113*, 135–140.
- (10) Tamaki T.; K. T. *J. Incl. Phenom.* **1984**, *2*, 815–822.
- (11) Clarke, R. J.; Coates, J. H.; Lincoln, S. F. **1986**, *2*, 2333–2343.
- (12) Banquy, X.; Prez-casas, S.; Tovar, E.; Garca, A.; Villa, A.; Amigo, A.; Mark, A. E.; Costas, M.; Piñeiro, A. *J. phys. chem B* **2007**, *111*, 4383–4392.
- (13) Hamai, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, *80*, 1527–1533.
- (14) Yang, C.; Fukuhara, G.; Nakamura, A.; Origane, Y.; Mori, T.; Wada, T.; Inoue, Y. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57*, 433–437.
- (15) Agbaria, R. A.; Roberts, E.; Warner, I. M. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 10056–10060.
- (16) Ndreaus, J. A.; Raxler, J. D.; Arr, R. M. **1997**, *312*, 306–312.
- (17) Cepeda, M.; Daviña, R.; García-Río, L.; Parajó, M. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *499*, 70–74.
- (18) García-Río, L.; Méndez, M.; Paleo, M. R.; Sardina, F. J. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 12756–12764.
- (19) Cepeda, M.; R, D.; García-Río, L.; Parajó, M.; Rodríguez-Dafonte, P.; Pessêgo, M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1093–1102.
- (20) Rekharsky, M. V; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875–1917.
- (21) Ueno, A.; Takahashi; Osa, T. *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.* **1980**, 921–922.
- (22) Takahashi, K.; Rav-Acha, C.; Choshen, E. *Environ. Sci. Technol. Stud. Control Var. aqueous React. by host-guest complexation cyclodextrins* **1986**, *21*, 1–12.
- (23) Hamai, S.; Sasaki, Y.; Hori, T.; Takahashi, A. *J. Incl. Phenom.* **2006**, *54*, 67–76.
- (24) Wu, D. H.; Chen, A. D.; Johnson, C. S. *Journal of Magnetic Resonance, Series A.* **1995**, *115*, 260–264.
- (25) Mehta, S. K.; Bhasin, K. K.; Dham, S.; Singla, M. L. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *321*, 442–451.
- (26) De Lisi, R.; Lazzara, G.; Milioto, S.; Muratore, N.; Terekhova, I. V. *Langmuir* **2003**, *19*, 7188–7195.
- (27) De Lisi, R.; Lazzara, G.; Milioto, S.; Muratore, N. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 13150–13157.
- (28) Cohen, Y.; Avram, L.; Frish, L. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44*, 520–554.
- (29) Price, W. S. *Concepts Magn. Reson.* **1998**, *10*, 197–237.

- (30) Nilsson, M.; Cabaleiro-Lago, C.; Valente, A. J. M.; Söderman, O. *Langmuir* **2006**, *22*, 8663–8669.
- (31) Cabaleiro-Lago, C.; Nilsson, M.; Söderman, O. *Langmuir* **2005**, *21*, 11637–11644.
- (32) Nakamura, A.; Inoue, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 966–972.
- (33) Brocos, P.; Díaz-Vergara, N.; Banquy, X.; Pérez-Casas, S.; Costas, M.; Piñeiro, Á. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 12455–12467.
- (34) Bentley, T. W.; Jones, R. O.; Kang, D. H.; Koo, S. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 799–806.
- (35) Kastrup, C. J.; Ismagilov, R. F. *J. Phys. Org. Chem.* **2007**, *20*, 711–715.
- (36) Lee, I.; Bentley, T. W. **1993**, *6*, 223–227.
- (37) Bunton, C. a; Nome, F.; Quina, F. H.; Romsted, L. S. *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 357–364.
- (38) Rathman, J. F. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1*, 514–518.
- (39) García-Río, L.; Leis, J. R.; Mejuto, J. C.; Pérez-Juste, J. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 4581–4587.
- (40) Alvarez, A. R.; García-Río, L.; Hervés, P.; Leis, J. R.; Mejuto, J. C.; Pérez-Juste, J. *Langmuir* **1999**, *15*, 8368–8375.
- (41) Dorrego, B.; García-Río, L.; Hervés, P.; Leis, J. R.; Mejuto, J. C.; Pérez-Juste, J. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4912–4920.
- (42) Dorrego, A. B.; García-Río, L.; Hervés, P.; Leis, J. R.; Mejuto, J. C.; Pérez-Juste, J. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2000**, *39*, 2945–2948.



3 Influencia del Cucurbit[7]urilo en la hidrólisis del N-picolinoilimidazol

3.1 Introducción

La complejación de moléculas por macrociclos es un área atractiva en la química supramolecular. Los cucurbiturilos¹⁻³ son receptores macrocíclicos formados por n unidades de glicourilo unidas entre ellas por n pares de puentes metileno. Estos receptores presentan una cavidad hidrofóbica y una geometría simétrica, con dos portales del mismo tamaño con grupos carbonilo alineados en la entrada de dichos portales, que les habilita para formar complejos de inclusión con moléculas orgánicas y cationes metálicos. La formación de complejos de inclusión por CB_n está determinada por distintos tipos de interacciones: interacciones hidrofóbicas, establecidas en el interior de la cavidad e interacciones ión-dipolo o dipolo-dipolo, establecidas en los portales del macrociclo, además de interacciones por enlace de hidrógeno.

El confinamiento impuesto por inclusión supramolecular, por medio de macrocíclicos, y las variaciones asociadas en la reactividad del sustrato son especialmente importantes en los procesos catalíticos^{4,5}. La evolución de estas interacciones supramoleculares es frecuentemente dictada por la rigidez estructural, restricción de volumen y las interacciones de unión que se desarrollan dentro de la región supramolecular. Esto condujo al desarrollo de varias moléculas supramoleculares para mejorar y controlar la reactividad química y selectividad.

El papel de los cucurbiturilos (CB_n), no sólo es actuar como un recipiente de reacción supramolecular, sino también como un catalizador para promover la reactividad y/o la selectividad tanto en reacciones térmicas como fotoquímicas. El uso de CB_n como un reactor de reacción catalítica para las reacciones térmicas se estudió por primera vez en la década de los 80,⁶ su capacidad para catalizar las transformaciones inducidas por la luz sólo se han explorado recientemente. Después de caracterizar estructuralmente el CB_6 , que fue originalmente sintetizado por Behrend⁷, Mock⁸ y sus colaboradores, que

estudiaron la influencia del CB6 como recipiente de reacción en la reacción de cicloadición [3+2] entre alquinos catiónicos y azida, demostraron que la reacción se aceleró aproximadamente 10^5 veces, dando lugar al producto triazol.

En nuestro grupo⁹, se ha estudiado la solvólisis de cloruros de benzoilo sustituidos que conducen al correspondiente ácido benzoico, encontrándose comportamientos distintos en presencia de CB7 y β -CD o DM- β -CD. Para las reacciones S_N1 puras, como la solvólisis del 1-bromoadamantano, tanto el CB7 como la β -CD inhibieron la reacción. La capacidad de ambas cavidades para solvatar el grupo saliente, Br^- , era similar al obtenido en mezclas de 70% metanol: agua. Sin embargo, la solvólisis de cloruros de benzoilo sustituidos con grupos electroattractores, que transcurre a través de un mecanismo asociativo, fue catalizada por DM- β -CD e inhibida por CB7. Por otra parte, la solvólisis de cloruros benzoilo sustituidos por grupos electrodonadores, que transcurre a través de un mecanismo disociativo, fue catalizada por CB7 e inhibida por DM- β -CD. Este comportamiento es consecuencia de la baja capacidad de ambas cavidades para solvatar el grupo saliente Cl^- , sin embargo, dentro de la cavidad del CB7 la interacción entre el potencial electrostático del portal de la cavidad y el catión acilo, influyen en el estado de transición de la reacción de solvólisis. Con este estudio, se presentó un ejemplo elegante del papel de los grupos carbonilo presentes en la entrada de los portales, desempeñando un importante papel en el mecanismo de reacción. Por otro lado, Nau y colaboradores¹⁰ estudiaron la hidrólisis ácida mediada por CB7, con oximas, carbamatos y amidas. En el caso de las amidas, la reacción transcurre a través de un pre-equilibrio, donde ocurre la protonación del oxígeno del grupo carbonilo, lo que la hace susceptible al ataque nucleofílico del agua, produciéndose la aceleración de la velocidad de reacción. Independientemente del sitio de protonación, la carga positiva resultante de la amida protonada debe situarse cerca del portal carbonílico del macrociclo y experimentar una estabilización Coulómbica.

En este capítulo se presenta un estudio de la reacción de hidrólisis del N-picolinoilimidazol (amida que pertenece a N-acetilimidazoles) en presencia de CB7 y distintos porcentajes de acetonitrilo. A través de distintos experimentos, estudiamos la posible formación de un complejo de inclusión entre CB7 y la amida, así como la influencia del disolvente (CH_3CN) en dicho complejo.

3.2 Sección experimental

Materiales. Todos los reactivos y disolventes utilizados en este estudio fueron obtenidos comercialmente, siendo de la máxima pureza disponible, y usados sin purificaciones posteriores. Excepto el CB7 que fue sintetizado, de acuerdo con el procedimiento descrito en la bibliografía³, y también el sustrato N-picolinoilimidazol que fue sintetizado a través de las indicaciones de Fife y Przystas^{11,12}.

Síntesis del Cucurbit[7]urilo (CB7): En un balón de 250 mL se ha colocado formaldehído (25 mL, 0.32361 mol) y se añadió, a baja temperatura la mezcla ácido sulfúrico-agua (120 mL, 9M). Lentamente, se adicionó glicolurilo (20.26 g, 0.1407 mol) y se ha dejado en agitación hasta que se formó un gel altamente viscoso y transparente, aproximadamente 30min. Posteriormente, se ha elevado la temperatura a 100°C, disolviéndose el gel, durante 75 horas.

Se colocó la mezcla de reacción en 200 mL de agua MilliQ y se añadió cerca de 2L de acetona, formándose un precipitado blanco constituido por la mezcla de CB n . Este precipitado se filtró y se lavó tres veces con 500 mL de una mezcla de acetona/agua (4:1) para eliminar el ácido, filtrándose el precipitado. Al precipitado se le añadió 500 mL de agua para disolver el CB5 y CB7, y separar la parte que permanece insoluble correspondiente al CB6 y CB8, que presentan una baja solubilidad en agua.

A la parte disuelta en agua, se añadió cerca de 1.5 L de acetona observándose la formación de un precipitado y se filtró. Para separar el CB5 del CB7, se ha disuelto este precipitado en la mínima cantidad de ácido clorhídrico concentrado (HCl) y se han separado por precipitación fraccionada, con ayuda del rotavapor. Cada precipitado obtenido fue disuelto y precipitado varias veces hasta que se elimina todo el ácido. Cuando se obtiene el CB7 puro, primero se lava con acetona y después con éter dietílico, así conseguimos eliminar el máximo posible de agua. Finalmente, el producto (CB7) se secó en una bomba de alto vacío a 140°C durante 72 horas. El producto ha sido caracterizado por ¹H RMN (400 MHz, D₂O, ppm): $\delta = 4.20$ (d, 14H), 5.49 (s, 14H), 5.75 (d, 14H).

Síntesis del N-picolinoilimidazol (I): En un balón se mezcló ácido picolínico (1.29 g, 10.48 mmol) con diclorometano (16 mL) bajo agitación, seguidamente se añadió 1,1-carbonildiimidazol CDI (2.71 g, 16.77 mmol) a la suspensión. Se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la disolución se lavó con una mezcla

saturada de bicarbonato sódico (NaHCO_3 , 25 mL) y agua (25 mL), y posteriormente se llevó hasta sequedad evaporando todo el disolvente con la ayuda del rotavapor, dando lugar a un aceite marrón. El producto ha sido caracterizado por ^1H RMN (400MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 7.11$ (d, 1 H, H-2 Im), 7.58 (dd, 1 H, H-1 Im), 7.98 (m, 2 H, H-5 Py y H-6 Py), 8.23 (d, 1 H, H-3 Im), 8.76 (d, 1 H, H-7 Py), 8.92 ppm (s, 1 H, H-4 Py).

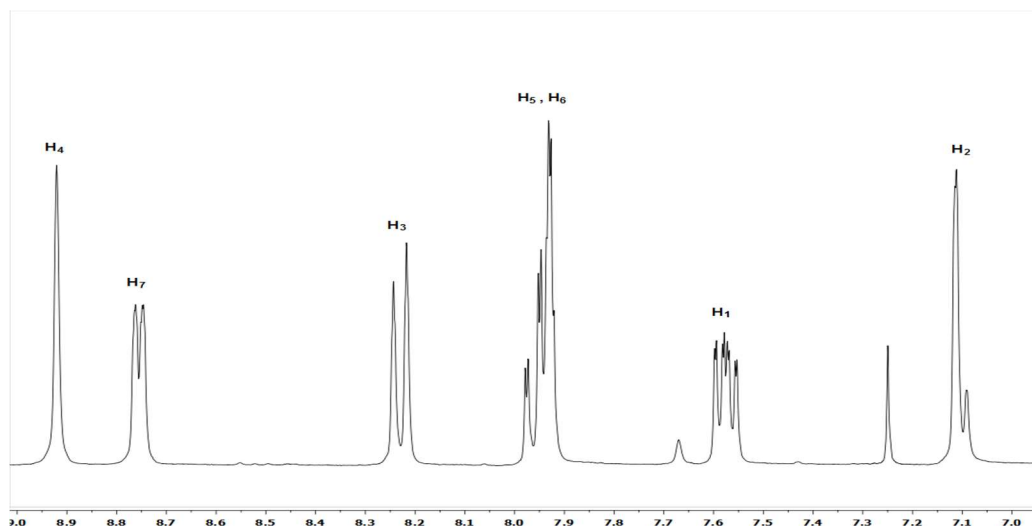


Figura 3.1 : Espectro de ^1H RMN del N-picolinoilimidazol (I) en CDCl_3 .

Estudio espectrofotométrico. Las soluciones madre de N-picolinoilimidazol (I) se prepararon en acetonitrilo, debido a su inestabilidad y baja solubilidad en agua. La concentración final de acetonitrilo en el medio de reacción era de 1% (v/v). Las disoluciones se prepararon mezclando volúmenes apropiados de las disoluciones acuosas madre de los reactivos utilizados, en una cubeta de cuarzo de 1cm de paso de luz. Los experimentos cinéticos se iniciaron al adicionar un pequeño volumen de la disolución de partida de N-picolinoilimidazol (I), cuya concentración fue de 4.5×10^{-5} M en cubeta, a la disolución del sistema correspondiente, previamente termostatizada a 25°C . Las reacciones se estudiaron cinéticamente siguiendo el cambio de absorbancia observado a 280-285 nm, longitud de onda donde se observa mayor variación de absorbancia para el (I), en un espectrofotómetro Cary 50 UV-Vis. La Figura 3.2, muestra un ejemplo de los datos absorbancia-tiempo obtenidos experimentalmente y su ajuste a la ecuación integrada de primer orden, ecuación (3.1). Los valores de las constantes de velocidad de pseudo-primer orden, k_{obs} , son reproducibles en 3%.

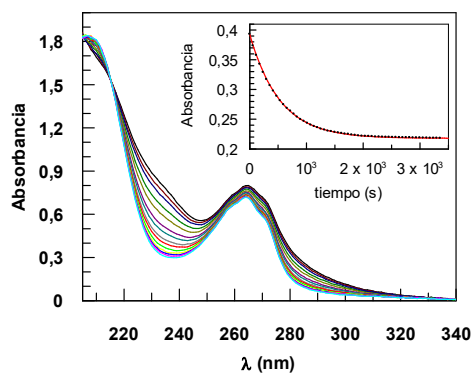


Figura 3.2: Espectro UV-Vis de la hidrólisis del N-picolinoilimidazol en función del tiempo, y un ejemplo de ajuste de la ecuación de primer orden. $[I] = 4.5 \times 10^{-5}$ M. $\Delta t = 60$ s.

$$A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty)e^{-k_{\text{obs}}t} \quad (3.1)$$

A partir de esta ecuación, se obtiene el valor de la constante de velocidad observada para el sustrato (I) en agua, $k_{\text{obs}} = 1.89 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Las reacciones de hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I) en presencia de distintos porcentajes de acetonitrilo, se estudiaron a distintos valores de pH utilizando una disolución tampón. Las constantes de velocidad observadas, se obtuvieron por extrapolación de los valores de k_{obs} obtenidos a varias concentraciones de tampón, a una concentración tampón cero. Para valores de pH entre 1-3 se utilizó HCl, para los restantes valores de pH se emplearon una serie de disoluciones tampón, de ácido acético-acetato (pH 4-5.5), hidrógeno fosfato-dihidrógeno fosfato (pH 6-8). Los valores de pH de la mezcla de reacción se midieron a 25°C con un electrodo de pH del modelo Radiometer.

Experimentos de RMN. Los espectros ^1H RMN fueron adquiridos en un espectrofotómetro Varian Inova 400. Las mezclas para el sistema CB7/1-Butilimidazol se prepararon mezclando los volúmenes apropiados de las disoluciones stock, preparadas previamente en D_2O . Las mezclas para los sistemas CB7/ 1-Butilimidazol y 1-Butilimidazol, ambos variando el porcentaje de acetonitrilo, se prepararon mezclando los volúmenes apropiados de las disoluciones stock, preparadas en D_2O . Como variamos el porcentaje de acetonitrilo en los experimentos de ^1H RMN, nos ayudamos de un tubo coaxial con una disolución de TSP [3-(trimetilsilil)propionato-2,2,3,3- d_4 de sodio] para referenciar los espectros ^1H en 0 ppm, debido a la presencia de una mezcla de disolventes deuterados, así nos evitamos referenciar cada disolvente en los espectros, según la proporción mayoritaria en el que estén en disolución. En todos los experimentos se

mantuvo la concentración constante de CB7 (2mM) y 1-Butilimidazol (1mM), y se varió el porcentaje de acetonitrilo.

3.3 Resultados y Discusión

El sustrato N-picolinoilimidazol (I) pertenece a un grupo de amidas, las N-acetilimidazoles¹³, que debido a sus características estructurales poseen una reactividad excepcional. Por ejemplo, si se comparan las constantes de velocidad para la hidrólisis básica de N-acilimidazoles con las del éster de p-nitrofenolacetato, para el primero k_{OH} es de $316 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mientras que para el segundo es $15 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, a pesar de que el pK_a del imidazol es de 14.5 y el de p-nitrofenol es de 7.¹⁴⁻¹⁶

Para explicar las variaciones en la velocidad de hidrólisis de (I) debemos de tener en cuenta sus características estructurales. Para las amidas convencionales existe una estructura resonante que desactiva el grupo carbonilo, sin embargo, en las amidas de la familia de los N-acilimidazoles existe a mayores, una resonancia opuesta que sitúa la carga parcial negativa sobre N-3, haciendo más reactivo al grupo carbonilo (Figura 3.3). Por tanto, los nucleófilos atacarán el grupo carbonilo de los N-acilimidazoles, y el enlace C-N se romperá fácilmente.

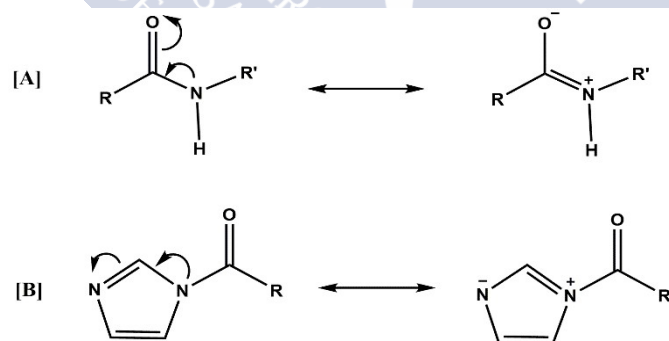


Figura 3.3 : Estructuras resonantes para aminas convencionales [A] que refleja la desactivación del grupo carbonilo, y estructuras resonantes para los N-acilimidazoles [B] que muestran que existe una resonancia opuesta que permite situar la carga negativa sobre N-3, haciendo más reactivo el grupo carbonilo.

Estudios anteriores de la reacción de hidrólisis de N-acilimidazoles y compuestos similares, sugieren que el mecanismo más probable en agua es aquel que plantea el ataque de una molécula de agua y la transferencia simultánea de un protón al grupo saliente¹⁷⁻¹⁹. Por lo tanto, el disolvente jugará un papel fundamental pues la reactividad de estos compuestos va a depender en gran medida de su capacidad para solvatar el grupo saliente.

3.3.1 Hidrólisis del N-picolinoilimidazol en presencia de CB7

En el estudio de la influencia de la concentración de CB7 en el proceso de hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I), se mantuvo constante tanto la concentración de $[I]=4.5 \times 10^{-5}$ M como el porcentaje de acetonitrilo (CH_3CN). Inicialmente, realizamos el experimento con un 3.85% de CH_3CN (Figura 3.4-b) y variamos la concentración de CB7. Tal como se puede observar, a partir de $\text{CB7} \approx 1.5 \times 10^{-4}$ M, se produce un aumento en la constante de velocidad observada, alcanzando un máximo a una concentración de $\text{CB7} \approx 1 \times 10^{-3}$ M, pero seguidamente disminuye. Estos resultados inesperados, nos llevaron a estudiar este proceso utilizando distintos porcentajes de CH_3CN , ya que cabría esperar una inhibición en el proceso de hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I) en presencia de CB7, como consecuencia de la menor polaridad del medio.

En la Figura 3.4 se muestran los resultados obtenidos en el proceso de hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I) en presencia de CB7 y de distintos porcentajes de CH_3CN .

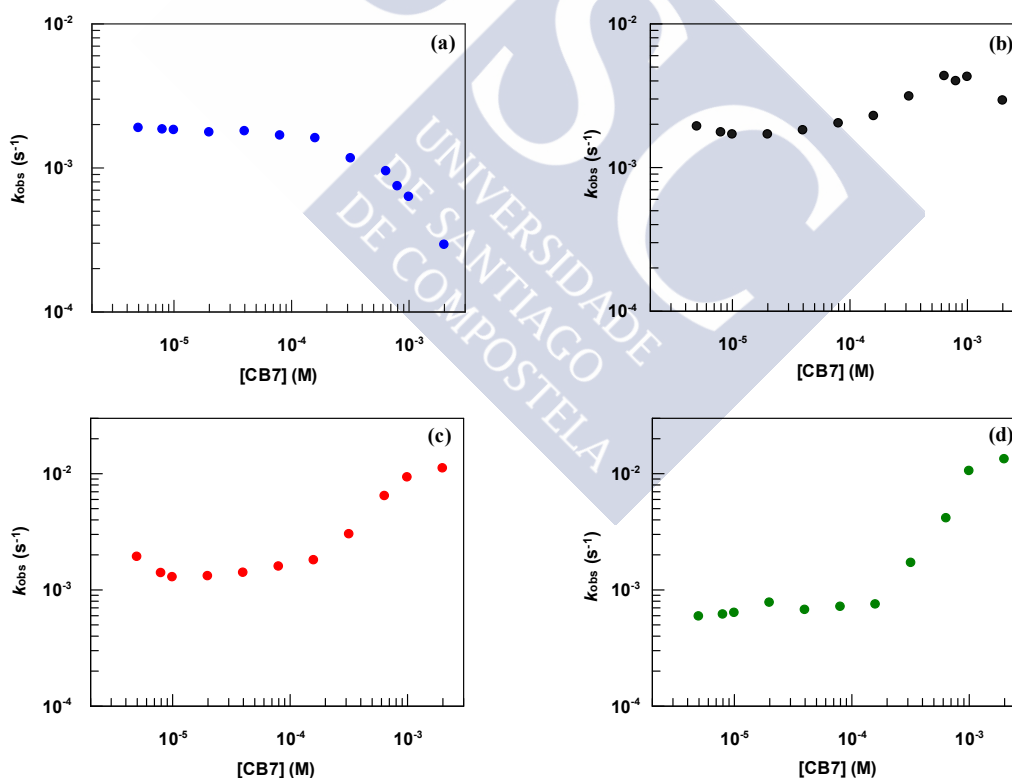


Figura 3.4 : Influencia de la concentración de CB7 en la constante de velocidad observada (k_{obs}) para la hidrólisis de N-picolinoilimidazol, para distintos porcentajes de acetonitrilo: (a) (●) 0,30%, (b) (●) 3,85%, (c) (●) 10% y (d) (●) 20%. $[I]=4.5 \times 10^{-5}$ M, $T=25^\circ\text{C}$.

Como podemos observar en la Figura 3.4, en todos los casos estudiados la constante de velocidad observada (k_{obs}) permanece prácticamente constante hasta una

concentración de $[CB7] \approx 1.5 \times 10^{-4}$ M. A partir de ese punto, vemos como para distintos porcentajes de acetonitrilo la constante de velocidad observada presenta distintos comportamientos.

Para el caso (a) donde el porcentaje de acetonitrilo es 0.30%, el porcentaje mínimo en cubeta, observamos que a partir de $[CB7] \approx 1.5 \times 10^{-4}$ M se produce una disminución de la velocidad de reacción, debido a la incorporación del sustrato (I) en la cavidad del CB7, donde el proceso de hidrólisis es mucho más lento que en medio acuoso, consecuencia de la menor polaridad de este medio. Para el caso (b) donde tenemos un 3.85% de acetonitrilo, podemos destacar en comparación con el caso (a) 0.30% de CH_3CN , que los valores para la constante de velocidad observada de (I) no alcanzan valores tan bajos, ambos en presencia de CB7.

Sin embargo, para los casos (c) y (d) donde los porcentajes de acetonitrilo son, 10% y 20%, respectivamente, el comportamiento es totalmente distinto. A partir de una determinada concentración de CB7, se produce un aumento de la constante velocidad observada para la hidrólisis del (I) mucho mayor que en los casos anteriores.

En la Figura 3.5, se representa la influencia de la concentración del CB7 sobre el cociente k_{obs}/k_w , con el objetivo de obtener una relación entre la constante de velocidad observada para la hidrólisis del (I) en presencia de distintos porcentajes de CH_3CN , y la constante de velocidad del (I) en agua. En todos los casos estudiados el cociente k_{obs}/k_w permanece prácticamente constante hasta una $[CB7] \approx 1.5 \times 10^{-4}$ M. A partir de ese punto, vemos como para distintos porcentajes de acetonitrilo el cociente entre ambas constantes presenta distintos comportamientos.

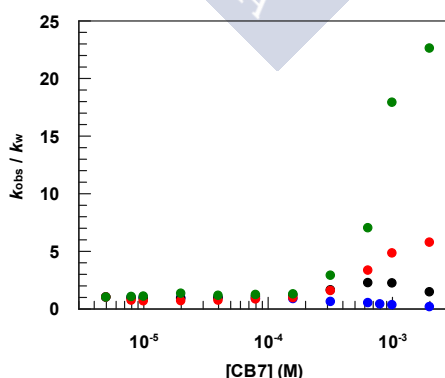


Figura 3.5 : Influencia de la concentración de CB7 en el cociente k_{obs}/k_w calculado a partir de los espectros para la hidrólisis de N-picolinoilimidazol, para distintos porcentajes de acetonitrilo: (a) (●) 0.30%, (b) (●) 3.85%, (c) (●) 10% y (d) (●) 20%. $[I] = 4.5 \times 10^{-5}$ M, $T = 25^\circ C$.

Para el caso (a) el valor para el cociente es casi despreciable, mientras que para el caso (b) se observa un aumento de k_{obs}/k_w hasta aproximadamente 1.5 veces, es decir, la velocidad de hidrólisis del (I) con el 3.85% de CH₃CN es 1.5 veces más rápida que en agua. Para los casos (c) y (d), con un 10% y 20% de CH₃CN, respectivamente, se observa que el cociente k_{obs}/k_w aumenta en 6 y 23 veces más, aproximadamente para cada caso. Por tanto, a medida que aumenta el porcentaje de acetonitrilo en el medio de reacción, la velocidad de hidrólisis del N-picolinoilimidazol es n veces más rápida que en agua pura. Los resultados presentados en la Figura 3.5, son totalmente inesperados ya que cabría esperar una inhibición en el proceso de hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I) en presencia de CB7, debido a la incorporación del sustrato (I) en la cavidad, donde el proceso de hidrólisis es mucho más lento que en medio acuoso, consecuencia de la menor polaridad de este medio.

En base a los resultados de este experimento, se observa una aceleración de la velocidad de la reacción en presencia de CB7 con el aumento del porcentaje de acetonitrilo. Esto puede ser consecuencia de la formación de un complejo de inclusión entre el (I) y el CB7, la afinidad de este macrociclo para formar complejos estables con amidas¹⁰ y su capacidad para cambiar el pK_a de las moléculas *guest*, nos hizo sospechar que el CB7 podrían acelerar la hidrólisis del (I). O también que, este aumento de la velocidad de reacción, puede ser atribuido a una posible interacción entre el complejo CB7:N-picolinoilimidazol con el acetonitrilo (CH₃CN), o resultado de una interacción de ambos por separado.

Considerando las posibilidades, realizamos el estudio del proceso de solvólisis del N-picolinoilimidazol (I) en ausencia de CB7, pero en presencia de distintos disolventes.

3.3.2 Influencia del disolvente en el proceso de hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I)

Para comprobar la influencia del poder ionizante del disolvente sobre la solvólisis de (I) se lleva a cabo la reacción en mezclas de agua y disolventes polares próticos y apróticos: etanol/agua y acetonitrilo/agua.

Como podemos observar en la Figura 3.6, la constante de velocidad observada del proceso de hidrólisis del (I), disminuye a medida que aumenta el porcentaje de etanol en el medio de reacción, desde $k_{obs} = 1.89 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ en agua pura hasta $k_{obs} = 9.55 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para mezclas de 80% etanol/agua. Se puede decir que, en estas condiciones experimentales

disminuye la capacidad ionizante del disolvente. Por tanto, el hecho de que la velocidad de hidrólisis sea mayor en agua que en etanol, es compatible con una reacción que tiene lugar a través de un estado de transición en el que la ruptura del enlace C-N tiene un papel importante.

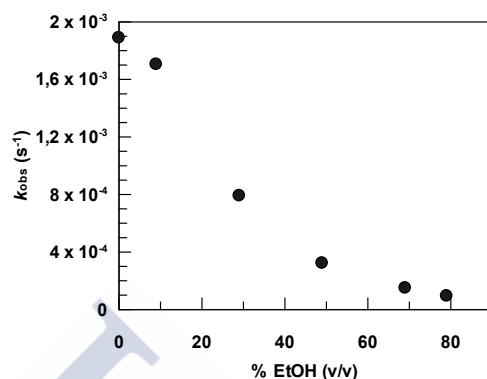


Figura 3.6 : Influencia del porcentaje de etanol en la constante de velocidad observada de la reacción de hidrólisis del N-picolinoilimidazol en mezclas etanol/agua. $[I]= 4.5 \times 10^{-5}$ M; $T= 25^{\circ}\text{C}$.

Ambos disolventes utilizados, agua y etanol, son disolventes polares próticos, y decidimos probar con otro disolvente polar, pero esta vez aprótico, el acetonitrilo (CH_3CN), ya que es menos nucleófilo que los usados anteriormente. Inicialmente hemos comprobado la influencia del poder ionizante del nuevo disolvente sobre el proceso de solvólisis de (I), llevando a cabo la reacción en mezclas acetonitrilo/agua.

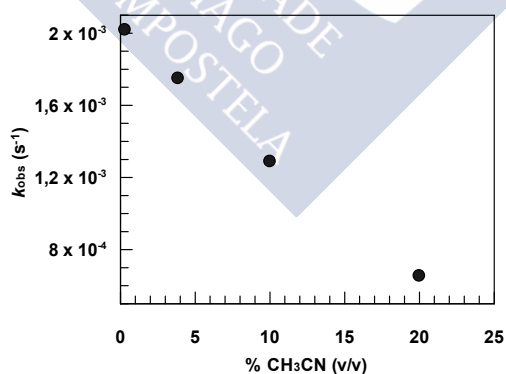


Figura 3.7 : Influencia del porcentaje de acetonitrilo en la constante de velocidad observada de la reacción de hidrólisis del N-picolinoilimidazol en mezclas acetonitrilo/agua. $[I]= 4.5 \times 10^{-5}$ M; $T= 25^{\circ}\text{C}$.

Como podemos observar en la Figura 3.7, la constante de velocidad observada de la reacción de hidrólisis para (I), disminuye a medida que aumenta el porcentaje de acetonitrilo en el medio de reacción. Como mencionamos anteriormente, la disolución madre del sustrato (I) está preparada en acetonitrilo, por tanto, debido al volumen

utilizado en cubeta vamos a tener un 0.30% mínimo de acetonitrilo en disolución, obteniéndose un valor $k_{obs} = 2.02 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ en agua que disminuye hasta $k_{obs} = 6.54 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para mezclas de 20% acetonitrilo/agua.

Este experimento no nos explica el comportamiento observado en presencia de CB7 (ver Figura 3.5), donde la constante de velocidad observada aumenta a medida que aumentamos el porcentaje de acetonitrilo.

3.3.3 Influencia del pH en la hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I) en presencia de los distintos porcentajes de acetonitrilo

La hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I) es una reacción que, está sujeta a catálisis por los iones hidroxilo (OH^-) e hidronio (H_3O^+), además del agua (H_2O)¹¹. En la Figura 3.8, se representa la influencia de la concentración de $[\text{H}^+]$ en la constante de velocidad observada para N-picolinoilimidazol en agua, manteniendo constante la concentración de (I) y los distintos porcentajes de acetonitrilo para cada caso. Se puede observar que hay una región independiente del pH, desde 5.5 a 7.5.

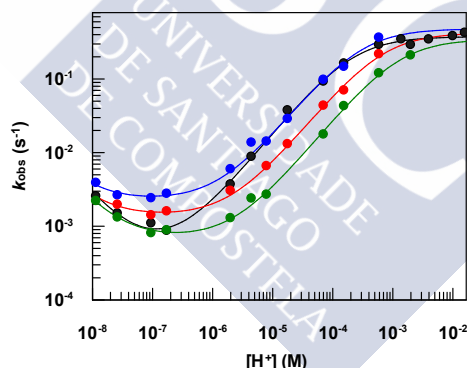
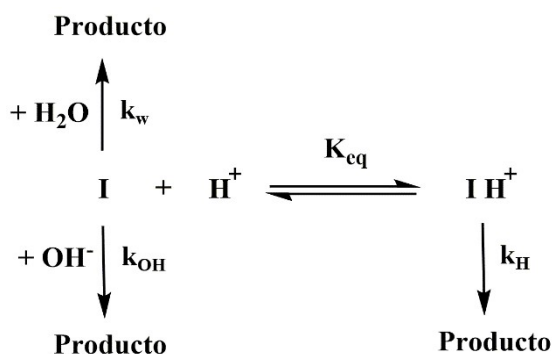


Figura 3.8 : Representación gráfica de la constante de velocidad observada (k_{obs}) para la hidrólisis de N-picolinoilimidazol frente a la $[\text{H}^+]$, con distintos porcentajes de acetonitrilo: (●) 0.30%, (●) 3.85%, (●) 10% y (●) 20%. $[\text{I}] = 4.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $T = 25^\circ\text{C}$.

Estos resultados son consistentes con el esquema mecanístico (Esquema 3.1) donde se considera que la reacción de hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I), está sujeta a catálisis por iones hidroxilo (OH^-) e hidronio (H_3O^+), además del agua (H_2O).



Esquema 3.1

El modelo (Esquema 3.1) debe contemplar que el N-picolinoilimidazol (I) se hidroliza en medio ácido, en medio básico y en agua, evolucionando para dar productos. Por tanto, la ecuación de velocidad viene dada por:

$$v = k_w [I] + k_H [I][H^+] + k_{OH} [I][HO^-] \quad (3.2)$$

La constante de equilibrio, K_{eq} , del proceso ilustrado en dicho esquema, puede definirse como:

$$K_{eq} = \frac{[IH^+]}{[I][H^+]} \quad \text{o} \quad K_{eq} = \frac{1}{K_a} \quad (3.3)$$

Las expresiones que definen las concentraciones de las especies reactivas, I y IH^+ , pueden ser obtenidas a partir de las ecuaciones (3.3) y de la ecuación del balance de materia para la concentración total de I (ecuación 3.4).

$$[I]_T = [I] + [IH^+] \quad (3.4)$$

$$[I] = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} [I]_T \quad (3.5)$$

$$[IH^+] = \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} [I]_T \quad (3.6)$$

Insertando las ecuaciones (3.5) y (3.6) en la ecuación de velocidad (3.2) tenemos:

$$v = \frac{k_w + k_H K_{eq} [H^+] + k_{OH} \left(\frac{10^{-14}}{[H^+]} \right)}{1 + K_{eq} [H^+]} [I]_T \quad (3.7)$$

Por lo que en condiciones de pseudo-primer orden, la constante de velocidad observada es definida de acuerdo con la ecuación (3.8):

$$k_{obs} = \frac{k_w + k_H K_{eq} [H^+] + k_{OH} \left(\frac{10^{-14}}{[H^+]} \right)}{1 + K_{eq} [H^+]} \quad (3.8)$$

Como se puede observar en la Figura 3.8 los datos experimentales se ajustan de forma satisfactoria a la ecuación (3.8) y los parámetros obtenidos de las constantes se encuentran en la Tabla 3.1. Los distintos valores de pK_a , se obtienen a partir de la ecuación (3.9), donde a partir de los valores la constante de equilibrio, K_{eq} , se obtienen los valores de K_a , ambas relacionadas por la ecuación (3.3).

$$pK_a = -\log K_a \quad (3.9)$$

Tabla 3.1 : Valores de las constantes para la hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I), para los distintos porcentajes de acetonitrilo.

% CH ₃ CN	k_w (s ⁻¹)	$10^{-3} k_{OH}$ (s ⁻¹)	$10^1 k_H$ (s ⁻¹)	K_{eq} (M ⁻¹)	K_a (M)	pK_a
0.30	$(2.24 \pm 1.07) \times 10^{-3}$	1.56 ± 0.79	4.81 ± 1.12	$(3.50 \pm 1.07) \times 10^3$	$(2.86 \pm 0.88) \times 10^{-4}$	3.54
3.85	$(4.97 \pm 0.93) \times 10^{-4}$	2.45 ± 0.34	3.77 ± 0.19	$(4.88 \pm 0.46) \times 10^3$	$(2.05 \pm 0.19) \times 10^{-4}$	3.69
10	$(1.37 \pm 0.16) \times 10^{-3}$	1.33 ± 0.82	4.24 ± 1.22	$(1.52 \pm 0.53) \times 10^3$	$(6.57 \pm 2.28) \times 10^{-4}$	3.18
20	$(6.88 \pm 0.66) \times 10^{-4}$	1.67 ± 0.26	3.47 ± 0.56	$(8.19 \pm 1.75) \times 10^2$	$(1.22 \pm 0.26) \times 10^{-3}$	2.91

Como se puede observar a partir de los valores de los parámetros (Tabla 3.1), la variación de pK_a es mínima para los estudios de N-picolinoilimidazol (I) con distintos porcentajes de acetonitrilo. Este experimento no nos permite explicar los resultados del apartado anterior, donde el aumento de la constante de velocidad de reacción, no puede

ser atribuido a una posible interacción del N-picolinoilimidazol con el acetonitrilo (CH_3CN).

Seguidamente, decidimos estudiar la influencia del porcentaje de acetonitrilo en formación de los complejos de inclusión entre el CB7 y las moléculas *guest*, y seleccionamos como molécula *guest* la 4-Nitroanilina.

3.3.4 Formación del complejo de inclusión entre CB7 y 4-Nitroanilina, en presencia de distintas concentraciones de acetonitrilo

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la complejación de un indicador, 4-Nitroanilina (4-NA) con el CB7. En la Figura 3.9, se muestra el espectro de absorción de la 4-NA en presencia de distintas concentraciones de CB7. Para este estudio la concentración de CB7 fue variada entre 0 y 1.4×10^{-3} M, y la concentración de 4-NA se mantuvo constante en 1×10^{-4} M. Como se puede observar, a medida que aumentamos la concentración de CB7 la absorbancia disminuye.

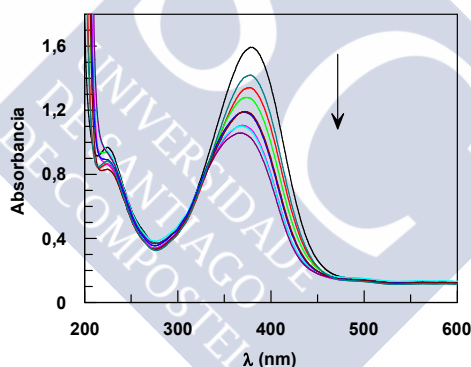


Figura 3.9 : Espectros de absorción de la $[4\text{-NA}] = 1 \times 10^{-4}$ M, en presencia de $[\text{CB7}] = 0 - 1.4 \times 10^{-3}$ M. Todos los espectros fueron registrados en agua Milli-Q a 25°C .

En este caso, es poco probable que los cambios observados en el espectro de absorción para 4-NA, se deban a la protonación del *guest* en la cavidad del CB7, dado que la 4-NA presenta un $\text{p}K_a = 0.98$,²⁰ lo que implicaría un desplazamiento del $\text{p}K_a$ de aproximadamente 5 unidades, entonces se considera que los cambios observados se deben a un efecto solvatocrómico.

Si se considera que las variaciones de absorbancia observadas en el espectro de la 4-NA en presencia de CB7, se debe a la formación de un complejo *host:guest* entre el CB7 y la 4-NA, se propone el siguiente modelo (Esquema 3.2).



Esquema 3.2

Estas consideraciones, implican que la ecuación para la absorbancia total se debe a la suma de la absorbancia de 4-NA en agua y a la complejada con el CB7:

$$Abs_T = \varepsilon_w[4\text{-NA}]_w + \varepsilon_{CB7}[\text{CB7:4-NA}] \quad (3.10)$$

Considerando las ecuaciones para el balance de materia de la 4-Anilina y para la constante de equilibrio para la formación del complejo 1:1 (CB7:4-NA), obtenemos una ecuación final referente a la absorbancia total (3.11).

$$Abs_T = \frac{Abs_w + Abs_{CB7}K[\text{CB7}]}{1 + K[\text{CB7}]} \quad (3.11)$$

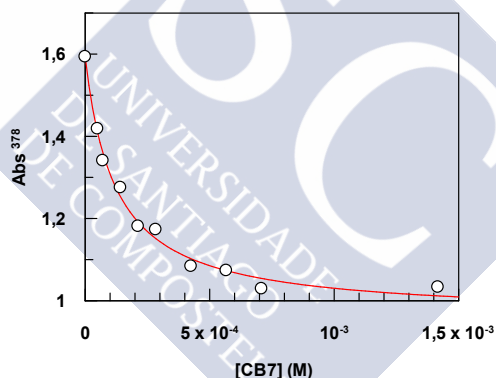


Figura 3.10 : Influencia de la concentración de CB7 en la absorbancia de la 4-NA a $\lambda=378$ nm. La línea representa el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación (3.11).

En Figura 3.10 se representa el valor de la absorbancia a 378 nm de la 4-Anilina en función de la concentración de CB7. Como aproximación, se ha considerado que la concentración de CB7 libre es aproximadamente igual a su concentración total. Los datos experimentales se ajustan de modo satisfactorio a la ecuación (3.11), y es posible determinar el valor de la constante de equilibrio para la formación del complejo 1:1 (CB7:4-NA), $K = (8.25 \pm 1.12) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Con este experimento, queremos poder explicar el aumento de la velocidad de reacción para el N-picolinoilimidazol en el apartado 3.3.1, y así poder atribuirlo a una posible interacción del CB7 con el acetonitrilo (CH_3CN).

Se estudió también la influencia de la adición un disolvente orgánico polar, acetonitrilo, en el valor de la constante de formación del complejo (CB7:4-NA). Con la adición de CH_3CN , se observó una disminución en el valor de la constante de formación del complejo 1:1 (CB7:4-NA). Los datos experimentales para cada concentración de acetonitrilo, se ajustaron a la ecuación (3.11), es decir, sin tener en cuenta la posibilidad de la formación de un complejo CB7: CH_3CN , obteniéndose una constante de formación del complejo aparente, K_{app} , que disminuye a medida que aumenta la concentración de acetonitrilo en el medio (ver Tabla 3.2 y Figura 3.11).

Tabla 3.2 : Variación de las constantes de formación aparentes (K_{app}) para el complejo entre CB7 y la 4-NA, variando la concentración de acetonitrilo para cada caso.

$[\text{CH}_3\text{CN}]$ (M)	K_{app} (M^{-1})
0	$(8.25 \pm 1.12) \times 10^3$
0.127	$(2.76 \pm 0.25) \times 10^3$
0.253	$(1.04 \pm 0.16) \times 10^3$
0.380	$(6.99 \pm 1.41) \times 10^2$
0.506	$(5.03 \pm 1.14) \times 10^2$

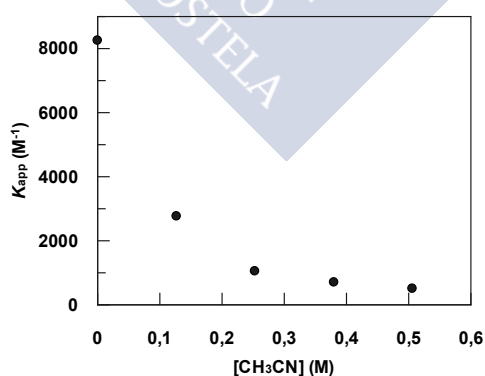
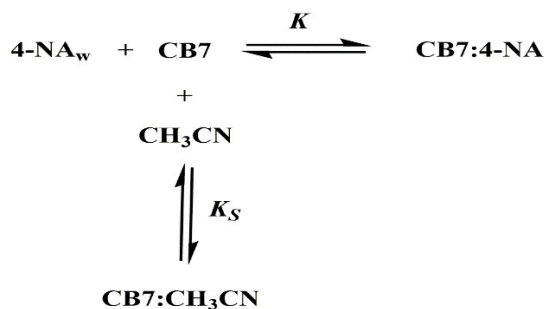


Figura 3.11 : Influencia de la concentración de CH_3CN sobre la constante de formación aparente (K_{app}) para el complejo CB7:4-NA.

La variación de la constante de formación aparente del complejo, K_{app} , se puede deber a una complejación competitiva entre el acetonitrilo y la 4-Anilina en ocupar el interior de la cavidad del CB7. Si suponemos que se forma un complejo 1:1 entre el

CH₃CN y el CB7, además del complejo CB7:4-NA, se puede considerar el siguiente modelo (Esquema 3.3).



Esquema 3.3

A partir del Esquema 3.3 y teniendo en cuenta la ecuación (3.11), el balance de materia del CB7 y los equilibrios referentes a la formación de los complejos entre el CB7 con el CH₃CN y con la 4-Anilina, obtenemos la siguiente ecuación para la K_{app} (3.12).

$$K_{app} = \frac{K}{1 + K_S[\text{CH}_3\text{CN}]} \quad \text{o} \quad \frac{1}{K_{app}} = \frac{1}{K} + \frac{K_S}{K}[\text{CH}_3\text{CN}] \quad (3.12)$$

En la Figura 3.12 se representa el inverso de la K_{app} en función de la concentración de acetonitrilo. Como se puede observar, los datos experimentales se ajustan de modo satisfactorio a la ecuación (3.12), y es posible determinar el valor de la constante de equilibrio para la formación del complejo 1:1 (CB7:4-NA); $K = (8.25 \pm 1.12) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, y para el complejo 1:1 (CB7:CH₃CN); $K_S = (2.89 \pm 0.13) \times 10^1 \text{ M}^{-1}$.

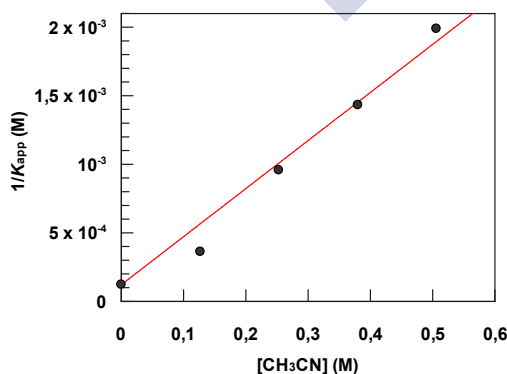


Figura 3.12 : Representación gráfica de la influencia de la concentración de CH₃CN sobre el inverso de la constante de formación aparente (K_{app}), teniendo en cuenta la formación del complejo CB7:4-NA y CB7:CH₃CN.

Comparando los valores de las constantes de equilibrio para los complejos 1:1 (CB7:4-NA y CB7:CH₃CN), se puede decir que el CB7 forma complejo con el acetonitrilo, además de con la 4-Anilina. Este experimento nos puede permitir explicar los resultados del apartado 3.3.1, donde el aumento de la velocidad de reacción, puede ser atribuido a una posible interacción del CB7 con el acetonitrilo (CH₃CN), además de complejarse con el N-picolinoilimidazol.

Por tanto, si consideramos que el aumento del porcentaje de acetonitrilo interviene en la formación del complejo CB7:N-picolinoilimidazol, la técnica que más información nos va aportar para la caracterización de los complejos formados es, ¹H RMN.

3.3.5 Caracterización estructural de los complejos formados entre el CB7 y 1-Butilimidazol (II)

Con el objetivo de poder explicar el comportamiento entre el CB7 y el N-picolinoilimidazol, utilizamos una molécula análoga al (I), más estable para los estudios por ¹H RMN, el 1-Butilimidazol (II), la cual tiene una parte similar al (I), el grupo imidazol (ver Figura 3.13). Por lo tanto, el comportamiento obtenido en los estudios con la molécula análoga (II), se podrá extrapolar para el N-picolinoilimidazol y comparar con estudios anteriores hechos para este *guest* (I).



Figura 3.13 : Estructuras del 1-Butilimidazol (II) (izquierda) y el N-picolinoilimidazol (I) (derecha), ambas tienen en común el grupo imidazol.

El proceso de complejación entre el CB7 y el 1-Butilimidazol (II), se estudió detalladamente a través de experimentos de ¹H RMN. Los dos componentes, CB7 y (II), presentan señales de ¹H que no se superponen, lo que nos facilita la identificación de las señales individuales de ambos componentes. En la Figura 3.14, se muestran los espectros de ¹H del CB7, 1-Butilimidazol y una mezcla 2:1 entre CB7 y 1-Butilimidazol.

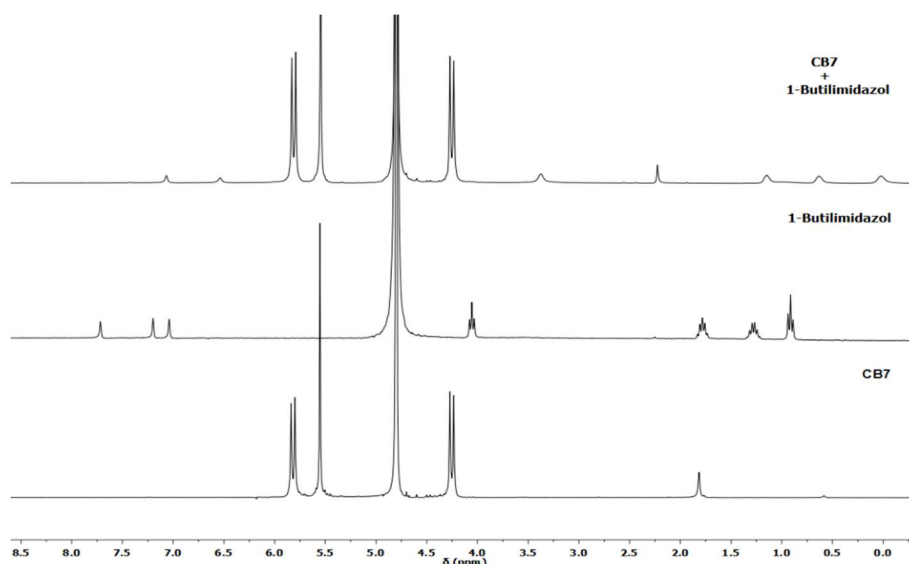


Figura 3.14 : Espectros de ^1H RMN del CB7, 1-Butylimidazol y CB7+1-Butylimidazol; $[\text{CB7}] = 2 \text{ mM}$ y $[\text{1-Butylimidazol}] = 1 \text{ mM}$.

3.3.5.1 Análisis de los espectros de ^1H RMN

Los estudios sistemáticos de RMN, proporcionan una información valiosa sobre la estequiometría y estructura de los complejos. Los cambios en los desplazamientos químicos del *guest* inducidos por la complejación ($\Delta\delta = \delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}$) son muy ilustrativos con respecto a su ubicación relativa a la cavidad del CB7. Se observa desplazamientos químicos hacia campo alto ($\Delta\delta < 0$), para protones situados dentro de la cavidad hidrófoba, mientras que el desapantallamiento provocado por los grupos carbonilo origina desplazamientos químicos hacia campo bajo ($\Delta\delta > 0$) en las resonancias de los protones del *guest* en la proximidad de los oxígenos carbonílicos^{1,2,21-24}.

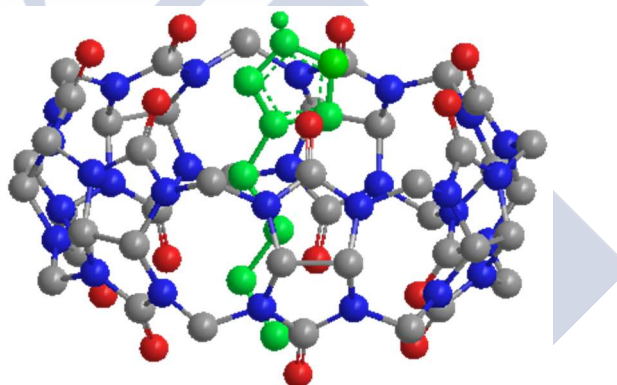
Por tanto, si nos fijamos en la Figura 3.14, se muestran los espectros ^1H RMN del 1-Butylimidazol en ausencia y presencia del CB7. En la Tabla 3.3, representamos las variaciones de los desplazamientos químicos del (II), prestando especial atención a los protones del grupo imidazol, ya que, es el grupo común al N-picolinoilimidazol (I), molécula objeto de este estudio.

En la Tabla 3.3, se muestran los valores de $\Delta\delta_{\text{obs}}$ (en valor absoluto), estos valores decrecen en el siguiente orden $C_T > C_\alpha > H_1 > H_3 > H_2$. En el proceso de análisis de los resultados experimentales, $\Delta\delta_{\text{obs}}$, podemos considerar que la cadena alquílica está situada en el interior de la cavidad hidrofóbica del CB7, y los protones del grupo imidazol también se encuentran significativamente afectados de mayor a menor magnitud (en valor absoluto), siguiendo este orden: H_1, H_3 y, por último, el H_2 .

Tabla 3.3 : Variación de los desplazamientos químicos del 1-Butilimidazol, en ausencia y presencia de CB7.

Espectro ^1H	H_1	H_2	H_3	C_α	C_T
1-Butilimidazol	7.04	7.20	7.72	4.06	0.91
1-Butilimidazol+CB7	6.54	7.07	7.42	3.37	0.02
$\Delta\delta = \delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}$	-0.5	-0.13	-0.3	-0.69	-0.88

A partir de la magnitud de los valores obtenidos para la variación de los desplazamientos químicos observados ($\Delta\delta_{\text{obs}}$), es posible obtener información sobre la estructura del complejo de inclusión, CB7:1-Butilimidazol. Se observa una variación en todas las señales del *guest* a campo alto ($\Delta\delta < 0$), por tanto, podemos decir que se forma un complejo 1:1, CB7:1-Butilimidazol (Esquema 3.4).



Esquema 3.4

3.3.6 Caracterización estructural de los complejos formados por CB7 y 1-Butilimidazol, en presencia de acetonitrilo

3.3.6.1 Análisis de los espectros de ^1H RMN

Influencia del % de acetonitrilo en la formación del complejo CB7:1-Butilimidazol

En los estudios con el N-picolinoilimidazol (I), debido a su inestabilidad y baja solubilidad en agua, se trabajó con mezclas de acetonitrilo/agua. De modo a simular las mismas condiciones experimentales, realizamos los experimentos de ^1H RMN con el 1-Butilimidazol (II) igualmente en mezclas de acetonitrilo/agua.

En la Figura 3.15, se muestran los desplazamientos químicos de ^1H RMN, para las señales de 1-Butilimidazol en presencia de CB7, variando el porcentaje de acetonitrilo en cada experimento realizado. Como se puede observar, en los espectros de ^1H RMN, donde se mantiene constante la concentración de $[\text{CB7}] = 2 \text{ mM}$ y $[\text{1-Butilimidazol}] = 1 \text{ mM}$, y solo cambia el porcentaje de acetonitrilo, se producen alteraciones en los desplazamientos químicos al aumentar el porcentaje de acetonitrilo en el medio.

Si nos fijamos en los cambios observados para las señales del *guest* (II) en relación a la cavidad del CB7, observamos que a medida que aumenta el porcentaje de acetonitrilo, los desplazamientos químicos observados para los protones, presentan en mayor o menor magnitud un desplazamiento hacia campo bajo ($\Delta\delta > 0$).

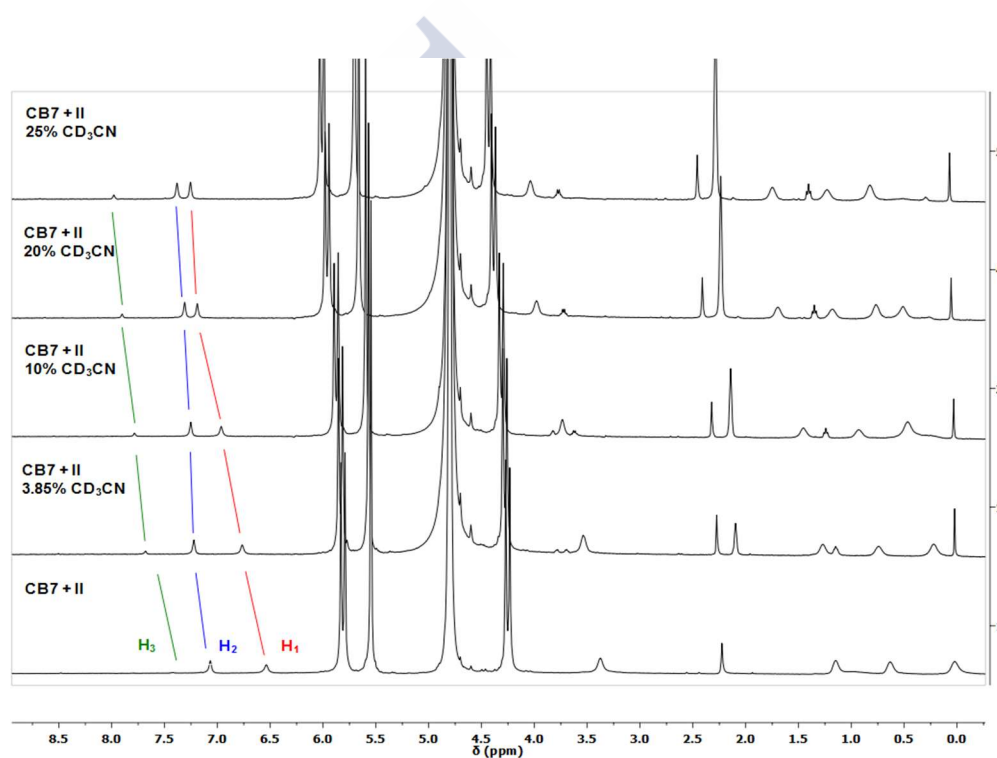


Figura 3.15 : Espectros de ^1H RMN del $[\text{1-Butilimidazol (II)}] = 1 \text{ mM}$ y $[\text{CB7}] = 2 \text{ mM}$ en ausencia y presencia de distintos porcentajes de acetonitrilo (CD_3CN).

En la Tabla 3.4, se encuentran los valores de los desplazamientos químicos de los protones del grupo imidazol para el 1-Butilimidazol (H_1 , H_2 y H_3), cuya parte es similar a la del N-picolinoilimidazol (I), donde se observa un desplazamiento hacia campo bajo ($\Delta\delta > 0$), y como mencionamos anteriormente, este efecto puede ser provocado por el desapantallamiento por los grupos carbonilo, situando los protones del *guest* (II) en la proximidad de los oxígenos carbonílicos.

Tabla 3.4 : Desplazamientos químicos inducidos por CB7 al aumentar del porcentaje de acetonitrilo ($\Delta\delta$), en los espectros ^1H RMN de los protones del grupo imidazol (H_1 , H_2 y H_3), en los protones adyacentes al N ($\text{C}\alpha$) y en los protones terminales (C_T).

[CB7:1-Butilimidazol] %Acetonitrilo	H_1	H_2	H_3	$\text{C}\alpha$	C_T
0	6.54	7.07	7.42	3.37	0.02
3.85	6.74	7.20	7.66	3.51	0.20
10	6.93	7.22	7.75	3.70	0.43
20	7.13	7.25	7.85	3.92	0.71
25	7.18	7.31	7.91	3.97	0.75
$\Delta\delta$ (ppm)	0.64	0.24	0.49	0.60	0.73

Por tanto, a medida que aumentamos el porcentaje de acetonitrilo la formación de complejo 1:1 (CB7:1-Butilimidazol) se ve afectada. De modo a concretar más la información, realizamos el estudio ^1H RMN en ausencia de CB7, para conocer el comportamiento del *guest* (II) con los distintos porcentajes de acetonitrilo.

Influencia del % de acetonitrilo en 1-Butilimidazol

En la Figura 3.16, se muestran los espectros de ^1H RMN del 1-Butilimidazol en presencia de los distintos porcentajes de acetonitrilo. Tal como se puede observar, al aumentar el porcentaje de acetonitrilo en los experimentos, se producen alteraciones en los desplazamientos químicos hacia campo bajo ($\Delta\delta > 0$).

En la Tabla 3.5, se encuentran los valores de los desplazamientos químicos de los protones del grupo imidazol (H_1 , H_2 y H_3), cuya parte es similar a la del N-picolinoilimidazol (I), donde se observa un desplazamiento hacia campo bajo ($\Delta\delta > 0$). Por tanto, todas las señales se ven afectadas en mayor o menor magnitud por el aumento del porcentaje de acetonitrilo.

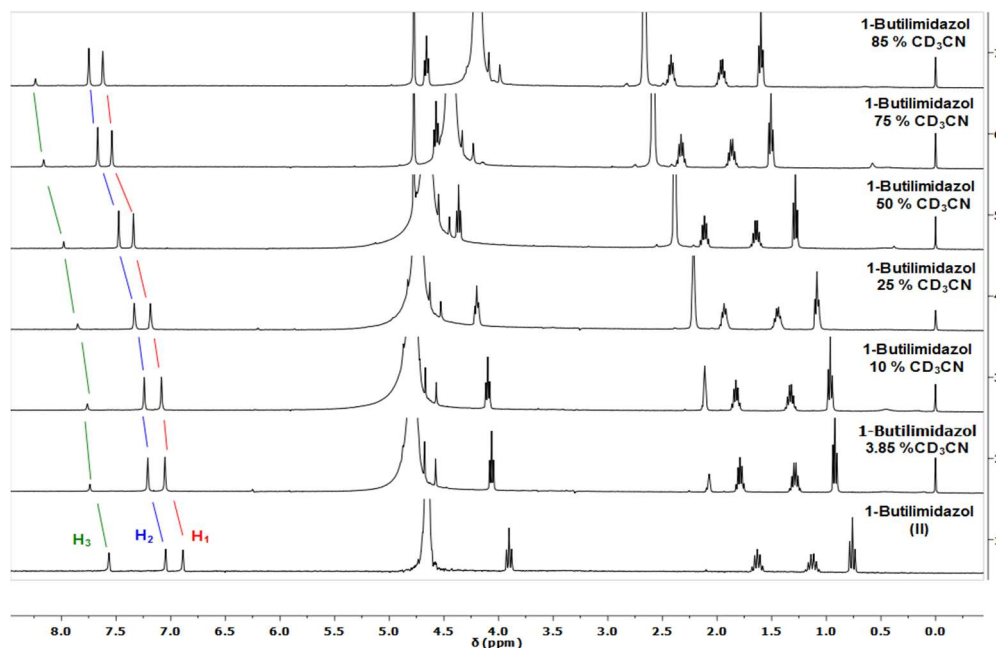


Figura 3.16 : Espectros de ^1H RMN del [1-Butylimidazol (II)]= 2mM en ausencia y presencia de distintos porcentajes de CD_3CN .

Tabla 3.5 : Desplazamientos químicos del 1-Butylimidazol (II) inducidos al aumentar del porcentaje de acetonitrilo ($\Delta\delta$), en los espectros ^1H RMN de los protones del grupo imidazol (H_1 , H_2 y H_3), en los protones adyacentes al N (C_α) y en los protones terminales (C_τ).

[1-Butylimidazol] %Acetonitrilo	H_1	H_2	H_3	C_α	C_τ
0	7.04	7.20	7.72	4.06	0.91
3.85	7.05	7.21	7.74	4.06	0.92
10	7.09	7.24	7.76	4,10	0.96
25	7.19	7.33	7.85	4.20	1.09
50	7.34	7.48	7.98	4.37	1.28
75	7.54	7.67	8.16	4.57	1.51
85	7.62	7.75	8.24	4.66	1.60
$\Delta\delta$ (ppm)	0.54	0.55	0.52	0.60	0.69

En ambos estudios, los valores para los desplazamientos químicos del *guest* (1-Butylimidazol) en ausencia y presencia del CB7, variando el porcentaje de acetonitrilo, siguen la misma tendencia se desplazan hacia campo bajo ($\Delta\delta > 0$).

Por tanto, el porcentaje de acetonitrilo tiene un papel importante en la formación del complejo *host:guest*. Para explicar el comportamiento observado, en la Figura 3.17 se

representan los valores de los desplazamientos químicos de las señales del 1-Butilimidazol (H_1 , H_2 y H_3) en presencia (ver Tabla 3.4) y ausencia de CB7 (ver Tabla 3.5), variando en ambos casos el mismo porcentaje de acetonitrilo.

Los valores de los desplazamientos químicos del (II) en presencia de CB7 son menores que en ausencia del mismo, pero a medida que aumentamos el porcentaje de acetonitrilo, los valores de los desplazamientos químicos en presencia de CB7 van aumentando hasta alcanzar los valores en ausencia de CB7.

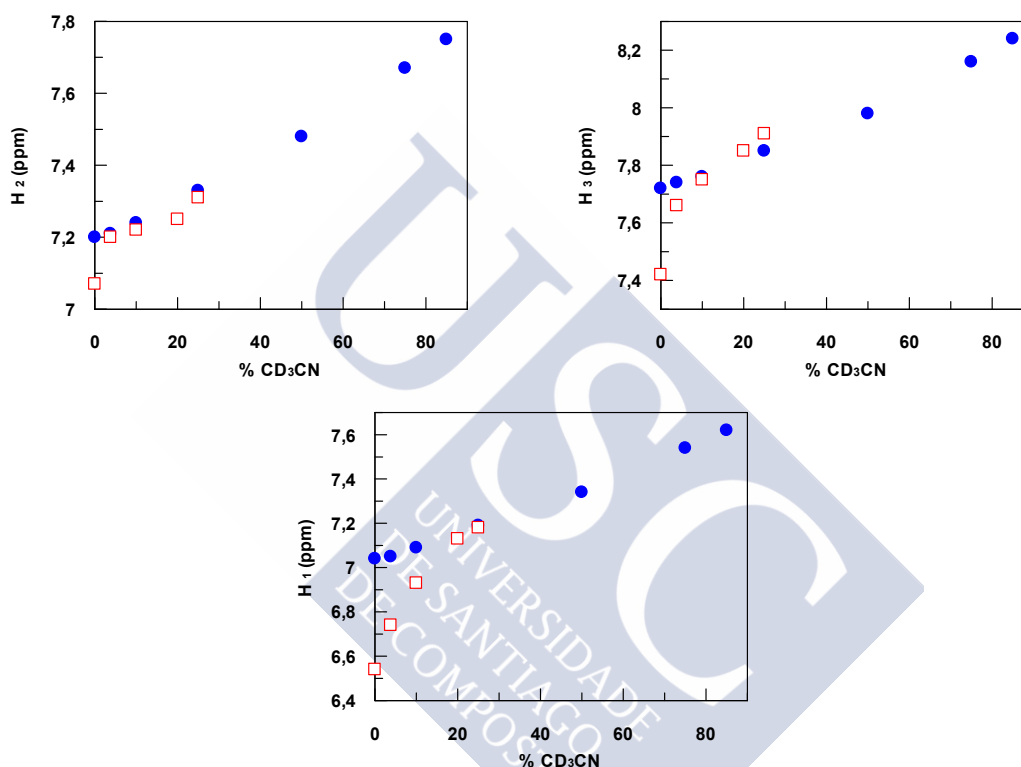


Figura 3.17 : Representación gráfica de los valores de los desplazamientos químicos para el grupo imidazol del 1-Butilimidazol (H_1 , H_2 y H_3), comparándolos en ausencia (●) y presencia de CB7 (□), variando el porcentaje de acetonitrilo (CD_3CN).

Como podemos observar en las gráficas, el valor para el H_2 es el primero en igualar el valor del desplazamiento químico en ausencia de CB7 con un 3.85% de acetonitrilo, seguido del H_3 que lo iguala con un 10% de acetonitrilo; y por último, el H_1 con aproximadamente un 20% de acetonitrilo. Este comportamiento indica que a medida que aumenta el porcentaje de acetonitrilo, estos protones se encuentran cada vez más fuera de la cavidad, expuestos al medio exterior.

Sin embargo, para el carbono adyacente al nitrógeno (C_α) y el carbono terminal (C_T) del 1-Butilimidazol, comparándolos en ausencia y presencia de CB7, variando el porcentaje de acetonitrilo (Figura 3.18), se observa que los valores de los desplazamientos

químicos de estas señales en presencia de CB7 son más bajos que los observados en ausencia de CB7, y no se logra alcanzar los mismos valores de los desplazamientos. Este comportamiento sugiere que puede existir interacción entre los protones del carbono adyacente al nitrógeno (C_α) y los protones del carbono terminal (C_T) del 1-Butilimidazol, con el CD_3CN en el interior de la cavidad del CB7.

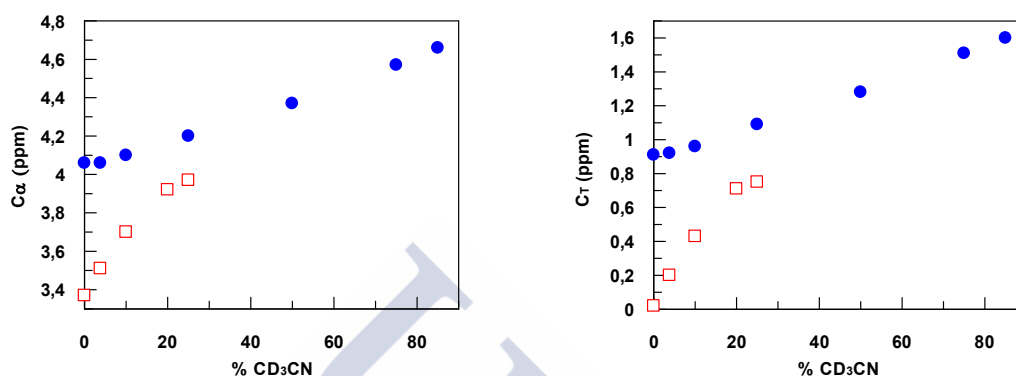
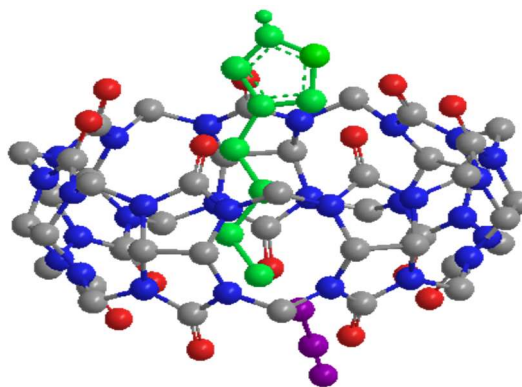


Figura 3.18 : Representación gráfica de los valores de los desplazamientos químicos para el C_α y el C_T del 1-Butilimidazol, comparándolos en ausencia (●) y presencia de CB7 (□), variando el porcentaje de acetronitrilo (CD_3CN).

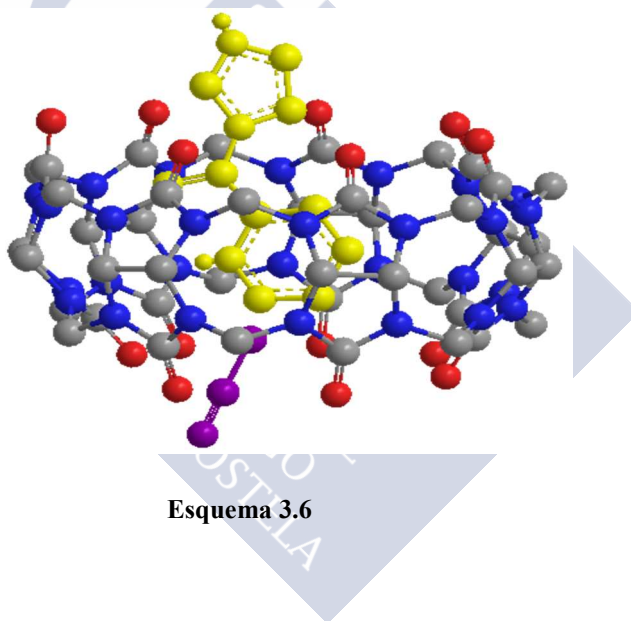
En presencia y ausencia de CB7, con determinados porcentajes de acetronitrilo, los valores de los desplazamientos químicos de los protones H_1 , H_2 y H_3 se igualan y para los protones de C_α y C_T no se logra alcanzar los mismos valores de los desplazamientos. Este comportamiento indica que los protones H_1 , H_2 y H_3 se encuentran fuera de la cavidad, expuestos al medio exterior, mientras que los protones de C_α y C_T se encuentran, posiblemente compartiendo la cavidad del CB7 con el acetronitrilo.

Por tanto, a partir de este estudio de 1H RMN podemos concluir que el acetronitrilo podrá formar parte del complejo 1:1 (CB7:1-Butilimidazol), dando lugar a un complejo triple 1:1:1 (CB7:1-Butilimidazol: CD_3CN) Esquema 3.5.



Esquema 3.5

Con estos resultados obtenidos para el 1-Butilimidazol, y extrapolando el mismo comportamiento para el N-picolinoilimidazol, podremos explicar los resultados obtenidos en la hidrólisis del (I) en presencia de diferentes porcentajes de acetonitrilo. Como mencionamos previamente, en ausencia de CB7 la constante de velocidad disminuye a medida que aumenta el porcentaje de acetonitrilo, mientras que en presencia de CB7 ocurre totalmente lo contrario, se produce un aumento de la constante de velocidad observada. Esto puede deberse a que el acetonitrilo se introduce en la cavidad del CB7 y hace que el N-picolinoilimidazol, encapsulado en el interior del macrociclo, se desplace hacia el exterior a medida que aumenta el porcentaje de acetonitrilo, situándolo próximo de los portales del CB7 y haciéndolo más accesible al ataque del agua, produciéndose un aumento de la constante de velocidad observada para la hidrólisis del N-picolinoilimidazol (Esquema 3.6).



3.4 Conclusión

Los resultados obtenidos en el estudio de las reacciones de hidrólisis del N-picolinoilimidazol (I) en presencia de CB7, con distintos porcentajes de acetonitrilo, muestran una aceleración de la velocidad de reacción. El aumento producido en la constante de velocidad observada (k_{obs}), nos hizo plantear varias hipótesis para poder explicarlo: por una parte se realizaron estudios de la influencia del pH para descartar una posible interacción entre el sustrato (I) con acetonitrilo, obteniéndose que el cambio de pK_a fue insignificante; por otro lado se estudió la posible interacción del CB7 con

acetonitrilo, ayudándonos de un indicador, 4-Anilina, obteniéndose que el CH_3CN puede ser complejoado por el macrociclo.

Gracias a la utilización de una molécula análoga, 1-Butilimidazol (II), pudimos confirmar la formación del complejo 1:1 (CB7:1-Butilimidazol) y también la formación del complejo triple 1:1:1 (CB7:1-Butilimidazol: CD_3CN), a partir del cual extrapolamos los resultados para el caso del sustrato (I).

Los resultados obtenidos por ^1H RMN nos permitieron proponer la formación del complejo 1:1:1 (CB7:N-picolinoilimidazol: CD_3CN), además de su estructura, y así lograr explicar el aumento de la velocidad de reacción a medida que se aumenta el porcentaje de acetonitrilo en el medio de reacción, en presencia de CB7.



3.5 Bibliografía

- (1) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844–4870.
- (2) Isaacs, L. *Chem. Commun. (Camb)*. **2009**, *6*, 619–629.
- (3) Assays, T. F.; Marquez, C.; Huang, F.; Nau, W. M. *IEEE Trans. Nanobiosci.* **2004**, *3*, 39–45.
- (4) Breslow, R.; Dong, S. D. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1997–2012.
- (5) Chen, J.; Körner, S.; Craig, S. L.; Rudkevich, D. M.; Rebek, Jr., J. *Nature* **2002**, *415*, 385–386.
- (6) Mock, W. L.; Irra, T. a; Wepsiec, J. P.; Adhya, M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5302–5308.
- (7) R. Behrend, E. Meyer, F. R. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1905**, *339*, 1–37.
- (8) Freeman, W. A.; Mock, W. L.; Shih, N. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7367–7368.
- (9) Basilio, N.; García-Río, L.; Moreira, J. A.; Pessêgo, M. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 848–855.
- (10) Dsouza, R. N.; Nau, W. M. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2595–2598.
- (11) Fife, T. H.; Przystas, T. J. *Society* **1985**, *9*, 1041–1047.
- (12) Fife, T. H.; Pujari, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4631–4636.
- (13) Jencks, W. P. *Science.* **1969**, *168*, 1080–1081.
- (14) Jencks, P.; Carriuolo, J. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 1272–1279.
- (15) Jencks, W. P.; Carriuolo, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 1778–1786.
- (16) Walba, H.; Isensee, R. W. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2789–2791.
- (17) Fife, T. H. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 325–331.
- (18) Jacob F. Patterson, William P. Huskey, J. L. H. *J. Org. Chem* **1980**, *45*, 4675–4679.
- (19) Reboud-ravaux, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1039–1046.
- (20) Ernest Alexander Braude; Frederick C Nachod; William Dale Phillips. *Acad. Press. New York* **1955**.
- (21) Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H. J.; Kim, K. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 621–630.
- (22) Kim, K. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 96–107.
- (23) Kim, K.; Selvapalam, N.; Ko, Y. H.; Park, K. M.; Kim, D.; Kim, J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 267–279.
- (24) Mock, W. L. *Arch. Gen. Psychiatry* **1995**, *175*, 1416–1418.

4 Nanopartículas supramoleculares derivadas de Cucurbit[7]urilo y Surfactantes zwitteriónicos

4.1 Introducción

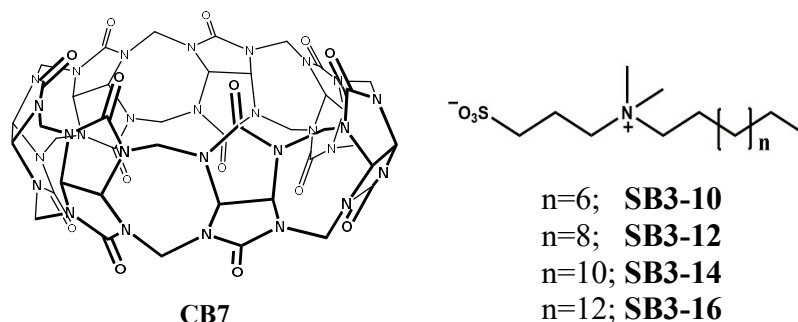
La química supramolecular contempla la agregación de unidades moleculares en arquitecturas bien definidas, a través de interacciones no covalentes específicas que permiten el diseño de nuevos materiales como las nanopartículas supramoleculares (SNPs)¹⁻⁵. Las nanopartículas supramoléculas (SNPs) son partículas en las que múltiples copias de diferentes bloques de construcción se unen mediante interacciones no covalentes específicas, dando lugar a estructuras que son típicamente más grandes que los propios bloques de construcción. En este contexto, es de gran interés la construcción controlada de estructuras y materiales a nanoescala, con formas y dimensiones bien definidas a partir de componentes moleculares. Estas SNPs presentan varias ventajas tales como el control del tamaño, agregación/desagregación controlada, carácter modular y fácil incorporación de agentes de formación de imágenes o ligandos de orientación. Debido a que los desencadenantes externos pueden inducir la desagregación selectiva de los sistemas supramoleculares, se investigan las nanocápsulas sensibles a los estímulos donde sus propiedades, como el tamaño, la forma y sus interacciones pueden ser cambiadas por un desencadenante externo⁶⁻⁸.

Las nanopartículas supramoleculares a base de ciclodextrina o hidrogeles, se han explorado a fondo para desarrollar diversos materiales biomédicos^{4,9-14}. Se han desarrollado sistemas supramoleculares de autoagregación basados en ciclodextrinas que responden al pH,^{15,16} luz,¹⁷⁻²⁰ voltaje,²¹ enzimas,²² lectinas,²³ o multiestímulos²⁴⁻²⁶, mostrando su potencial como sistemas de liberación inteligente. Se han investigado distintos enfoques para las SNP basadas en la CD, con el fin de terminar la red supramolecular multivalente, evitando así el crecimiento continuo de las partículas y su agregación debido a interacciones multivalentes atractivas. Se ha usado para este fin, el poli(etilenglicol) terminado en un grupo adamantilo como stopper para evitar el continuo

crecimiento de las partículas debido a las fuerzas electrostáticas^{9,27-29}. A pesar de la importancia de las SNPs, poco se sabe sobre las interacciones electrostáticas, las interacciones *host:guest* y las influencias estéricas en el control del tamaño y estabilidad de las partículas.

Además del sistema Ad-CD, hay una gran variedad de unidades de reconocimiento molecular disponibles en química supramolecular, sin embargo, pocas de estas han sido utilizadas para la preparación de SNPs ajustables en tamaño. Los sulfonatocalixarenos (SCn), son conocidos como buenos receptores supramoleculares en agua, y se han utilizado con el fin de obtener arquitecturas de autoagregación. Su interacción con surfactantes catiónicos promueve la formación de micelas supramoleculares^{30,31} y vesículas³²⁻³⁴, así como la transición de micela a vesícula. Recientemente se ha demostrado su capacidad para formar SNPs estables y monodispersas³⁵⁻³⁷. La formación de un complejo *host:guest* estable es el paso preliminar para la preparación de SNPs. Los cucurbiturilos (CBn)³⁸, con constantes de equilibrio hasta un nivel de 10^{18} , son receptores prometedores para la preparación de SNPs³⁹. El gran tamaño de la cavidad de los cucurbiturilos, CB8, les permite la capacidad de formar complejos 1:2, asistida por naphthol-viologen dando complejos de transferencia de carga⁴⁰. Utilizando estos complejos ternarios supramoleculares o similares, se han preparado distintas nanopartículas y microestructuras⁴¹ basadas en CB8⁴²⁻⁴⁴, dependiendo del tiempo y de la temperatura. En estos estudios se ha concluido que se necesitan complejos de transferencia de carga para formar SNPs utilizando CB8, mientras que el CB7 es ineficaz para la preparación de SNPs.

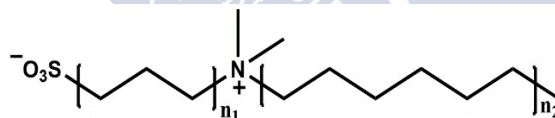
En este capítulo se muestra la formación de las SNPs utilizando el cucurbit[7]uril (CB7) y los surfactantes zwitteriónicos (sulfobetainas)⁴⁵ (Esquema 4.1). Las SNPs obtenidas son estables, con un tamaño y carga bien definidos, capaces de transportar un *guest* solubilizado, que puede ser liberado por disociación reversible de nanopartículas tras la adición de un *guest* externo. La gran simplicidad de la preparación de estas SNPs, además de la biocompatibilidad del CB7 y la sulfobetaina, permiten un amplio campo de aplicaciones.



Esquema 4.1

4.2 Sección Experimental

Materiales. Todos los reactivos comerciales fueron adquiridos con la máxima pureza disponible y sin posteriores purificaciones. Excepto para el CB7 que fue sintetizado, de acuerdo con el procedimiento descrito en la bibliografía⁴⁶ y mostrado en el capítulo 3. Los surfactantes zwitteriónicos (sulfobetainas) utilizados en este estudio, nos permitieron variar la longitud de la cadena alquílica ($n_2 = 10-16$) y también la longitud del espaciador ($n_1 = 3-6$) entre ambas cargas (Esquema 4.2).



Esquema 4.2

Estudio espectrofotométrico. El sustrato *trans*-4-[4-(dimetilamino)-estiril]-1-metilpiridinio (DSMI⁺), que se utilizó como sustrato competidor, se preparó en agua Milli-Q. En todos los casos estudiados, la concentración de DSMI⁺ se mantuvo constante en 1.17×10^{-5} M. Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro Cary UV-Vis a 25°C.

Experimentos de RMN. Las disoluciones madre se prepararon en D₂O. Los espectros de ¹H RMN y los bidimensionales TCOSY fueron registrados en el espectrómetro Varian Inova 700. Los sistemas mixtos CB7/sulfobetaina se prepararon mezclando los volúmenes apropiados de las disoluciones madre de CB7 y sulfobetaina en cada caso.

Tensión Superficial. La tensión superficial (σ) de las muestras fue medida con un tensiómetro Krüss K-11 usando la técnica de placa de Wilhelmy. Se ha utilizado una placa comercial de platino suministrada por Krüss. Los valores presentados son el promedio de veinte medidas registradas en intervalos de 10 segundos, comprobándose que la tensión superficial se mantiene constante con el tiempo.

DLS (Dynamic Light Scattering).¹ La difusión dinámica de luz láser se realizó utilizando un goniómetro ALV SP-86, un correlacionador ALV 5000 Multi-tau y un láser semiconductor bombeado ópticamente Coherent Sapphire, operando a una longitud de onda de 488 nm y a una potencia de 200 mW. Las muestras fueron filtradas con ayuda de filtros de membrana de 25 mm MF-Millipore con tamaño de poro de 0.45 μm . Las funciones de correlación se acumularon durante 300 s y se analizaron con el software ALV Correlator (ALV-5000 / E versión 3.0) basado en el algoritmo CONTIN adaptado al ruido del correlador específico. La temperatura se fijó a 25°C. Los espectros de tiempo de relajación logarítmicamente muestreada (amplitud vs. $\log(\tau)$) se obtuvieron de la inversión CONTIN de las funciones de correlación normalizados. Suponiendo medición homodina, se obtuvo la distribución de difusividades o coeficientes de difusión aplicando la relación $D = 1/(q^2 \tau)$, y se transformó utilizando la relación de Stokes-Einstein, con el fin de obtener el radio hidrodinámico $R_H = kTq^2 \tau / 6\pi\eta_0$, donde k es la constante de Boltzmann, η_0 es la viscosidad del disolvente, n es el índice de refracción a la temperatura T , y $q = (4\pi n/\lambda) \cdot \text{sen}(\theta/2)$ es el vector de dispersión en función de la longitud de onda en el vacío, λ , y el ángulo de dispersión θ . Las mediciones se realizaron a diferentes ángulos entre 30° y 150° con incrementos de 15°.

Los diámetros hidrodinámicos de las micelas de SB3-16 y de las nanopartículas formadas por CB7/SB3-16 se determinaron con un aparato de Malvern-ZetaSizer (Nano ZS90), que utiliza la dispersión dinámica de la luz en un ángulo de dispersión de 90° para medir el tamaño de partícula. Esta técnica mide la difusión de partículas en movimiento Browniano, y convierte este valor a tamaño y a una distribución de tamaño utilizando la relación de Stokes-Einstein. Las mediciones se realizaron en modo automático a 25°C y se evaluaron con un estándar gaussiano.

¹ Las medidas de DLS han sido realizadas en la Universidad de Santiago de Compostela, en colaboración con el Profesor Carlos Vázquez Vázquez.

Potencial Zeta. Las medidas de Potencial Z se realizaron con la ayuda del aparato de Malvern-ZetaSizer (Nano ZS90). Para medir el Potencial Z se utiliza la técnica de microelectroforesis de láser de Doppler. Se aplica un campo eléctrico a una disolución de moléculas o a una dispersión de partículas, que hace que se muevan a una velocidad que está relacionada con el Potencial Z. Las mediciones se realizaron en modo automático a 25°C.

Cryo-TEM. En estos experimentos hemos utilizado una película de soporte Holey Carbon sobre una rejilla de cobre de malla 400. Después de la descarga lumínica para hacer hidrófila la película de carbono, se depositó una gota de 3 μl de la muestra sobre la rejilla. A continuación, la rejilla se montó en un émbolo (Leica EM-CPC) y se secó con un papel de filtro Whatman No.1. La suspensión acuosa que contenía exosomas se vitrificó inmediatamente mediante inmersión rápida en etano líquido. La rejilla con las muestras vitrificadas se montó en un sistema de crio-transferencia de Gatan 626 y se insertó en el microscopio. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio crio-electrónico Jeol JEM 2011 operando a 200 kV, bajo condiciones de dosis bajas, y utilizando diferentes grados de desenfoque (500-900 nm) para obtener un contraste de fase adecuado. Las imágenes fueron grabadas con una cámara Gatan Ultrascan US1000 CCD y fueron adquiridas y analizadas con el Digital Micrograph 1.8.

Carboxifluoresceína. 5(6)-carboxifluoresceína (CF) fue suministrada por Aldrich. La homogeneización del tamaño de las nanopartículas para estudios de encapsulación con CF se realizó con un Mini-Extruder de Avanti Polar Lipids (tamaño de poro 200 nm). Para los estudios de encapsulación molecular de las SNPs se mezclaron volúmenes iguales de 0.5 mL de CB7 (3 mM CB7, 50 mM CF, 10 mM Tris, pH 7.4) y 0.5 mL de SB3-16 (3 mM SB3-16, 50 mM CF, 10 mM Tris, pH 7.4). Estas disoluciones madre dan un volumen total de 1 mL (1.5 mM de CB7, 1.5 mM de SB3-16, 50 mM de CF, 10 mM de Tris, pH 7.4). El tamaño de la suspensión de las nanopartículas obtenido se homogeneizó mediante extrusiones (15x) con un Mini-Extruder a través de una membrana de policarbonato (tamaño de poro, 200 nm). El colorante (CF) no encapsulado se eliminó por filtración en gel (Sephadex G-50) con Tris 10 mM, pH 7.4. Las condiciones finales son: \sim 1.5 mM de CB7 y 1.5 mM de SB3-16; dentro de las nanopartículas: 50 mM CF, Tris 10 mM, pH 7.4; condiciones exteriores del buffer: Tris 10 mM, pH 7.4.

4.3 Resultados y Discusión

En este trabajo se realizaron cuatro estudios de distinto nivel: (i) Análisis del complejo *host:guest* formado por CB7 y diferentes sulfobetáinas, mediante la caracterización de sus constantes de equilibrio y estructura; (ii) Estudio del efecto del CB7 sobre la agregación de sulfobetáinas en forma de micelas; (iii) Caracterización de las SNPs, con especial énfasis en la capacidad de ensamblaje/desensamblaje y (iv) el uso de las SNPs para la solubilización y liberación de fármacos tras la desagregación de las SNPs.

4.3.1 Formación de los complejos *host:guest* entre las Sulfobetáinas y CB7

4.3.1.1 Determinación de las constantes de equilibrio entre el CB7 y las Sulfobetáinas

La característica común de todos los surfactantes utilizados en el presente estudio es su capacidad para autoagregarse formando micelas, con una concentración crítica micelar (cmc) que varían desde 1.3×10^{-2} M a 2×10^{-5} M al aumentar la longitud de la cadena alquílica (ver Tabla 1). Los estudios de complejación con el cucurbiturilo deben realizarse en sistemas muy diluidos, para evitar que la micelización sea un proceso competitivo. Las metodologías experimentales disponibles para este estudio excluyen el uso de las titulaciones de ITC y RMN, por lo que se realizó el estudio mediante el desplazamiento de una sonda.

Los valores de las constantes de equilibrio entre el CB7 y las sulfobetáinas se determinaron a través de experimentos competitivos, utilizando como sustrato competidor el *trans*-4-[4-(dimetilamino)-estiril]-1-metilpiridinio (DSMI⁺). La complejación inicial de DSMI⁺ se puede detectar mediante espectroscopia UV-Vis. En la Figura 4.1 se muestra la influencia del CB7 sobre los espectros de absorción de DSMI⁺ en ausencia de sulfobetáinas. El DSMI⁺ tiene un máximo de absorción centrado a 444 nm en disolución acuosa y se puede observar que el pico máximo de absorción disminuye a medida que aumenta la concentración del CB7, debido a su inclusión en la cavidad del macrociclo. El aumento de la absorción a 330 nm se debe a la protonación del DSMI⁺ ($pK_a = 3.1$) como resultado de su inclusión en la cavidad del CB7. La protonación inducida

por el CB7 a pH neutro, está bien documentada en la bibliografía permitiendo que el pK_a se desplace hasta 4 unidades⁴⁷.

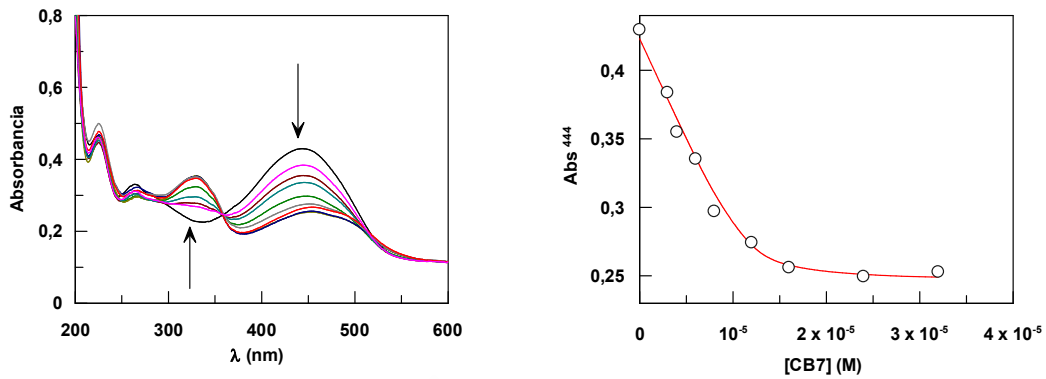
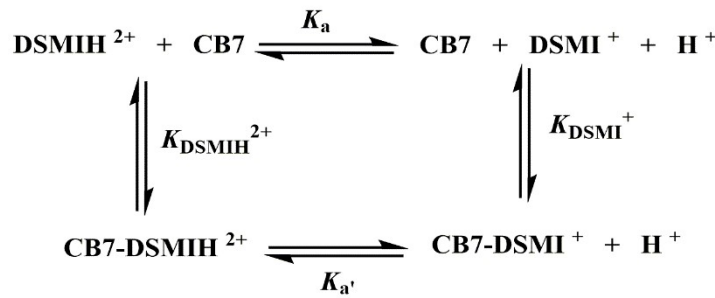


Figura 4.1 : (Izquierda) Influencia de la concentración de CB7 en el espectro de absorción del $[DSMI^+] = 1.17 \times 10^{-5}$ M. (Derecha) Representación de la influencia de la concentración de CB7 en la absorbancia del $DSMI^+$ para $\lambda = 444$ nm. La línea representa el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación (4.3). Las medidas fueron realizadas a pH neutro y a 25°C .

Teniendo en cuenta que el $DSMI^+$ está presente en su forma monocatiónica, tanto en el agua como en la cavidad del CB7, y como estructura dicatiónica justamente dentro de la cavidad (los experimentos se realizan a pH neutro), proponemos el siguiente modelo (Esquema 4.3):



Esquema 4.3

Estas consideraciones, implican que la ecuación para la absorbancia determinada experimentalmente a una longitud de onda específica, A_{obs} , se expresa como un promedio de las especies que absorben en el medio, y se puede expresar como:

$$\begin{aligned}
 A_{obs} = & \varepsilon^{DSMI^+} [DSMI^+] + \varepsilon^{DSMIH^{2+}} [DSMIH^{2+}] + \varepsilon^{CB7-DSMI^+} [CB7 - DSMI^+] \quad (4.1) \\
 & + \varepsilon^{CB7-DSMIH^{2+}} [CB7 - DSMIH^{2+}]
 \end{aligned}$$

Considerando la protonación del $DSMI^+$ en el complejo de inclusión y que el pH del medio es 7, la especie protonada de $DSMIH^{2+}$ se puede despreciar en ausencia de CB7.

$$A_{obs} = \varepsilon^{DSMI^+} [DSMI^+] + \varepsilon^{CB7-DSMI^+} [CB7 - DSMI^+] + \varepsilon^{CB7-DSMIH^{2+}} [CB7 - DSMIH^{2+}] \quad (4.2)$$

La A_{obs} (ecuación (4.2)) se puede expresar en términos de constantes de equilibrio y de concentraciones totales de CB7 y $DSMI^+$ (ecuación (4.3)).

$$A_{obs} = \frac{A + B[CB7]}{1 + K_{app}[CB7]} \quad (4.3)$$

Donde:

$$A = \varepsilon^{DSMI^+} [DSMI^+]_T \quad (4.4)$$

$$B = [DSMI^+]_T \left(\varepsilon^{CB7-DSMI^+} K_{DSMI^+} + \frac{\varepsilon^{CB7-DSMIH^{2+}} [H^+] K_{DSMIH^{2+}}}{K_a} \right) \quad (4.5)$$

$$K_{app} = K_{DSMI^+} + \frac{K_{DSMIH^{2+}} [H^+]}{K_a} \quad (4.6)$$

El ajuste de la ecuación (4.3) a los datos experimentales de la Figura 4.1-derecha, se efectuó atribuyendo varios valores de K_{app} , considerando como valor óptimo para la constante, el valor con que se obtuvo un mínimo en desviación estándar (χ^2) del ajuste. A partir de este método, se obtuvo como valor óptimo para la constante de equilibrio aparente, $K_{app} = (4.5 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Con el fin de obtener la constante de equilibrio entre las distintas sulfobetaínas y el CB7 se llevaron a cabo ensayos de desplazamiento. La influencia del CB7 en el espectro de absorción del $DSMI^+$ también se estudió en presencia de las sulfobetaínas, con diferentes longitudes de la cadena alquílica (SB3-10, SB3-12, SB3-14 y SB3-16).

En la Figura 4.2 se muestra, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para el SB3-14. La banda de absorción centrada a 444 nm aumenta con la adición de sulfobetaína,

debido a que se produce el desplazamiento del $DSMI^+$ al agua desde la cavidad del cucurbiturilo.

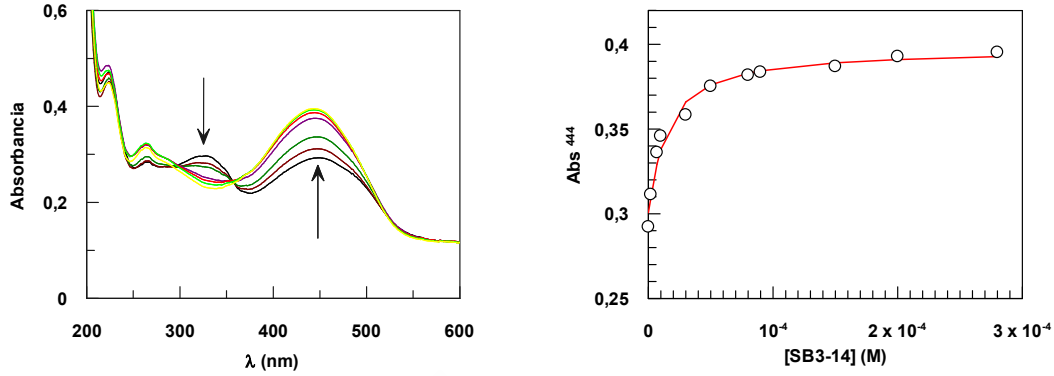


Figura 4.2 : (Izquierda) Influencia de la concentración de SB3-14 en el espectro de absorción del $DSMI^+$ en presencia de CB7. (Derecha) Representación de la influencia de la concentración de SB3-14 en la absorbancia del $DSMI^+$ para $\lambda = 444$ nm en presencia de CB7. La línea representa el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación (4.3). $[CB7] = 1.2 \times 10^{-5}$ M; $[DSMI^+] = 1.17 \times 10^{-5}$ M. Las medidas fueron realizadas a pH neutro y a 25°C .

El análisis de los resultados experimentales se realizó de acuerdo a un modelo competitivo. Para resolver la ecuación (4.3) en este caso, es necesario conocer la concentración de CB7 libre, $[CB7]_f$, para cada concentración de sulfobetaína. La concentración de CB7 libre, se puede determinar a través de un proceso de simulación, donde se considera que los complejos formados entre el surfactante y el CB7 presentan una estequiometría 1:1. Las constantes de equilibrio establecidas para el CB7 con el $DSMI^+$ y para los monómeros de surfactante ($S = SB3-14$) se expresan como:

$$K_{DSMI^+} = \frac{[CB7-DSMI^+]}{[CB7][DSMI^+]} \quad K_{DSMIH^{2+}} = \frac{[CB7-DSMIH^{2+}]}{[CB7][DSMIH^{2+}]} \quad K_a = \frac{[DSMI^+][H^+]}{[DSMIH^{2+}]} \quad (4.7)$$

$$K_a = \frac{[CB7-DSMI^+][H^+]}{[CB7-DSMIH^{2+}]} \quad K_{1:1} = \frac{[CB7-S]}{[S][CB7]}$$

El balance de materia para las concentraciones totales de CB7, $DSMI^+$ y surfactante (SB3-14) viene dado por:

$$[S]_T = [S] + [CB7 - S] \quad (4.8)$$

$$[DSMI^+]_T = [DSMI^+] + [CB7 - DSMI^+] + [CB7 - DSMIH^{2+}] \quad (4.9)$$

$$[CB7]_T = [CB7] + [CB7 - DSMI^+] + [CB7 - DSMIH^{2+}] + [CB7 - S] \quad (4.10)$$

Combinando las ecuaciones de las constantes de equilibrio y los balances de materia, obtenemos una ecuación de tercer grado para la determinación de la concentración de CB7 libre:

$$a[CB7]_f^3 + b[CB7]_f^2 + c[CB7]_f + d = 0 \quad (4.11)$$

Donde:

$$a = K_{app}K_{1:1} \quad (4.12)$$

$$b = K_{1:1} + K_{app} + K_{1:1}K_{app}([DSMI^+]_T + [S]_T - [CB7]_T) \quad (4.13)$$

$$c = K_{app}([DSMI^+]_T - [CB7]_T) + K_{1:1}([S]_T - [CB7]_T) + 1 \quad (4.14)$$

$$d = -[CB7]_T \quad (4.15)$$

La ecuación (4.11) se resolvió para distintos valores de $K_{1:1}$, obteniendo $[CB7]_f$. Se consideró el valor de $K_{1:1}$ óptimo, el que se obtuvo del ajuste de la ecuación (4.3) a los datos experimentales de la Figura 4.2-derecha, con el valor que se obtuvo un mínimo de la desviación estándar (χ^2) del ajuste. A partir de este método competitivo, se obtienen los valores de las constantes de equilibrio, $K_{1:1}$, entre el CB7 y las distintas sulfobetainas, recogidos en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 : Valores de las constantes de equilibrio para los complejos 1:1 ($K_{1:1}$) entre CB7 y las distintas sulfobetainas obtenidas en agua a 25°C. Se incluyen también los valores de la concentración micelar crítica (cmc) para cada surfactante.

Surfactante	$K_{1:1}$ (M ⁻¹)	cmc ⁴⁸ (M)
SB3-10	(3.4±0.1)x10 ⁶	1.3x10 ⁻²
SB3-12	(2.3±0.1)x10 ⁶	2.0x10 ⁻³
SB3-14	(4.5±0.1)x10 ⁶	2.0x10 ⁻⁴
SB3-16	(6.1±0.1)x10 ⁶	2.0x10 ⁻⁵

Como se puede observar en la Tabla 4.1, los valores de las constantes de equilibrio son casi independientes de la longitud de la cadena alquílica de los surfactantes a pesar de la gran diferencia en los valores de su cmc. En estudios anteriores del grupo⁴⁹ se ha mostrado que las constantes de equilibrio de los surfactantes catiónicos con el CB7 son independientes de la longitud de la cadena alquílica del surfactante, consecuencia de la interacción electrostática entre la carga positiva y los grupos carbonilo de los portales del cucurbiturilo. Además, los valores de las constantes de equilibrio obtenidas con esta familia de surfactantes, son del mismo orden de magnitud que los obtenidos para los bromuros de alquiltrimetilamonio, lo que sugiere que el CB7 interactúa principalmente con la parte catiónica del grupo de cabeza de las sulfobetainas, despreciando la parte negativa.

4.3.1.2 Caracterización estructural de los complejos *host:guest* entre el CB7 y las Sulfobetainas

El proceso de complejación del SB3-14 con el CB7 se estudió detalladamente mediante experimentos de ¹H RMN y TOCSY, para muestras con concentraciones de [SB3-14] = 0.5 mM y [CB7] = 1mM. Los dos componentes, CB7 y SB3-14 presentan señales de ¹H RMN que no se superponen, lo que facilita la identificación de las señales individuales de ambos componentes. En la Figura 4.3 se muestra, a modo de ejemplo, los espectros de ¹H RMN del CB7, SB3-14 y la mezcla de ambos componentes.

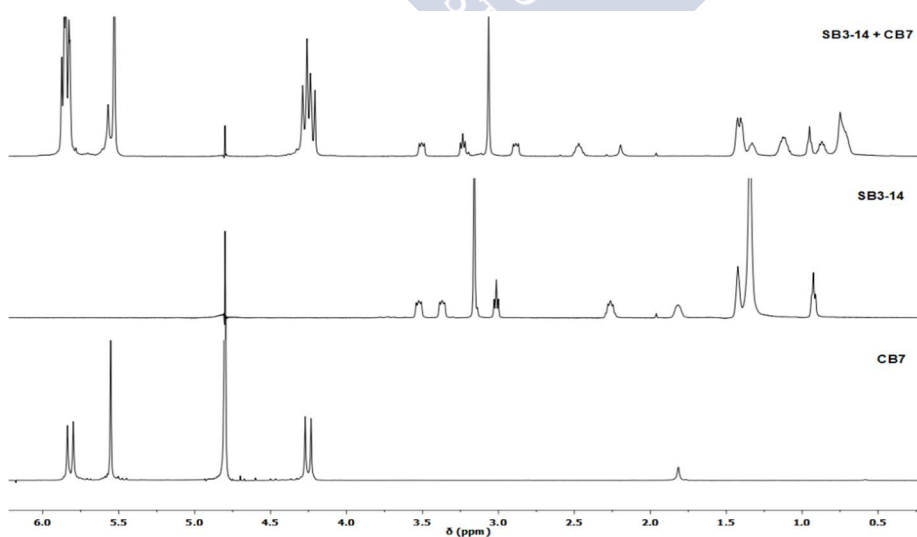


Figura 4.3 : Espectros de ¹H RMN del CB7, SB3-14 y mezcla CB7+SB3-14.

4.3.1.2.1 Análisis de los espectros de ^1H RMN

Los estudios sistemáticos de RMN, proporcionan información valiosa sobre la estequiometría y estructura de los complejos. Los cambios en los desplazamientos químicos del *guest* inducidos por la complejación ($\Delta\delta = \delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}$) son muy ilustrativos con respecto a su ubicación relativa en la cavidad del CB7. Se observa desplazamientos químicos hacia campo alto ($\Delta\delta < 0$), para protones situados dentro de la cavidad hidrófoba, mientras que el desapantallamiento provocado por los grupos carbonilo origina desplazamientos químicos hacia a campo bajo ($\Delta\delta > 0$) en las resonancias de los protones del *guest* en la proximidad de los oxígenos carbonílicos⁵⁰⁻⁵².

En la Figura 4.4 se muestran los espectros de ^1H RMN del surfactante (SB3-14) en ausencia y en presencia de CB7. Como se puede observar, los cambios en los desplazamientos químicos de los protones de la cadena alquílica presentan desplazamientos hacia campo alto ($\Delta\delta < 0$) debido a la formación del complejo 1:1 entre CB7 y el SB3-14.

En estado libre, el CB7 posee un plano de simetría y hace que los protones de los portales sean equivalentes, originando un espectro de ^1H RMN con dos dobletes y un singlete (Figura 4.3). Sin embargo, cuando la cavidad del CB7 se encuentra ocupada por un *guest*, se observa que las señales correspondientes a los protones del portal del CB7 originan cuatro dobletes, debido a la ruptura del plano de simetría del CB7 (Figura 4.4).

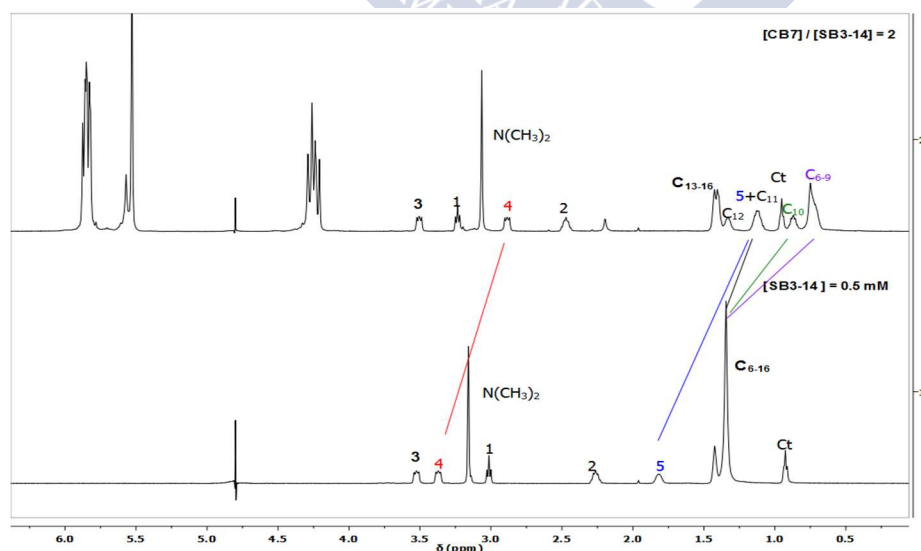


Figura 4.4 : Espectros de ^1H RMN del SB3-14 (0.5 mM) en ausencia y presencia de CB7 (1 mM). Los átomos de carbono se empiezan a enumerar a partir del grupo sulfonato (albergando los átomos de carbono del espaciador y de la cadena alquílica).

4.3.1.2.2 ^1H TCOSY

La asignación de ^1H RMN de la sulfobetaina se ha realizado mediante la técnica de TCOSY (del inglés Total Correlation Spectroscopy). Esta técnica nos permite identificar el acoplamiento entre los protones de la cadena alquílica y del espaciador del surfactante (SB3-14), ambas cadenas alquílicas por separado. Por consiguiente, cuando se compleja el SB3-14 con el CB7, observamos en el ^1H RMN que los protones de la cadena alquílica que aparecían como dos señales (asignadas como 5 y C₆₋₁₆), cuando se complejan la señal a la que pertenecen los protones de C₆₋₁₆, se desdobra en cinco señales distintas (ver Figura 4.4). Con esta técnica nos fijamos en el acoplamiento de las señales más intensas, y así podemos identificar donde está cada protón de la misma cadena (Figura 4.5). Por un lado, tenemos la cadena del espaciador (1, 2, 3) y por otro lado tenemos la cadena alquílica (4-Ct), y fijándonos en la intensidad de las señales podemos identificar la posición de cada protón por separado.

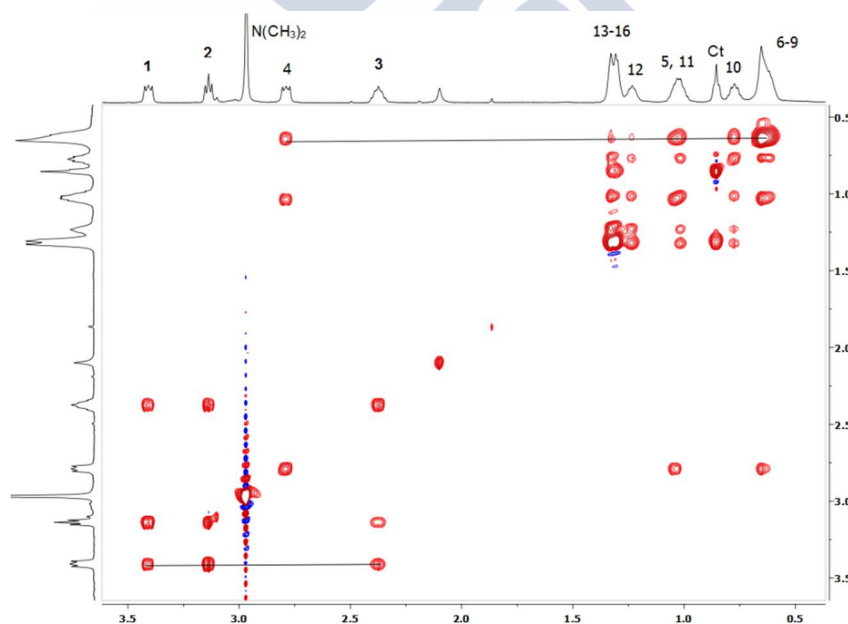


Figura 4.5 : Espectro TCOSY del SB3-14 (0.5 mM) en presencia de CB7 (1 mM), donde se muestra la correlación entre las señales de la cadena alquílica (4-Ct) y del espaciador (1-3), por separado. Los átomos de carbono se empiezan a enumerar a partir del grupo sulfonato.

Con la ayuda de ambas técnicas, ^1H RMN y TCOSY, analizamos los cambios significativos de los desplazamientos químicos que se producen en las señales de la sulfobetaina, inducidos por la complejación con el CB7 mostrando desplazamientos hacia campo bajo y también hacia campo alto (ver Figura 4.4 y Figura 4.5).

En la Figura 4.6 se muestra un análisis detallado de los valores de los desplazamientos químicos para las sulfobetainas (SB3-14 y SB6-14), donde se observan desplazamientos hacia campo bajo ($\Delta\delta > 0$) para los protones del espaciador (nombrados como: 1-3 para el SB3-14; y 1-6 para el SB6-14) de la sulfobetaina y para los protones del carbono terminal (Ct) de la cadena alquílica. Todas las demás señales muestran un desplazamiento químico hacia campo alto ($\Delta\delta < 0$) en distintas magnitudes. Los cambios más significativos hacia campo alto, se observan para los protones de la cadena alquílica próximos al grupo amonio ($N^+(CH_3)_2$), desde el carbono 4 hasta el carbono 11 para SB3-14, y desde el carbono 7 hasta el 14 para SB6-14. Se observan pequeños cambios de desplazamientos negativos para los protones del grupo de cabeza $N^+(CH_3)_2$, probablemente como resultado del equilibrio entre la inclusión de un grupo metilo en el interior de la cavidad del CB7, $\Delta\delta < 0$, y otro localizado fuera de la cavidad, $\Delta\delta > 0$.

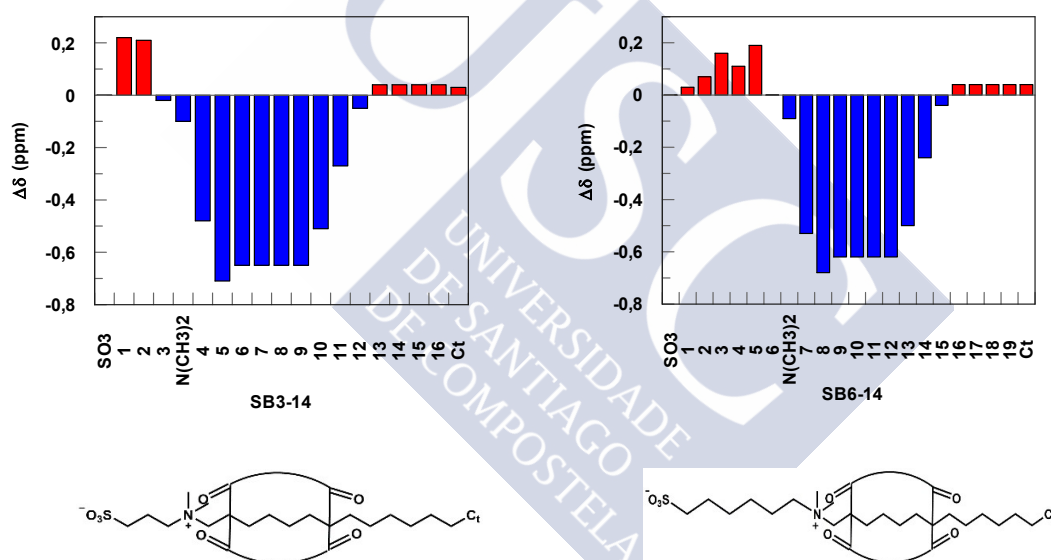


Figura 4.6 : (Izquierda) Desplazamientos químicos inducidos por el CB7 ($\Delta\delta = \delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}$, ppm) en los espectros de ^1H RMN de SB3-14, para la relación molar $[\text{CB7}]/[\text{SB3-14}] = 2$; $[\text{SB3-14}] = 0.5$ mM; (Derecha) Desplazamientos químicos inducidos por el CB7 ($\Delta\delta = \delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}$, ppm) en el espectros de ^1H RMN de SB6-14, para la relación molar $[\text{CB7}]/[\text{SB6-14}] = 2$; $[\text{SB6-14}] = 0.5$ mM. Se representa el dibujo de la estructura del complejo *host:guest*, para cada sulfobetaina.

Los desplazamientos químicos inducidos por la complejación mostrados en la Figura 4.6, indican que casi nueve grupos metileno de las sulfobetainas muestran un efecto hacia campo alto. El tamaño de la cavidad del CB7 (9.1Å) permite la inclusión de hasta siete átomos de carbono de una cadena alquílica, si se encuentran en conformación *trans*. Basándonos en estudios previos de nuestro laboratorio, dos CB7 deberían estar involucrados en la formación de ambos complejos *host:guest*, un externo y otro interno⁴⁹.

Además, en el estudio realizado por Steinke y Tunel⁵³, se muestra que el CB6 podría unirse a los iones amonio formando un complejo interno y otro externo, y el complejo externo podría intervenir en los procesos de reticulación del polímero. Por tanto, podríamos pensar que en nuestro caso debería participar en la interacción con sulfobetainas más de un cucurbiturilo. La formación de complejos externos será de gran importancia en la preparación de las SNPs, podrían intervenir en procesos de reticulación (cross-linking).

4.3.2 Influencia del CB7 en el proceso de micelización de las Sulfobetainas

4.3.2.1 Tensión superficial

En ausencia de aditivos, los valores obtenidos para la tensión superficial (σ) en función de la concentración de las sulfobetainas (SB3-14 y SB3-16) en disolución acuosa, presentan un perfil similar al estudiado por otras técnicas para disoluciones de surfactantes convencionales. La concentración micelar crítica (cmc) del surfactante se determina en el punto donde se observa un cambio brusco en la pendiente de los datos de σ frente a la concentración de surfactante (Figura 4.7). Para el SB3-14 y SB3-16, se ha obtenido un valor de cmc de 0.2 mM (2×10^{-4} M) y 0.03 mM (3×10^{-5} M), respectivamente, de acuerdo con el valor encontrado en la bibliografía⁵⁴.

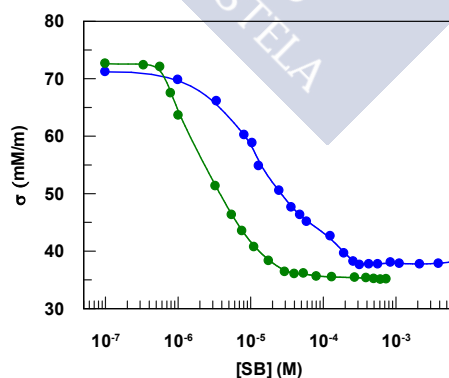


Figura 4.7 : Variación de la tensión superficial (σ) con la concentración de las sulfobetainas SB3-14 (●), SB3-16 (●). T= 25°C.

La inclusión de la sulfobetaina en la cavidad del CB7 impide su autoagregación, de tal modo que la concentración micelar crítica se desplaza a valores más altos. En la Figura 4.8 se muestra la variación de la tensión superficial en función de la concentración

de SB3-14 y SB3-16 tanto en ausencia como en presencia de CB7, y así podemos comparar los distintos estudios. La tensión superficial de ambas sulfobetainas en ausencia de CB7 se muestra previamente en la Figura 4.7. Cuando adicionamos el CB7, manteniendo su concentración constante ($[CB7] = 1 \text{ mM}$) y variamos la concentración de sulfobetaina, observamos que el intervalo de tensión superficial no afectada se amplía en dos órdenes de magnitud, desplazando la concentración micelar crítica (cmc_1) a valores superiores a 1 mM para ambas sulfobetainas, independientemente de que por sí solas tengan valores de cmc distintos en ausencia de CB7. Se puede observar igualmente que la tensión superficial en presencia de $[CB7] = 1 \text{ mM}$ permanece constante para la SB3-16 hasta 0.1 mM, mientras que para el caso de la SB3-14 hasta 0.4 mM, indicando que el complejo *host:guest* formado por sulfobetaina y cucurbiturilo no absorbe en la interfase aire-agua. Mientras que cuando adicionamos concentraciones equimolares de sulfobetaina y CB7, el intervalo de tensión superficial no afectada se amplía, pero en menor magnitud que para el caso de $[CB7] = 1 \text{ mM}$ desplazando la concentración micelar crítica (cmc_2) a valores más altos, para la SB3-16 es de 0.3 mM y para la SB3-14 es de 0.7 mM.

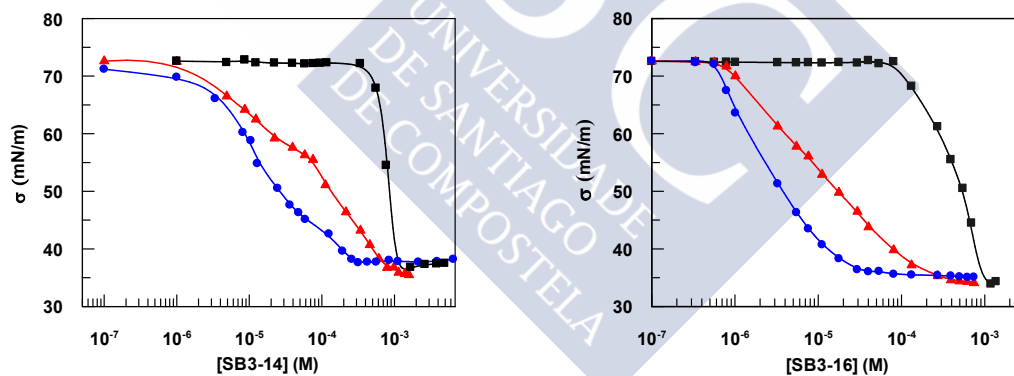


Figura 4.8 : (Izquierda) Variación de la tensión superficial (σ) con la concentración de SB3-14 en ausencia de CB7 (\bullet), en presencia de concentraciones equimolares de SB3-14 y CB7 (\blacktriangle) y en presencia de una concentración constante de CB7, $[CB7] = 1 \text{ mM}$, (\blacksquare) a 25°C . (Derecha) Variación de la tensión superficial (σ) con la concentración de SB3-16 en ausencia de CB7 (\bullet), en presencia de concentraciones equimolares de SB3-16 y CB7 (\blacktriangle) y en presencia de una concentración constante de CB7, $[CB7] = 1 \text{ mM}$, (\blacksquare) a 25°C .

La disminución de la tensión superficial para las disoluciones acuosas de surfactante se atribuye a la adsorción del monómero de surfactante en la interfase aire-agua. Debido a que tanto el CB7 puro como los complejos de inclusión de CB7:sulfobetaina no se adsorben en la interfase aire-agua, debemos esperar una única dependencia de la tensión superficial sobre la concentración de monómero de sulfobetaina.

En la Figura 4.9 se encuentra representada la concentración de monómeros de SB3-16 frente a la concentración total de surfactante, en presencia de concentraciones equimolares de SB3-16 y CB7 y en presencia de $[CB7] = 1 \text{ mM}$. Los datos de la tensión superficial frente a la $[SB3-16]$ en ausencia de CB7, pueden usarse como una curva de calibración para obtener la cantidad de monómeros de la SB3-16 en presencia de cucurbiturilo. Además, utilizando las constantes de equilibrio del complejo *host:guest* presentadas en la Tabla 4.1, es posible calcular la concentración de monómero de sulfobetáina en función de la concentración total de sulfobetáina en presencia de distintas concentraciones de CB7. Estos valores para el caso de la SB3-16, se muestran en la Figura 4.9, como se puede observar las concentraciones de monómeros determinadas experimentalmente son siempre mayores que las calculadas, considerando sólo la formación de complejos *host:guest* 1:1 con el cucurbiturilo, lo que nos indica que la concentración de monómero de surfactante en presencia de CB7 está subestimada. Hemos obtenido resultados similares con otras sulfobetáinas y debemos atribuir estos resultados a una disminución de las moléculas disponibles de CB7 para la complejación de la sulfobetáina. Como mostraremos más adelante, un número de moléculas de CB7 deberían ser secuestradas, actuando en la reticulación (cross-linking) para la formación de las nanopartículas supramoleculares (SNPs).

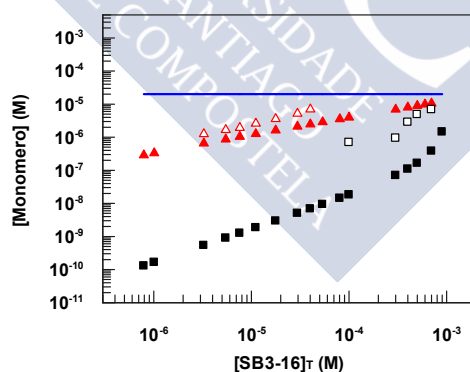


Figura 4.9 : Representación de la concentración de monómeros de SB3-16 frente a la concentración total del surfactante, en presencia de concentraciones equimolares de SB3-16 y CB7 (▲) y en presencia de $[CB7] = 1 \text{ mM}$ (■), calculadas utilizando la constante de equilibrio mostrada en la Tabla 4.1. La concentración de monómeros de SB3-16 frente a la concentración total del surfactante, en presencia de concentraciones equimolares de SB3-16 y CB7 (△) y en presencia de $[CB7] = 1 \text{ mM}$ (□), calculadas utilizando los resultados obtenidos de la tensión superficial en ausencia de CB7. La línea azul representa la concentración micelar crítica del SB3-16.

4.3.3 Caracterización de las nanopartículas supramoleculares (SNPs) basadas en CB7

4.3.3.1 DLS

Los experimentos de DLS evidencian la existencia de tres modos de relajación para SB3-16 en la distribución del tiempo de decaimiento. La Figura 4.10-(a) muestra un modo rápido a tiempos de relajación cortos ($\tau \approx 0.02$ ms para $\theta = 90^\circ$) y un segundo modo a tiempos de relajación intermedios ($\tau \approx 0.70$ ms para $\theta = 90^\circ$). Ambos modos dependen del ángulo de medida y se relacionaron con la difusión de micelas de SB3-16 y con los agregados micelares de SB3-16, respectivamente. Además, se observa un modo lento a tiempos de relajación largos, que es independiente del vector de dispersión, lo que indica que es un modo "viscoelástico". El coeficiente de difusión promedio de las micelas de SB3-16 se obtuvo mediante el ajuste lineal de la dependencia angular de los tiempos de relajación del modo rápido (Figura 4.10-(b)), $D = (78.8 \pm 1.3) \mu\text{m}^2/\text{s}$, lo que corresponde a un radio hidrodinámico promedio de $R_H = 3.11 \pm 0.05$ nm. Cuando se añade el CB7 a la disolución de SB3-16, $[\text{CB7}] = 1$ mM y $[\text{SB3-16}] = 1$ mM, se forma un complejo de inclusión y ya no se observan micelas de SB3-16. Esta característica se puede observar claramente en la Figura 4.10-(a) donde el modo rápido asociado a las micelas de SB3-16 desaparece en la distribución de tiempos de decaimiento después de adicionar el CB7, y las nanopartículas supramoleculares derivadas del complejo *host:guest* permanecen en la disolución.

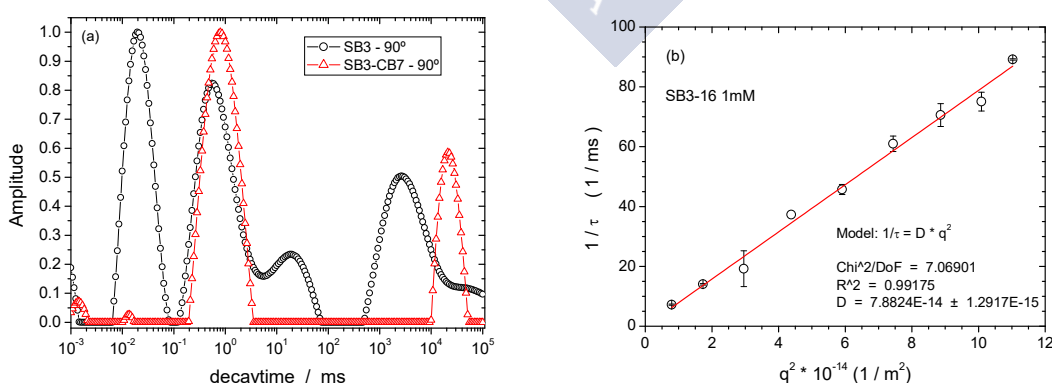


Figura 4.10 : (a) Comparación de la distribución de tiempos de decaimiento para las micelas de SB3-16 (○) y para el complejo de inclusión CB7:SB3-16 (Δ); (b) Determinación del coeficiente de difusión promedio para las micelas de SB3-16.

Por otra parte, esta nanopartícula supramolecular se observa claramente debido a su dependencia angular, Figura 4.11-(a). El coeficiente de difusión promedio del agregado supramolecular formado al mezclar concentraciones equimolares de SB3-16 y CB7 se obtuvo mediante el ajuste lineal de la dependencia angular de los tiempos de relajación del modo rápido, $D = (2.18 \pm 0.08) \mu\text{m}^2/\text{s}$, lo que corresponde a un radio hidrodinámico promedio de $R_H = 115 \pm 4 \text{ nm}$ (Figura 4.11-(b)).

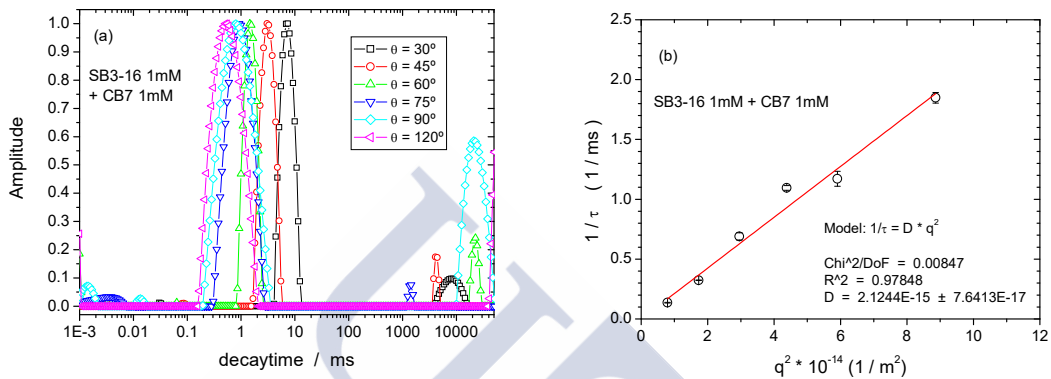


Figura 4.11 : Datos de DLS para el complejo de inclusión CB7:SB3-16 ($[\text{CB7}] = 1 \text{ mM}; [\text{SB3-16}] = 1 \text{ mM}$). (a) Dependencia angular; (b) Determinación del coeficiente de difusión promedio para el complejo de inclusión.

Las nanopartículas supramoleculares obtenidas a partir de la agregación de complejos *host:guest* pueden desagregarse con la adición de un *guest* competitivo. Dado que el CB7 tiene la capacidad para complejar cationes tetraetilamonio⁵⁵ se estudió su efecto en la estabilidad de las SNPs. La adición de tetraetilamonio, $[\text{TEA}] = 2 \text{ mM}$, compiten con la SB3-16 para complejarse con el CB7, desplazando la SB3-16 de los complejos *host:guest*, obteniéndose la recuperación de las micelas de SB3-16. En la Figura 4.12 se muestra el ajuste lineal de la dependencia angular de los tiempos de relajación del modo de las micelas, dando un valor de coeficiente de difusión promedio de $D = (115.1 \pm 1.5) \mu\text{m}^2/\text{s}$, que corresponde a un radio hidrodinámico promedio de $R_H = 2.1 \pm 0.3 \text{ nm}$. Este tamaño de radio hidrodinámico es ligeramente menor que el que obtuvimos antes, pero esto puede deberse a la presencia de una gran cantidad de cloruro de tetraetilamonio en disolución.

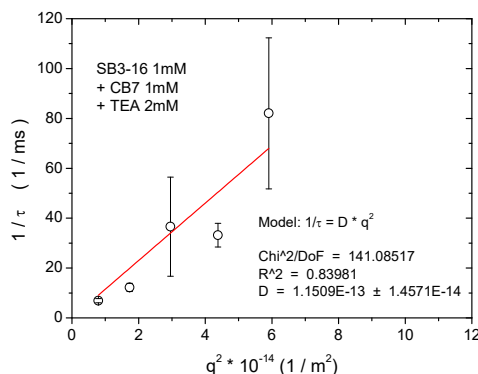


Figura 4.12 : Datos de DLS para las micelas de SB3-16 recuperadas después de la adición de 2 mM de TEA, con el fin de romper las partículas supramoleculares de CB7:SB3-16.

La agregación-desagregación de las SNPs inducida por un *guest* competitivo (TEA) se muestra claramente en la Figura 4.13 mediante experimentos de DLS en un ángulo de dispersión de 90°.

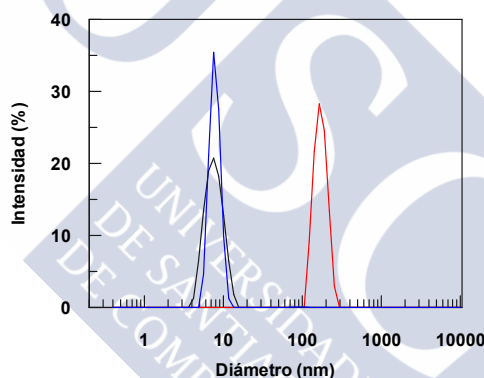


Figura 4.13 : Medidas de DLS en un ángulo de dispersión de 90°, que muestran las distribuciones de tamaño de: (línea negra) micelas formadas por SB3-16 con una concentración de 3 mM y con un diámetro de 8.119 nm; (línea roja) SNPs formadas por una mezcla equimolar de 1.5 mM de SB3-16 y CB7 con un diámetro de 172.1 nm y (línea azul) desagregación de las SNPs produciendo micelas por la adición de 2mM de cloruro de tetraetilamonio (TEA) a la mezcla de [SB3-16]=[CB7]= 1.5 mM obteniendo un diámetro de 7.853 nm. Todos los experimentos fueron realizados en agua Milli-Q y a 25°C.

4.3.3.2 Crio-TEM

Con el objetivo de confirmar por otras técnicas la formación de las nanopartículas supramoleculares (SNPs) se realizaron experimentos de Crio-TEM (Crio-Microscopía Electrónica de Transmisión) de una disolución con cantidades equimoleculares de [CB7]=[SB3-16]= 2 mM y otra disolución de control, conteniendo únicamente surfactante, [SB3-16]= 2 mM.

La Figura 4.14-derecha muestra que en la imagen correspondiente a la mezcla equimolar de CB7 y SB3-16, se observa un agregado circular en tono gris más oscuro,

cuyo tamaño es de aproximadamente 200 nm. Sin embargo, en la Figura 4.14-izquierda (disolución de sulfobetaína) no se aprecia ningún tipo de estructura. Por tanto, podemos confirmar la formación de las nanopartículas supramoleculares también por este método.

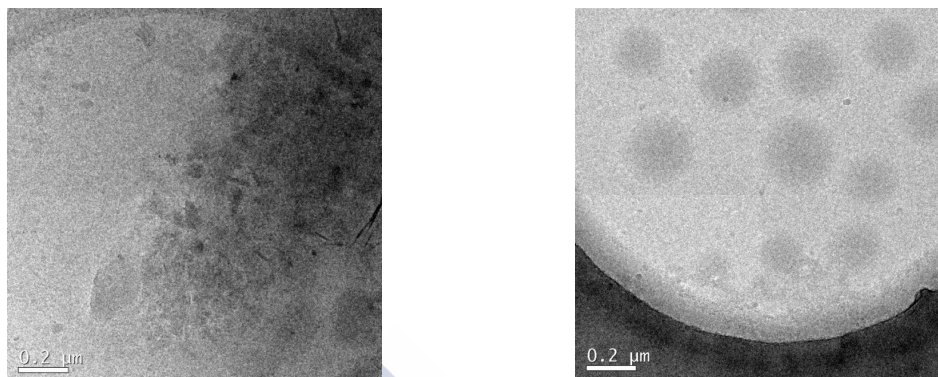
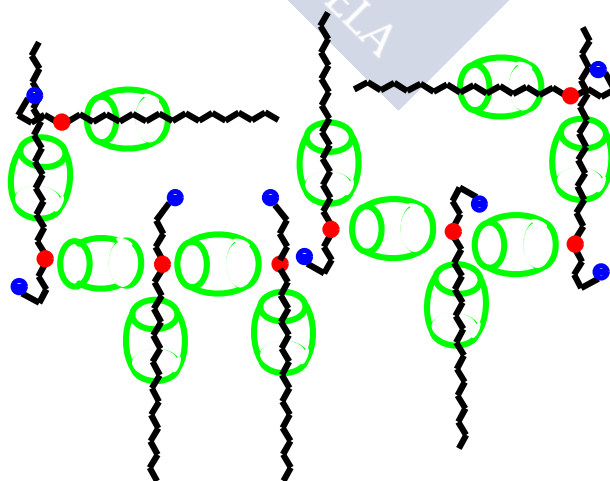


Figura 4.14 : Imágenes del Crio-TEM para las mezclas que contienen: (Izquierda) disolución de SB3-16 (2 mM) en ausencia de CB7; (Derecha) Disolución equimolar de $[CB7]=[SB3-16]=2$ mM.

La formación de las nanopartículas supramoleculares de CB7 y sulfobetaínas puede explicarse considerando la formación de complejos internos y externos entre el cucurbit[7]urilo y la parte catiónica del surfactante⁴⁹. En el Esquema 4.4 se propone una situación donde los complejos externos pueden actuar como un enlace cruzado entre las sulfobetaínas complejadas por CB7. La implicación del CB7 en la reticulación es compatible con los resultados de tensión superficial, que muestran que una cantidad importante de CB7 no está disponible para complejar los monómeros de la sulfobetaína.



Esquema 4.4

En la Figura 4.15-izquierda se muestra el tamaño del diámetro de las nanopartículas supramoleculares en función del tiempo. Estos resultados fueron obtenidos por el aparato de Malvern-ZetaSizer, que utiliza la dispersión dinámica de luz en un ángulo de dispersión de 90°. Los SNPs se obtuvieron mezclando CB7 con una concentración 1.5 mM y diferentes concentraciones de sulfobetaina obteniéndose así distintas relaciones molares: $[SB3-16]/[CB7] = 0.5; 0.67; 1$ y 2 . Un aumento adicional de la concentración de sulfobetaina, conduce a relaciones molares mayores, $[SB3-16]/[CB7] = 4$ y 5.3 , dando lugar a que la sulfobetaina se autoagregue, formando micelas e impidiendo la formación de las nanopartículas supramoleculares (ver Figura 4.16).

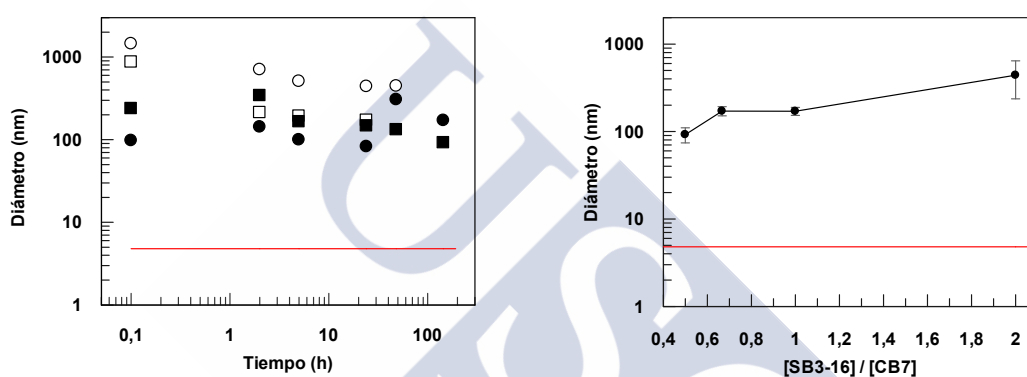


Figura 4.15 : (Izquierda) Representación gráfica de la evolución del tamaño con el tiempo de las nanopartículas supramoleculares (SNPs) derivadas de la SB3-16 y el CB7 obtenidas para distintas relaciones molares a 25°C. (■) $[SB3-16]/[CB7] = 0.5$; (□) $[SB3-16]/[CB7] = 0.67$; (●) $[SB3-16]/[CB7] = 1$ y (○) $[SB3-16]/[CB7] = 2$. (Derecha) Influencia de la relación molar de Sulfobetaina:CB7 sobre el tamaño de las SNPs después de su estabilización. La línea roja muestra el tamaño de las micelas de SB3-16.

La tendencia general que se muestra en la Figura 4.15, es que el tamaño de las SNPs disminuye en las primeras dos horas después de su formación, estabilizándose después de un día y manteniéndose estable durante al menos dos semanas. La dependencia tamaño-tiempo puede ser explicada por la compactación de las nanopartículas preformadas, debido a la adsorción de los monómeros de la sulfobetaina. Esta adsorción apantalla las repulsiones electrostáticas entre los grupos sulfonato de las sulfobetainas y los portales del cucurbiturilo, permitiendo una estructura más compacta. La Figura 4.15-derecha muestra que el tamaño de las SNPs aumenta con el porcentaje de sulfobetaina en la mezcla de reacción, este efecto se puede atribuir a un mayor porcentaje de surfactante en la superficie de las nanopartículas. Como se mostrará a continuación, este comportamiento es compatible con la carga superficial más negativa de los SNPs al aumentar la concentración de surfactante.

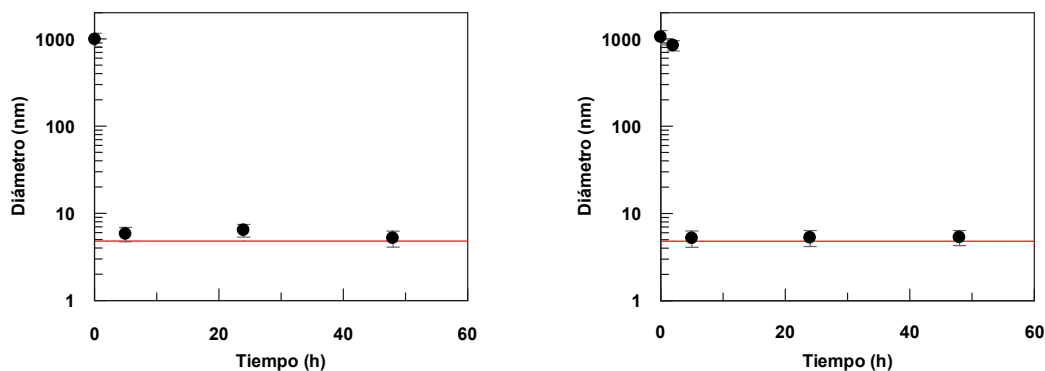


Figura 4.16 : (Izquierda) Evolución del tamaño con el tiempo de las nanopartículas supramoleculares (SNPs) derivadas de la SB3-16 y el CB7 obtenidas para la relación molar $[SB3-16]/[CB7] = 4$ a $25^{\circ}C$. (Derecha) Evolución del tamaño con el tiempo para las nanopartículas supramoleculares (SNPs) derivadas de la SB3-16 y el CB7 obtenidas para la relación molar $[SB3-16]/[CB7] = 5.3$ a $25^{\circ}C$. La línea roja muestra el tamaño de las micelas de SB3-16.

La Figura 4.17-izquierda muestra la evolución del Potencial Zeta con el tiempo para distintas relaciones molares de las SNPs, donde se observa la misma tendencia que para la evolución del tamaño. El potencial Z disminuye con el tiempo, alcanzando el equilibrio después de 24 horas y manteniéndose constante durante casi dos semanas. Para relaciones molares de $[SB3-16]/[CB7] < 1$, los valores de potencial Z inicialmente son positivos y van disminuyendo con el tiempo hasta alcanzar valores negativos muy pequeños en el equilibrio. El comportamiento experimental puede explicarse por la rápida formación de agregados supramoleculares y posterior lenta adsorción de SB3-16 hasta alcanzar el equilibrio. El valor del potencial Z en el equilibrio es claramente menos negativo que para las micelas de SB3-16 puras.

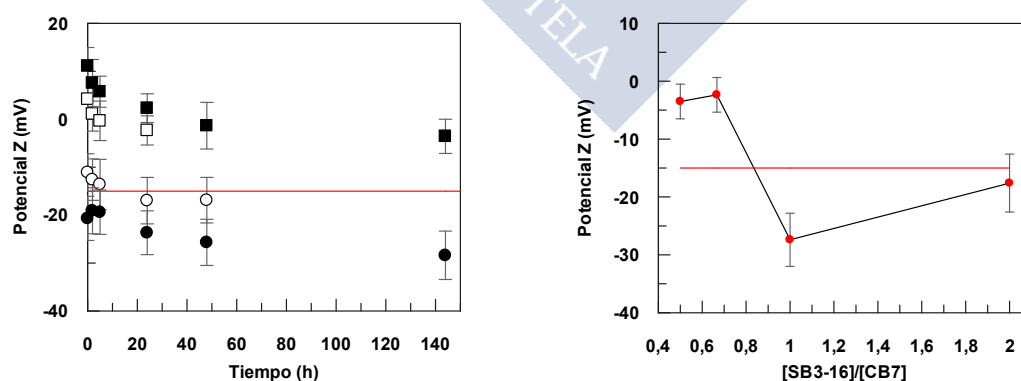


Figura 4.17 : (Izquierda) Representación gráfica del Potencial Z con el tiempo de las nanopartículas supramoleculares (SNPs) derivadas de la SB3-16 y el CB7 obtenidas para distintas relaciones molares a $25^{\circ}C$. (■) $[SB3-16]/[CB7] = 0.5$; (□) $[SB3-16]/[CB7] = 0.67$; (●) $[SB3-16]/[CB7] = 1$ y (○) $[SB3-16]/[CB7] = 2$. (Derecha) Influencia de la relación molar Sulfobetaina:CB7 sobre el Potencial Z de las SNPs después del equilibrio. La línea roja muestra el Potencial Z de las micelas de SB3-16.

Al aumentar el porcentaje de sulfobetaina en la mezcla de reacción se observan valores de potencial Z más negativos, claramente los valores están por debajo del valor de las micelas de SB3-16 puras. Se han observado valores mínimos de potencial Z para la relación molar $[SB3-16]/[CB7] = 1$, lo que sugiere la gran adsorción del surfactante en la superficie de las SNPs. Un aumento adicional de la concentración de la sulfobetaina en la relación molar con el CB7, no da lugar a nanopartículas más negativas. Por tanto, para $[SB3-16] = 2\text{mM}$ y $[CB7] = 1\text{mM}$, la cantidad de monómeros de surfactante en disolución debe ser claramente mayor que la concentración micelar crítica de surfactante, $\text{cmc} = 0.02\text{mM}$, permitiendo que la micelización actúe como un proceso competitivo con las SNPs. El proceso de micelización hace que disminuya el surfactante disponible para ser adsorbido en la superficie de las SNPs. Este efecto se muestra claramente para relaciones molares mayores, $[SB3-16]/[CB7] = 4$ y 5.3 , donde las SNPs observadas justo después de la mezcla se desagregan en menos de una hora, dando lugar a la formación de micelas (ver Figura 4.16 y Figura 4.18).

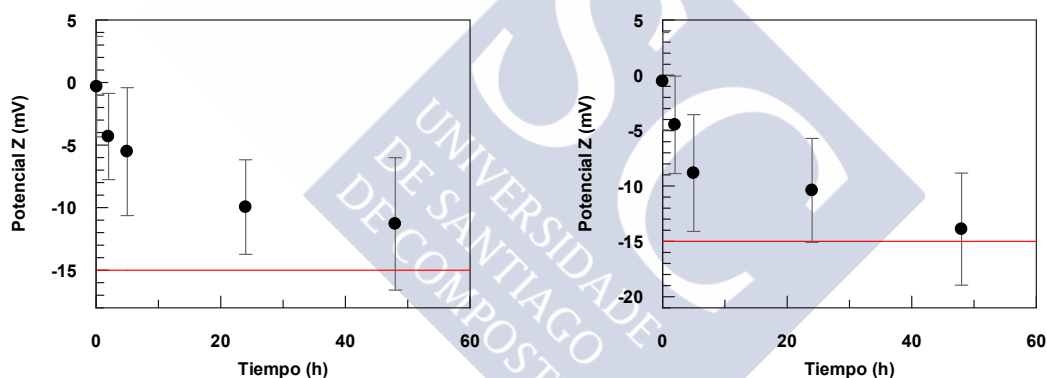
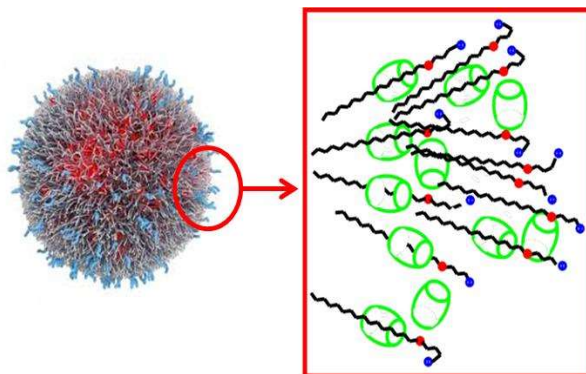


Figura 4.18 : (Izquierda) Evolución del Potencial Z con el tiempo de las nanopartículas supramoleculares (SNPs) derivadas de la SB3-16 y el CB7 obtenidas para la relación molar $[SB3-16]/[CB7] = 4$ a 25°C . (Derecha) Evolución del Potencial Z con el tiempo de las nanopartículas supramoleculares (SNPs) derivadas de la SB3-16 y el CB7 obtenidas para la relación molar $[SB3-16]/[CB7] = 5.3$ a 25°C . La línea roja muestra el potencial Z de las micelas de SB3-16.

En los complejos *host:guest* formados por la SB3-16 y el CB7, el grupo amonio (cargado positivamente) de la sulfobetaina se encuentra dentro de la cavidad del cucurbiturilo, o muy cerca de sus portales. Como consecuencia, la mayor parte de la carga positiva está protegida por los grupos carbonilo, presentes en la entrada de los portales del CB7, dando lugar a nanopartículas con una carga neta negativa en su superficie (Esquema 4.5).



Esquema 4.5

4.3.4 Las SNPs como portadoras de fármacos

Las características particulares de las SNPs obtenidas, nos alientan a explorar la posibilidad de la encapsulación molecular de fármacos dentro de las nanopartículas híbridas formadas por el cucurbiturilo/surfactante, y posterior liberación bajo efectos externos. La 5(6)-carboxifluoresceína (CF) es un fluoróforo con excelentes propiedades luminiscentes que constituye una sonda óptima para estudios de encapsulación. La CF se *quenchea* a concentraciones altas (50 mM) y recupera su fluorescencia tras su dilución⁵⁶. Por lo tanto, preparamos disoluciones equimolares de CB7, [CB7] = 1.5 mM, y SB3-16, [SB3-16] = 1.5 mM, que contienen la CF en concentraciones *quencheadas* en un tampón acuoso (50 mM). La mezcla de volúmenes iguales de las disoluciones de cucurbiturilo y sulfobetaina (que contienen CF) provocó la formación de dispersiones de las SNPs con carboxifluoresceína *quencheada*. Después de la extrusión de esta mezcla heterogénea a través de una membrana de policarbonato (tamaño del poro de 200 nm) y la eliminación del colorante no encapsulado por filtración en gel (Sephadex G-50) se obtuvo una dispersión uniforme de las nanopartículas con colorante encapsulado, y un tamaño controlado de 200 nm aproximadamente (ver Figura 4.19-izquierda).

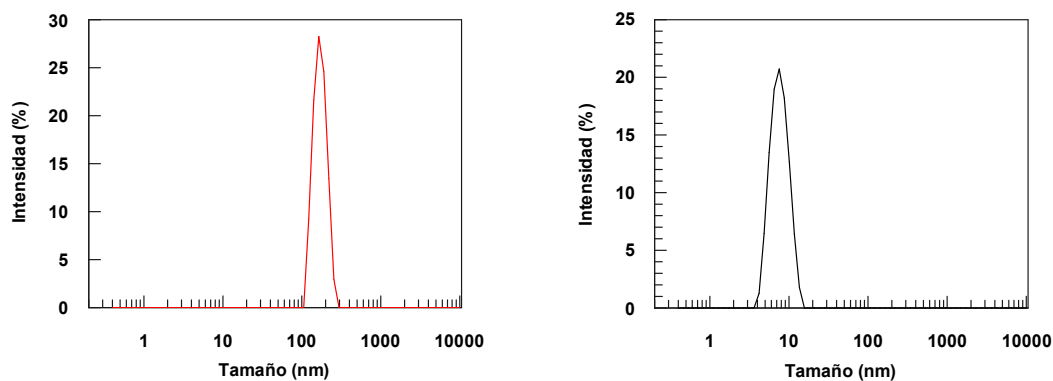


Figura 4.19 : (Izquierda) Experimento de DLS para el tamaño de las nanopartículas supramoleculares (SNPs) con CF encapsulada en su interior, con un diámetro de 172.1nm. (Derecha) Experimento de DLS donde se rompen las SNPs al añadir TEA, y se observa el tamaño de la micela de SB3-16 con un diámetro de 7.853nm.

También investigamos la liberación, desencadenada por un estímulo externo del contenido de las nanopartículas, mediante la adición de unos destructores adecuados para la mezcla CB7/SB3-16. Inicialmente supervisamos la emisión de fluorescencia de la CF ($\lambda_{exc} = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 517 \text{ nm}$) de las nanopartículas tras la adición del cloruro de tetraetilamonio (TEA), la cual sabemos que se une fuertemente a la cavidad del cucurbiturilo⁵⁷. Sin embargo, en la Figura 4.20 se muestra que la adición de TEA a las SNPs proporcionó una ligera inesperada disminución de la emisión de la CF. Este comportamiento podría ser resultado de una complejación de TEA/CB7 junto con la simultánea micelización del surfactante con la CF en su interior, una situación que inhibiría el aumento esperado de la emisión de la CF.

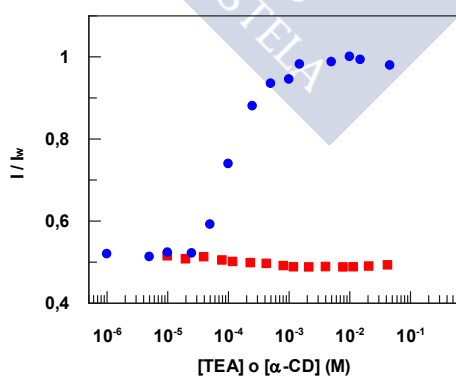


Figura 4.20 : Fluorescencia de la CF encapsulada en nanopartículas supramoleculares (SNPs) formadas por $[SB3-16]=[CB7]= 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ a 25°C . Activamos la liberación del contenido de la SNP mediante la adición de: (■) TEA y (●) α -CD. $[CF]= 1 \times 10^{-7} \text{ M}$.

La formación de micelas de SB3-16 después de la eliminación del CB7, se correlaciona con la reducción de tamaño observado en los experimentos de DLS después

de la adición de TEA a las dispersiones de las nanopartículas de CB7/SB3-16 (desde 200 nm hasta 8 nm, aproximadamente se puede ver en la Figura 4.19). Se debe mencionar que la formación de micelas de SB3-16 después de la eliminación de CB7, está favorecida en el rango de concentración empleado, ya que estamos por encima de la concentración micelar crítica del SB3-16 ($cmc = 0.02 \text{ mM}$). La formación inicial de micelas de sulfobetaina/CF debe descartarse, ya que el mismo protocolo de extrusión para SB3-16 conducen a la formación de micelas con un tamaño de 8 nm, que son claramente diferentes a los 200 nm de tamaño de las nanopartículas híbridas formadas por CB7/SB3-16. Además, pudimos confirmar experimentalmente que la adición de sulfobetaina (a concentraciones mayores de la cmc) inactivó considerablemente la emisión de la carboxifluoresceína (ver Figura 4.21).

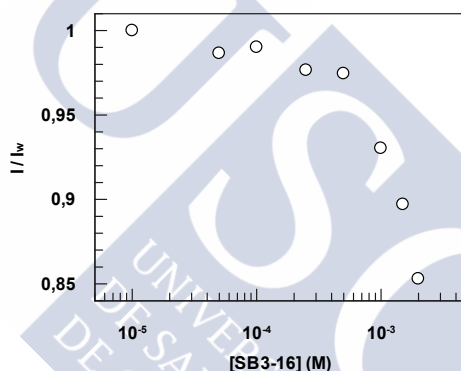


Figura 4.21 : Influencia de la concentración de SB3-16 sobre la intensidad de emisión de la CF, a medida que aumenta el número de micelas del surfactante se *quenchea* la fluorescencia de CF, debido a la encapsulación de CF en el interior de las micelas a 25°C. $[CF] = 1 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Por tanto, con el fin de interrumpir la formación de las micelas de SB3-16, se trata las nanopartículas con α -CD, produciéndose un importante aumento en la emisión de la carboxifluoresceína, que confirma la liberación del colorante interno de las SNPs después de la desagregación y también la interrupción de la formación de micelas de SB3-16 (ver Figura 4.20). La Figura 4.22 confirma la importancia de la micelización del surfactante, mediante el tratamiento directo de la micela de SB3-16 con α -ciclodextrina, observamos que se produjo una recuperación completa en la emisión de la CF.

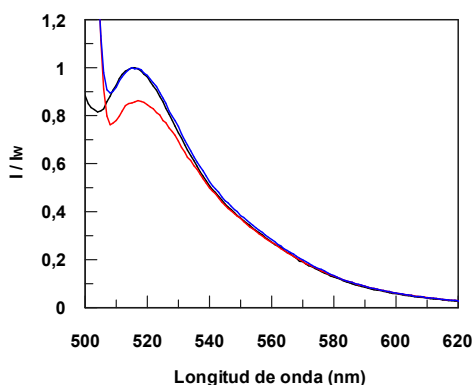


Figura 4.22 : Espectro de emisión de la CF (línea negra): en presencia de micelas de SB3-16 (línea roja), y en presencia de micelas de SB3-16 cuando se le añade α -CD (línea azul) $[CF]= 1 \times 10^{-7}$ M; $[SB3-16]= 2 \times 10^{-3}$ M; $[\alpha-CD]=1 \times 10^{-2}$ M. T= 25°C.

4.4 Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio, nos permitieron confirmar la formación de complejos de inclusión entre CB7 y surfactantes zwitteriónicos (sulfobetáinas) con cadenas alquílicas de diez a dieciséis grupos metileno. Los valores de las constantes de equilibrio entre el CB7 y las sulfobetáinas se determinaron a través de experimentos competitivos, en que se utilizó el DSMI⁺. Se mostró que los valores de las constantes de equilibrio son independientes de la hidrofobicidad del *guest* y se confirmó la interacción electrostática como principal fuerza. La caracterización por RMN de los complejos *host:guest* sugirió la formación de un complejo de inclusión donde el CB7 interactúa con el grupo catiónico del surfactante zwitteriónico al incluir parte de su cadena alquílica. Esta unión tan fuerte está reticulada por moléculas de CB7 adicionales, dando lugar a la formación de nanopartículas supramoleculares (SNPs).

Se ha estudiado la formación reversible de nanopartículas supramoleculares, con un tamaño cercano a 200 nm y obtenidas mediante la unión de CB7/sulfobetáina, además se han caracterizado por experimentos de DLS y Crio-TEM. Los monómeros de sulfobetáina se pueden desplazar de la cavidad del CB7 mediante la adición de un *guest* apropiado, por ejemplo, el tetraetilamonio (TEA), resultando la desagregación de las SNPs. La evolución de las SNPs con el tiempo, indica que la estructura amorfa reticulada inicial evoluciona con el tiempo por absorción de monómeros de sulfobetáina adicionales, dando lugar a una reducción de tamaño y un potencial de superficie más negativo. El potencial de superficie, que es siempre negativo, se puede modificar por la relación molar de $[SB3-16]/[CB7]$ logrando un Potencial Z más negativo que el obtenido para las micelas

de SB3-16, mediante el aumento de la concentración de surfactante en la mezcla de reacción. La carboxifluoresceína (CF) se libera tras la desagregación de las SNPs, evidencia su posible aplicación para la solubilización y liberación de fármacos.



4.5 Bibliografía

- (1) Lehn, J.-M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 4763–4768.
- (2) Ling, X. Y.; Phang, I. Y.; Schönherr, H.; Reinhoudt, D. N.; Vancso, G. J.; Huskens, J. *Small* **2009**, *5*, 1428–1435.
- (3) Aida, T.; Meijer, E. W.; Stupp, S. I. *Science*. **2012**, *335* (6070), 813–817.
- (4) Davis, M. E.; Zuckerman, J. E.; Choi, C. H. J.; Seligson, D.; Tolcher, A.; Alabi, C. A.; Yen, Y.; Heidel, J. D.; Ribas, A. *Nature* **2010**, *464*, 1067–1070.
- (5) Wang, H.; Wang, S.; Su, H.; Chen, K. J.; Armijo, A. L.; Lin, W. Y.; Wang, Y.; Sun, J.; Kamei, K. I.; Czernin, J.; Radu, C. G.; Tseng, H. R. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 4344–4348.
- (6) Motornov, M.; Roiter, Y.; Tokarev, I.; Minko, S. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 174–211.
- (7) Staff, R. H.; Gallei, M.; Landfester, K.; Crespy, D. *Macromolecules* **2014**, *47*, 4876–4883.
- (8) Rapoport, N. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 962–990.
- (9) Davis, M. E. *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 659–668.
- (10) Li, J.; Loh, X. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1000–1017.
- (11) Moya-Ortega, M. D.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Loftsson, T. *Int. J. Pharm.* **2012**, *428*, 152–163.
- (12) Zhang, J.; Ma, P. X. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1215–1233.
- (13) Zhang, J.; Jia, Y.; Li, X.; Hu, Y.; Li, X. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 3035–3040.
- (14) Fan, H.; Hu, Q.-D.; Xu, F.-J.; Liang, W.-Q.; Tang, G.-P.; Yang, W.-T. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1428–1436.
- (15) Park, C.; Oh, K.; Lee, S. C.; Kim, C. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46* (9), 1455–1457.
- (16) Ji, R.; Cheng, J.; Yang, T.; Song, C. C.; Li, L.; Du, F. S.; Li, Z. C. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3531–3539.
- (17) Yan, Q.; Xin, Y.; Zhou, R.; Yin, Y.; Yuan, J. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9594–9596.
- (18) Liu, Y.; Yu, C.; Jin, H.; Jiang, B.; Zhu, X.; Zhou, Y.; Lu, Z.; Yan, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4765–4770.
- (19) Zou, J.; Tao, F.; Jiang, M. *Langmuir* **2007**, *23*, 12791–12794.
- (20) Nalluri, S. K. M.; Voskuhl, J.; Bultema, J. B.; Boekema, E. J.; Ravoo, B. J. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 9747–9751.
- (21) Yan, Q.; Yuan, J.; Cai, Z.; Xin, Y.; Kang, Y.; Yin, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9268–9270.
- (22) Park, C.; Kim, H.; Kim, S.; Kim, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16614–16615.
- (23) Voskuhl, J.; Stuart, M. C. A.; Ravoo, B. J. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16*, 2790–2796.
- (24) Schmidt, B. V. K. J.; Hetzer, M.; Ritter, H.; Barner-Kowollik, C. *Macromolecules* **2013**, *46*, 1054–1065.
- (25) Liu, H.; Zhang, Y.; Hu, J.; Li, C.; Liu, S. *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *210*, 2125–2137.
- (26) Chen, Y.; Pang, X. H.; Dong, C. M. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 579–586.
- (27) Lee, J. H.; Chen, K. J.; Noh, S. H.; Garcia, M. A.; Wang, H.; Lin, W. Y.; Jeong, H.; Kong, B. J.; Stout, D. B.; Cheon, J.; Tseng, H. R. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52*, 4384–4388.
- (28) Mejia-Ariza, R.; Huskens, J. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 210–216.
- (29) Grana-Suarez, L.; Verboom, W.; Huskens, J. *Chem Commun* **2014**, *50*, 7280–7282.

- (30) Basílio, N.; García-Río, L. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15*, 9315–9319.
- (31) Basílio, N.; Gómez, B.; García-Río, L.; Francisco, V. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19*, 4570–4576.
- (32) Francisco, V.; Basilio, N.; García-Río, L.; Leis, J. R.; Marques, E. F.; Vázquez-Vázquez, C. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6551–6553.
- (33) Guo, D. S.; Wang, K.; Wang, Y. X.; Liu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10244–10250.
- (34) Guo, D.-S.; Liu, Y. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1925–1934.
- (35) Coeur, L.; Amiel, C.; Guigner, J. *Langmuir* **2013**, *29*, 7682–7688.
- (36) Wintgens, V.; Miskolczy, Z.; Guigner, J.-M.; Amiel, C.; Harangozó, J. G.; Biczók, L. *Langmuir* **2015**, *31*, 6655–6662.
- (37) Hu, X.-Y.; Chen, Y.; Liu, Y. *Chinese Chem. Lett.* **2015**, *26*, 862–866.
- (38) Isaacs, L. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2052–2062.
- (39) Cao, L.; Sekutor, M.; Zavalij, P. Y.; Mlinarič-Majerski, K.; Glaser, R.; Isaacs, L. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 988–993.
- (40) Kim, K.; Selvapalam, N.; Ko, Y. H.; Park, K. M.; Kim, D.; Kim, J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 267–279.
- (41) Zhang, J.; Coulston, R. J.; Jones, S. T.; Geng, J.; Scherman, O. A.; Abell, C. *Science* **2012**, *335*, 690–694.
- (42) Appel, E. A.; Dyson, J.; Delbarrio, J.; Walsh, Z.; Scherman, O. A. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51*, 4185–4189.
- (43) Appel, E. a.; Barrio, J. Del; Dyson, J.; Isaacs, L.; Scherman, O. a. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2278–2281.
- (44) Stoffelen, C.; Huskens, J. *Chem. Commun. Chem. Commun* **2013**, *49*, 6740–6742.
- (45) Drinkel, E.; Souza, F. D.; Fiedler, H. D.; Nome, F. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2013**, *18*, 26–34.
- (46) Assays, T. F.; Marquez, C.; Huang, F.; Nau, W. M. *IEEE Trans.Nanobiosci.* **2004**, *3*, 39–45.
- (47) Saleh, N.; Koner, A. L.; Nau, W. M. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 5398–5401.
- (48) Frescura, V. L. A.; Marconi, D. M.; Zanette, D.; Nome, F.; Blask, A.; Bunton, C. A. *J.Phys.Chem* **1995**, *99*, 11494–11500.
- (49) Pessêgo, M.; Moreira, J. A.; Garcia-Rio, L. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18*, 7931–7940.
- (50) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *117*, 4922–4949.
- (51) Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H.-J.; Kim, K. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 621–630.
- (52) Kim, K. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 96–107.
- (53) Tuncel, D.; Steinke, J. H. G. *Macromolecules* **2004**, *37*, 288–302.
- (54) Qu, G.; Cheng, J.; Wei, J. *J Surfact Deterg* **2011**, *14*, 31–35.
- (55) Kalyanasundaram, K. ;Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc* **1977**, *99*, 2039–2044.
- (56) Montenegro, J.; Matile, S. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 681–689.
- (57) St-Jacques, A. D.; Wyman, I. W.; Macartney, D. H. *Chem. Commun.* **2008**, *40*, 4936–4938.



5 Autoagregación de los Calix[4]arenos Catiónicos Anfílicos e Interacción con el Cucurbit[7]urilo

5.1 Introducción

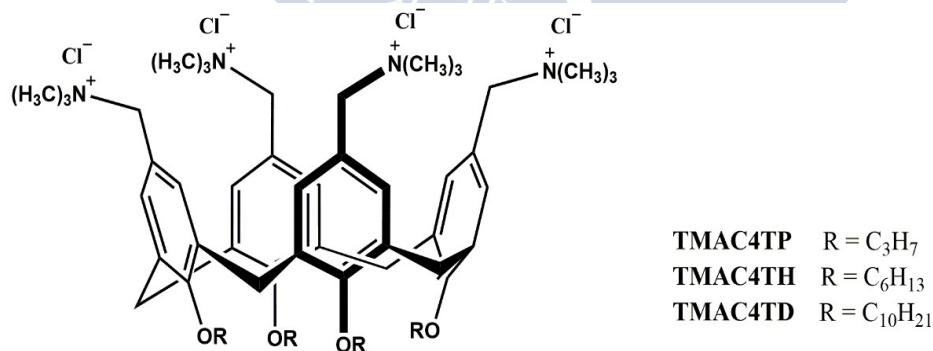
Los surfactantes convencionales son moléculas anfílicas, que constan de una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica, cuya principal característica consiste en su capacidad para adsorberse en superficies e interfaces. Estas moléculas cuando se disuelven en agua tienden a agregarse para formar micelas¹, donde los grupos hidrofóbicos tienden a ser direccionados hacia el interior del agregado, mientras que los grupos hidrofílicos tienden a localizarse en la superficie de estos agregados en contacto directo con el disolvente. Las micelas son el tipo de agregados que se encuentran con más frecuencia en disoluciones acuosas de surfactantes iónicos, se establecen de manera espontánea, cuando la concentración de surfactante en disolución excede la concentración micelar crítica (cmc).

Los calixarenos son macrociclos particularmente atractivos en la construcción de surfactantes, debido a que su modificación química es relativamente sencilla². El grupo de Shinkai fue el pionero en el diseño y síntesis de calixarenos anfílicos³. En su laboratorio se ha demostrado que, los *p*-sulfonatocalix[*n*]arenos modificados con cadenas alquílicas en el portal inferior forman agregados micelares en disolución acuosa. Estos calixarenos anfílicos se distinguen de los surfactantes convencionales, debido a que son capaces de autoasociarse para formar micelas o vesículas, y a mayores constan de cavidades para formar complejos de inclusión con moléculas orgánicas e iones. La naturaleza del grupo de cabeza del calixareno anfílico es un elemento clave en los estudios de autoensamblaje⁴, para la formación de vesículas o micelas en disolución acuosa.

La familia de los CB_n debido a su estructura y potencial electrostático negativo, permite formar complejos de inclusión principalmente con compuestos catiónicos, y dicha complejación está controlada por interacciones ion-dipolo en los portales y por

interacciones hidrofóbicas en su cavidad⁵. La presencia de CB7 en una disolución que contiene micelas origina la existencia de nuevos equilibrios de complejación, con el surfactante o con los contraiones, y, por tanto, esta nueva interacción puede cambiar la concentración micelar crítica (cmc) a valores más altos, alterando la formación de agregados coloidales. La capacidad del CB_n para formar complejos *host:guest* con otras macromoléculas, que habitualmente se usan como *hosts*, sugiere que los calixarenos catiónicos anfifílicos pueden actuar como *guest* en presencia de CB7. En la bibliografía encontramos distintos estudios de complejación entre dos macrociclos^{6,7}, pero destacamos el estudio realizado por el grupo de Isaacs *et al.*⁸ donde se explicó como el CB10 compleja en su interior un calix[4]areno catiónico.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la agregación de los calix[4]arenos catiónicos anfifílicos en disolución acuosa, sustituidos en el portal inferior con cadenas alquílicas de 3, 6 y 10 átomos de carbono y grupos trimetilamonio en su portal superior (Esquema 5.1). Se han utilizado diversas técnicas de caracterización, como la conductividad, espectroscopía de fluorescencia, DOSY, DLS, Crio-TEM...etc, permitiendo conocer el valor de la cmc para el calix[4]areno, así como el tamaño y geometría del agregado. También se presentan los resultados obtenidos para el estudio de complejación entre el CB7 y los calix[4]arenos catiónicos anfifílicos.



Esquema 5.1

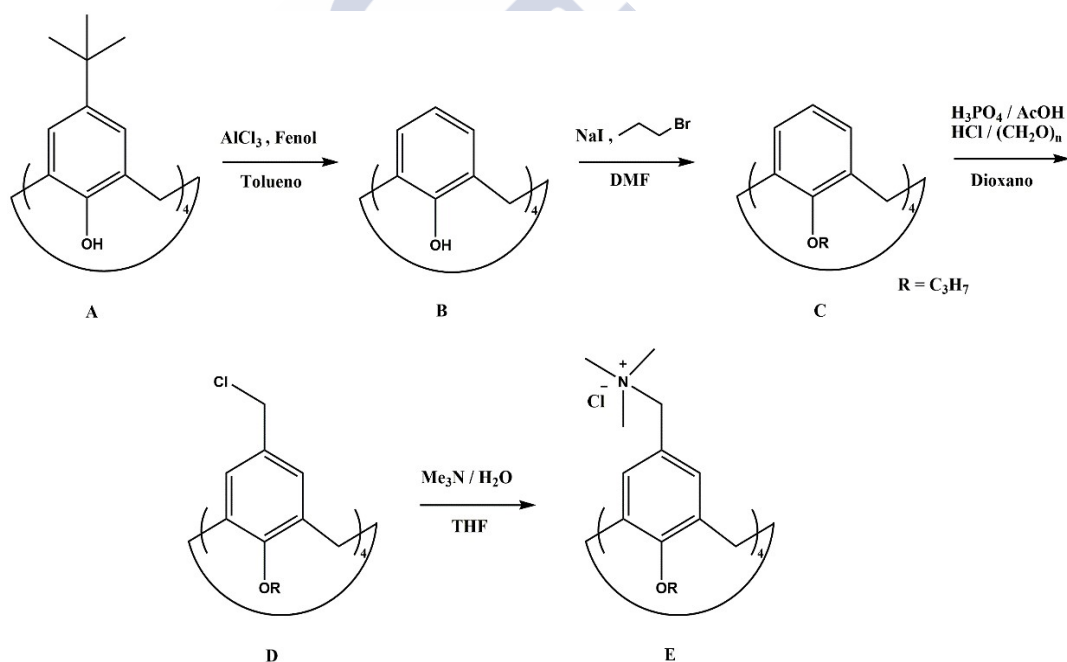
5.2 Sección Experimental

Materiales. Todos los reactivos químicos comerciales fueron adquiridos con la máxima pureza disponible en Sigma-Aldrich y ninguno requiere purificación adicional. Los macrociclos calix[4]arenos catiónicos anfifílicos (TMAC4TP, TMAC4TH y TMAC4TD) y el cucurbit[7]urilo (CB7), fueron sintetizados en el presente estudio. El CB7 se ha

sintetizado de acuerdo con el procedimiento descrito en el capítulo 3. Para la síntesis de los tres calix[4]arenos catiónicos anfífilicos seguimos un método descrito en la bibliografía^{4,9}, que se diferencian entre ambos en el paso de síntesis (compuesto **C**) para la alquilación del portal inferior con el correspondiente bromuro de alquilo (1-bromopropano, 1-bromohexano y 1-bromodecano) para obtener el TMAC4TP, TMAC4TH y TMAC4TD, respectivamente.

A modo resumen, se presenta una descripción detallada del procedimiento experimental realizado para la síntesis del calix[4]areno catiónico sustituido en el portal inferior con cadenas alquílicas de 3 átomos de carbono (TMAC4TP).

Síntesis del 5,11,17,23-Tetrakis(trimetilamonioetil)-25,26,27,28-tetra-*n*-propiloxi calix[4]areno tetracloruro (TMAC4TP)



Esquema 5.2

Síntesis y caracterización del compuesto B. En un balón redondo de 500 mL se disolvió *p-tert*-butilcalix[4]areno comercial (**A**) (10 g, 15.4 mmol) y fenol (8.7 g, 92.4 mmol) 250 mL de tolueno seco. A la disolución resultante se le añadió AlCl_3 (16.4 g, 123 mmol), se agitó la mezcla de reacción durante 6 h a 60°C bajo atmosfera de argón. Una vez enfriada, se añadió 200 mL de HCl (3%) y se agitó por 30 min. Se separó la fase orgánica de la fase acuosa, se secó la fase orgánica con Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad resultando

un residuo semisólido. Al residuo semisólido se añadió MeOH, formándose un precipitado blanco y se filtró. Se recrystalizó de CHCl₃/MeOH. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 10.20 (s, 4H), 7.05 (d, 8H), 6.73 (t, 4H), 4.24 (s (ancho), 4H), 3.55 (s (ancho), 4H).

Síntesis y caracterización del compuesto C. En un balón de 250 mL se colocaron 60 ml de DMF seca y se añadió el compuesto **B** (4.92 g, 11.59 mmol). A la disolución anterior se le adicionó NaH (60 % en aceite mineral, 2.09 g, 52.15 mmol), previamente lavado con hexano seco. Se agitó la mezcla de reacción durante 30 min a 60°C. Una vez enfriada hasta 30°C, se añadió lentamente 1-bromopropano (4.73 mL, 52.15 mmol) y se agitó durante 12 h a 30°C. La reacción se monitorizó por ¹H RMN y se añadió NaH y una cantidad equivalente de 1-bromopropano hasta la completa alquilación. Se paró la reacción con la adición de 300 mL de agua y se extrajo el producto con CHCl₃, se secó y evaporó la fase orgánica. El precipitado blanco se recrystalizó en acetonitrilo. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 6.58 (m, 12H), 4.45 (d, 4H), 3.85 (t, 8H), 3.15 (d, 4H), 1.93 (m, 8H), 0.99 (t, 12H).

Síntesis y caracterización del compuesto D. En un balón de 500 mL se disolvió el compuesto **C** (3.16 g, 5.34 mmol) en 150 mL de dioxano. A la disolución resultante se le adicionó paraformaldehído (3.36 g, 112 mmol), ácido fosfórico (38 mL), ácido acético (38 mL), y se agitó durante 2 h a 80°C, después se adicionó el ácido clorhídrico (38 mL) y se dejó durante 16 h. Se concentró la mezcla de reacción hasta aproximadamente sequedad, se añadió 50 mL agua fría y se extrajo con CHCl₃. Se realizaron varios lavados de la fase orgánica con agua y con una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó hasta sequedad, resultando un aceite. A este aceite se le adicionó MeOH formándose un precipitado blanco, que se recrystalizó en acetonitrilo. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 6.65 (s, 8H), 4.41 (d, 4H), 4.3 (s, 8H), 3.84 (t, 8H), 3.14 (d, 4H), 1.91 (m, 8H), 0.98 (t, 12H).

Síntesis y caracterización del compuesto E. En un balón de 250 mL se disolvió el compuesto **D** (2.64 g, 3.36 mmol) en 80 mL de THF. A la disolución resultante se le añadió trimetilamina (45% en agua, 22 mL, 140 mmol) y se agitó durante 24 h a temperatura ambiente bajo atmosfera de argón. Se evaporó hasta sequedad, resultando un

aceite que precipitó con adición de acetona. Se recristalizó en metanol/acetona y se obtuvo el producto puro (TMAC4TP).

Los calix[4]arenos catiónicos anfífilos sintetizados en este capítulo se han identificado por ^1H RMN. **TMAC4TP** ^1H RMN (400 MHz, D_2O , ppm): $\delta = 6.97$ (s, 8H, ArH), 4.61 (d, 4H, Ar- CH_2 -Ar), 4.22 (s, 8H, Ar- CH_2 -N), 4.04 (t, 8H, Ar-O- CH_2), 3.45 (d, 4H, Ar- CH_2 -Ar), 2.92 (s, 36H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 2.03 (m, 8H, - CH_2 - CH_2 -O), 1.05 (t, 12H, CH_3 - CH_2 -). **TMAC4TH** ^1H RMN (400 MHz, D_2O , ppm): $\delta = 6.96$ (s, 8H, ArH), 4.59 (d, 4H, Ar- CH_2 -Ar), 4.21 (s, 8H, Ar- CH_2 -N), 4.07 (t, 8H, Ar-O- CH_2), 3.45 (d, 4H, Ar- CH_2 -Ar), 2.92 (s, 36H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 2.02 (m, 8H, - CH_2 - CH_2 -O), 1.54 (m, 8H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 -O), 1.43 (m, 16H, alquil- CH_2), 0.95 (t, 12H, CH_3 - CH_2 -). **TMAC4TD** ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6 , ppm): $\delta = 6.88$ (s, 8H, ArH), 4.48 (s, 8H, Ar- CH_2 -N), 4.37 (d, 4H, Ar- CH_2 -Ar), 3.89 (t, 8H, Ar-O- CH_2), 3.32 (d, 4H, Ar- CH_2 -Ar), 2.94 (s, 36H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 1.88 (m, 8H, - CH_2 - CH_2 -O-Ar), 1.32 (m, 56H, alquil- CH_2), 0.85 (t, 12H, CH_3 - CH_2 -).

Conductividad. La conductividad eléctrica (κ) se midió con un conductímetro Crison GLP 32. La temperatura se mantiene constante por medio de un baño de agua termostatzado a 25°C y el error en la exactitud de las medidas fue del 0.5%. Las disoluciones se prepararon con agua Milli-Q y el estudio de la variación de la conductividad eléctrica con la concentración, ha sido realizado mediante la adición de volúmenes conocidos de una disolución concentrada de los calix[4]arenos (TMAC4TP, TMAC4TH y TMAC4TD). La conductividad eléctrica se utilizó para la determinación del valor de la concentración micelar crítica (cmc).

Estudio espectrofluorimétrico. Todos los espectros de fluorescencia se registraron en el fluorímetro Cary Eclipse a 25°C. Los espectros de fluorescencia del 1,8-ANS (ácido 1-naftaleno-8-anilino sulfónico) en disolución acuosa y en presencia de distintas concentraciones de calix[4]areno (TMAC4TP, TMAC4TH, TMAC4TD, TC4 y SC4TH) se realizaron a una longitud de onda de excitación de 350 nm. En los experimentos realizados en el sistema CB7/TMAC4TD se registraron los cambios en el espectro de fluorescencia de 1,8-ANS variando la concentración de TMAC4TD y manteniendo constante la concentración de CB7. La concentración de 1,8-ANS se mantiene constante en 5×10^{-6} M para todos los estudios. Los espectros de fluorescencia del rojo nilo (NR) y del Prodan se realizaron en disolución acuosa y en presencia de distintas concentraciones del TMAC4TD. La longitud de onda de excitación utilizada para los espectros del NR es

de 550 nm, manteniendo constante su concentración 2.7×10^{-6} M, mientras que para los espectros del Prodan se realizaron a 343 nm y su concentración se mantuvo constante en 1.23×10^{-5} M.

Experimentos de RMN. Las disoluciones madre se prepararon en D₂O. Los espectros de DOSY fueron adquiridos por el mismo aparato, mediante experimentos de eco spin con pulsos de gradientes bipolares. Se aplicaron gradientes rectangulares (G) con 2 ms de duración (δ), variando la potencia de los mismos entre 4 a 65 cm^{-1} en 20 pasos. El tiempo de difusión, Δ , de los experimentos fue optimizado para cada muestra de modo que la intensidad de las señales disminuyera cerca del 95% para el gradiente máximo. Los datos fueron procesados mediante el programa MestReC (*Mestrelab Research Inc.*).

DLS (Dynamic Light Scattering). Los diámetros hidrodinámicos de las micelas del TMAC4TD y de las vesículas formadas por CB7/TMAC4TD se determinaron con un aparato de Malvern-ZetaSizer (Nano ZS90), que utiliza la dispersión dinámica de la luz en un ángulo de dispersión de 90° para medir el tamaño de partícula. Esta técnica mide la difusión de partículas en movimiento Browniano, y convierte este valor a tamaño y a una distribución de tamaño utilizando la relación de Stokes-Einstein. Las mediciones se realizaron en modo automático a 25°C y se evaluaron con un estándar gaussiano.

Cryo-TEM. Las imágenes para las vesículas formadas por la mezcla CB7/TMAC4TD se obtuvieron usando un microscopio crio-electrónico Jeol JEM 2011 operando a 200 kV, bajo condiciones de dosis bajas, y utilizando diferentes grados de desenfoque (500-900 nm) para obtener un contraste de fase adecuado. Las imágenes fueron grabadas con una cámara Gatan Ultrascan US1000 CCD y fueron adquiridas y analizadas con el Digital Micrograph 1.8.

5.3 Resultados y Discusión

5.3.1 Autoagregación de los Calix[4]arenos Catiónicos Anfílicos

La determinación de la concentración micelar crítica (cmc) para los agregados micelares formados de manera espontánea por los calix[4]arenos catiónicos anfílicos (TMAC4TP, TMAC4TH y TMAC4TD), puede ser determinada mediante el seguimiento

de una propiedad del sistema, como la conductividad, y también mediante la espectroscopia de fluorescencia, con ayuda de una sonda fluorescente sensible a los cambios de polaridad, ambos estudios se realizan en función de la concentración de calix[4]areno. En nuestro laboratorio se ha demostrado a través de un estudio termodinámico que, los p-sulfonatocalix[n]arenos (SCn) modificados en el portal inferior con cadenas alquílicas de distintos tamaños, pueden formar agregados micelares en disolución acuosa¹⁰.

5.3.1.1 Método conductivimétrico

La conductividad es una de las técnicas más comunes para estudiar la autoagregación de los surfactantes iónicos. A partir de esta técnica se puede obtener directamente dos propiedades características de los agregados micelares: el valor de la concentración micelar crítica (cmc) y la fracción de carga micelar neutralizada (β). El principio del método¹¹ se basa en que, a concentraciones de surfactante inferiores a la cmc, éste se comporta como un simple electrolito, por lo que la conductividad (κ) aumenta linealmente con la concentración de surfactante. Por encima de la cmc, la concentración de monómeros de surfactante se mantiene prácticamente constante, por lo que el incremento de surfactante en esta región resulta casi exclusivamente en un incremento de la concentración micelar y de contraiones. En el agregado micelar, las posibles repulsiones entre las cargas de las moléculas de surfactante son apantalladas por la incorporación de contraiones en el agregado, consiguiendo que la carga micelar se encuentre parcialmente neutralizada. De este modo, la conductividad de la disolución por encima de la cmc, se incrementa con una menor pendiente que la observada en ausencia de micelas. Por tanto, la cmc puede ser determinada a través de la intersección entre dos rectas trazadas a partir de las medidas conductivimétricas obtenidas a concentraciones por debajo y por encima de la concentración micelar crítica.

En la Figura 5.1 se muestran los datos conductivimétricos obtenidos para los distintos calix[4]arenos catiónicos tetraalquilados con cadenas de 3, 6 y 10 átomos de carbono en el portal inferior. A partir de la intersección de las dos rectas se determinó el valor de la cmc para los distintos calixarenos estudiados. Además, con los datos conductivimétricos también se puede obtener la fracción de carga micelar neutralizada (β). Los valores obtenidos para las cmc's y para β se muestran en la Tabla 5.1. Debido a que la variación de la conductividad con respecto a la concentración de surfactante

aumenta linealmente antes y después de la cmc, se determinó el valor de la pendiente pre-micelar (S_1) y de la pendiente post-micelar (S_2) a partir del ajuste lineal de los datos conductivimétricos. El cociente entre las pendientes es igual al grado de ionización de las micelas ($\alpha = S_2/S_1$)^{12,13}, y el valor de β se obtiene a partir de la relación $\beta = 1-\alpha$, el cual también se puede definir como el grado de unión de los contraiones a la micela.

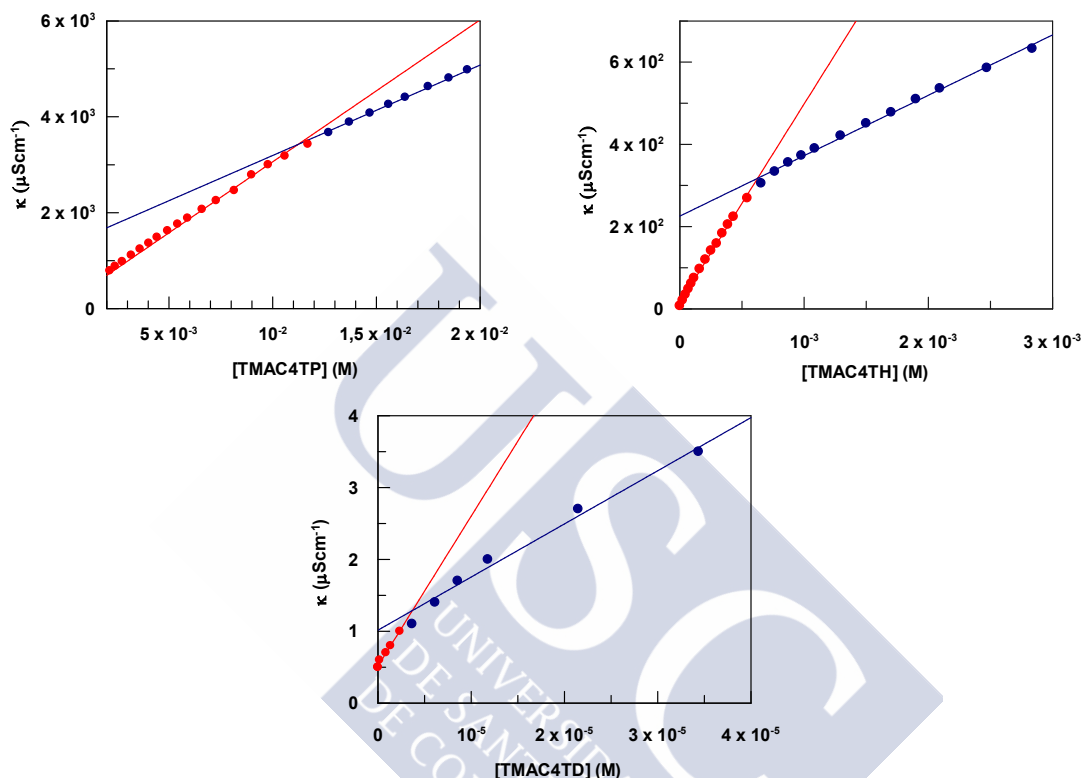


Figura 5.1 : Determinación de la cmc a partir de la conductividad en función de la concentración de TMAC4TP, TMAC4TH y TMAC4TD. T = 25°C.

Como se puede observar en la Tabla 5.1, los valores de la fracción de carga micelar neutralizada (β) aumentan al incrementar la longitud de la cadena alquílica de los calix[4]arenos, siendo la diferencia más notable el valor de β para el TMAC4TP con respecto a los otros dos calixarenos (TMAC4TH y TMAC4TD), cuyos valores permanecen prácticamente constantes. Esto indica que la hidratación del grupo de cabeza cambia con el incremento de las cadenas alquílicas, lo que se ha atribuido a un cambio en la densidad de carga en la superficie de la micela¹². A medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica mayor es el grado de compacidad del agregado y más contraiones son atraídos a la capa de Stern alrededor de las “cabezas” del surfactante, lo que resulta en el aumento de la fracción de carga micelar neutralizada (β)¹⁴. Los valores de β para nuestros

calix[4]arenos son ligeramente inferiores a los observados habitualmente para los surfactantes alquiltrimetilamonio de cadena sencilla¹⁵.

Tabla 5.1 : Valores obtenidos para la concentración micelar crítica (cmc) y la fracción de carga micelar neutralizada (β) a partir de los datos conductivimétricos para la agregación de los calix[4]arenos catiónicos anfífilicos 25°C.

Surfactante	cmc (M)	β
TMAC4TP	1.2×10^{-2}	0.36
TMAC4TH	6×10^{-4}	0.69
TMAC4TD	3×10^{-6}	0.65

Nota: el β fue calculado a partir de $\alpha = S_2/S_1$.

5.3.1.2 Influencia de la estructura de los surfactantes sobre la energía libre de micelización (ΔG_M^0) en el proceso de agregación

Los calix[4]arenos catiónicos anfífilicos estudiados se comportan como surfactantes, y se diferencian entre ellos en la longitud de las cadenas alquílicas, por tanto, se puede obtener información acerca de cómo influye el tamaño de las cadenas alquílicas en el proceso de micelización para esta clase especial de surfactantes.

A partir del método de conductividad para los distintos surfactantes (TMAC4TP, TMAC4TH y TMAC4TD) obtuvimos los valores para la cmc y la fracción de carga micelar neutralizada de los contraiones a la micela (β), utilizando estos valores para determinar la energía libre de micelización (ΔG_M^0) para los distintos surfactantes iónicos. En los estudios de surfactantes con más de una cadena alquílica, los resultados suelen presentarse en unidades de *mol de cadenas alquílicas/dm³* de disolución (los parámetros expresados con estas unidades se indican con un *). De acuerdo con la ecuación general propuesta por Zana¹⁶ para un surfactante iónico, $A_j^{iz_s}$, con i grupos cargados con valencia z_s , j cadenas alquílicas conectadas por algunos grupos puente, y contraiones con valencia z_c , la ΔG_M^{0*} viene dada por la siguiente ecuación expresada en *kJ por mol de cadenas alquílicas/dm³*:

$$\Delta G_M^{0*} = RT \left(\frac{1}{j} + \beta \frac{i}{j} \left| \frac{z_s}{z_c} \right| \right) \ln cmc^* + RT \left(\frac{i}{j} \left| \frac{z_s}{z_c} \right| \beta \ln \frac{i}{j} \left| \frac{z_s}{z_c} \right| - \frac{\ln j}{j} \right) \quad (5.1)$$

donde R (kJ/mol K) y T (K) son la constante de los gases ideales y la temperatura, respectivamente; y la cmc^* es la concentración micelar crítica en unidades de *moles de cadenas alquílicas/dm³*, donde sabemos que $cmc^* = jcmc$. Para el caso específico de los surfactantes estudiados en este capítulo la ecuación (5.1) se puede escribir como:

$$\Delta G_M^{0*} = RT \left(\frac{1}{j} + \beta \right) \ln cmc^* - RT \frac{\ln j}{j} \quad (5.2)$$

Por otra parte, también se puede calcular la ΔG_M^0 en unidades molares, donde la ecuación (5.1) se reduce a la siguiente:

$$\Delta G_M^0 = RT(1 + \beta i) \ln cmc + RT(\beta i \ln i) \quad (5.3)$$

Debemos destacar, que la aplicación de la ecuación (5.3) solo es útil en el sentido de confirmar el cálculo efectuado por la ecuación (5.1) o viceversa, sabiendo que se relaciona $\Delta G_M^0 = j \Delta G_M^{0*}$. Los valores obtenidos de ΔG_M^{0*} y ΔG_M^0 a partir de las ecuaciones (5.2) y (5.3), respectivamente, se presentan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2 : Valores obtenidos para las cmc 's, la fracción de carga micelar neutralizada (β) y la energía libre de micelización (ΔG_M^0), a partir del estudio conductivimétrico de la agregación de los distintos calix[4]arenos anfífilicos a 25°C.

Surfactante	nU/nC	β	cmc / cmc^* (M)	$\Delta G_M^0 / \Delta G_M^{0*}$ (kJ.mol ⁻¹)
TMAC4TP	4/3	0.36	$1.2 \times 10^{-2} / 4.8 \times 10^{-2}$	-21.79 / -5.44
TMAC4TH	4/6	0.69	$6 \times 10^{-4} / 2.4 \times 10^{-3}$	-59.63 / -14.91
TMAC4TD	4/10	0.65	$3 \times 10^{-6} / 1.2 \times 10^{-5}$	-104.48 / -26.12

(Nota: nU es el número de unidades que se repiten en la estructura del calix[4]areno, que es igual al número de cadenas alquílicas por molécula, y nC es el número de átomos de carbono por cadena alquílica).

5.3.1.3 Influencia de la longitud de la cadena alquílica en el proceso de micelización de los calix[4]arenos catiónicos anfífilicos

La relación entre la concentración micelar crítica (cmc) de un surfactante en disolución y su energía libre de micelización (ΔG_M^0) es probablemente la más utilizada en la ciencia de los surfactantes. La cmc de los calix[4]arenos catiónicos anfífilicos decrece

al incrementar la longitud de la cadena alquílica como se puede observar en la Tabla 5.2. La dependencia del $\log cmc^*$ sobre el número de átomos de carbono (nC) en la cadena alquílica ha sido descrita por la regla de Klevens a través de la siguiente ecuación^{17,18}:

$$\log cmc^* = A - BnC \quad (5.4)$$

donde A varía ampliamente y depende del grupo de cabeza, temperatura y tipo de contraión, mientras que el parámetro B representa la contribución de cada grupo metileno en la disminución de la cmc por la cadena alquílica. En la Figura 5.2 se representa el $\log cmc^*$ frente al número de carbonos en la cadena alquílica (nC) para los tres calix[4]arenos estudiados y se obtiene un ajuste lineal de los datos, cuyos valores de la ordenada en el origen y la pendiente son de $A = 0.33 \pm 0.14$ y $B = -0.52 \pm 0.02$, respectivamente.

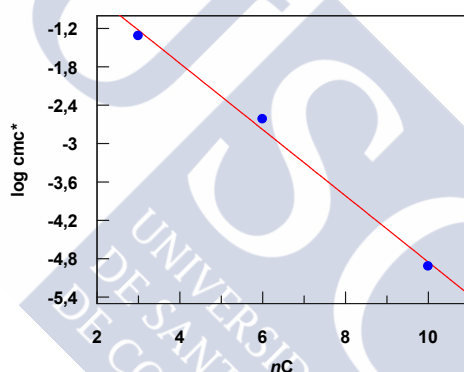


Figura 5.2 : Variación del $\log cmc^*$ con el número de átomos de carbono en la cadena alquílica (nC) para los distintos calix[4]arenos alquilados. La línea roja representa el mejor ajuste de los datos experimentales.

El valor de B es negativo, lo que refleja que las interacciones hidrofóbicas contribuyen favorablemente a la disminución de ΔG_M^{0*} . Que se obtenga un valor negativo para la pendiente es un comportamiento generalmente observado para las distintas clases de surfactantes¹⁹. El valor de A es positivo, lo que indica que la transferencia del grupo hidrófilo desde el seno de la disolución acuosa hacia la pseudofase micelar contribuye de forma desfavorable al proceso de micelización, siendo este comportamiento similar a la mayoría de los surfactantes. En nuestro caso el parámetro A engloba la contribución de los grupos iónicos, de los anillos aromáticos, de los átomos de oxígeno que conectan las cadenas alquílicas a los anillos y de los grupos CH_2 del puente. Si lo comparamos con los surfactantes de cadena sencilla lineal, el grupo CH_2 y los anillos aromáticos deben de contribuir favorablemente a la formación de micelas mediante interacciones hidrofóbicas,

CH- π y de tipo apilamiento π , mientras que los grupos iónicos y polares (oxígenos) deben contribuir desfavoreciendo el proceso de micelización. Por tanto, debido a que el valor del parámetro A es positivo sugiere que la repulsión de los grupos iónicos y los grupos polares predomina con respecto a las interacciones hidrofóbicas para el proceso de agregación.

El valor de la energía libre de micelización (ΔG_M^{0*}) es proporcional al $\log \text{cmc}^*$, por tanto se espera que ΔG_M^{0*} disminuya al incrementarse el número de átomos de carbono (nC) en la cadena alquílica. En la Figura 5.3 se presentan los valores obtenidos de ΔG_M^{0*} obtenidos para los distintos calix[4]arenos frente a nC .

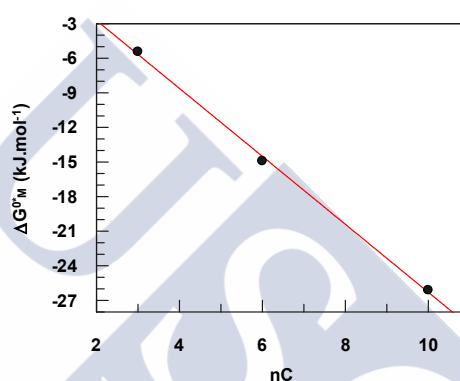


Figura 5.3 : Variación del parámetro termodinámico ΔG_M^{0*} con el número de átomos de carbono en la cadena alquílica (nC) para los derivados de calix[4]areno anfífilos. La línea representa el mejor ajuste de los datos experimentales.

En nuestro caso, ΔG_M^{0*} se puede escribir como la ecuación de Gibbs, es decir, como el sumatorio de todas las contribuciones que cada grupo específico del calix[4]areno aporta a las interacciones que se establecen durante la formación de la micela:

$$\Delta G_M^{0*} = \Delta G_M^{0*}(I) + \Delta G_M^{0*}(Ar) + \Delta G_M^{0*}(O) + \Delta G_M^{0*}(P) + (n-1)C\Delta G_M^{0*}(CH_2) + \Delta G_M^{0*}(CH_3) \quad (5.5)$$

Donde I representa los grupos iónicos y contraiones, Ar los anillos aromáticos, O el oxígeno que conecta las cadenas alquílicas con los anillos, P el CH_2 del puente, CH_2 los carbonos secundarios de la cadena alquílica y CH_3 el carbono terminal. En un estudio sobre la solubilidad de alcanos en agua realizado por M.Rosen²⁰, se demostró que la $\Delta G_M^{0*}(CH_3)$ no cambia con el aumento de la longitud de la cadena alquílica, y se puede representar como $\Delta G_M^{0*}(CH_3) = \Delta G_M^{0*}(CH_2) + k$, donde k es una constante. A partir de esta igualdad podemos expresar la ecuación (5.5) de la siguiente forma:

$$\Delta G_M^{0*} = \Delta G_M^{0*}(I) + \Delta G_M^{0*}(Ar) + \Delta G_M^{0*}(O) + \Delta G_M^{0*}(P) + k + nC\Delta G_M^{0*}(CH_2) \quad (5.6)$$

Por tanto, cuando representamos los valores de ΔG_M^{0*} frente a nC (ver Figura 5.3), se obtiene una recta del tipo $\Delta G_M^{0*} = A - BnC$, donde $B = \Delta G_M^{0*}(CH_2)$ y A incluye todos los demás parámetros de la ecuación (5.6). A partir del ajuste lineal de los datos experimentales, se ha determinado para la pendiente (B) un valor de -2.95 ± 0.09 kJ/mol, que se corresponde con la energía libre de micelización para transferir un grupo CH_2 desde el seno acuoso de la disolución hacia la pseudofase micelar ($\Delta G_M^{0*}(CH_2)$), mientras que el valor para la ordenada en el origen (A) es de 3.17 ± 0.69 kJ/mol. Esto significa que las interacciones entre las cadenas alquílicas (hidrofóbicas y de van der Waals) contribuyen favorablemente a la energía libre de micelización, y contribuyen con valores relativos de 42%, 79% y 88% para el TMAC4TP, TMAC4TH y TMAC4TD, respectivamente. La contribución del porcentaje restante viene dada por el balance de las interacciones favorables (contribuciones del puente CH_2 y de los anillos aromáticos) y desfavorables (repulsiones entre grupos iónicos y polares) incluidas en el parámetro A , predominan las interacciones desfavorables debido a su valor positivo.

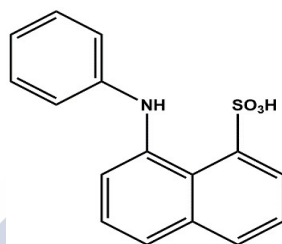
Si comparamos el valor obtenido para $\Delta G_M^{0*}(CH_2) = -2.95 \pm 0.09$ kJ/mol en nuestro caso, con el mencionado en la bibliografía para los surfactantes convencionales^{15,16} ($\Delta G_M^{0*}(CH_2) = -3.35 \pm 0.20$ kJ/mol), observamos que es ligeramente inferior. Por tanto, el valor de $\Delta G_M^{0*}(CH_2)$ obtenido para los derivados de calix[4]areno catiónicos anfílicos puede sugerir la posibilidad de que estos compuestos establezcan interacciones hidrofóbicas intramoleculares entre las cadenas alquílicas (debido a su conformación de cono), en su estado monomérico, disminuyendo la variación energética asociada con la transferencia del surfactante desde el medio acuoso hacia el interior del agregado micelar.

5.3.2 Fluorescencia de emisión de distintas sondas en presencia de calix[4]arenos catiónicos anfílicos

5.3.2.1 Sonda fluorescente 1,8-ANS

En este apartado se estudia el comportamiento de la fluorescencia de emisión con los distintos calix[4]arenos catiónicos anfílicos (TMAC4TP, TMAC4TH y TMAC4TD), utilizando como sonda fluorescente el ácido 1-naftaleno-8-anilino sulfónico

(1,8-ANS, ver Esquema 5.3). La principal característica de esta sonda es la alta sensibilidad a los cambios de polaridad^{21,22}, es mínimamente fluorescente en medios polares, como las disoluciones acuosas, pero extremadamente fluorescente en medios no polares, tales como sistemas organizados y agregados micelares^{23,24}. Esta propiedad es de gran importancia, debido a que el 1,8-ANS es ampliamente utilizado para investigar propiedades de proteínas, bicapas lipídicas, vesículas, receptores supramoleculares y sistemas de autoensamblaje.



Esquema 5.3

En principio, el substrato (1,8-ANS) puede ser susceptible de inclusión en los calix[4]arenos catiónicos anfifílicos, tanto por la parte catiónica como por la parte hidrofóbica de las cadenas alquílicas. Inicialmente se muestra el comportamiento de fluorescencia del 1,8-ANS con los calixarenos conjuntamente, para verificar donde se encuentra localizada la sonda, y posteriormente analizamos el comportamiento de cada macrociclo por separado.

En la Figura 5.4 se muestra la influencia de la concentración de los distintos calixarenos en la intensidad de fluorescencia de emisión del 1,8-ANS. Como se puede observar, a medida que aumenta la concentración de los calixarenos en presencia de la sonda, se produce un aumento de la intensidad, debido a que la sonda se encuentra en un ambiente más hidrofóbico, y dicho aumento de la intensidad se produce antes de la cmc de cada calixareno (ver Tabla 5.1). Cabe destacar que los macrociclos empleados en este estudio, tienen en común el grupo trimetilamonio del borde superior y se diferencian en la longitud de sus cadenas alquílicas del borde inferior. A partir del análisis de los resultados obtenidos vemos que el comportamiento de la fluorescencia con los distintos calixarenos no es el mismo, por tanto, podemos considerar que la interacción del 1,8-ANS con los calixarenos se produce por la parte hidrofóbica de las cadenas alquílicas. En el caso del TMAC4TD y del TMAC4TH, se necesita una menor cantidad de calixareno para que se produzca un cambio apreciable en la intensidad de fluorescencia en

comparación con el TMAC4TP, esto puede ser debido a que la longitud de las cadenas alquílicas es mayor y se incrementa su carácter hidrofóbico, por lo que la sonda tiene una mayor afinidad por el TMAC4TD y el TMAC4TH, en comparación con el TMAC4TP.

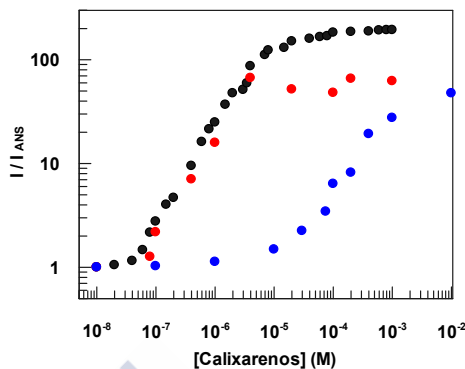


Figura 5.4 : Influencia de la concentración de calix[4]areno sobre la intensidad de fluorescencia normalizada del 1,8-ANS (I/I_{ANS}) a 500 nm y 25°C. (●) TMAC4TD, (●) TMAC4TH y (●) TMAC4TP.

Posteriormente, considerando que la sonda interacciona con los calix[4]arenos catiónicos anfífilos por las cadenas alquílicas, nos centramos en el comportamiento de la fluorescencia para cada macrociclo por separado. La influencia del TMAC4TP, del TMAC4TH y del TMAC4TD en el espectro de fluorescencia de emisión del 1,8-ANS se encuentra representada en las Figura 5.5, Figura 5.6 y Figura 5.7, respectivamente.

Como era de esperar, para los tres casos la intensidad de fluorescencia (I/I_{ANS}) aumenta y el máximo de la banda de emisión se desplaza hacia longitudes de onda (λ_{max}) menores a medida que aumenta la concentración de calixareno, debido a la inclusión de la sonda en las cadenas alquílicas de los macrociclos²⁵. Sin embargo, un análisis detallado de la influencia de los distintos calixarenos en λ_{max} y la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{ANS}) antes de la cmc demuestra que su variación no es sincronizada, es decir, da como resultado una capa de solvatación no homogénea alrededor de la sonda que se refleja en sus propiedades de fluorescencia.

Una estimación aproximada para el caso del TMAC4TP, muestra que a una concentración de 1×10^{-4} M se ha observado casi el 85% del cambio general en λ_{max} , sin embargo, sólo se ha alcanzado el 7% del cambio global en la intensidad de fluorescencia en estas condiciones experimentales.

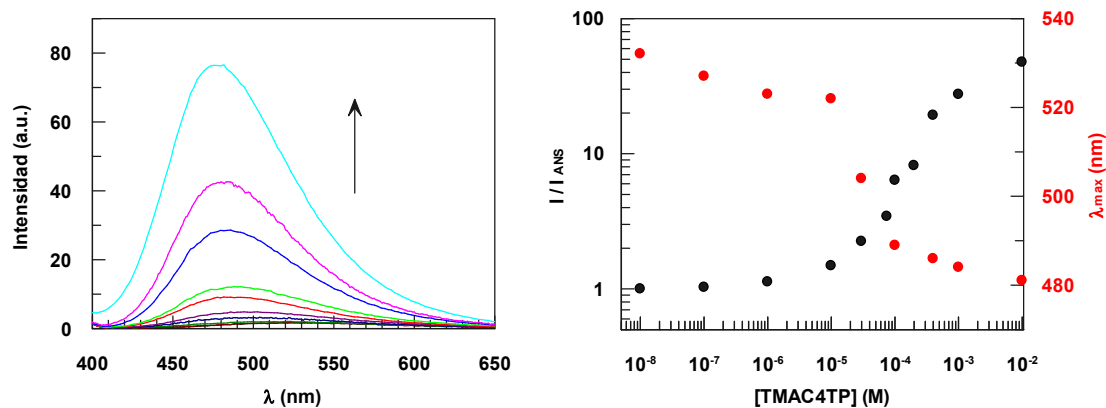


Figura 5.5 : (Izquierda) Influencia de la concentración del TMAC4TP en el espectro de fluorescencia del [1,8-ANS] = 5×10^{-6} M, mostrando un aumento de la intensidad de fluorescencia. (Derecha) Representación gráfica de la longitud de onda máxima (λ_{\max}) y la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{500}) a 500 nm frente a la concentración de TMAC4TP.

Para el caso del TMAC4TH a una concentración de aproximadamente 4×10^{-7} M, se ha observado casi el 94% del cambio global en λ_{\max} , mientras que sólo se ha alcanzado el 10% del cambio global en la intensidad de fluorescencia en estas condiciones experimentales.

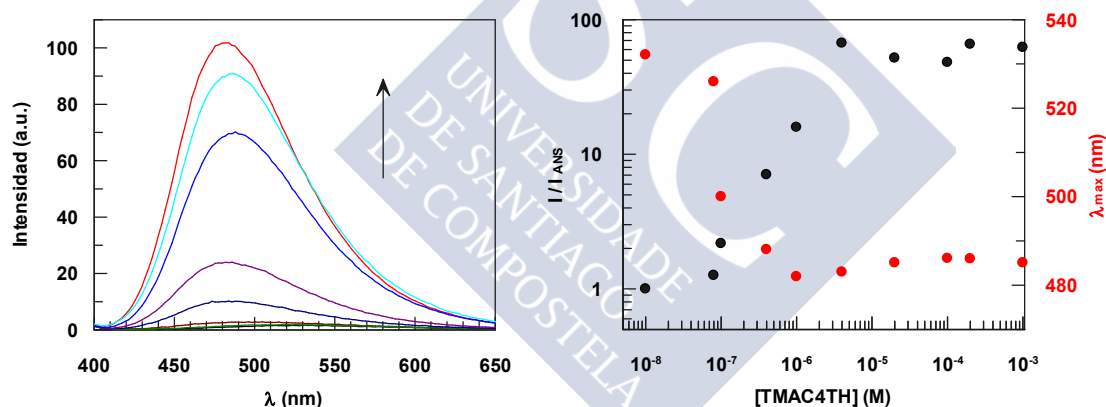


Figura 5.6 : (Izquierda) Influencia de la concentración del TMAC4TH en el espectro de fluorescencia del [1,8-ANS] = 5×10^{-6} M, mostrando un aumento de la intensidad de fluorescencia. (Derecha) Representación gráfica de la longitud de onda máxima (λ_{\max}) y la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{500}) a 500 nm frente a la concentración de TMAC4TH.

Por último, para el TMAC4TD se ha observado a una concentración de 2×10^{-7} M se da el 70% del cambio general en λ_{\max} , mientras que el cambio global en la intensidad de fluorescencia es de sólo el 2% en dichas condiciones experimentales.

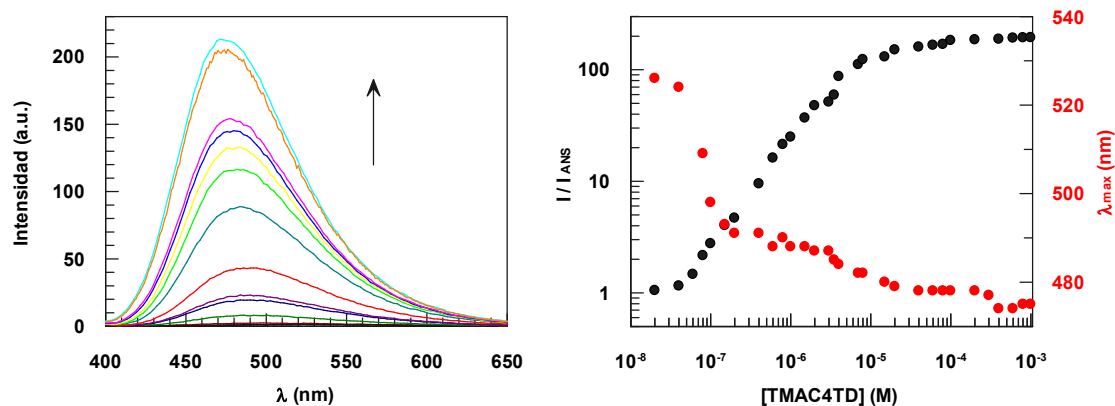


Figura 5.7 : (Izquierda) Influencia de la concentración del TMAC4TD en el espectro de fluorescencia del [1,8-ANS] = 5×10^{-6} M, mostrando un aumento de la intensidad de fluorescencia. (Derecha) Representación gráfica de la longitud de onda máxima (λ_{\max}) y la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{500}) a 500 nm frente a la concentración de TMAC4TD.

Por tanto, podemos concluir que la variación no sincronizada de λ_{\max} y de la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{500}) para los tres calix[4]arenos catiónicos anfífilos antes de la cmc, puede ser explicada considerando la formación de un complejo *host:guest* 1:1, donde el grupo anilino de la sonda se introduce en las cadenas alquílicas hidrofóbicas del calixareno, resultando un cambio importante en la λ_{\max} pero casi sin afectar a la intensidad de fluorescencia. Además, debido a que el cambio ocurre antes de la cmc, podemos considerar que el macrociclo actúa como una “micela unimolecular”. El aumento adicional de la concentración de calixareno produce un aumento de la intensidad de fluorescencia, lo que puede ser debido a la formación de un complejo 2:1, donde el segundo calixareno se une al grupo naftaleno de la sonda también por las cadenas alquílicas.

En resumen, los resultados experimentales para los calixarenos estudiados indican que la incorporación del grupo anilino en las cadenas alquílicas del macrociclo induce el desplazamiento de la banda de emisión (λ_{\max}), mientras que la complejación del grupo naftaleno por las cadenas alquílicas de un segundo macrociclo forma el complejo 2:1, induciendo un aumento de la intensidad de fluorescencia.

A mayores se hizo un estudio de la fluorescencia de emisión del 1,8-ANS con calix[4]arenos anfífilos modificados en el portal superior, para comparar su comportamiento con los catiónicos funcionalizados con grupos trimetilamonio. En primer lugar, vamos a comparar los calix[4]arenos catiónicos con cadenas alquílicas propil que se diferencian en el grupo funcional del portal superior, uno con grupo trimetilamonio

(TMAC4TP) y otro con el grupo 1-trimetilamonio-2-dimetilaminoetano (TC4, caracterizado y estudiado en el capítulo siguiente).

En la Figura 5.8 se muestra la influencia de los distintos calixarenos catiónicos en la intensidad de fluorescencia de emisión del 1,8-ANS antes de la cmc para cada calixareno, cuyo valor para el TMAC4TP es de 12mM y para el TC4 de aproximadamente 3mM.

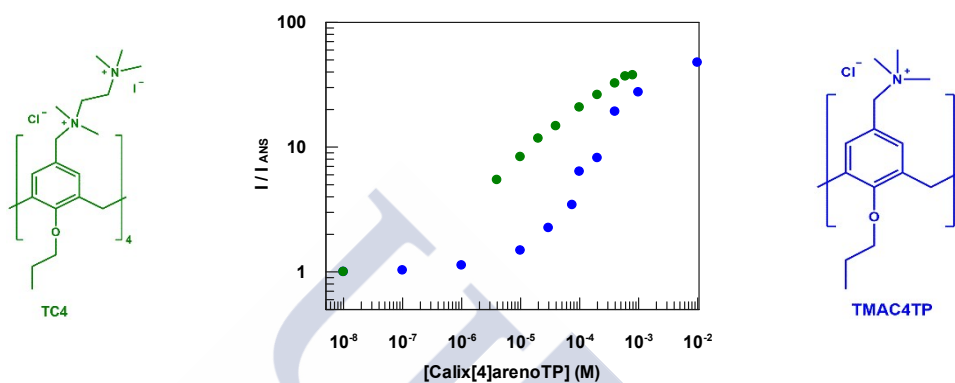


Figura 5.8 : Influencia de la concentración de calix[4]areno sobre la intensidad de fluorescencia normalizada del 1,8-ANS (I/I_{ANS}) a 500 nm y 25°C. (●) TC4 y (●) TMAC4TP. Representación de las estructuras moleculares de los calix[4]arenos (TC4 y TMAC4TP) a ambos lados de la gráfica.

Como se puede observar, los calixarenos presentan un comportamiento distinto con la intensidad de fluorescencia de la sonda, esto puede ser debido a que el TC4 consta de 8 cargas positivas mientras que el TMAC4TP sólo dispone de 4 cargas positivas, lo que hace que el TC4 tenga una cavidad con menor densidad de carga negativa. Por tanto, tal como se refleja en los resultados experimentales, esta característica del TC4 facilita más la entrada de la sonda por las cadenas alquílicas y aumenta su afinidad con respecto al TMAC4TP, que se considera que tiene una cavidad más negativa.

En la Figura 5.9 se muestra el comportamiento del espectro de fluorescencia del 1,8-ANS para el TC4. Una estimación aproximada muestra que casi el 64% del cambio general en λ_{max} se ha observado para $[TC4]= 1 \times 10^{-5}$ M, sin embargo, en estas condiciones experimentales sólo se ha alcanzado el 22% del cambio global en la intensidad de fluorescencia. Por tanto, la variación no sincronizada de λ_{max} y de la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{ANS}) para los datos experimentales antes de la cmc para el TC4, puede ser explicada considerando la formación de los complejos *host:guest* 1:1 y 2:1, de igual modo que ocurría con los calixarenos estudiados previamente.

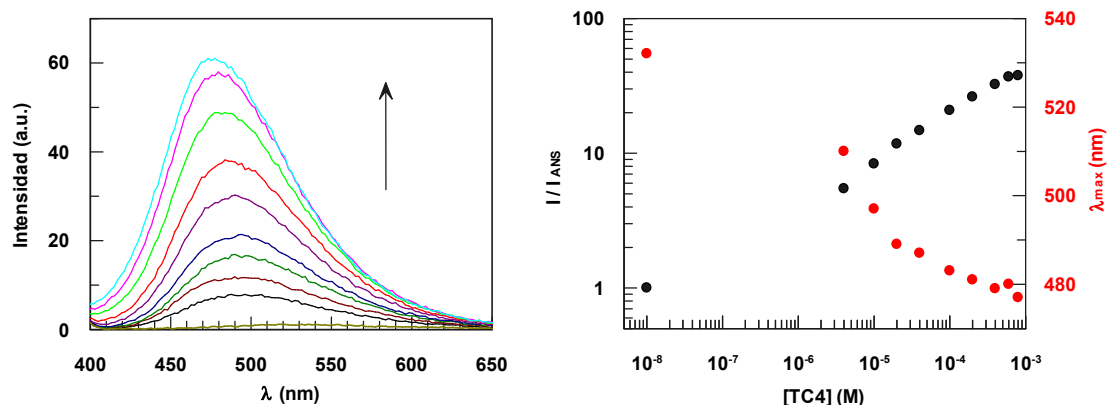


Figura 5.9 : (Izquierda) Influencia de la concentración del macrociclo TC4 en el espectro de fluorescencia del [1,8-ANS]= 5×10^{-6} M, mostrando un aumento de la intensidad de fluorescencia. (Derecha) Representación gráfica de la longitud de onda máxima (λ_{\max}) y la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{ANS}) a 500 nm frente a la concentración de TC4.

A continuación, comparamos el comportamiento de la fluorescencia de emisión del 1,8-ANS en presencia de un calixareno catiónico anfifílico con otro aniónico anfifílico. Ambos calix[4]arenos constan de cadenas alquílicas con 6 átomos de carbono y se diferencian en el grupo funcional del portal superior, el catiónico tiene grupos trimetilamonio (TMAC4TH) y el aniónico tiene grupos sulfonato (SC4TH).

En la Figura 5.10 se muestra la influencia del SC4TH y del TMAC4TH en la intensidad de fluorescencia del 1,8-ANS, y como se puede observar los calix[4]arenos tienen un comportamiento distinto.

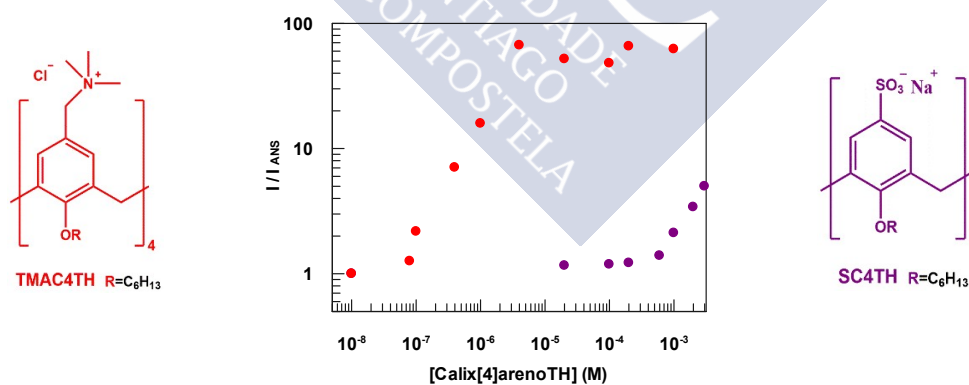


Figura 5.10 : Influencia de la concentración de calix[4]areno sobre la intensidad de fluorescencia normalizada del 1,8-ANS (I/I_{ANS}) a 500 nm y 25°C. (●) TMAC4TH y (●) SC4TH. Representación de las estructuras moleculares de los calix[4]arenos (TMAC4TH y SC4TH) a ambos lados de la gráfica.

Para el TMAC4TH fue explicado anteriormente mientras que para el SC4TH podemos considerar que antes de la cmc ($\approx 8 \times 10^{-4}$ M) no se produce ningún cambio en la intensidad, por lo que se considera que la sonda presenta una muy baja afinidad por el SC4TH, encontrándose mayoritariamente la sonda en disolución acuosa hasta que el

calixareno aniónico miceliza. Se descarta la complejación entre el SC4TH y el 1,8-ANS debido a que la cavidad del calixareno presenta una elevada densidad de carga negativa, y, consecuentemente, se produce la repulsión entre ambos.

En la Figura 5.11 se muestra la influencia del SC4TH en el espectro de fluorescencia de emisión de la sonda. Como se puede observar, el aumento de la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{ANS}) y el desplazamiento del máximo de la banda de emisión hacia longitudes de onda menores (λ_{max}) empieza a una concentración de calixareno bien definida, que se corresponde con el valor de la cmc del macrociclo.

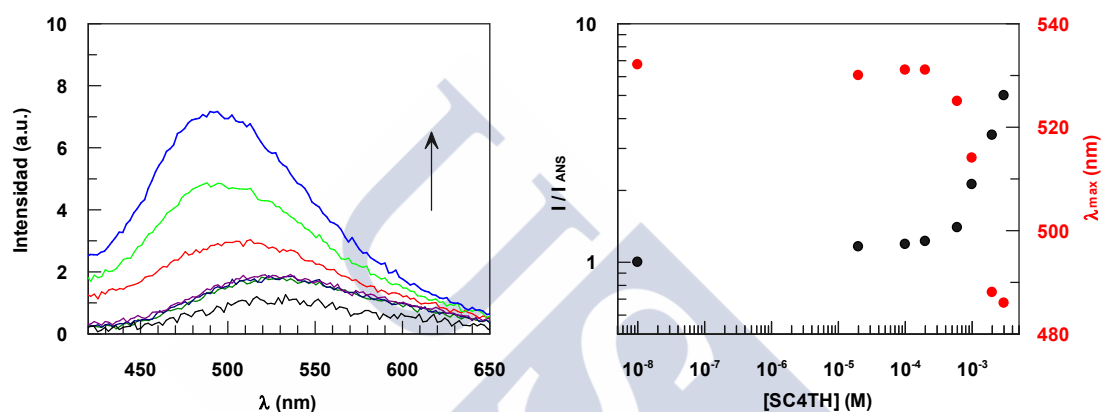


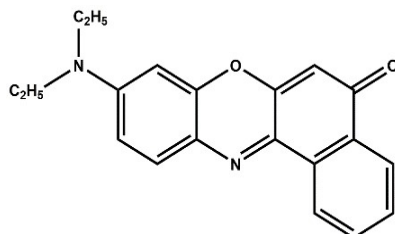
Figura 5.11 : (Izquierda) Influencia de la concentración del SC4TH en el espectro de fluorescencia del [1,8-ANS] = 5×10^{-6} M, mostrando un aumento de la intensidad de fluorescencia. (Derecha) Representación gráfica de la longitud de onda máxima (λ_{max}) y la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{ANS}) a 500 nm frente a la concentración de SC4TH.

Por tanto, la variación sincronizada de λ_{max} y I/I_{ANS} se debe a la incorporación del 1,8-ANS al interior hidrofóbico de la micela formada por el calixareno aniónico, originando una capa de solvatación homogénea alrededor de la sonda. Este comportamiento de la fluorescencia del 1,8-ANS es similar al observado en la bibliografía por los surfactantes monoméricos (alquilsulfonatos de sodio)²⁶, donde el aumento de la intensidad coincide con el valor de la cmc para los surfactantes.

5.3.2.2 Sonda fluorescente Rojo Nilo

En este apartado se estudia el comportamiento de la fluorescencia de emisión con uno de los calix[4]arenos catiónicos anfífilicos (TMAC4TD), utilizando como sonda el Rojo Nilo (9-(dietilamino)-5H-benzo[R]fenoxazin-5-ona, NR, ver Esquema 5.4). El NR es una sonda hidrofóbica solvatocrómica cuyo espectro de emisión de fluorescencia depende del medio en el que se encuentre, por ello ha sido ampliamente utilizada para el

estudio de micelas^{27,28} y vesículas^{29,30}. La cuestión es saber si esta sonda sigue el mismo comportamiento que el 1,8-ANS incorporándose en las cadenas alquílicas, o si sólo indica el proceso de agregación del calix[4]areno.



Esquema 5.4

En la Figura 5.12 se muestra el espectro de fluorescencia de emisión del rojo nilo en presencia de distintas concentraciones del TMAC4TD. Como se puede observar, la intensidad de fluorescencia normalizada aumenta (I/I_{ANS}) y el máximo de la banda de emisión se desplaza hacia longitudes de onda menores (λ_{max}), a medida que aumentamos de la concentración del TMAC4TD. Cuando la concentración de calix[4]areno es baja, el valor de la intensidad de fluorescencia se mantiene constante e igual al valor obtenido en disolución acuosa para el rojo nilo. Pero a partir de una determinada concentración, la intensidad aumenta repentinamente, como consecuencia de la formación de agregados y la consiguiente incorporación del NR en el medio micelar, el punto de inflexión observado en la gráfica se corresponde con la cmc para el TMAC4TD cuyo valor es de 3×10^{-6} M.

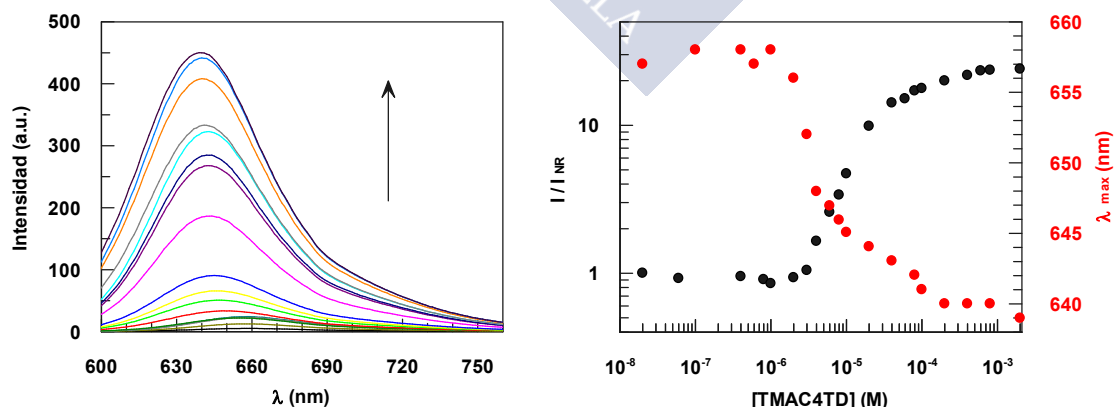
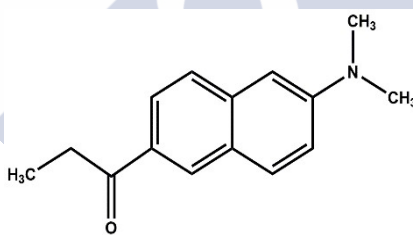


Figura 5.12 : (Izquierda) Influencia del incremento de la concentración de TMAC4TD en el espectro de fluorescencia del $[NR] = 2.7 \times 10^{-6}$ M. (Derecha) Representación gráfica de la longitud de onda máxima (λ_{max}) y la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{ANS}) a 640 nm frente a la concentración de TMAC4TD. $T = 25^\circ\text{C}$.

Con los resultados obtenidos, se comprobó que los agregados formados por el calix[4]areno son capaces de encapsular rojo nilo en su interior hidrofóbico, y esta propiedad nos permitió determinar la cmc del compuesto.

5.3.2.3 Sonda fluorescente Prodan

Otra sonda utilizada para el estudio del comportamiento de fluorescencia de emisión para el TMAC4TD, es la 6-propionil-2-(N,N-dimetil)aminonaftaleno (Prodan, ver Esquema 5.5), ha sido objeto de muchos estudios en las últimas décadas debido a su alta sensibilidad al medio en el que se encuentre, lo que la hace útil como sonda fluorescente para diferentes tipos de medios tales como micelas³¹, micelas inversas y microemulsiones³²⁻³⁴. El Prodan es una sonda fluorescente hidrofóbica que presenta la ventaja de poder medir intensidades de fluorescencia tanto en disolventes polares como no polares, además del cambio espectral originado por los cambios de polaridad, estas características la hacen una sonda adecuada para la caracterización de sistemas micelares³⁵.



Esquema 5.5

En la Figura 5.15 se presenta la influencia del TMAC4TD en el espectro de fluorescencia de emisión del Prodan. Como se puede observar, a medida que se aumenta la concentración de calix[4]areno se produce un incremento de la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{ANS}) que es paralelo al desplazamiento del máximo de la banda de emisión hacia longitudes de onda menores (λ_{max}). El cambio más notable de ambas propiedades de fluorescencia afectadas de manera sincronizada, se produce a una determinada concentración de macrociclo, que se corresponde con la cmc para el TMAC4TD cuyo valor es de 3×10^{-6} M, aproximadamente. Este comportamiento en la longitud de onda del máximo de emisión que se desplaza desde 520 nm en agua hasta 488nm cuando se alcanzan concentraciones elevadas de TMAC4TD, es similar al valor

que exhibe el Prodan en presencia de agregados micelares como los que forman los surfactantes catiónicos monoméricos (DTAB, bromuro de dodeciltrimetilamonio)³¹.

Finalmente, tanto la intensidad de fluorescencia como la λ_{\max} se mantienen constantes lo que nos indica que el equilibrio entre la sonda fluorescente en agua y el medio micelar, se encuentra desplazado en favor de este último.

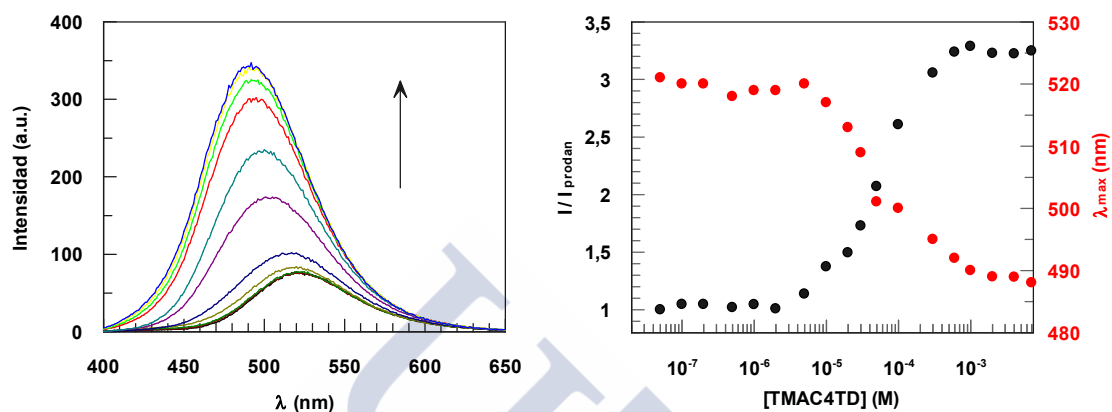


Figura 5.13 : (Izquierda) Influencia del incremento de la concentración de TMAC4TD en el espectro de fluorescencia del $[\text{Prodan}] = 1.23 \times 10^{-5} \text{ M}$. (Derecha) Representación gráfica de la longitud de onda máxima (λ_{\max}) y la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{ANS}) a 520 nm frente a la concentración de TMAC4TD. $T = 25^\circ\text{C}$.

Los resultados experimentales obtenidos con ambas sondas fluorescentes, NR y Prodan, nos permiten detectar los agregados micelares en disolución para el TMAC4TD, dando un valor de la cmc en concordancia con los resultados obtenidos por conductividad. Dichos resultados también pueden ser extrapolados para el resto de calix[4]arenos catiónicos anfílicos (TMAC4TP y TMAC4TH). Por tanto, se descartó la formación de complejos *host:guest* entre las cadenas alquílicas de los calix[4]arenos y la sonda, como ocurría con el 1,8-ANS.

5.3.3 Caracterización del agregado formado por el Calix[4]areno Catiónico Anfílico (TMAC4TD)

5.3.3.1 Difusimetría de RMN y DLS

La difusimetría de RMN o DOSY (Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy) es una técnica que permite determinar los coeficientes de difusión (D) de moléculas y/o agregados en disolución a partir de sus señales en el espectro de RMN. El coeficiente de difusión de una determinada especie, depende de su tamaño, forma y peso molecular

“efectivo”. Por tanto, a partir de este parámetro se puede obtener información acerca del tamaño y forma de moléculas y/o agregados supramoleculares, y así obtener información para el estudio de los procesos de agregación en sistemas coloidales y supramoleculares³⁶.

El coeficiente de difusión (D) se obtiene a partir de un espectro pseudo-2D donde se incrementa la potencia entre 4 y 65 cm^{-1} en 20 sub-espectros 1D (Figura 5.14-izquierda). A partir del análisis cuantitativo de la intensidad de un pico de eco correspondiente en el espectro de difusión, se obtiene el valor de D mediante el ajuste no lineal de la intensidad de la señal a la ecuación de Stejskal-Tanner³⁷.

$$I = I_0 \exp \left[-D \gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \right] \quad (5.7)$$

donde I es la intensidad de la señal medida, I_0 es la intensidad o integral de la señal con el pulso de gradiente más bajo, γ es la constante giromagnética del núcleo observado, G la potencia del gradiente, δ la duración del pulso del gradiente, y Δ es el tiempo de difusión. En la Figura 5.14-derecha se muestran los valores experimentales obtenidos para las intensidades de la señal de los protones del grupo trimetilamonio del TMAC4TD en una muestra de concentración 1 mM, el decaimiento de la intensidad de las señales se ajustaron a la ecuación (5.7), dando un valor de $D = 7.63 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

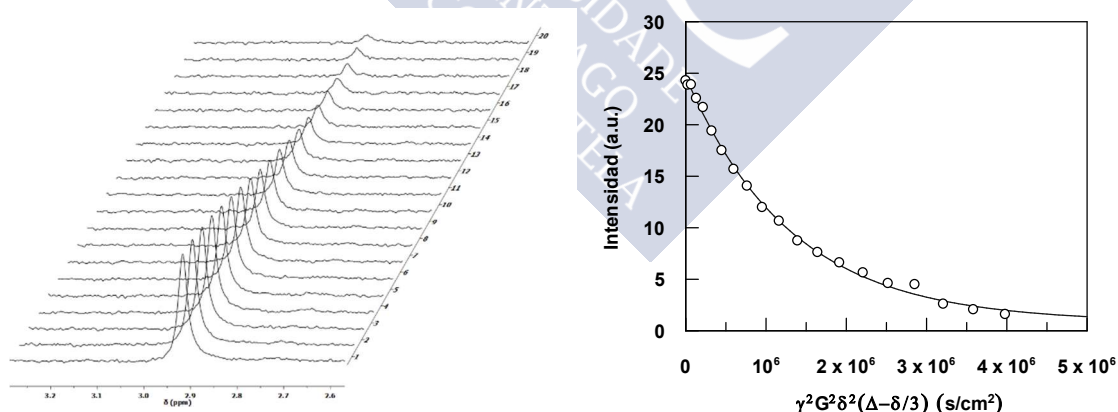


Figura 5.14 : (Derecha) Espectros de decaimiento de la intensidad de la señal de ^1H DOSY de RMN obtenidos para un disolución de TMAC4TD (1 mM D_2O). (Izquierda) Representación de los datos para la señal de los protones metilo del grupo de cabeza del TMAC4TD, donde la línea representa el ajuste de los datos a la ecuación (5.7).

La relación entre D y el tamaño y la forma de una determinada partícula, viene dada por la ecuación de Einstein-Smoluchowski (5.8), donde k_b es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y f es el coeficiente de fricción hidrodinámico.

En el caso de una esfera en un medio continuo de viscosidad η , el coeficiente de fricción f viene dado por la ecuación de Stokes (5.9), donde r_h es el radio hidrodinámico.

$$D = \frac{k_b T}{f} \quad (5.8)$$

$$f = 6\pi\eta r_h \quad (5.9)$$

Por tanto, si combinamos las ecuaciones (5.8) y (5.9), obtenemos la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r_h} \quad (5.10)$$

El estudio de ^1H DOSY para el TMAC4TD, presenta limitaciones para esta técnica debido al valor tan pequeño de la cmc (3×10^{-6} M), no fuimos capaces de llegar a concentraciones lo suficientemente bajas para obtener valores de D_{obs} compatibles con lo esperado en ausencia de agregados en disolución. Por tanto, en la Figura 5.15 se muestran los coeficientes de difusión observados para concentraciones superiores a la cmc del TMAC4TD, donde sabemos que ya tenemos agregados micelares.

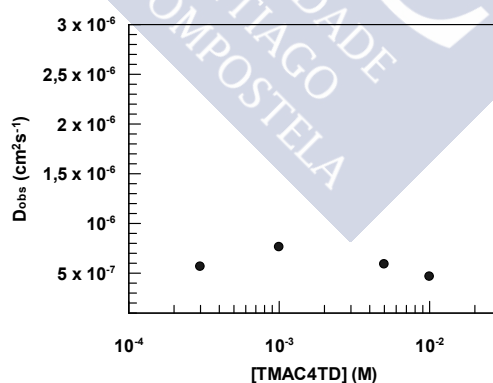


Figura 5.15 : Influencia de la concentración de TMAC4TD por encima de la cmc en los coeficientes de difusión observados (D_{obs}). Los experimentos fueron realizados en D_2O a 25°C .

En este caso, no podemos obtener el valor de la cmc para el TMAC4TD a partir de los coeficientes de difusión observados. Sabemos que D es inversamente proporcional al radio hidrodinámico de las especies en disolución (5.10), y la disminución de D_{obs} a partir de una determinada concentración, indica la presencia de agregados en disolución

y por tanto el valor de la cmc. Pero si hacemos la media de los valores obtenidos de D_{obs} para concentraciones elevadas del TMAC4TD, cuyos valores permanecen prácticamente constantes (ver Figura 5.15), podemos determinar el radio hidrodinámico (r_h) de las micelas formadas por el calix[4]areno, considerando que éstas presentan un geometría esférica. En la Tabla 5.3 se presenta el resultado para la medida de D_{obs} y el valor de r_h .

Tabla 5.3 : Valor medio de los coeficientes de difusión para el TMAC4TD, y valor del radio hidrodinámico (r_h) considerando agregados con geometría esférica.

Surfactante	$10^7 D_{obs}(\text{cm}^2/\text{s})$	r_h (nm)
TMAC4TD	5.96 ± 0.10	3.34 ± 0.12

La autoagregación del calix[4]areno anfifílico catiónico, TMAC4TD, también se confirmó por experimentos de DLS en un ángulo de dispersión de 90° . En la Figura 5.16 se muestra la distribución del tamaño de ensamblaje de las micelas formadas por TMAC4TD con una concentración de 1 mM. Los resultados muestran un diámetro hidrodinámico de 5.732 nm que si lo comparamos con el resultado del radio hidrodinámico (r_h) obtenido por experimentos de DOSY, vemos que aproximadamente se obtiene el mismo valor para el tamaño de la micela formada por el calix[4]areno.

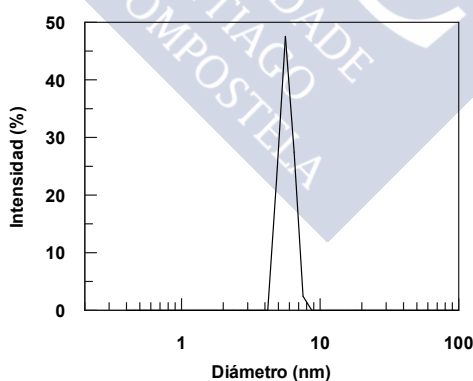
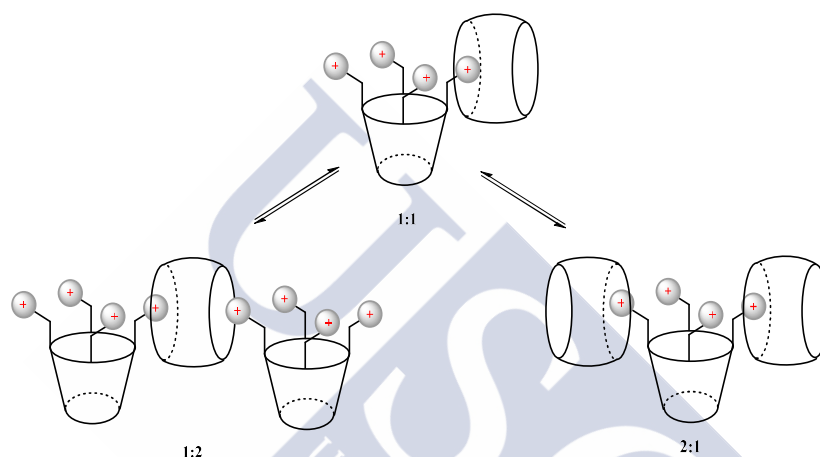


Figura 5.16 : Experimento de DLS para el tamaño de las micelas del TMAC4TD, con un diámetro hidrodinámico de 5.732 nm.

5.3.4 Caracterización de los agregados basados en la interacción entre el CB7 y el Calix[4]areno Catiónico Anfílico (TMAC4TD)

En estudios previos realizados por nuestro grupo para la interacción del CB7 con calix[4]arenos catiónicos anfílicos (TMAC4TP y TMAC4TH), se obtuvieron como resultado la formación de complejos del tipo 1:1, 2:1 y 1:2 (modelo tres especies) y que la interacción se produce a través de la parte catiónica del calix[4]areno con los grupos carbonilo presentes en la entrada del portal del CB7.



Esquema 5.6 : Modelo que contempla la formación de tres tipos de complejos entre el CB7 y los macrociclos.

Una vez se obtuvieron las estequiometría y la estructura de los complejos formados por el CB7 y el calix[4]areno catiónico, se estudió la influencia del CB7 en el proceso de micelización del calix[4]areno y se observó que la presencia de CB7 no afecta de forma significativa a la cmc del macrociclo, contrariamente a lo observado en presencia de agregados micelares formados por surfactantes convencionales, donde la cmc sí se ve afectada por la presencia de CB7³⁸. Por tanto, esta diferencia de comportamiento se atribuyó a la posible interacción entre el CB7 con los agregados micelares de calix[4]areno, que se confirmó realizando experimentos de Crio-TEM, dando lugar a la formación de vesículas.

En este capítulo nos centramos en el estudio de la interacción entre el CB7 y el calix[4]areno catiónico anfílico sustituido en el portal inferior de la cavidad por cadenas alquílicas de 10 átomos de carbono (TMAC4TD). Debido a que el valor de la cmc para el TMAC4TD (0.003 mM) es muy pequeño para realizar estudios fiables por medidas calorimétricas, por experimentos de ¹H RMN y de DOSY, como se realizó para los otros

calixarenos (TMAC4TP y TMAC4TH), se extrapolaron los resultados obtenidos y consideramos la formación de tres tipos de complejos 1:1, 2:1 y 1:2 entre el CB7 y el TMAC4TD. A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la caracterización de las vesículas basadas en la interacción entre el CB7 y los agregados micelares de TMAC4TD, a través de experimentos de DLS y Crio-TEM.

5.3.4.1 DLS y Crio-TEM

Con el objetivo de confirmar la posible interacción del CB7 con los agregados micelares formados por el TMAC4TD, se realizaron experimentos de difusión dinámica de luz (DLS) en un ángulo de dispersión de 90° . La Figura 5.17 muestra los resultados obtenidos para una disolución que contenía una mezcla de $[\text{TMAC4TD}] = 1 \text{ mM}$ y $[\text{CB7}] = 1.5 \text{ mM}$, y se compara con los resultados obtenidos solo para un disolución de $[\text{TMAC4TD}] = 1 \text{ mM}$. Se observa un aumento del tamaño del agregado y un cambio drástico en la estructura del agregado en presencia del CB7 (línea roja), como consecuencia de la interacción entre el CB7 y los agregados micelares del TMAC4TD, dando lugar a un agregado polidisperso (vesículas) con distintos tamaños.

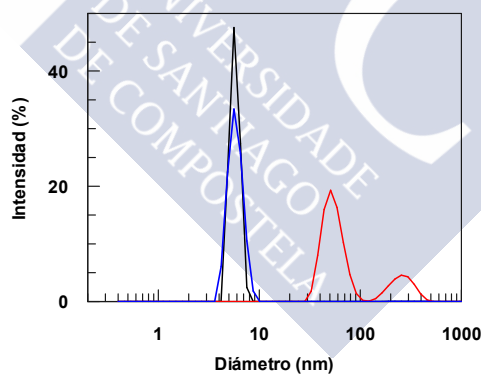


Figura 5.17 : Medidas de DLS que muestran las distribuciones de tamaño para: (línea negra) las micelas formadas por el TMAC4TD con una concentración de 1 mM y con un diámetro de 5.732 nm; (línea roja) agregados formados por una mezcla de $[\text{TMAC4TD}] = 1 \text{ mM}$ y $[\text{CB7}] = 1.5 \text{ mM}$ con tamaños polidispersos entre 50 y 250 nm y (línea azul) desagregación de las vesículas formadas por $[\text{TMAC4TD}] = 1 \text{ mM}$ y $[\text{CB7}] = 1.5 \text{ mM}$ inducida por la adición de cloruro de tetraetilamonio (TEA), obteniéndose micelas con un diámetro de 5.642 nm. Todos los experimentos fueron realizados en agua Milli-Q y a 25°C .

Los agregados polidispersos obtenidos a partir de la interacción entre el CB7 y los agregados micelares del TMAC4TD se pueden desagregar con la adición de un *guest* competitivo. Se añadieron cationes tetraetilamonio ($[\text{TEA}] = 2 \text{ mM}$) a la mezcla, ya que sabemos que el CB7 tiene la capacidad para complejarse con dichos cationes³⁹, por lo que compiten con el TMAC4TD para complejarse con el CB7, desplazando el TMAC4TD de

los complejos *host:guest*, obteniéndose la recuperación de las micelas del calix[4]areno. Los resultados de la desagregación de las vesículas son obtenidos mediante experimentos de DLS (línea azul) y se muestran en la Figura 5.17.

Esta interacción fue confirmada también por experimentos de Crio-TEM (Crio-Microscopía Electrónica de Transmisión), en donde se midió una disolución con concentraciones de $[\text{TMAC4TD}] = 1 \text{ mM}$ y $[\text{CB7}] = 1.5 \text{ mM}$ y otra de control, conteniendo únicamente calixareno, $[\text{TMAC4TD}] = 1 \text{ mM}$.

En la Figura 5.18-izquierda se muestra la imagen que se corresponde con la disolución de TMAC4TD en ausencia de CB7, donde no se aprecia ningún tipo de estructura. Sin embargo, en la Figura 5.18-derecha la imagen que se muestra corresponde con la disolución del TMAC4TD en presencia de CB7, donde se observa un claro contraste entre el perímetro y el centro de los agregados formados, siendo ésta una característica importante en la formación de vesículas. En la imagen se puede observar que se trata de un sistema de vesículas polidispersas, sus tamaños pueden variar confirmando los resultados obtenidos por experimentos de DLS, y también varía la forma de las vesículas. Una característica a destacar para la formación de este tipo de vesículas, es que se obtienen de manera espontánea sin la necesidad de estímulos químicos y/o mecánicos.

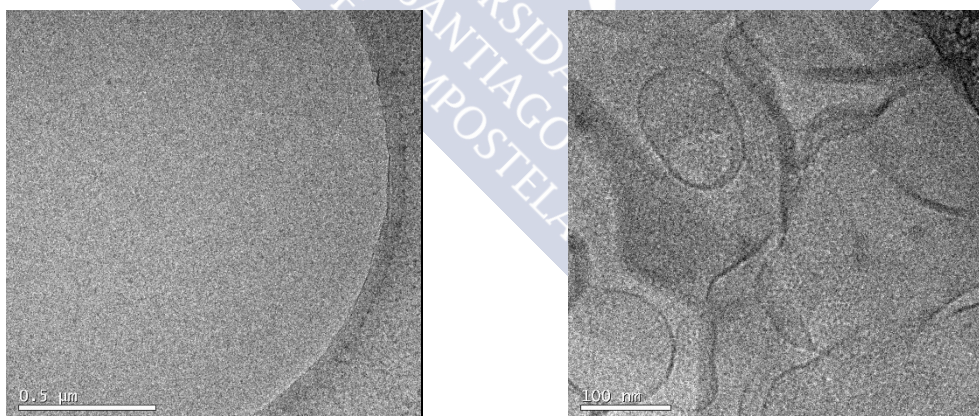
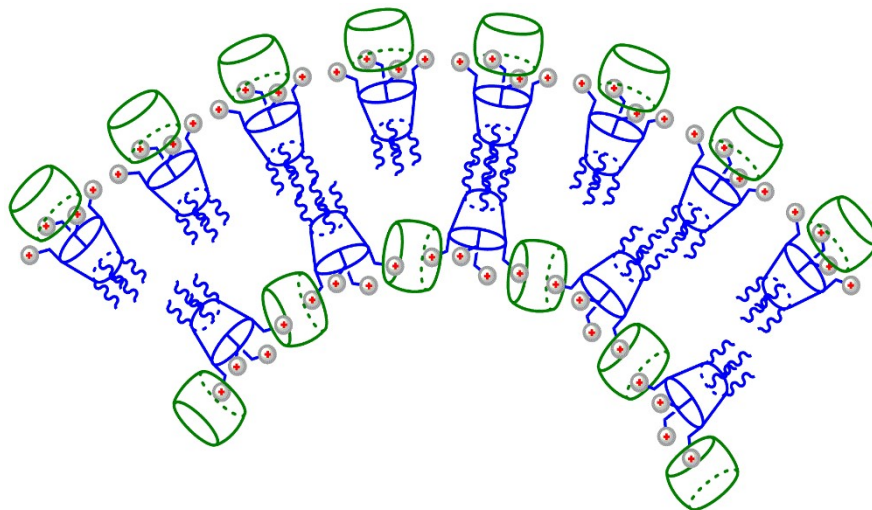


Figura 5.18 : Imágenes del Crio-TEM obtenidas para la mezclas que contienen: (Izquierda) disolución de TMAC4TD (1 mM) en ausencia de CB7; (Derecha) Disolución de $[\text{TMAC4TD}] = 1 \text{ mM}$ y $[\text{CB7}] = 1.5 \text{ mM}$.

Por tanto, debido a la diversidad estructural y la estequiometría de los distintos tipos de complejos (1:1, 2:1 y 1:2) formados entre el CB7 y el calix[4]areno catiónico anfílico (TMAC4TD) se facilita la formación de este tipo de agregado. En el Esquema 5.7 se propone una estructura para la bicapa de la vesícula, donde suponemos que la capa

externa presentaría una estructura más flexible y la capa interna sería un poco más compacta.



Esquema 5.7

5.3.5 Encapsulación del 1,8-ANS por la vesícula

El principal objetivo de este apartado se centra en el estudio acerca de la permeabilidad y estabilidad en medio acuoso de las vesículas formadas entre CB7 y el calix[4]areno catiónico anfifílico (TMAC4TD). Una de las principales características de las vesículas formadas por el calix[4]areno/cucurbit[7]urilo es la posibilidad de encapsular algún sustrato en su interior. Como sustrato susceptible de inclusión en la vesícula, se propuso el ácido 1-naftaleno-8-anilino sulfónico (1,8-ANS) que se trata de una sonda extremadamente fluorescente en medios no polares, por tanto, se considera óptima para estudios de encapsulación y seguimos su comportamiento por fluorescencia de emisión.

Anteriormente se estudió el comportamiento del 1,8-ANS en presencia del TMAC4TD, y se consideró la incorporación de la sonda en las cadenas alquílicas del calix[4]areno formando complejos *host:guest* 1:1 y 2:1 antes de la cmc, y posteriormente su localización en el interior de la micela formada por el macrociclo. En este apartado, estudiamos el comportamiento de la sonda en presencia de la vesícula formada por TMAC4TD/CB7 y lo comparamos con el estudio del TMAC4TD en ausencia de CB7.

En la Figura 5.19 se muestra la influencia del TMAC4TD en presencia de 1mM de CB7 (en rojo) en el espectro de fluorescencia de emisión del 1,8-ANS. Como se puede observar, a medida que aumentamos la concentración del calixareno en presencia de CB7 la intensidad de fluorescencia normalizada aumenta (I/I_{ANS}). Este comportamiento se debe a la incorporación de la sonda dentro de la bicapa de la vesícula. Si por el contrario, el 1,8-ANS no interacciona con la vesícula se esperaría una disminución de la intensidad hasta alcanzar el valor en agua. Estos resultados los comparamos con el comportamiento del TMAC4TD en ausencia de CB7 (en negro), y podemos concluir que debido a que suponemos que la capa externa de bicapa de la vesícula presenta una estructura más flexible, la sonda va a estar más en contacto con el agua, consideramos un ambiente menos apolar en comparación con el agregado del TMAC4TD, por eso la intensidad de fluorescencia no alcanza valores tan elevados como los obtenidos en ausencia de CB7.

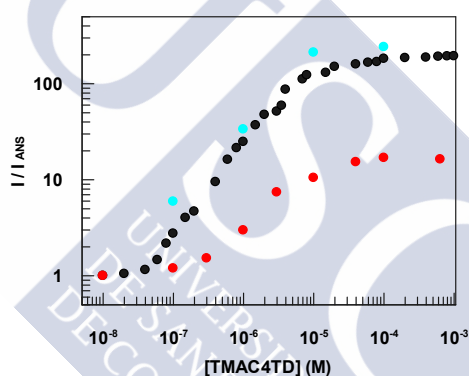


Figura 5.19 : Influencia de la concentración de TMAC4TD sobre la intensidad de fluorescencia normalizada del 1,8-ANS (I/I_{ANS}) a 500 nm y 25°C. En ausencia (●) y presencia de (●) [CB7]= 1mM. Se activa la liberación del contenido de la vesícula mediante la adición de: (●) [TEA]= 5mM.

También se estudió la liberación del 1,8-ANS encapsulado por las vesículas formadas por la mezcla de CB7/TMAC4TD, mediante la adición de cationes tetraetilamonio ([TEA] = 5 mM). En la Figura 5.19 se muestra que la adición de TEA a las vesículas proporcionó un aumento de la intensidad de fluorescencia de emisión del 1,8-ANS, hasta valores prácticamente iguales que los obtenidos en el estudio del TMAC4TD en ausencia de CB7. Por tanto, este comportamiento puede ser debido a la desagregación de las vesículas, ya que los cationes tetraetilamonio compiten con el calix[4]areno para complejarse con el CB7, quedando libre el TMAC4TD para interactuar con el 1,8-ANS, obteniéndose la recuperación de su comportamiento en la intensidad de fluorescencia. Estos resultados, de la desagregación de las vesículas con TEA, también fueron confirmados anteriormente por experimentos de DLS.

5.4 Conclusión

Los resultados obtenidos en este capítulo para el estudio de la autoagregación de los calix[4]arenos catiónicos anfífilicos (TMAC4TP, TMAC4TD y TMAC4TD), nos permitieron por técnicas como la conductividad, determinar el valor de la cmc y de la fracción de carga micelar neutralizada (β) para estos macrociclos. Los resultados han demostrado que el valor de la cmc para las calix[4]arenos disminuye con el incremento de la longitud de las cadenas alquílicas, mientras que el valor de β aumenta, lo que puede ser atribuido a un cambio en la densidad de carga en la superficie de la micela. A partir de los valores de la cmc y β , se determina la energía libre de micelización (ΔG_M^0) para cada macrociclo. Se demostró que las interacciones entre las cadenas alquílicas favorecen al proceso de micelización y el valor de ΔG_M^0 disminuye con el aumento del número de átomos de carbono en la cadena alquílica.

En el estudio de fluorescencia de los calix[4]arenos catiónicos anfífilicos con el 1,8-ANS, se observó que la variación no sincronizada de λ_{\max} y de la intensidad de fluorescencia normalizada (I/I_{ANS}) antes de la cmc, puede ser explicada considerando la incorporación del grupo anilino en las cadenas alquílicas del macrociclo induciendo el desplazamiento de la banda de emisión (λ_{\max}), mientras que la complejación del grupo naftaleno por las cadenas alquílicas de un segundo macrociclo para dar el complejo 2:1, induce un aumento de la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, los resultados experimentales del estudio de fluorescencia de otras sondas (NR y Prodan) con el macrociclo catiónico sólo nos permitió determinar el valor de la cmc, a diferencia del comportamiento obtenido con el 1,8-ANS.

Los agregados formados por el TMAC4TD se caracterizaron por técnicas de RMN y experimentos de DLS. A partir de la determinación de los coeficientes de difusión para el macrociclo, podemos determinar el radio hidrodinámico ($r_h = 3.34 \pm 0.12$ nm) de las micelas formadas por el calix[4]areno, considerando que éstas presentan un geometría esférica. El tamaño de las micelas también se confirmó por experimentos de DLS (diámetro hidrodinámico de 5.732 nm), dando resultados de tamaño compatibles por ambas técnicas.

También se estudió la caracterización de los agregados basados en la interacción entre el CB7 y los calix[4]arenos catiónicos, considerando la formación de complejos del tipo 1:1, 2:1 y 1:2, entre el CB7 y el TMAC4TD. A partir de la dispersión dinámica de luz se confirmó un aumento del tamaño del agregado, como consecuencia de la

interacción entre el CB7 y las micelas del TMAC4TD. Por último, del análisis de las imágenes de Crio-TEM, confirmamos la formación espontánea de vesículas para el sistema CB7/TMAC4TD. Se estudió la encapsulación del 1,8-ANS por las vesículas y se confirmó su liberación mediante la adición de cationes tetraetilamonio por medidas de fluorescencia, confirmándose también la desagregación de las vesículas por experimentos de DLS.



5.5 Bibliografía

- (1) B. Jonsson, B. Lindman, K. Holmberg, B. K. *Surfactants And Polymers In Aqueous Solutions*, John Wiley & Sons: Chichester, U. K.; **1998**.
- (2) Böhmer, V. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1995**, *34*, 713–745.
- (3) Shinkai, S.; Mori, S.; Koreishi, H.; Tsubaki, T.; Manabe, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2409–2416.
- (4) Strobel, M.; Kita-Tokarczyk, K.; Taubert, a.; Vebert, C.; Heiney, P. a.; Chami, M.; Meier, W. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 252–259.
- (5) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844–4870.
- (6) Liu, S.; Shukla, A. D.; Gadde, S.; Wagner, B. D.; Kaifer, A. E.; Isaacs, L. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 2657–2660.
- (7) Kim, S.-Y.; Jung, I.-S.; Lee, E.; Kim, J.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40*, 2119–2121.
- (8) Liu, S.; Zavalij, P. Y.; Isaacs, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16798–16799.
- (9) Düker, M. H.; Gómez, R.; Vande Velde, C. M. L.; Azov, V. A. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2881–2884.
- (10) Basílio, N.; Garcia-Rio, L. *ChemPhysChem.* **2012**, *13*, 2368–2376.
- (11) Domínguez, A.; Fernández, A.; González, N.; Iglesias, E.; Montenegro, L. *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1227–1231.
- (12) Zana, R. *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, *78*, 330–337.
- (13) Sugihara, G.; Nakamura, A. A.; Nakashima, T.-H.; Araki, Y.-I.; Okano, T.; Fujiwara, M. *Colloid Polym. Sci.* **1997**, *275*, 790–796.
- (14) Krof, A. *Acta Chim. Slov.* **2012**, *59*, 564–570.
- (15) Petek, A.; Krajnc, M.; Petek, A. *Tenside Surf. Det.* **2016**, *53*, 56–63.
- (16) Zana, R. *Langmuir* **1996**, *12*, 1208–1211.
- (17) Klevens, H. B. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1953**, *30*, 74–80.
- (18) Huibers, P. D. T. *Langmuir* **1999**, *15*, 7546–7550.
- (19) Jonsson, B.; Lindman, B.; Holmberg, K.; Kronberg, B. *Surfactants Polym. Aqueous Solut. John Wiley Sons Chichester, U.K.*, **1998**.
- (20) Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena. 2nd ed.*, Wiley, New York **1989**.
- (21) Stryer, L. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 482–495.
- (22) Masui, R.; Kuramitsu, S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 12133–12143.
- (23) Sarkar, D.; Ghosh, D.; Das, P.; Chattopadhyay, N. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 12541–12548.
- (24) Barros, A. E. B.; Carvalho, F. A. O.; Alves, F. R.; Carvalho, J. W. P.; Tabak, M. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *74*, 327–336.
- (25) Pereira-Vilar, A.; Martin-Pastor, M.; Pessêgo, M.; García-Río, L. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 6587–6595.
- (26) Griffiths, P. C.; Roe, J. A. *Langmuir* **2000**, *16*, 8248–8254.
- (27) Datta, A.; Mandal, D.; Pal, S. K.; Bhattacharyya, K. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10221–10225.
- (28) Wang, K.-P.; Chen, Y.; Liu, Y. *Chem. Commun. (Camb)*. **2015**, *51*, 1647–1649.
- (29) Lin, C.; Zhao, J.; Jiang, R. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *464*, 77–81.

- (30) Wu, M.; Zhu, Y.; Jiang, W. *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 1212–1216.
- (31) Karukstis, K. K.; Suljak, S. W.; Waller, P. J.; Whiles, J. A.; Thompson, E. H. Z. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 11125–11132.
- (32) Karukstis, K. K.; Frazier, A. A.; Loftus, C. T.; Tuan, A. S. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8163–8169.
- (33) Novaira, M.; Biasutti, M. A.; Silber, J. J.; Correa, N. M. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 748–759.
- (34) Novaira, M.; Moyano, F.; Biasutti, M. A.; Silber, J. J.; Correa, N. M. *Langmuir* **2008**, *24*, 4637–4646.
- (35) Weber, G.; Farris, F. J. *Biochemistry* **1979**, *18*, 3075–3078.
- (36) Cohen, Y.; Avram, L.; Frish, L. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44*, 520–554.
- (37) Price, W. S. *Concepts Magn. Reson.* **1998**, *10*, 197–237.
- (38) Pessêgo, M.; Moreira, J. a.; García-Río, L. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18*, 7931–7940.
- (39) Kalyanasundaram, K. ; Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc* **1977**, *99*, 2039–2044.





6 Capacidad de los Calix[4]arenos Modificados como Receptores Aniónicos en medio acuoso

6.1 Introducción

En los últimos años, hay un gran interés en diseñar y sintetizar receptores macrocíclicos con propiedades y funciones específicas que nos permiten mejorar la selectividad y la afinidad para complejar distintas moléculas. Desde el descubrimiento de las primeras moléculas anfitrión artificiales, los éteres corona¹, se sintetizaron otros macrociclos con potenciales capacidades para el reconocimiento molecular, tales como los cucurbiturilos², los calixarenos³ o, más recientemente, los pilararenos⁴, creando así una gran variedad de macrociclos que se diferencian en el tamaño, la densidad de carga, la flexibilidad y los grupos funcionales. Estos compuestos, dan lugar a uno de los ensamblajes más fascinantes y más explorados de la química supramolecular, la formación de los complejos *host:guest*⁵.

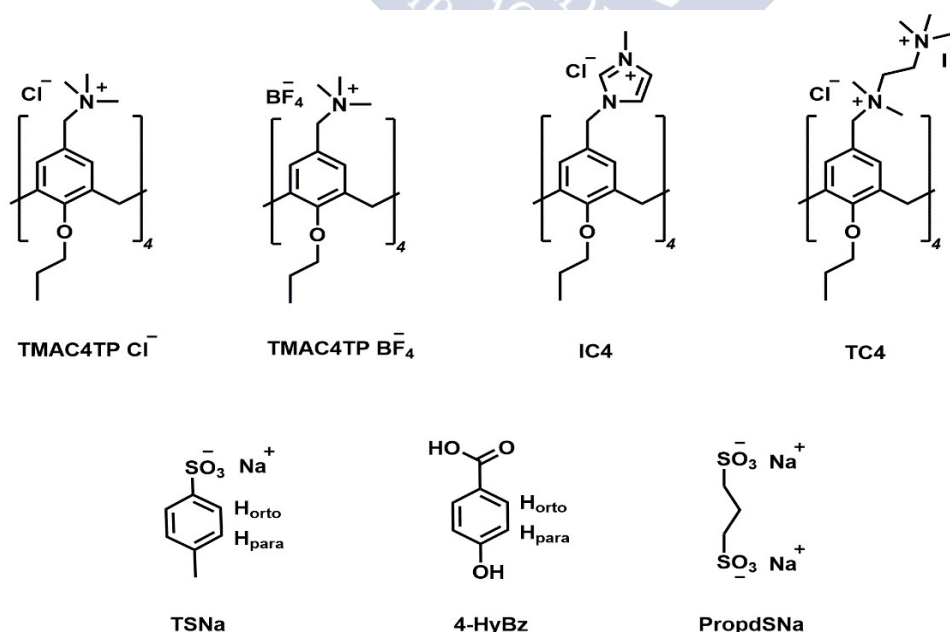
Los calix[*n*]arenos son moléculas macrocíclicas compuestas por unidades fenólicas conectadas entre sí por puentes de metileno en posición *orto*⁶. Tienen unas características estructurales únicas, pues se caracterizan por tener una estructura flexible bien definida que consta de un portal superior más ancho y un portal inferior más estrecho. Los calixarenos pueden ser fácilmente modificados, tanto en el portal inferior como en el superior, con una gran variedad de grupos funcionales, a través de estrategias de síntesis relativamente sencillas.

Dado que la mayoría de los procesos biológicos tienen lugar en medio acuoso, los receptores sintéticos solubles en agua pueden ser utilizados como modelos para mimetizar procesos naturales, como el reconocimiento de moléculas bioactivas o transformaciones químicas catalizadas por enzimas. Sin embargo, la solubilidad de los calixarenos en agua es limitada. La ventaja de estos macrociclos es que pueden modificarse químicamente de una manera muy simple, en comparación con otros macrociclos^{7,8}, por lo que su solubilidad puede aumentarse funcionalizándolos con grupos específicos altamente

hidrofílicos que pueden ser iónicos (ya sea catiónicos, como grupos de amonio o imidazol, o aniónicos, como carboxilato o sulfonato) o neutros como aminas terciarias⁹⁻¹⁶, que permiten aumentar la solubilidad de estos compuestos en agua.

Cuando los calixarenos se utilizan como receptores en medio acuoso neutro hay que tener en cuenta la presencia de contraiones. La competencia entre estos contraiones y los *guests* externos por las posiciones de reconocimiento, es muy diferente en comparación con otros receptores neutros como ciclodextrinas o cucurbiturilos. En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha focalizado su investigación en los procesos de formación de complejos *host:guest* en agua¹⁷⁻¹⁹, con especial énfasis en la influencia de los contraiones en la complejación de *guests* catiónicos, aniónicos o neutros por calixarenos y por pilararenos²⁰⁻²².

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos en el estudio de la complejación con calix[4]arenos. Vamos a comparar su habilidad para enlazar a sus propios contraiones, así como distintos *guest* aniónicos externos (*p*-toluensulfonato, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido 1,3-propanodisulfónico disodium sal), además de sondas fluorescentes (lucigenina y ácido 1-naftaleno-8-anilino sulfónico). El calix[4]areno fue modificado hidrofóbicamente incorporándole una cadena alquílica propil en el portal inferior para conseguir mantenerlo en conformación cono, mientras que en el portal superior lo funcionalizamos con grupos trimetilamonio (con cambio de contraión Cl⁻ por BF₄⁻), metilimidazol y 1-trimetilamonio-2-dimetilaminoetano (Esquema 6.1).



Esquema 6.1 : (Arriba) Estructuras moleculares de los calix[4]arenos modificados. (Abajo) Estructuras de las moléculas elegidas como *guests*.

La funcionalización de estos calix[4]arenos en sus posiciones de reconocimiento con la incorporación de grupos catiónicos, nos aportan una mayor separación entre la carga positiva y la cavidad rica en electrones, por tanto, se produce un aumento de las posibilidades de complementariedad entre el *host* y el *guest*.

6.2 Sección Experimental

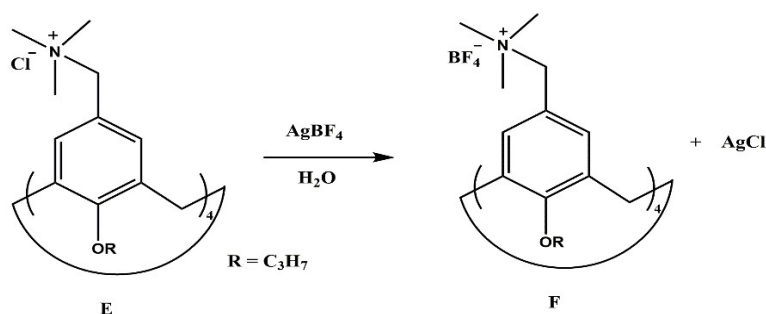
Materiales. Todos los reactivos químicos comerciales fueron adquiridos con la máxima pureza disponible en Sigma-Aldrich y ninguno requiere purificación adicional. Los calix[4]arenos catiónicos anfifílicos solubles en agua, que tienen en común la cadena alquílica propil en el portal inferior y se diferencian en los grupos catiónicos del portal superior, fueron sintetizados en el presente estudio.

Para la síntesis de estos calix[4]arenos modificados seguimos el método de síntesis descrito en el capítulo 5 (Esquema 5.2) hasta el paso común para las tres síntesis, la clorometilación del portal superior (compuesto **D**)^{10,23} a partir del cual se explican las modificaciones específicas del portal superior para cada síntesis de calix[4]areno.

Síntesis del 5,11,17,23-Tetrakis(trimetilamonioetil)-25,26,27,28-tetra-*n*-propiloxi calix[4]areno tetracloruro (TMAC4TP)

La síntesis del TMAC4TP (compuesto **E**) fue descrita en su totalidad en el capítulo 5 (Esquema 5.2). El calix[4]areno con contraión Cl⁻ se ha identificado por ¹H RMN y por espectroscopia de masas ESI. **TMAC4TP Cl⁻** ¹H RMN (400 MHz, D₂O, ppm): $\delta = 6.97$ (s, 8H, ArH), 4.61 (d, 4H, Ar-CH₂-Ar), 4.22 (s, 8H, Ar-CH₂-N), 4.04 (t, 8H, Ar-O-CH₂), 3.45 (d, 4H, Ar-CH₂-Ar), 2.92 (s, 36H, N(CH₃)₃), 2.03 (m, 8H, -CH₂-CH₂-O), 1.05 (t, 12H, CH₃-CH₂-). ESI-MS: m/z [TMAC4TP⁺.3Cl⁻]⁺ 987.5828 (calc: 987.63).

El intercambio del contraión Cl^- por BF_4^- en el TMAC4TP (compuesto **F**), se obtuvo con el siguiente procedimiento (Esquema 6.2).



Esquema 6.2

Síntesis y caracterización del compuesto F. En un balón de 100 ml se disolvió el compuesto **E** con contraiones de Cl^- (1.5 g, 1.47 mmol) en la mínima cantidad de agua Milli-Q, en otro balón de 50 ml se disolvió el compuesto AgBF_4 (1.14 g, 5.86 mmol) también en la mínima cantidad de agua Milli-Q. Una vez disueltos ambos compuestos, se añadió lentamente la disolución de AgBF_4 en pequeñas porciones a la disolución del compuesto **E**, bajo agitación y a temperatura ambiente. Se obtuvo un precipitado fino y grisáceo. La suspensión se separó por centrifugación y el sobrenadante recogido se filtró a través de un filtro de 0.45 μm . Después eliminamos el disolvente con la ayuda del rotavapor, obtuvimos un sólido amarillento (1.2 g, 80%). El intercambio iónico completo se comprobó mediante la adición de AgNO_3 mostrando la ausencia del precipitado de AgCl . El calix[4]areno con contraión BF_4^- se ha identificado por ^1H RMN y por espectroscopia de masas ESI. **TMAC4TP BF_4^-** ^1H RMN (400 MHz, D_2O , ppm): $\delta = 6.95$ (s, 8H, ArH), 4.61 (d, 4H, Ar- CH_2 -Ar), 4.20 (s, 8H, Ar- CH_2 -N), 4.04 (t, 8H, O- CH_2), 3.44 (d, 4H, Ar- CH_2 -Ar), 2.93 (s, 36H, N(CH_3)₃), 2.03 (m, 8H, CH_2 - CH_2 -O-), 1.05 (t, 12H, CH_3 - CH_2 -). ESI-MS: m/z [**TMAC4TP** $^+$.2 BF_4^-] $^{+2}$ 527.3444 (calc: 527.467); m/z [**TMAC4TP** $^+$.3 BF_4^-] $^+$ 1141.6915 (calc: 1141.737).

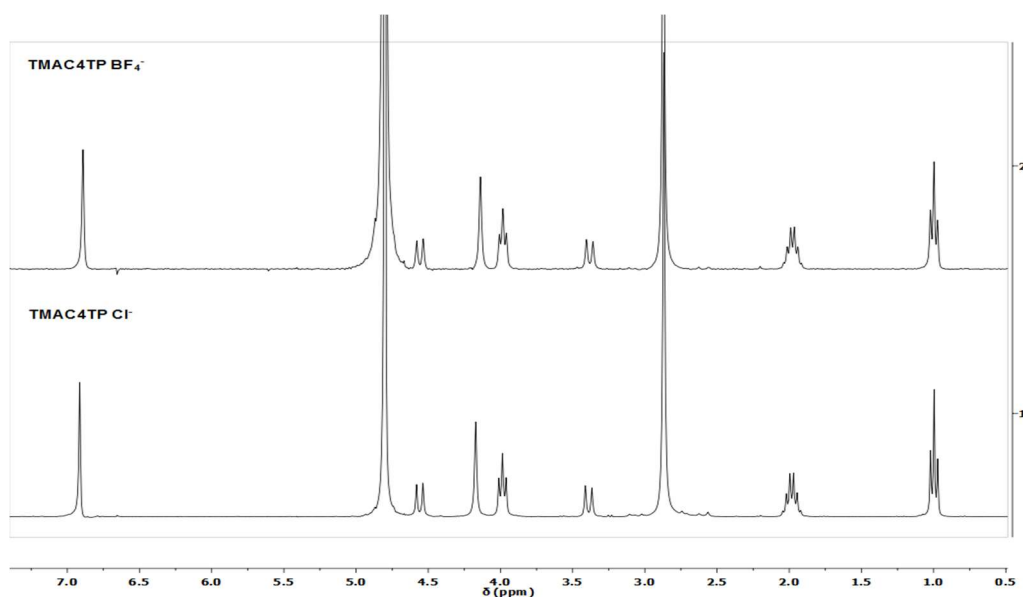
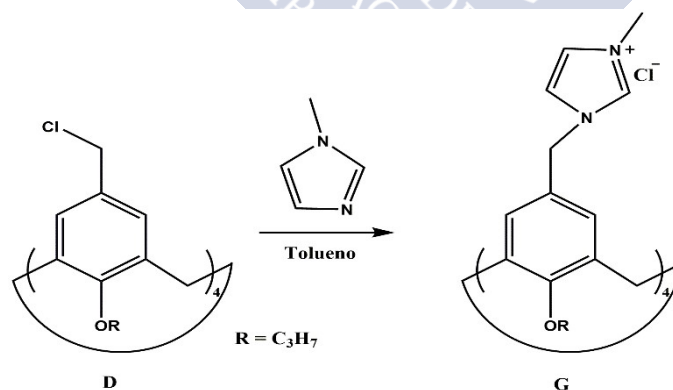


Figura 6.1 : Espectros de ^1H RMN del TMAC4TP Cl^- y del TMAC4TP BF_4^- en D_2O .

Síntesis del 5,11,17,23-Tetrakis(3-trimetilimidazol)-metilen-25,26,27,28-tetra-*n*-propiloxi calix[4]areno tetracloruro (IC4)

Para la síntesis del compuesto IC4 (compuesto **G**) se siguió el método descrito en la bibliografía^{10,23} para obtener el compuesto **D** (Esquema 5.2), y para la modificación del portal superior del calix[4]areno con N-metilimidazol se siguió otro método descrito en la literatura¹².



Esquema 6.3

Síntesis y caracterización del compuesto G. En un balón de 50 mL se disolvió el compuesto **D** (0.5 g, 0.629 mmol) en 16 mL de Tolueno. A la disolución resultante se le añadió N-metilimidazol (0.5 mL, 6.29 mmol) y se agitó durante 3 h a 70°C . Se dejó enfriar, y el disolvente se evaporó hasta sequedad, resultando un sólido que se recrystalizó

en etanol/dietil éter. ^1H RMN (300 MHz, D_2O , ppm): $\delta = 8.64$ (s, 4H, 2-im), 7.44 (d, 4H, 4-im), 7.25 (d, 4H, 5-im), 6.87 (s, 8H, ArH), 5.09 (s, 8H, Ar-CH₂-N), 4.45 (d, 4H, Ar-CH₂-Ar), 3.96 (t, 8H, O-CH₂), 3.88 (s, 12H, CH₃-im), 3.31 (d, 4H, Ar-CH₂-Ar), 1.97 (m, 8H, -CH₂-CH₂-O-), 1.01 (t, 12H, CH₃-CH₂-).

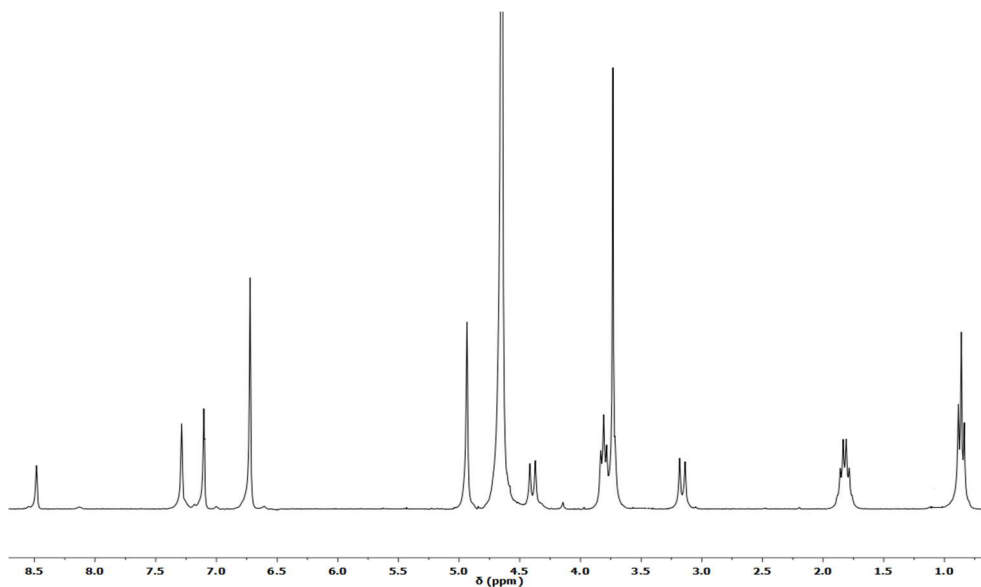
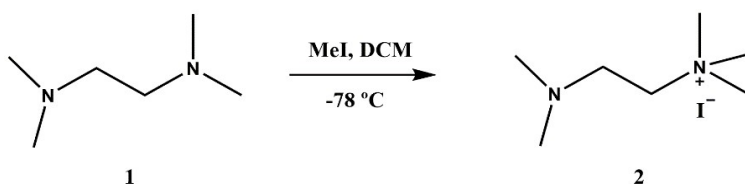


Figura 6.2 : Espectro ^1H RMN del IC4 en D_2O .

Síntesis del 5,11,17,23-Tetrakis(1-trimetilamonio-2-dimetilaminoetane)-metileno-25,26,27,28-tetra-n-propiloxi calix[4]areno tetracloruro (TC4)

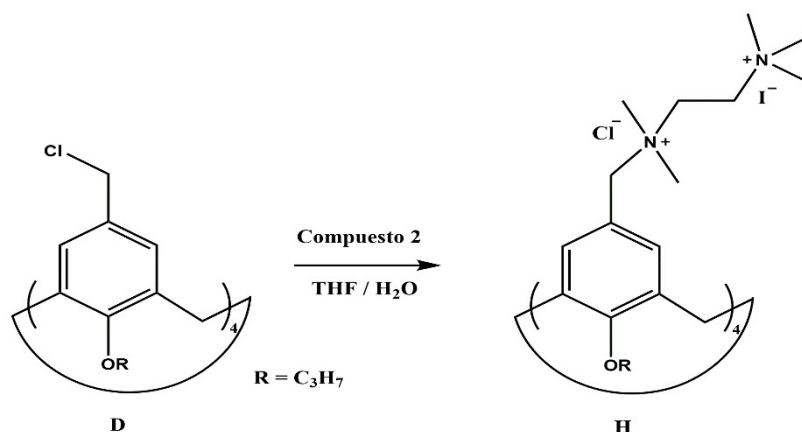
Para la síntesis del compuesto TC4 (compuesto **H**) se siguió el método descrito en la bibliografía^{10,23} para obtener el compuesto **D**, y para la modificación del portal superior del calix[4]areno con 1-trimetilamonio-2-dimetilaminoetano de yoduro (compuesto **2**) se siguió una versión modificada del método descrito en la literatura¹².

Previamente a sintetizar el compuesto **H**, debemos sintetizar un reactivo esencial para su síntesis, el compuesto **2** (metilación de la Tetrametiletilendiamina (TMEDA=compuesto **1**)), siguiendo el método descrito en la bibliografía²⁴.



Esquema 6.4

Síntesis y caracterización del compuesto 2. En un balón de 250 mL se disolvió la tetrametiletilendiamina (29 g, 250 mmol) en 50 mL de diclorometano y se enfrió a -78°C . Bajo agitación, se añadió el yoduro de metilo (32 g, 225 mmol) disuelto en 25 mL de diclorometano con un embudo de goteo durante aproximadamente 30 minutos. Después de agitar a -78°C durante 1 h, la mezcla da como resultado la formación de un precipitado blanco. El sólido se lavó con diclorometano y se secó en la bomba de vacío, dando el compuesto **2**. ^1H RMN (300 MHz, D_2O , ppm): $\delta = 3.52$ (t, 2H), 3.20 (s, 9H), 2.89 (t, 2H), 2.31 (s, 6H).



Esquema 6.5

Síntesis y caracterización del compuesto H. En un balón de 50 ml se añadió una disolución de 1-Trimetilamonio-2-dimetilaminoetano de yoduro (compuesto 2, 2.62 g, 10.17 mmol) en 7.5 ml de agua Milli-Q a otra disolución de compuesto **D** (0.2 g, 0.254 mmol) en 22.5 ml de THF bajo agitación. La mezcla de reacción se calentó a 60°C y se dejó durante 6 h. Después de enfriar, el precipitado se filtró y para eliminar el exceso del compuesto 2, lo disolvemos en CHCl_3 ya que nuestro compuesto final **H** no es soluble en cloroformo. Se recrystalizó de metanol/acetona. El producto se secó en la bomba de vacío, dando el compuesto **H**. ^1H RMN (300 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 7.11$ (s, 8H, ArH), 4.65 (s, 8H, Ar- $\text{CH}_2\text{-N}$), 4.40 (d, 4H, Ar- $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4.28 (s (ancho), 8H, $\text{CH}_2\text{-N-(CH}_3)_3$), 4.05 (s (ancho), 8H, $(\text{CH}_3)_2\text{-N-CH}_2$), 3.85 (t, 8H, O- CH_2), 3.45 (d, 4H, Ar- $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 3.26 (s, 36H, $-(\text{CH}_3)_3$), 2.90 (s, 24H, $-(\text{CH}_3)_2$), 1.90 (m, 8H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 0.99 (t, 12H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$).

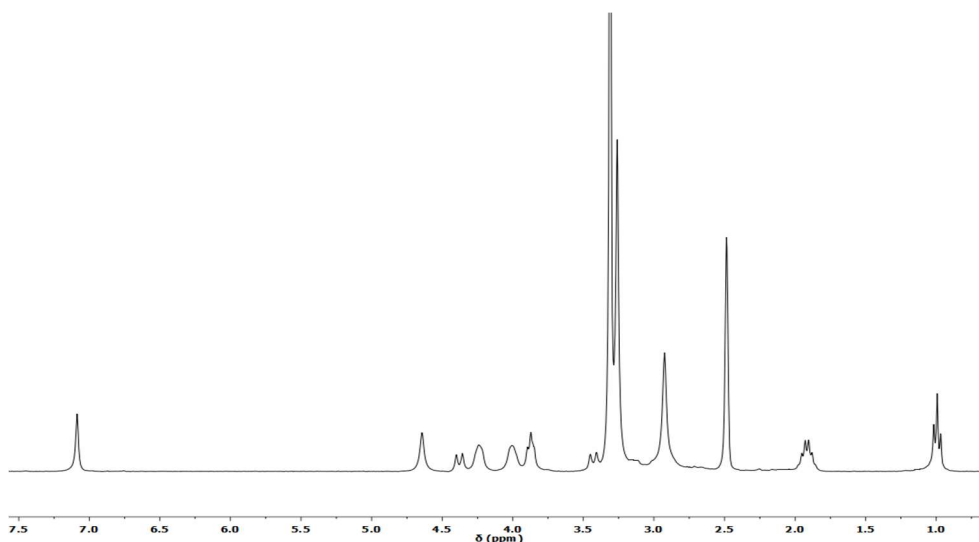


Figura 6.3 : Espectro de ^1H RMN del TC4 en DMSO.

Podemos destacar, que con los calix[4]arenos utilizados en este trabajo todos los experimentos fueron realizados a concentraciones inferiores a la concentración micelar crítica, debido a que tienen una gran capacidad de autoagregación gracias a su naturaleza anfifílica.

Valoración microcalorimétrica isotérmica. Las valoraciones calorimétricas han sido realizadas en un microcalorímetro de valoración isotérmica (VP-ITC) de Microcal Co. a presión atmosférica y 25°C . En un experimento típico, previamente a la toma de las medidas, se desgasifican las disoluciones de las muestras en un sistema ThermoVac (MicroCal, Inc.). En cada valoración la celda de referencia se enrasa con agua Milli-Q. A continuación, desde la jeringa de inyección se añade gradualmente una disolución de *guest* (0.268 mL) en la celda de reacción (1.459 mL) manteniendo una agitación constante (459 rpm). En todos los experimentos, se rechazó la primera inyección para eliminar los efectos de difusión sobre la celda calorimétrica de materiales de la jeringa. Se utilizó el software ORIGIN (Microcal Inc.) para calcular la constante de equilibrio (K) a partir de una única curva de valoración. El calor de reacción para cada experimento se calculó mediante el modelo de "*one set of binding sites*".

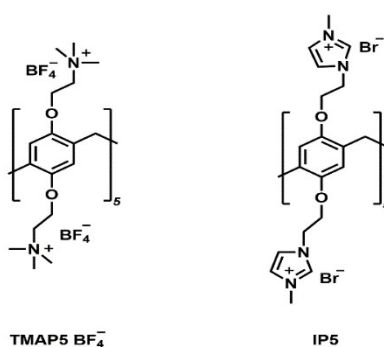
Experimentos de RMN. Tanto los experimentos de ^1H RMN como los experimentos de DOSY (^1H y ^{19}F) fueron adquiridos a 25°C en un espectrofómeto Varian Inova 500. Los espectros de ^1H DOSY fueron adquiridos mediante experimentos de eco spin con pulsos de gradientes bipolares (DOSY-Dbppste)²⁵, mientras que para los espectros de ^{19}F DOSY

se obtuvieron mediante experimentos de eco spin con un gradiente simple (DOSY-Doneshot)²⁶. Se aplicaron pulsos de gradientes (G) rectangulares y su potencia fue incrementada de 4.0 a 141.8 cm⁻¹ para el ¹H y de 1.85 a 17.7 cm⁻¹ para el ¹⁹F en 20 pasos. La duración del gradiente de campo pulsado (δ) para codificar y decodificar la difusión fue de 1.6 ms para los experimentos de ¹H y de 2 ms para los de ¹⁹F. El tiempo de difusión (Δ) fue optimizado a 50 ms para el ¹H y 300 ms para el ¹⁹F. La fuerza absoluta del gradiente fue calibrada utilizando una muestra de difusión conocida como referencia. La muestra utilizada en el calibrado para los experimentos de ¹H fue el D₂O 99% a 25°C ($D = 1.85 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)²⁷ y para los experimentos de difusión en ¹⁹F se usó una disolución de NaF 0.3 mM preparada en H₂O con un 10% de D₂O a 25°C ($D = 1.37 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)²⁸. Los datos fueron procesados utilizando el programa MestreC.

Estudio espectrofluorimétrico. Todos los espectros de fluorescencia se registraron en el fluorímetro Cary Eclipse equipado con compartimientos de celdas termostalizadas a 25°C. Los espectros de emisión del pireno se realizaron a una longitud de onda de excitación de 334 nm, manteniendo constante su concentración en 8.6×10^{-7} M. Los espectros de fluorescencia de la sonda LCG en disolución acuosa se realizaron a una longitud de onda de excitación de 368 nm, con concentración constante de 1×10^{-6} M.

6.3 Resultados y Discusión

El objetivo de este trabajo, se centra en la capacidad de los calix[4]arenos como macrociclos receptores de aniones, además de su capacidad para complejar sus propios contraiones. En este estudio vamos a comparar los resultados finales obtenidos con dos de los calixarenos modificados (TMAC4TP y IC4), con los obtenidos con el pilarareno en condiciones similares (Esquema 6.6).



Esquema 6.6 : Estructuras moleculares de los pilar[5]arenos modificados.

6.3.1 Complejación del TMAC4TP con su propio contraión (BF_4^-) y con un *guest* aniónico (TSNa)

6.3.1.1 Complejación del contraión por el macrociclo

El calix[4]areno con ambos portales sustituidos, el portal inferior por cadenas alquílicas de 3 carbonos y el portal superior por el grupo trimetilamonio con contraiones de BF_4^- , en disolución acuosa tiene 4 contraiones BF_4^- , que corresponde a una cantidad considerable de sal en disolución. De este modo, la primera cuestión a considerar en este estudio es si los contraiones del calix[4]areno están complejados por el macrociclo (TMAC4TP). Para obtener esta información, se calcularon los coeficientes de autodifusión (D) por experimentos de ^1H y ^{19}F RMN DOSY, tanto para el TMAC4TP como para el contraión BF_4^- , para dos concentraciones de calix[4]areno. La difusión de RMN es una potente técnica que nos permite obtener simultáneamente los coeficientes de difusión (D) de todas las especies que coexisten en disolución, siempre que presenten picos distintos y no superpuestos^{29,30}. Dado que la difusión depende del tamaño y la forma de las moléculas, esta técnica se emplea habitualmente para el estudio de complejos *host:guest*. En la Figura 6.4 se muestran los coeficientes de difusión observados (D_{obs}) para el TMAC4TP y para el BF_4^- a distintas concentraciones de macrociclo.

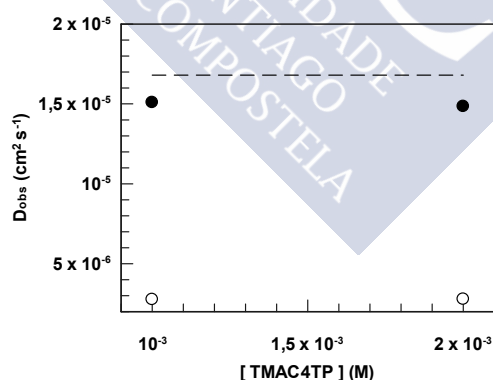


Figura 6.4 : Coeficientes de autodifusión para el TMAC4TP (○) y para el BF_4^- (●) en D_2O a 25°C. La línea discontinua representa el coeficiente de difusión de BF_4^- libre en disolución acuosa.

Como se puede observar, los coeficientes de difusión para el TMAC4TP no se ven afectados por el cambio de su concentración, se mantienen constantes, por tanto, se descarta la autoagregación del macrociclo bajo estas condiciones experimentales. Mientras que los coeficientes de difusión para el contraión (BF_4^-), disminuyen lentamente al aumentar la concentración de calixareno, lo que indica que una fracción de ellos están

unidos al TMAC4TP. Si comparamos, los coeficientes de difusión de los contraiones BF_4^- con los del anión BF_4^- puro en disolución acuosa, se observa que son siempre más pequeños ($D_{\text{obs}} = (1.68 \pm 0.05) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; línea discontinua en la Figura 6.4).

El coeficiente de difusión del anión BF_4^- puro, es independiente de la concentración de sal KBF_4 , y por lo tanto se descartaron cambios en la viscosidad de la disolución en el intervalo de concentraciones estudiados. Si asumimos que la formación de complejos entre TMAC4TP y el BF_4^- es rápida en la escala de tiempo del RMN, el coeficiente de difusión observado (D_{obs}) se expresa como un promedio ponderado entre el estado libre y complejo, según la ecuación:

$$D_{\text{obs}} = \chi_{\text{bound}} D_{\text{bound}} + (1 - \chi_{\text{bound}}) D_{\text{free}} \quad (6.1)$$

Por tanto, a partir del coeficiente de difusión BF_4^- en presencia de calixareno, $D_{\text{BF}_4^-}^{\text{TMAC4TP}}$, podemos obtener la fracción molar de BF_4^- complejo, $\chi_{\text{bound}}^{\text{BF}_4^-}$, usando la ecuación (6.2):

$$\chi_{\text{bound}}^{\text{BF}_4^-} = \frac{D_{\text{free}}^{\text{BF}_4^-} - (D_{\text{BF}_4^-}^{\text{TMAC4TP}})_{\text{obs}}}{D_{\text{free}}^{\text{BF}_4^-} - D_{\text{TMAC4TP}}^{\text{TMAC4TP}}} \quad (6.2)$$

donde $D_{\text{free}}^{\text{BF}_4^-}$ es el coeficiente de difusión para el BF_4^- no complejo y se obtiene de la disolución de NaBF_4 en ausencia de calixareno, y $D_{\text{TMAC4TP}}^{\text{TMAC4TP}}$ es el coeficiente de difusión del calixareno.

Los datos de $\chi_{\text{bound}}^{\text{BF}_4^-}$ recogidos en la Tabla 6.1, muestran que al aumentar la concentración de TMAC4TP, la fracción de BF_4^- asociado con el macrociclo aumenta ligeramente. Debido a que la relación molar *host:contraión* se mantuvo constante en todos los experimentos (1:4), los valores calculados para $\chi_{\text{bound}}^{\text{BF}_4^-}$ confirman que el macrociclo puede acomodar aproximadamente uno o ninguno de los contraiones en su cavidad. Estos resultados indican que la carga neta positiva en la parte superior del anillo de TMAC4TP, no se ve afectada por la concentración del macrociclo en disolución.

Tabla 6.1 : Coeficientes de difusión observados para el contraión BF_4^- en distintas concentraciones de la muestra de TMAC4TP ($D_{BF_4}^{TMAC4TP}$), y los correspondientes coeficientes de difusión para el macrociclo TMAC4TP ($D_{TMAC4TP}^{TMAC4TP}$).

[TMAC4TP] (M)	$10^5 D_{BF_4}^{TMAC4TP}$ (cm ² /s)	$10^6 D_{TMAC4TP}^{TMAC4TP}$ (cm ² /s)	$\chi_{bound}^{BF_4^-}$
0.001	1.509±0.171	2.761±0.088	0.122
0.002	1.485±0.092	2.786±0.038	0.139

Esta conclusión contrasta con los estudios previos de nuestro grupo²², donde se muestra que los pilararenos pueden acomodar aproximadamente hasta cinco contraiones BF_4^- , dependiendo de la concentración del macrociclo. Como consecuencia de esta complejación, la carga neta del pilarareno cambia de aproximadamente 10 cargas positivas (para concentraciones de pilarareno < 10⁻⁶ M) a cinco cargas positivas para concentraciones de pilarareno de más de 10⁻³ M. Los resultados muestran que el pilarareno tiene una mayor capacidad para complejar sus propios contraiones, en comparación con el calixareno.

6.3.1.2 Complejación del TMAC4TP con *p*-toluensulfonato sódico (TSNa)

La capacidad de complejación del *guest* aniónico (TSNa) por el calix[4]areno sustituido en el portal superior con trimetilamonio, se estudió a través de experimentos de ¹H RMN y por fluorescencia del pireno.

6.3.1.2.1 Análisis de los espectros de ¹H RMN

Los estudios sistemáticos de ¹H RMN, proporcionan información valiosa sobre la estequiometría y estructura de los complejos. Los cambios en los desplazamientos químicos del *guest* inducidos por la complejación ($\Delta\delta = \delta_{bound} - \delta_{free}$) son muy ilustrativos con respecto a su ubicación relativa a la cavidad del TMAC4TP BF_4^- .

En la Figura 6.5 se muestran los espectros de ¹H RMN del calix[4]areno en presencia de distintas concentraciones de *p*-toluensulfonato sódico. Tal como se puede observar, la adición sucesiva de mayores cantidades de TSNa a la muestra estándar de TMAC4TP BF_4^- (1.5 mM), no conduce a alteraciones de los desplazamientos químicos

de las señales pertenecientes al *guest*, lo que sugiere la ausencia de inclusión del TSNa en la cavidad rica en electrones del calix[4]areno.

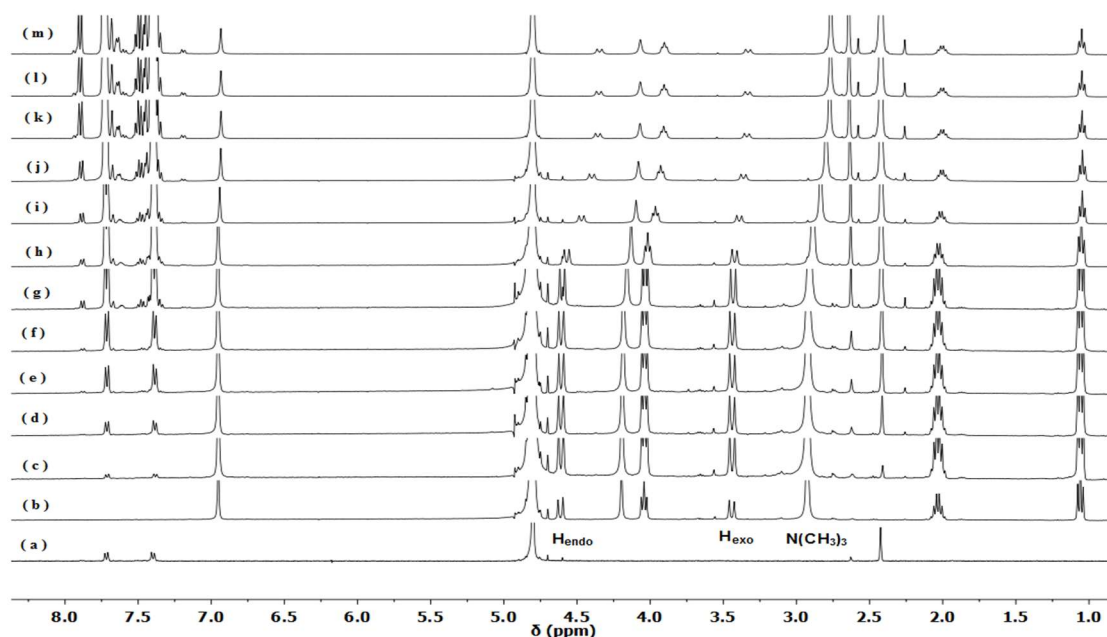


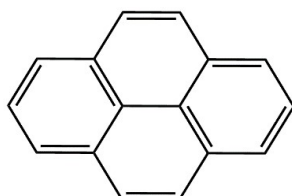
Figura 6.5 : Espectros ^1H RMN del TSNa (1 mM) (a) y del TMAC4TP BF_4^- (1.5 mM) en ausencia (b), y en presencia de distintas concentraciones de TSNa: (c) $[\text{TSNa}] = 0.1\text{mM}$; (d) $[\text{TSNa}] = 0.5\text{mM}$; (e) $[\text{TSNa}] = 1\text{mM}$; (f) $[\text{TSNa}] = 1.5\text{mM}$; (g) $[\text{TSNa}] = 5\text{mM}$; (h) $[\text{TSNa}] = 10\text{mM}$; (i) $[\text{TSNa}] = 25\text{mM}$; (j) $[\text{TSNa}] = 50\text{mM}$; (k) $[\text{TSNa}] = 100\text{mM}$; (l) $[\text{TSNa}] = 120\text{mM}$; (m) $[\text{TSNa}] = 140\text{mM}$.

Cuando la relación molar *host/guest* es inferior o igual a 1 (del caso (f) al (m)), se observa unos cambios en las señales del calix[4]areno, especialmente en los protones que pertenecen a los grupos puente (H_{endo} y H_{exo}) y a los grupos trimetilamonio ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), desplazándose ligeramente hacia campo alto. Debido a que consideramos que no se forma complejo de inclusión entre el TMAC4TP BF_4^- y el TSNa, debemos saber a qué se deben estos cambios en los espectros de ^1H RMN. En este experimento se realizó una adición sucesiva de *p*-toluensulfonato, considerando que la presencia de grandes cantidades de sales en el medio puede alterar drásticamente la cmc de surfactantes, por lo que realizamos medidas de espectroscopia de fluorescencia utilizando el pireno como molécula sonda.

6.3.1.2.2 Fluorescencia de emisión del pireno en presencia de TMAC4TP y TSNa

Para clarificar los resultados obtenidos por ^1H RMN, se ha recurrido a la espectroscopia de fluorescencia, utilizando el pireno como molécula sonda (ver Esquema 6.7). El pireno es un hidrocarburo aromático policíclico que presenta un espectro de

emisión característico, compuesto por cinco bandas de vibración. Esta técnica es útil para estudiar la agregación de surfactantes, debido a que el cociente entre la intensidad de la primera y de la tercera banda de vibración (I_1/I_3) en el espectro de fluorescencia del pireno, es muy sensible a los cambios de polaridad³¹, es decir, este cociente disminuye drásticamente cuando se pasa de un medio polar para un medio apolar.



Esquema 6.7

Como el pireno es una molécula apolar, tiende a asociarse a las micelas, observándose un cambio muy brusco en el cociente I_1/I_3 en el momento que estas se forman, dando lugar así al valor de su cmc. En la Figura 6.6 determinamos la concentración micelar crítica para los calixarenos TMAC4TP, con contraión cloruro y tetrafluoroborato, en presencia de *p*-toluensulfonato a través de la fluorescencia de emisión del pireno.

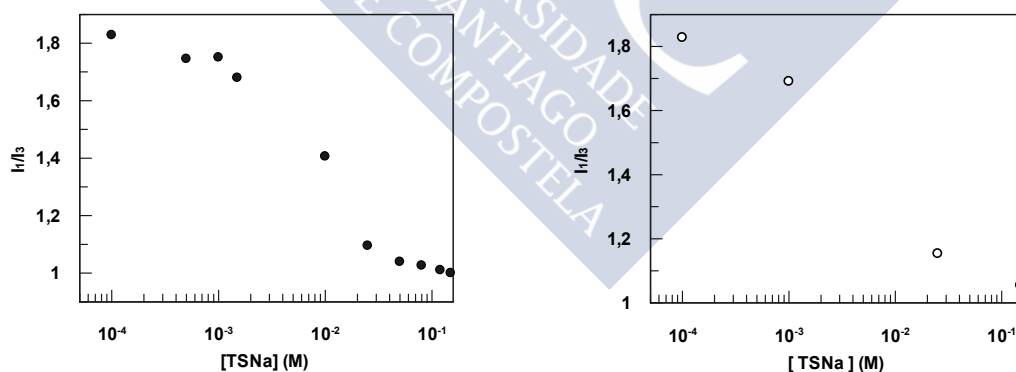


Figura 6.6 : Influencia de la concentración de *p*-toluensulfonato en el cociente I_1/I_3 para concentraciones de calix[4]areno constantes: (Izquierda) [TMAC4TP Cl⁻]= 1.5 mM; (Derecha) [TMAC4TP BF₄⁻]= 1.5 mM. [pireno] = 8.6×10^{-4} mM; T= 25°C.

Como podemos observar, la variación del cociente I_1/I_3 en función de la concentración de TSNa, presenta a concentraciones bajas un valor de $I_1/I_3=1.8$ que coincide con la ausencia de agregados, es el valor del pireno en agua. Mientras que al aumentar la concentración de *p*-toluensulfonato, el valor del cociente cae a valores

cercanos a 1, indicando que el pireno se encuentra en un entorno hidrofóbico, es decir, encapsulado en los agregados formados.

Los valores obtenidos para las cmc's de los TMAC4TP con distintos contraiones en presencia de TSNa, son aproximadamente el mismo 1 mM, es decir son independientes del contraión del calix[4]areno, pero si lo comparamos con el valor de la cmc del TMAC4TP en ausencia de *p*-toluensulfonato que es aproximadamente 12 mM (ver capítulo 5-Figura 5.1), vemos que la presencia de TSNa en el medio reduce drásticamente la cmc de estos calix[4]arenos. Por tanto, con este experimento hemos demostrado que la adición sucesiva de *p*-toluensulfonato a ambos TMAC4TP se traduce en una disminución de su cmc, posiblemente como consecuencia de la gran cantidad de sales presentes en el medio.

De este modo podemos confirmar que, los cambios en las señales del calix[4]areno obtenidos por ^1H RMN en presencia de un gran exceso de *p*-toluensulfonato, se deben a la agregación del macrociclo en lugar de la complejación con el *guest* (TSNa).

Estos resultados contrastan con los obtenidos en estudios previos de nuestro grupo²², donde se muestra que los pilararenos sustituidos con trimetilamonio (ver Esquema 6.6) forman complejos *host:guest* con el *p*-toluensulfonato. Los resultados obtenidos determinaron la formación de un complejo de inclusión con estequiometría 1:1 entre ambos compuestos, con una constante de equilibrio del rango de 10^6 M^{-1} ; y además, a mayores relaciones molares *guest/host* el pilarareno no sólo forma complejos estables 1:1, sino que también forma complejos con un *guest* externo, para formar complejos 2:1.

6.3.2 Complejación del IC4 con su propio contraión (Cl⁻) y con distintos *guests* aniónicos

Los cambios estructurales en el portal superior del calix[4]areno, al sustituir los grupos trimetilamonio por grupos metilimidazol, tienen un efecto importante en la complejación del contraión por los calix[4]arenos y se probará si este efecto debe extenderse a los *guests* aniónicos externos. La cmc del IC4 fue determinada por el método conductivimétrico, donde la intersección de las dos rectas trazadas a partir de los datos de conductividad, da un valor de aproximadamente entre 1 y 3 mM.

6.3.2.1 Complejación del contraión por el macrociclo, utilizando un colorante, la lucigenina (LCG)

En el apartado de la complejación del TMAC4TP con sus contraiones BF_4^- , se concluyó que la interacción entre el TMAC4TP con sus contraiones BF_4^- transcurre principalmente mediante interacciones electrostáticas. Ahora al sustituir los grupos trimetilamonio por grupos metilimidazol del calix[4]areno, se pueden añadir interacciones por enlace de hidrógeno a la interacción electrostática, lo que da la posibilidad de una mayor capacidad de complejar contraiones.

Para comprobar la posibilidad de complejar los contraiones Cl^- por el IC4, realizamos experimentos de fluorescencia con una sonda fluorescente. A partir de estos experimentos, se pueden obtener las concentraciones de iones cloruro que coexisten libres en equilibrio con el macrociclo (IC4). A partir de las concentraciones de cloruro libre, es fácil calcular la fracción molar del contraión complejado. Se escogió como sonda fluorescente la lucigenina (LCG, N,N'-dimetil-9,9'-biacridinium dinitrato), que es un colorante catiónico^{32,33} y no interactúa con nuestro macrociclo catiónico, IC4. Podemos destacar que, la fluorescencia de la sonda utilizada (LCG) puede ser *quencheada* eficazmente³⁴ por haluros, cianato, tiocianato y aminas, de tal modo que es fácil de obtener la concentración de cloruro libre en equilibrio con el macrociclo.

Antes de proceder a realizar los experimentos en presencia de calix[4]areno con la lucigenina, primero debemos evaluar el *quenching* de la LCG por el Cl^- (NaCl). En la Figura 6.7-izquierda se muestra el comportamiento del espectro de la LCG cuando aumentamos la concentración de NaCl. Como se puede observar, se produce una disminución de la intensidad, acorde a lo que dijimos anteriormente, la fluorescencia de la sonda se *quenecha* en presencia de haluros. Por otro lado, en la Figura 6.7-derecha se muestra la relación entre la intensidad de fluorescencia y la concentración del *quencher* (anión Cl^-). Esta relación de intensidades se puede describir por la ecuación de Stern-Volmer (6.3):

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[\text{Cl}^-] \quad (6.3)$$

donde I_0 es la intensidad de fluorescencia del fluoróforo (LCG) en ausencia de los iones Cl^- e I es la intensidad de fluorescencia en presencia de los iones Cl^- . K_{SV} es la constante de *quenching* de Stern-Volmer³³.

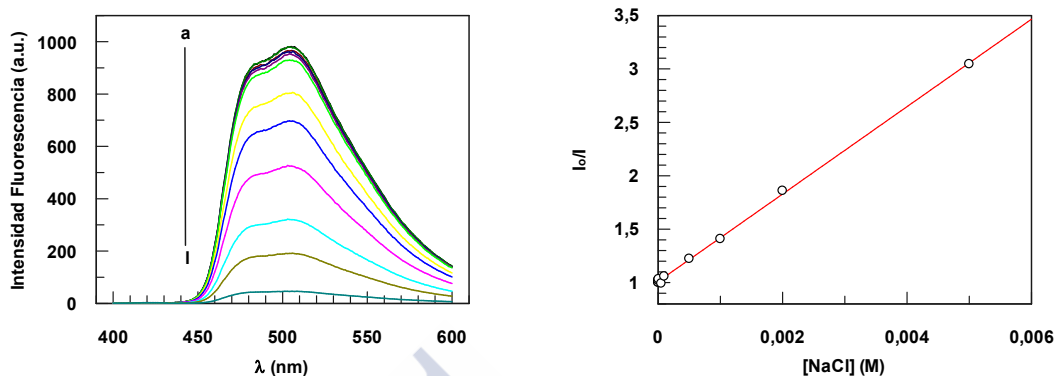


Figura 6.7 : (Izquierda) Influencia del incremento de la concentración de NaCl ($a = 0 \text{ M} \rightarrow 1 = 5 \times 10^{-2} \text{ M}$) en el espectro de fluorescencia de la $[\text{LCG}] = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$. (Derecha) Representación gráfica de I_0/I frente a la $[\text{NaCl}]$ según la ecuación de Stern-Volmer a 25°C .

En medio acuoso, podemos decir que la lucigenina, LCG, tiene una alta sensibilidad al cloruro (Cl^-) ya que si ajustamos los datos experimentales a la ecuación (6.3), obtenemos el valor para la constante de Stern-Volmer, $K_{SV} = 404.4 \text{ M}^{-1}$ para el Cl^- .

En la Figura 6.8-izquierda se muestra como disminuye la intensidad en el espectro de la fluorescencia de LCG en función de la concentración del macrociclo (IC4). Debemos tener en cuenta que al aumentar la concentración de IC4, también estamos aumentando la concentración de cloruro, porque el calix[4]areno tiene de partida cuatro contraiones Cl^- . El *quenching* de la fluorescencia de lucigenina por el macrociclo (IC4) no se observa bajo las condiciones experimentales que estudiamos, probablemente debido a la repulsión electrostática entre el macrociclo catiónico (IC4) y el colorante de fluorescencia (LCG) también catiónico.

A partir de los datos experimentales mostrados en la Figura 6.8-izquierda y utilizando la ecuación de Stern-Volmer mostrada previamente con una $K_{SV} = 404.4 \text{ M}^{-1}$, podemos obtener el porcentaje de contraiones Cl^- complejados. Como puede observarse en la Figura 6.8-derecha, este porcentaje aumenta con la concentración del macrociclo porque tenemos 4 contraiones para el IC4, alcanzando un valor límite en el que se ha neutralizado el 25% de la carga, lo que corresponde a un ion cloruro complejado por el calix[4]areno.

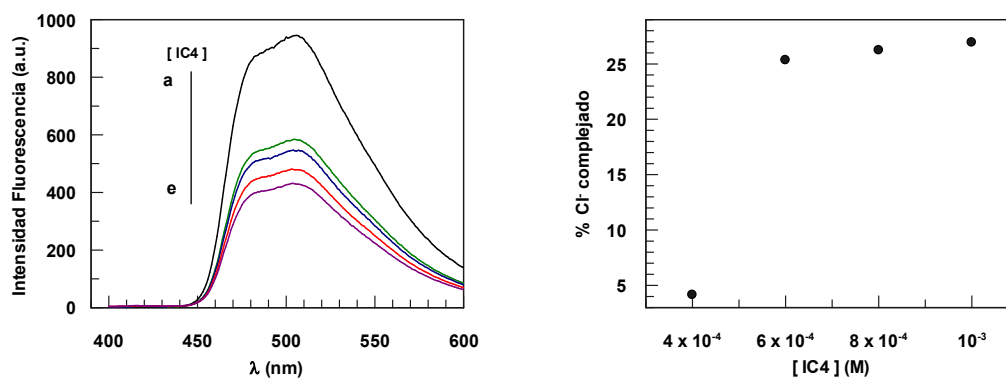


Figura 6.8 : (Izquierda) Influencia del incremento de la concentración de IC4 ($a = 0 \text{ M} \rightarrow e = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$) en el espectro de fluorescencia de la $[\text{LCG}] = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$. (Derecha) Influencia de la concentración del IC4 en el porcentaje de iones cloruro complejados por el macrociclo.

Si comparamos estos resultados obtenidos con el IC4 con los obtenidos para el TMAC4TP BF_4^- , se observa que para el IC4 a concentraciones superiores a 0.5mM un contraión cloruro está complejado por el macrociclo, sin embargo para el TMAC4TP BF_4^- a concentraciones de 1mM no se alcanza ese porcentaje de tetrafluoroborato complejado, a pesar del mayor carácter hidrófobo de los iones tetrafluoroborato en comparación con los iones cloruro. Los resultados experimentales muestran que los calixarenos son muy selectivos en cuanto a su habilidad para complejar, dependiendo tanto del grupo de cabeza como de la naturaleza de las interacciones intermoleculares.

Por último, estos resultados contrastan con los obtenidos en estudios previos de nuestro grupo^{22,35}, donde se demuestra que los pilararenos con distintas modificaciones en el portal superior, TMAP5 y IP5 (ver estructuras en Esquema 6.6), pueden complejar contraiones distintos casi con el mismo porcentaje. Los aniones de tetrafluoroborato se unieron al TMAP5 neutralizando casi el 50% de la carga, y se obtuvo casi el mismo porcentaje de complejación para los iones bromuro con IP5 un 45%, independientemente del distinto carácter hidrófobo de los contraiones. Se esperaba un mayor porcentaje de carga neutralizada para TMAP5, ya que los iones de bromuro son más hidrófilos que el tetrafluoroborato. Por otro lado, podemos destacar para la explicación de la capacidad de reconocimiento de aniones por los pilararenos, que el enlace de hidrógeno, sólo es posible para el IP5, a mayores de las interacciones electroestáticas.

6.3.2.2 Complejación del IC4 con *p*-toluensulfonato sódico (TSNa)

La capacidad de complejación del *guest* aniónico (TSNa) por el calix[4]areno, sustituido en el portal superior por los grupos metilimidazol, se estudió a través de experimentos de ^1H RMN y de medidas calorimétricas.

6.3.2.2.1 Análisis de los espectros de ^1H RMN

El análisis de los cambios en los desplazamientos químicos inducidos por la complejación ($\Delta\delta = \delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}$) en las señales de resonancia de los protones del *guest* (TSNa) nos proporcionan información sobre su ubicación con respecto al macrociclo (IC4).

En la Figura 6.9 se muestran los espectros de ^1H RMN del IC4 en presencia y ausencia de *p*-toluensulfonato. Como se puede observar, los cambios en los desplazamientos químicos de los protones del TSNa presentan desplazamientos hacia campo alto ($\Delta\delta < 0$) por tanto, sugiere la formación de un complejo de inclusión entre el *guest* aniónico y el macrociclo catiónico.

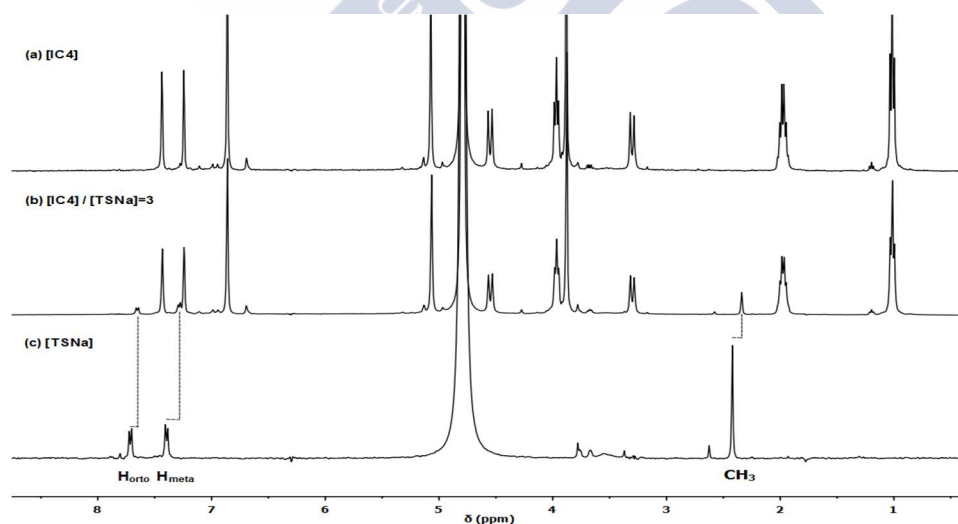


Figura 6.9 : Espectros de ^1H RMN del IC4 en presencia del *p*-toluensulfonato en D_2O a 25°C . (a) $[\text{IC4}]=0.9\text{mM}$, (b) $[\text{IC4}]=0.9\text{mM}$ $[\text{TSNa}]=0.3\text{mM}$ y (c) $[\text{TSNa}]=0.3\text{mM}$.

Los valores de los desplazamientos de los protones del TSNa siguen el siguiente orden $\text{CH}_3 > \text{meta} > \text{orto}$, lo que nos indica que el grupo metilo del *guest* debe estar más incorporado en la cavidad del macrociclo, mientras que el grupo sulfonato debería estar más cerca de las cargas positivas del grupo metilimidazol del macrociclo (ver estructura del TSNa- Esquema 6.1).

Cuando se realizó el estudio con el calix[4]areno modificado con grupos trimetilamonio (TMAC4TP BF₄⁻) con el *guest* aniónico (TSNa), se observó que no había interacción entre ambos. Sin embargo, ahora con el calix[4]areno modificado con grupos metilimidazol y el mismo *guest*, se observa la formación de un complejo de inclusión 1:1.

Esto demuestra que la correcta elección de los grupos funcionales en los centros de reconocimiento es un paso crítico en el diseño y la construcción de este tipo de receptores moleculares.

6.3.2.2.2 *Determinación de la constante de equilibrio entre el IC4 y el TSNa*

La constante de equilibrio y la estequiometría del complejo formado por el IC4 y el *p*-toluensulfonato sódico se pueden determinar por la valoración calorimétrica isotérmica (ITC), obteniéndose directamente los valores de las constantes de equilibrio y los parámetros termodinámicos asociados. En la Figura 6.10 se muestra los resultados obtenidos para cada valoración de TSNa con IC4. Los datos de las isothermas de complejación se ajustaron al modelo “One Set of Sites” dado por el software de MicroCal para complejos del tipo 1:1. A partir de este ajuste obtenemos simultáneamente el valor de la constante de equilibrio $K = (1.6 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y de los parámetros termodinámicos (ΔH° y ΔS°). Los resultados obtenidos nos indican que la complejación es impulsada principalmente por la entalpía ($\Delta H^\circ = -6500 \pm 200 \text{ J/mol}$), probablemente como consecuencia de las interacciones no covalentes, como la electrostática o interacción π (C-H $\cdots\pi$), que participan en el proceso de complejación entre ambas especies, acompañadas por cambios entrópicos favorables ($\Delta S^\circ = 39.3 \text{ J/mol K}$) debido a cambios conformacionales y efectos de desolvatación³⁶.

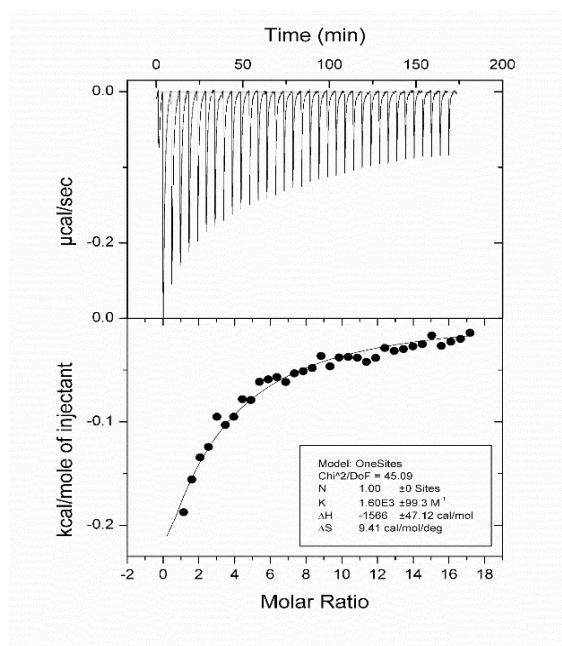


Figura 6.10 : Valoración calorimétrica de 268 μL de *p*-toluenosulfonato (8 mM) en 1.459 mL de IC4 (0.1 mM) en 35 inyecciones a 25°C. (Arriba) Trazas calorimétricas (flujo de calor vs tiempo) para las 35 inyecciones (8 μL por inyección) de una disolución de TSNa (8 mM) en una disolución de IC4 (0.1 mM). (Abajo) Isotherma de complejación (obtenida por la integración de las trazas calorimétricas) vs Relación Molar.

Sin embargo, la valoración calorimétrica utilizando *p*-toluenosulfonato y el pilar[5]areno sustituido con imidazol (IP5) no muestra calor de reacción aparente³⁵. Sabemos que se forma un complejo de inclusión entre ambas especies, debido a que en los experimentos realizados por ^1H RMN, se producen cambios experimentales en los desplazamientos químicos de los protones de *p*-toluenosulfonato hacia campo alto, los cuales son aproximadamente cuatro veces más grandes que los obtenidos usando IC4. Este hecho, probablemente está relacionado con algún tipo de compensación entalpía-entropía que se produce cuando ΔG° es aproximadamente constante dentro de la reacción, mientras que ΔH° y ΔS° varían significativamente, causando una termoneutralidad que conduce a la imposibilidad de detectar la complejación entre un *host* y un *guest* por valoración calorimetría isotérmica^{37,38}.

6.3.2.3 Complejación del IC4 con 4-HidroxiBenzoato (4-HyBz)

Los calix[4]arenos sustituidos con el grupo imidazol (IC4), producen constantes de equilibrio para los aniones mayores que con el TMAC4TP. Este comportamiento se observó tanto en el porcentaje de complejación del contraión como en la complejación con el *guest* aniónico de *p*-toluenosulfonato. Esta diferencia puede ser atribuida a la suma

de la interacción por enlace de hidrógeno además de las interacciones electrostáticas. Debido a que la interacción del tipo enlace de hidrógeno iónico $(\text{C-H})^+ \cdots \text{X}^-$ puede ser posible³⁹, elegimos el anión 4-hidroxibenzoato como *guest* para el siguiente estudio con el calix[4]areno, IC4.

6.3.2.3.1 Análisis de los espectros de ^1H RMN

En la Figura 6.11 se muestran los espectros de ^1H RMN del IC4 en presencia y ausencia de 4-hidroxibenzoato. Como se puede ver, se observaron pequeños cambios en los desplazamientos químicos de los protones aromáticos del 4-HyBz hacia campo alto ($\Delta\delta = -0.03$ ppm), posiblemente inducidos por la complejación con el calix[4]areno (ver estructura del 4-HyBz- Esquema 6.1).

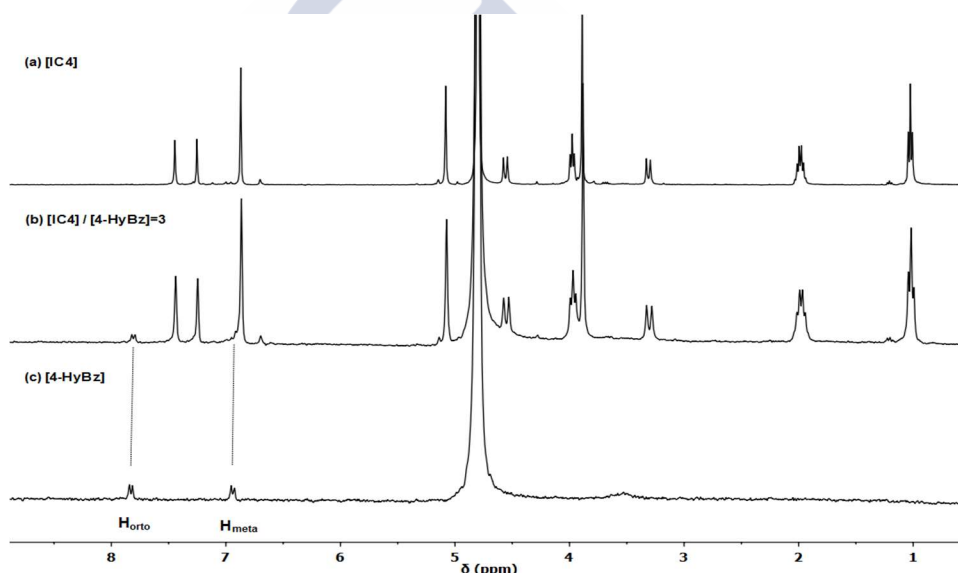


Figura 6.11 : Espectros de ^1H RMN del IC4 en presencia del 4-Hidroxibenzoato en D_2O a 25°C . (a) $[\text{IC4}] = 0.9\text{mM}$, (b) $[\text{IC4}] = 0.9\text{mM}$ $[\text{4-HyBz}] = 0.3\text{mM}$ y (c) $[\text{4-HyBz}] = 0.3\text{mM}$.

Por otra parte, y teniendo en cuenta que ambos *guests* aniónicos, el *p*-toluensulfonato y el 4-hidroxibenzoato no son demasiado distintos en su tamaño y forma, este pequeño desplazamiento de las señales de los protones aromáticos podría explicarse si el 4-hidroxibenzoato no se encuentra en el interior de la cavidad aromática del IC4, como ocurre en el caso del *p*-toluensulfonato. En el posible complejo formado por el IC4 con el 4-hidroxibenzoato, tanto las interacciones electrostáticas entre las cargas positivas de los grupos imidazol del calixareno y el grupo carboxílico del 4-hidroxibenzoato, así como las interacciones por enlace de hidrógeno tendrían más

influencia, estabilizando el complejo en la zona del portal superior en lugar de en la cavidad aromática.

6.3.2.3.2 Determinación de la constante de equilibrio entre el IC4 y el 4-HyBz

La constante de equilibrio y la estequiometría del complejo formado por el IC4 y el 4-hidroxibenzoato se pueden determinar por la valoración calorimétrica isotérmica (ITC), obteniéndose directamente los valores de las constantes de equilibrio y los parámetros termodinámicos asociados. En la Figura 6.12 se muestra la valoración calorimétrica del 4-HyBz con el IC4, dando un calor de reacción aparente causado por la formación de un complejo de inclusión entre ambas especies. Los datos de las isotermas de complejación se ajustaron al modelo "One Set of Sites" dado por el software de MicroCal para complejos del tipo 1:1. A partir de este ajuste obtenemos el valor de la constante de equilibrio $K = (1.9 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, que es un valor aproximadamente 10 veces mayor en comparación con el que obtuvimos para el complejo de inclusión formado entre el IC4 y el *p*-toluensulfonato.

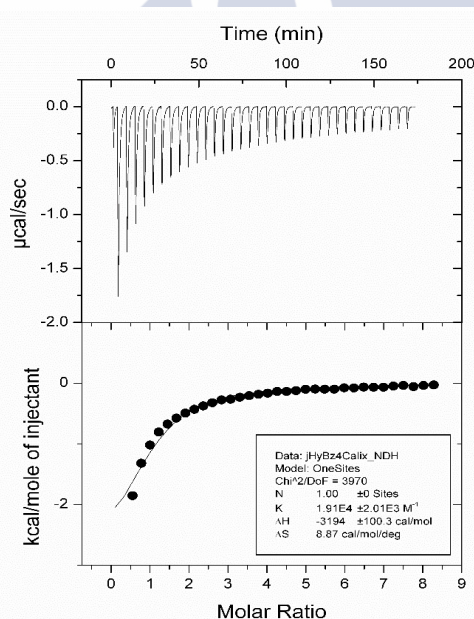


Figura 6.12 : Valoración calorimétrica de 268 μL de 4-hidroxibenzoato (4 mM) en 1.459 mL de IC4 (0.1 mM) en 35 inyecciones a 25°C. (Arriba) Trazas calorimétricas (flujo de calor vs tiempo) para las 35 inyecciones (8 μL por inyección) de una disolución de 4-HyBz (4 mM) en una disolución de IC4 (0.1 mM). (Abajo) Isotherma de complejación (obtenida por la integración de las trazas calorimétricas) vs Relación Molar.

Los resultados obtenidos para los parámetros termodinámicos indican que el complejo formado por el IC4 con el 4-HyBz está favorecido entálpicamente, con un valor

de $\Delta H^\circ = -13400 \pm 400$ J/mol, como consecuencia de las múltiples interacciones no covalentes que se producen en el proceso de complejación, mientras que los cambios entrópicos favorables, $\Delta S^\circ = 37$ J/mol K, son similares en ambos casos. Por lo tanto, como resultado de la rica versatilidad que este tipo de macrociclos tienen para ofrecer en el campo de la química *host-guest*, usando un calix[4]areno anfifílico como receptor molecular catiónico y las modificaciones correctas, pasamos de la ausencia de interacción entre el *guest* (*p*-toluensulfonato) y el *host* (TMAC4TP) a la formación de complejos de inclusión estables entre el IC4 con el *p*-toluensulfonato y con el 4-hidroxibenzoato.

A modo de resumen, en la comparación entre el IC4 y el IP5 para la complejación con estos dos *guests* aniónicos (TSNa y 4-HyBz), podemos destacar que la introducción de grupos imidazol en el pilar[5]areno (IP5) proporciona al receptor catiónico una característica especial e interesante que no se aplica para el caso del IC4, su carácter fluorescente, que lo convierte en un potencial quimiosensor fluorescente³⁵. Con el fin de determinar la constante de equilibrio para IP5 e 4-hidroxibenzoato, se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia, a partir de los cuales vemos como varía la intensidad de fluorescencia del pilar[5]areno ($\lambda = 464$ nm) con el aumento de la concentración de 4-HyBz. A partir del ajuste no lineal de los datos experimentales, se obtuvo el valor de la constante de equilibrio $K = (1.1 \pm 0.2) \times 10^6$ M⁻¹. Si comparamos este valor de la constante de equilibrio, con la que obtuvimos en nuestro caso con el IC4, podemos decir que con el IP5 es casi 100 veces mayor. Para el caso de complejación del IP5 con *p*-toluensulfonato, dicho complejo no implica el *quenching* de la fluorescencia del macrociclo. Por tanto, debemos monitorizar la regeneración de la fluorescencia mediante un método de complejación competitiva, para obtener la constante de equilibrio del complejo. Con este fin, se estudió la influencia de la concentración de *p*-toluenosulfonato en la intensidad de fluorescencia del complejo formado por el IP5 y 4-hidroxibenzoato, esto induce a la recuperación de la fluorescencia del IP5 como consecuencia del desplazamiento del 4-HyBz por el TSNa de la cavidad del pilar[5]areno, dando lugar a la formación de un nuevo complejo entre el IP5 y el TSNa con una constante de equilibrio, $K = (3.5 \pm 0.4) \times 10^4$ M⁻¹. Una vez más, y debido a todas las razones discutidas a través de este trabajo, se obtuvieron constantes de equilibrio más altas en el caso de los pilararenos en comparación con los de los calixarenos como consecuencia de la mejor complementariedad de las especies que forman el complejo.

6.3.3 Complejación del TC4 con distintos *guests* aniónicos

Este tipo de calix[4]areno modificado consta de 8 grupos catiónicos en el portal superior, con una separación entre ellos, y una región aromática rica en electrones, mejorando la capacidad para complejar distintos *guest* aniónicos. Un calix[4]areno parecido al TC4 se encuentra en la bibliografía^{12,40}, y sus estudios demostraron que la formación de micelas se dan a concentraciones bastantes altas, dando un valor para la cmc de aproximadamente 3×10^{-3} M, en disolución acuosa. Por tanto, debido a la similitud estructural con nuestro calix[4]areno podemos considerar que el valor de la cmc es prácticamente el mismo para TC4.

6.3.3.1 Complejación del TC4 con *p*-toluensulfonato sódico (TSNa)

La capacidad para complejar el *guest* aniónico (TSNa) por el calix[4]areno sustituido en el portal superior con 1-trimetilamonio-2-dimetilaminoetano (TC4), se estudió a través de experimentos de ^1H RMN.

6.3.3.1.1 Análisis de los espectros de ^1H RMN

En la Figura 6.13 se muestran los espectros de ^1H RMN del calix[4]areno en presencia de distintas concentraciones de *p*-toluensulfonato sódico. Los cambios en los desplazamientos químicos del *guest* inducidos por la complejación ($\Delta\delta = \delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}$) son muy ilustrativos con respecto a su ubicación relativa a la cavidad del TC4. Como se puede observar, la adición sucesiva de mayores cantidades de TSNa a la muestra estándar de TC4 (1.5 mM), no conduce a alteraciones en los desplazamientos químicos de las señales pertenecientes al *guest*, lo que sugiere la ausencia de inclusión del TSNa en la cavidad rica en electrones del calix[4]areno.

Cuando en los espectros de ^1H RMN la relación molar *host/guest* es inferior o igual a 1 a partir del caso (c), observamos que los cambios más significativos en los desplazamientos se producen en las señales del calix[4]areno, especialmente en los protones que pertenecen a los grupos puente ($H_{\text{endo}}=4.62\text{ppm}$ y $H_{\text{exo}}=3.48\text{ppm}$), al carbono alfa del anillo aromático ($C_1=4.67\text{ppm}$) y a los grupos metilo de los nitrógenos ($N(\text{CH}_3)_3=3.34\text{ppm}$ (36H) y $N(\text{CH}_3)_2=3.09\text{ppm}$ (24H)), desplazándose lentamente hacia campo alto.

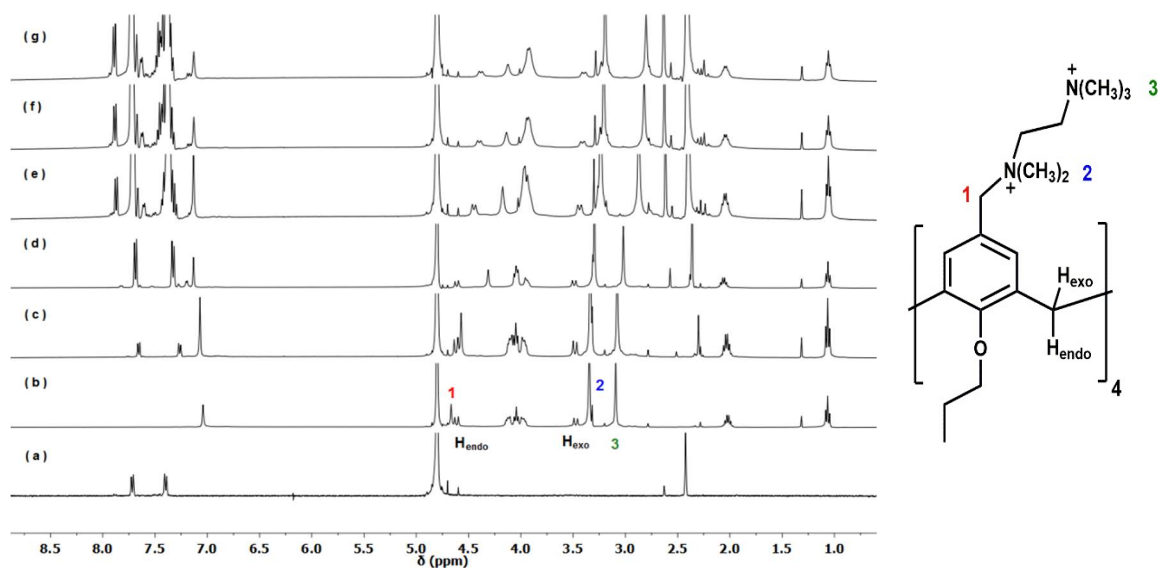


Figura 6.13 : Espectros ^1H RMN del TSNa (1 mM) solo (a) y del TC4 (1.5 mM) en ausencia (b), y en presencia de distintas concentraciones de TSNa: (c) [TSNa]=1.5mM; (d) [TSNa]=10mM; (e) [TSNa]=50mM; (f) [TSNa]=100mM; (g) [TSNa]=140mM. Las señales de los protones H_{endo} , H_{exo} , C_1 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ se muestran en los espectros y en la figura insertada del TC4.

Este comportamiento en los desplazamientos químicos es similar al observado en el caso del TMAC4TP BF_4^- con el *guest* TSNa, donde no se formaba el complejo de inclusión, y los cambios observados en los espectros de ^1H RMN del macrociclo se debían a la gran cantidad de sal presente en el medio, originando una significativa disminución de la cmc. En el presente caso, TC4 y el *p*-toluensulfonato sódico, los cambios observados en los espectros de ^1H RMN pueden deberse igualmente a la agregación del macrociclo en lugar de la complejación del *guest* por el calix[4]areno. Sin embargo, en este caso no hicimos el estudio de fluorescencia con el pireno para confirmarlo.

6.3.3.2 Complejación del TC4 con el ácido 1,3-Propanodisulfónico disodium sal (PropdSNa)

6.3.3.2.1 Determinación de la constante de equilibrio entre el TC4 y el PropdSNa

La constante de equilibrio del complejo formado por el TC4 y el PropdSNa se determinó por medidas de ITC. Los experimentos de calorimetría se realizaron colocando la disolución del TC4 en la celda de reacción y se fue añadiendo gradualmente la disolución del *guest* aniónico. En este caso, elegimos como *guest* la sal disódica del ácido 1,3-propanodisulfónico, porque en disolución acuosa sus dos cargas negativas están casi

a la misma distancia que las dos cargas positivas del calix[4]areno modificado en el portal superior, y la capacidad para complejarse entre ambos puede ser mayor.

En la Figura 6.14 se muestran los resultados obtenidos para cada valoración del PropdSNa con el TC4, y los datos de las isoterms de complejación se ajustaron a un modelo de ecuaciones para complejos del tipo 1:1 suministradas por el software de MicroCal, a partir del cual se obtuvieron los valores de la constante de equilibrio $K = (7.03 \pm 0.28) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y de los parámetros termodinámicos (ΔH° y ΔS°). Los resultados obtenidos indican que la formación del complejo 1:1, entre el TC4 y el PropdSNa, está favorecida en términos entrópicos ($\Delta S^\circ = 143 \text{ J/mol K}$) y desfavorecida en términos entálpicos ($\Delta H^\circ = 20767 \pm 350 \text{ J/mol}$). El elevado cambio entrópico puede ser resultado del proceso de desolvatación del TC4, mientras que la entalpía positiva probablemente resulta de la energía necesaria para el proceso de desolvatación que supera la energía liberada en el proceso de complejación.

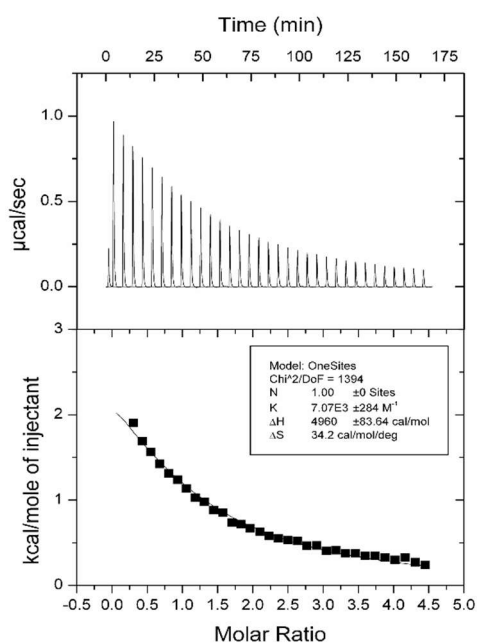


Figura 6.14 : Valoración calorimétrica de 268 μL de 1,3-Propanodisulfónico disodium sal (2.22 mM) en 1.459 mL de TC4 (0.1 mM) en 35 pasos a 25°C. (Arriba) Trazas calorimétricas (flujo de calor vs tiempo) para las 35 inyecciones (8 μL por inyección) de una disolución de PropdSNa (2.22 mM) en una disolución de IC4 (0.1 mM). (Abajo) Isotherms de complejación (obtenidas por la integración de las trazas calorimétricas) vs Razón Molar.

Por tanto, este calix[4]areno anfífilico modificado actúa como receptor molecular catiónico, observándose interacción entre el *guest* (PropdSNa) y el *host* (TC4) dando lugar a un complejo de inclusión.

6.4 Conclusión

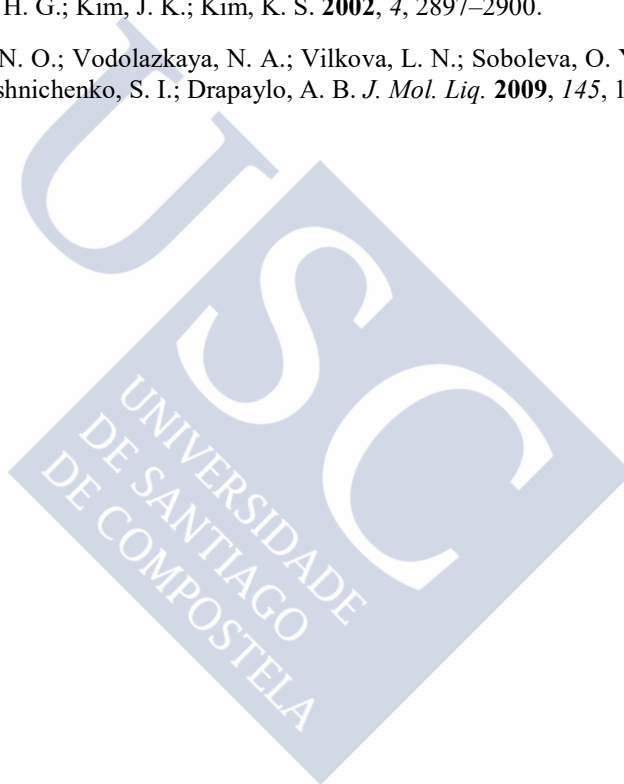
Los resultados obtenidos en este estudio, nos permitieron confirmar la formación de complejos de inclusión entre los calix[4]arenos catiónicos modificados y los distintos *guests* aniónicos. Una característica importante es que los macrociclos tienen la capacidad de complejar sus propios contraiones, tal como estudiamos en el caso del TMAC4TP con BF_4^- o el IC4 con Cl^- , afectando así a su carga neta y modificando sus propiedades para actuar como receptor de aniones. La principal ventaja de estos calix[4]arenos para actuar como receptores aniónicos, resulta de la modificación de su portal superior con sustituyentes catiónicos, aportando una mayor separación entre la carga positiva y la cavidad rica en electrones del macrociclo. De este modo aumenta la posibilidad de complejación con distintos *guests* aniónicos, tal como es observado en los distintos casos estudiados en este capítulo. Cuando sustituimos los grupos trimetilamonio por los grupos metilimidazol en el macrociclo, además de las interacciones electrostáticas, nos permite incorporar interacciones por enlace de hidrógeno. Estos cambios estructurales tienen un efecto importante en la complejación del contraión y de los *guests* aniónicos. En el estudio de comparación de la posibilidad de los calix[4]arenos en complejar sus propios aniones, verificamos que el TMAC4 BF_4^- y el IC4 Cl^- complejan sus propios aniones, pero se detecta un mayor porcentaje de contraión complejoado en el caso del IC4. Sin embargo, en la complejación del *guest* externo, TSNa, con el IC4 se observa la formación del complejo de inclusión 1:1 entre ambos, mientras que con el TMAC4TP BF_4^- y el TC4 no se observa interacción con el *guest*, sino que los cambios observados en el espectro de ^1H RMN pueden deberse a la agregación del macrociclo.

Con este estudio pudimos demostrar que la correcta elección de los grupos funcionales en los sitios de reconocimiento es un paso crítico en el diseño y la construcción de este tipo de receptores moleculares, y que son de mucha importancia en los procesos de complejación.

6.5 Bibliografía

- (1) Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017–7036.
- (2) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844–4870.
- (3) Gutsche, C. D. *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 161–170.
- (4) Ogoshi, T.; Kanai, S.; Fujinami, S.; Yamagishi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5022–5023.
- (5) Cram, D. J. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1988**, *27*, 1009–1112.
- (6) Asfari, Z.; Bohmer, V.; Harrowfield, J.; Vicens, J. *Calixarenes 2001, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, Netherlands 2001.* **2001**, 49–56.
- (7) Böhmer, V. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1995**, *34*, 713–745.
- (8) Ogoshi, T.; Yamagishi, T. A. *European J. Org. Chem.* **2013**, *15*, 2961–2975.
- (9) Ma, Y.; Ji, X.; Xiang, F.; Chi, X.; Han, C.; He, J.; Abliz, Z.; Chen, W.; Huang, F. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12340–12342.
- (10) Strobel, M.; Kita-Tokarczyk, K.; Taubert, a.; Vebert, C.; Heiney, P. a.; Chami, M.; Meier, W. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 252–259.
- (11) Yao, Y.; Xue, M.; Chi, X.; Ma, Y.; He, J.; Abliz, Z.; Huang, F. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6505–6507.
- (12) Rodik, R. V.; Klymchenko, A. S.; Jain, N.; Miroshnichenko, S. I.; Richert, L.; Kalchenko, V. I.; Mély, Y. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17*, 5526–5538.
- (13) Ogoshi, T.; Hashizume, M.; Yamagishi, T.; Nakamoto, Y. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3708–3710.
- (14) Shinkai, S.; Mori, S.; Koreishi, H.; Tsubaki, T.; Manabe, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2409–2416.
- (15) Rincón, A. M.; Prados, P.; De Mendoza, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3493–3498.
- (16) Hu, X.-B.; Chen, L.; Si, W.; Yu, Y.; Hou, J.-L. *Chem. Commun. (Camb).* **2011**, *47*, 4694–4696.
- (17) Basílio, N.; García-Río, L. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15*, 9315–9319.
- (18) Basílio, N.; Francisco, V.; García-Río, L. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 10764–10772.
- (19) Pessêgo, M.; Dasilva, J. P.; Moreira, J. A.; García-Río, L. *Chempluschem* **2013**, *78*, 1058–1064.
- (20) Francisco, V.; Basílio, N.; García-Río, L. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 5308–5315.
- (21) Francisco, V.; Basílio, N.; García-Río, L. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4710–4716.
- (22) Gómez, B.; Francisco, V.; Fernández-Nieto, F.; García-Río, L.; Martín-Pastor, M. *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 12123–12132.
- (23) Düker, M. H.; Gómez, R.; Vande Velde, C. M. L.; Azov, V. A. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2881–2884.
- (24) Jordan, J. P.; Grubbs, R. H. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46*, 5152–5155.
- (25) Jerschow, A.; Müller, N. *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 372–375.
- (26) Wu, D. H.; Chen, A. D.; Johnson, C. S. *Journal of Magnetic Resonance, Series A.* **1995**, 260–264.
- (27) Price, W. S. *Concepts Magn. Reson.* **1998**, *10*, 197–237.
- (28) Ribeiro, A. C. F.; Estesó, M. A.; Lobo, V. M. M.; Valente, A. J. M.; Simões, S. M. N.; Sobral, A. J. F. N.; Burrows, H. D. *Acta Chim. Slov.* **2010**, *57*, 410–414.
- (29) W.S.Price. *Concepts Magn. Reson.* **1997**, *95*, 299–336.
- (30) Cohen, Y.; Avram, L.; Frish, L. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44*, 520–554.

- (31) Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2039–2044.
- (32) Ghale, G.; Lanctôt, A. G.; Kreissl, H. T.; Jacob, M. H.; Weingart, H.; Winterhalter, M.; Nau, W. M. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 2762–2765.
- (33) Graefe, A.; Stanca, S. E.; Nietzsche, S.; Beckert, R.; Biskup, C.; Mohr, G. J.; Kubicova, L. **2008**, *80*, 6526–6531.
- (34) Legg, K. D.; Hercules, D. M. *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 2114–2118.
- (35) Fernández-Rosas, J.; Gómez-González, B.; Pessêgo, M.; Rodríguez-Dafonte, P.; Parajó, M.; García-Río, L. *Supramol. Chem.* **2016**, *278*, 1–11.
- (36) Douteau-Guével, N.; Coleman, A. W.; Morel, J.-P.; Morel-Desrosiers, N. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 629–633.
- (37) Inoue, Y.; Jing, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10637–10644.
- (38) Exner, O. *Chem. Commun.* **2000**, *17*, 1655–1656.
- (39) Ihm, H.; Yun, S.; Kim, H. G.; Kim, J. K.; Kim, K. S. **2002**, *4*, 2897–2900.
- (40) Mchedlov-Petrossyan, N. O.; Vodolazkaya, N. A.; Vilkova, L. N.; Soboleva, O. Y.; Kutuzova, L. V.; Rodik, R. V.; Miroshnichenko, S. I.; Drapaylo, A. B. *J. Mol. Liq.* **2009**, *145*, 197–203.



7 Influencia del contraión como factor decisivo en la formación de complejos *host:guest* entre *p*-Sulfonatocalix[4]areno y Betaínas

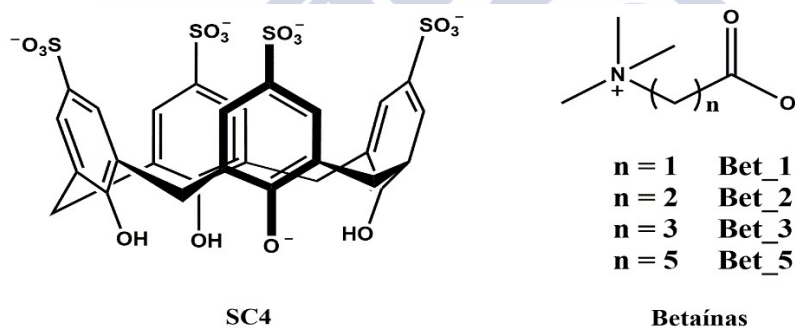
7.1 Introducción

Los *p*-sulfonatocalix[*n*]arenos (SC_{*n*}) son los calixarenos más estudiados debido a su elevada solubilidad en agua, cuya característica es de especial importancia ya que la mayoría de los procesos de interés biológico ocurren en medio acuoso y son utilizados en diversas aplicaciones biomédicas, como actividades antivirales, bloqueo enzimático y complejación de proteínas¹. Los SC_{*n*} tienen una cavidad aromática rica en electrones π y grupos sulfonato en posición *para* a los oxígenos fenólicos, mostrando una capacidad para formar complejos de inclusión con diversas moléculas *guests*², incluyendo moléculas orgánicas neutras o catiónicas y cationes orgánicos e inorgánicos³. Dependiendo del *guest*, pueden estar involucrados diferentes tipos de interacciones como las hidrofóbicas, electrostáticas, π - π , catión- π , CH- π , etc. Por otro lado, la estabilidad y la selectividad en la formación de los complejos formados por SC_{*n*} no solo depende de la estructura molecular del *guest* y del *host*, sino que también influyen las condiciones de la disolución, como por ejemplo el pH⁴ o la presencia de cationes metálicos⁵.

En el grupo de Morel-Desrosiers⁶ investigaron la interacción entre el SC₄ y los cationes metálicos monovalentes y en sus estudios no detectaron cambios significativos en las variaciones de calor para los cationes Na⁺ y Ag⁺, lo que sugirió que estos cationes no se complejaban con el calixareno. Sin embargo, años después fue nuestro grupo de investigación el que confirmó la complejación de cationes metálicos monovalentes por *p*-sulfonatocalix[4]areno⁷⁻¹⁰, y se cuantificó que el SC₄ compleja un contraión Na⁺. Debido a la naturaleza aniónica del SC₄, que existe como un pentaanión a pH neutro, los cationes sodio están siempre presentes como contraiones en la disolución, y, por tanto, debe considerarse que existe una competencia entre las especies *guests* y los contraiones en los

procesos de complejación, viéndose afectadas las constantes de equilibrio y los parámetros termodinámicos. Estos efectos son mucho más importantes en presencia de altas concentraciones de sodio (por ejemplo, en disoluciones tamponadas) por lo que las conclusiones derivadas de los datos experimentales pueden verse seriamente afectadas. Los sistemas binarios *host:guest* con el SC4 fueron ampliamente estudiados^{3,8}, pero de la formación de complejos ternarios con SC4 hay menos estudios en la literatura¹⁰⁻¹².

En este capítulo se ha estudiado la influencia de los cationes Na^+ en la complejación del SC4 con distintos surfactantes (betaínas) en disolución acuosa neutra (Esquema 7.1). Las betaínas tienen una estructura zwitteriónica, que constan de un grupo funcional cargado positivamente ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) y otro cargado negativamente (COO^-), separados entre ellos por un espaciador apolar (cadena alquílica de distintas longitudes), dependiendo su carga del pH de la disolución. Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de ^1H RMN y de la valoración microcalorimetría isotérmica (ITC), presentan la evidencia de la formación de complejos binarios o ternarios dependiendo de la longitud del espaciador de la betaína, y se propone un modelo mecanístico (competitivo o competitivo-cooperativo) detallado para ambos casos.



Esquema 7.1

7.2 Sección Experimental

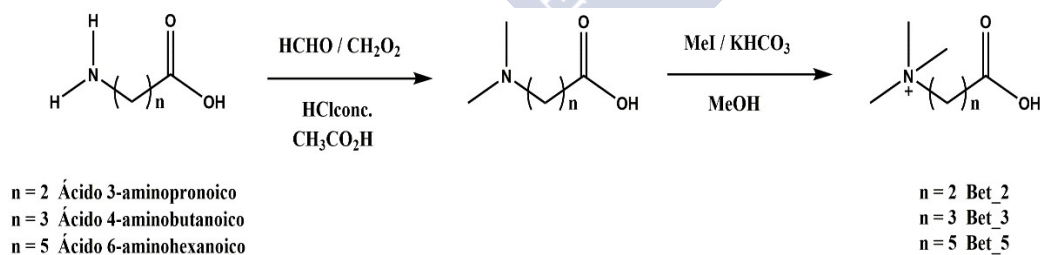
Materiales. La betaína con longitud del espaciador de un carbono entre ambas cargas, la N, N, N-trimetilglicina ($n = 1$ Bet_1), fue adquirida con la máxima pureza disponible en Sigma-Aldrich (98%) y fue usada sin posteriores purificaciones. El resto de las betaínas utilizadas en este capítulo (Bet_2, Bet_3 y Bet_5), que se diferencian en la longitud del espaciador entre ambas cargas, fueron sintetizadas al igual que el SC4.

Síntesis del *p*-sulfonatocalix[4]areno (SC4)

El *p*-sulfonatocalix[4]areno (SC4) fue obtenido mediante una síntesis que consta de dos pasos de reacción¹³⁻¹⁵. El primer paso consiste en la *ipso*-sulfonación del *p*-*tert*-butilcalix[4]areno en H₂SO₄ a 80°C. Una vez filtrado el producto obtenido (forma ácida del SC4), se disolvió en metanol y precipitó con acetato de etilo. El segundo paso de la síntesis consiste en neutralizar la forma ácida del SC4 con Na₂CO₃ en disolución acuosa. El producto en disolución se decoloró con carbón activado y se filtró a través de Celita. La disolución final se dejó evaporar lentamente con ayuda de calor y agitación, y el producto fue disuelto en la mínima cantidad de agua y precipitado con metanol. La recristalización del SC4Na (pentasodio de SC4) en la mezcla metanol/ agua fue repetida al menos 3 veces. Finalmente, el producto se secó a 80°C en la bomba de vacío durante dos días. ¹H RMN (300 MHz, D₂O, ppm): δ = 7.57 (s, 8H, ArH), 4.01 (s, 8H, Ar-CH₂-Ar).

Síntesis de las Betaínas

Las betaínas son compuestos que están en forma zwitteriónica a pH neutro, y que poseen una carga positiva y otra negativa simultáneamente. La síntesis de las tres betaínas (Bet_2, Bet_3 y Bet_5) sigue el mismo procedimiento que consta de dos pasos de reacción descritos en la literatura^{16,17} y sólo se diferencian en el reactivo de partida, que determina la longitud del espaciador entre ambas cargas que queremos obtener (Esquema 7.2).



Esquema 7.2

Síntesis y caracterización de Bet_2, Bet_3 y Bet_5. El primer paso consiste en la dimetilación del reactivo de partida (ácido 3-aminopropiónico, 4-aminobutanoico y 6-aminohexanoico) con ácido fórmico y formaldehído (37% en agua) a 90°C durante 8 horas, aproximadamente. Después la mezcla se trató con HCl concentrado y se evaporó

hasta sequedad, resultando un residuo semisólido. A continuación, el semisólido se lavó con ácido acético y se filtró, dando lugar a un sólido blanco. El segundo paso consiste en obtener el análogo trimetil, mediante la alquilación del producto obtenido anteriormente con yoduro de metilo (MeI), bicarbonato potásico (KHCO₃) y MeOH seco. La mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 26 horas. Posteriormente a la mezcla de reacción se le añadió agua Milli-Q, y se extrajo con diclorometano (CH₂Cl₂). La fase acuosa se llevó al rotavapor para eliminar todo el metanol y parte del agua Milli-Q, después se liofilizó dando como resultado el producto final, un sólido blanco. Los productos Bet_2, Bet_3 y Bet_5 fueron caracterizados por la técnica de ¹H RMN. **Bet_2** ¹H RMN (300 MHz, D₂O, ppm): δ = 3.62 (t, 2H, N-CH₂-), 3.19 (s, 9H, N(CH₃)₃), 2.72 (t, 2H, -CH₂-COO⁻). **Bet_3** ¹H RMN (300 MHz, D₂O, ppm): δ = 3.34 (m, 2H, N-CH₂-), 3.15 (s, 9H, N(CH₃)₃), 2.29 (t, 2H, -CH₂-COO⁻), 2.05 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-). **Bet_5** ¹H RMN (300 MHz, D₂O, ppm): δ = 3.35 (m, 2H, N-CH₂-), 3.13 (s, 9H, N(CH₃)₃), 2.23 (t, 2H, -CH₂-COO⁻), 1.84 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-), 1.65 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO⁻), 1.40 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-CH₂-).

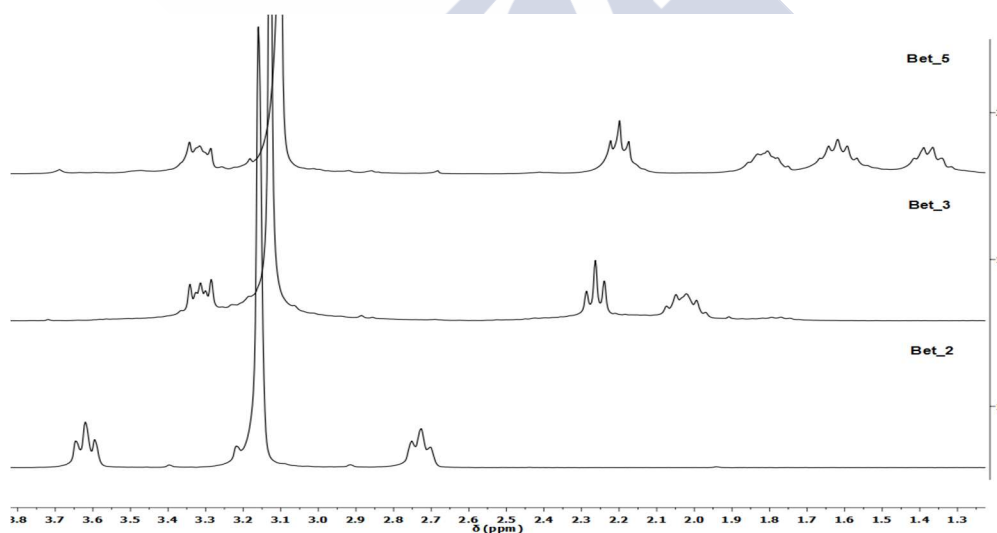


Figura 7.1 : Espectros de ¹H RMN de las tres betainas sintetizadas (Bet_2, Bet_3 y Bet_5) en D₂O.

Valoración microcalorimetría isotérmica. Las valoraciones calorimétricas han sido realizadas en un microcalorímetro de valoración isotérmica (VP-ITC) de Microcal Co. a presión atmosférica y 25°C. Las disoluciones de las muestras son desgasificadas y termostalizadas previamente a la valoración usando el accesorio ThermoVac (MicroCal, Inc.). En cada experimento, tenemos la jeringa de inyección con una disolución de *guest* (0.268 mL) que fue añadida gradualmente a la celda de reacción que contiene la

disolución de *host* (1.459 mL) y con agitación constante (459 rpm). Además, se realizaron experimentos añadiendo distintas concentraciones de NaCl a la valoración inicial, manteniendo constante la concentración de sal añadida en la jeringa y en la celda. Se utilizó el software ORIGIN (Microcal Inc.) para calcular la constante de equilibrio (K) a partir de una única curva de valoración. El calor de reacción para cada experimento se calculó mediante el modelo de "one set of binding sites".

Experimentos de RMN. Los espectros ^1H RMN fueron adquiridos en un espectrofotómetro Varian Inova 400. Las mezclas para los sistemas SC4/Betaína se prepararon mezclando los volúmenes apropiados de las disoluciones stock, preparadas previamente en D_2O a 25°C . Para resolver el sistema de ecuaciones por el método numérico utilizamos el programa Dynafit.

7.3 Resultados y Discusión

En este trabajo se estudió la complejación de las betaínas, con distintas longitudes de espaciador entre los grupos de cabeza, por el SC4 en disolución acuosa y a pH neutro. Se han realizado experimentos de ITC y ^1H RMN para obtener las constantes de equilibrio, que dependen de la concentración del calixareno con contraiones Na^+ y también de la concentración de Na^+ añadido.

7.3.1 Formación de los complejos *host:guest* entre las Betaínas y SC4

7.3.1.1 Caracterización estructural y determinación de las constantes de equilibrio de los complejos por ^1H RMN

El proceso de complejación de las distintas betaínas con el SC4 se estudió detalladamente mediante experimentos de ^1H RMN. Los experimentos se llevaron a cabo en ausencia de cationes Na^+ añadidos, manteniendo la concentración de las distintas betaínas constante y variando la concentración de SC4. El porcentaje de SC4 no complejo disponible para actuar como receptor varía con su concentración, debido a la capacidad del SC4 para complejar sus propios contraiones (Na^+)⁹.

Los estudios sistemáticos de RMN proporcionan información sobre la estequiometría de los complejos, y también sobre la forma en la que el *guest* se puede

introducir en la cavidad del SC4, a través de los cambios en los desplazamientos químicos del *guest* inducidos por la complejación ($\Delta\delta = \delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}$). A continuación, presentamos el estudio de las cuatro betaínas estudiadas en este capítulo.

Comportamiento de la *Bet_1* y *Bet_2* con el SC4

En la Figura 7.3 se muestra los desplazamientos químicos de los protones del grupo $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de la *Bet_1* y *Bet_2* con el aumento de la concentración del SC4, así como el ajuste al modelo de complejación competitiva. Como se puede observar, el desplazamiento químico se produce hacia campo alto ($\Delta\delta < 0$), indicando que la *Bet_1* y *Bet_2* deben incorporarse en la cavidad del SC4 por el grupo trimetilamonio, debido a que es la señal que experimenta un mayor cambio hacia campo alto tras la adición de SC4.

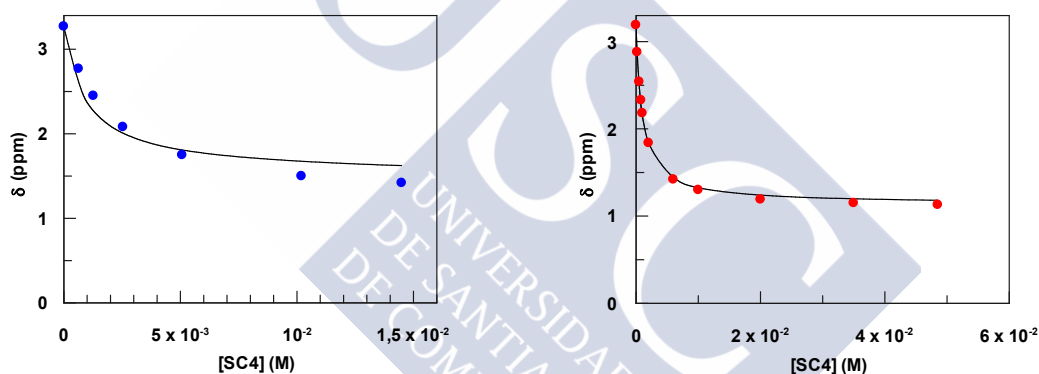
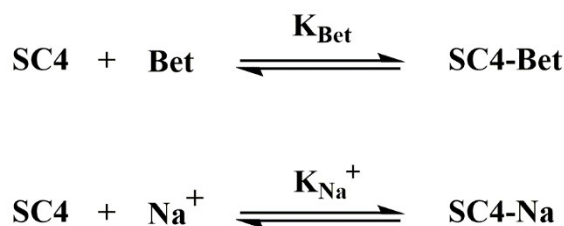


Figura 7.2 : Desplazamientos químicos de la señal del grupo $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de la *Bet_1* (●) y de la *Bet_2* (●) en función de la concentración de SC4 en D_2O a 25°C . [*Bet_1*]= 0.5 mM; [*Bet_2*]= 1 mM. La línea representa el ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación competitiva.

Con el objetivo de reproducir los datos experimentales de la Figura 7.2, se consideró un modelo de complejación competitiva (Esquema 7.3) en el que ambos Na^+ y betaína compiten simultáneamente por la cavidad del SC4 de manera competitiva.



Esquema 7.3

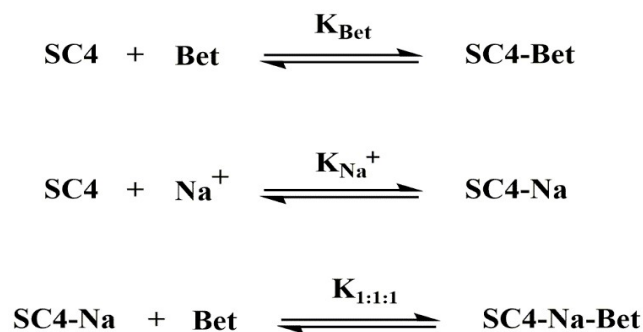
Las líneas de ajuste de los datos experimentales de la Figura 7.2 para la Bet_1 y la Bet_2, se obtuvieron por un método numérico para resolver el sistema de ecuaciones basado en el modelo de complejación competitiva, utilizando el programa Dynafit. El ajuste se ha realizado fijando el desplazamiento químico de la betaína libre (δ_f) y la constante de complejación del Na^+ ($K_{\text{Na}^+} = 183 \text{ M}^{-1}$) previamente obtenida por nuestro grupo⁹, y se dejó optimizar la constante de complejación de la betaína con el SC4 (K_{Bet}) y el desplazamiento químico de la betaína complejada (δ_c). A partir de este método competitivo, se obtienen los valores de las constantes de equilibrio, K_{Bet} , entre el SC4 y las distintas betaínas (Bet_1 y Bet_2) y los desplazamientos químicos de las betaínas complejadas, recogidos en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1 : Valores de las constantes de equilibrio para los complejos 1:1 (K_{Bet}) entre SC4 y las distintas betaínas y de los desplazamientos químicos de las betaínas complejadas (δ_c), obtenidos en D_2O a 25°C . Se incluyen también los valores de los desplazamientos químicos de las betaínas libres (δ_f).

Betaína	$K_{\text{Bet}} (\text{M}^{-1})$	$\delta_c (\text{ppm})$	$\delta_f (\text{ppm})$
Bet_1	$(8.50 \pm 9.50) \times 10^2$	$(1.10 \pm 2.01) \times 10^{-6}$	3.27
Bet_2	$(1.28 \pm 0.27) \times 10^3$	$(1.20 \pm 0.30) \times 10^{-6}$	3.19

Como podemos observar, los valores obtenidos para el desplazamiento químico de las betaínas complejadas no tienen significado físico, pues implicarían una $\Delta\delta = 3.27$ o 3.19 ppm para la complejación de Bet_1 y Bet_2, respectivamente. Los valores obtenidos son una clara evidencia de que los datos experimentales no pueden ser ajustados por un modelo de complejación competitiva, a pesar de la coincidencia observada casi perfecta entre los datos experimentales y los calculados mostrados en la Figura 7.2.

Con el fin de obtener una descripción del modelo de complejación, se consideró un modelo de complejación competitiva-cooperativa, considerando la formación de un complejo triple 1:1:1 entre SC4:Na:Bet además del complejo *host:guest* convencional, de acuerdo con el Esquema 7.4.



Esquema 7.4

En la Figura 7.3 se muestra los desplazamientos químicos de los protones del grupo $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de la Bet_1 y Bet_2 con el aumento de la concentración del SC4, ajustados al modelo de complejación competitiva-cooperativa.

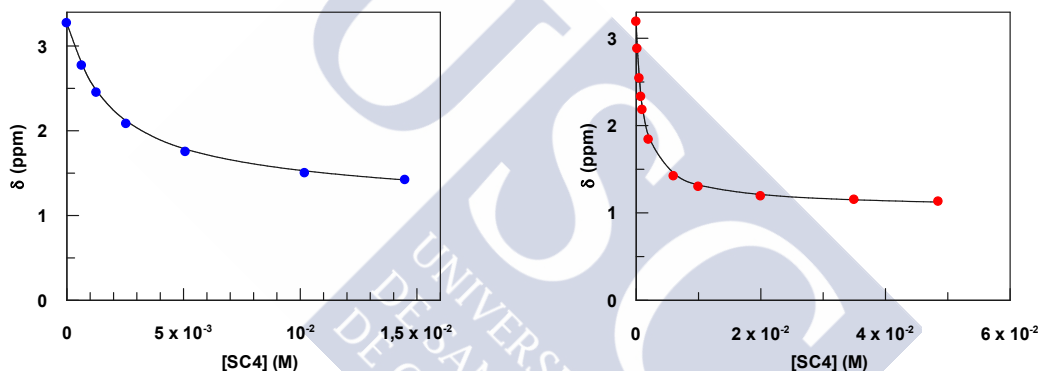


Figura 7.3 : Desplazamientos químicos de la señal del grupo $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de la Bet_1 (●) y de la Bet_2 (●) en función de la concentración de SC4 en D_2O a 25°C . $[\text{Bet}_1] = 0.5 \text{ mM}$; $[\text{Bet}_2] = 1 \text{ mM}$. La línea representa el ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación competitiva-cooperativa.

Considerando la formación del complejo triple entre el SC4, betaína y Na^+ , las líneas de ajuste de los datos experimentales mostrados en la Figura 7.3, se obtuvieron por un método numérico basándonos en el modelo competitivo-cooperativo. Se ha fijado el valor de valor de la constante de complejación del Na^+ ($K_{\text{Na}^+} = 183 \text{ M}^{-1}$) y el valor del desplazamiento químico de la betaína libre (δ_f), y se consideró que el desplazamiento de la betaína complejada formando el complejo binario (SC4-Bet) y el complejo triple (SC4-Na-Bet) son iguales. Se dejó optimizar la constante de complejación para el complejo binario (K_{Bet}) y para el triple ($K_{1:1:1}$), además del desplazamiento químico de la betaína

complejada (δ_c). Los resultados obtenidos del ajuste de los datos experimentales al modelo competitivo-cooperativo se recogen en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2 : Valores de las constantes de equilibrio para los complejo binario (K_{Bet}) y para el complejo triple ($K_{1:1:1}$), además de los desplazamientos químicos de las betaínas complejadas (δ_c), obtenidos en D_2O a 25°C .

Betaína	$K_{\text{Bet}} (\text{M}^{-1})$	$K_{1:1:1} (\text{M}^{-1})$	δ_c (ppm)
Bet_1	$(6.47 \pm 0.10) \times 10^2$	$(5.60 \pm 0.13) \times 10^2$	(1.19 ± 0.01)
Bet_2	$(2.36 \pm 0.07) \times 10^3$	$(6.08 \pm 0.71) \times 10^2$	(1.06 ± 0.01)

Como se puede observar, los valores obtenidos de K_{Bet} , $K_{1:1:1}$ y δ_c , para la Bet_1 y Bet_2, tienen significado físico según el modelo competitivo-cooperativo. En la Figura 7.3 se muestra un buen ajuste entre los desplazamientos químicos experimentales y calculados, con los valores obtenidos para cada betaína a partir de este modelo. Podemos destacar que la formación del complejo triple (SC4-Na-Bet) tiene lugar por un efecto cooperativo negativo con las constantes de equilibrio, para el complejo triple, más pequeñas que para el complejo binario.

Comportamiento de la Bet_3 y Bet_5 con el SC4

La complejación por el SC4 de las betaínas con espaciadores más cortos (Bet_1 y Bet_2), muestran un buen ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación competitivo-cooperativo. Sin embargo, al aumentar la longitud del espaciador se observó, mediante experimentos de ^1H RMN un comportamiento diferente en la complejación.

En la Figura 7.4 se muestra los desplazamientos químicos de los protones del grupo $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de la Bet_3 y Bet_5 a medida que aumentamos la concentración de SC4. Con el fin de obtener el mejor ajuste de los datos experimentales para estas betaínas, se consideró el modelo de complejación competitiva desarrollado previamente para los casos de Bet_1 y Bet_2 (ver Esquema 7.3).

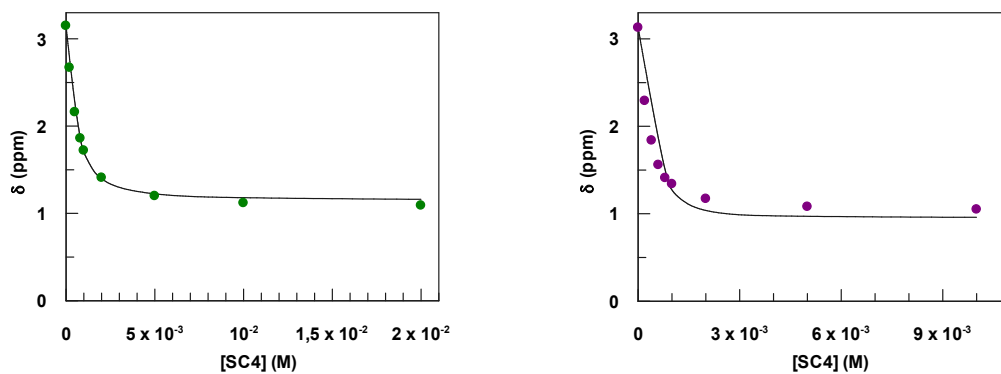


Figura 7.4 : Desplazamientos químicos de la señal del grupo $N^+(CH_3)_3$ de la Bet_3 (●) y de la Bet_2 (●) en función de la concentración de SC4 en D_2O a $25^\circ C$. $[Bet_3]=1\text{ mM}$; $[Bet_5]=1\text{ mM}$. La línea negra representa el ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación competitiva.

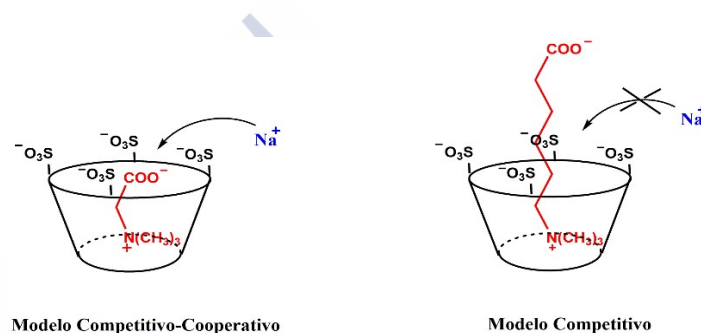
En la Figura 7.4 se observa que los datos experimentales para la Bet_3 y la Bet_5 pueden ser ajustados de un modo satisfactorio por el modelo de complejación competitiva. El ajuste se ha realizado optimizando la constante de complejación de la betaína con el SC4 (K_{Bet}) y el desplazamiento químico de la betaína complejada (δ_c), y se ha fijado el desplazamiento químico de la betaína libre (δ_f) y la constante de complejación del Na^+ ($K_{Na^+}=183\text{ M}^{-1}$). Los valores obtenidos de las constantes de equilibrio, K_{Bet} , y de los desplazamientos químicos de las betaínas complejadas se muestran en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3 : Valores de las constantes de equilibrio para los complejos 1:1 (K_{Bet}) entre SC4 y las distintas betaínas y de los desplazamientos químicos de las betaínas complejadas (δ_c), obtenidos en D_2O a $25^\circ C$. Se incluyen también los valores de los desplazamientos químicos de las betaínas libres (δ_f).

Betaína	$K_{Bet} (M^{-1})$	δ_c (ppm)	δ_f (ppm)
Bet_3	$(1.49 \pm 0.20) \times 10^4$	(1.05 ± 0.01)	3.15
Bet_5	$(1.00 \pm 0.27) \times 10^5$	(0.94 ± 0.12)	3.13

A modo resumen, podemos decir que el valor de la constante de equilibrio para el complejo binario (SC4-Bet) aumenta con la longitud del espaciador de las betaínas, alcanzando valores para la constante de equilibrio de aproximadamente 10^5 M^{-1} . Para el caso de la Bet_1 y Bet_2, que constan de una longitud de espaciador más corta entre los grupos cargados, el ajuste de los datos experimentales obtenidos por experimentos de 1H RMN predice la formación de un complejo triple 1:1:1 (SC4-Na-Bet). Podemos considerar que al complejar dichas betaínas, hay una repulsión de carga entre los grupos sulfonato del calixareno y el grupo cargado negativamente de la betaína (COO^-), por

tanto, la complejación de los cationes Na^+ disminuiría la repulsión entre cargas dando lugar a la formación de un complejo triple. Para el caso de la *Bet_3* y la *Bet_5*, la separación entre los grupos cargados es mayor, los datos experimentales se ajustan de modo satisfactorio al modelo de complejación competitiva, dando lugar a complejos *host:guest* 1:1 (SC4-Bet) cuyos valores para la constante de equilibrio son mayores de 10^4 M^{-1} . Podemos considerar que estas betaínas tienen un comportamiento parecido al catión tetrametilamonio (TMA^+), cuyo estudio se realizó en nuestro grupo mediante experimentos de ITC¹⁸ y RMN¹⁹, donde se ajustaron los datos experimentales a un modelo de complejación competitiva obteniéndose una constante de equilibrio de aproximadamente $K = 6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.



Esquema 7.5

7.3.1.2 Determinación de las constantes de equilibrio de los complejos por ITC

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos por la técnica de ^1H RMN, realizamos el estudio por medidas calorimétricas para determinar la constante de equilibrio y la estequiometría del complejo formado por el SC4 y las betaínas.

Comportamiento de la Bet_1 con el SC4

En la Figura 7.5 se muestran los resultados obtenidos para cada valoración de *Bet_1* con SC4. Los datos de las isotermas de complejación se ajustaron al modelo “One Set of Sites” para complejos del tipo 1:1, obteniéndose la constante de equilibrio observada (K_{obs}) para la *Bet_1* con un valor de $K_{\text{obs}} = (7.06 \pm 0.04) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ a pH neutro. Como se puede observar, la interacción entre el SC4 y la *Bet_1* es principalmente impulsada por la entalpía ($\Delta H^\circ = -24900 \pm 68 \text{ J/mol}$), acompañada de un cambio entrópico negativo ($\Delta S^\circ = -28.9 \text{ J/mol K}$).

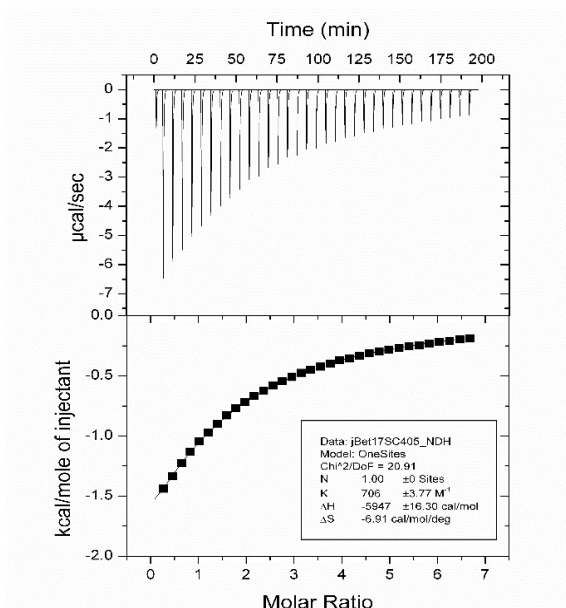


Figura 7.5 : Valoración calorimétrica de 268 μL de Bet_1 (16.67 mM) en 1.459 mL de SC4 (0.5 mM) en 34 inyecciones a 25°C. (Arriba) Trazas calorimétricas (flujo de calor vs tiempo) para las 34 inyecciones (8 μL por inyección) de una disolución de Bet_1 (16.67 mM) en una disolución de SC4 (0.5 mM). (Abajo) Isotherma de complejación (obtenida por la integración de las trazas calorimétricas) vs Relación Molar.

7.3.1.2.1 Influencia de los cationes sodio sobre la constante de equilibrio entre Bet_1 y SC4

En el apartado anterior hemos informado de la influencia de los cationes de sodio, que están presentes en disolución acuosa como contraión del SC4. Para obtener más información sobre la influencia del catión Na^+ en la complejación de las betaínas por el SC4, se llevaron a cabo experimentos de ITC añadiendo más cantidad de NaCl. Para ello hemos determinado la constante de equilibrio (K_{obs}) a varias concentraciones de NaCl.

En la Figura 7.6 se muestran dos ejemplos de las valoraciones calorimétricas de la Bet_1 con el SC4 en presencia de distintas concentraciones de NaCl, donde los datos de las isosterms de complejación se ajustaron al modelo “One Set of Sites”.

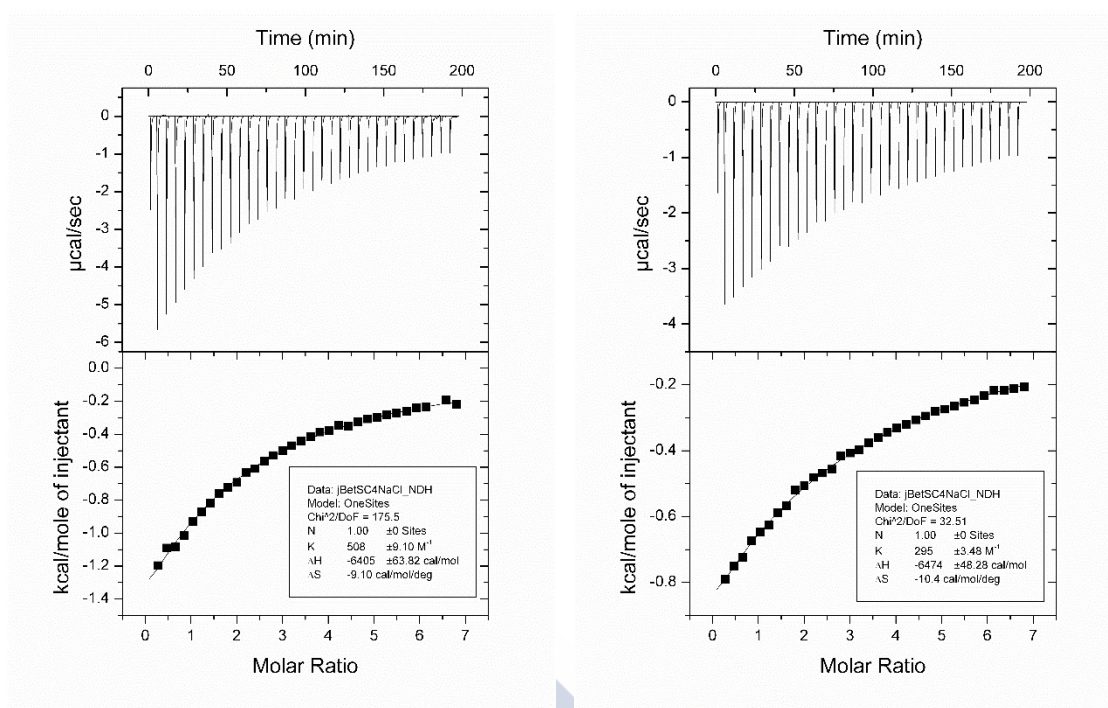


Figura 7.6 : Valoración calorimétrica de Bet_1 con SC4 en 34 inyecciones a 25°C. (Arriba) Trazas calorimétricas (flujo de calor vs tiempo) para las 34 inyecciones (8 μL por inyección) de una disolución de Bet_1 (16.67 mM) en una disolución de SC4 (0.5 mM) en presencia de 10mM de NaCl (izquierda) y 500mM de NaCl (derecha). (Abajo) Isotherma de complejación (obtenida por la integración de las trazas calorimétricas) vs Relación Molar y ajustada al modelo “One Set of Sites”.

Como se puede observar, los valores de la constante de equilibrio observada disminuye de $706 \pm 4 \text{ M}^{-1}$ a $295 \pm 4 \text{ M}^{-1}$ en presencia de 500mM NaCl, lo que sugiere una unión competitiva. Sin embargo, en la Figura 7.7 se muestra la influencia de la concentración de NaCl en K_{obs} y $1/K_{\text{obs}}$ para la complejación de la Bet_1 por el SC4 en disolución acuosa neutra, llevada a cabo por experimentos de ITC.

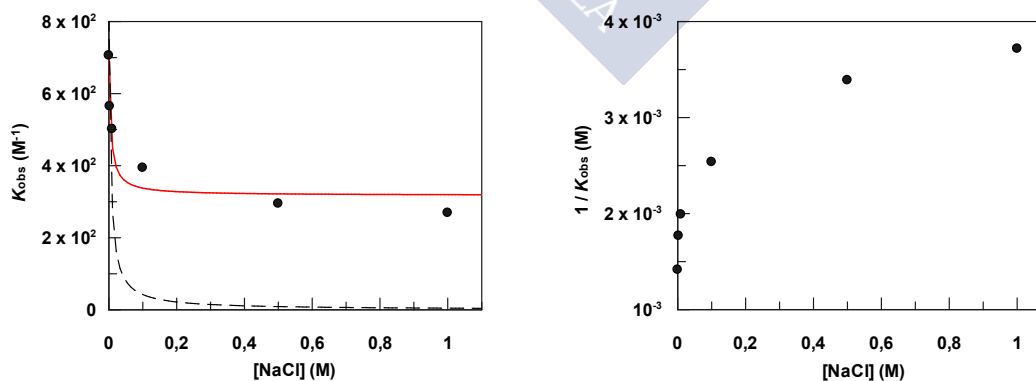


Figura 7.7 : Influencia de la concentración de NaCl en K_{obs} (izquierda) y $1/K_{\text{obs}}$ (derecha) para la formación de complejos entre Bet_1 y SC4. Los valores de K_{obs} fueron obtenidos por valoraciones calorimétricas donde los datos de las isothermas se ajustaron al modelo “One Set of Sites”. La línea roja representa el ajuste según la ecuación (7.3) para el modelo competitivo-cooperativo, y la línea discontinua se ajusta al modelo competitivo.

En la Figura 7.7-derecha se representa la inversa de K_{obs} frente a la concentración de NaCl, en donde la ausencia de una dependencia lineal pone en evidencia que el modelo competitivo⁸ sea compatible con el comportamiento observado en el presente caso. Además, en la Figura 7.7-izquierda la línea discontinua representa un ajuste de los datos al modelo competitivo, y como se puede observar no es compatible con el comportamiento esperado, ya que los valores de K_{obs} deberían acercarse a cero para altas concentraciones de NaCl. Por tanto, al igual que en el estudio por ^1H RMN del comportamiento de la Bet_1 con el SC4, obtenemos una clara evidencia de que los datos experimentales no pueden ser ajustados al modelo de complejación competitiva.

Para justificar los resultados obtenidos, se propone el modelo de complejación competitiva-cooperativa mostrado anteriormente (ver Esquema 7.4) donde se tiene en cuenta la posible formación del complejo triple 1:1:1 entre SC4, Na y Bet_1. De acuerdo con este esquema, la constante de equilibrio observada (K_{obs}) se puede definir como la siguiente ecuación (7.1):

$$K_{obs} = \frac{[SC4 - Bet] + [SC4 - Na - Bet]}{([SC4] + [SC4 - Na])[Bet]} \quad (7.1)$$

Combinando esta ecuación (7.1), con las ecuaciones de las constantes de equilibrio establecidas por el SC4 con el Na^+ y la Bet_1 en el Esquema 7.4, expresadas como:

$$K_{Bet} = \frac{[SC4 - Bet]}{[SC4][Bet]} \quad K_{Na^+} = \frac{[SC4 - Na]}{[SC4][Na]} \quad K_{1:1:1} = \frac{[SC4 - Na - Bet]}{[SC4 - Na][Bet]} \quad (7.2)$$

y suponiendo que la cantidad de cationes de sodio agregada, $[\text{Na}^+]_0$, es mucho mayor que los contraiones de sodio suministrados por el SC4, podemos obtener la ecuación que define la dependencia de K_{obs} con la concentración de Na^+ :

$$K_{obs} = \frac{K_{Bet} + K_{Na^+}K_{1:1:1}[\text{Na}^+]_0}{1 + K_{Na^+}[\text{Na}^+]_0} \quad (7.3)$$

A partir del ajuste no lineal de los valores de K_{obs} a la ecuación (7.3), representado en la Figura 7.7-izquierda con la línea roja, se obtienen los valores para las constantes de equilibrio para el complejo binario K_{Bet} y complejo triple $K_{1:1:1}$, recogidos en la Tabla 7.4.

El valor de K_{Na^+} se mantuvo constante e igual a $183 M^{-1}$, con el fin de obtener valores más fiables para las anteriores constantes de equilibrio.

Tabla 7.4 : Valores de las constantes de equilibrio para el complejo binario (K_{Bet}) y el complejo triple ($K_{1:1:1}$) manteniendo constante $K_{Na^+} = 183 M^{-1}$, a partir del ajuste al modelo competitivo-cooperativo a $25^{\circ}C$.

Betaína	$K_{Bet} (M^{-1})$	$K_{1:1:1} (M^{-1})$
Bet_1	$(7.09 \pm 0.38) \times 10^2$	$(3.17 \pm 0.29) \times 10^2$

Los resultados obtenidos para el estudio de la Bet_1 con SC4 en presencia de cationes Na^+ , tanto por experimentos de ITC y 1H RMN son compatibles entre ellos, dando valores similares para las constantes de equilibrio de los complejos. En este caso, primero el Na^+ compite con la Bet_1 para complejarse con el SC4, pero después como hay exceso de Na^+ se vuelve a complejarse con el SC4-Bet, formándose un verdadero complejo triple que tiene lugar dentro de la cavidad del SC4 (ver Esquema 7.5).

Comportamiento de la Bet_3 y Bet_5 con el SC4

La constante de equilibrio y la estequiometría del complejo formado por el SC4 y distintas betaínas se pueden determinar por la valoración calorimétrica isotérmica (ITC), obteniéndose directamente los valores de las constantes de equilibrio y los parámetros termodinámicos asociados. Los experimentos realizados con las betaínas con espaciadores más grandes (Bet_3 y Bet_5) muestran diferentes comportamientos de estequiometría y complejación, con respecto a lo observado con la Bet_1.

En la Figura 7.8 se muestran los resultados obtenidos para cada valoración de Bet_3 y Bet_5 con SC4. Como podemos observar, los datos de las isothermas de valoración para ambas betaínas se ajustaron al modelo “One Set of Sites” pero no reproduce el valor experimental de los datos con $N=1$ para complejos del tipo 1:1.

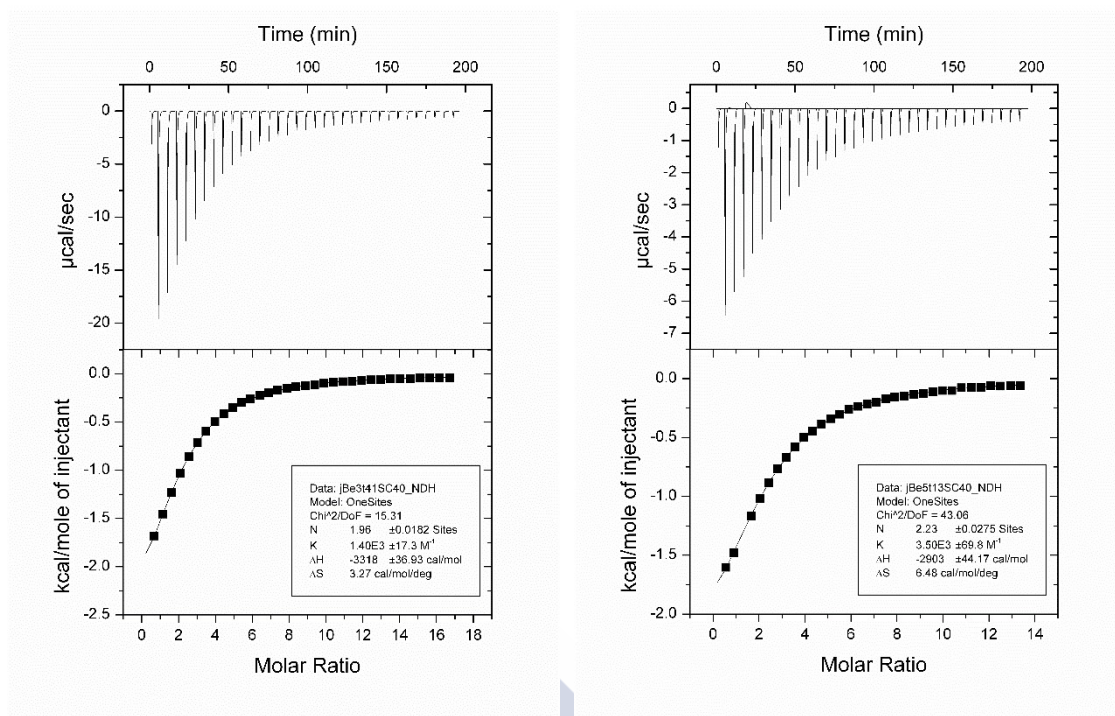


Figura 7.8 : (Izquierda) Valoración calorimétrica de 268 μL de Bet_3 (41.67 mM) en 1.459 mL de SC4 (0.5 mM) y (Derecha) valoración calorimétrica de 268 μL de Bet_5 (13.33 mM) en 1.459 mL de SC4 (0.2 mM) ambos en 34 inyecciones a 25°C. (Arriba) Trazas calorimétricas (flujo de calor vs tiempo) para las 34 inyecciones (8 μL por inyección) de una disolución de Bet_3 y Bet_5 en una disolución de SC4. (Abajo) Isotherma de complejación (obtenida por la integración de las trazas calorimétricas) vs Relación Molar.

En cambio, el ajuste que reproduce bien los datos de las isothermas de valoración, da valores de aproximadamente $N \approx 2$, por lo que podemos considerar que el complejo formado entre la Bet_3 y la Bet_5 con el SC4 tendrá una estequiometría distinta aún por determinar. Los resultados obtenidos que se muestran en la Tabla 7.5, nos indican que la complejación para ambas betaínas es impulsada principalmente por la entalpía acompañada por cambios de entropía favorables.

Tabla 7.5 : Valores de las constantes de equilibrio (K) y de los parámetros termodinámicos (ΔH^0 y ΔS^0) para los complejos formados entre el SC4 y las distintas betaínas, obtenidos en disolución acuosa neutra a 25°C.

Betaína	K (M^{-1})	ΔH^0 (J/mol)	ΔS^0 (J/mol K)
Bet_3	$(1.40 \pm 0.02) \times 10^3$	$(1.38 \pm 0.02) \times 10^4$	13.69
Bet_5	$(3.50 \pm 0.07) \times 10^3$	$(1.22 \pm 0.02) \times 10^4$	27.13

Para obtener más información sobre lo que puede estar ocurriendo en el estudio de la Bet_3 y Bet_5 con SC4, estudiamos la influencia de la concentración de cationes

Na^+ sobre las constantes de equilibrio, mediante experimentos de ITC añadiendo más cantidad de NaCl.

En la Figura 7.9 se muestran dos ejemplos de las valoraciones calorimétricas de la Bet_3 con el SC4 en presencia de distintas concentraciones de NaCl. Como se puede observar, para una concentración de 50mM de NaCl los datos de las isoterma de complejación se ajustan de manera similar al caso de Bet_3 en ausencia de NaCl añadido, mientras que a concentraciones elevadas de NaCl los datos se ajustan al modelo “One Set of Sites” para complejos del tipo 1:1. Podemos destacar que a medida que aumenta la concentración de sal los valores de las constantes de equilibrio disminuyen.

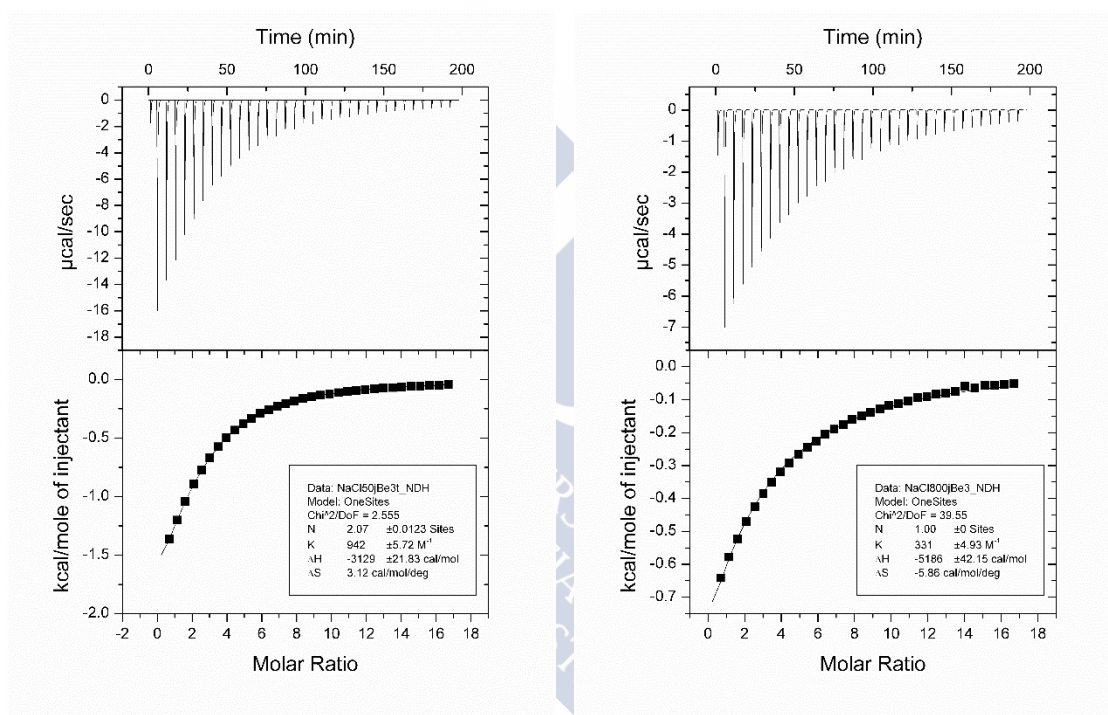


Figura 7.9 : Valoración calorimétrica de Bet_3 con SC4 en 34 inyecciones a 25°C. (Arriba) Trazas calorimétricas (flujo de calor vs tiempo) para las 34 inyecciones (8 µL por inyección) de una disolución de Bet_3 (41.67 mM) en una disolución de SC4 (0.5 mM) en presencia de 50mM de NaCl (izquierda) y 800mM de NaCl (derecha). (Abajo) Isotherma de complejación (obtenida por la integración de las trazas calorimétricas) vs Relación Molar y ajustada al modelo “One Set of Sites”.

Para el caso de la Bet_5 representado en la Figura 7.10, se observa la misma tendencia. Para bajas concentraciones de NaCl se comporta como la Bet_5 con SC4 en ausencia de NaCl añadido, sin embargo, a elevadas concentraciones de NaCl se ajusta al modelo para complejos del tipo 1:1, disminuyendo también el valor de la constante de equilibrio a medida que aumenta la concentración de NaCl.

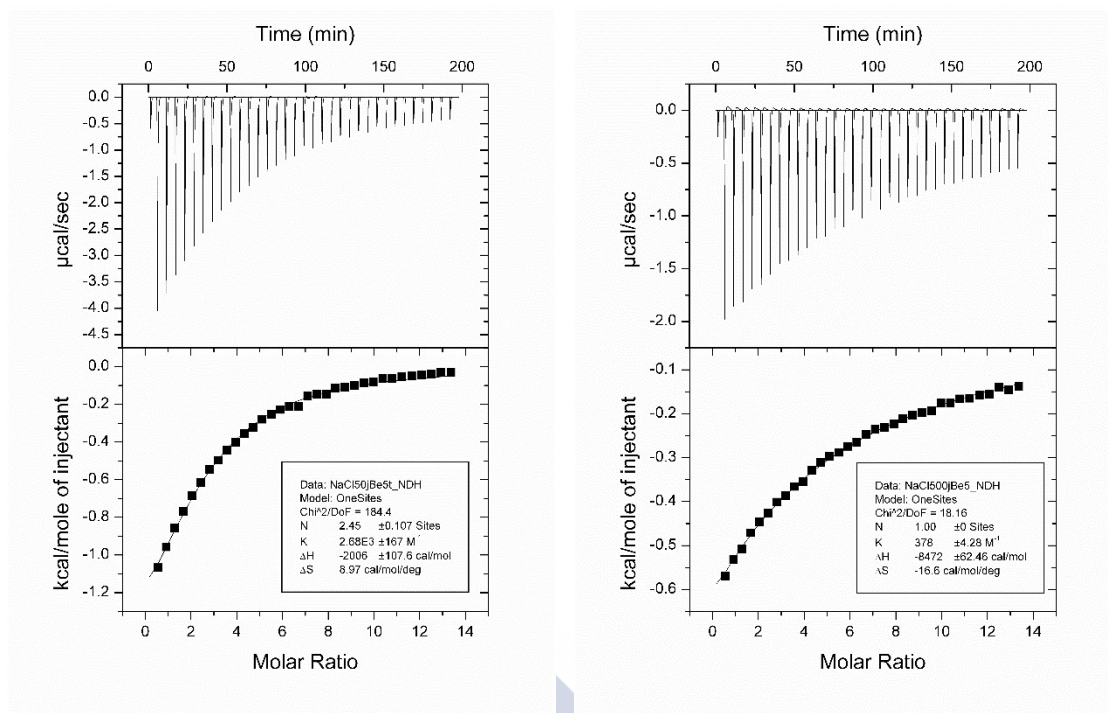


Figura 7.10 : Valoración calorimétrica de Bet_5 con SC4 en 34 inyecciones a 25°C. (Arriba) Trazas calorimétricas (flujo de calor vs tiempo) para las 34 inyecciones (8 µL por inyección) de una disolución de Bet_5 (13.33 mM) en una disolución de SC4 (0.2 mM) en presencia de 50mM de NaCl (izquierda) y 500mM de NaCl (derecha). (Abajo) Isotherma de complejación (obtenida por la integración de las trazas calorimétricas) vs Relación Molar y ajustada al modelo “One Set of Sites”.

Por tanto, debido a que los experimentos realizados por ITC con la Bet_3 y Bet_5 en ausencia y en presencia de cantidades pequeñas de NaCl no se ajustan todos al modelo “One Set of Sites”, no podemos hacer el mismo estudio que hicimos con la Bet_1. Los datos experimentales obtenidos por ¹H RMN para la Bet_3 y la Bet_5 en ausencia de NaCl añadido se ajustaban de modo satisfactorio al modelo de complejación competitiva. Pero en los experimentos de ITC no está claro, ya que creemos que debido a los ajustes de las isothermas de valoración para la Bet_3 y la Bet_5 a bajas concentraciones de NaCl, posiblemente exista otro tipo de estequiometría para los complejos antes de alcanzar concentraciones de NaCl elevadas. Estos resultados obtenidos por ITC no son definitivos, hay que profundizar este estudio en un futuro.

En resumen, no podemos concluir que los resultados obtenidos por experimentos de ITC como de ¹H RMN para el estudio de la Bet_3 y la Bet_5 con el SC4 en presencia de cationes Na⁺, sean compatibles entre ellos.

7.4 Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio, nos permitieron confirmar el efecto de los cationes Na^+ (añadidos o como contraión del macrociclo) sobre la formación de complejos de inclusión entre el SC4 y las betaínas, con distinta longitud de espaciador entre sus cargas. Se han realizado experimentos de ITC y ^1H RMN, y se demostró que los cationes pueden influir en la formación de los complejos de dos maneras distintas dependiendo de la longitud del espaciador de la betaína: pueden competir con las moléculas *guests* por la cavidad del calixareno (modelo competitivo) o pueden formar un complejo triple (modelo competitivo-cooperativo).

Para el caso de las betaínas con espaciador corto (Bet_1 y Bet_2), se observó que el modelo de complejación competitiva-cooperativa se ajusta a los resultados experimentales obtenidos por ambas técnicas. Los resultados muestran que la presencia de distintas concentraciones de cationes en disolución influye en los valores de la constante de equilibrio para la formación del complejo entre la betaína y el SC4, dando lugar a la formación de un complejo triple (SC4-Na-Bet) que tiene lugar por un efecto cooperativo negativo. Para el caso de las betaínas con espaciador largo (Bet_3 y Bet_5), los resultados experimentales obtenidos por ^1H RMN se ajustaron de forma satisfactoria al modelo de complejación competitivo, dando complejos *host:guest* 1:1 (SC4-Bet) con valores para la constante de equilibrio $< 10^4 \text{ M}^{-1}$. Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos por ITC a bajas concentraciones de NaCl predicen posiblemente otro tipo de estequiometría para los complejos *host:guest*, que está aún por determinar.

7.5 Bibliografía

- (1) Perret, F.; Lazar, A. N.; Coleman, A. W. *Chem. Commun.* **2006**, 23, 2425–2438.
- (2) Asfari, Z.; Bohmer, V.; Harrowfield, J.; Vicens, J. *Calixarenes 2001*, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, Netherlands **2001**, 49–56.
- (3) Guo, D. S.; Wang, K.; Liu, Y. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2008**, 62, 1–21.
- (4) Liu, Y.; Ma, Y. H.; Chen, Y.; Guo, D. S.; Li, Q. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 6468–6473.
- (5) Bakirci, H.; Koner, A. L.; Nau, W. M. *Chem. Commun. (Camb)*. **2005**, 43, 5411–5413.
- (6) Morel, J.-P.; Morel-Desrosiers, N. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 462–465.
- (7) Basílio, N.; García-Río, L.; Martín-Pastor, M. *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 7201–7206.
- (8) Francisco, V.; Basílio, N.; García-Río, L. *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116, 5308–5315.
- (9) Francisco, V.; Piñeiro, A.; Nau, W. M.; García-Río, L. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, 19, 17809–17820.
- (10) Francisco, V.; Basílio, N.; García-Río, L. *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 4710–4716.
- (11) Bakirci, H.; Koner, A. L.; Dickman, M. H.; Kortz, U.; Nau, W. M. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, 45, 7400–7404.
- (12) Basílio, N.; Francisco, V.; García-Río, L. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 10764–10772.
- (13) Shinkai, S.; Mori, S.; Tsubaki, T.; Sone, T.; Manabe, O. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5315–5318.
- (14) Atwood, J. L.; Coleman, A. W.; Zhang, H.; Bott, S. G. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1989**, 7, 203–211.
- (15) Lamartine, R.; Regnouf-de-Vains, J.-B.; Choquar, P.; Marcillac, A. *World Patent, WO 97/49677*, **1997**.
- (16) Cui, X.; Li, Z.; Tao, C. Z.; Xu, Y.; Li, J.; Liu, L.; Guo, Q. X. *Org. Lett.* **2006**, 8, 2467–2470.
- (17) Kretsinger, J. K.; Schneider, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7907–7913.
- (18) Francisco, V.; García-Río, L. *Langmuir* **2014**, 30, 6748–6755.
- (19) Pessêgo, M.; Basílio, N.; Muñiz, M. C.; García-Río, L. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 6442–6448.