TESIS DE DOCTORADO

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PILAR[n]ARENOS PARA SU USO COMO RECEPTORES MOLECULARES.

ALBA PEREIRA VILAR

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PILAR[n]ARENOS PARA SU USO COMO RECEPTORES MOLECULARES.

D./Dña. Alba Pereira Vilar

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
4) *Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 30 de enero de 2021.

Fdo Alba Pereira Vilar

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D./Dña. **Luis García Río**

En condición de: **Tutor/a y director/a**

Título de la tesis: **Síntesis y caracterización de pilar[n]arenos para su uso como receptores moleculares.**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Alba Pereira Vilar**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Santiago de Compostela**, **30 de enero de 2021**

Firma electrónica

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D./Dña. **Nuno Míguel Jesuíno Basilio**

En condición de: **Director/a**

Título de la tesis: **Síntesis y caracterización de pilar[n]arenos para su uso como receptores moleculares.**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Alba Pereira Vilar**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Lisboa**, **30 de enero de 2021**

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis Luis García Río y Nuno Míguel Jesuíno Basílio por animarme a comenzar esta aventura y guiarme durante todo el proceso de elaboración de esta tesis doctoral. Así mismo, no quiero olvidarme de los profesores y colaboradores del grupo Mercedes Parajó Montes, Pedro Rodríguez Dafonte y Juan Carlos Mejuto Fernández.

También quiero agradecer al profesor Juan Carlos Penedo Esteiro de *School of Physics and Astronomy* de la *University of St Andrews* por supervisar mi trabajo durante mi estancia en Escocia. Gracias por hacerme sentir parte del grupo desde el primer momento, por toda tu ayuda durante la estancia y posterior redacción del trabajo y, sobre todo, por descubrirme una nueva forma de trabajar. Gracias Carlos.

Agradezco a la Xunta de Galicia por el apoyo concebido a través de la *Bolsa de apoio á etapa predoutoral* para llevar a cabo este trabajo.

Quiero dar las gracias a todas las personas que han colaborado de alguna u otra forma en esta tesis. A la profesora María Rita Paleo Pillado y al resto del grupo del profesor Francisco Javier Sardina, por sus buenos consejos de química orgánica. A Manuel Martín Pastor por darle luz al capítulo 7 cuando todo era oscuridad. Al profesor Rodrigo Montecinos Escobar, de la Pontífica Universidad Católica de Chile, por los experimentos de dinámica molecular. A Mencha y Ramón de la unidad de RMN por toda la ayuda prestada. A todo el personal del CIQUS que hacen que trabajar allí sea muy fácil: Carmen, Flora, Arcadio y Pablo.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por todo lo que hemos vivido juntos:

A Luz, Márcia y Silvia; por todo lo que me enseñasteis aunque coincidiéramos muy poco tiempo.

A Miguel, por ese consejo que me diste el primer día y que no seguí. Ahora soy yo la que se lo retrasmito al resto del grupo.

A María y Pepita, por todos los momentos vividos en el laboratorio y, sobre todo a los que vivimos fuera de él.

A Álvaro, por todas esas anécdotas que nos hacían llorar de risa a todos.

A Borja, por ayudarme a dar los primeros pasos en el laboratorio.

A Juan, por todas tus frases célebres e historias rocambolescas que siempre sacan una sonrisa.

A Alba, por traer un trocito de Asturias al laboratorio. Gracias por enseñarnos un nuevo idioma y ponerle ese sentido de humor tan tuyo a todo lo que haces.

A Ale, por no dejar de sorprenderme desde aquella conversación de nuestras bebidas favoritas. Gracias por la amabilidad, profesionalidad y el buen humor que le pones a la vida.

A Mariña, por todos los momentos que compartimos durante y después de tu tesis. Gracias por las conversaciones, las tardes de amigas, por preocuparte siempre de cómo estaba, por las risas… En definitiva, gracias por estar siempre.

A Roberto, por ser la única persona capaz de hacerme reír en cualquier situación, por todas esas confesiones que nos alegraban los días, por toda tu ayuda y, como no, gracias por los momentos en las neveras.

A Bea, por ser un auténtico descubrimiento. Gracias por las conversaciones filosóficas, las conversaciones de temas absurdos, por instaurar el término *caña flash*, por la confianza, los momentos vividos y por los que nos quedan por vivir. Gracias por llegar siendo una compañera y salir siendo una amiga.

A Ángel, por aguantarme durante los últimos siete años. Gracias por ser el mejor compañero que se puede pedir, por ayudarme siempre, por hacerme reír, por preocuparte, por los miles de memes que siempre me sacan una sonrisa (algún día te pillaré en un renuncio y no podrás contestarme con uno de ellos).

A Nitin, Edu, Lucía, Jackson, Richard y Ghibom; por todo lo que me enseñasteis durante vuestras estancias, por hacerme conocer nuevas culturas y abrir mi mente. Espero que nos volvamos a encontrar.

A todos mis compañeros del BNS en St Andrews, en especial a Remi Fritzen por hacerme muy fácil mi estancia en Escocia.

Me gustaría agradecer a los amigos que de una u otra forma compartieron este camino conmigo:

A Iago, por todas esas tardes de cañas en las que solucionábamos todos los problemas del mundo.

A Iria, por ser una de las mejores sorpresas que me tenía preparado Santiago. ¡Quién nos iba a decir que siendo casi vecinas nos íbamos a conocer aquí! Gracias por ser la mejor compañera de carrera, de Máster, de piso, de doctorado y de todo. Espero que podamos cumplir nuestra promesa de hacer ese viaje juntas.

A Sandra y Tere, por estar en mi vida desde que somos pequeñas. Gracias por todos los momentos, viajes, risas y cotilleos que hemos vivido (y los que nos quedan…). Gracias por el apoyo, los ánimos y por hacerlo siempre todo más fácil.

Gracias a mi familia por estar siempre ahí (mis padrinos Fina y Luis; mis tíos Carlos y Vero y a mis primos Luis, Sonia y Sofía). Gracias especialmente a mis abuelos, aunque ya no estéis aquí para verme finalizar esta etapa sé que, estéis donde estéis, estaréis presumiendo de nieta.

Y, por último, pero no por ello menos importante, gracias a mis padres a quienes debo absolutamente todo. Gracias por vuestro apoyo incondicional, por vuestro cariño, por creer en mi probablemente más que yo misma, por preocuparos siempre por todo lo que me rodea, por no dejarme caer nunca y por hacerme sentir lo orgullosos que estáis de mí. Esta tesis es vuestra.

A todos aquellos de los que me haya podido olvidar y hayan sido importantes durante esta etapa, les pido perdón y les doy las gracias.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A mis padres,

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

ABSTRACT 1

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN 3

1.1 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR 5
1.1.1 Interacciones intermoleculares no covalentes 5
1.1.2 Autoensamblaje molecular 8
1.1.2.1 Micelas
1.1.2.2 Vesículas
1.1.3 Química anfitrión-huésped 12
1.2 CICLODEXTRINAS 16
1.2.1 Estructura y propiedades 16
1.2.2 Funcionalización de ciclodextrinas naturales 18
1.2.3 Propiedades host-guest de las ciclodextrinas 23
1.3 PILARARENOS 30
1.3.1 Estructura y propiedades 30
1.3.2 Síntesis y funcionalización de pilararenos 33
1.3.3 Propiedades host-guest de pilararenos 40
1.3.3.1 Guest catiónicos
1.3.3.2 Guest aniónicos
1.3.3.3 Guest neutros
1.4 BIBLIOGRAFÍA 51

CAPÍTULO 2: INDUCIÓN DEL CAMBIO DE PROPIEDADES ASINCRÓNICO DE SONDAS FLUORESCENTES MEDIANTE EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR 63

2.1 INTRODUCCIÓN 65
2.2 MÉTODO EXPERIMENTAL 68
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 69
2.3.1 Comportamiento fotoquímico de ANS en diferentes medios 69
2.3.2 Comportamiento fotoquímico de ANS con DM-β-CD 71
2.3.3 Comportamiento fotoquímico de ANS con α, β y γ-CD 80
2.3.4 Comportamiento fotoquímico de ANS con Albúmina de Suero Bobino (BSA) 86
2.4 CONCLUSIONES 94
2.5 APÉNDICES 95
2.6 BIBLIOGRAFÍA 108

CAPÍTULO 3: FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN ENTRE ANS Y PILAR[n]ARENOS 112

3.1 INTRODUCCIÓN 114
3.2 MÉTODO EXPERIMENTAL 115
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 117
3.3.1 Comportamiento fotoquímico de ANS con P5TMA 117
3.3.2 Comportamiento de ANS con P5TMA mediante espectroscopía de ^{1}H-RMN 124
3.3.3 Comportamiento de ANS con P5TMA mediante dinámica molecular 126
3.3.4 Evidencia de la complejación de iones pequeños por P5TMA 129
3.3.5 Evidencia de la complejación de alcanosulfonatos lineales 132
3.3.6 Evidencia de la complejación de *p*-toluensulfonato sódico 133
3.3.7 Influencia del tamaño del receptor en el comportamiento fotoquímico de ANS 137
3.4 CONCLUSIONES 140
3.5 APÉNDICES 141
3.6 BIBLIOGRAFÍA 175

CAPÍTULO 4: ESTABILIZACIÓN DE PEROXINITRITO EN PILAR[5]ARENO 179

4.1 INTRODUCCIÓN 181
4.2 MÉTODO EXPERIMENTAL 185
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 187
4.3.1 Descomposición de peroxinitrito 187
4.3.2 Estabilización de peroxinitrito en medio ácido 189
4.3.3 Estabilización de peroxinitrito en medio básico 194
4.4 CONCLUSIONES 198
4.5 APÉNDICES 199
4.6 BIBLIOGRAFÍA 205

CAPÍTULO 5: ESTABILIZACIÓN DE INTERMEDIOS DE REACTIVOS DEL TIPO COMPLEJO DE MEISENHEIMER CON PILAR[n]ARENOS 209

5.1 INTRODUCCIÓN 211
5.2 MÉTODO EXPERIMENTAL 212
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 214
5.3.1 Estudio cinético de la reacción de 1,3,5-trinitrobenceno (TNB) con NaOH 214
5.3.2 Estudio cinético de la reacción de 1,3,5-trinitrobenceno (TNB) con NaOH en presencia de pilar[n]arenos 216
5.4 CONCLUSIONES 220

5.5 APÉNDICES.....221
5.6 BIBLIOGRAFÍA.....222

CAPÍTULO 6: FORMACIÓN DE [2]ROTAXANOS ENTRE P5TMA Y DIÁCIDOS LINEALES DE DIFERENTE LONGITUD DE CADENA..... 224

6.1 INTRODUCCIÓN 226
6.2 MÉTODO EXPERIMENTAL.....230
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 231
6.3.1 Formación de complejo de inclusión entre MO y P5TMA.....231
6.3.2 Formación de complejo de inclusión entre P5TMA y diácidos carboxílicos.....234
6.3.3 Formación de complejo de inclusión entre P5TMA y C10 mediante RMN 248
6.4 CONCLUSIONES.....251
6.5 APÉNDICES.....252
6.6 BIBLIOGRAFÍA.....263

CAPÍTULO 7: MECANISMO DE FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE ESTILBENO Y AZOBENCENO CON P5TMA Y P6TMA..... 266

7.1 INTRODUCCIÓN 268
7.2 MÉTODO EXPERIMENTAL.....273
7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 275
7.3.1 Estudio del ácido 4,4'-estilbendicarboxílico.....275
7.3.1.1 Estudio mediante RMN
7.3.1.2 Estudio mediante espectroscopía UV-Vis
7.3.1.3 Influencia de la temperatura
7.3.1.4 Influencia del tamaño de la cavidad
7.3.2 Estudio del ácido azobenceno-4,4'-dicarboxílico.....295
7.3.2.1 Influencia de la concentración de P5TMA
7.3.2.2 Influencia de la concentración de azobenceno
7.3.2.3 Influencia de la temperatura
7.3.2.4 Procesos competitivos
7.3.2.5 Influencia del tamaño de la cavidad
7.3.2.6 Estudio mediante RMN
7.4 CONCLUSIONES.....311
7.5 APÉNDICES.....312
7.6 BIBLIOGRAFÍA.....340

CAPÍTULO 8: ESTUDIO DE INTERACCIONES ADN-PROTEÍNA INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE REPARACIÓN DE ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER) 348

8.1 INTRODUCCIÓN 350
8.1.1 Teoría del FRET y relación con *ratio A* o relación A 351
8.1.2 XPA (*Xeroderma Pigmentosum group A protein*) 353
8.1.3 RPA (Proteína de Replicación A) 353
8.1.4 Interacción entre XPA y RPA 354
8.2 MÉTODO EXPERIMENTAL 355
8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 355
8.3.1 Interacción de XPA con burbujas de tres nucleótidos (B3) mediante experimentos de anisotropía 356
8.3.2 Interacción de XPA con burbujas de doce nucleótidos (B12) mediante experimentos de anisotropía 359
8.3.3 Cambios conformacionales en burbuja B3 por interacción con XPA usando FRET 360
8.3.4 Cambios conformacionales en burbuja B12 por interacción con XPA usando FRET 361
8.3.5 Cambios conformacionales en burbuja B12 por interacción con RPA usando FRET y anisotropía 363
8.3.6 Cambios conformacionales en burbuja B12 por interacción conjunta de RPA y XPA 365
8.3.6.1 Influencia de XPA sobre RPA
8.3.6.2 Influencia de RPA sobre XPA
8.4 CONCLUSIONES 368
8.5 BIBLIOGRAFÍA 369

CHAPTER 9: SUMMARY AND CONCLUSIONS 373

ANEXO I: Permisos de revistas científicas 378

ABSTRACT

This thesis describes main types of inclusion complexes always in the field of supramolecular chemistry. In Chapter 1 a brief introduction is given of supramolecular chemistry, cyclodextrins and pillar[n]arenes. Furthermore, an exhaustive bibliographic report on inclusion complexes is reviewed too.

In Chapter 2, it has been confirmed that ANS is sensitive to changes in solvation since the quantum yield and the position of the band are modified synchronously by changes in solvation layer. The photochemical behavior has been studied with mixtures of solvents. The modification of ANS properties makes it a useful tool to understand colloid and biological systems. The encapsulation on ANS into a macromolecule, a natural or modified cyclodextrin, originates a non-homogeneous solvation layer around the dye. The formation of inclusion complexes generates microenvironments. The biological relevance has been revealed by studying the interaction of ANS and BSA.

In Chapter 3, it has been confirmed the ability of P5TMA to act as a molecular receptor for anion dyes. The ability of P5TMA to form complexes with multiple stoichiometry has been revealed (formation of 1:1, 1:2 and 1:1:1 host guest complexes). Through a competitive experiment, it has been possible the determination of the equilibrium constants for small ions, linear molecules and sodium *p*-toluensulfonate. Moreover, it has been confirmed the ability of P6TMA to act as molecular receptor too, the size of the macrocycle and the π-π interactions are evaluated.

In Chapter 4, the decomposition of peroxynitrite in acidic and basic medium has been studied by the determination of the rate constant of these processes. Furthermore, the stabilization of peroxynitrite into the cavity of the P5TMA has been studied in acidic and basic medium and the rate constant of these processes have been determinate. This stabilization has been evaluated by the inhibition of two oxidation reactions.

In Chapter 5, the formation of a Meisenheimer complex has been studied by the reaction of TNB and NaOH under different conditions. The same process has been studied with P5TMA in the medium. A stabilization of the Meisenheimer complex is obtained by the use of P5TMA (a factor of 3.7). The same process has been studied with P6TMA in the medium with a stabilization of the Meisenheimer complex too (a factor of 8).

In Chapter 6, it has been studied the formation of inclusion complexes between P5TMA and Methyl Orange (MO), the P5TMA:MO complex is a useful tool in competitive experiments with TSNa or different diacids. The displacement of MO with diacids allows the elucidation of the kinetic constants as well as to establish the relationship between the constants and the size of the chain. The mechanism of the process indicates the formation of a pre-complex between the P5TMA:MO and the diacid. To calculate the equilibrium constants it is necessary to change the P5TMA:MO complex to P5TMA:Stil complex (Chapter 7).

In Chapter 7, a new mode of complexation by pillararenes has been reported by the identification of three types of complexes: external, kinetic and thermodynamic complexes. It is possible to determinate the thermodynamic parameters associated with each process (the equilibrium constant to the external complex and the kinetic constant to the kinetic complex). The activation energies are also calculated.

In Chapter 8, it has been studied the interaction of XPA and RPA (proteins of the NER mechanism) with different damaged DNA fragments (bubble B3 and B12). The K_D constants associated with each process have been determined, as well as the number of proteins that bind to each of the bubbles. It have been established the dynamic of each protein individually and the dynamic of both proteins.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 1

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.

1.1 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR.

En el año 1987 Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn y Charles J. Pedersen fueron galardonados con el premio Novel de Química ``*por el desarrollo y uso de moléculas que presentan interacciones de estructura específica de alta selectividad´´* siendo este, el primer reconocimiento de la comunidad científica a un nuevo campo emergente dentro de la química: la química supramolecular. Años más tarde, en el 2016, Bernard Feringa, James Fraser Stodart y Jean-Pierre Sauvage recibirían el mismo galardón ``*por el diseño y síntesis de máquinas moleculares´´* confirmando el interés de la sociedad científica en este campo de investigación.

1.1.1 Interacciones intermoleculares no covalentes.

La ``química más allá de las moléculas´´ [1–3] o química supramolecular estudia la formación de entidades complejas y organizadas, formadas por interacciones intermoleculares no covalentes entre dos o más especies moleculares. La principal ventaja de este tipo de interacciones, frente a las covalentes, radica tanto en su carácter débil como en su naturaleza reversible [4–6]. Dado que la mayoría de procesos biológicos tienen lugar en agua e implican interacciones reversibles y no covalentes entre las distintas especies moleculares, es de gran importancia comprender estas interacciones con el objetivo de crear nuevos sistemas supramoleculares [7,8]. En cuanto a la clasificación de estas interacciones cabe destacar que abarcan desde enlaces coordinativos, con una fuerza de varios cientos de kJ/mol, hasta interacciones mucho más débiles de pocas unidades de kJ/mol. A continuación, se indican las más relevantes [2,4,9–13]; siendo en este momento necesario aclarar que han de tenerse en cuenta tanto este tipo de fuerzas para todas las moléculas del sistema, como otras interacciones derivadas del medio de reacción; tales como solvatación, emparejamiento de iones, redes cristalinas, etc.

Las interacciones ion-ion [1–3] cuyo rango de energía se establece entre 100-350 kJ/mol son consideradas como las más fuertes. Este tipo de interacción tiene lugar entre iones de igual o distinta carga siendo considerada como fuerza de repulsión o atracción, respectivamente. La magnitud de la fuerza electrostática viene definida por la ley de Coulomb y es, por tanto, directamente proporcional a la magnitud de las cargas e inversamente proporcional a la distancia. En consecuencia, en la formación de un agregado, la disminución de la distancia entre dos iones supone un factor geométrico, aunque no haya una direccionalidad específica en la interacción ion-ion.

Las interacciones ion-dipolo presentan energías en el rango 50-200 kJ/mol, este tipo de interacción se establece entre un ion y un dipolo; en contraposición al caso anterior, la

orientación del dipolo con respecto a la carga sí es importante. Uno de los ejemplos más representativos de este tipo de interacción es la solvatación de los iones de la molécula de NaCl en medio acuoso. En este apartado se han de tener en cuenta, además, las interacciones ion-dipolo inducido, donde la presencia de un ión provoca una distorsión de la nube electrónica de una molécula apolar dando lugar a una molécula polarizada. Un ejemplo de este tipo de interacción es la provocada por el Fe^{2+} de la hemoglobina al entrar en contacto con el O_2.

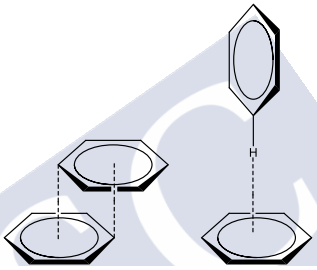
Las interacciones dipolo-dipolo cuya energía se establece entre 5 y 50 kJ/mol se corresponden con las interacciones entre dipolos de distinta carga, ya sea de dos moléculas o de una única molécula lo suficientemente grande como para interaccionar consigo misma. Al igual que en los dos casos anteriores, la orientación relativa de los dos dipolos es de vital importancia. Como ejemplo de este tipo de interacción, se puede mencionar el establecido entre dos moléculas de HCl.

El resto de fuerzas de van der Waals, cuya energía es inferior a 5 kJ/mol, tienen lugar por la interacción de núcleos sobre la nube electrónica de una molécula que es polarizada; siendo este tipo de fuerza el resultado de una superposición de las interacciones atractivas de dispersión. Este tipo de fuerza cobra importancia cuando tiene lugar entre un gran número de moléculas o en la formación de complejos donde una pequeña sonda apenas se incluye en la cavidad del macrociclo [1,14]. Un ejemplo de este tipo de interacciones es la dispersión de *London*, fuerza de carácter atractivo que aumenta a medida que las moléculas se aproximan, sin embargo, dichas interacciones se vuelven repulsivas cuando la distancia entre moléculas es tan pequeña que las nubes electrónicas de ambas empiezan a interaccionar.

El enlace de hidrógeno [15] es probablemente uno de los más importantes dado su implicación en el ámbito de la bioquímica, el ejemplo más representativo es la estructura de doble hélice del ADN. Este tipo de interacción se puede definir como una interacción del tipo dador-aceptor entre dos átomos para formar un tipo especial de atracción dipolo-dipolo. Para que tenga lugar este proceso es necesario que un átomo actúe como donador de protones mientras que, otro átomo actúe como aceptor de protones, generándose así, un enlace del tipo A-H--B. Para que esto ocurra, el átomo A debe ser lo suficientemente electronegativo como para retirar densidad electrónica del protón, de forma que el átomo B pueda donar parte de su densidad electrónica al mismo. Para actuar como aceptor, el átomo B debe tener un par de electrones libres o π polarizables. Además, en el campo de la química supramolecular cobra gran importancia debido a la direccionalidad del enlace, esta característica permite controlar la geometría de los complejos formados mediante la síntesis de anfitriones específicos para un huésped de interés. A nivel energético y estructural, los enlaces de hidrógeno se pueden clasificar en fuertes (60-120 kJ/mol, distancia entre heteroátomos de 2.2-2.5 Å y ángulo de 175-180º), moderados (15-60 kJ/mol, distancia entre heteroátomos de 2.5-3.2 Å y ángulo de 130-180º) y débiles (15 kJ/mol, distancia entre heteroátomos menor a 4 Å y ángulos de 90-150º) [1-3,15] Esta clasificación pone de manifiesto que los enlaces de hidrógeno fuertes, tienen una mayor contribución covalente mientras que, los moderados y débiles son de naturaleza

electrostática. La disposición de los enlaces permite un gran control espacial para los enlaces fuertes, y una mayor flexibilidad en el caso de los moderados y débiles.

Por último, se evalúan los sistemas π, la interacción catión-π [17] presenta un rango de energías de 5 a 80 kJ/ mol. Este tipo de sistemas π pueden interaccionar entre sí, sin embargo, si estos dos sistemas presentan una alta riqueza o deficiencia electrónica, no interactuarán positivamente de una forma ``cara a cara´´ debido a la repulsión entre nubes π [18]. Con el fin de evitar esta situación, se adopta un apilamiento en forma de T en la que la nube π negativa interactúa con la nube σ, un ejemplo de este tipo de apilamiento lo presenta el benceno (esquema 1) [19].



Esquema 1. (Izquierda) Apilamiento en forma ``cara a cara´´ de dos moléculas de benceno (Derecha) Apilamiento en forma de T de dos moléculas de benceno.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el medio de reacción es un factor determinante, dentro de este apartado es necesario mencionar el efecto hidrofóbico. Este efecto se basa en la preferencia de disposición de las moléculas con la finalidad de reducir la superficie de contacto entre moléculas polares/ próticas y apolares/ apróticas. Un ejemplo que resalta la gran importancia del efecto hidrofóbico es el desplazamiento de las moléculas de agua del interior de una ciclodextrina mediante una sonda. Este proceso es posible dada la baja interacción con la cavidad interna de la ciclodextrina, dando lugar a una ganancia entálpica del sistema y, además, a una ganancia entrópica si varias moléculas de agua son desplazadas por una única sonda [1–3]. La formación de micelas, la baja solubilidad de algunos solutos apolares en medio acuoso o el plegamiento de las proteínas son algunos ejemplos de gran importancia del efecto hidrofóbico [20,21].

El conjunto de las interacciones anteriormente mencionadas determinará el tipo de agregación que tiene lugar entre moléculas presentes en el sistema. De esta manera, y de forma tradicional, la química supramolecular se divide en dos grandes campos: la química de autoasociación o autoensamblaje molecular y la química anfitrión-huésped.

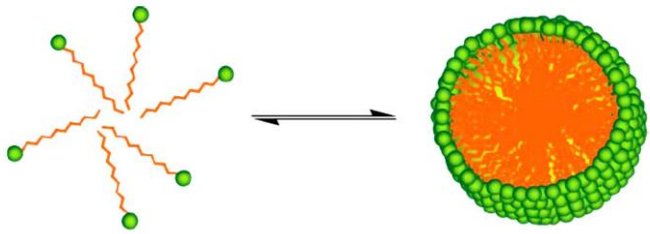
1.1.2 Autoensamblaje molecular.

El proceso de autoensamblaje molecular es uno de los más potentes y eficaces para la formación, de manera espontánea y programada, de estructuras complejas a partir de unidades moleculares más pequeñas dando lugar a agregados perfectamente estructurados, estables y unidos no covalentemente. Los ejemplos más representativos de este tipo de sistemas son la formación de micelas y vesículas mediante la agregación de surfactantes.

Los surfactantes [22–24] son moléculas que se caracterizan por su tendencia a adsorberse en superficies e interfases con el objetivo de reducir la energía libre de esa fase. Otro de los rasgos característicos de estos agentes tensioactivos, es que los unímeros o monómeros tienden a formar agregados en disolución en forma de micela; el proceso de micelización permite reducir el contacto entre los grupos apolares del surfactante y el agua, reduciéndose así la energía libre del sistema. La formación de este tipo de estructuras modifica por completo las propiedades del sistema. Los monómeros libres en disolución contribuyen a la reducción de la tensión interfacial y superficial, los procesos dinámicos (humectación o formación de espuma) se rigen por la concentración de unímero libre en disolución. Por otra parte, las micelas se convierten en un reservorio para las moléculas de surfactante libres. La formación de este tipo de estructuras está designada fundamentalmente, y tal y como se mencionaba anteriormente, por fuerzas de carácter hidrofóbico. Ha de tenerse en cuenta que por un lado la expulsión de la parte hidrófoba del agente tensioactivo favorece la separación de fases, mientras que, la presencia de estos grupos polares se oponen; se produce, por tanto, un balance de fuerzas que puede dar lugar a diferentes estructuras según su parámetro de empaquetamiento crítico [25] siendo probablemente las micelas y vesículas las más estudiadas hasta el momento.

1.1.2.1 Micelas.

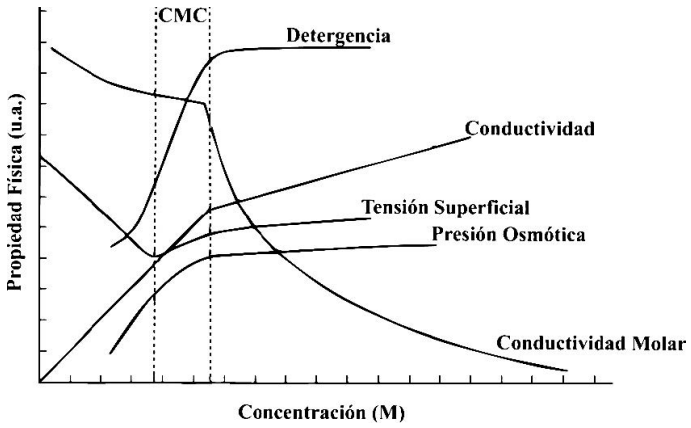
Las micelas se forman cuando la concentración de surfactante, generalmente con una única cola hidrófoba, en disolución alcanza la denominada concentración de micelización crítica, CMC; es decir, la máxima concentración posible de unímero en disolución, independientemente de cuál sea la concentración total de surfactante adicionado al sistema. Por lo tanto, la disolución micelar se compone de unímeros agregados y unímeros libres en equilibrio, la adicción de más surfactante tras alcanzar la CMC modifica la concentración de micelas, pero no la de unímeros. En medio acuoso, el grupo hidrofóbico del agente tensioactivo se dispone hacia el interior del agregado mientras que, el grupo polar, se dirige hacia el disolvente interactuando con las moléculas de agua (Esquema 2).



Esquema 2. Equilibrio y estructura de la formación de una micela en medio acuoso.

El valor de CMC es característico para cada uno de los surfactantes, siendo su determinación posible mediante la evolución de alguna de las propiedades del sistema [26]: tensión superficial, conductividad, difusión libre, turbidez…De forma general, se puede concluir que el valor de la CMC para un surfactante disminuye de forma proporcional a la longitud de su cadena hidrocarbonada, cuanto más pequeña sea la cadena menor será el carácter apolar. Todas las propiedades mencionadas anteriormente, sufren una variación brusca cuando se forman las micelas en el medio [26,27]. Por lo tanto, el valor de la CMC puede ser definido de manera global mediante la ecuación (1) donde φ representa una propiedad que se puede medir y, C_T la concentración de surfactante total que ha sido adicionado al medio. Algunos factores como la temperatura o la presencia de cosolutos modifican el valor de CMC obtenido; de forma general se puede establecer que el aumento de la temperatura provoca una disminución en el valor de CMC, llegando incluso a la separación de fases. La variación de CMC por la presencia de cosolutos en disolución es mucho más compleja ya que, la tendencia depende tanto del carácter del surfactante como de la naturaleza del soluto añadido.

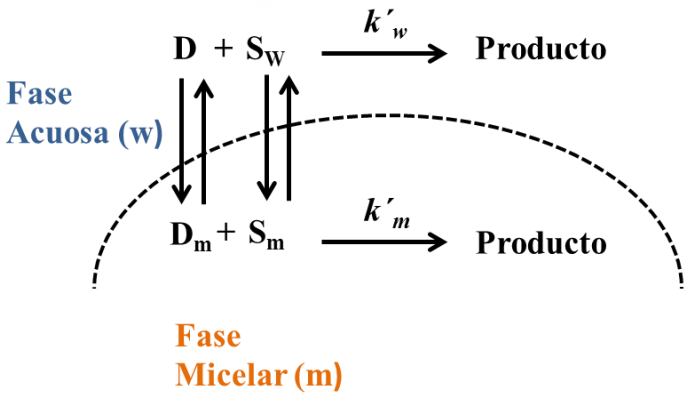
$$\frac{d^3(\varphi)}{dC_T^3} = 0 \qquad (1)$$



Esquema 3. Representación de los cambios observados en un sistema a partir de la formación de micelas para la determinación del valor de CMC.

Las micelas son agregados dinámicos con un tiempo de vida de milisegundos, sin embargo, el intercambio monómero de micela / monómero libre es un proceso mucho más rápido, del orden de microsegundos.

Una de las ventajas que presentan este tipo de agregados es su capacidad para modificar reacciones químicas, como por ejemplo en la solubilización de diferentes sustancias mediante la participación, fundamentalmente, de fuerzas de carácter hidrofóbico y electrostático. Este proceso de solubilización se explica generalmente a partir del modelo de la pseudofase, sistema en el que se encuentran dos medios perfectamente diferenciados, la psudofase acuosa y la micelar. La existencia de estos dos medios provoca dos efectos sobre la reactividad del sistema. En primer lugar, la inclusión de los sustratos dentro de la micela proporciona un lugar de encuentro entre sustancias con diferente polaridad y, al ser concentradas en un volumen muy pequeño aumenta la probabilidad de que se produzca una reacción química entre ellas. En segundo lugar, si tan solo una de las especies presentes en la disolución entra en contacto con la micela, estos sistemas actúan como inhibidores de reacciones químicas al separar sustancias. Además, cabe destacar que la capa de solvatación del sustrato que interacciona con la micela, es radicalmente distinta a la capa de solvatación del sustrato en medio acuoso; estos cambios de polaridad [28,29] afectan a un gran número de procesos químicos por lo que en bibliografía se encuentran numerosos estudios que evalúan el efecto de las micelas sobre la velocidad de reacción [30,31]. Los estudios cinéticos se basan en el modelo de la pseudofase, siendo el caso más simple el estudio de una reacción unimolecular donde el efecto catalítico está definido por la eficacia de la unión entre el sustrato y la micela (constante de asociación K_m) así como por las constantes de velocidad en la pseudofase micelar y acuosa (k'_m y k'_w, respectivamente). Menger y Portnoy [32,33] desarrollaron un modelo que permite el estudio de K_m, k'_m y k'_w a partir de la dependencia de la velocidad observada frente a la concentración de surfactante [33] (esquema 4) El efecto catalítico sobre una reacción unimolecular puede ser atribuido a un efecto del medio local.



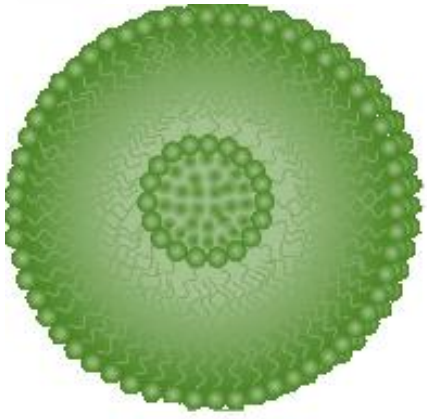
Esquema 4. Modelo de la peudofase micelar diseñada por Menger y Portnoy.

En el caso de reacciones bimoleculares, o de mayor orden, se ha de tener en cuenta la concentración local de cada una de las especies en la micela al tratar los datos con el modelo de la pseudofase micelar. En este tipo de estudios, la dependencia de la constante de velocidad con la concentración de surfactante no permite la determinación directa de todos los parámetros, por lo que, es necesario el uso de otras técnicas.

Todos los factores anteriormente mencionados conducen a que las micelas tengan un gran número de aplicaciones en campos: detergentes, cosméticos, pintura, alimentación, nanotecnología, transformaciones químicas o sistemas de liberación controlada de fármacos son algunos de ellos [34].

1.1.2.2 Vesículas.

Las vesículas son bicapas cerradas formadas por surfactantes que cercan en su interior una pequeña zona acuosa (Esquema 5) Fueron descritas en 1961 por el Dr. Bangham tras la utilización de un microscopio electrónico en el estudio de una tinción negativa sobre una disolución seca de fosfolípidos. Estas estructuras son modelos similares a las membranas biológicas, ya que la composición de biomenbranas está formada mayoritariamente por proteínas y lípidos. El papel de los lípidos en las membranas ha generado mucha controversia, algunos autores sugieren que son necesarios para la estabilidad de regiones con alta curvatura, otros que actúan como componentes reguladores y, finalmente otros grupos de investigación sugieren que desempeñan un papel fundamental en la capacidad enzimática [35]. La mayor parte de los lípidos naturales están constituidos por una cadena saturada y otra insaturada, lo que conduce a un empaquetamiento perfecto [36].



Esquema 5. Estructura de una vesícula en medio acuoso.

Las vesículas se clasifican en tres grandes grupos dependiendo de su composición y estabilidad: dispersión de fosfolípidos en agua (ya sean naturales, sintéticos o mezclas de ambos) [37], sistemas con surfactantes de doble cadena del tipo dialquil-diamonio [38,39] y por último, las formadas por mezclas de surfactantes de distinta naturaleza (catiónicos y aniónicos, no iónico e iónico…) [40–42] Las dos primeras clases son sistemas metaestables cuya estructura está definida por el método de preparación utilizado [43]. Algunos de los métodos más utilizados son la sonicación con una punta de ultrasonidos sobre la temperatura de transición de fase [44] o la inyección de etano o cloroformo [43,45]. Las vesículas de la tercera clase son termodinámicamente estables, se forman por simple dispersión de los surfactantes en agua [41,46]. Uno de los sistemas más comunes son las mezclas de surfactantes aniónicos y catiónicos, eliminando los contraiones inorgánicos, de forma que las estructuras obtenidas son muy similares a las alcanzadas por surfactantes de doble cadena. La principal diferencia es que en surfactantes de doble cadena la distancia entre cargas es fija, mientras que, en las vesículas mencionadas anteriormente, la carga depende de la concentración de sales presentes en el sistema. Se han estudiado sistemas tanto en condiciones equimolares como con diferentes relaciones molares, dando lugar a vesículas positivas o negativas, dependiendo de la proporción de surfactantes. También se han estudiado sistemas formados por mezclas de surfactantes no iónicos e iónicos con diferentes proporciones [40,47].

Las aplicaciones de este tipo de agregados son numerosas: transporte de fármacos [48,49], nanoreatores de particulas magnéticas [50–54], encapsulación de moléculas [55–58], suministro molecular [59] o enzimas y ADN [60–64] cobran gran importancia en farmacología; diagnóstico médico, cosmética… Actualmente, además de las aplicaciones mencionadas, existe un gran interés por el estudio de las micelas desde un punto de vista de su estabilidad, topología, flexibilidad, geometría molecular y modelización termodinámica [65–73].

1.1.3 Química anfitrión-huésped.

Los procesos de autoensamblaje más interesantes y estudiados hasta el momento en química supramolecular son los complejos de inclusión [74]. En estos procesos, una molécula o ión (denominada huésped o *guest*) es encapsulada dentro de la estructura de otra molécula de mayor tamaño (denominada anfitrión o *host*) mediante interacciones de carácter no covalente. La formación y estabilidad de estos complejos de inclusión dependen de múltiples factores: el grado de cooperatividad entre los grupos de unión, la posible preorganización estructural del anfitrión, etc. Cuando un anfitrión presenta una gran tendencia a unirse con un determinado huésped recibe el nombre de selectivo [75]. Este tipo de agregado está definido por una constante de equilibrio K (ecuación 2) que indica de forma cuantitativa la afinidad entre un anfitrión y un huésped determinados. Además de la afinidad es posible calcular la selectividad cuando hay más de un huésped en el sistema, permitiendo conocer la afinidad relativa de un

anfitrión al encapsular diferentes huéspedes; la selectividad está definida por el cociente de las constantes de equilibrio (ecuación 3).

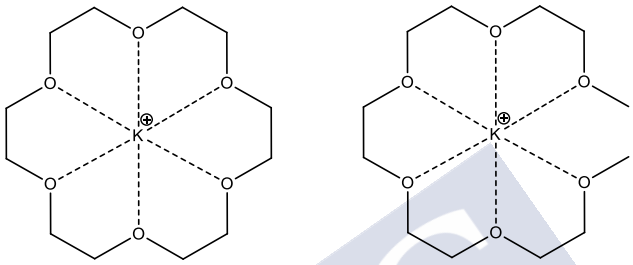
$$\text{Anfitrión} + \text{Huésped} \rightleftharpoons \text{Complejo} \quad K = \frac{[\text{Complejo}]}{[\text{Anfitrión}][\text{Huésped}]} \qquad (2)$$

$$\text{Selectividad} = \frac{K(\text{Huésped 1})}{K(\text{Huésped 2})} \qquad (3)$$

Las condiciones óptimas para la formación de un complejo de inclusión, de manera selectiva, dando como resultado una estructura estable; son un tamaño, geometría y presencia de grupos funcionales complementarios con el sitio de unión del anfitrión. Sin embargo, la compatibilidad química, aunque es una condición necesaria, no se puede considerar como suficiente ya que han de cumplirse otro tipo de requisitos tales como factores geométricos, orientaciones espaciales y compatibilidad de tamaños de ambos componentes. Probablemente, el requisito que permite predecir la formación de un complejo de inclusión de forma más simple es el tamaño. Solo los huéspedes cuyo tamaño sea inferior al de la cavidad del anfitrión serán capaces de introducirse por completo en la misma, la situación más favorable se produce cuando el huésped ocupa aproximadamente el 55% del volumen de la cavidad del anfitrión [76,77]. Una unión de este tipo garantiza un equilibrio energético entre las fuerzas atractivas y repulsivas y, además, desde el punto de vista entrópico un equilibrio entre los grados de libertad vibracional, rotacional y translacional. Dado que las interacciones que tienen lugar en este tipo de agregado son de carácter débil, los complejos de inclusión serán más estables cuantas más interacciones existan, motivo por el que será favorable la existencia de múltiples sitios de unión.

El origen termodinámico [78] de la estabilización de los complejos de inclusión puede compararse con el efecto quelato dado en la formación de complejos metálicos con ligandos n-dentados. El efecto quelato consiste en un aumento de la estabilidad de los complejos que presentan anillos quelato frente a aquellos que no los tienen (o tienen menos) La sustitución de ligandos monodentados por ligandos bidentados provoca un aumento de la entropía del sistema ya que, por cada ligando bidentado unido al metal se liberan dos monodentados. En estos procesos, cobran gran importancia los factores entrópicos y entálpicos. Además, es necesario evaluar estos sistemas estadísticamente, dado que la disociación de un ligando bidentado implica la ruptura de dos enlaces simultáneamente. Otros factores a tener en cuenta son los estéricos y electrostáticos, que serán favorables o no dependiendo de la naturaleza de las moléculas implicadas. El efecto quelato se puede considerar como un ejemplo de cooperatividad entre sitios de unión de un mismo ligando o anfitrión. Existen dos tipos de cooperatividad, la positiva tiene lugar cuando la complejación de una primera molécula incrementa la afinidad del huésped hacia una segunda molécula, y la negativa, cuando la afinidad disminuye. Cabe destacar que si la complejación de la primera especie induce un cambio en la conformación del receptor, afectando al segundo proceso de complejación, tiene lugar un fenómeno denominado efecto alostérico [79] análogo a los procesos de regulación enzimática.

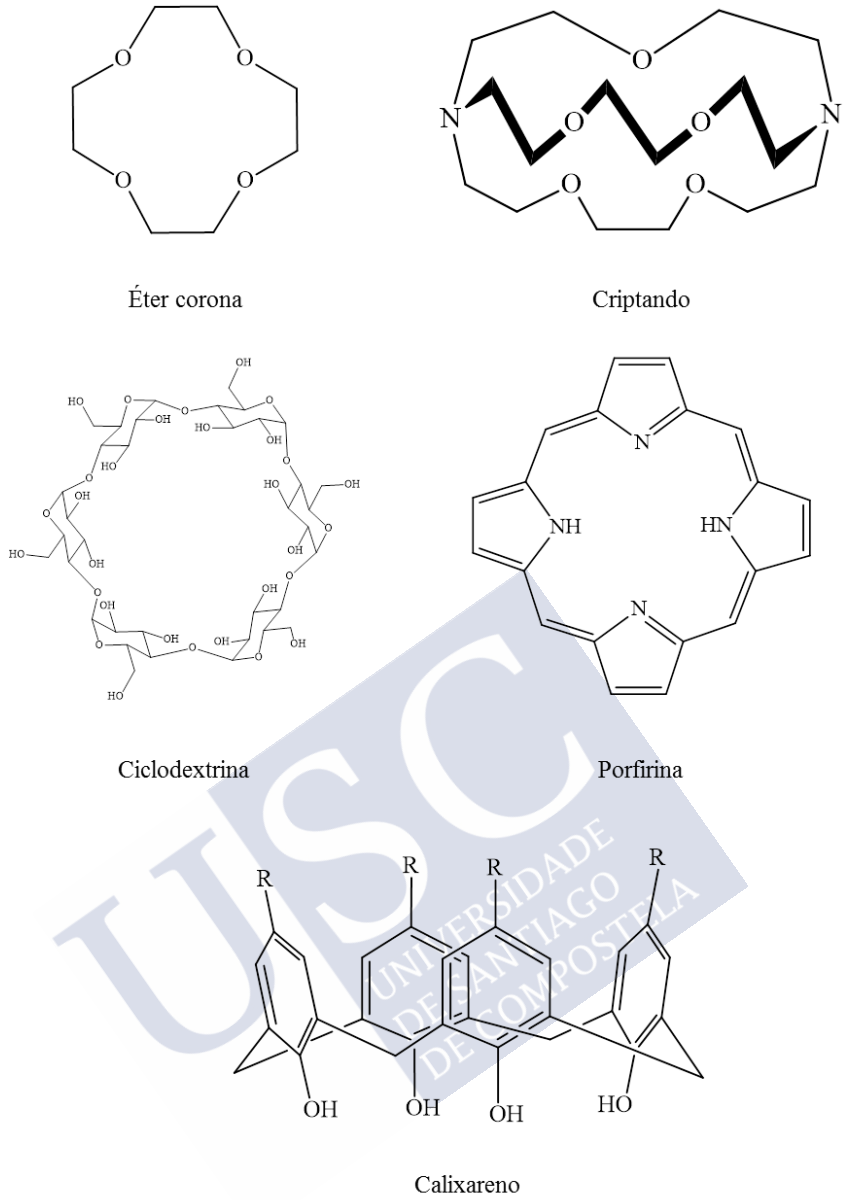
Otro aspecto a tener en cuenta en la formación de complejos de inclusión desde el punto de vista de la formación y estabilidad de los mismos, es la preorganización de la estructura del anfitrión, denominada efecto macrocíclico [80,81]. Un complejo será más estable si el anfitrión es un ligando macrociclico con *n* lugares de unión que el complejo formado por el ligando de cadena abierta equivalente. Uno de los ejemplos más representativos del efecto maclocíclico es la complejación de K^+ con el 18-corona-6 frente al homólogo de cadena abierta (esquema 6), la constante de equilibrio para el primer sistema es aproximadamente cuatro órdenes de magnitud superior a la constante del segundo proceso [82].



Esquema 6. Ejemplo de efecto macrocíclico en la complejación de K+ mediante (izquierda) 18-corona-6 (derecha) homólogo abierto de 18-corona-6.

La principal ventaja que presentan los anfitriones preorganizados radica en que poseen una geometría definida, los sitios de unión, por lo tanto, presentan una disposición espacial adecuada para la interacción con el huésped sin necesidad de ``una energía de reorganización´´ adicional, este proceso es entrópicamente favorable. Desde un punto de vista entálpico, la preorganización del anfitrión es también un proceso favorable ya que, los anfitriones flexibles tienden a adoptar configuraciones con el máximo de distancia entre grupos repulsivos, en el proceso de complejación, al organizar la estructura para dar lugar al complejo, aparecerán fuerzas repulsivas que incrementan la entalpía. Sin embargo, si el anfitrión presenta una estructura rígida, obliga a estos grupos a interaccionar antes de la complejación, por lo tanto, el proceso de inclusión no supone un incremento significativo de la entalpía.

Esta preorganización puede lograrse mediante la síntesis de moléculas anfitrión con estructuras rígidas, cavidades definidas y un tamaño adecuado para la formación de complejos de inclusión. En la actualidad, la forma más utilizada es la síntesis de macrociclos. Cada uno de ellos presentará una afinidad determinada frente a un huésped, además, la gran ventaja de estas estructuras es que son fácilmente funcionalizables, por lo que es posible aumentar la afinidad y selectividad hacia determinados huéspedes. Algunos de los macrociclos más comunes y utilizados son: éteres corona, ciclodextrina, criptandos, porfirinas, calixarenos, cucurbiturilos, pìlararenos… En el esquema 7 se representan las estructuras de algunos de ellos.



Esquema 7. Ejemplo de estructuras de algunos de los macrociclos más utilizados.

Dada la gran importancia de la química supramolecular, en los últimos años ha surgido un gran interés por el diseño de nuevos macrociclos. Sin embargo, el desarrollo de nuevas clases de anfitriones es un trabajo complejo dada la necesidad de generar nuevas rutas sintéticas que permitan la funcionalización de los macrociclos según las características del huésped. Actualmente, están cobrando una gran importancia los pilararenos, macrociclos con una composición similar a los calixarenos pero con una estructura claramente diferenciada; los pilararenos, además, es la última clase de macrociclos descubierta hasta el momento [83].

En esta tesis, se presentan varios estudios en el área de la química de formación de complejos de inclusión, los macrociclos utilizados son ciclodextrinas y pilararenos cuyas características se desarrollan en los apartados 1.2 y 1.3, respectivamente.

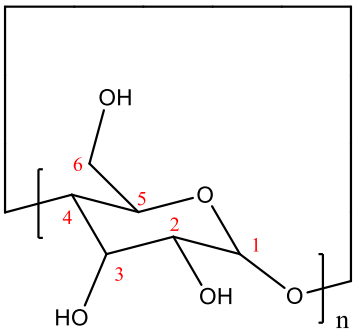
1.2 CICLODEXTRINAS.

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos que se obtienen a partir de la degradación enzimática del algodón dando lugar a estructuras con seis (α-CD), siete (β-CD), ocho (γ-CD) o más unidades de α-D-glucosa unidas entre sí mediante las posiciones 1-4. La α, β y γ-CD son consideradas como ciclodextrinas nativas y son sustancias cristalinas, homogéneas y no higroscópicas que pueden ser funcionalizadas con el fin de variar sus propiedades.

La primera publicación sobre ciclodextrinas data de 1891 [84], el químico francés A. Villiers las describió como sustancias cristalinas obtenidas tras la degradación de almidón con *Bacillus Amylobacter* a las que denominó *celulosinas* por su resistencia a la hidrólisis ácida. Sin embargo, no fue hasta 1903-1911 cuando se identificaron la α y β-ciclodextrina, estableciéndose las bases de la química de estos macrociclos por parte del químico austriaco Franz Schärdinger. Más tarde, en la época de los treinta, Freundberg identificó la estructura de la γ-CD usando Rayos X. Además, sugirió la existencia de ciclodextrinas con un mayor número de unidades. Al principio de la década de los cincuenta, los grupos de investigación de French y Cramer determinaron las propiedades físicas y químicas de estos macrociclos. Algunos años más tarde, en 1953, Freundberg, Cramer y Plieninger generaron la primera patente relacionada con las ciclodextrinas en la que se detallaban las principales aplicaciones de las mismas. En 1957, French realiza la primera revisión bibliográfica de ciclodextrinas.

1.2.1 Estructura y propiedades.

Las unidades de glucopiranosa que conforman las ciclodextinas adoptan generalmente una conformación del tipo silla, si bien es cierto que, la formación de complejos de inclusión puede distorsionar o invertir esta conformación [85,86]. En consecuencia, a la disposición de cada una de las unidades, las ciclodextrinas presentan una estructura cilíndrica en forma de cono truncado (esquema 8) dando lugar a dos portales de diferente tamaño. Tal y como se puede observar, los grupos hidroxilos secundarios (denominados como C2 y C3) se orientan hacia el portal de mayor envergadura mientras que, los hidroxilos primarios (denominados C6) se orientan hacia el portal más estrecho; los grupos CH_2OH se disponen hacia la parte externa del macrociclo. Esta disposición de los hidroxilos en ambos portales le confiere un cierto carácter hidrofílico a la parte externa del macrociclo. Por otro lado, la cavidad de las ciclodextrinas está formada por los hidrógenos de los grupos C-H (de las posiciones 3, 5 y 6) además de por los oxígenos glicosídicos. Los electrones no compartidos de los oxígenos glicosídicos aportan cierto carácter básico de Lewis, mientras que, los átomos de hidrógeno son responsables del carácter apolar de la cavidad (con respecto al agua) De estas características estructurales deriva la capacidad de estos macrociclos para formar complejos de inclusión con moléculas hidrófobas en medio acuoso.



Esquema 8. Estructura de una unidad de α-D-glucosa de una ciclodextrina con n unidades con numeración de los carbonos.

La profundidad de la cavidad de las ciclodextrinas es siempre la misma (7.8 Å) ya que está determinada por el tamaño de las unidades de glucosa. Sin embargo, el diámetro de la cavidad varía de forma proporcional al número de glucosas que conformen a la ciclodextrina. En la tabla 1 se resumen las principales características de las ciclodextrinas naturales [87].

Tabla 1. Características estructurales y propiedades de las ciclodextrinas naturales.

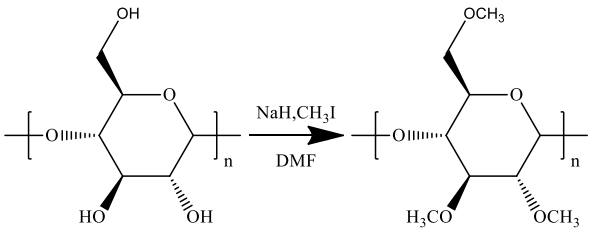
PROPIEDAD	α-CD	β-CD	γ-CD
Unidades de glucosa	6	7	8
Peso Molecular (g/mol)	973	1135	1297
Diámetro interno (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Diámetro externo (Å)	14.6	15.4	17.5
Volumen cavidad ($Å^3$)	174	262	427
$[\alpha]_D$ a 25ºC	150±0.5	162.5±0.5	177.4±0.5
Temperatura de fusión (ºC)	255-260	255-265	240-245
Contenido en agua (% peso)	10.2	13-15	8-18
Moléculas de agua	6	11	17
Solubilidad en agua (g/ 100 ml)	14.5	1.85	23.2

Los grupos hidroxilos de las posiciones 2 y 3 hacen que se establezca una red de enlaces de hidrógeno intramoleculares, esta es la razón que explica la diferente solubilidad de las ciclodextrinas en agua. En la β-CD, la red de enlaces de hidrógenos es completa por lo que presenta una gran estabilidad y, por consiguiente, una baja solubilidad en medio acuoso. En la α-CD, sólo se forman cuatro de los seis posibles enlaces de hidrógeno debido a que la tensión del anillo distorsiona una de las unidades de glucosa. La alta solubilidad de la γ-CD se explica mediante su tamaño, al tratarse de una estructura más flexible se pierde la coplanaridad del ciclo, disminuyendo así, la probabilidad de formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares. Además de en agua, las ciclodextrinas son solubles en medios polares apróticos como el dimetilsulfóxido (DMSO) o dimetilformamida (DMF) e insolubles en la mayor parte de los disolventes orgánicos convencionales (metanol, etanol, acetona…).

1.2.2 Funcionalización de ciclodextrinas naturales.

La funcionalización de ciclodextrinas naturales [88] hace posible ampliar el rango de aplicaciones de este macrociclo. Estas modificaciones tienen lugar sobre los grupos hidroxilo, centros nucleófilos, por lo que las reacciones tendrán lugar mediante un ataque electrófilo. Sin embargo, este proceso es altamente tedioso por la presencia de varios tipos de grupos hidroxilo en la estructura de las ciclodextrinas localizados en la posición 2, 3 y 6. Afortunadamente, existen pequeñas diferencias entre ellos que permiten diseñar rutas sintéticas apropiadas. Los hidroxilos de la posición 2 son los más ácidos (pK_a = 12.2) [89] por lo que al sufrir una desprotonación con el uso de una base adecuada, la reacción da lugar a un anión que presenta una nucleofilia mayor que el resto de hidroxilos protonados. Cuando todos los grupos hidroxilos están desprotonados al usar un amplio exceso de base, tiene lugar la reacción entre un reactivo con carácter electrófilo y la posición 6 ya que esta es la más accesible. La sustitución en la posición 3 es la que conlleva una mayor dificultad siendo sólo posible con reactivos capaces de introducirse en la cavidad de la CD y reaccionando con la misma; evidentemente, esta interacción puede dificultar otras modificaciones posteriores. Todos estos factores, unidos al papel del disolvente, hacen que, de forma general, los rendimientos de las reacciones de funcionalización de ciclodextrinas sean bajos.

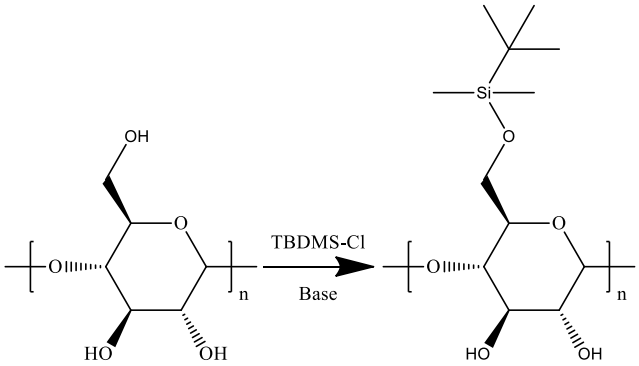
Las ciclodextrinas completamente persustituidas [88] son aquellas en las que todos los grupos hidroxilos han sido sustituidos por el mismo grupo funcional, de forma general se puede establecer que la reacción tiene lugar mediante un amplio exceso del reactivo electrófilo sobre la ciclodextrina. Los principales objetivos en la generación de este tipo de compuestos es aumentar la solubilidad, ya sea en medio orgánico o acuoso, y por otra parte, generar macrociclos específicos que han de ser usados posteriormente. Un ejemplo de este tipo de sustitución es la obtención de la correspondiente ciclodextrina per-O-metilada al hacer reaccionar una ciclodextrina natural con NaH y CH_3I en N,N´-Dimetilformamida (esquema 9) [90,91].



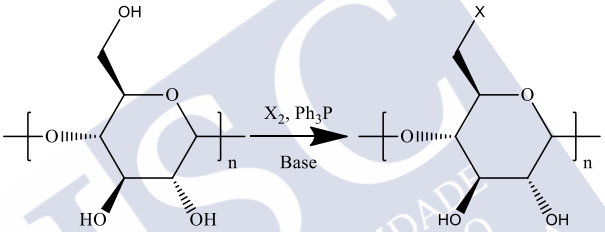
Esquema 9. Síntesis de ciclodextrinas α y β per-O-metilada siendo n = 6 y 7 respectivamente.

Las ciclodextrinas persustituidas en posiciones seleccionadas son aquellas que presentan sustitución en la posición 2, 3, 6 o una combinación de posiciones. La síntesis de este tipo de compuestos se basa en las diferencias de reactividad mencionadas anteriormente junto a la protección / desprotección de los hidroxilos de interés. Tal y como se explica anteriormente, la posición 6 es la que presenta una mayor reactividad por razones estéricas, siendo las

modificaciones usando *tert*-butildimetilsililo o halógenos las más representativas (esquema 10 y 11) [92,93].

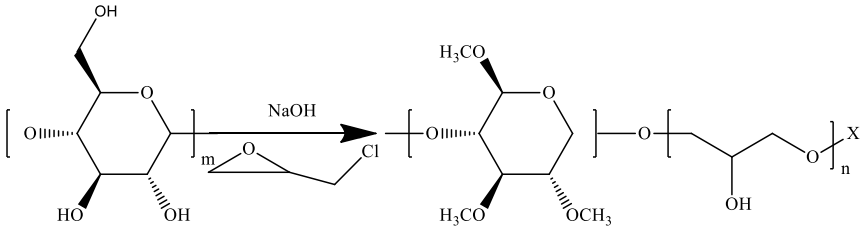


Esquema 10. Síntesis de ciclodextrina modificada selectivamente en la posición 6 siendo n = 6, 7 ó 8 para α, β y γ-CD respectivamente usando cloruro de *tert*-butildimetilsililo (TBDMS-Cl).

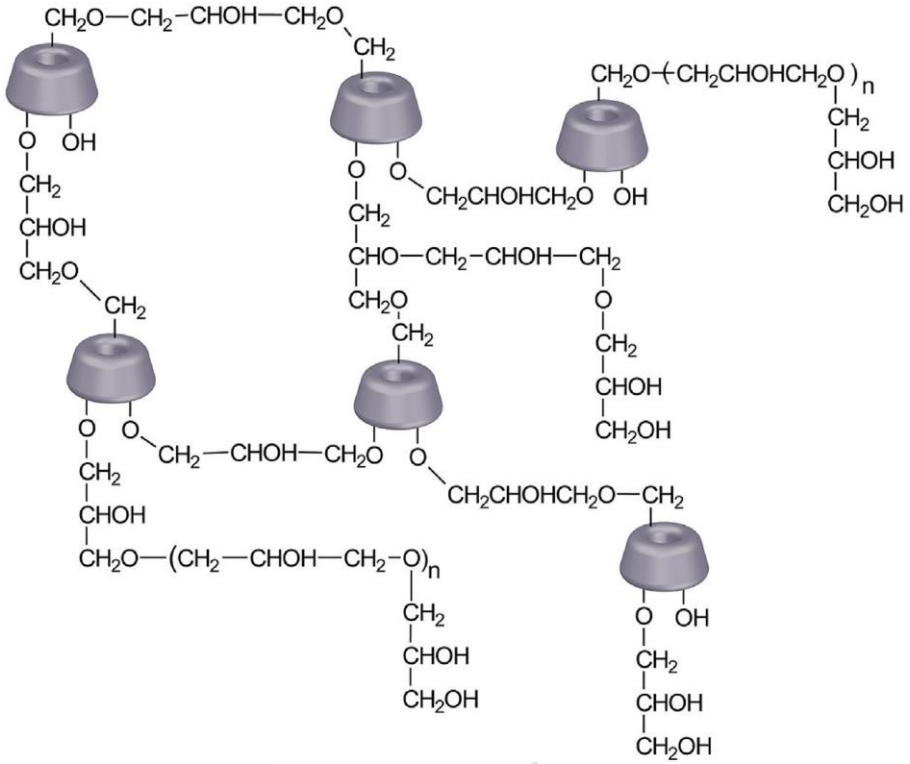


Esquema 11. Síntesis de ciclodextrina modificada selectivamente en la posición 6 siendo n = 6, 7 ó 8 para α, β y γ-CD respectivamente y X = Br o I.

Las ciclodextrinas con sustitución aleatoria se caracterizan por presentar funcionalización en varias posiciones, la estructura exacta y el número de estructuras obtenidas en el medio de reacción es desconocido. Dadas estas características es de vital importancia ser especialmente cuidadoso en la preparación de las muestras ya que, diferentes isómeros presentan diferentes características. Las condiciones sintéticas, de manera general, son similares a las utilizadas para las ciclodextrinas totalmente sustituidas, siendo en este caso necesario el uso de un menor número de equivalentes del reactivo seleccionado. Un ejemplo de este tipo de reactividad se encuentra en ciclodextrinas unidas entre sí mediante polímeros, con el fin de sintetizar este tipo de compuestos se siguen tres estrategias sintéticas diferentes: (1) unión directa en una única etapa mediante un agente apropiado, (2) reacción en dos pasos, el primero consiste en la modificación de una ciclodextrina natural seguida de una segunda reacción entre esta y el polímero y (3) modificación de la ciclodextrina natural seleccionada con grupos capaces de sufrir reacciones de polimerización dando lugar a polímeros ramificados que evolucionan en polímeros lineales con ciclodextrinas. Un ejemplo de la primera ruta sintética es la reacción directa de epiclorohidrina-2(clorometil)-oxirano con una ciclodextrina (esquema 12 y 13) [94]

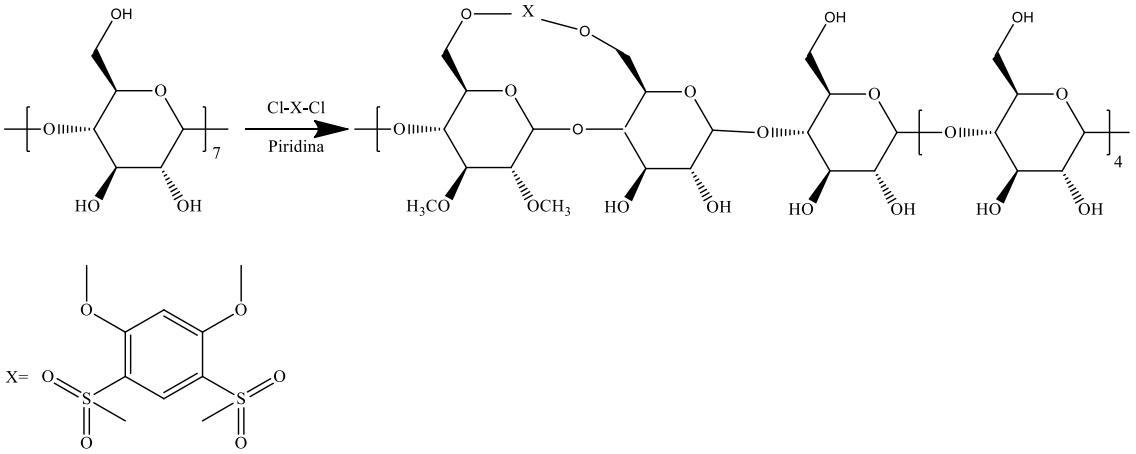


Esquema 12. Síntesis de ciclodextrinas con sustitución aleatoria en medio básico, siendo X= H o CD, m = 6 ó 7 para α o β-CD respectivamente y n = 0, 1 ,2…

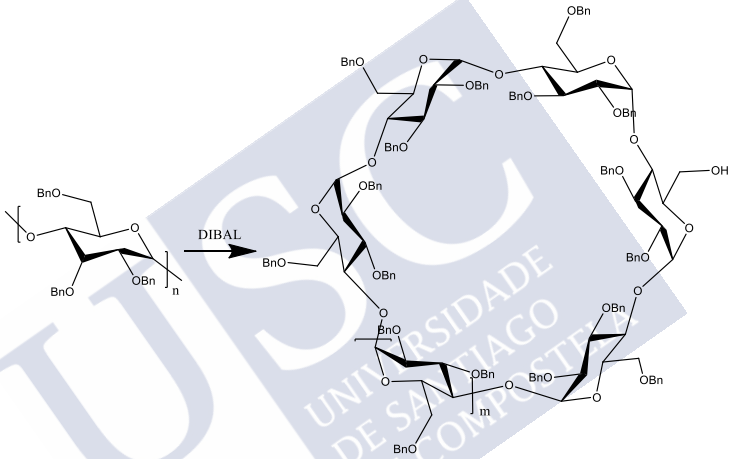


Esquema 13. Estructura de la ciclodextrina con sustitución aleatoria obtenida como producto de la reacción del esquema 12. Reproducido con permiso de ref 94.

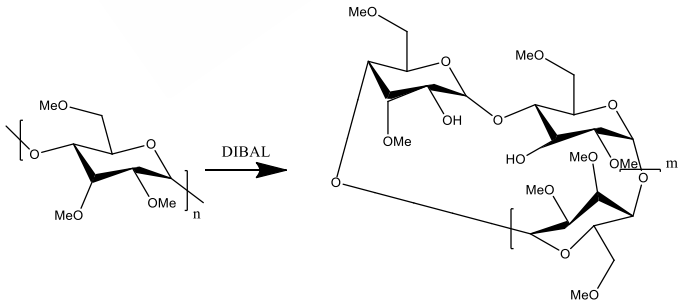
Las ciclodextrinas sustituidas selectivamente son aquellas en las que el producto de reacción es un único isómero con estructura conocida. Su síntesis es la más compleja dado el alto número de posiciones susceptibles a sufrir una modificación lo que implica el desarrollo de una gran variedad de estrategias sintéticas diferentes. La primera de ellas consiste en una sustitución directa mediante el uso de disulfonatos en la posición 6 de la unidad de glucosa seleccionada (esquema 14) [95] La segunda vía sintética se basa en la desprotección selectiva de ciclodextrinas persustituidas de dos grupos bencil opuestos (esquema 15) [96] Por último, la tercera estrategia sintética consiste en una desprotección en una de las unidades permitiendo un acceso directo a las posiciones 2 y 3 (esquema 16) [97]



Esquema 14. Síntesis de ciclodextrinas sustituida selectivamente mediante sustitución directa.



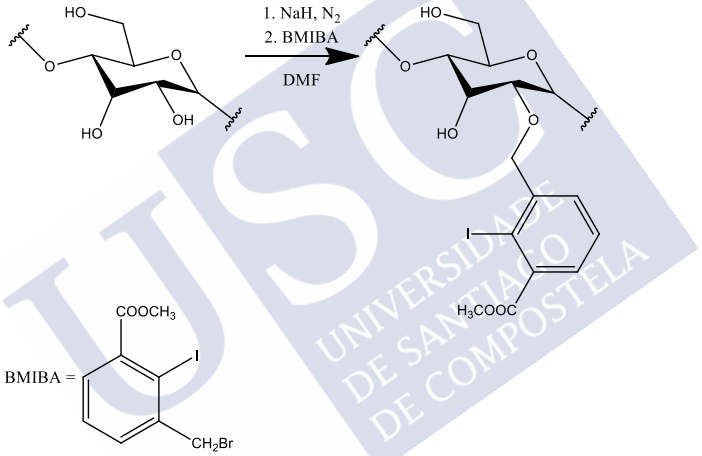
Esquema 15. Síntesis de ciclodextrinas sustituida selectivamente mediante desprotección selectiva siendo n = 6, 7 y 8; m = 1, 2 y 3 para α, β y γ-CD respectivamente.



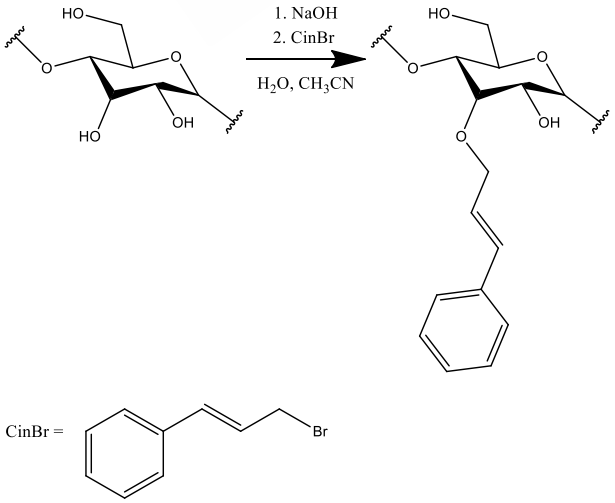
Esquema 16. Síntesis de ciclodextrinas sustituida selectivamente mediante desprotonación en la posición 2 siendo n = 6, 7 y 8; m = 4, 5 y 6 para α, β y γ-CD respectivamente.

Las ciclodextrinas monosustituidas son aquellas que han sufrido una modificación en la posición 2, 3 ó 6. Actualmente existen dos rutas sintéticas: directa e indirecta. En el primer método, sustitución directa, la reacción tiene lugar entre una ciclodextina natural y el reactivo seleccionado. La segunda estrategia sintética, la indirecta, incluye como paso fundamental la desprotección de una ciclodextrina persustituida, este segundo método el más empleado en la

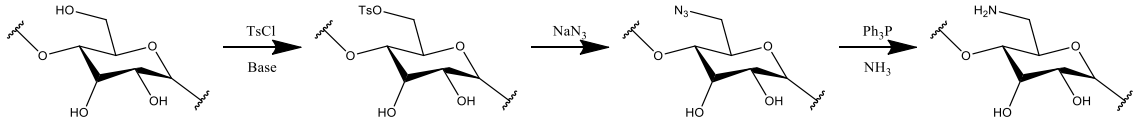
actualidad. Cabe destacar que la monosustitución en la posición 2 es factible mediante el método directo debido a la acidez del grupo hidroxilo, el rendimiento en este tipo de reacciones puede alcanzar el 40% si bien, la etapa de purificación es tediosa debido a la dificultad de separar isómeros. En el esquema 17 [98] y 16 [97] se muestran ejemplos de monosustitución en la posición 2 mediante un método directo e indirecto, respectivamente. La posición 3, tal y como se mencionó anteriormente es la que presenta una menor accesibilidad, generalmente es necesario la inclusión previa del reactivo de interés en la cavidad de la ciclodextrina, en el esquema 18 [99] se muestra un ejemplo de este tipo de reactividad. La monosustitución en la posición 6 presenta la ventaja de que el grupo hidroxilo es el menos ácido, este tipo de sustitución genera ciclodextrinas precursoras que pueden dar lugar a una nueva ciclodextrina mediante la ampliación de la ruta sintética o bien unirse a una superficie para realizar estudios que permitan evaluar la capacidad de complejación de las mismas; en el esquema 19 [100] se presenta un ejemplo de este tipo de reactividad.



Esquema 17. Síntesis de ciclodextrinas monosustituida selectivamente en la posición 2.



Esquema 18. Síntesis de ciclodextrinas monosustituida selectivamente en la posición 3.



Esquema 19. Síntesis de ciclodextrinas monosustituida selectivamente en la posición 6.

1.2.3 Propiedades host-guest de las ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas son macrociclos capaces de formar complejos de inclusión o *host:guest* al alojar en el interior de su cavidad a una molécula huésped que presente un tamaño, forma y polaridad compatible con la estructura de la cavidad [101]. Este proceso de complejación está determinado mediante interacciones de carácter no covalentes y factores geométricos. Dada la estructura de la ciclodextrina, las moléculas huésped tienden a formar complejos introduciendo su parte apolar dentro de la cavidad, esta orientación permite establecer interacciones del tipo hidrofóbico, siendo el complejo más estable cuanto más hidrofóbica sea la molécula huésped. La importancia de la formación de complejos de inclusión radica en los cambios de solubilidad y reactividad que sufre el *guest* sin necesidad de alterar su estructura [102].

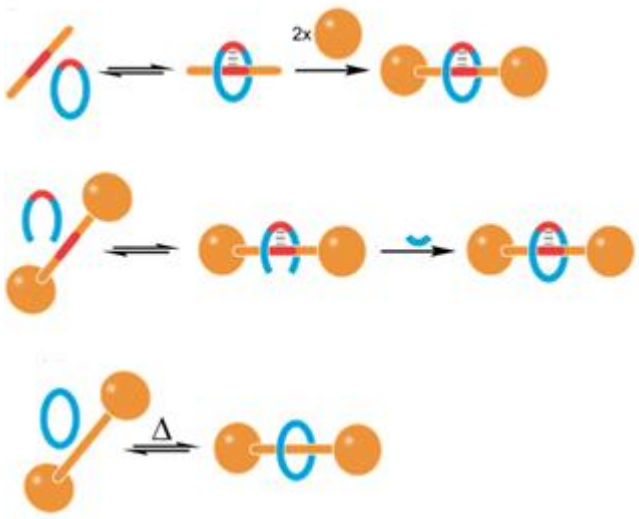
De forma general, se puede establecer que el mecanismo de formación de un complejo de inclusión entre una CD y un huésped se divide en varias etapas [103]. La primera etapa consiste en la aproximación del huésped al anfitrión. A continuación, es necesario que algunas de las moléculas de agua que se encuentran dentro de la cavidad sean expulsadas al medio, este paso implica la rotura de las interacciones de las moléculas de agua con la estructura de la CD; del mismo modo, ha de romperse la capa de solvatación del huésped. El siguiente paso consiste en el establecimiento de interacciones no covalentes entre los sustituyentes de la molécula *guest* con los grupos del portal o cavidad de la ciclodextrina, diferentes estudios han revelado que la formación de enlaces de hidrógeno cobra gran importancia en el nivel de estabilidad del complejo de inclusión formado, desafortunadamente es un proceso extremadamente rápido por lo que las constantes de velocidad de inclusión no pueden ser determinadas. Finalmente, las moléculas de disolvente, generalmente agua, han de reorganizarse en torno a la nueva estructura formada.

La mayor parte de los complejos formados presentan una estequiometría 1:1, es decir, una única molécula huésped es complejada por una ciclodextrina. Sin embargo, en la bibliografía se encuentran también múltiples ejemplos de estequiometrías más complejas; con algunos compuestos aromáticos, azocompuestos o surfactantes de cadena alquílica larga se pueden formar complejos del tipo 2:1, esto implica que la molécula guest es complejada por dos moléculas anfitrión. De forma análoga, una ciclodextrina también es capaz de acomodar en su cavidad a dos moléculas huésped iguales, formación de complejo con estequiometría

1:2, o a dos moléculas huésped diferentes dando lugar a un complejo con estequiometría 1:1:1 (Fig 1).

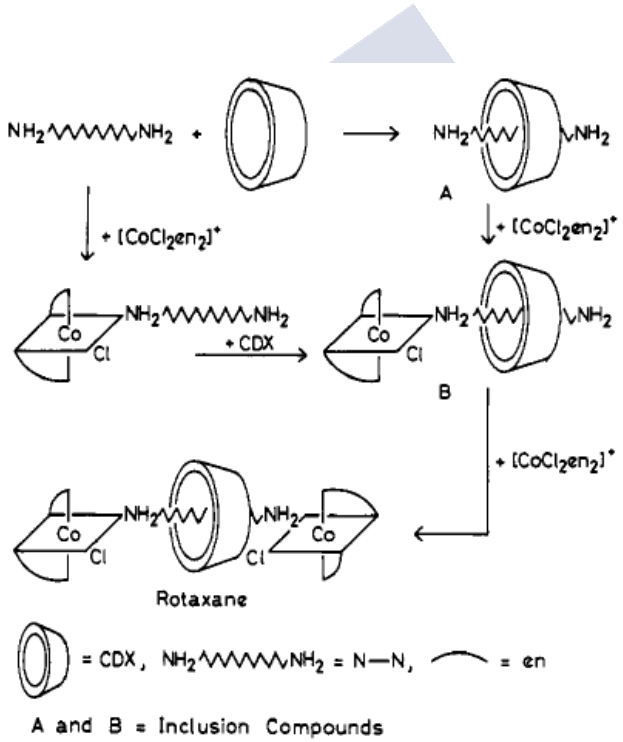
Figura 1. Estructuras de los complejos formados entre ciclodextrinas y sondas según su estequiometría.

Dentro de las estructuras formadas cobra gran importancia la formación de rotaxanos y pseudorotaxanos, estas son estructuras moleculares unidas mecánicamente en la que una molécula eje se inserta en la cavidad de un macrociclo. La obtención de este tipo de estructuras se explica mediante tres mecanismos distintos: (1) inclusión del eje en la cavidad del macrociclo e inmovilización mediante la inclusión de grupos voluminosos en los extremos del eje (2) Inclusión del eje modificado con grupos voluminosos dentro de un macrociclo parcialmente formado que, a continuación se cierra (3) Inclusión del eje en el interior del macrociclo a altas temperaturas (esquema 20) dada la estructura de las ciclodextrinas, el mecanismo de formación la mayoría de rotaxanos basados en ciclodextrinas es el (1).

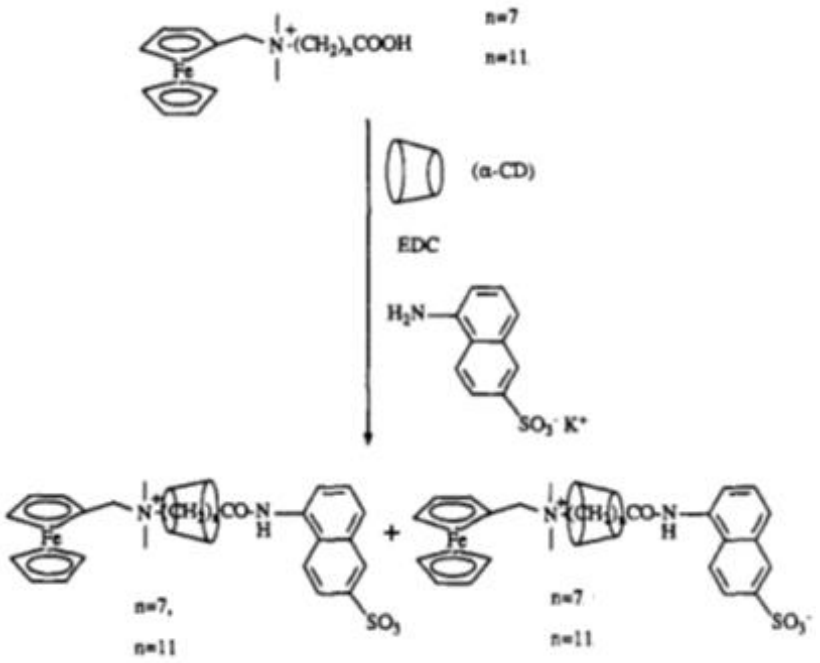


Esquema 20. Mecanismos de formación de rotaxanos.

En 1981 el grupo de Ogino publica por primera vez la formación de un rotaxano usando α y β-CD con un complejo de cobalto que da lugar a los *stoppers* (esquema 21) [104] Este descubrimiento generó un nuevo campo de investigación que condujo a que durante los años posteriores se sintetizaron un amplio número de rotaxanos siguiendo este tipo de reactividad [105], con esta finalidad se emplearon complejos de cobalto con distintos ligandos, hierro o rutenio; dentro de este tipo de rotaxanos cabe destacar la síntesis del rotaxano formado por 1,12-dibromodecano con la vitamina B12 en presencia de α-CD que implica la formación de un enlace Co-C estable. Años más tarde, Isnin y Kaifer sintetizaron el primer rotaxano basado en ciclodextrinas mediante la formación de un enlace amida entre un complejo de hierro y 5-amino-2-naftalenosulfonato sódico (esquema 22) [106] En 1999, el grupo de Easton sintetiza un rotaxano cuyo eje presenta estructura de estilbeno con grupos terminales derivados del 2,4,6-trinitrobenceno, se sintetiza tambien derivados de azobenceno.



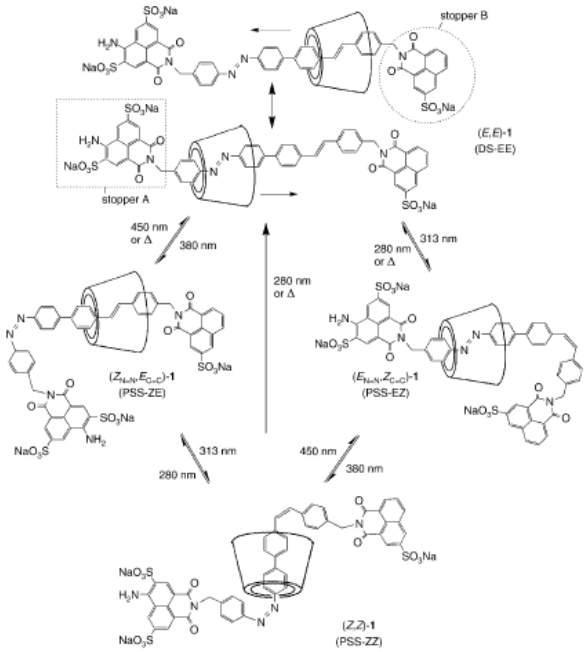
Esquema 21. Síntesis de rotaxano basado en ciclodextrinas usando un complejo de cobalto como precursor de los grupos terminales del eje. Reproducido desde ref 104.



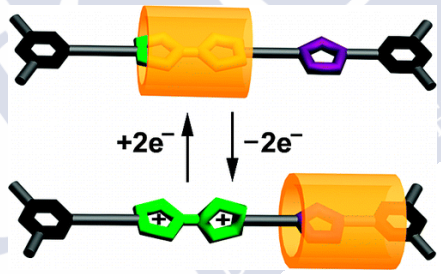
Esquema 22. Síntesis de rotaxano basado en ciclodextrinas usando un complejo de hierro y 5-amino-2-naftalenosulfonato sódico como precursor de los grupos terminales del eje. Reproducido desde ref 106.

Estos primeros descubrimientos abrieron el camino para generar máquinas moleculares, estructuras en las que el eje adopta diferentes conformaciones o propiedades como respuesta a un estímulo externo (temperatura, pH, irradiación de luz…)

Las lanzaderas moleculares son rotaxanos formados por un eje que posee varios sitios de unión y un componente móvil, un macrociclo, que se mueve entre los diferentes sitios de unión. Uno de los ejemplos más representativos de este tipo de máquinas moleculares se encuentra en aquellos en los que el eje posee un grupo azobenceno o estilbeno, la gran ventaja de estos grupos funcionales es que es posible una transformación selectiva de la configuración cis o trans al irradiar la muestra con una longitud de onda adecuada; este cambio en la configuración da lugar al movimiento de la ciclodextrina en torno al eje. Un ejemplo de este tipo de máquinas moleculares fue desarrollado por Qu y colaboradores (esquema 23) generando un sistema en el que es posible controlar la posición de la α-CD mediante la irradiación selectiva del grupo azobenceno o estilbeno. Más recientemente, Stoddart y colaboradores publicaron el desarrollo de una lanzadera mediada mediante una doble oxidación (esquema 24) [105].

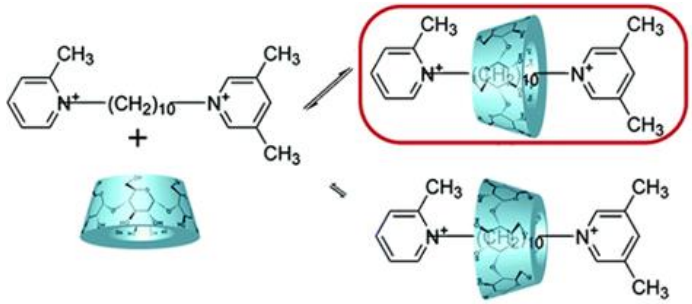


Esquema 23. Lanzadera molecular basada en una ciclodextrina como elemento móvil y un eje con grupos azobenceno y estilbeno. Reproducido con permiso desde ref 105.

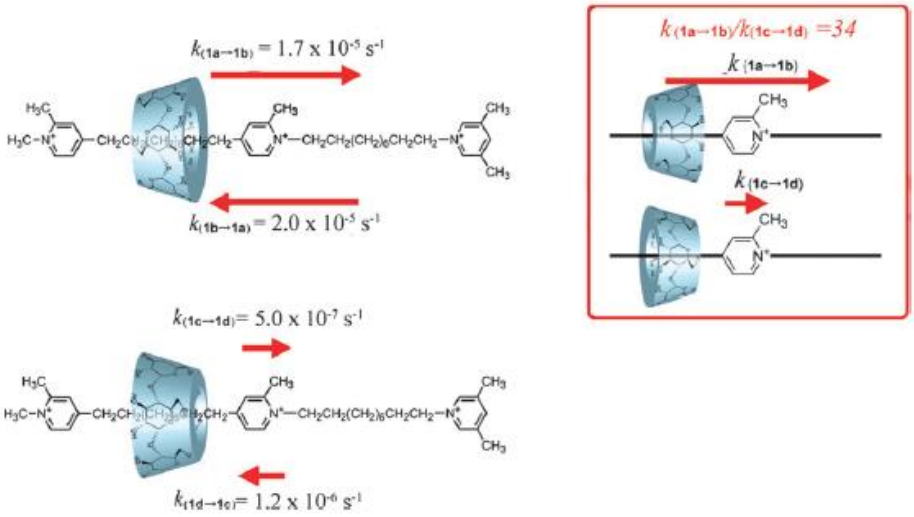


Esquema 24. Lanzadera molecular basada en una reacción redox. Reproducido con permiso de ref 105.

Además del estudio del movimiento de una ciclodextrina entorno a un eje, es posible generar psudorotaxanos en los que el movimiento sea unidireccional en torno al eje. Uno de los ejemplos más representativos de este tipo de máquinas moleculares fue desarrollado por el grupo de Oshikiri y colaboradores al ser capaces de delucidar el mecanismo de formación de este tipo de estructuras con ejes decanometilénicos, usando la técnica de resonancia magnética nuclear es posible la identificación de dos procesos (uno rápido y otro lento) según el portal mediante el cual la ciclodextrina acoge al eje (esquema 25 [107]) Este mismo grupo de investigación fue capaz de extender el sistema mediante un doble eje, el objetivo era estudiar tanto el movimiento del macrociclo como la interacción de este con los anteriores grupos terminales. Especialmente importante es el hecho de que se ha podido determinar las constantes de asociación, disociación y traslación según el portal de entrada (esquema 26 [108]).

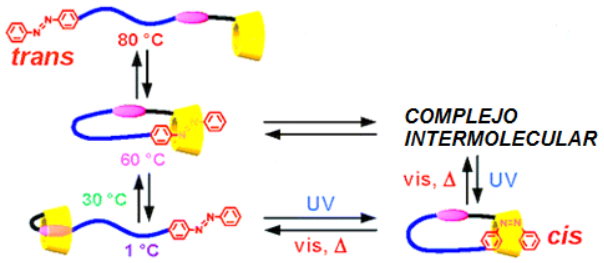


Esquema 25. Maquina molecular formada por ciclodextrinas y un eje decametilénico con especificación del movimiento traslacional. Distinción de un proceso rápido marcado en color rojo y otro lento. Reproducido desde ref 107.



Esquema 26. Maquina molecular formada por ciclodextrinas y un doble eje con especificación del movimiento traslacional. Reproducido desde ref 108.

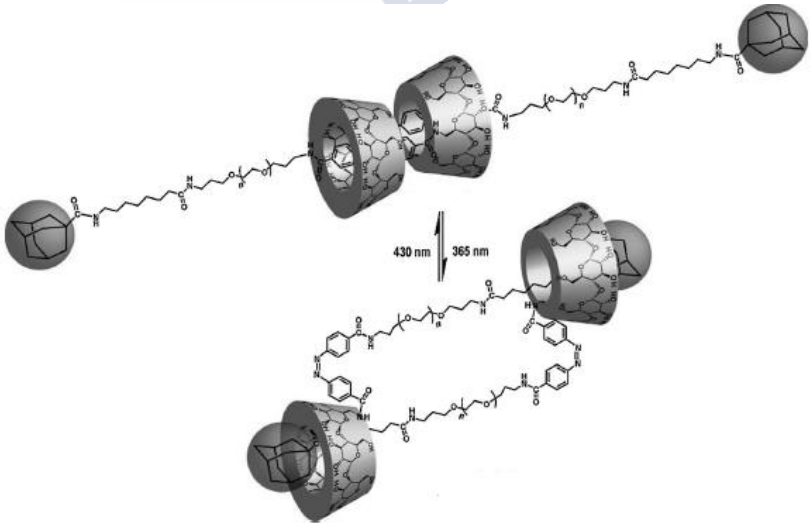
Igualmente, interesante es la formación de [1] rotaxanos, en este tipo de estructuras es necesario que el macrociclo esté funcionalizado con un eje capaz de incluirse dentro de la cavidad mediante un proceso de autoensamblaje intramolecular. El estudio de [1] rotaxanos se centra en conocer la influencia de la longitud de la cadena sobre el proceso de complejación, algunos autores como Inoue sugieren que a medida que aumenta la longitud desciende el valor de la constante de velocidad [109]. El proceso se vuelve especialmente interesante al incluir grupos azobenceno en la cadena, estableciéndose diferentes estructuras según la conformación del azobenceno, la fácil isomerización de este grupo permite la modulación de la estructura mediante la correcta irradiación de la muestra (esquema 27 [110]).



Esquema 27. Control de la conformación de [1]rotaxano de ciclodextrina modificada mediante la temperatura, la irradiación de luz y la concentración (en el equilibrio de complejo intermolecular). Reproducido desde ref 110.

Como último ejemplo de máquinas moleculares basadas en pseudorotaxanos o rotaxanos con ciclodextrinas es necesario mencionar los músculos moleculares. Estos rotaxanos están formados por moléculas con dos partes diferenciadas, parte de la estructura actúa como rotor y otra parte como eje, formándose de esta manera polímeros supramoleculares a partir de complejos de inclusión intermoleculares. Desde que el grupo de Hoshino et al reportaran el primer músculo molecular [111] se ha generado un gran interés de la comunidad científica en este ámbito. De nuevo, la funcionalización de los ejes con grupos isomerizables mediante irradiación de luz destaca en este apartado, un ejemplo es el sistema generado por el grupo de Harada en el que el grupo azobenceno genera sitios de inclusión con y sin respuesta a la irradiación de luz (Esquema 28 [112])

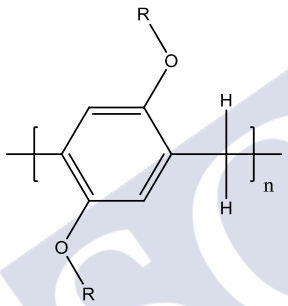
El interés de este tipo de estructuras se amplía en la actualidad mediante la formación de polirotaxanos y polipseudorotaxanos por sus múltiples aplicaciones, especialmente en la formación de geles [105].



Esquema 28. Músculo molecular basado en ciclodextrinas con grupo azobenceno sensible a la isomerización por irradiación de luz. Reproducido desde ref. 112.

1.3 PILARARENOS.

Los pilararenos (esquema 29) son una nueva clase de macrociclos formados por unidades de 1,4-dialcoxibenceno unidas entre sí en posición para a través de puentes metilénicos. Los de cinco unidades fueron descubiertos en 2008 por el grupo de investigación de Tomoki Ogoshi, quien los denomino pilarareno por su arquitectura simétrica en forma de columna o pilar [83]. Un año más tarde, se sintetizaba por primera vez un pilarareno de seis unidades [113]. Desde 2012 hasta la actualidad se han desarrollado múltiples rutas sintéticas para lograr pilararenos con 7-15 unidades [114,115]. De manera general se puede decir que estos macrociclos están formados por entre 5 a 15 unidades de 1,4-dialcoxibenceno, sin embargo, los de cinco unidades son los más estudiados hasta el momento.



Esquema 29. Estructura de pilar[n]areno siendo n=5-15.

1.3.1 Estructura y propiedades.

La inusual simetría de estos macrociclos hace que presenten unas características geométricas y estereoquímicas con gran aplicabilidad en el ámbito del reconocimiento molecular. Su estructura, desde el punto de vista lateral, tiene una arquitectura en forma de pilar, esto hace que estos macrociclos sean altamente simétricos y rígidos. Desde una vista superior, los pilararenos presentan la estructura del polígono correspondiente a su número de unidades, por ejemplo, el pilar[5]areno presenta una estructura en forma de pentágono regular (Figura 2).

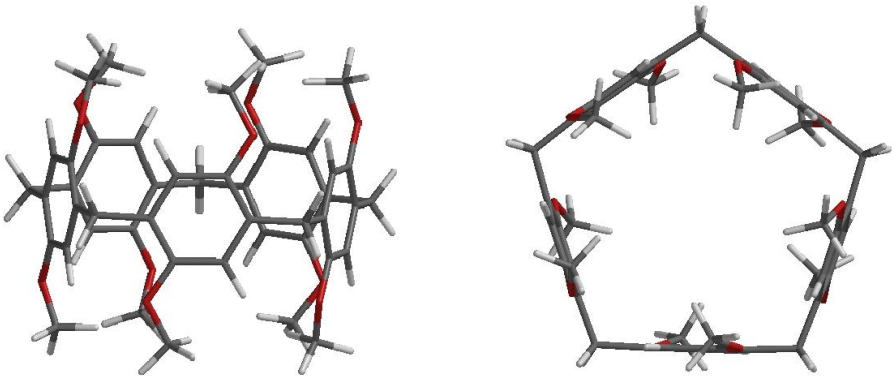


Figura 2. (Izquierda) Vista lateral de un pilar[5]areno. (Derecha) Vista superior de un pilar[5]areno.

El estudio de las características estructurales de los nuevos macrociclos es extremadamente importante ya que, de ellas dependerán las propiedades del mismo en la formación de complejos anfitrión: huésped. A diferencia de otros macrociclos, como por ejemplo los calixarenos, los pilararenos presentan una cavidad simétrica y única; en el caso de los calixarenos los puentes en posición *meta* hacen que la estructura sea en forma de copa o canasta. Mediante la técnica de cristalografía de Rayos X se ha podido determinar que para pilar[5]arenos el ángulo formado por el enlace carbono-carbono del puente metileno oscila entre 108º y 111º según el tipo de sustituyentes de los portales. Este valor es muy parecido al de un enlace carbono-carbono del tipo sp^3 (109º) o al calculado para el ángulo interno de un pentágono regular (108º), razón por la que los pilararenos de cinco unidades muestran una mayor estabilidad conformacional y, sean más fácilmente sintetizables que sus homólogos de seis o siete unidades.

Otra de las características de los pilararenos es su cavidad hidrofóbica y altamente rica en electrones; esta densidad electrónica los convierte en los anfitriones perfectos ante moléculas neutras o con deficiencia electrónica. Los alcanos lineales con grupos amina, amonio, nitrilo o haluro presentan una gran afinidad con los pilararenos; del mismo modo es altamente favorable la formación de complejos de inclusión con compuestos aromáticos como por ejemplo derivados de viológeno o piridinio. Diversos estudios basados en el radio de van der Waals [83,116,117] han determinado que el diámetro interno del pilar[5]areno es aproximadamente 5.6Å , este valor es equivalente a la cavidad del cucurbit[6]uril (5.8Å) [118] o α-ciclodextrina (4.7Å a 5.3Å) [87]; el diametro externo calculado es aproximadamente 6.7Å (Figura 3) Por otro lado, los perfiles de potencial electrostático para pilar[5]arenos funcionalizados con cadenas alquílicas muestran que la superficie de la cavidad es inerte, esto es debido a que los grupos alcoxi de ambos portales actúan como donadores de electrones. La densidad π-electrónica en los pilararenos (figura 4) está altamente favorecida por sus características estructurales, siendo esta una de las principales diferencias de los pilararenos con respecto a los calixarenos cuya estructura, en forma de cono, es más abierta.

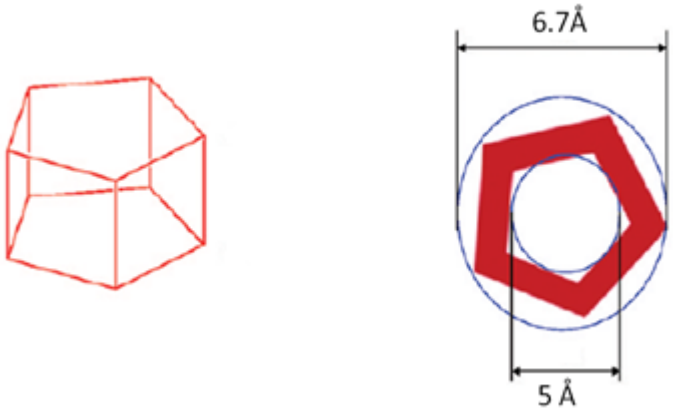


Figura 3. Estructura de pilar[5]areno y determinación del radio interno y externo.

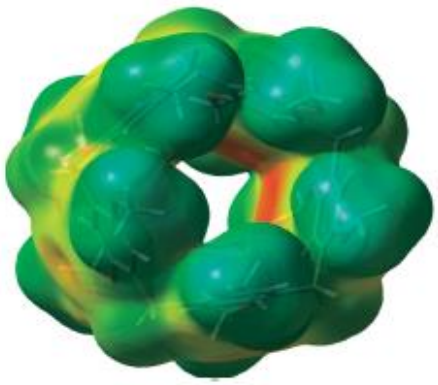


Figura 4. Perfil de potencial electrostático de pilar[5]areno con cadenas metilénicas como grupo funcional de ambos portales. El color azul muestra las zonas con más deficiencia electrónica mientras que el naranja señala las zonas más ricas electronicamente.

Otra de las características propias de los pilar[5]arenos, y que lo distinguen del resto de macrociclos, es su quiralidad planar dada por la posición de los sustituyentes. Las unidades pueden rotar entorno al eje formado por los puentes metileno dando lugar a ocho estereoisómeros conformacionales: cuatro diasteoisómeros por dos enantiómeros (figura 5) Mediante estudios de ^{1}H-RMN dinámico se demuestra que estos estereoisómeros se intercombierten entre sí por la rotación de las unidades fenólicas entorno al eje; para aislar a los confórmeros es necesario inhibir la rotación. Actualmente existen dos estrategias para lograrlo, la primera consiste en sintetizar pilararenos con grupos muy voluminosa en ambos portales y, la segunda, en la introducción de una sonda en la cavidad del pilarareno para que actúe como agente de ``frenado´´ [119–121].

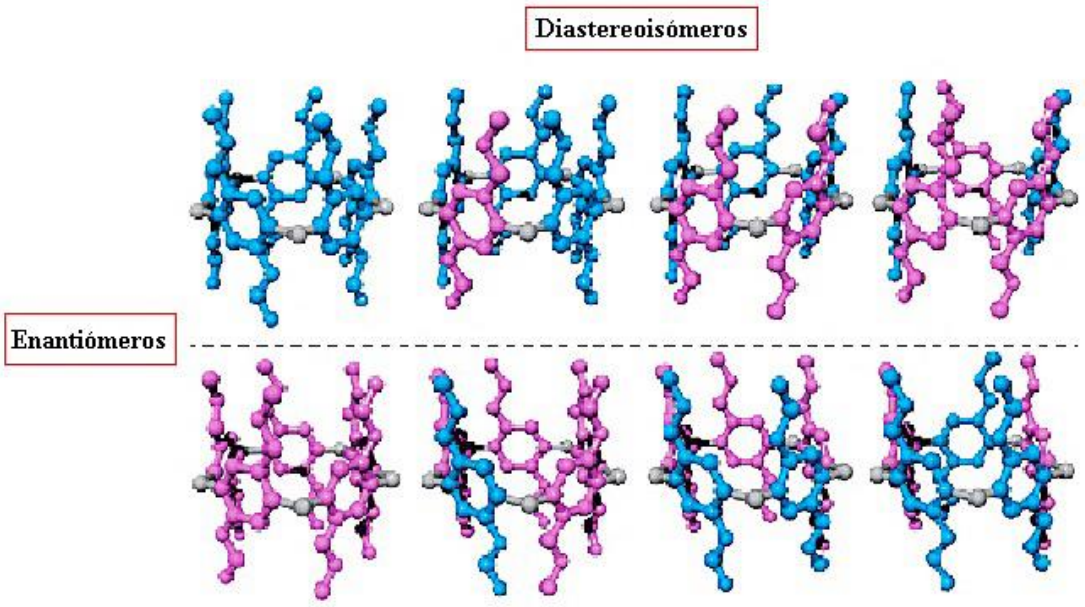
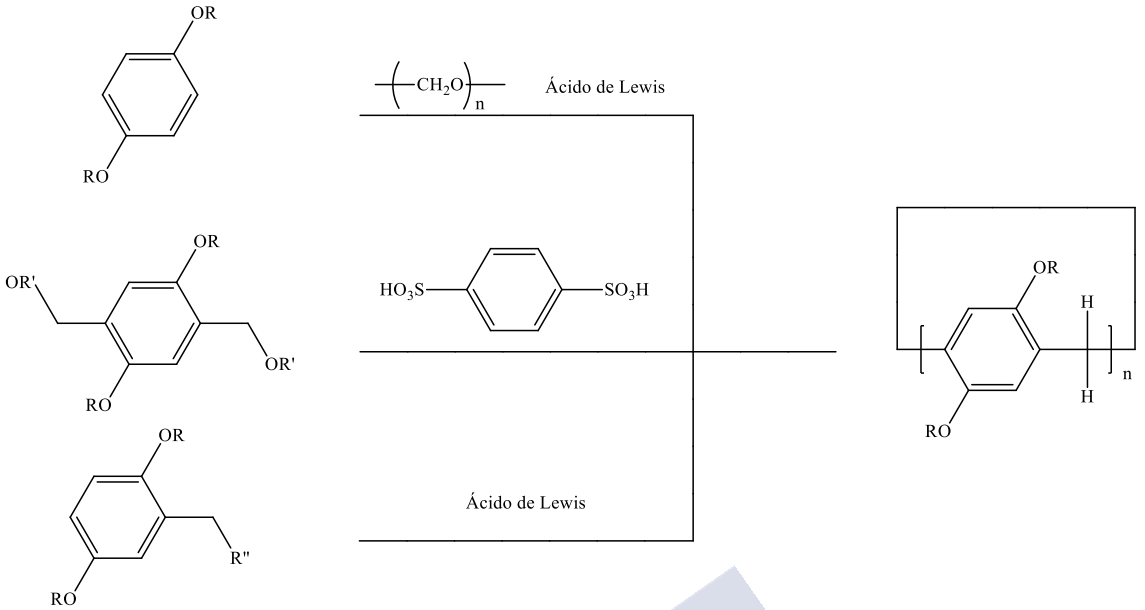


Figura 5. Estructura de los ocho estereoisómeros del pilar[5]areno indicando en color rosa la unidad que ha girado sobre el puente metilo y en azul las unidades que no han rotado.

Dada su estructura, los pilararenos son altamente solubles en medio orgánico lo que supone una buena alternativa a ciclodextrinas y cucurbiturilos (macrociclos que solo son solubles en agua) Cabe destacar que con la correcta funcionalización es posible sintetizar pilararenos solubles en medio acuoso. Afortunadamente, es posible una funcionalización versátil, los pilar[5]arenos pueden acomodar diez sustituyentes de forma selectiva lo que hace especialmente interesante el desarrollo de múltiples estrategias sintéticas. Estas modificaciones hacen que estos macrociclos puedan sufrir procesos de autoensanblaje dando lugar a pseudorotaxanos y rotaxanos [122], polímeros [123] y otros materiales de interés [124]. Además, participan en procesos de liberación de fármacos [125], separación de compuestos en mezclas complejas [126]…

1.3.2 Síntesis y funcionalización de pilararenos.

La principal ruta sintética en la obtención de pilararenos tiene como reacción principal la alquilación de Friedel-Crafts, en este tipo de reacción un derivado fenólico (el 1,4-dialcoxibenceno de interés) y el paraformaldehído condensan mediante un ácido, ya sea orgánico o de Lewis, actúa como catalizador dando lugar a un carbocatión. A continuación, el carbocatión generado reacciona con otro derivado fenólico generando un puente metileno que une a las dos unidades (esquema 30, ruta 1).



Esquema 30. Principales rutas sintéticas para la generación de pilar[n]arenos siendo R'= alquilo o bencilo, R'' = -OH, Br y n=5,6 ó 7.

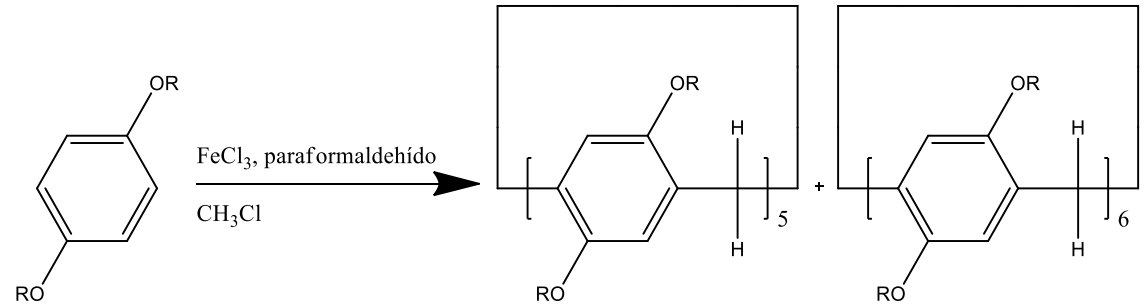
En la primera síntesis de pilararenos [83] se usaron múltiples ácidos de Lewis (H_2SO_4, $TiCl_4$, $FeCl_3$, $SnCl_4$, $AlCl_3$…) dándose los mejores resultados con el uso de $BF_3.O(C_2H_5)_2$ obteniéndose un pilararenо de cinco unidades con un rendimiento del 22%, la síntesis tuvo lugar a temperatura ambiente y con un tiempo de reacción optimizado de 3 horas. El grupo de Ogoshi, desarrolló varias rutas sintéticas con el objetivo de obtener derivados de pilararenos con diferentes combinaciones de grupos alquílicos en ambos portales, mediante estas series se pudo concluir que la longitud de los sustituyentes es un parámetro clave en el proceso de ciclación, las cadenas más largas tienden a impedir la reacción por motivos estéricos [120]. Finalmente, este mismo grupo consiguió sintetizar un dimetoxipilar[5]areno con un 70% de rendimiento, la reacción se llevó a cabo usando tres equivalentes de paraformaldehído sobre uno de 1,4-dimetoxibenceno, a temperatura ambiente y con un tiempo de reacción optimizado de 3 minutos [116].

En las rutas 2 y 3 del esquema 30 se plantean dos metodologías sintéticas en las que se usan ácidos orgánicos (ácido *p*-toluensulfónico) o ácidos de Lewis como catalizadores, siendo la principal diferencia, con respecto a la ruta 1, los monómeros de partida (2,5-alcoxibencilobromuros, 2,5-alcoxibenciloalcoholes o 1,4-dialcoxi-2,5-bis(alcoximetil)bencenos), los rendimientos en las rutas 2 y 3 son ligeramente superiores a los obtenidos en la ruta 1 [127].

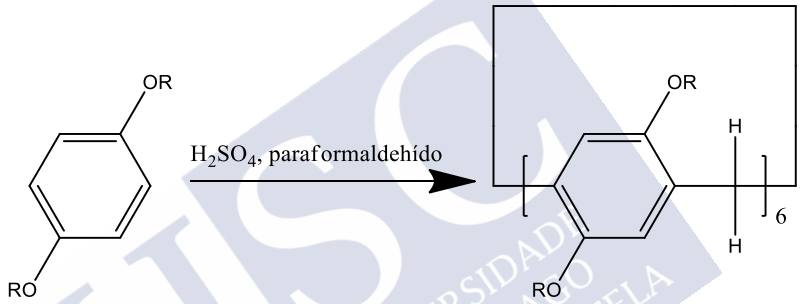
En la bibliografía también se encuentran vías sintéticas que conducen a pilar[5]arenos asimétricos, uno de los primeros ejemplos fue el obtenido mediante la condensación de monómeros no simétricos (1-etoxi-4-metoxibenceno o 1-butoxi-4-metoxibenceno). [119,128]

El grupo de Cao y colaboradores desarrolló la primera síntesis de pilar[6]arenos usando $FeCl_3$ como catalizador, la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente y en un tiempo de reacción optimizado de 2-3 horas según el tipo de sustitución, los rendimientos son del 30-40 % (Esquema 31) [129] Años más tarde, el grupo de Zyryanov desarrolló una ruta sintética de

pilar[6]arenos sin uso de disolvente, la reacción es llevada a cabo con 1,4-dialcoxibenceno y paraformaldehído usando H_2SO_4 como catalizador, el rendimiento obtenido fue de 80% (Esquema 32) [130].

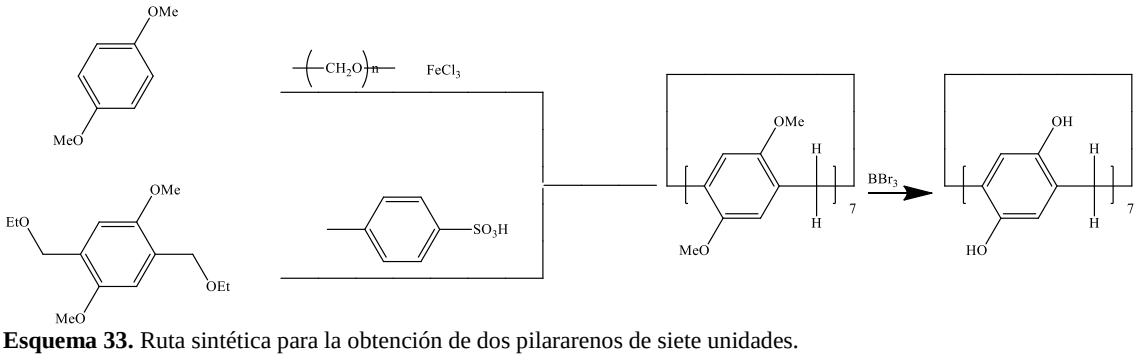


Esquema 31. Ruta sintética para la obtención de pilarareno de seis unidades siendo n= etilo, propilo, butilo, hexilo, octilo o metilo.



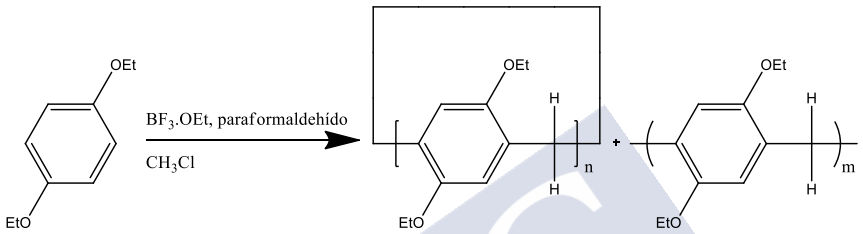
Esquema 32. Ruta sintética para la obtención de pilarareno de seis unidades sin uso de disolvente siendo R = C_2H_5, C_3H_7, C_4H_9, 2-etilo, hexilo o C_7H_{15}.

El grupo de Huang sintetiza uno de los primeros pilar[7]arenos, en concreto el 1,4-bis(n-propoxi)pilar[7]areno, mediante la condensación de 1,4-di(n-prppoxi)-2,5-bis(metoximetil)benceno con el ácido *p*-toluensulfónico actuando como catalizador. El grupo de Cao desarrolla la síntesis de dimetoxipilar[7]areno a partir de dos rutas sintéticas (esquema 33), la primera ruta consiste en la condensación de 1,4-dimetoxibenceno con paraformaldehído y, la segunda, en la condensación de 2,5-bis(bencilometil)-1,4-dimetoxibenceno; el producto obtenido de ambas síntesis es tratado con BBr_3 para la obtención del dihidroxipilar[7]areno [115].



Esquema 33. Ruta sintética para la obtención de dos pilararenos de siete unidades.

La síntesis de pilararenos más grandes, de 8 a 10 unidades, fue descrita por el grupo de Li; la reacción de 1,4-dietoxibenceno con paraformaldehído con BF_3.OEt actuando como ácido conduce a la formación de una mezcla de pilararenos (esquema 34) El análisis mediante Rayos X de las muestras obtenidas permitió esclarecer que en el caso de pilar[n]arenos con n=8-10 la estructura se transforma dando lugar a dos cavidades (Figura 6) [131] El grupo de Ogoshi determinó que el pilar[5]areno puede transformarse en pilararenos superiores mediante control cinético, es por tanto de vital importancia tanto el tiempo como la temperatura de reacción [114]. Desafortunadamente, los rendimientos obtenidos en la síntesis de pilararenos grandes es muy bajo, en todos los casos inferior al 5%.



Esquema 34. Síntesis de pilar[n]areno siendo n=5-10 y m el número de unidades del polímero.

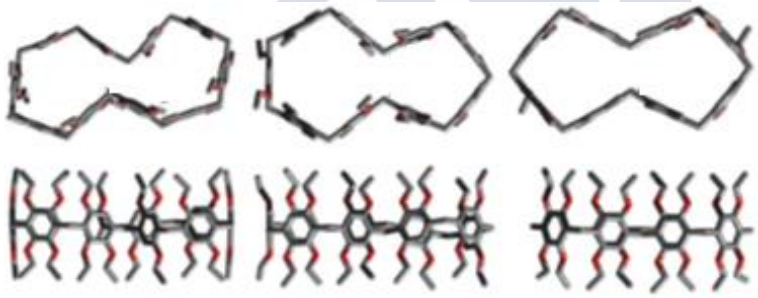
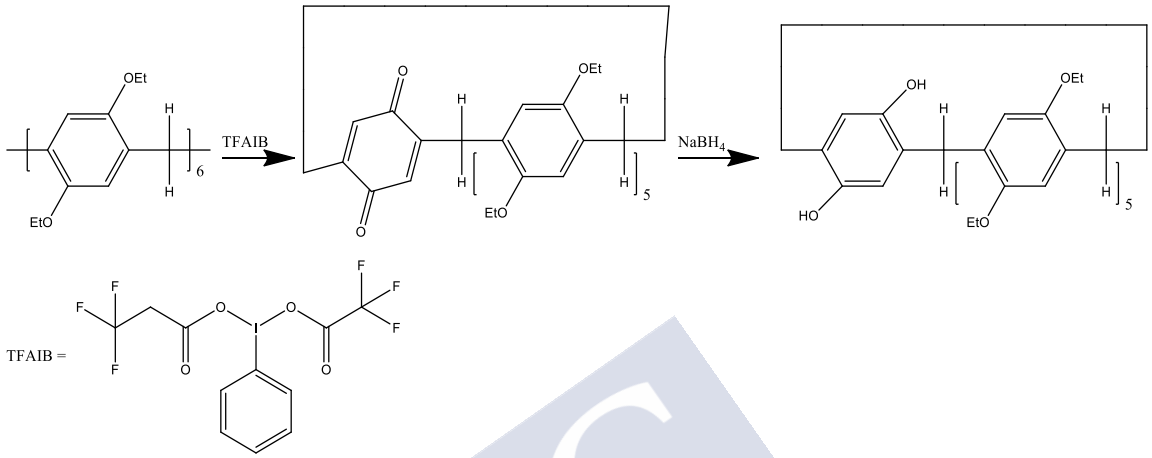


Figura 6. Estructura y vista superior lateral de pilar[8]areno, pilar[9]areno y pilar[10]areno. Reproducido desde ref 131.

Además de pilararenos es posible la síntesis de copilararenos, es decir, pilararenos con diferentes unidades. El grupo de Huang desarrolló una ruta sintética para su obtención basada en la ciclooligomerización de dos unidades, 1,4-dimetoxibenceno y 1,4-dibutoxibenceno. El número de unidades en el producto final se modifica mediante la variación de proporción de monómeros de los reactivos [132]. La desventaja de este tipo de reacciones radica en la obtención de numerosos productos secundarios.

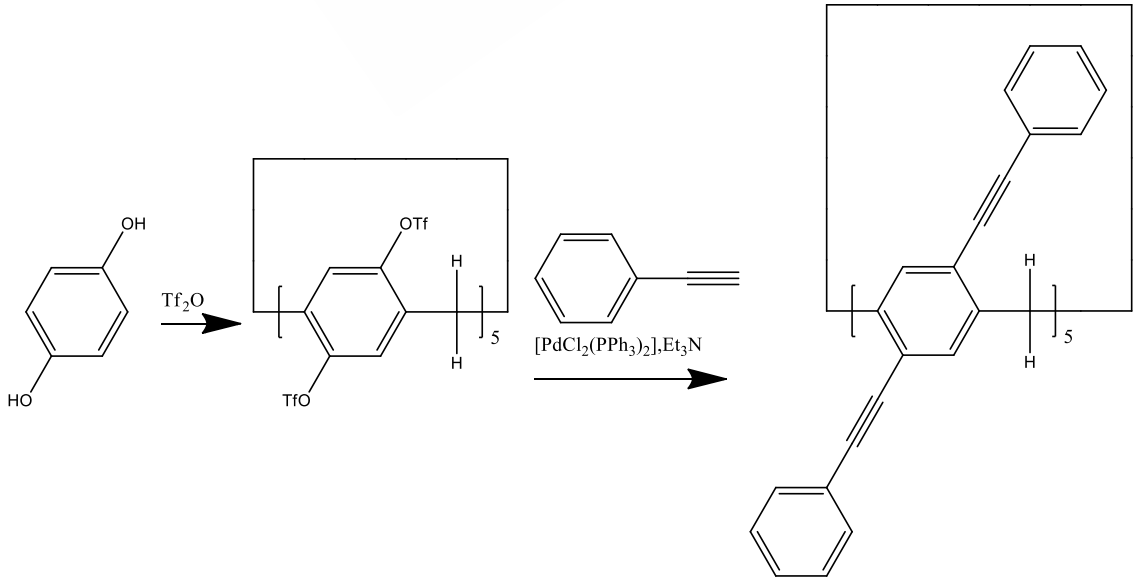
La funcionalización de cualquier macrociclo es un aspecto tremendamente importante ya que, se pueden variar tanto las propiedades físicas como la solubilidad del mismo. Con el objetivo de usar los pilararenos en el ámbito de la química supramolecular se han desarrollado múltiples rutas sintéticas que permitan la obtención de pilararenos compatibles con diferentes sondas. De forma general, los pilararenos con sustituyentes alquilo se forman directamente a partir de los monómeros de partida; una vez ciclado, se lleva a cabo la funcionalización de los mismos. Una de las funcionalizaciones más recurrentes es la desalquilación de un alcoxipilarareno usando BBr_3 para obtener un compuesto perhidroxilado, este nuevo grupo funcional es altamente reactivo lo que permite el diseño de numerosas rutas sintéticas, un

ejemplo es la eterificación del pilarareno. Otra de las funcionalizaciones más recurrentes es la oxidación de grupos alcoxi, el grupo de Ogoshi prepara di- y tetrapilar[n]arenos funcionalizados mediante una oxidación catalizada por [bis(trifluoroacetoxi)iodo]benceno (TFAIB) y posterior reducción con $NaBH_4$ (esquema 35) [133].



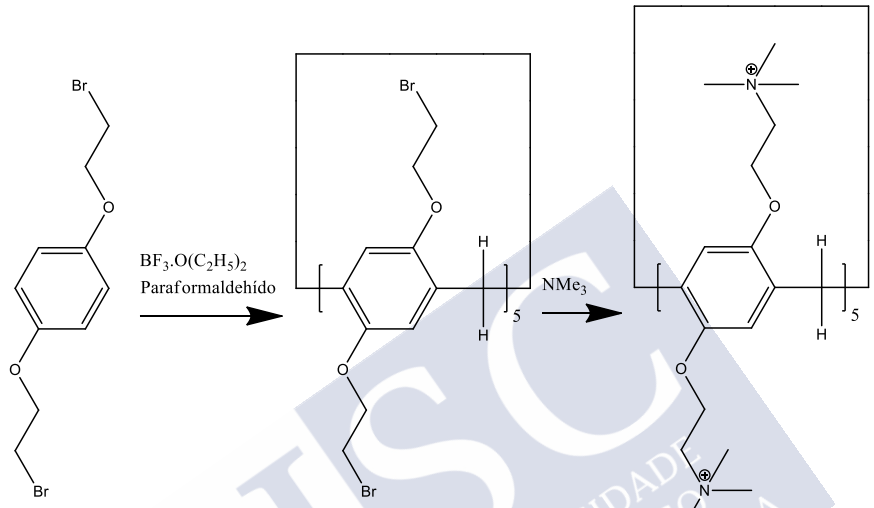
Esquema 35. Obtención de pilar[6]areno modificado mediante oxidación con TFAIB y posterior reducción con $NaBH_4$.

Otra posible modificación es la modificación mediante acoplamientos cruzados catalizados por paladio. Un ejemplo de este tipo de reactividad se encuentra en el pilarareno fluorescente sintetizado por Ogoshi vía acoplamiento de Sonogashira (esquema 36) [134], el rendimiento cuántico depende de la temperatura y el disolvente. Además, este pilarareno es capaz de formar complejos de inclusión con moléculas con deficiencia electrónica dada su amplia superficie π. Este es uno de los muchos ejemplos en los que una modificación del pilarareno cambia las propiedades del macrociclo haciéndolo fluorescente [135].

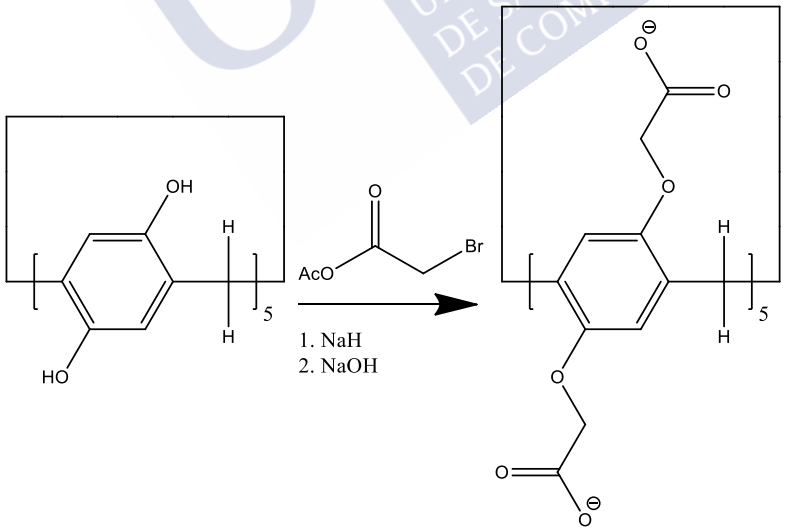


Esquema 36. Síntesis de un pilar[5]areno fluorescente mediante acoplamiento de Sonogashira.

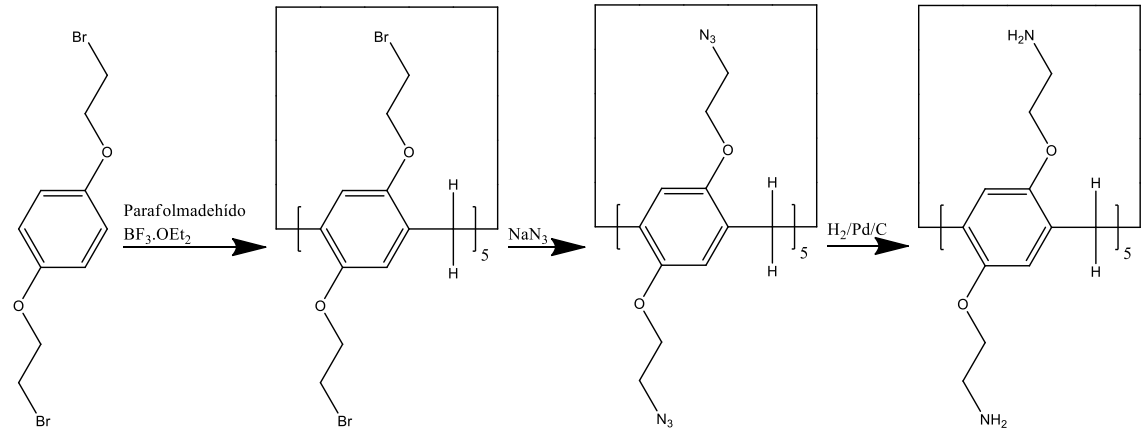
La principal desventaja de los pilararenos mencionados anteriormente es su insolubilidad en agua, dado que la mayor parte de los procesos biológicos tienen lugar en medio acuoso, es de vital importancia la obtención de pilararenos solubles en este medio. Mediante modificaciones, será posible utilizarlos como modelos que imiten procesos naturales como por ejemplo, el reconocimiento molecular o reacciones químicas catalizadas por enzimas. Con este propósito, se han desarrollado estrategias sintéticas para introducir grupos hidrofílicos iónicos, ya sean catiónicos (esquema 37) [136] o iónicos (esquema 38) [137]; o neutros (esquema 39) [138].



Esquema 37. Síntesis de un pilar[5]areno catiónico.



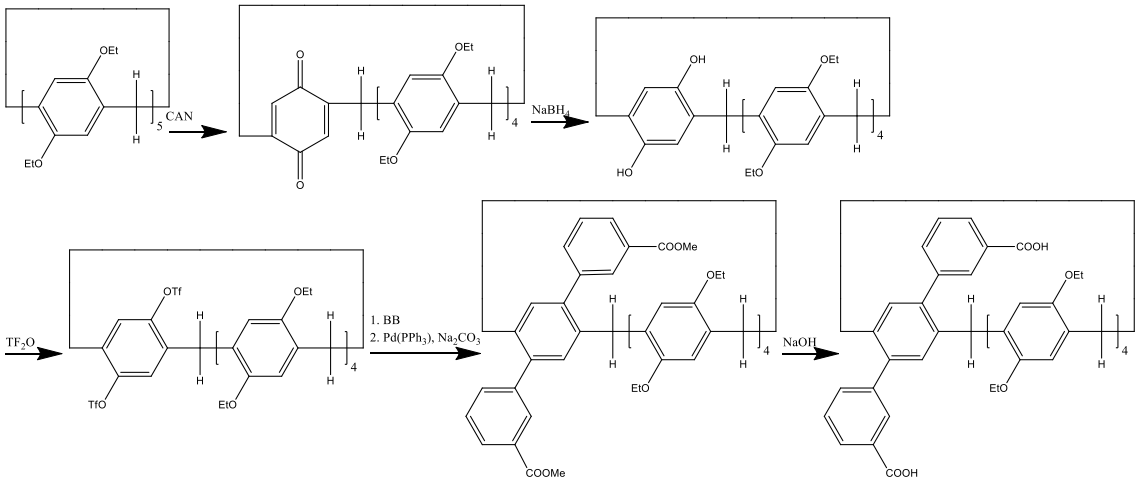
Esquema 38. Síntesis de pilar[5]aniónico.



Esquema 39. Síntesis de pilar[5]neutro.

El desarrollo de esta nueva metodología permite sintetizar pilararenos con interesantes propiedades, un ejemplo es el pilar[5]areno con funcionalización de diez grupos óxido de tri(etileno), este macrociclo es soluble en agua en el rango de 25 a 45ºC, a partir de esta temperatura disminuye su temperatura de disolución critica dado su carácter anfifílico [139]. Otros pilararenos, como los que contienen bromo como sustituyente, funcionan como intermediarios en múltiples vías sintéticas; la reacción de estos intermedios con 1-metilimidazol [140] , piridina [141] o tributilfosfina [142] permitió la obtención de pilararenos catiónicos. Otro ejemplo de intermedio lo encontramos en aquellos pilararenos con sustituyentes azidas ya que, permiten la síntesis de pilararenos dentríticos mediante reacciones de ``*click´´*, estos macrociclos son especialmente interesantes por las interacciones que pueden establecer con el ADN [143].

Por último, además de la sustitución total de los grupos es posible una mono-, di-, tetra- y pentasustitución, con este objetivo se han diseñado varias rutas sintéticas (ciclación de monómeros diferentes, desprotección regioselectiva…) un ejemplo de este tipo de funcionalización se detalla en el esquema 40 [144].



Esquema 40. Síntesis de pilar[5]areno monofuncionalizado siendo BB el ácido 3-(metoxicarbonil)fenilborico y CAN $[(NH_4)_2\ Ce(NO_3)_6]$.

1.3.3 Propiedades host-guest de pilararenos.

Esta nueva clase de macrociclos, los pilar[n]arenos ya han sido reconocidos como buenos candidatos para actuar como receptores moleculares. Su rigidez y simetría hacen que sean más selectivos a la hora de complejar huéspedes frente a otros macrociclos clásicos como calixarenos o éteres corona. Además, los pilararenos son solubles en diferentes disolventes orgánicos ya que su fácil funcionalización permite generar pilararenos específicos para un *guest*, esto hace que el proceso sea mucho más preciso que con el uso de ciclodextrinas o cucurbiturilos, por ejemplo. Cabe destacar, que tal y como se explica en el apartado 1.3.2 de este capítulo, con la correcta funcionalización es posible la obtención de pilararenos solubles en agua, hecho extremadamente importante para el estudio de sistemas biológicos. Las interacciones entre los pilararenos y las moléculas huéspedes son fundamentalmente hidrofóbicas y electrostáticas dado el carácter electrodonador de la cavidad de estos macrociclos. Por esta razón, los pilararenos pueden establecer interacciones con moléculas catiónicas, iónicas o neutras.

1.3.3.1 Guest catiónicos

El estudio de formación de complejos de inclusión entre los pilararenos y moléculas catiónicas es un proceso ampliamente estudiado; generando gran interés el estudio de huéspedes con sistemas heterocíclicos de nitrógeno por la posibilidad de interacciones del tipo electrostático. El grupo de Ogoshi estudió por primera vez la interacción entre un pilarareno (P5OMe en figura 8) y huéspedes catiónicos, los *guest* seleccionados fueron derivados del viológeno y piridinio [83] (G1 y G2 en figura 9), concluyendo que se formaban en los dos casos complejos de inclusión con estequiometría 1:1. El mismo estudio con adamantino no resultó satisfactorio ya que no se formaban complejos de inclusión con P5OMe. El grupo de Li demostró años más tarde que los cationes de adamantano tenían una alta afinidad por P7OEt frente a los pilararenos equivalentes de cinco y seis unidades; determinaron que se formaban complejos de inclusión con estequiometría 1:1 con constantes de equilibrio de $(3.1 \pm 0.5) \times 10^3 M^{-1}$, $(1.9 \pm 0.3) \times 10^4 M^{-1}$ y $(1.2 \pm 0.3) \times 10^5 M^{-1}$ para pilarareno con 5, 6 y 7 unidades, respectivamente [145]. Este mismo grupo estudió la formación de complejos de inclusión entre P5OH (figura 8) y, como sondas, derivados piridinicos (G1) y derivados dicationes bis(imidazolio) (G3); llegando a la conclusión de que se formaban dos tipos de complejos. Entre P5OH y los derivados alquílicos de G1 se forman complejos con estequiometría 2:1 mientras que, con los derivados de G3 se forman complejos 1:1 del tipo pseudorotaxano [146]. El grupo de Huang estudió también la formación de complejos de inclusión con derivados de G3, en esta ocasión el pilarareno seleccionado es P6OH (figura 8); observando la formación de complejos de inclusión con estequiometría 1:1 en forma de [2]psudorotaxanos [147].

Uno de los cationes que más interés ha despertado son los derivados de sales de amonio, se ha estudiado la interacción de sales de amonio secundarias (G4, figura 8) con P5OMe y P5DP (figura 9) determinándose la formación en los dos casos de complejos con estequiometría 1:1 en forma de [2]pseudorotaxano, las constantes de asociación calculadas son $K = (1.09 \pm 0.31) \times 10^3 M^{-1}$ y $K = (2.40 \pm 0.20) \times 10^3 M^{-1}$ respectivamente. A partir de esta comparación, se puede concluir que el aumento de la constante con P5DP como macrociclo radica en las nuevas fuerzas de Van der Waals entre los grupos propilo del P5DP y la cadena carbonada del *guest* [148]. Las sales de amonio terciarias también se han estudiado (G5, figura 8), usando como host el PnDIB (figura 9), se ha determinado que con P5DIB no se forma ningún complejo mientras que, con P6DIB se forma un complejo con estequiometría 1:1 y constante de equilibrio $K = 334 \pm 24\ M^{-1}$ [117]. Cabe destacar que las sales de amonio secundarias han sido ampliamente utilizadas para estudiar la capacidad de pilararenos no simétricos, un ejemplo de este tipo de sistemas se encuentra en la formación de complejos 1:1 entre G5 y P5OMe-OH (figura 9) por la interacción catión-π de ambas moléculas, siendo la constante de equilibrio $K = 780 \pm 110\ M^{-1}$ [149]. Otro ejemplo curioso, es la formación de complejos de inclusión con el dímero de pilarareno P5D (figura 9) y G5, dando lugar a complejos con una nueva estequiometría 1:2 [150].

El grupo de Wang estudió la interacción entre P5OBu (figura 9) y G6 (figura 8) encontrando diferencias significativas entre el ferroceno y su forma reducida; la constante de asociación entre P5OBu y la forma reducida del ferroceno es significativamente más débil que la constante de asociación entre P5OBu y G6 siendo las constantes $K = 18 \pm 0.5\ M^{-1}$ y $K = (2.0 \pm 0.1) \times 10^4\ M^{-1}$, respectivamente [151]. Por último, el grupo de Li descubre un nuevo modo de complejación estudiando a G7 (figura 8), por primera vez en la bibliografía se reporta la complejación mediante una transferencia de carga entre la sonda y el P6OEt; en este caso el tamaño de la cavidad cobra un importante papel ya que, la complejación con P5OEt no es posible por el reducido tamaño del macrociclo y, en el caso de P7OEt tampoco es posible dado su gran tamaño [152].

El grupo de Huang realizó un interesante estudio con un derivado de azobenceno (G8, figura 8) y P6OPr (figura 9), la forma trans de G8 se incluye en la cavidad del macrociclo con una constante de equilibrio de $K = (2.22 \pm 0.34) \times 10^3\ M^{-1}$; una vez formado se irradia el sistema a 365 nm por lo que la estructura de G8 se modifica de trans a cis; este cambio en la configuración provoca un desplazamiento de G8 hacia el exterior dando lugar a un complejo externo. Cuando la concentración es lo suficientemente alta, es decir, cuando se supera la concentración de agregación crítica ($1.68 \times 10^{-4} M$) se forman agregados supramoleculares en forma de micela (Figura 7) [153].

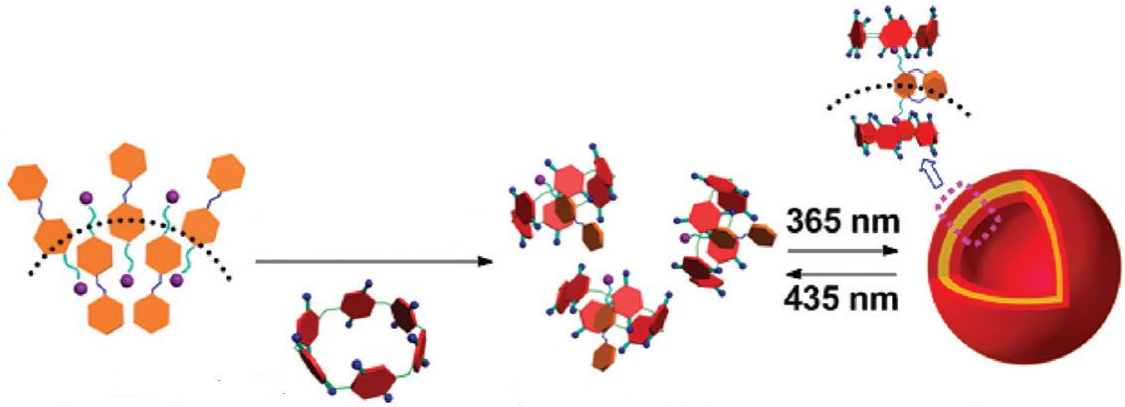


Figura 7. Mecanismo de formación de vesícula. Trans-G8 en disolución que forma complejos de inclusión con P6OPr. Equilibrio entre complejos de inclusión y vesícula mediante irradiación. Reproducido con permiso de ref 153.

En la actualidad, ha cobrado gran importancia la detección y cuantificación de iones ya que presentan importantes roles en varios procesos biológicos. El hierro, por ejemplo, participa en el transporte de oxígeno, transferencia de electrones y catálisis enzimática; la deficiencia o la sobreproducción del hierro puede conducir a enfermedades como la anemia, Parkinson, Alzheimer o cáncer. Por ello, se ha diseñado un pilarareno con derivados de quinolinas selectivo a iones Fe^{+3} frente a otros metales como Na^{+}, K^{+}, Ca^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}, Fe^{+2}, Co^{+2}, Ni^{+2}, Cu^{+2} o Zn^{+2}. La gran ventaja de este sistema es que, se pueden realizar experimentos competitivos con otro ión, el F^{-}, permitiendo la cuantificación del fluoruro mediante un experimento competitivo en el que se forma $[FeF_6]^{3-}$ quedando el P5Q libre en disolución [154]. Del mismo modo, se sintetizan pilararenos específicos para la detección de Na^{+}, K^{+}, Cs^{+} y Pb^{+2} , formándose complejos con estequiometría 1:1 y cuyos log de K_a varían entre 2.0 y 4.8 [155]. Como último ejemplo de catión, cabe destacar la determinación de Au^{+3} ya que este metal pesado se ha utilizado en numerosos estudios ambientales, de agentes cancerígenos, de nanomateriales… al igual que en los casos anteriores, se diseña un pilarareno específico dando lugar a un complejo de estequiometría 2:1. La selectividad del pilarareno se justifica mediante su falta de interación con otros cationes típicos: Ag^{+}, Al^{+3}, Ba^{+2}, Bi^{+}, Ca^{+2}, Cd^{+2}, Co^{+3}, Cs^{+}, Cu^{+2}, Fe^{+2}, Fe^{+3}, Hg^{+2}, K^{+}, Li^{+}, Mg^{+2}, Na^{+}, Pb^{+2}, Sb^{+2}, Sn^{+2}, Sr^{+2} o Ni^{+2} [156].

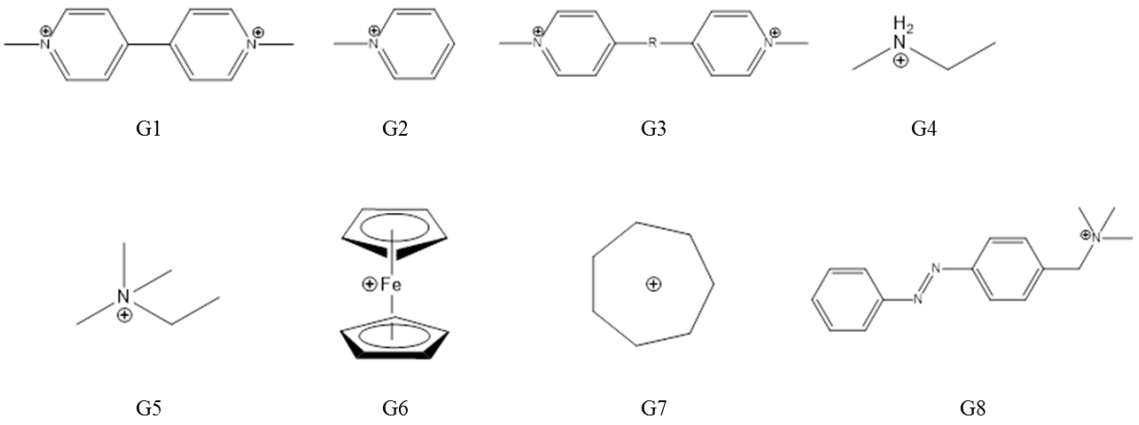


Figura 8. Estructura de huéspedes G1 a G8.

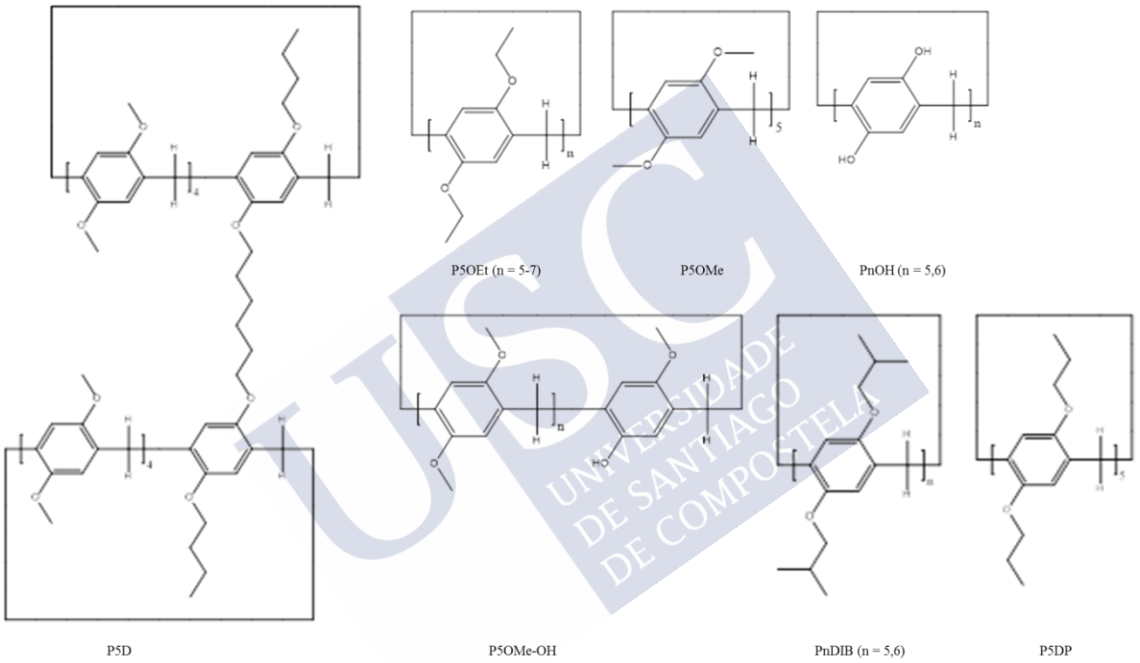


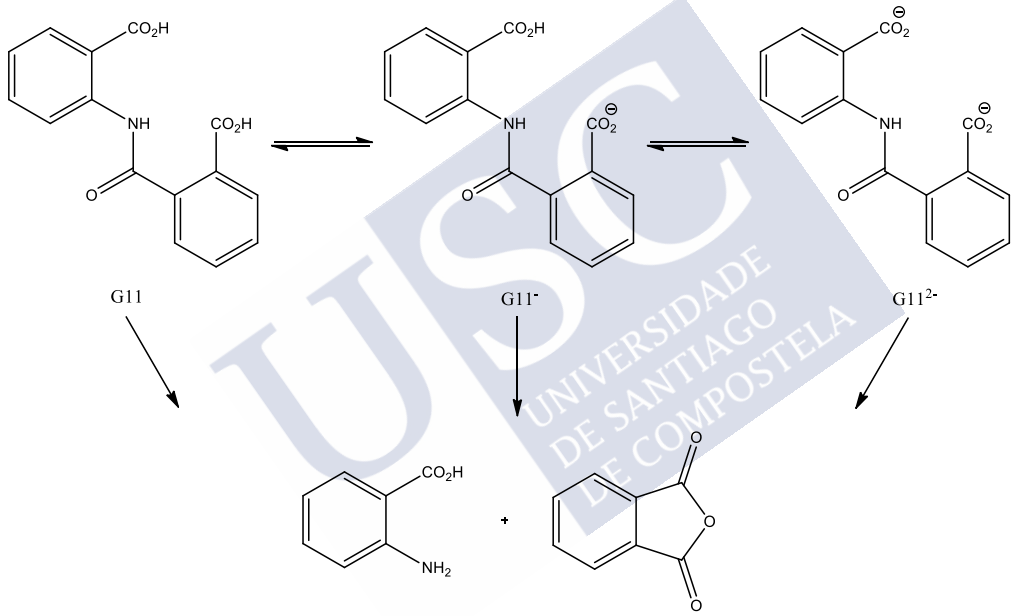
Figura 9. Estructura de anfitriones.

1.3.3.2 Guest aniónicos.

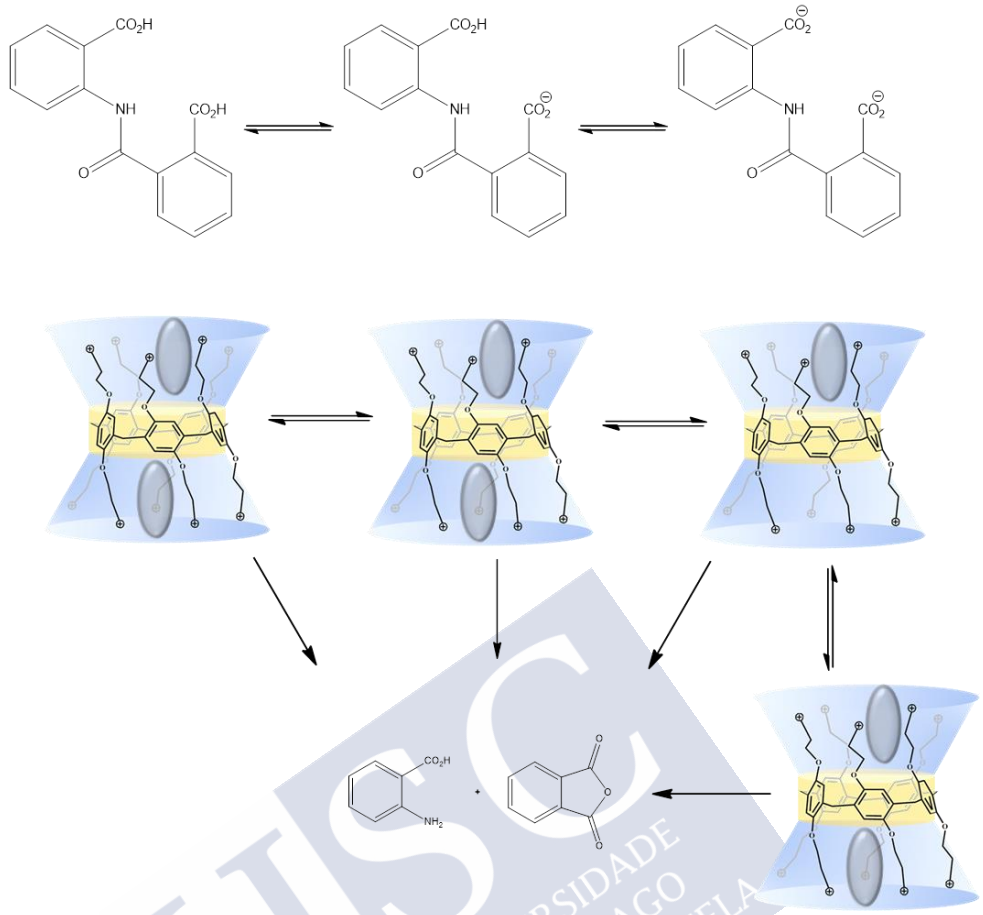
El número de estudios de formación de complejos de inclusión entre pilararenos y moléculas aniónicas es mucho más limitado, comparada con el estudio de guest catiónicos. No obstante, en la bibliografía se encuentran interesantes estudios. El grupo de Huang estudio la formación de complejos de inclusión entre G8 (figura 10) y P5TMA (figura 11), uno de los primeros pilararenos solubles en agua que ha sido sintetizado; determinando la formación de un complejo con estequiometría 1:1 y constante de asociación de $K = (1.33 \pm 0.94) \times 10^4\ M^{-1}$ [136]. La constante determinada para el sistema P6TMA:G8 es del mismo orden de magnitud que el complejo formado por P5TMA (figura 11) y el catión de viológeno. El grupo de Li estudió la interacción entre G9 y G10 (figura 10) con P6P (figura 11) dilucidando la

formación de complejos con estequiometría 1:1 y constantes de asociación K = (2.1 ± 0.3) x 10^5 M^{-1} y K = (3.8 ± 0.2) x 10^4 M^{-1} para G10 y G9, respectivamente [141].

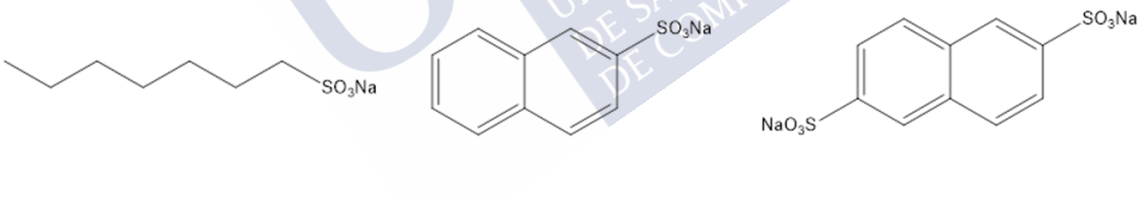
Uno de los ejemplos más curiosos de la complejación de sondas aniónicas es el proceso de inhibición que sufre G11, y sus respectivas formas dependiendo del pH del medio, al introducirse dentro de la cavidad de P5TMA (figura 11) La forma $G11^-$ forma un complejo de inclusión con estequiometría 1:2 cuya constante de equilibrio es K = 2.42 x 10^8 M^{-2}. Por otra parte, la forma $G11^{-2}$ forma un complejo con estequiometría 1:1, K = (2.29 ± 0.5) x 10^4 M^{-1}, que evoluciona a un complejo 1:2 con una constante asociada de K = (6.22 ± 2.6) x 10^4 M^{-1}. En el esquema 41 y 42 se desarrollan los procesos de descomposición e inhibición de la descomposición, respectivamente [157]. La constante de velocidad de descomposición de $G11^{2-}$ en la cavidad del P5TMA se reduce en un factor de 222 con respecto al proceso en agua pura.



Esquema 41. Equilibrio de disociación y descomposición de G11 sin adicción de pilarareno al medio de reacción.



Esquema 42. Equilibrio de disociación y descomposición de G11 al adicionar P5TMA al medio de reacción.



G8 G9 G10

Figura 10. Estructura de los huéspedes G8-10.

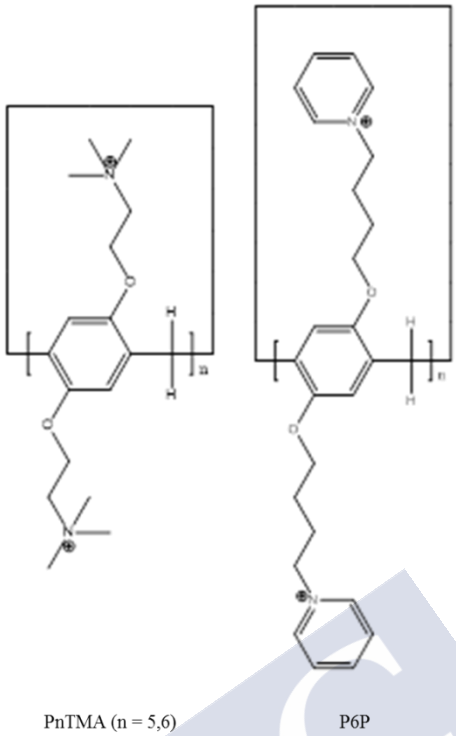


Figura 11. Estructuras de anfitriones.

1.3.3.3 Guest neutros.

El número de estudios de formación de complejos de inclusión con pilararenos y huéspedes neutros es, al igual que en el caso de *guests* catiónicos, muy amplio. El grupo de Ogoshi estudió la interacción de n-alcanos (G12) con P5OEt y su dímero P5DB (figura 16), llegando a la conclusión de que las constantes de asociación entre *n*-alcanos y P5OEt eran tan pequeñas que no es posible la determinación de su estequiometría ni de la constante de equilibrio asociada. Sin embargo, la síntesis del dímero P5DB, permite generar un macrociclo con dos cavidades de alta riqueza electrónica, por lo tanto, se amplía el número de interacciones C-H---π y enlaces de puente de hidrógeno que se forman entre el huésped y el anfitrión. El aumento de interacciones se traduce en la formación de un complejo mucho más fuerte; usando como *guests* *n*-hexano y *n*-octano se pudo determinar la formación de complejos con estequiometría 1:1 y, constantes de asociación de $K = 98 \pm 12\ M^{-1}$ y $K = 62 \pm 10\ M^{-1}$, respectivamente. Cabe destacar que las constantes son elevadas en comparación a los valores habituales para la formación de complejos *host:guest* con *n*-alcanos. En este estudio, además, se evalúan otros *guest* como diaminas neutras, ciclohexano y 2-, 3-metilhexano funcionalizados con grupos voluminosos; llegando a la conclusión de que no forman complejos de inclusión con el dímero pero sí con P5OEt, la constante de asociación para diaminas neutras es de $K = 70 \pm 10\ M^{-1}$ [158].

El grupo de Hou evalúa la influencia del tamaño de diácidos (G13, figura 15) en la formación de complejos de inclusión con P5A (figura 16), las constantes de asociación para cadenas de más de diez carbonos es mayor que para cadenas de ocho y nueve carbonos; esta diferencia se debe a que en el caso de diácidos con cadenas largas además de las fuerza hidrofóbica se establece una interacción entre los extremos del P5A y los grupos carboxilo; para diácidos con menos de 8 carbonos no se forma ningún complejo. Especialmente interesante es la posibilidad de transformar el [2]pseudorotaxano formado en [2]rotaxano (figura 12) para cadenas de más de quince carbonos al añadir TEA (figura 15) al medio de reacción, TEA interacciona con los ácidos terminales mediante fuerzas electrostáticas dando lugar a una especie de grupos terminales que impiden la disociación del rotaxano [138].

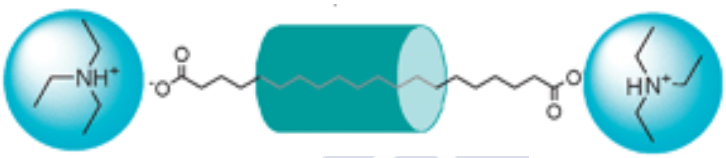


Figura 12. Estructura del [2]rotaxano formado al añadir TEA a una disolución de [2]pseudorotaxano de P5A y diácido de cadena de 17 carbonos.

El grupo de Cao estudia la interacción de alcanoles y alcanodioles (G14 y G15, figura 15) con P5OMe y su copilarareno P5F (figura 16). La afinidad de P5F por G13 y G14 es superior a la mostrada por P5OMe ya que, se establecen un mayor número de interacciones C-H---π, dipolo-dipolo y de puente de hidrógeno. Así, la constante de asociación del complejo P5OMe:G13 es demasiado pequeña como para ser calculada mientras que para el complejo P5F:G13 se determina una constante $K = (3.45 \pm 0.6) \times 10^2\ M^{-1}$. En el estudio de G14 sí es posible determinar las dos constantes obteniendo un valor de $K = (2.91 \pm 0.44) \times 10^2\ M^{-1}$ y $K = (1.48 \pm 0.21) \times 10^3\ M^{-1}$ para P5OMe y P5F, respectivamente [159].

El grupo de Li estudia la interacción de dihalogenoalcanos (G16, figura 15) con P5OEt, determinando la formación de [2]pseudorotaxanos mediante el establecimiento de fuerzas C-H---π, C-H---halógeno, dipolo-dipolo y de dispersión. Las constantes de asociación aumentan siguiendo la secuencia F > Cl > Br > I siendo la constante de asociación para 1,4-difluorbutano $(8.6 \pm 0.5) \times 10\ M^{-1}$ y, $(1.0 \pm 0.1) \times 10^4\ M^{-1}$ para 1,4-diiodobutano. La explicación a este comportamiento radica en las fuerzas de dispersión, el flúor es el menos polarizable por lo que será el que establezca una menor fuerza de dispersión y, por tanto, una menor interacción con pilararenos con sustitución alquílica. Este mismo grupo estudia la diferencia en la complejación de bromoalcanos y dibromoalcanos, llegando a la conclusión de que los dibromoalcanos forman complejos más fuertes y estables dado las fuerzas de dispersión cooperativas, la formación de enlaces por puente de hidrógeno y las interacciones del tipo C-H---π. Un ejemplo son las constantes de asociación determinadas para 1-bromobutano y 1,4-dibromobutano con P5OEt, $K = (5.2 \pm 0.4) \times 10\ M^{-1}$ y $K = (4.9 \pm 0.3) \times 10^3\ M^{-1}$, respectivamente. Además, se evalúa el efecto de la cadena para pilararenos con sustitución alquílica, determinando que para el mismo dibromoalcano (1,4-dibromobutano) la

constante de asociación es similar para pilararenos con cadenas de dos o más carbonos (K ≈ 4.0 x 10^3 M^{-1}) siendo la constante para P5OMe ligeramente inferior K = (1.6 ± 0.1) x 10^3 M^{-1} [160]. Otro de sus estudios se centra en imidazoles y bis(imidazoles) con pilar[5]arenos con sustitución alquílica, P5OEt forma complejos de inclusión de estequiometría 1:1 con bis(imidazoles) dado las múltiples interacciones C-H---π y C-H---O(N) que se pueden establecer. Por la suma de interacciones y tamaño tanto del P5OEt como del bis(imidazol), el complejo más fuerte y estable se establece con el derivado de cadena de cuatro unidades, siendo la constante de asociación K = (1.0 ± 0.4) x 10^4 M^{-1}. Con el objetivo de comparar como influye que el guest posea en su estructura uno o dos grupos de imidazol, se determina la constante de asociación entre P5OEt y el monoimidazol asociado a G16 siendo esta K = (2.4 ± 0.4) x 10^2 M^{-1}; se pone de manifiesto, una vez más, la importancia de formación de fuerzas cooperativas [161]. El estudio de formación de complejos de inclusión de dinitrilos planos con deficiencia electrónica con P5OBu y la posterior adicción de otro *guest* al sistema permite, por primera vez, el estudio de complejos con estequiometría 2:1, las fuerzas dominantes en este sistema son interacciones π-π, donor-aceptor y enlace de hidrógeno. Además, la adicción de una segunda sonda al sistema permite la formación de complejos internos (inclusión dentro de la cavidad del pilarareno) y complejos externos (figura 13) [162]. El siguiente grupo que analiza el grupo de Li son derivados de nitrilo, esta publicación es la primera que analiza el comportamiento de pilar[6]arenos con sondas neutras, los derivados que contienen grupos funcionales como benceno, naftaleno o adamantano forman complejos de inclusión con P6OEt con constantes de asociación de K = 28-41 M^{-1}, K ≈ 8 M^{-1} y K = 28-41 M^{-1}, respectivamente. Cabe destacar, que los derivados de nitrilo mencionados anteriormente no forman complejos de inclusión con P5OEt dado su gran tamaño.

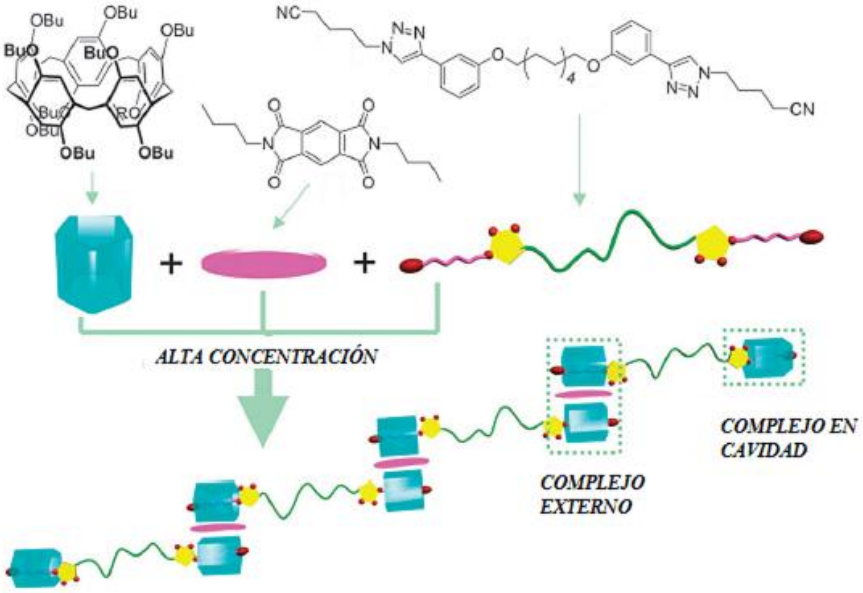


Figura 13. Formación de polímero supramolecular con P5OBu, G17 y G18.

El grupo de Stoddart evalúa la interacción entre P5OMe y aminas alifáticas neutras observando la formación de [2]pseudorotaxanos con constantes de asociación de (0.29-3.60) x 10^4 M^{-1}. Además, mediante la funcionalización del macrociclo es posible añadir un grupo fluoroforo sensible a diaminas alquílicas [163].

Recientemente, se ha sintetizado un poli-pseudortaxano mediante la técnica de *one-pot* con pilararenos modificados con grupos tiol y piridina, P5OMe-OTP (figura 16) La formación de este tipo de estructuras es posible mediante la coordinación del pilarareno, trifluoroacetato de plata y, la inclusión de dinitritos con diferente longitud de cadena en la cavidad de P5OMe-OTP según se representa en la figura 14 [164]. Además, se ha analizado la capacidad de los pilararenos para formar diferentes estructuras, la modificación de los sustituyentes hace que estas varíen de un complejo con estequiometría 1:1 a la formación de canales según el n-hexano se disponga en el interior de la cavidad o, interaccione de manera externa con dos pilararenos [165]. Por último, se estudia la interacción del indol y sus derivados azoicos (5-azoindol y 7-azoindol) con el P5TMA, en todos los casos se forman complejos de inclusión con estequiometría 1:1 siendo las constantes de asociación K = 4918.2, 330 y 386.8 M^{-1} para la sonda indol, 5-azoindol y 7-azoindol, respectivamente [166].

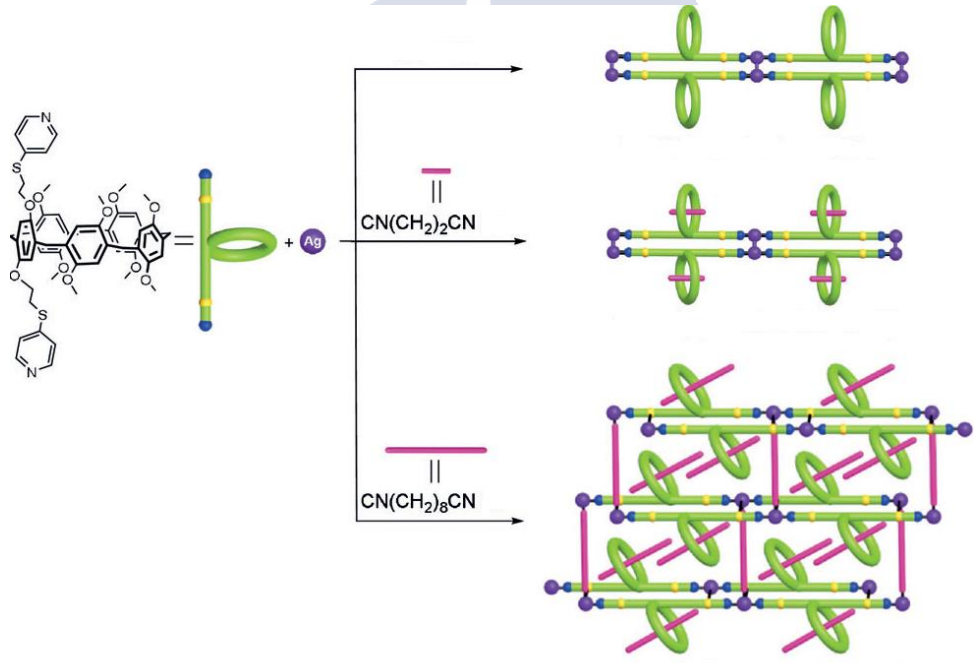
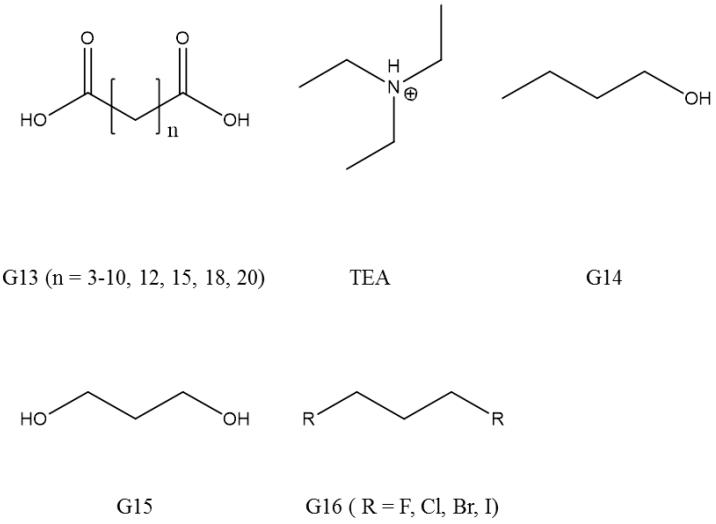


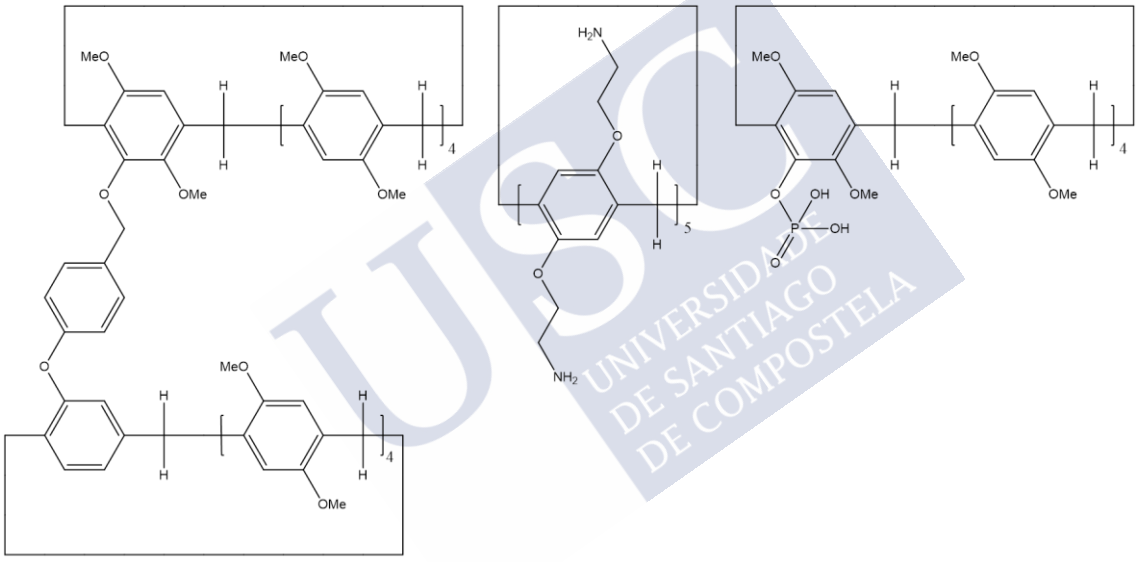
Figura 14. Formación de diferentes pseudorotaxanos según el dinitrito empleado. Formación de polímero 1D sin adicción de dinitrito. Formación de poli pseudorotaxano 1D al añadir un dinitrito de cadena de dos unidades. Formación de poli pseudorotaxano 2D al añadir un dinitrito de cadena de ocho unidades. Reproducido desde ref 164.



G13 (n = 3-10, 12, 15, 18, 20) TEA G14

G15 G16 (R = F, Cl, Br, I)

Figura 15. Estructuras de huéspedes G13-G16 y TEA.



P5DB P5A P5F

Figura 16. Estructuras de anfitriones.

1.4 BIBLIOGRAFÍA.

(1) Gautam R. Desiraju. Chemistry Beyond the Molecule. *Nat.* **2001**, *412* (July), 397–400. DOI: 10.1038/35086640.

(2) Ariga K.; Kunitake T. *Supramolecular Chemistry – Fundamentals and Applications* Springer, Berlin, Germany, **2006**.

(3) Rotello, V. M. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry By Jonathan W. Steed (Durham University, U.K.), David R. Turner (Monash University, Australia), and Karl J. Wallace (University of Southern Mississippi). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2007*; 2007; Vol. 129. DOI: 10.1021/ja0769853.

(4) Steed, J. W.; Atwood, J. L.; Gale, P. a. Definition and Emergence of Supramolecular ChemistryAdapted in Part from Supramolecular Chemistry , J. W. Steed and J. L. Atwood, Wiley: Chichester, 2nd Ed., 2009. *Supramol. Chem.* **2012**, 1–5. DOI: 10.1002/9780470661345.smc002.

(5) Chapter, T.; Seen, S. S.; The, B. W. Biological Supermolecules — Learning from Nature. *Supramol. Chem. Fundam. Appl.* **2006**, 175–203. DOI: 10.1007/3-540-26185-0_6.

(6) Lehn, J. M. *Supramolecular Chemistry : Conceps and Perspectives*, VCH.; Weinheim, **1995**.

(7) Cragg, P. J. *Supramolecular chemistry: From Biological Inspiration to Biomedical Applications;* Springer, New York, 2010.

(8) Oshovsky, G. V.; Reinhoudt, D. N.; Verboom, W. Supramolecular Chemistry in Water. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46* (14), 2366–2393. DOI: 10.1002/anie.200602815.

(9) Kolesnichenko, I. V.; Anslyn, E. V. Practical Applications of Supramolecular Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (9), 2385–2390. DOI: 10.1039/c7cs00078b.

(10) Anslyn, E. V.; Zimmerman, S. C. Supramolecular Chemistry at the Interface of Biology, Materials and Medicine. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1101–1102. DOI: 10.3762/bjoc.12.105.

(11) Lehn, J. M. Supramolecular Chemistry: Where from? Where To? *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (9), 2378–2379. DOI: 10.1039/c7cs00115k.

(12) Steed, J. W. Supramolecular Chemistry: Definition. *Encycl. Supramol. Chem.* **2004**, 1401–1411. DOI: 10.1081/e-esmc-120012662.

(13) Schmuck, C. *Bioorganic Chemistry and Chemical Biology Bioorganic Chemistry*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2004**.

(14) Andreetti, G. D.; Ungaro, R.; Pochini, A. Crystal and molecular structure of cyclo{quater[(5-t-butyl-2-hydroxy-1,3-phenylene)methylene]} toluene (1 : 1) clathrate, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1979**, *22*, 1005-1007. DOI: 10.1039/C39790001005.

(15) Minch, M. J. An Introduction to Hydrogen Bonding (Jeffrey, George A.). *J. Chem. Educ.* **1999**, *76* (6), 759. DOI: 10.1021/ed076p759.1.

(16) Leighton, C. Modern Techniques for Characterizing Magnetic Materials, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (47), 16746-16748. DOI: 10.1021/ja059776w.

(17) Dougherty, D. a. The Cation-π Interaction. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (4), 885–893.

DOI: 10.1021/ar300265y.

(18) Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. The Nature of π-π Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (14), 5525–5534. DOI: 10.1021/ja00170a016.

(19) Hunter, C. a.; Lawson, K. R.; Perkins, J.; Urch, C. J. Aromatic Interactions. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, No. 5, 651–669. DOI: 10.1021/ar4000828.

(20) Meyer, E. E.; Rosenberg, K. J.; Israelachvili, J. Recent Progress in Understanding Hydrophobic Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (43), 15739–15746. DOI: 10.1073/pnas.0606422103.

(21) Chandler, D. Interfaces and the Driving Force of Hydrophobic Assembly. *Nature* **2005**, *437* (7059), 640–647. DOI: 10.1038/nature04162.

(22) Fariya, M.; Jain, A.; Dhawan, V.; Shah, S.; Nagarsenker, M. S. Bolaamphiphiles: A Pharmaceutical Review. *Adv. Pharm. Bull.* **2014**, *4* (Suppl 2), 483–491. DOI: 10.5681/apb.2014.072.

(23) Meyers, D. *Surfaetant Science and Technology*, VCH Publishers, New York, 1988.

(24) Jonsson, B.; Lindman, B.; Holmberg, K.; Kronberg, B. Surfactants and Polymers in Aqueos Solutions, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2002.

(25) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* **1976**, *72*, 1525–1568. DOI: 10.1039/F29767201525.

(26) Mittal, K. L. *Micellization, solubilization and microemulsions*, Plenum Press, New York, 1976.

(27) Mittal, K. L. *Colloidal Dispersions and Micellar Behavior*. ACS Symp. Ser., Washington, 1975.

(28) Lessard, J. G.; Fragata, M. Micropolarities of Lipid Bilayers and Micelles. 3. Effect of Monovalent Ions on the Dielectric Constant of the Water-Membrane Interface of Unilamellar Phosphatidylcholine Vesicles. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90* (5), 811–817. DOI: 10.1021/j100277a022.

(29) Mukerjee, P.; Ray, A. The Specificity of Counterion Adsorption to Micelles of Dodecylpyridinium Iodide and Their Critical Concentrations. *J. Phys. Chem.* **1966**, *70* (7), 2150–2157. DOI: 10.1021/j100879a014.

(30) Mittal, L. K. *Micellization, Solubilization and microemulsions*, Plenum Press: New York and London, 1977.

(31) Fendler, J. H. F.; Fendler, E. J. *Catalysls In Micellar and Macromolecular Systems*, Press, New York ,1975.

(32) Halsey, G. D. On the Structure of Micelles. *J. Phys. Chem.* **1953**, *57* (1), 87–89. DOI: 10.1021/j150502a018.

(33) Menger, F. M.; Portnoy, C. E. On the Chemistry of Reactions Proceeding Inside Molecular Aggregates. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (18), 4698–4703. DOI: 10.1021/ja00994a023.

(34) Sar, P.; Ghosh, A.; Scarso, A.; Saha, B. Surfactant for Better Tomorrow: Applied Aspect of Surfactant Aggregates from Laboratory to Industry. *Res. Chem. Intermed.* **2019**, *45* (12), 6021–6041. DOI: 10.1007/s11164-019-04017-6.

(35) Cullis, P. R.; Hope, M. J.; Tilcock, C. P. S. Lipid Polymorphism and the Roles of Lipids in Membranes. *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *40* (2–4), 127–144. DOI: 10.1016/0009-3084(86)90067-8.

(36) Kunitake, T.; Okahata, Y. A Totally Synthetic Bilayer Membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (11), 3860–3861. DOI: 10.1021/ja00453a066.

(37) Valadez, T. N.; Norton, J. R.; Neary, M. C. Reaction of Cp*(Cl)M(Diene) (M = Ti, Hf) with Isonitriles. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (32), 10152-10155. DOI: 10.1021/jacs.5b06654.

(38) Carmona-Ribeiro, A. M.; Yoshida, L. S.; Sesso, A.; Chaimovich, H. Permeabilities and Stabilities of Large Dihexadecylphosphate and Dioctadecyldimethylammonium Chloride Vesicles. *J. Colloid Interface Sci.* **1984**, *100* (2), 433–443. DOI: 10.1016/0021-9797(84)90449-1.

(39) Carmona-Ribeiro, a. M.; Yoshida, L. S.; Chaimovich, H. Salt Effects on the Stability of Dioctadecyldimethylammonium Chloride and Sodium Dihexadecyl Phosphate Vesicles. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89* (13), 2928–2933. DOI: 10.1021/j100259a045.

(40) Kaler, E. W.; Herrington, K. L.; Murthy, a. K.; Zasadzinski, J. a. N. Phase Behavior and Structures of Mixtures of Anionic and Cationic Surfactants. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96* (16), 6698–6707. DOI: 10.1021/j100195a033.

(41) Marques, E. F. Size and Stability of Catanionic Vesicles: Effects of Formation Path, Sonication, and Aging. *Langmuir* **2000**, *16* (11), 4798–4807. DOI: 10.1021/la9908135.

(42) Horbaschek, K.; Hoffmann, H.; Hao, J. Classic L Phases as Opposed to Vesicle Phases in Cationic-Anionic Surfactant Mixtures *J. Phys. Chem. B*, 2000, 104 (13), 2781-2784. DOI: 10.1021/jp993128f.

(43) Carmona-Ribeiro, A. M.; Chaimovich, H. Preparation and Characterization of Large Dioctadecyldimethylammonium Chloride Liposomes and Comparison with Small Sonicated Vesicles. *BBA - Biomembr.* **1983**, *733* (1), 172–179. DOI: 10.1016/0005-2736(83)90103-7.

(44) Kano, K.; Romero, A.; Djermouni, B.; Ache, H. J.; Fendler, J. Characterization of Surfactant Vesicles as Membrane Mimetic Agents. 2. Temperature-Dependent Changes of the Turbidity, Viscosity, Fluorencence Polarization of 2-Methylanthracene, and Positron Annihilation in Sonicated Dioctadecyldimethylammonium Chloride. J. Am. Chem. Soc., 101 (15), 1975, 4030-4037. DOI: 10.1021/ja00509a002.

(45) Feitosa, E.; Barreleiro, P. C. a.; Olofsson, G. Phase Transition in Dioctadecyldimethylammonium Bromide and Chloride Vesicles Prepared by Different Methods. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *105* (2), 201–213. DOI: 10.1016/S0009-3084(00)00127-4.

(46) Khan, A. Phase Science of Surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1* (5), 614–623. DOI: 10.1016/s1359-0294(96)80099-9.

(47) Zhai, L.; Zhao, M.; Sun, D.; Hao, J.; Zhang, L. Salt-Induced Vesicle Formation from Single Anionic Surfactant SDBS and Its Mixture with LSB in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (12), 5627–5630. DOI: 10.1021/jp044596e.

(48) Bize, C.; Garrigues, J. C.; Blanzat, M.; Rico-Lattes, I.; Bistri, O.; Colasson, B.; Reinaud, O. Spontaneous Formation of Vesicles in a Catanionic Association Involving

a Head and Tail Functionalized Amino-Calix[6]Arene. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (4), 586–588. DOI: 10.1039/b904135d.

(49) Rosa, M.; Infante, M. R.; Miguel, M. D. G.; Lindman, B. Spontaneous Formation of Vesicles and Dispersed Cubic and Hexagonal Particles in Amino Acid-Based Catanionic Surfactant Systems. *Langmuir* **2006**, *22* (13), 5588–5596. DOI: 10.1021/la053464p.

(50) Cram, D. J.; Cram, J. M. *Container Molecules and their guest*, Monographs in Supramolecular Chemistry, Cambridge:The Royal Society of Chemistry, 1994.

(51) Yang, Y.; Li, L.; Chen, G. Synthesis of Magnetic Particles via a Cationic-Anionic Surfactant Vesicle Method. *J. Magn. Magn. Mater.* **2006**, *305* (1), 40–46. DOI: 10.1016/j.jmmm.2005.11.028.

(52) McKelvey, C. a.; Kaler, E. W.; Zasadzinski, J. a.; Coldren, B.; Jung, H. T. Templating Hollow Polymeric Spheres from Catanionic Equilibrium Vesicles: Synthesis and Characterization. *Langmuir* **2000**, *16* (22), 8285–8290. DOI: 10.1021/la000569d.

(53) Hentze, H. P.; Raghavan, S. R.; McKelvey, C. a.; Kaler, E. W. Silica Hollow Spheres by Templating of Catanionic Vesicles. *Langmuir* **2003**, *19* (4), 1069–1074. DOI: 10.1021/la020727w.

(54) Yu, W. L.; Pei, J.; Huang, W.; Zhao, G. X. Formation of CdS Nanoparticles in Mixed Cationic-Anionic Surfactant Vesicle System. *Mater. Chem. Phys.* **1997**, *49* (1), 87–92. DOI: 10.1016/S0254-0584(97)80134-4.

(55) Poincare, H. Bromide Catanionic Vesicles : Aggregate. *Langmuir* **2000**, *16*, 9099-9102. DOI: 10.1021/la000810o.

(56) Fischer, A.; Hebrant, M.; Tondre, C. Glucose Encapsulation in Catanionic Vesicles and Kinetic Study of the Entrapment/Release Processes in the Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate/Cetyltrimethylammonium Tosylate/Water System. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *248* (1), 163–168. DOI: 10.1006/jcis.2001.8187.

(57) Danoff, E. J.; Wang, X.; Tung, S. H.; Sinkov, N. a.; Kemme, A. M.; Raghavan, S. R.; English, D. S. Surfactant Vesicles for High-Efficiency Capture and Separation of Charged Organic Solutes. *Langmuir* **2007**, *23* (17), 8965–8971. DOI: 10.1021/la070215n.

(58) Wang, X.; Danoff, E. J.; Sinkov, N. a.; Lee, J. H.; Raghavao, S. R.; English, D. S. Highly Efficient Capture and Long-Term Encapsulation of Dye by Catanionic Surfactant Vesicles. *Langmuir* **2006**, *22* (15), 6461–6464. DOI: 10.1021/la0605135.

(59) Brito, R. O.; Marques, E. F.; Silva, S. G.; do Vale, M. L.; Gomes, P.; Araújo, M. J.; Rodriguez-Borges, J. E.; Infante, M. R.; Garcia, M. T.; Ribosa, I.; Vinardell, M. P.; Mitjans, M. Physicochemical and Toxicological Properties of Novel Amino Acid-Based Amphiphiles and Their Spontaneously Formed Catanionic Vesicles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2009**, *72* (1), 80–87. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.03.017.

(60) Rosa, M.; Miguel, M. D. G.; Lindman, B. DNA Encapsulation by Biocompatible Catanionic Vesicles. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *312* (1), 87–97. DOI: 10.1016/j.jcis.2006.07.084.

(61) Rosa, M.; del Carmen Morán, M.; da Graça Miguel, M.; Lindman, B. The Association of DNA and Stable Catanionic Amino Acid-Based Vesicles. *Colloids Surfaces A*

Physicochem. Eng. Asp. **2007**, *301* (1–3), 361–375. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2006.12.082.

(62) Lee, J.; Chang, C. H. DNA Association-Enhanced Physical Stability of Catanionic Vesicles Composed of Ion Pair Amphiphile with Double-Chain Cationic Surfactant. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *121*, 171–177. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.06.005.

(63) Kuo, J. H. S.; Chang, C. H.; Lin, Y. L.; Wu, C. J. Flow Cytometric Characterization of Interactions between U-937 Human Macrophages and Positively Charged Catanionic Vesicles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2008**, *64* (2), 307–313. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.02.006.

(64) Lee, C. H.; Yang, Y. M.; Leu, K. L.; Lin, H. Y.; Liang, C. H.; Chang, C. H. Exploring Physical Stability Characteristics of Positively Charged Catanionic Vesicle/DNA Complexes. *Colloid Polym. Sci.* **2015**, *293* (8), 2239–2247. DOI: 10.1007/s00396-015-3608-6.

(65) Hao, J.; Liu, W.; Xu, G.; Zheng, L. Vesicles from Salt-Free Cationic and Anionic Surfactant Solutions. *Langmuir* **2003**, *19* (26), 10635–10640. DOI: 10.1021/la030065q.

(66) Song, A.; Dong, S.; Jia, X.; Hao, J.; Liu, W.; Liu, T. An Onion Phase in Salt-Free Zero-Charged Catanionic Surfactant Solutions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (26), 4018–4021. DOI: 10.1002/anie.200500353.

(67) Dubois, M.; Demé, B.; Gulik-Krzywicki, T.; Dedieu, J. C.; Vautrin, C.; Désert, S.; Perez, E.; Zemb, T. Self-Assembly of Regular Hollow Icosahedra in Salt-Free Catanionic Solutions. *Nature* **2001**, *411* (6838), 672–675. DOI: 10.1038/35079541.

(68) Shen, Y.; Hao, J.; Hoffmann, H. Reversible Phase Transition between Salt-Free Catanionic Vesicles and High-Salinity Catanionic Vesicles. *Soft Matter* **2007**, *3* (11), 1407–1412. DOI: 10.1039/b711817a.

(69) Liu, C.; Hao, J.; Wu, Z. Phase Behavior and Rheological Properties of Salt-Free Catanionic Surfactant Mixtures in the Presence of Bile Acids. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (30), 9795–9804. DOI: 10.1021/jp103916a.

(70) Sun, W.; Shen, Y.; Hao, J. Phase Behavior and Rheological Properties of Salt-Free Catanionic TTAOH/DA/H2O System in the Presence of Hydrophilic and Hydrophobic Salts. *Langmuir* **2011**, *27* (5), 1675–1682. DOI: 10.1021/la104181b.

(71) Li, X.; Dong, S.; Hao, J. Phase Behavior, Rheological Properties, and Vesicles of Alkyldimethylamine Oxide and Fluorinated Acidic Surfactant Mixtures. *Soft Matter* **2009**, *5* (5), 990–998. DOI: 10.1039/b815640a.

(72) Wu, C. J.; Kuo, A. T.; Lee, C. H.; Yang, Y. M.; Chang, C. H. Fabrication of Positively Charged Catanionic Vesicles from Ion Pair Amphiphile with Double-Chained Cationic Surfactant. *Colloid Polym. Sci.* **2014**, *292* (3), 589–597. DOI: 10.1007/s00396-013-3104-9.

(73) Lee, C. H.; Yang, Y. M.; Chang, C. H. Enhancing Physical Stability of Positively Charged Catanionic Vesicles in the Presence of Calcium Chloride via Cholesterol-Induced Fluidic Bilayer Characteristic. *Colloid Polym. Sci.* **2014**, *292* (10), 2519–2527. DOI: 10.1007/s00396-014-3285-x.

(74) Cram, D. J. International Edition in English. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1985**, *24*

(10), 799–810.

(75) Schneider, H. J.; Yatsimirsky, A. K. Selectivity in Supramolecular Host-Guest Complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (2), 263–277. DOI: 10.1039/b612543n.

(76) Nau, W. M.; Florea, M.; Assaf, K. I. Deep inside Cucurbiturils: Physical Properties and Volumes of Their Inner Cavity Determine the Hydrophobic Driving Force for Host-Guest Complexation. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51* (5–6), 559–577. DOI: 10.1002/ijch.201100044.

(77) Mecozzi, S.; Rebek, J. The 55% Solution: A Formula for Molecular Recognition in the Liquid State. *Chem. - A Eur. J.* **1998**, *4* (6), 1016–1022. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3765(19980615)4:6<1016::AID-CHEM1016>3.0.CO;2-B.

(78) Hancock, R. D. Chelate Ring Size and Metal Ion Selection: The Basis of Selectivity for Metal Ions in Open-Chain Ligands and Macrocycles. *J. Chem. Educ.* **1992**, *69* (8), 615–621. DOI: 10.1021/ed069p615.

(79) Rebek, J.; Trend, J. E.; Wattley, R. V.; Chakravorti, S. Allosteric Effects in Organic Chemistry. Site-Specific Binding. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (15), 4333–4337. DOI: 10.1021/ja00509a047.

(80) Amma, L. 6540 of Hydrate Oxygens into a Two-Stranded Ribbon. The Ribbons Are Then Stacked Parallel To. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, No. 62, 6540–6541. DOI: 10.1021/ja01051a091.

(81) Hedaya, M.; Kent, M. E. Effect of Macrocyclic Structures on The Rate of Formation and Dissociation of Copper (II) Complexes *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92* (7), 2151-2153. DOI: 10.1021/ja00710a068.

(82) Cram, D. J.; Cram, J. M. Container Molecules and Their Guest *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, 1994.

(83) Ogoshi, T.; Kanai, S.; Fujinami, S.; Yamagishi, T. A.; Nakamoto, Y. Para-Bridged Symmetrical Pillar[5]Arenes: Their Lewis Acid Catalyzed Synthesis and Host-Guest Property. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (15), 5022–5023. DOI: 10.1021/ja711260m.

(84) Kurkov, S. V.; Loftsson, T. Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453* (1), 167–180. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.055.

(85) Caira, M. R.; Griffith, S. V. J.; Nassimbenp, L. R.; Oudtshoornb, B. Van. Unusual $^{1}C_{4}$ Conformation of a Methylglucose Residue in Crystalline Permethyl-b-cyclodextrin Monohydrate *J. Chem. Soc. Perkins Trans. 2*, **1994**, *6*, 2071-2072. DOI: 10.1039/P29940002071.

(86) Harata, K.; Hirayama, F.; Kaneto, A. Crystal Structure of Heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)-p-cyclodextrin Complexes with m-lodophenol and 4-Biphenylacetic Acid. Guest-induced Conformational Change of a Pyranose Ring *J. Am. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1992**, *6*, 1159-1166. DOI: 10.1039/P29920001159.

(87) Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1743–1753. DOI: 10.1021/cr970022c.

(88) Řezanka, M. Synthesis of Substituted Cyclodextrins. *Environ. Chem. Lett.* **2019**, *17* (1), 49–63. DOI: 10.1007/s10311-018-0779-7.

(89) Sallas, F.; Darcy, R. Amphiphilic Cyclodextrins - Advances in Synthesis and Supramolecular Chemistry. *European J. Org. Chem.* **2008**, No. 6, 957–969. DOI:

10.1002/ejoc.200700933.

(90) Nakazono, K.; Takashima, T.; Arai, T.; Koyama, Y.; Takata, T. High-Yield One-Pot Synthesis of Permethylated α-Cyclodextrin-Based Polyrotaxane in Hydrocarbon Solvent through an Efficient Heterogeneous Reaction. *Macromolecules* **2010**, *43* (2), 691–696. DOI: 10.1021/ma902161d.

(91) Stefanache, A.; Silion, M.; Stoica, I.; Fifere, A.; Harabagiu, V.; Farcas, A. Poly[2,7-(9,9-Dioctylfluorene)-Alt-(5,5′-Bithiophene/Permethylated β-Cyclodextrin) Main-Chain Polyrotaxane: Synthesis, Characterization and Surface Morphology. *Eur. Polym. J.* **2014**, *50* (1), 223–234. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2013.11.001.

(92) Benkhaled, A.; Cheradame, H.; Fichet, O.; Teyssié, D.; Buchmann, W.; Guégan, P. Synthesis and Characterization of Amphiphilic Per-(6-Thio-2,3-Trimethylsilyl)Cyclodextrin: Application to Langmuir Film Formation. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *73* (3), 482–489. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.12.031.

(93) Maynard, D. K.; Vigh, G. Synthesis and Analytical Characterization of the Sodium Salt of Heptakis(2-O-Methyl-3,6-Di-O-Sulfo)Cyclomaltoheptaose, a Chiral Resolving Agent Candidate for Capillary Electrophoresis. *Carbohydr. Res.* **2000**, *328* (3), 277–285. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)00114-2.

(94) Morin-Crini, N.; Winterton, P.; Fourmentin, S.; Wilson, L. D.; Fenyvesi, É.; Crini, G. Water-Insoluble β-Cyclodextrin–Epichlorohydrin Polymers for Removal of Pollutants from Aqueous Solutions by Sorption Processes Using Batch Studies: A Review of Inclusion Mechanisms. *Prog. Polym. Sci.* **2018**, *78*, 1–23. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2017.07.004.

(95) Breslow, R.; Canary, J. W.; Varney, M.; Waddell, S. T.; Yang, D. Artificial Transaminases Linking Pyridoxamine to Binding Cavities: Controlling the Geometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (13), 5212–5219. DOI: 10.1021/ja00169a032.

(96) Sollogoub, M. Site-Selective Heterofunctionalization of Cyclodextrins: Discovery, Development, and Use in Catalysis. *Synlett* **2013**, *24* (20), 2629–2640. DOI: 10.1055/s-0033-1339877.

(97) Letort, S.; Mathiron, D.; Grel, T.; Albaret, C.; Daulon, S.; Djedaïni-Pilard, F.; Gouhier, G.; Estour, F. The First 2IB,3IA-Heterodifunctionalized β-Cyclodextrin Derivatives as Artificial Enzymes. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (13), 2601–2604. DOI: 10.1039/c4cc09189b.

(98) Masurier, N.; Estour, F.; Froment, M. T.; Lefèvre, B.; Debouzy, J. C.; Brasme, B.; Masson, P.; Lafont, O. Synthesis of 2-Substituted β-Cyclodextrin Derivatives with a Hydrolytic Activity against the Organophosphorylester Paraoxon. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40* (7), 615–623. DOI: 10.1016/j.ejmech.2005.02.008.

(99) Jindřich, J.; Tišlerová, I. Simple Preparation of 3I-O-Substituted β-Cyclodextrin Derivatives Using Cinnamyl Bromide. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (22), 9054–9055. DOI: 10.1021/jo051339c.

(100) Řezanka, P.; Řezanková, K.; Sedláčková, H.; Mašek, J.; Rokosová, L.; Bláhová, M.; Řezanka, M.; Jindřich, J.; Sýkora, D.; Král, V. Influence of Substituent Position and Cavity Size of the Regioisomers of Monocarboxymethyl-α-, β-, and γ-Cyclodextrins on the Apparent Stability Constants of Their Complexes with Both Enantiomers of Tröger's Base. *J. Sep. Sci.* **2016**, *39* (5), 980–985. DOI: 10.1002/jssc.201500845.

(101) Connors, K. a. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (5), 1325–1357. DOI: 10.1021/cr960371r.

(102) Hu, J.; Tao, Z.; Li, S.; Liu, B. The Effect of Cyclodextrins on Polymer Preparation. *J. Mater. Sci.* **2005**, *40* (23), 6057–6061. DOI: 10.1007/s10853-005-3799-1.

(103) Dickinson, A. W.; Cramer, F.; Saenger, W. Inclusion Compounds. XIX. The Formation of Inclusion Compounds of α-Cyclodextrin in Aqueous Solutions. Thermodynamics and Kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (1), 14–20.

(104) Ogino, H. Relatively High-Yield Syntheses. *J. Am. Chem. Soc* **1981**, *103* (8), 1303–1304.

(105) Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Cyclodextrin-Based Rotaxanes: From Rotaxanes to Polyrotaxanes and Further to Functional Materials. *European J. Org. Chem.* **2019**, *2019* (21), 3344–3357. DOI: 10.1002/ejoc.201900090.

(106) Isnin, R.; Kaifer, A. E. Novel Class of Asymmetric Zwitterionic Rotaxanes Based on α-Cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (21), 8188–8190. DOI: 10.1021/ja00021a067.

(107) Oshikiri, T.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Kinetic Control of Threading of Cyclodextrins onto Axle Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (35), 12186–12187. DOI: 10.1021/ja053532u.

(108) Oshikiri, T.; Yamaguchi, H.; Takashima, Y.; Harada, A. Face Selective Translation of a Cyclodextrin Ring along an Axle. *Chem. Commun.* **2009**, *7345* (37), 5515–5517. DOI: 10.1039/b906425g.

(109) Inoue, Y.; Miyauchi, M.; Nakajima, H.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Self-Threading and Dethreading Dynamics of Poly(Ethylene Glycol)-Substituted Cyclodextrins with Different Chain Lengths. *Macromolecules* **2007**, *40* (9), 3256–3262. DOI: 10.1021/ma070095q.

(110) Inoue, Y.; Kuad, P.; Okumura, Y.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Thermal and Photochemical Switching of Conformation of Poly(Ethylene Glycol)-Substituted Cyclodextrin with an Azobenzene Group at the Chain End. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (20), 6396–6397. DOI: 10.1021/ja071717q.

(111) Hoshino, T.; Miyauchi, M.; Kawaguchi, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, a. Daisy Chain Necklace: Tri[2]Rotaxane Containing Cyclodextrins [21]. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (40), 9876–9877. DOI: 10.1021/ja0018264.

(112) Li, S.; Taura, D.; Hashidzume, A.; Harada, A. Light-Switchable Janus [2]Rotaxanes Based on α-Cyclodextrin Derivatives Bearing Two Recognition Sites Linked with Oligo(Ethylene Glycol). *Chem. - An Asian J.* **2010**, *5* (10), 2281–2289. DOI: 10.1002/asia.201000169.

(113) Cao, D.; Kou, Y.; Liang, J.; Chen, Z.; Wang, L.; Meier, H. A Facile and Efficient Preparation of Pillararenes and a Pillarquinone. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48* (51), 9721–9723. DOI: 10.1002/anie.200904765.

(114) Ogoshi, T.; Ueshima, N.; Sakakibara, F.; Yamagishi, T. A.; Haino, T. Conversion from Pillar[5]Arene to Pillar[6-15]Arenes by Ring Expansion and Encapsulation of C60 by Pillar[n]Arenes with Nanosize Cavities. *Org. Lett.* **2014**, *16* (11), 2896–2899. DOI: 10.1021/ol501039u.

(115) Chen, Y.; Tao, H. Q.; Kou, Y. H.; Meier, H.; Fu, J. L.; Cao, D. R. Synthesis of Pillar[7]Arene. *Chinese Chem. Lett.* **2012**, *23* (5), 509–511. DOI: 10.1016/j.cclet.2012.03.026.

(116) Ogoshi, T.; Aoki, T.; Kitajima, K.; Fujinami, S.; Yamagishi, T. A.; Nakamoto, Y. Facile, Rapid, and High-Yield Synthesis of Pillar[5]Arene from Commercially Available Reagents and Its X-Ray Crystal Structure. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (1), 328–331. DOI: 10.1021/jo1020823.

(117) Han, C.; Ma, F.; Zhang, Z.; Xia, B.; Yu, Y.; Huang, F. DIBpillar[n]Arenes (n = 5, 6): Syntheses, X-Ray Crystal Structures, and Complexation with n-Octyltriethyl Ammonium Hexafluorophosphate. *Org. Lett.* **2010**, *12* (19), 4360–4363. DOI: 10.1021/ol1018344.

(118) Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H. J.; Kim, K. Cucurbituril Homologues and Derivatives: New Opportunities in Supramolecular Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36* (8), 621–630. DOI: 10.1021/ar020254k.

(119) Ogoshi, T.; Masaki, K.; Shiga, R.; Kitajima, K.; Yamagishi, T. A. Planar-Chiral Macrocyclic Host Pillar[5]Arene: No Rotation of Units and Isolation of Enantiomers by Introducing Bulky Substituents. *Org. Lett.* **2011**, *13* (5), 1264–1266. DOI: 10.1021/ol200062j.

(120) Ogoshi, T.; Kitajima, K.; Aoki, T.; Fujinami, S.; Yamagishi, T. A.; Nakamoto, Y. Synthesis and Conformational Characteristics of Alkyl-Substituted Pillar[5]Arenes. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (10), 3268–3273. DOI: 10.1021/jo100273n.

(121) Ogoshi, T.; Kitajima, K.; Aoki, T.; Yamagishi, T. A.; Nakamoto, Y. Effect of an Intramolecular Hydrogen Bond Belt and Complexation with the Guest on the Rotation Behavior of Phenolic Units in Pillar[5]Arenes. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1* (5), 817–821. DOI: 10.1021/jz900437r.

(122) Gao, L.; Han, C.; Zheng, B.; Dong, S.; Huang, F. Formation of a Pillar[5]Arene-Based [3]Pseudorotaxane in Solution and in the Solid State. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (5), 472–474. DOI: 10.1039/c2cc37646f.

(123) Paquin, F.; Rivnay, J.; Salleo, A.; Stingelin, N.; Silva, C. Multi-Phase Semicrystalline Microstructures Drive Exciton Dissociation in Neat Plastic Semiconductors. *J. Mater. Chem. C* **2015**, *3* (207890), 10715–10722. DOI: 10.1039/b000000x.

(124) Si, W.; Chen, L.; Hu, X. B.; Tang, G.; Chen, Z.; Hou, J. L.; Li, Z. T. Selective Artificial Transmembrane Channels for Protons by Formation of Water Wires. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (52), 12564–12568. DOI: 10.1002/anie.201106857.

(125) Wu, X.; Gao, L.; Hu, X. Y.; Wang, L. Supramolecular Drug Delivery Systems Based on Water-Soluble Pillar[n]Arenes. *Chem. Rec.* **2016**, 1216–1227. DOI: 10.1002/tcr.201500265.

(126) Jie, K.; Zhou, Y.; Li, E.; Huang, F. Nonporous Adaptive Crystals of Pillararenes. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51* (9), 2064–2072. DOI: 10.1021/acs.accounts.8b00255.

(127) Holler, M.; Allenbach, N.; Sonet, J.; Nierengarten, J. F. The High Yielding Synthesis of Pillar[5]Arenes under Friedel-Crafts Conditions Explained by Dynamic Covalent Bond Formation. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (20), 2576–2578. DOI: 10.1039/c2cc16795f.

(128) Kou, Y.; Tao, H.; Cao, D.; Fu, Z.; Schollmeyer, D.; Meier, H. Synthesis and Conformational Properties of Nonsymmetric Pillar[5]Arenes and Their Acetonitrile Inclusion Compounds. *European J. Org. Chem.* **2010**, No. 33, 6464–6470. DOI: 10.1002/ejoc.201000718.

(129) Tao, H.; Cao, D.; Liu, L.; Kou, Y.; Wang, L.; Meier, H. Synthesis and Host-Guest Properties of Pillar[6]Arenes. *Sci. China Chem.* **2012**, *55* (2), 223–228. DOI: 10.1007/s11426-011-4427-3.

(130) Santra, S.; Kopchuk, D. S.; Kovalev, I. S.; Zyryanov, G. V.; Majee, a.; Charushin, V. N.; Chupakhin, O. N. Solvent-Free Synthesis of Pillar[6]Arenes. *Green Chem.* **2016**, *18* (2), 423–426. DOI: 10.1039/c5gc01505g.

(131) Hu, X. B.; Chen, Z.; Chen, L.; Zhang, L.; Hou, J. L.; Li, Z. T. Pillar[n]Arenes (n = 8-10) with Two Cavities: Synthesis, Structures and Complexing Properties. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (89), 10999–11001. DOI: 10.1039/c2cc36027f.

(132) Zhang, Z.; Xia, B.; Han, C.; Yu, Y.; Huang, F. Syntheses of Copillar[5]Arenes by Co-Oligomerization of Different Monomers. *Org. Lett.* **2010**, *12* (15), 3285–3287. DOI: 10.1021/ol100883k.

(133) Ogoshi, T.; Yamafuji, D.; Kotera, D.; Aoki, T.; Fujinami, S.; Yamagishi, T. A. Clickable Di-and Tetrafunctionalized Pillar[n]Arenes (n = 5, 6) by Oxidation-Reduction of Pillar[n]Arene Units. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (24), 11146–11152. DOI: 10.1021/jo302283n.

(134) Ogoshi, T.; Umeda, K.; Yamagishi, T. A.; Nakamoto, Y. Through-Space π-Delocalized Pillar[5]Arene. *Chem. Commun.* **2009**, No. 32, 4874–4876. DOI: 10.1039/b907894k.

(135) Cao, D.; Meier, H. Pillararene-Based Fluorescent Sensors for the Tracking of Organic Compounds. *Chinese Chem. Lett.* **2019**, *30* (10), 1758–1766. DOI: 10.1016/j.cclet.2019.06.026.

(136) Ma, Y.; Ji, X.; Xiang, F.; Chi, X.; Han, C.; He, J.; Abliz, Z.; Chen, W.; Huang, F. A Cationic Water-Soluble Pillar[5]Arene: Synthesis and Host-Guest Complexation with Sodium 1-Octanesulfonate. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (45), 12340–12342. DOI: 10.1039/c1cc15660h.

(137) Strutt, N. L.; Zhang, H.; Schneebeli, S. T.; Stoddart, J. F. Functionalizing Pillar[n]Arenes. **2014**.

(138) Hu, X. B.; Chen, L.; Si, W.; Yu, Y.; Hou, J. L. Pillar[5]Arene Decaamine: Synthesis, Encapsulation of Very Long Linear Diacids and Formation of Ion Pair-Stopped [2]Rotaxanes. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (16), 4694–4696. DOI: 10.1039/c1cc10633c.

(139) Ogoshi, T.; Shiga, R.; Yamagishi, T. A. Reversibly Tunable Lower Critical Solution Temperature Utilizing Host-Guest Complexation of Pillar[5]Arene with Triethylene Oxide Substituents. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (10), 4577–4580. DOI: 10.1021/ja300989n.

(140) Yao, Y.; Xue, M.; Chi, X.; Ma, Y.; He, J.; Abliz, Z.; Huang, F. A New Water-Soluble Pillar[5]Arene: Synthesis and Application in the Preparation of Gold Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (52), 6505–6507. DOI: 10.1039/c2cc31962d.

(141) Chen, W.; Zhang, Y.; Li, J.; Lou, X.; Yu, Y.; Jia, X.; Li, C. Synthesis of a Cationic Water-Soluble Pillar[6]Arene and Its Effective Complexation towards

Naphthalenesulfonate Guests. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (72), 7956–7958. DOI: 10.1039/c3cc44328k.

(142) Ogoshi, T.; Ueshima, N.; Yamagishi, T. A. An Amphiphilic Pillar[5]Arene as Efficient and Substrate-Selective Phase-Transfer Catalyst. *Org. Lett.* **2013**, *15* (14), 3742–3745. DOI: 10.1021/ol4016546.

(143) Ogoshi, T.; Shiga, R.; Hashizume, M.; Yamagishi, T. A. "Clickable" Pillar[5]Arenes. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (24), 6927–6929. DOI: 10.1039/c1cc11864a.

(144) Wu, X. L.; Chen, Y.; Hu, W. J.; Liu, Y. a.; Jia, X. S.; Li, J. S.; Jiang, B.; Wen, K. Bis- and Mono(m-Benzoic Acid)-Functionalized Pillar[5]Arenes. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (22), 4897–4900. DOI: 10.1039/c7ob00984d.

(145) Fan, J.; Chen, Y.; Cao, D.; Yang, Y. W.; Jia, X.; Li, C. Host-Guest Properties of Pillar[7]Arene towards Substituted Adamantane Ammonium Cations. *RSC Adv.* **2014**, *4* (9), 4330–4333. DOI: 10.1039/c3ra46505e.

(146) Li, C.; Xu, Q.; Li, J.; Feina Yao; Jia, X. Complex Interactions of Pillar[5]Arene with Paraquats and Bis(Pyridinium) Derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (7), 1568–1576. DOI: 10.1039/b920146g.

(147) Ma, Y.; Chi, X.; Yan, X.; Liu, J.; Yao, Y.; Chen, W.; Huang, F.; Hou, J. L. Per - Hydroxylated Pillar[6]Arene: Synthesis, x-Ray Crystal Structure, and Host-Guest Complexation. *Org. Lett.* **2012**, *14* (6), 1532–1535. DOI: 10.1021/ol300263z.

(148) Han, C.; Yu, G.; Zheng, B.; Huang, F. Complexation between Pillar[5]Arenes and a Secondary Ammonium Salt. *Org. Lett.* **2012**, *14* (7), 1712–1715. DOI: 10.1021/ol300284c.

(149) Ogoshi, T.; Demachi, K.; Kitajima, K.; Yamagishi, T. A. Monofunctionalized Pillar[5]Arenes: Synthesis and Supramolecular Structure. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (25), 7164–7166. DOI: 10.1039/c1cc12333e.

(150) Xia, B.; He, J.; Abliz, Z.; Yu, Y.; Huang, F. Synthesis of a Pillar[5]Arene Dimer by Co-Oligomerization and Its Complexation with n-Octyltrimethyl Ammonium Hexafluorophosphate. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (34), 4433–4436. DOI: 10.1016/j.tetlet.2011.06.065.

(151) Xia, W.; Hu, X. Y.; Chen, Y.; Lin, C.; Wang, L. A novel redox-responsive pillar[6]arene-based inclusion complex with the ferrocenium guest. *Chem. Commun*., **2013**,*49*, 5085-5087. DOI: 10.1039/C3CC41903G.

(152) Fan, J.; Deng, H.; Li, J.; Jia, X.; Li, C. Charge-Transfer Inclusion Complex Formation of Tropylium Cation with Pillar[6]Arenes. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (57), 6343–6345. DOI: 10.1039/c3cc42506a.

(153) Yu, G.; Han, C.; Zhang, Z.; Chen, J.; Yan, X.; Zheng, B.; Liu, S.; Huang, F. Pillar [6] Arene-Based Photoresponsive Host − Guest Complexation. **2012**, *52*, 2–8.

(154) Joseph, R.; Asok, A.; Joseph, K. Quinoline Appended Pillar[5]Arene (QPA) as Fe3+ Sensor and Complex of Fe3+ (FeQPA) as a Selective Sensor for F−, Arginine and Lysine in the Aqueous Medium. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *224*, 117390. DOI: 10.1016/j.saa.2019.117390.

(155) Nazarova, A. a.; Yakimova, L. S.; Padnya, P. L.; Evtugyn, V. G.; Osin, Y. N.; Cragg, P. J.; Stoikov, I. I. Monosubstituted Pillar[5]Arene Functionalized with

(Amino)Phosphonate Fragments Are "Smart" Building Blocks for Constructing Nanosized Structures with Some s-and p-Metal Cations in the Organic Phase. *New J. Chem.* **2019**, *43* (36), 14450–14458. DOI: 10.1039/c9nj03539g.

(156) Yang, J. L.; Yang, Y. H.; Xun, Y. P.; Wei, K. K.; Gu, J.; Chen, M.; Yang, L. J. Novel Amino-Pillar[5]Arene as a Fluorescent Probe for Highly Selective Detection of Au3+ Ions. *ACS Omega* **2019**, *4* (18), 17903–17909. DOI: 10.1021/acsomega.9b02951.

(157) Silveira, E. V.; Nascimento, V.; Wanderlind, E. H.; Affeldt, R. F.; Micke, G. a.; Garcia-Rio, L.; Nome, F. Inhibitory and Cooperative Effects Regulated by PH in Host-Guest Complexation between Cationic Pillar[5]Arene and Reactive 2-Carboxyphthalanilic Acid. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (15), 9684–9692. DOI: 10.1021/acs.joc.9b01377.

(158) Ogoshi, T.; Demachi, K.; Kitajima, K.; Yamagishi, T. A. Selective Complexation of N-Alkanes with Pillar[5]Arene Dimers in Organic Media. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (37), 10290–10292. DOI: 10.1039/c1cc14395f.

(159) Chen, Y.; He, M.; Li, B.; Wang, L.; Meier, H.; Cao, D. A Monophosphoryl Copillar[5]Arene: Synthesis and Host-Guest Complexation with Alkanols. *RSC Adv.* **2013**, *3* (44), 21405–21408. DOI: 10.1039/c3ra43744b.

(160) Shu, X.; Fan, J.; Li, J.; Wang, X.; Chen, W.; Jia, X.; Li, C. Complexation of Neutral 1,4-Dihalobutanes with Simple Pillar[5]Arenes That Is Dominated by Dispersion Forces. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (17), 3393–3397. DOI: 10.1039/c2ob25251a.

(161) Li, C.; Chen, S.; Li, J.; Han, K.; Xu, M.; Hu, B.; Yu, Y.; Jia, X. Novel Neutral Guest Recognition and Interpenetrated Complex Formation from Pillar[5]Arenes. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (40), 11294–11296. DOI: 10.1039/c1cc14829j.

(162) Wang, S.; Wang, Y.; Chen, Z.; Lin, Y.; Weng, L.; Han, K.; Li, J.; Jia, X.; Li, C. The Marriage of Endo-Cavity and Exo-Wall Complexation Provides a Facile Strategy for Supramolecular Polymerization. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (16), 3434–3437. DOI: 10.1039/c4cc08820d.

(163) Strutt, N. L.; Forgan, R. S.; Spruell, J. M.; Botros, Y. Y.; Stoddart, J. F. Monofunctionalized Pillar[5]Arene as a Host for Alkanediamines. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (15), 5668–5671. DOI: 10.1021/ja111418j.

(164) Lee, E.; Park, I. H.; Ju, H.; Kim, S.; Jung, J. H.; Habata, Y.; Lee, S. S. Formation of a Pillar[5]Arene-Based Two-Dimensional Poly-Pseudo-Rotaxane: Threading and Crosslinking by the Same Guest Molecules. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, *58* (33), 11296–11300. DOI: 10.1002/anie.201904183.

(165) Ogoshi, T.; Hamada, Y.; Sueto, R.; Sakata, Y.; Akine, S.; Moeljadi, A. M. P.; Hirao, H.; Kakuta, T.; Yamagishi, T. A.; Mizuno, M. Host–Guest Complexation Using Pillar[5]Arene Crystals: Crystal-Structure Dependent Uptake, Release, and Molecular Dynamics of an Alkane Guest. *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25* (10), 2497–2502. DOI: 10.1002/chem.201805733.

(166) Montecinos, R.; Diaz-Wilson, F.; Bravo-Sepulveda, A.; Salas, C. O.; Recabarren-Gajardo, G.; Nome, F. Investigation about the Complexation of Trimethylammonium-Derived Pillar[5]Arene with Indole and Azaindole Derivatives. *J. Phys. Org. Chem.* **2019**, *32* (1), 1–8. DOI: 10.1002/poc.3889.

CAPÍTULO 2

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

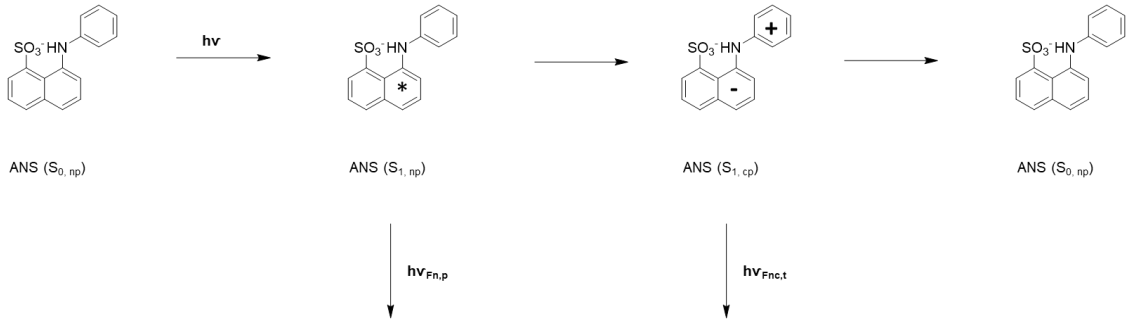
CAPÍTULO 2: INDUCIÓN DEL CAMBIO DE PROPIEDADES ASINCRÓNICO DE SONDAS FLUORESCENTES MEDIANTE EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR.

2.1 INTRODUCCIÓN.

Las sondas con propiedades fluorescentes siempre han generado una gran atención debido a sus múltiples aplicaciones; se usan en pinturas, tintas y dispositivos ópticos como resultado de su color, espectros con bandas anchas y un alto rendimiento cuántico [1–5] Además, en los últimos años, se han desarrollado múltiples ensayos en diagnóstico clínico. Una sonda fluorescente apta para la realización de experimentos en medios heterogéneos debe mostrar cambios significativos como mínimo en un parámetro: desplazamiento del máximo de emisión, cambios en el rendimiento cuántico, es decir, en la intensidad; o modificación de la anisotropía. Algunos ejemplos de este tipo de sistemas son: receptores supramoleculares [6–12], micelas y vesículas [13,14], microemulsiones [15,16] y proteínas [17–19], entre otros.

La alta sensibilidad del ácido 8-anilino-1-naftalenosulfonato (ANS) a los cambios de polaridad han convertido a esta sonda en el candidato ideal para la realización de estudios de sistemas agregados, cabe destacar que el pequeño tamaño del ANS (en comparación con moléculas biológicas) permite el estudio de este tipo de sistemas con una mínima interferencia. La propiedad más destacable de esta molécula es que, tanto su rendimiento cuántico como la longitud de onda del máximo de emisión, presentan una fuerte dependencia con la polaridad del medio. En medios no polares orgánicos presenta un rendimiento cuántico elevado y el máximo de emisión se desplaza hacia menores longitudes de onda si tomamos como referencia el agua, medio polar, donde la intensidad es prácticamente despreciable.

El comportamiento fotoquímico del ANS en diversos disolventes fue dilucidado por el grupo de Kosower a finales del siglo XX [20,21]. Se propuso como mecanismo que la absorción de luz conduce a un estado excitado local con geometría no planal ($S_{1,np}$) que evoluciona dando lugar a una transferencia electrónica intramolecular, el resultado de esta reacción es un estado cargado ($S_{1,ct}$) tal y como puede observarse en el esquema 1.



Esquema 1. Comportamiento fotoquímico del ANS y estructuras de los estados implicados.

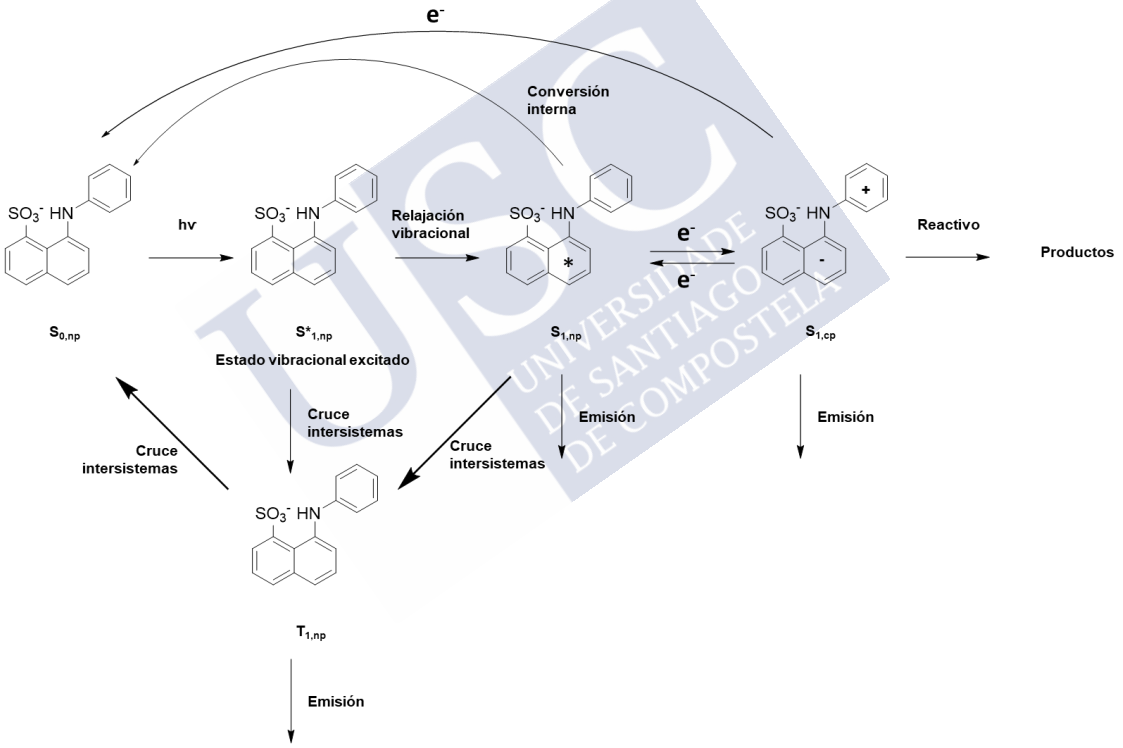
La representación de los puntos de energías de emisión y rendimiento cuántico frente a la polaridad del medio presentan una buena correlación mostrando dos pendientes claramente diferenciadas. La posición de la emisión predominante en disolventes no polares varía ligeramente con la polaridad, esto está asociado a un estado excitado del grupo naftaleno ($S_{1,np}$), la gran sensibilidad de la segunda emisión sólo puede ser explicada mediante una transferencia de carga desde el estado $S_{1,ct}$; la desactivación de la fluorescencia en medios polares está claramente asociada al estado $S_{1,ct}$.

Además de la polaridad del medio, se estudiaron factores como la viscosidad; la velocidad de conversión de $S_{1,np}$ a $S_{1,ct}$ es menor en disolventes viscosos lo que indica la participación de un electrón en el proceso de desactivación [22]. Esta asignación se hizo en base a las posiciones relativas del máximo de emisión y al rendimiento cuántico, desplazamientos hacia menores longitudes de onda y mayores rendimientos cuánticos son característicos del estado $S_{1,np}$ [21]. La constante de desactivación radiante, k_r, es más sensible a los cambios de polaridad que la constante de desactivación no radiante, k_{nr}, por lo tanto; la disminución de intensidad de fluorescencia se debe a la disminución de k_r en medios polares, es decir, a la disminución de la localización de la carga en el grupo n-arilo [22].

El estado $S_{1,np}$ puede desactivarse mediante cuatro vías : radiante, conversión interna, transferencia electrónica intramolecular o por una reacción fotoquímica. En disolventes no polares, prima el decaimiento por la vía radiante mientras que, en el caso de disolventes polares la constante de velocidad de conversión de $S_{1,ct}$ a $S_{1,np}$ aumenta llegando a ser mayor que la constante de velocidad asociada a la emisión radiante; esta reacción puede ser reversible tal y como ocurre en otras sondas como el 2,6-ANS y sus derivados [21]. El estado $S_{1,ct}$ se desactiva mediante dos vías, en disolventes con polaridad media se produce una emisión desde el estado excitado y, en medios con polaridad alta, se produce una transferencia electrónica a un estado vibracional de S_0 (Esquema 2).

Por ejemplo, en dioxano puro el espectro muestra dos bandas: a 463 nm correspondiente al estado $S_{1,np}$ y un pequeño hombro a 500 nm que implica la emisión desde $S_{1,ct}$. En agua pura el comportamiento es análogo, la banda situada a 535 nm corresponde a la emisión desde $S_{1,ct}$ mientras que el hombro a 480 nm evidencia la emisión desde $S_{1,np}$. Con disolventes de polaridad media, tales como el etilenglicol, se pueden apreciar dos bandas bien definidas.

A 77K la emisión desde $S_{1,ct}$ desaparece porque la velocidad de transferencia de carga depende de la viscosidad y polaridad, en un medio rígido el cambio configuracional está inhibido. Este comportamiento se observa por ejemplo en el etilenglicol, donde la emisión desde $S_{1,ct}$ desaparece a 77K recuperándose al acercarse al punto de fusión del disolvente; a continuación, la intensidad aumenta ligeramente y se produce un desplazamiento del máximo de emisión hacia longitudes de onda mayores debido a la relajación del disolvente. Analizando el tiempo de decaimiento a bajas temperaturas, 77K, se observa una tendencia monoexponencial en todos los disolventes desde $S_{1,np}$ a medida que aumenta la temperatura; cuando se alcanza un punto próximo a la temperatura de fusión se observa un decaimiento biexponencial que implica un equilibrio entre ambos estados excitados, si la temperatura continua aumentando se observa un nuevo comportamiento monoexponencial correspondiente a $S_{1,ct}$.



Esquema 2. Comportamiento fotoquímico del ANS.

2.2 MÉTODO EXPERIMENTAL.

Todos los reactivos y disolventes utilizados en este trabajo fueron obtenidos comercialmente siendo en todos los casos de la máxima pureza disponible. No se ha realizado ninguna purificación posterior.

Espectroscopía RMN: los espectros de RMN se adquirieron con un espectofotómetro de Varian Inova 750MHz equipado con sonda inversa de triple resonancia $^{1}H/^{13}C/^{31}P$ y triple eje de gradiente PFG para el uso de tubos convencionales de tamaño 5 mm. Los espectros han sido tomados a 5°C y, los desplazamientos químicos han sido referenciados al disolvente deuterado utilizado, el D_2O. Los espectros son procesados y analizados con el software Mestrenova 10.0. La asignación de las señales se ha llevado a cabo mediante experimentos 2D homo y heteronucleares.

Los espectros de diferencia de transferencia de saturación (del inglés STD, *Saturation Transfer Difference*) han sido adquiridos para muestras con formación de complejos 1:1 y 2:1 de DM-β-CD y ANS con acumulación de 128 *scans* en ambos experimentos. La saturación, tanto en el experimento STD_{on} como STD_{off}, consistió en un tren de pulsos selectivo de baja potencia con forma gaussiana de duración 50 ms, separados por un intervalo de 0.1 ms y 2dB cubriendo una banda de saturación de 70 Hz. El tren de pulsos de saturación *on* para el complejo DM-β-CD: ANS 1:1 se seleccionó según cada una de las nueve señales, el desplazamiento químico seleccionado se indica entre paréntesis y en ppm: H_2 (3.0), OMe_6 (3.03), OMe_2 (3.19), H_4 (3.28), H_6' (3.34), H_6 (3.40), H_5 (3.54), H_3 (3.62) y H_1 (4.91). Para la muestra de complejo DM-β-CD: ANS 2:1, se seleccionó un tren de frecuencia de pulsos correspondientes a las seis señales cuyo desplazamiento se indica entre paréntesis y en ppm: OMe_6 (3.25), OMe_2 (3.44), H_6 (3.61), H_5 (3.76), H_3 (3.85) y H1 (5.1). En cada uno de los experimentos de STD_{off} se seleccionó un tren de pulsos de saturación similar a los anteriores, pero con un desplazamiento del pulso de 20 ppm. El espectro STD_{off-on} ha sido adquirido con los *scans* correspondientes a los experimentos STD_{on} y STD_{off}, obteniéndose los FIDs automáticamente mediante la resta por el ciclo de fase. El espectro de control STD_{off} se ha adquirido mediante la aplicación del tren de pulsos de saturación *off* sin referencia del FID y con la mitad de scans, 64.

Se realizaron también experimentos de STD para las muestras de BSA: ANS 1:2500 y BSA: ANS 1:100. El pulso de secuencias incluye la supresión de la señal correspondiente al disolvente, D_2O, siendo el tren de pulso de saturación equivalente a los experimentos anteriores. La supresión de la señal del D_2O está basada en la secuencia DPFGSE (del inglés *double pulse field gradient spin echo*) y aplicación de pulsos gausianos selectivos de 180 grados de 2 ms en la frecuencia correspondiente al agua (4.7 ppm). La frecuencia de saturación del STD_{on} se desplaza 1.12 ppm correspondientes a la región de los protones alifáticos de BSA, la frecuencia de saturación en el espectro STD_{off} se desplaza a 20 ppm. El espectro STD_{off-on} se adquiere mediante el intercalado de los experimentos de STD_{off} y STD_{on}

y autoadquisición de los FIDs. Los espectros se realizan mediante la exploración de una serie de tiempos de saturación y *scans* constantes durante 4 s, esto incluye un período de 1s para la adquisición del FID. Para la muestra BSA:ANS 1:2500, cada STD ha sido medido con 2300 *scans* y diferentes tiempos de saturación (0.4, 0.8, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 s); para la muestra BSA:ANS 1:100 se han necesitado 640 *scans* y diferentes tiempos de saturación (0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.6, 2, 2.5 y 3s)

Modelización molecular: los cálculos necesarios para la determinación de la estructura de los diferentes complejos se realizan en el software VEGA ZZ mediante CHARMM. La estructura inicial de la DM-β-CD se construye a partir de experimentos de rayos X para la β-ciclodextrina donde todos los anillos de glucosa adoptan una conformación estable del tipo silla. Los grupos –OMe de los siete residuos de la DM-β-CD se disponen con un ángulo de torsión de -60°C definidos por los átomos O_5−C_5− C_6−O_6, de esta forma los protones H_6 y $H_{6'}$ del grupo –OMe se dispongan hacia el interior de la cavidad; los resultados obtenidos mediante NOE y STD concuerdan con esta disposición.

La estructura inicial de DM-β-CD y ANS se optimizó mediante la minimización de la energía, a continuación, se inició la modelización de los diferentes complejos partiendo de la inclusión de ANS en la cavidad del macrociclo, para el complejo 1:1 se partió de un modelo consistente con los resultados reflejados en NOE mientras que, para el complejo 2:1 se estudiaron dos posibilidades (distribución paralela o antiparalela de las dos DM-β-CD) optimizándose la estructura para alcanzar un mínimo de energía. Las estructuras finales se representaron mediante el software Pymol.

Espectroscopía de fluorescencia: todos los espectros de fluorescencia se registraron en un fluorímetro Cary Eclipse a temperatura constante, 25°C. El equipo cuenta con un sistema multicelda termostatizado para cubetas convencionales, se utilizaron en todos los experimentos cubetas de cuarzo de 1mm de paso de luz. Los espectros de fluorescencia del ANS, de las mezclas ANS y ciclodextrina y, de la mezcla ANS y BSA; se realizaron a una longitud de onda de excitación de 350 nm, apertura de 2.5 nm y 10 nm en rendija de excitación y emisión, respectivamente. La variación de intensidad se ha recogido a 505 nm.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

2.3.1 Comportamiento fotoquímico de ANS en diferentes medios.

El gran interés del ANS, tal y como se explica en el apartado 2.1, radica en su singular comportamiento fotoquímico. En mezclas de disolventes es de esperar que la solvatación de la sonda sea homogénea y, por tanto, que la variación de su rendimiento cuántico y posición se

modifiquen de forma sincrónica. Con el objetivo de comprobar la afirmación anterior se realizó un estudio del comportamiento del ANS con mezclas de disolventes (metanol/agua y 1,4-dioxano/agua).

Las mezclas se prepararon manteniendo constante la concentración de ANS (2.00 x 10^{-5}M) y variando la polaridad del medio según la composición de la mezcla. El comportamiento del ANS en los dos medios es equivalente, la intensidad de emisión aumenta y la posición de la banda se desplaza hacia menores longitudes de onda a medida que aumenta la proporción de disolvente orgánico en el medio, es decir, a medida que disminuye la polaridad del sistema (Fig. 1 y 2) Tal y como se esperaba, el cambio en las dos magnitudes se produce de forma sincrónica.

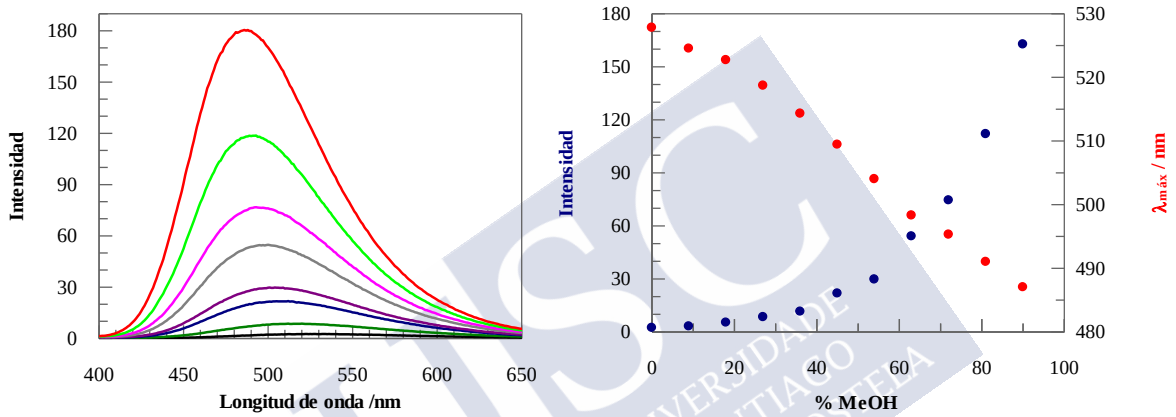


Figura 1. (Izquierda) Espectros de fluorescencia de ANS (2.00 x 10^{-5}M) con excitación a 350 nm y temperatura constante de 25°C al variar el porcentaje de metanol en el medio. (Derecha) Variación de la intensidad (a 505 nm) y posición de la longitud de onda del máximo al variar la proporción de MeOH/H_2O del medio.

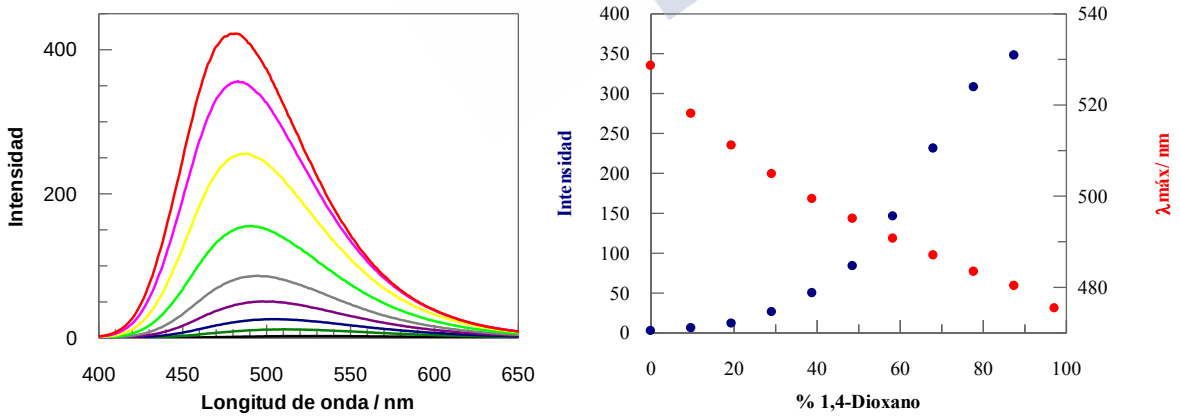


Figura 2. (Izquierda) Espectros de fluorescencia de ANS (2.00 x 10^{-5}M) con excitación a 350 nm y temperatura constante de 25°C al variar el porcentaje de 1,4-dioxano en el medio. (Derecha) Variación de la intensidad (a 505 nm) y posición de la longitud de onda del máximo al variar la proporción de 1,4-dioxano/H_2O del medio.

2.3.2 Comportamiento fotoquímico de ANS con DM-β-CD.

Con el fin de profundizar en el entendimiento del comportamiento fotoquímico de esta sonda en diferentes medios se procede a la evaluación de su comportamiento frente a un macrociclo, se selecciona la 2,6-dimetil-β-ciclodextrina (DM-β-CD) dada su alta solubilidad en agua. El principal interés del uso de un macrociclo en el estudio de este tipo de sistemas radica en la generación de capas de solvatación heterogéneas.

En primer lugar, se ha evaluado la influencia de la concentración de DM-β-CD sobre las propiedades del ANS, con este objetivo se han realizado espectros de fluorescencia a muestras con una concentración de sonda constante (2.00 x 10^{-5}M) y concentraciones crecientes de macrociclo; todos los experimentos se realizaron a una temperatura constante de 25 °C (Fig. 3) Tal y como se esperaba, se produce un aumento de la intensidad de fluorescencia a la vez que la banda correspondiente al ANS se desplaza hacia menores longitudes de onda debido a la inclusión de la sonda en la cavidad del macrociclo. Sin embargo, un análisis más profundo de la influencia de DM-β-CD sobre el comportamiento del ANS revela que la variación de sus propiedades no se produce de forma sincrónica, tal y como ocurría en las mezclas de disolventes del apartado 2.3.1.

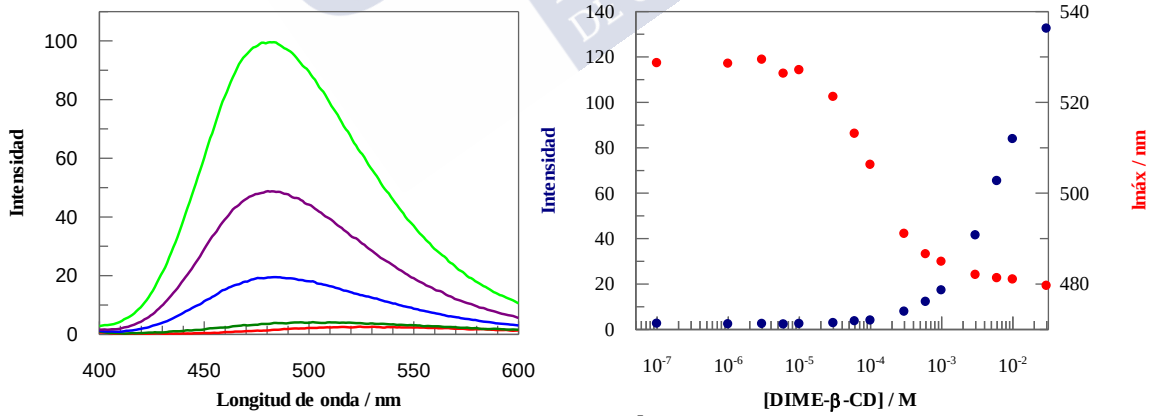


Figura 3. (Izquierda) Espectros de fluorescencia de ANS (2.00 x 10^{-5}M) con excitación a 350 nm y temperatura constante de 25°C al variar la concentración de DM-β-CD en el medio. (Derecha) Variación de la intensidad (a 505 nm) y posición de la longitud de onda del máximo al variar la concentración de DM-β-CD.

Como estimación inicial se puede establecer que aproximadamente el 95% del cambio de la posición de la banda se ha completado a una concentración de DM-β-CD de 1.00 x 10^{-3} M mientras que, tan solo un 10% del cambio en la intensidad se ha llevado a cabo. Como primera explicación a la variación asincrónica de la intensidad y la posición de la banda del

ANS, se propuso la formación de un complejo de inclusión de estequiometría 1:1 donde la solvatación de la molécula es heterogénea entorno a su estructura. Para conocer la constante de equilibrio del sistema se deduce una ecuación que relacione el cambio de intensidad y posición a partir del equilibrio formado.

$$\text{ANS} + \text{DM-}\beta\text{-CD} \rightleftharpoons 1{:}1$$

Esquema 3. Esquema de equilibrio de reacción entre ANS y DM-β-CD dando lugar a la formación de un complejo de estequiomería 1:1.

A partir del equilibrio planteado en el esquema 3 se establece la relación entre cada una de las moléculas con la constante de equilibrio (1) y, tras una reordenación de los términos y denominando x a la concentración de complejo formado, es decir a 1:1; se obtiene la expresión (2) que permite ajustar el modelo planteado a los datos experimentales (deducción completa del modelo en el apéndice 2.5.1). Cabe destacar que todas las concentraciones con cero como subíndice hacen referencia a concentraciones iniciales mientras que, todas aquellas que no disponen de subíndice hacen referencia a concentraciones en el equilibrio.

$$K = \frac{[1{:}1]}{[\text{ANS}][\text{DM-}\beta\text{-CD}]} \tag{1}$$

$$Kx^2 - K\left[\left([\text{DM-}\beta\text{-CD}]_0[\text{ANS}]_0\right)+1\right]x + K[\text{DM-}\beta\text{-CD}]_0[\text{ANS}]_0 = 0 \tag{2}$$

Resolviendo la ecuación 2 se determina la proporción de complejo 1:1 formado en el medio, para el cálculo de la constante de equilibrio será necesario relacionar el cambio en la intensidad y en la posición del máximo con la formación del complejo. El cambio en la intensidad se define mediante la suma de la contribución de cada una de las especies (3) siendo I_L y I_C la intensidad del ANS libre y complejado, respectivamente y; x_L y x_C la fracción molar de ANS libre y complejado, respectivamente. Mediante un balance de materia y reorganización de la ecuación (3) se obtiene la expresión (4).

$$I = I_L x_L + I_C x_C \tag{3}$$

$$I = I_C + \frac{I_L - I_C}{[\text{ANS}]_0} x_c \tag{4}$$

En el cambio de la longitud de onda se toma como aproximación la expresión (5) donde se supone que el máximo de emisión resultante es la suma de la contribución de cada una de las especies. Se considera esta expresión como una mera herramienta de aproximación ya que, la magnitud correcta para la determinación de la emisión individual de cada uno de los componentes viene dada por la deconvolucion de los espectros obtenidos. Al igual que en el

caso del cambio de intensidad, la nomenclatura elegida es λ_L y λ_C para la longitud de onda correspondiente al ANS libre y complejado, respectivamente.

$$\lambda = \lambda_L x_L + \lambda_C x_C \qquad (5)$$

Para calcular todos los parámetros del sistema se emplea un método iterativo utilizando el software *Solver* (Microsoft Excel), el ajuste del modelo planteado no resulta satisfactorio ya que, como se puede observar en la figura 4 no es posible ajustar de manera simultánea el cambio en intensidad y longitud de onda.

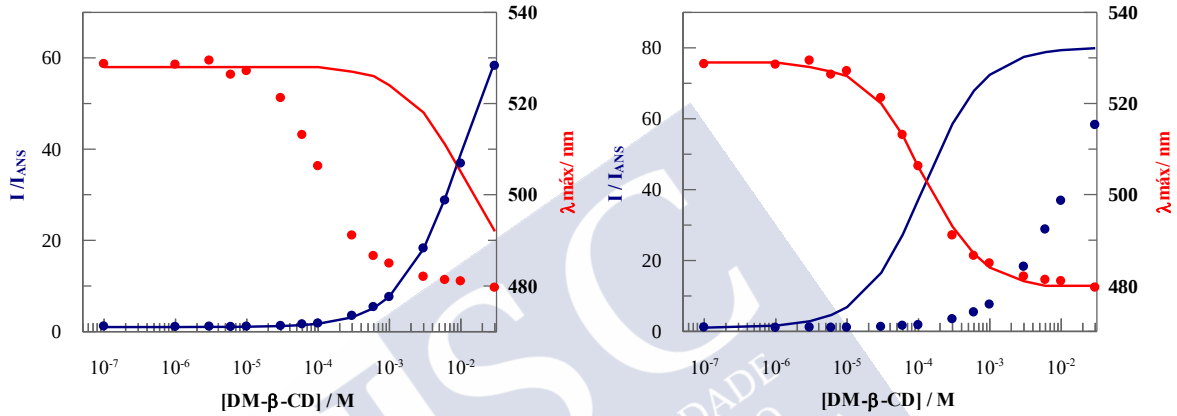


Figura 4. (Izquierda) Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración DM-β-CD y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 obteniendo un buen ajuste para la intensidad y un mal ajuste para el máximo de emisión. (Derecha) Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración DM-β-CD y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 obteniendo un buen ajuste para el máximo de emisión y un mal ajuste para la emisión.

En vista de los resultados anteriores es necesario plantear un modelo más complejo en el que intervengan un mayor número de moléculas, dadas las características estructurales del ANS y la DM-β-CD se plantea un nuevo modelo donde se forma un primer complejo de estequiometría 1:1. En este caso, el anillo de anilino del ANS se introduciría en la cavidad del DM-β-CD explicando el cambio en el máximo de emisión y el poco efecto sobre la intensidad. A continuación, y cuando la concentración de DM-β-CD es lo suficientemente elevada, una segunda ciclodextrina compleja el anillo de naftaleno con el consecuente efecto sobre la intensidad. El modelo planteado se muestra en el esquema 4.

$$\text{ANS} + \text{DM-β-CD} \overset{K_1}{\rightleftharpoons} 1{:}1$$

$$1{:}1 + \text{DM-β-CD} \overset{K_2}{\rightleftharpoons} 2{:}1$$

Esquema 4. Esquema de equilibrio de reacción entre ANS y DM-β-CD dando lugar a la formación de un complejo 1:1 y, a continuación, un complejo de estequiometría 2:1 al aumentar la concentración de DM-β-CD.

A partir del equilibrio planteado en el esquema 4 se establece la relación entre cada una de las moléculas con la constante de equilibrio (6 y 7) y, mediante un balance de masa y denominando x a la concentración de DM-β-CD libre; se obtiene la expresión (8) que permite ajustar el modelo planteado a los datos experimentales (deducción completa del modelo en el apéndice 2.5.2) Cabe destacar que todas las concentraciones con cero como subíndice hacen referencia a concentraciones iniciales mientras que, todas aquellas que no disponen de subíndice hacen referencia a concentraciones en el equilibrio.

$$K_1 = \frac{[1:1]}{[ANS][DM\text{-}\beta\text{-}CD]} \quad (6)$$

$$K_2 = \frac{[2:1]}{[1:1][DM\text{-}\beta\text{-}CD]} \quad (7)$$

$$K_1K_2x^3 + \left[K_1 + (K_1K_2)\left(2[ANS]_0 - [DM\text{-}\beta\text{-}CD]_0\right)\right]x^2 + \left[1 + K_1\left([ANS]_0 - [DM\text{-}\beta\text{-}CD]_0\right)\right]x - [ANS]_0 = 0 \quad (8)$$

Al igual que para el modelo inicial, se plantea el cambio en la intensidad como la suma de todas las contribuciones denominando I_L, $I_{1:1}$ y $I_{2:1}$ a la intensidad del ANS libre, complejo 1:1 y complejo 2:1, respectivamente; de igual manera se denomina x_L, $x_{1:1}$ y $x_{2:1}$ a la fracción molar de ANS libre, complejo 1:1 y complejo 2:1, respectivamente (9). El cambio en la posición se plantea de nuevo mediante la aproximación de considerar una suma de contribuciones siendo λ_L, $\lambda_{1:1}$ y $\lambda_{2:1}$ la posición del ANS libre, complejo 1:1 y complejo 2:1 (10).

$$I = I_L x_L + I_{1:1} x_{1:1} + I_{2:1} x_{2:1} \quad (9)$$

$$\lambda = \lambda_L x_L + \lambda_{1:1} x_{1:1} + \lambda_{2:1} x_{2:1} \quad (10)$$

Para resolver la ecuación 2.8 y determinar las constantes de equilibrio del sistema se aplica el método Newton-Raphson, una vez obtenida la solución se emplea de nuevo un método iterativo para la determinación del valor de las constantes de equilibrio. Tal y como puede observarse en la figura 5, el ajuste global del modelo planteado proporciona un resultado óptimo dando lugar a la determinación del valor de las constantes de equilibrio: $K_1 = (9.7 \pm 0.1) \times 10^3\ M^{-1}$ y $K_2 = (73 \pm 5)\ M^{-1}$. Además, se obtiene la posición relativa de cada uno de los complejos $\lambda_{1:1}$ = 481 nm y $\lambda_{2:1}$ = 479 nm; y la intensidad relativa de cada uno de ellos $I_{1:1}$ = 2.1 y $I_{2:1}$ = 93.6.

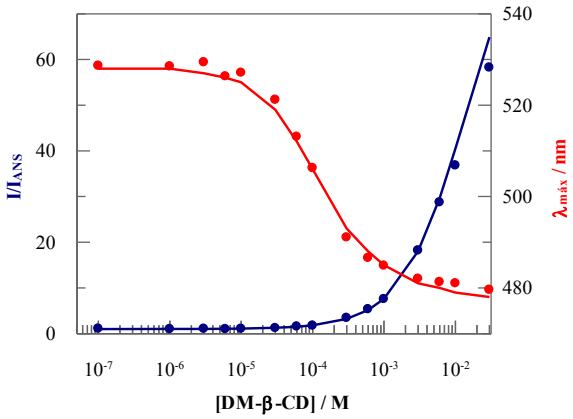


Figura 5. Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración DM-β-CD y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 y 2:1 obteniendo un buen ajuste para la intensidad y el máximo de emisión.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la determinación de la longitud de onda de emisión se ha calculado suponiendo que se trata de una magnitud aditiva, para comprobar si esta simplificación aporta unas predicciones correctas se ha realizado la deconvolución de cada uno de los espectros de emisión en los que la concentración de DM-β-CD es inferior a 10^{-4}M (Fig. 6). Mediante este tratamiento se puede calcular además la fracción molar de complejo 1:1 en función de la concentración de DM-β-CD, a partir de las cuales se determina que el valor de la constante K_1 es (9.1 ± 0.6) x 10^3 M^{-1} (Fig 7). El segundo parámetro que se valora es la posición del complejo 1:1, la deconvolución de los espectros muestran dos bandas con forma gaussiana. La primera banda con centro en 18818 cm^{-1}, correspondiente a una longitud de onda de 531 nm, se identifica con el ANS libre en agua mientras que, la segunda con centro en 20841 cm^{-1}, correspondiente a 480 nm, se identifica con el ANS que se encuentra en la cavidad de la DM-β-CD. Es importante destacar que los valores obtenidos para la constante K_1 y las posiciones en el espectro mediante su deconvolución son muy similares a los obtenidos mediante la simplificación inicial (10). La razón de esta similitud se encuentra en el hecho de que con concentraciones inferiores a 10^{-4}M sólo es posible un único proceso de complejación, se pone de manifiesto, por tanto, la posibilidad de usar un método más sencillo para la predicción de máximos de emisión de fluorescencia.

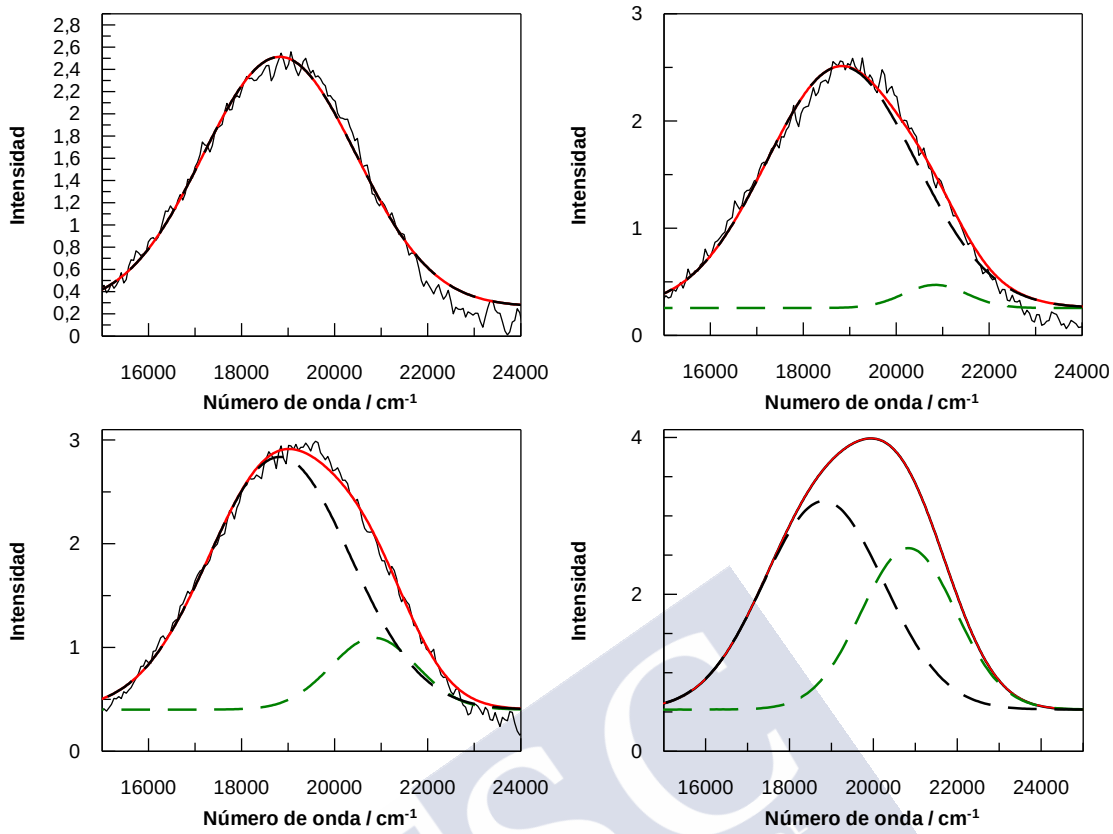


Figura 6. Deconvolución de espectros de fluorescencia mostrándose (—) espectro de fluorescencia, (—) ajuste global, (- -) ANS en agua y (- -) complejo 1:1 de muestras con concentración constante de ANS 2.00 x 10^{-5} M y concentración de DM-β-CD: a) 0.00M, b) 6.00 x 10^{-6}M, c) 3.00 x 10^{-4}M y d) 1.00 x 10^{-4}M.

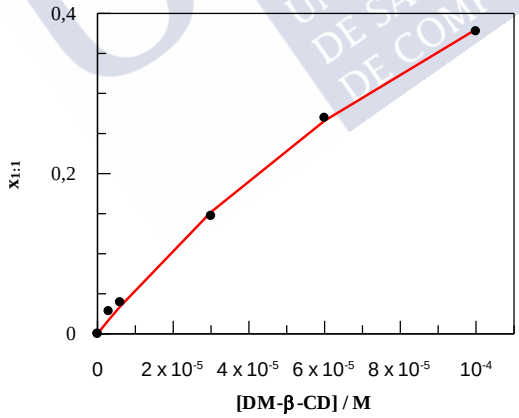


Figura 7. Fracción molar de complejo 1:1 frente a la concentración total de DM-β-CD y ajuste al modelo (2.2) en color rojo.

La formación de complejos con estequiometría 1:1 y 2:1 entre β-ciclodextrinas modificadas y otros naftalenosulfonatos ya ha sido estudiada exclusivamente mediante la variación del rendimiento cuántico [40]. En esta tesis doctoral, además, se ha estudiado la estructura de ambos complejos mediante resonancia magnética nuclear usando STD (*Saturation Transfer Difference*). Se seleccionó esta técnica dado que está considerada como uno de los mejores métodos en la dilucidación de estructuras de complejos en disolución, aporta información acerca de las interacciones intermoleculares entre protones de un ligando

y un receptor molecular que interactúan dando lugar a un equilibrio. En este estudio se utiliza la metodología STD, en conjunto con dinámica molecular, para confirmar los resultados obtenidos mediante espectroscopía de fluorescencia.

En primer lugar, es necesario la asignación de cada uno de los desplazamientos químicos de los diferentes protones del ANS y DM-β-CD (Fig 8). Se realiza una combinación de experimentos mono y bidimensionales (^{1}H, ^{13}C, HSQC y HMBC) a una muestra de 0.5 mM de ANS en D_2O (apéndice 2.5.3). De igual manera, para determinar el desplazamiento químico del complejo 1:1, se realizan los mismos experimentos mono y bidimensionales sobre una muestra de 0.5 mM de ANS y 1.0 mM de DM-β-CD donde la mayor parte del ANS forma parte de un complejo de inclusión (apéndice 2.5.4).

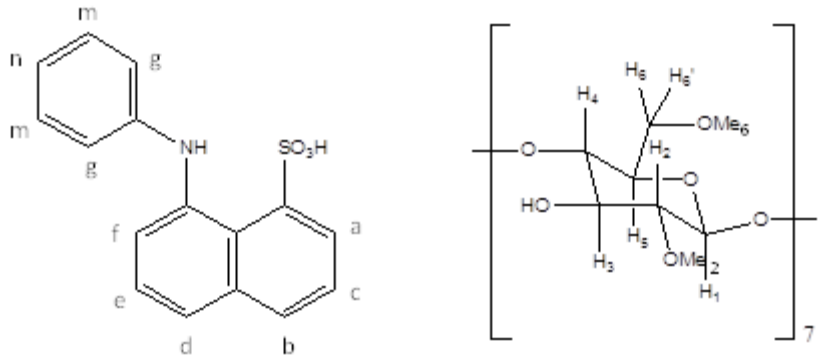


Figura 8. (Izquierda) Estructura y nomenclatura de cada uno de los protones del ANS. (Derecha) Estructura y nomenclatura de cada uno de los protones de DM-β-CD.

El espectro de STD obtenido para la muestra con complejo 1:1 se muestra en la figura 9, en la región aromática aparece la respuesta de algunas de las señales del ANS cuando se saturan señales específicas de DM-β-CD. Especialmente significativos son los fuertes picos detectados para la molécula de ANS asignados como m, g y n (anillo de anilino) y los protones e y f (anillo de naftaleno). Estas respuestas de STD aparecen cuando cualquiera de los protones H_3, H_5, H_6, $H_{6'}$ o H_4 del macrociclo son saturados. La saturación de los protones H_1, OMe_2 y OMe_6 de DM-β-CD no causan ninguna respuesta STD en los picos correspondientes al ANS, se consideran por tanto como anti-STD en el proceso de modelización molecular.

La estructura obtenida es consistente con la relación de proximidades establecida mediante los experimentos de STD, así como por los anti-STD observados. La estructura optimizada muestra al anillo del ANS en la cavidad de DM-β-CD donde se establecen un gran número de contactos STD entre los protones del anillo de anilino y los protones H_3, H_5, H_6, $H_{6'}$o H_4 de DM-β-CD. El anillo de naftaleno, por el contrario, se sitúa relativamente fuera de la cavidad razón por la que solo se establecen débiles STD intermoleculares entre los protones e y f y los ya citados protones del macrociclo. Es importante destacar que en la estructura del complejo 1:1 los protones a y b del ANS están expuestos al disolvente y por lo tanto, no establecen contactos del tipo STD con el DM-β-CD (Fig. 10).

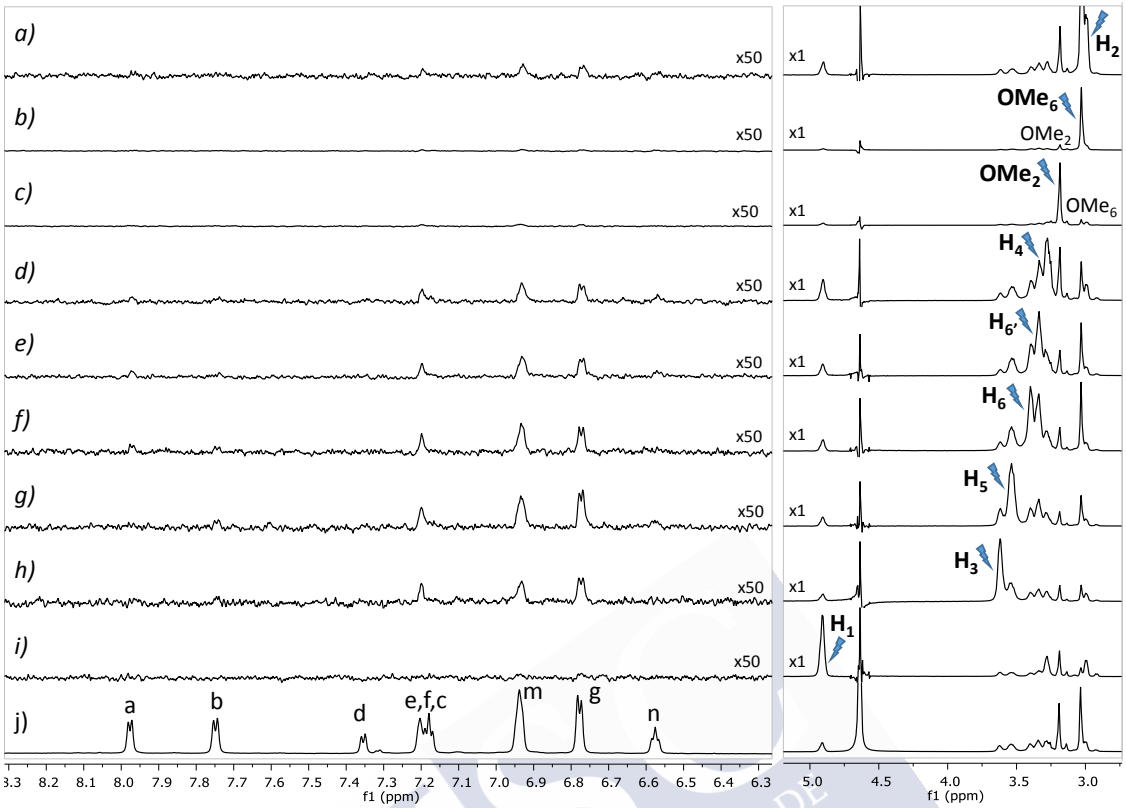


Figura 9. Espectros de STD correspondientes a la formación de un complejo de estequiometría 1:1. Los espectros a-i son los STD^{off-on} 1D mientras que el espectro j es el STD^{off} 1D que sirve como referencia. Las señales saturadas se indican con un rayo de color azul en cada uno de los experimentos.

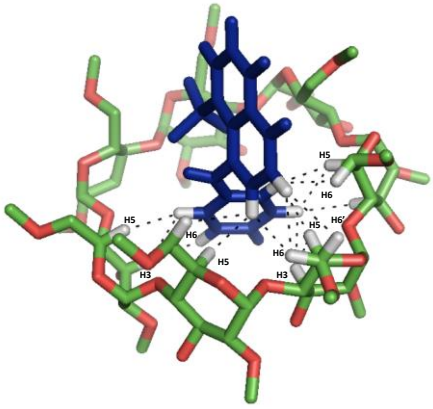


Figura 10. Estructura obtenida mediante dinámica molecular para el complejo de DM–β-CD:ANS con estequiometría 1:1. Todas las distancias protón-protón que se muestran son inferiores a 3.0 Å.

El espectro de STD obtenido para una muestra de concentración 0.45 mM de ANS y 68 mM de DM-β-CD permite el estudio de la estructura del complejo con estequiometría 2:1 ya que, el exceso de anfitrión es lo suficientemente elevado como para poder formar este nuevo tipo de complejo en disolución. Los espectros de STD se muestran en la figura 11, se puede observar que como en el caso anterior, se obtiene respuesta por parte de ciertos protones del ANS cuando se saturan señales específicas de DM-β-CD; en concreto, los protones H_3, H_5 y

H_6, a diferencia que en el estudio del complejo 1:1, en el complejo 2:1 se producen respuestas STD que implican tanto protones del anillo de anilino como al de naftaleno. Especialmente interesante es la respuesta de los protones a y b del ANS ya que en el caso del complejo 1:1 no se observa ninguna respuesta STD. Por otra parte, la saturación de los protones H_1, OMe_2 y OMe_6 de DM-β-CD no generan señales STD especificas por lo que se consideran como antiSTD para la modelización de la estructura. La optimización de la estructura del complejo 2:1 presenta dos posibles estructuras, la disposición de las dos moléculas de DM-β-CD puede ser paralela o antiparalela; en principio, estas dos estructuras son distinguibles mediante STD. Dado que la única disposición que permite STD intermolecular entre los grupos OMe_6 y OMe_2 es la disposición antiparalela (aparición de picos STD entre OMe_6-OMe_2 y viceversa en la figura 11) se considera esta estructura como la correcta. En base a todas estas consideraciones, la optimización del sistema permite dilucidar la estructura del complejo 2:1 (Fig 12) que es consistente con todos los STDs intermoleculares y también, con los antiSTDs. En la estructura determinada se observa como el anillo de anilino se encuentra en la cavidad de una DM-β-CD mientras que el anillo de naftaleno se inserta en la cavidad de una segunda ciclodextrina, mediante esta disposición se establecen un gran número de STDs intermoleculares entre los protones H_3, H_5 y H_6 con los protones a y b del ANS.

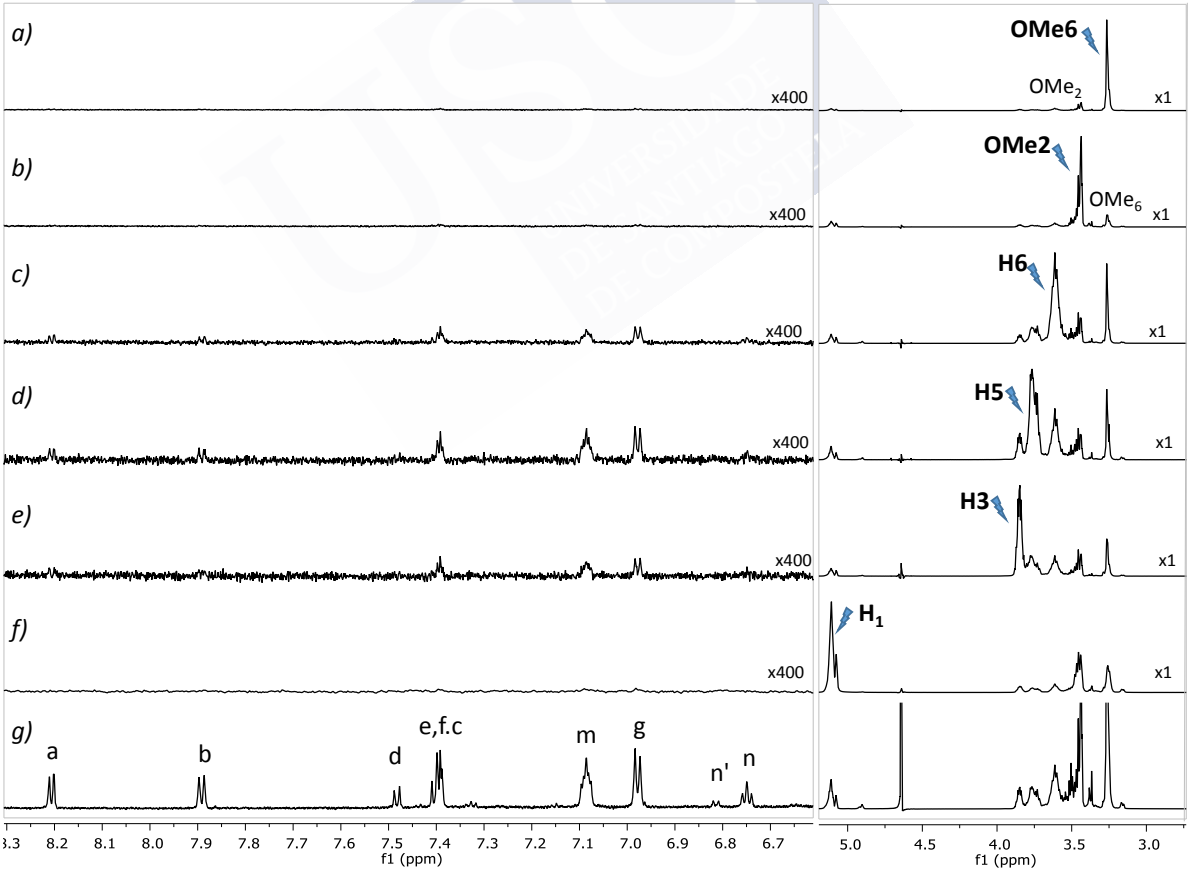


Figura 11. Espectros STD obtenidos para un complejo de estequiometría 2:1 entre el ANS y DM-β-CD. Los espectros a-f son los $STD^{off\text{-}on}$ 1D mientras que el espectro g es el STD^{off} 1D que sirve como referencia. Las señales saturadas se indican con un rayo de color azul en cada uno de los experimentos.

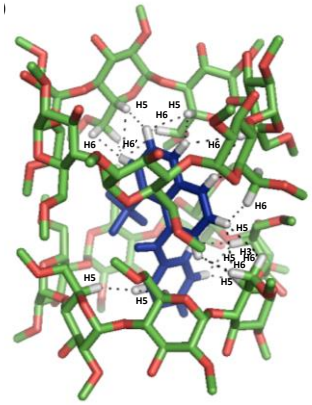


Figura 12. Estructura del complejo 2:1 formado entre la DM-β-CD y el ANS en disolución acuosa. Todas las distancias protón-protón que se muestran son inferiores a 3.0 Å.

Finalmente, la dilucidación de las estructuras concuerda con los resultados obtenidos mediante resonancia magnética nuclear (STD) y, además, confirma los resultados obtenidos mediante espectroscopia de fluorescencia.

2.3.3 Comportamiento fotoquímico de ANS con α, β y γ-CD.

La microsolvatación del ANS al formar complejos de inclusión con la DM-β-CD conduce a la variación asincrónica de sus propiedades, con el objetivo de comprobar si este comportamiento es exclusivo de DM-β-CD o puede ser generalizado para otro tipo de ciclodextrinas, se realiza un estudio de la influencia del tamaño de la cavidad. Este estudio se realiza en las mismas condiciones descritas en el apartado 2.3.1 de este capítulo, de forma que se evalúa la influencia de las tres ciclodextrinas naturales sobre las propiedades del ANS.

En una primera aproximación y tal y como se puede observar en las figuras 13, 14 y 15, el comportamiento del ANS parece ser paralelo al observado con la DM-β-CD, en todos los casos el desplazamiento de $\lambda_{máx}$ tiene lugar a bajas concentraciones de ciclodextina, mientras que el cambio en la intensidad no es factible hasta que la concentración de macrociclo es elevada. Si bien cabe destacar, que en el caso de la α-CD la variación asincrónica es menos evidente que con la β y γ-CD.

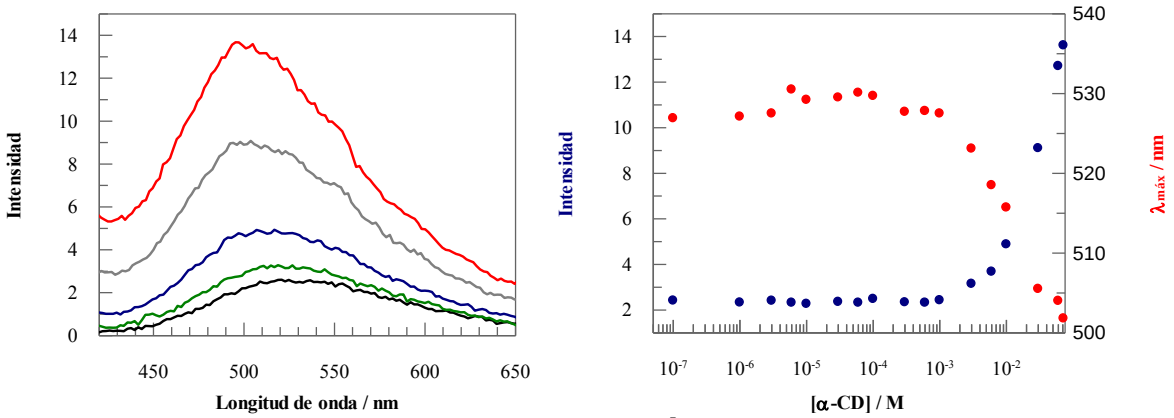


Figura 13. (Izquierda) Espectros de fluorescencia de ANS (2.00 x 10^{-5}M) con excitación a 350 nm y temperatura constante de 25°C al variar la concentración de α-CD en el medio. (Derecha) Variación de la intensidad (a 505 nm) y posición de la longitud de onda del máximo al variar la concentración de α-CD.

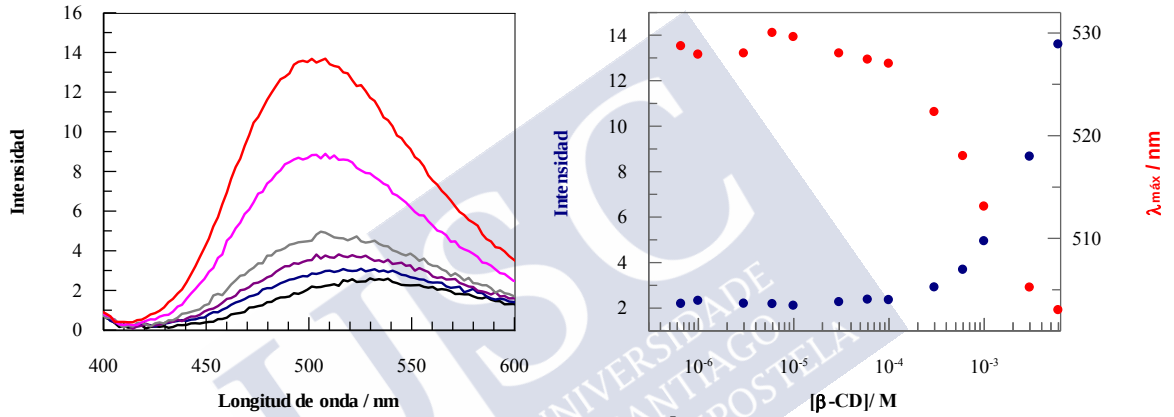


Figura 14. (Izquierda) Espectros de fluorescencia de ANS (2.00 x 10^{-5}M) con excitación a 350 nm y temperatura constante de 25°C al variar la concentración de β-CD en el medio. (Derecha) Variación de la intensidad (a 505 nm) y posición de la longitud de onda del máximo al variar la concentración de β-CD.

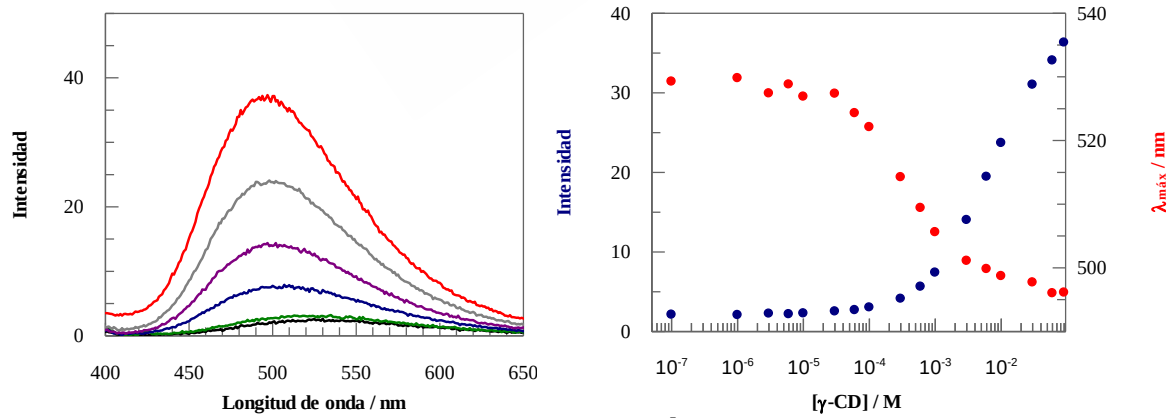


Figura 15. (Izquierda) Espectros de fluorescencia de ANS (2.00 x 10^{-5}M) con excitación a 350 nm y temperatura constante de 25°C al variar la concentración de γ-CD en el medio. (Derecha) Variación de la intensidad (a 505 nm) y posición de la longitud de onda del máximo al variar la concentración de γ-CD.

El protocolo utilizado para la determinación de las constantes de equilibrio asociadas a cada uno de los sistemas es el mismo del apartado 2.3.1 de este capítulo. El estudio comienza suponiendo la formación de un complejo de inclusión con estequiometría 1:1, el ajuste de los datos a la expresión (2.2) se realiza con el mismo método iterativo. Tal y como se puede observar en las figuras 16, 17 y 18 el ajuste no es satisfactorio, al igual que en el sistema formado por la DM-β-CD y el ANS, no es posible analizar de manera simultánea el cambio en la intensidad y en la posición del máximo de emisión. Este resultado es especialmente significativo en el estudio de la influencia de α-CD sobre las propiedades de ANS ya que, la asincronicidad es menos evidente que con β y γ-CD.

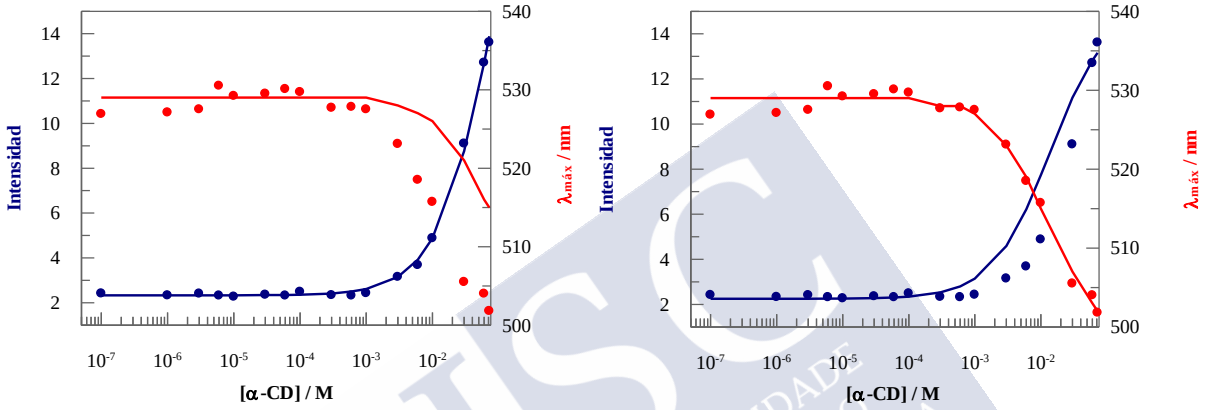


Figura 16. (Izquierda) Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración α-CD y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 obteniendo un buen ajuste para la intensidad y un mal ajuste para el máximo de emisión. (Derecha) Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración α-CD y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 obteniendo un buen ajuste para el máximo de emisión y un mal ajuste para la emisión.

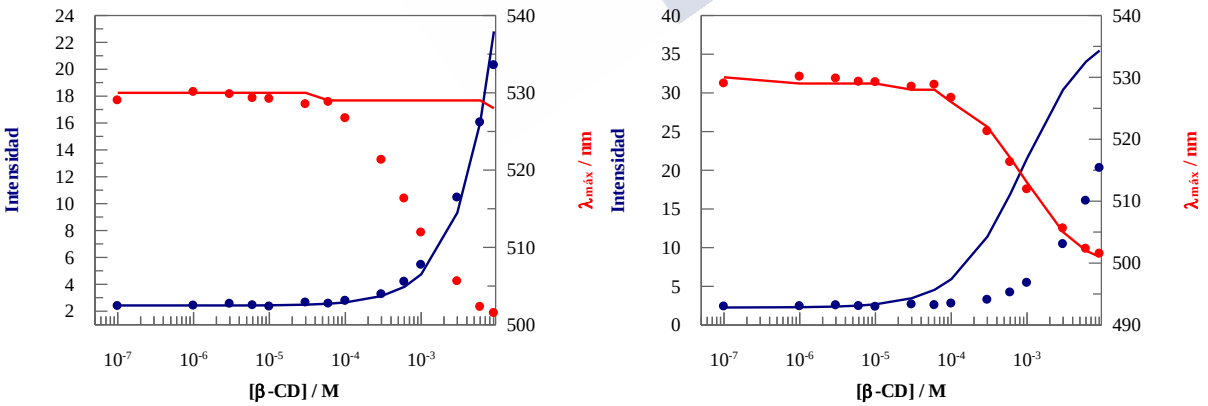


Figura 17. (Izquierda) Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración β-CD y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 obteniendo un buen ajuste para la intensidad y un mal ajuste para el máximo de emisión. (Derecha) Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración β-CD y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 obteniendo un buen ajuste para el máximo de emisión y un mal ajuste para la emisión.

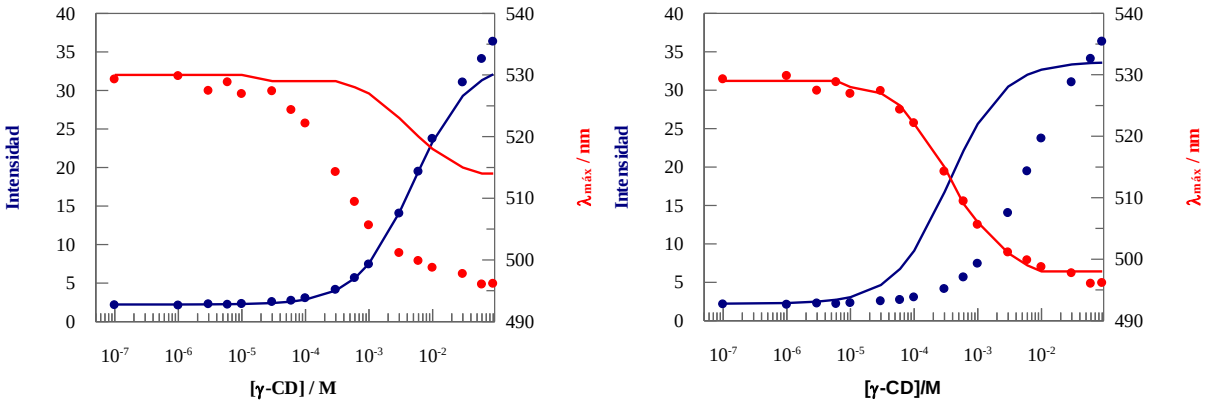


Figura 18. (Izquierda) Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración γ-CD y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 obteniendo un buen ajuste para la intensidad y un mal ajuste para el máximo de emisión. (Derecha) Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración γ-CD y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 obteniendo un buen ajuste para el máximo de emisión y un mal ajuste para la emisión.

Dado que no es posible explicar ninguno de los tres sistemas mediante un modelo de compleción simple, y en base a los estudios previos, se propone de nuevo el modelo de complejación (8) donde se asume la formación de un primer complejo de estequiometría 1:1 que evoluciona, al aumentar la concentración de ciclodextrina en el medio, a un complejo de estequiometría 2:1. En todos los casos, se obtiene una buena correlación entre los datos experimentales y la ecuación propuesta (Fig. 19, 20 y 21) siendo posible la determinación tanto de las constantes de equilibrio como de la posición e intensidad relativa de cada uno de los complejos formados (Tabla 1 y 2). En todos los casos, los cambios en $\lambda_{máx}$ tienen lugar a concentraciones bajas de ciclodextrina mientras que, la intensidad de fluorescencia es afectada a concentraciones altas de macrociclo como consecuencia de la formación de complejos 2:1.

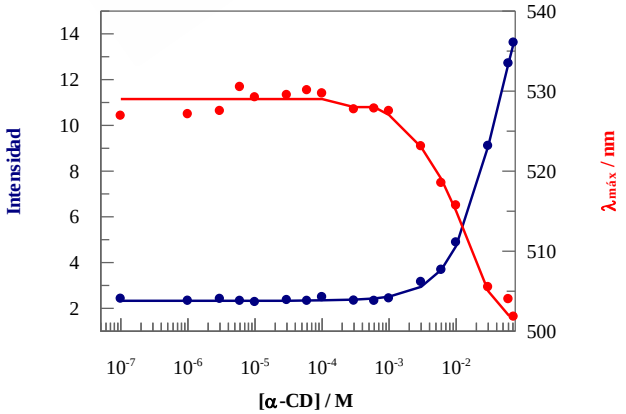


Figura 19. Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración α-CD y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 y 2:1 obteniendo un buen ajuste para la intensidad y el máximo de emisión.

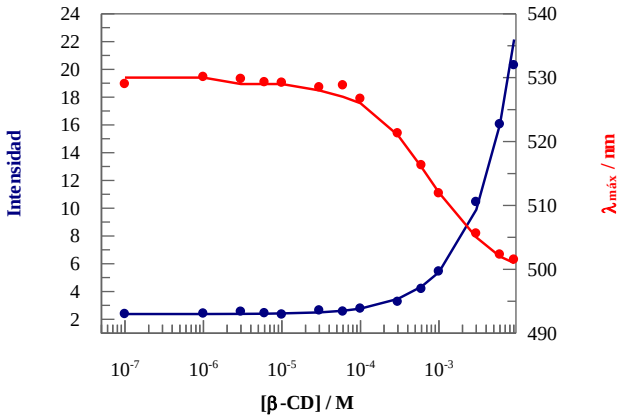


Figura 20. Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración β-CD y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 y 2:1 obteniendo un buen ajuste para la intensidad y el máximo de emisión.

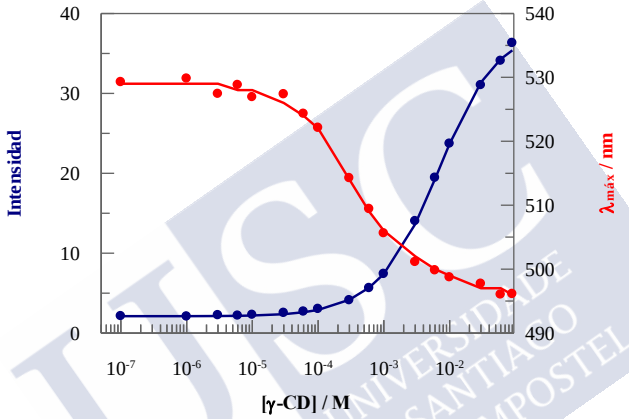


Figura 21. Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración γ-CD y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 y 2:1 obteniendo un buen ajuste para la intensidad y el máximo de emisión.

Tabla 1. Constantes de equilibrio, posición del máximo de emisión e intensidad relativa del complejo 1:1 formado entre ANS y diferentes ciclodextrinas obtenidos mediante el ajuste al modelo (8)

Ciclodextrina	K_1 / M^{-1}	$\lambda_{1:1}$ / nm	$I_{1:1/ANS}$
α-CD	62 ± 3	495	2.2
β-CD	(1.2 ± 0.1) x 10^3	498	2.2
DM-β-CD	(9.7 ± 0.1) x 10^3	481	2.1
γ-CD	(3.7 ± 0.3) x 10^3	501	2.2

Tabla 2. Constantes de equilibrio, posición del máximo de emisión e intensidad relativa del complejo 2:1 formado entre ANS y diferentes ciclodextrinas obtenidos mediante el ajuste al modelo (8)

Ciclodextrina	K_2 / M^{-1}	$\lambda_{2:1}$ / nm	$I_{2:1/ANS}$
α-CD	23 ± 3	502	8.8
β-CD	68 ± 9	501	20.2
DM-β-CD	73 ± 5	479	93.6
γ-CD	140 ± 18	496	18.0

La constante de equilibrio K_1 aumenta a medida que se incrementa el tamaño de la cavidad de la ciclodextrina siendo el valor obtenido para el complejo 1:1 entre α-CD y ANS el más pequeño y, el proceso entre γ-CD y ANS el más favorable. Comparando los resultados obtenidos de β-CD y DM-β-CD se puede afirmar que además del tamaño de la cavidad, la hidrofobicidad es un factor determinante, la funcionalización resultante de modificar los grupos OH por OMe en la estructura del macrociclo hace que la constante de equilibrio K_1 se incremente aproximadamente 8 veces. La constante de equilibrio K_2 muestra también una fuerte dependencia con el tamaño de la cavidad, siendo la γ-CD el mejor receptor; esto se debe a que es lo suficientemente grande como para que el anillo de naftaleno se acomode en su interior. Cabe destacar que en este caso la hidrofobicidad del macrociclo, a diferencia de la formación de complejos 1:1, no es determinante, las constantes de equilibrio K_2 obtenidas para β-CD y DM-β-CD son similares.

La intensidad de fluorescencia calculada para el complejo 1:1 es compatible con el modelo propuesto, ya que, muestra un aumento muy poco significativo en comparación con la intensidad de fluorescencia del ANS en medio acuoso, siendo además el valor obtenido independiente del tamaño de la cavidad. Por otro lado, la intensidad de fluorescencia calculada para el complejo 2:1 sí muestra una fuerte dependencia con el tamaño de la cavidad; si se compara el valor obtenido con α-CD y el resto de macrociclos, se puede establecer que la incorporación parcial del anillo de naftaleno del ANS dentro de la cavidad de la α-CD determina el valor obtenido, siendo este mucho menor que el valor obtenido para ciclodextrinas de mayor tamaño. En el caso de la γ-CD y debido a su gran tamaño, se produce un limitado desplazamiento de moléculas de agua del interior de la cavidad al producirse la inclusión del anillo de naftaleno, esto implica que el huésped se encuentra en un microambiente más hidrofilico que en el caso de ciclodextrinas más pequeñas. Por lo tanto, la capa de solvatación del naftaleno está constituida por un importante número de moléculas de agua, este factor explica el moderado aumento de la intensidad de fluorescencia. Se pone de nuevo de manifiesto la importancia de la hidrofobicidad cuando se compara el aumento de intensidad de DM-β-CD con las ciclodextrinas naturales, siendo este aumento aproximadamente unas cinco veces superior a su homóloga sin funcionalizar.

El cambio en $\lambda_{máx}$ está igualmente afectado por la hidrofobicidad y el tamaño de la cavidad, siguiendo la secuencia α, β y γ-CD se puede observar como a medida que aumenta el tamaño de la cavidad se produce un mayor desplazamiento de la posición (tomando como referencia la posición del ANS en agua) La ciclodextrina más pequeña muestra una baja afinidad por el ANS sin embargo, una vez se forma el complejo el anillo de anilino se acomoda perfectamente en la cavidad dando lugar a un importante efecto sobre la longitud de onda. Tal y como se esperaba, los valores obtenidos para el complejo 2:1 son prácticamente idénticos a los calculados para el complejo 1:1. La aproximación de la segunda ciclodextrina para dar lugar al complejo 2:1 con la α y β-CD, podría implicar un pequeño desplazamiento del anillo de anilino hacia el exterior de la cavidad, esto permitiría explicar que los valores calculados para $\lambda_{2:1}$ sean superiores a los obtenidos para $\lambda_{1:1}$. Por el contrario, en el caso de la

γ-CD y debido a su gran tamaño, no es necesario el desplazamiento del anillo de anilino, se forma una estructura del tipo [3]pseudorotaxano donde aumenta la hidrofobicidad y, consecuentemente, se produce un pequeño desplazamiento hacia menores longitudes de onda al comparar el complejo 1:1 con el 2:1.

Finalmente, es importante destacar que el proceso de inclusión entre ANS y β-CD ya ha sido estudiado anteriormente por otros grupos de investigación [6,23–27] analizando únicamente la variación de la intensidad de fluorescencia, las constantes obtenidas se encuentran en el rango de 60-150 M^{-1} considerando exclusivamente la formación de un complejo 1:1. De manera paralela, los mismos estudios con α-CD determinan constantes de asociación en el rango de 0-5 M^{-1} [26]. Es evidente, que todos los estudios mencionados subestiman el proceso de complejación, dando lugar a conclusiones incorrectas cuando se utiliza el ANS en procesos competitivos con el objetivo de determinar las constantes de asociación de otras sondas.

2.3.4 Comportamiento fotoquímico de ANS con Albúmina de Suero Bobino (BSA).

La gran repercusión de este capítulo sería mostrar que el comportamiento asincrónico del ANS como respuesta a los cambios de solvatación no está limitado exclusivamente a receptores moleculares como las ciclodextrinas. Dado que una de las principales aplicaciones de las sondas fluorescentes es su uso para el estudio de proteínas, se selecciona la Albúmina de Suero Bobino (BSA) para testar si el comportamiento fotoquímico del ANS con ciclodextrinas es extrapolable a este tipo de sistemas.

La BSA es una de las proteínas más estudiadas hasta el momento, su estructura fue dilucidada a finales del siglo XX estableciéndose que en su estructura primaria sólo se registran dos triptofanos (Trp-134, Trp-212) [28]. Su estructura secundaria es en un 67% una hélice α, se pudo determinar que posee nueve bucles y diecisiete enlaces disulfuro; mediante experimentos de rayos X se pudo determinar que la BSA consta de tres dominios (I, II y III) que se dividen a su vez en dos subdominios (A y B).

Esta proteína presenta gran interés dado que entre sus principales funciones se encuentra el transporte de ácidos grasos, hormonas, iones metálicos y metabolitos. Las características de BSA como transportador dependerán, por tanto, de las fuerzas moleculares establecidas entre BSA y las substancias transportadas, tales como la formación de enlaces por puente de hidrógeno y fuerzas electrostáticas o hidrofóbicas presentes en los diferentes sitios de unión [28,29]. Por lo tanto, conocer las características de estas regiones es de vital importancia.

El conocimiento de las interacciones hidrofóbicas tiene una gran relevancia ya que, son determinantes a la hora de conocer la estructura de las proteínas, la mayoría de grupos hidrofóbicos se sitúan hacia el interior, sin embargo, aquellos que se sitúan en la superficie,

suelen desempeñar importantes funciones en el ámbito del reconocimiento molecular con pequeñas moléculas, otras proteínas o membranas. Esta es la razón por la que los estudios, y el desarrollo de nueva metodología, de las regiones hidrofóbicas de las proteínas sean cada vez más frecuentes [30–36].

Dada la importancia de esta proteína, son numerosos los estudios con diferentes sondas fluorescentes que se han realizado con la finalidad de esclarecer su estructura, una de las sondas utilizadas es el ANS. Estos estudios han aportado cierta discrepancia ya que dependiendo de la técnica empleada los resultados son diferentes.

Algunos autores han determinado mediante experimentos fluorimétricos que tan sólo una molécula de ANS entra en contacto con el sitio de unión de BSA, el equilibrio está determinado por una constante de asociación K de (1.20 ± 0.1) x 10^6 M^{-1} [37]. Por otra parte, otros autores han determinado mediante la misma técnica que BSA cuenta con 3-5 sitios de unión con afinidad similar ante ANS y, constantes de asociación K en el rango de (1.4-2.9) x 10^6 M^{-1} [17,38], el rendimiento cuántico calculado de ANS:BSA es de 0.46 [17], valor que concuerda con el rendimiento cuántico para ANS y otras proteínas (0.42-0.48) [30]. Si la técnica seleccionada para el estudio es diálisis y métodos potenciométricos, el número de sitios de unión asciende hasta 10 [39] con constantes de asociación K de 2.00 x 10^5 a 6.20 x 10^6 M^{-1} [40–45]. Finalmente, mediante experimentos de FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Förster) se determina que BSA posee cinco sitios de unión con constantes de asociación K entre 1.20 x 10^4 y 5.20 x 10^5, para los cuatro sitios con K mayor de $10^4 M^{-1}$ se establece que los sitios de unión se disponen a una distancia de 18-27Å de uno de los Trp, mientras que, el sitio de unión con K más pequeña se sitúa a más de 34Å de distancia de los dos Trp.

Ante todas estas discrepancias, en este capítulo se tratará de esclarecer la relación entre ANS y BSA utilizando la metodología descrita para la DM-β-CD. En primer lugar, se estudia la influencia de BSA sobre el comportamiento fotoquímico del ANS realizando espectros de fluorescencia en las mismas condiciones que las descritas en el apartado 2.3.1 (Fig 22), la concentración de ANS se mantiene constante durante todo el experimento en 2.00 x 10^{-5}M. Aparentemente, el comportamiento es muy similar al visto anteriormente con las ciclodextrias, se observa una importante variación de $\lambda_{máx}$ antes de que comience el cambio en la intensidad de fluorescencia; esto sugiere que el ANS se liga a la proteína mediante el anillo de anilino, tal y como ocurre con las ciclodextrinas estudiadas anteriormente.

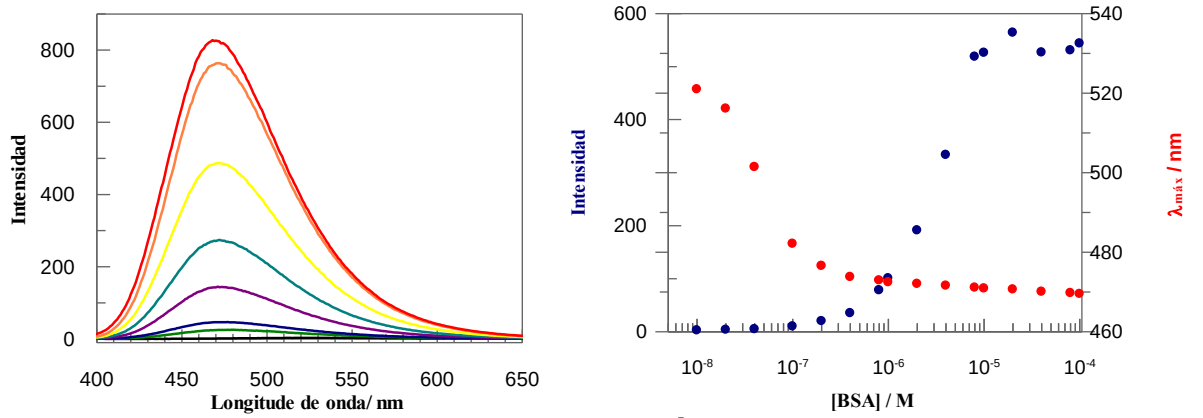


Figura 22. (Izquierda) Espectros de fluorescencia de ANS (2.00 x 10^{-5}M) con excitación a 350 nm y temperatura constante de 25°C al variar la concentración de BSA en el medio. (Derecha) Variación de: (•) intensidad a 505 nm y (•) posición de la longitud de onda del máximo al variar la concentración de BSA.

Como estudio complementario al anterior se ha realizado la influencia de ANS sobre BSA (Fig 23) manteniendo constante la concentración de BSA en 1.00 x 10^{-6}M y realizando espectros de fluorescencia excitando a 280 nm. Se puede observar la aparición de dos bandas, la primera correspondiente a la región del espectro de 320-380 nm, característica de BSA (concretamente de los dos Trp de la estructura) disminuye a medida que aumenta la concentración de ANS en el medio mientras que; la segunda, correspondiente a la región del espectro de 420-600 nm característica de ANS aumenta a medida que lo hace la concentración de sonda en el medio.

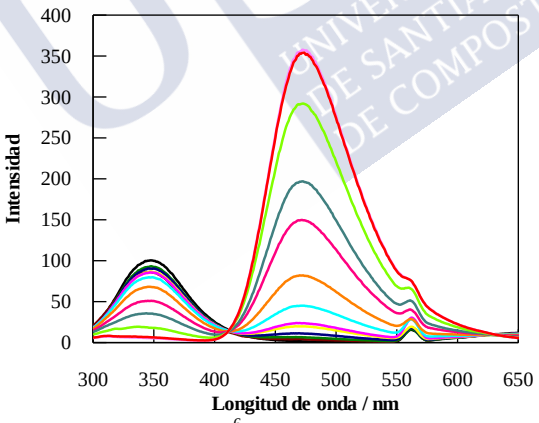


Figura 23. Espectros de fluorescencia de BSA (1.00 x 10^{-6}M) con excitación a 280 nm y temperatura constante de 25°C al variar la concentración de ANS en el medio.

Un estudio más pormenorizado de los espectros de fluorescencia mostrados en la figura anterior, nos permite deducir que la ausencia de cambios en la forma de las bandas es un indicativo de que la proteína no está sufriendo ningún proceso de desnaturalización. Además, el cambio en la intensidad de ambas bandas se produce de manera sincrónica (Fig 24). Un aspecto importante a destacar, es que el cambio de intensidad y posición del máximo de BSA es un proceso sincrónico (Fig. 24), esto indica que los cambios observados en el experimento anterior (Fig. 22) son resultado exclusivamente del comportamiento fotoquímico del ANS.

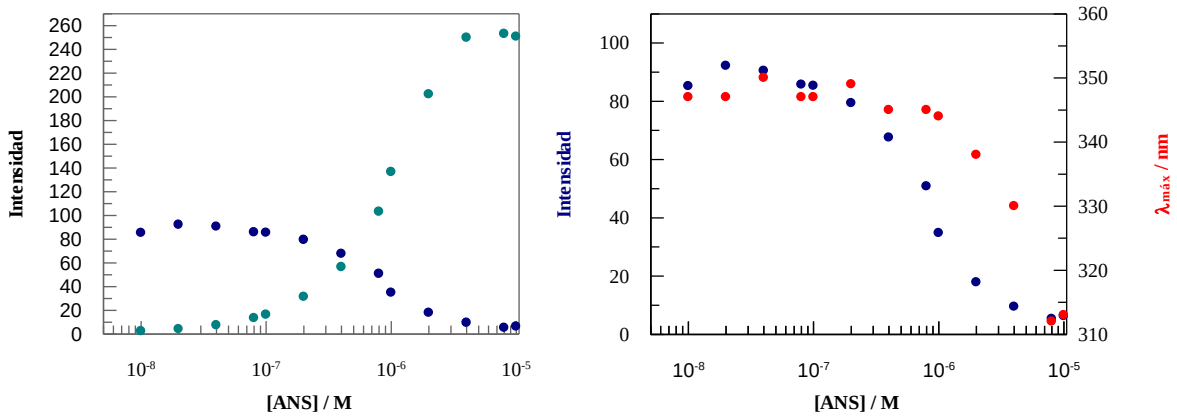


Figura 24. (Izquierda) Variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración de ANS de las bandas de: (•) BSA, 474 nm y (•) ANS, 505 nm. (Derecha) Variación de (•) intensidad y (•) $\lambda_{máx}$ de BSA al variar la concentración de ANS del medio.

Siguiendo el protocolo establecido en el apartado 2.3.1, la complejación de ANS por BSA se estudia mediante resonancia magnética nuclear, el primer experimento de STD se realiza sobre una muestra de BSA:ANS con una proporción de 1:2500 ya que esta muestra se corresponde con la situación experimental en la que el rendimiento cuántico no se ve alterado. El STD inicial se utiliza para determinar que parte de la estructura del ANS participa en el proceso de complejación [48,49]. En la figura 25 se muestra el espectro STD_{off} y $STD_{\textit{off-on}}$ al saturar la señal con desplazamiento químico 1.12 ppm correspondiente a la región alifática de BSA y, donde no aparece ninguna señal correspondiente a ANS. La aparición de señales en la región de ANS como respuesta de STD demuestra que en estas condiciones experimentales se produce la asociación de ambos compuestos. Para identificar que protones de ANS que forman parte del epítomo de BSA, se realizan una serie de experimentos con variación del tiempo de saturación de STD, esto permite construir las curvas de intensidad para cada uno de los protones de ANS (Fig 26) a partir de la combinación de las ecuaciones (12, 13 y 14).

$$STD = \frac{STD_{off}\text{-}STD_{on}}{STD_{off}} \qquad (12)$$

$$STD(t_{sat}) = STD_{max}\left[1\text{-}e^{-k_{sat}t_{sat}}\right] \qquad (13)$$

$$STD_0 = STD_{max}k_{sat} \qquad (14)$$

Los protones m y g del ANS presentan una pendiente positiva desde el inicio y a todos los tiempos de saturación; esto permite identificar que estos protones están implicados en el proceso de complejación, el resto de protones no presentan una respuesta inicial por lo que podemos asumir que no forman parte del epitomo de BSA; las respuestas posteriores son el resultado de un mecanismo de difusión de spin y no de una transferencia intermolecular dada por la proximidad de protones. Se puede afirmar, por tanto, que en la muestra estudiada se

produce una complejación del ANS por parte de BSA y, que el anillo de anilino de ANS interacciona directamente con el sitio de unión.

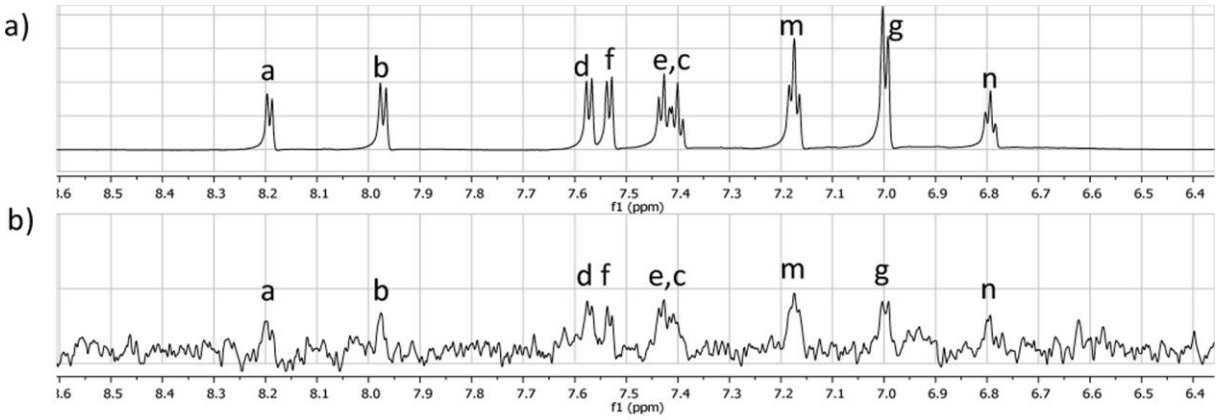


Figura 25. Experimentos de STD sobre una muestra de BSA:ANS 1:2500 a) Espectro STD_{off} y b) espectro $STD_{off\text{-}on}$ con tiempo de saturación 3s.

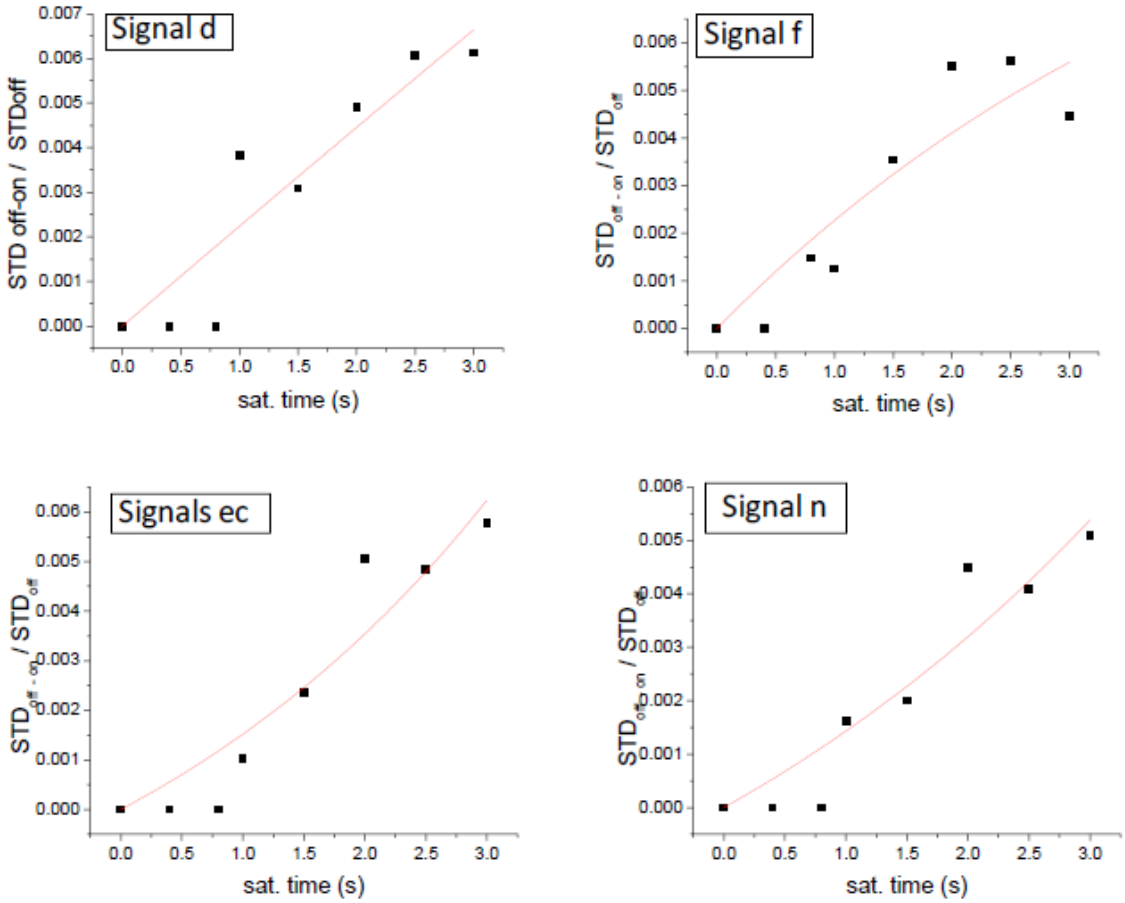


Figura 26. Análisis de STD inicial de una muestra de ANS:BSA 1:2500 para los protones d, f, c, e y n de la molécula de ANS determinados a partir de las ecuaciones 2.12, 2.13 y 2.14.

De manera similar, se estudia una muestra de ANS:BSA con composición 1:100 ya que, en estas condiciones experimentales tanto la intensidad de fluorescencia como la posición del máximo se encuentran afectadas. El STD inicial calculado a partir de las ecuaciones 2.12, 2.13 y 2.14 muestra pendientes negativas para todos los protones del ANS (Fig 28) lo que indica que en estas condiciones toda la estructura del ANS está interaccionando de un u otro modo con la proteína.

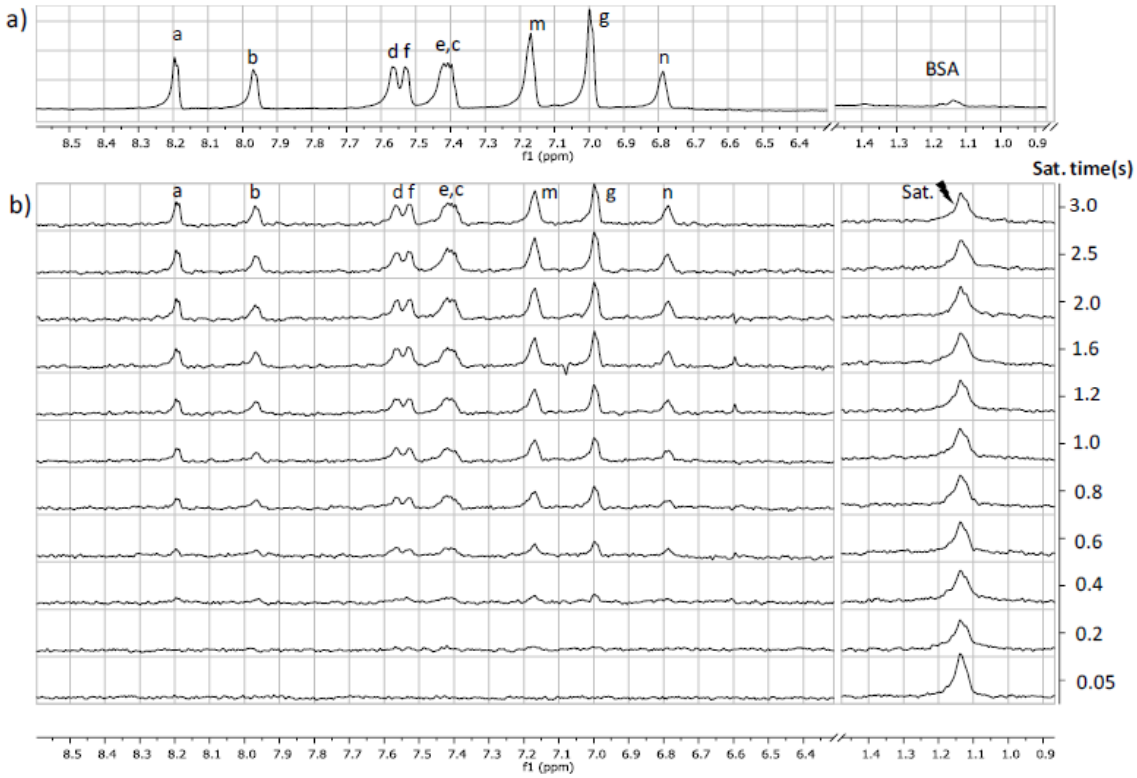


Figura 27. Experimentos de STD sobre una muestra de BSA:ANS 1:100 a) Espectro STD_{off} y b) espectro $STD_{off\text{-}on}$ con diferentes tiempos de saturación.

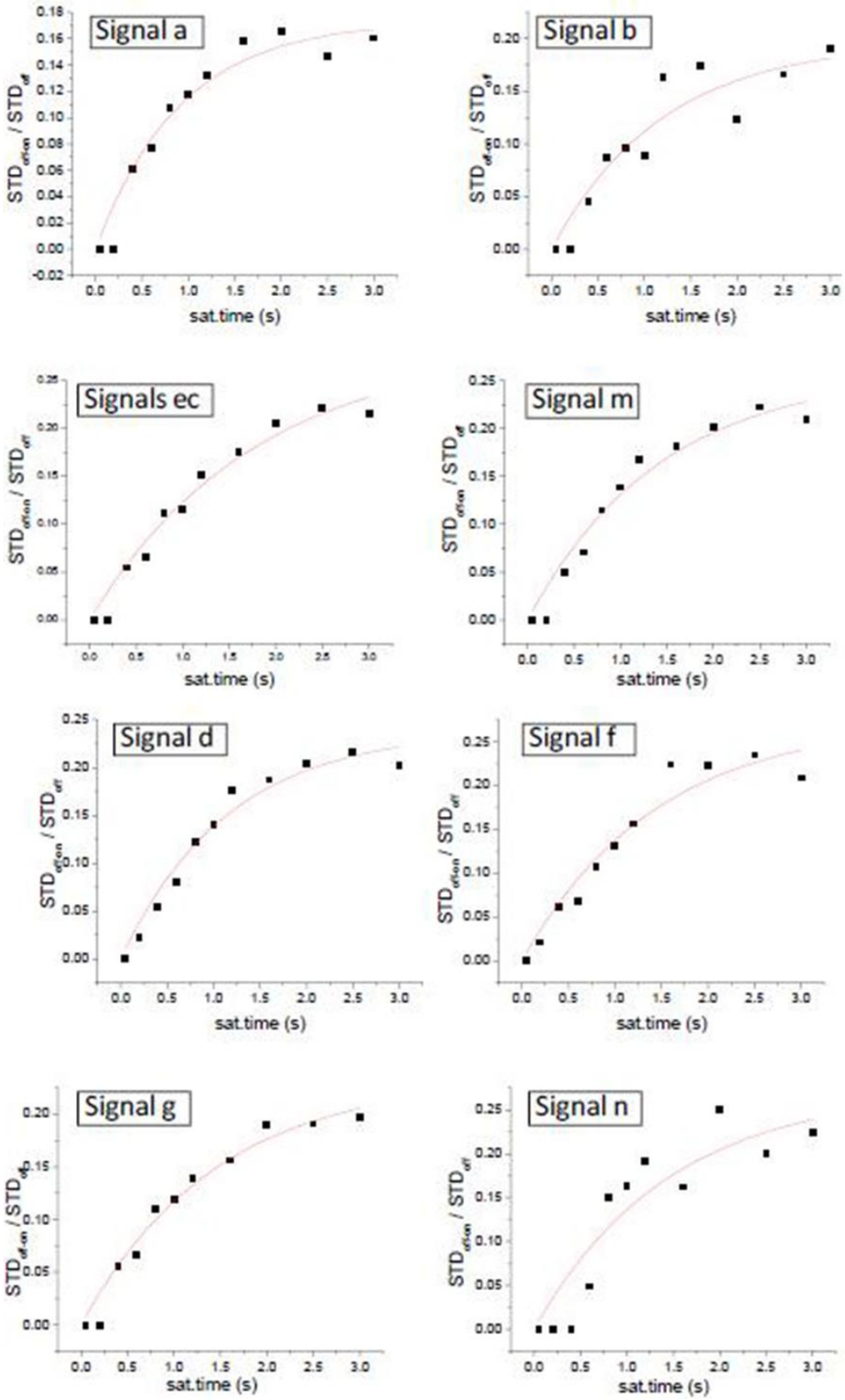


Figura 28. Experimentos STD de una muestra BSA:ANS 1:100 para los protones a, b, d, f, c, e, m, g y n de la molécula de ANS determinados a partir de las ecuaciones 2.12, 2.13 y 2.14.

La presencia de más de un dominio en la estructura de la proteína puede explicar el comportamiento observado. Ciertos sitios de unión pueden presentar un carácter más hidrofílico mientras que en otros tenga más importancia la combinación de interacciones hidrofóbicas, formación de enlaces de puente de hidrógeno o factores electrostáticos [46,47].

En relación a la gran discrepancia que envuelve la complejación del ANS por parte de BSA, y tras los estudios realizados, podemos afirmar que el ANS presenta dos modos de enlace diferentes que han de ser analizados y, por último, que BSA presenta un alto número de sitios de unión capaces de acomodar al anillo de anilino del ANS cuando la sonda se encuentra en un amplio exceso sobre la concentración de proteína. Este último resultado está además avalado por estudios similares donde con otras sondas diferentes al ANS se han llegado a calcular más de 100 sitios de unión.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.4 CONCLUSIONES.

En este capítulo, se ha podido confirmar que la sonda ANS es sensible a los cambios de solvatación, ya que, tanto su rendimiento cuántico como la posición del máximo de emisión, se modifican de manera sincrónica ante los cambios de polaridad sufridos por la capa de solvatación del medio. Se ha estudiado su comportamiento fotoquímico ante mezclas de metanol/agua y 1,4-dioxano/agua. La modificación de sus propiedades hace que sea una herramienta muy útil en estudios supramoleculares, de formación de coloides y de sistemas biológicos.

La incorporación de ANS a un sistema organizado, ciclodextrinas naturales y modificadas, origina una capa de solvatación entorno a la estructura de la molécula no homogénea, generándose microambientes. Ante esta situación, se observa un cambio asincrónico de las propiedades de la sonda, de forma que el anillo de anilino de ANS provoca un cambio en el máximo de emisión al introducirse dentro de la cavidad de la ciclodextrina formando un complejo de estequiometría 1:1. La inclusión del anillo de naftaleno de ANS en la cavidad de una segunda ciclodextrina, formando así un complejo del tipo 2:1, genera un cambio en la intensidad de emisión produciéndose un incremento del rendimiento cuántico. Los cambios observados en espectroscopía de fluorescencia son confirmados mediante resonancia magnética nuclear. El cambio en estas dos propiedades debe ser analizado de manera conjunta en estudios de química supramolecular, tanto en la formación de complejos con un macrociclo como en procesos competitivos.

La relevancia biológica se ha puesto de manifiesto mediante el estudio de la interacción de ANS y BSA, se ha confirmado que ANS puede unirse de dos modos diferentes a la proteína. Además, se confirma BSA cuenta con más de un sitio de unión mediante experimentos de STD.

2.5 APÉNDICES.

2.5.1 Desarrollo de la ecuación definida para el modelo de complejación 1:1.

$$ANS + CD \overset{K}{\rightleftharpoons} 1{:}1$$

$$K = \frac{[1{:}1]}{[ANS][CD]}$$

Denominando a 1:1 como x:

$$K = \frac{x}{([ANS]_0 - x)([CD]_0 - x)}$$

Mediante una reorganización de los términos se obtiene la siguiente expresión:

$$Kx^2 - K([ANS]_0 + [CD]_0)x + K[ANS]_0[CD]_0 = x$$

$$Kx^2 - [K([ANS]_0 + [CD]_0) + 1]x + K[ANS]_0[CD]_0 = 0$$

2.5.2 Desarrollo de la ecuación definida para el modelo de complejación 2:1.

$$ANS + CD \overset{K_1}{\rightleftharpoons} 1{:}1$$

$$1{:}1 + CD \overset{K_2}{\rightleftharpoons} 2{:}1$$

Las constantes de equilibrio se definen como:

$$K_1 = \frac{[1{:}1]}{[ANS][CD]} \Rightarrow [1{:}1] = K_1[ANS][CD]$$

$$K_2 = \frac{[2{:}1]}{[1{:}1][CD]} \Rightarrow [2{:}1] = K_2[1{:}1][CD]$$

Sustituyendo y ordenando términos:

$$[2{:}1] = K_2[1{:}1][CD]$$

$$[2{:}1] = K_2\ [CD](K_1[ANS][CD]) = K_1K_2[ANS][CD]^2$$

Conociendo el balance de materia de ciclodextrina implicada:

$$[CD]_T = [CD] + [1{:}1] + 2[2{:}1]$$

$$[CD]_T = [CD] + K_1[ANS][CD] + 2K_1K_2[ANS][CD]^2$$

Conociendo el balance de materia de ANS implicada:

$$[ANS]_T = [ANS] + [1:1] + [2:1]$$

$$[ANS]_T = [ANS] + K_1[ANS][CD] + K_1K_2[ANS][CD]^2$$

$$[ANS]_T = [ANS]\ (1+K_1\ [CD]+K_1K_2[CD]^2)$$

$$[ANS] = \frac{[ANS]_T}{1+ K_1[CD]+K_1K_2[CD]^2}$$

Sustituyendo la expresión obtenida en el balance de materia de ANS en el balance de materia de CD:

$$[CD]_T = [CD] + K_1[ANS][CD] + 2K_1K_2[ANS][CD]^2$$

$$[CD]_T = [CD] + K_1[CD]\ \frac{[ANS]_T}{1+K_1[CD]+K_1K_2[CD]^2} + 2K_1K_2[CD]^2\ \frac{[ANS]_T}{1+K_1[CD]+K_1K_2[CD]^2}$$

$$(1+K_1[CD]+K_1K_2[CD]^2)[CD]_T = (1+K_1[CD]+K_1K_2[CD]^2)[CD]+K_1[CD][ANS]_T+2K_1K_2[CD]^2[ANS]_T$$

$$[CD]_T+K_1[CD][CD]_T+K_1K_2[CD]^2[CD]_T = [CD]+K_1[CD]^2+K_1K_2[CD]^3+K_1[CD][ANS]_T+2K_1K_2[CD]^2[ANS]_T$$

$$K_1K_2[CD]^3+2K_1K_2[CD]^2[ANS]_T-K_1K_2[CD]^2[CD]_T+ K_1[CD]^2+K_1[CD][ANS]_T-K_1[CD][CD]_T-[CD]-[CD]_T =0$$

$$K_1K_2[CD]^3+\left[K_1\left(1+K_2(2[ANS]_T-[CD]_T)\right)\right][CD]^2+[1+K_1([CD]_T-[ANS]_T)][CD]-[CD]_T=0$$

2.5.3 Asignación de molécula de ANS libre.

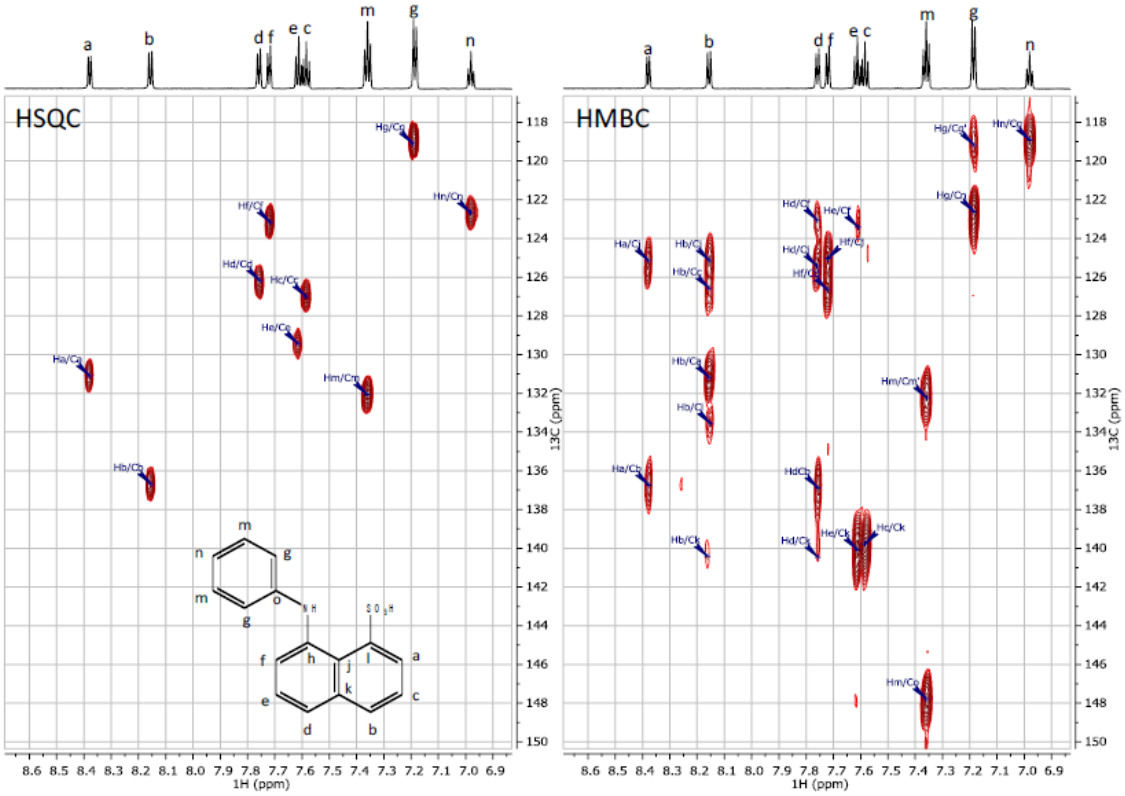


Figura A1. Asignación de las señales en ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN de ANS: 2D ^{1}H, ^{13}C HSQC y 2D ^{1}H ^{13}C HMBC de una disolución 0.5 mM de ANS en D_2O A 25ºC.

2.5.4 Asignación de complejo con estequiometría 1:1.

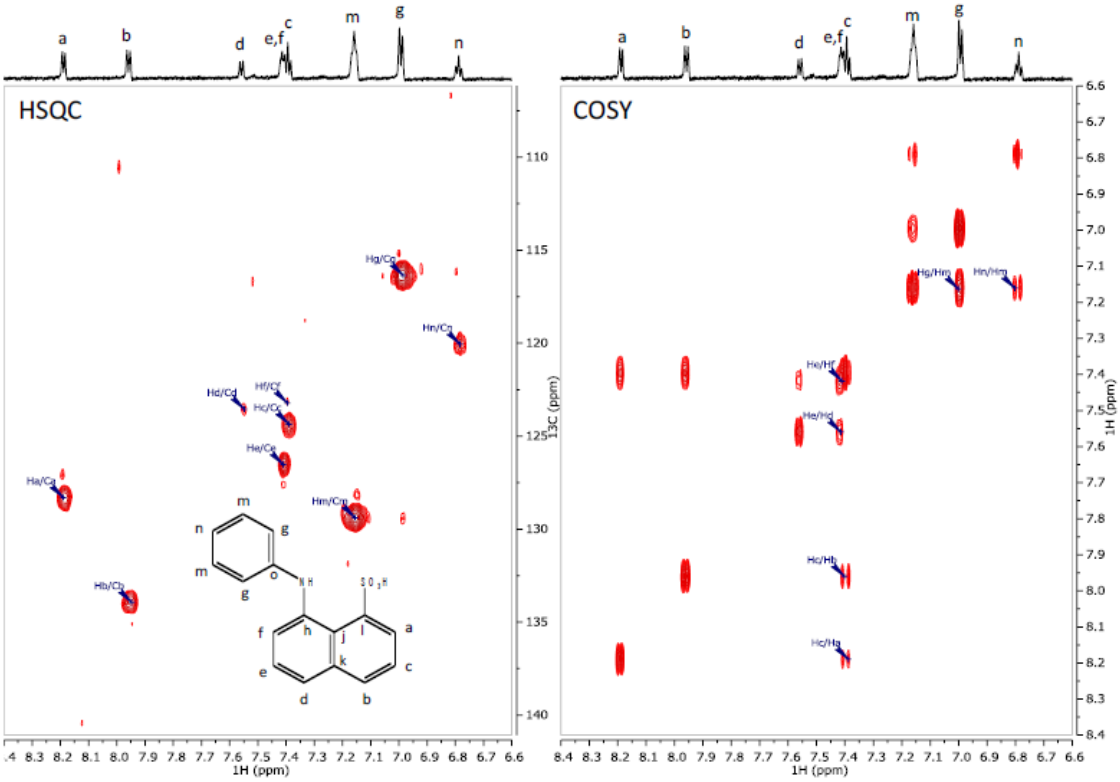


Figura A2. Asignación de las señales de los espectros ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN del complejo DM-β-CD:ANS con estequiometría 1:1: 2D ^{1}H, ^{1}H COSY de una muestra 0.5:1.0 mM en D_2O a 25ºC. Las señales de ^{1}H-RMN de DM-β-CD aparecen en la región de 3 a 5.2 ppm

2.5.5 Energía conformacional y distancias de enlace obtenidas por modelización molecular del complejo 1:1.

Tabla 3. Energías conformacionales y coordenadas cartesianas (Å) del modelo 1:1 de DM-β-CD y ANS optimizado mediante mecánica molecular. El modelo es calculado mediante CHARMM y cargas Gasteiger.

Energy Term	Angle	Bond	Hybrid	Non-bond	Torsion	Total Energy
(kcal mol^{-1})	81.036514	24.89451	0.231725	85.258858	15.605289	207.026886

Atom	X (Å)	Y (Å)	Z (Å)
C(1)	-22.0433	-26.2805	-10.2595
C(2)	-22.0425	-26.8936	-8.8553
C(3)	-23.4352	-27.4825	-8.5643
C(4)	-24.6076	-26.5113	-8.8622
C(5)	-24.3825	-25.6682	-10.1497
C(6)	-25.2572	-24.4096	-10.2458
O(7)	-21.0043	-27.9179	-8.7806
C(8)	-20.2636	-27.8815	-7.5348
O(9)	-23.4973	-27.8881	-7.1787
O(10)	-25.808	-27.3169	-9.0504
O(11)	-23.0053	-25.1956	-10.2511
O(12)	-26.6727	-24.6995	-10.4339
C(13)	-27.406	-23.4462	-10.5586
C(14)	-20.6463	-29.1992	-14.5805
C(15)	-20.5544	-29.9396	-13.2328
C(16)	-21.5113	-29.3025	-12.2093
C(17)	-21.3192	-27.7744	-12.1003
C(18)	-21.3549	-27.1443	-13.5146
C(19)	-21.0618	-25.6397	-13.5359
O(20)	-20.8728	-31.3524	-13.4328
C(21)	-19.9786	-32.242	-12.7176
O(22)	-21.297	-29.9082	-10.9159
O(23)	-22.4107	-27.258	-11.2829
O(24)	-20.3766	-27.7835	-14.392
O(25)	-22.1964	-24.892	-13.0274
C(26)	-21.9498	-23.466	-13.0472
C(27)	-23.5123	-31.0365	-18.7058
C(28)	-22.2093	-31.6995	-18.2311
C(29)	-21.888	-31.2343	-16.7929
C(30)	-21.9345	-29.6941	-16.6218
C(31)	-23.1913	-29.0926	-17.3044
C(32)	-23.1786	-27.56	-17.391
O(33)	-22.3578	-33.1481	-18.3529
C(34)	-21.1014	-33.872	-18.4164
O(35)	-20.573	-31.7069	-16.427
O(36)	-21.9592	-29.3744	-15.1967
O(37)	-23.3287	-29.5955	-18.6697
O(38)	-23.504	-26.9778	-16.1036
C(39)	-23.6599	-25.5402	-16.1873
C(40)	-28.0738	-33.7855	-17.8491
C(41)	-26.8116	-34.438	-17.2604
C(42)	-25.7291	-33.3724	-17.0418
C(43)	-25.4515	-32.5352	-18.3102
C(44)	-26.7788	-32.0654	-18.9683
C(45)	-26.5818	-31.4696	-20.3686
O(46)	-27.13	-35.1051	-16.0004
C(47)	-26.5844	-36.4459	-15.9182
O(48)	-24.5143	-34.0236	-16.6096
O(49)	-24.6626	-31.3868	-17.8779
O(50)	-27.7298	-33.1679	-19.1192
O(51)	-25.9544	-30.1623	-20.2967
C(52)	-25.6685	-29.6374	-21.6154
C(53)	-31.9916	-32.107	-14.5769
C(54)	-31.5707	-33.5827	-14.6723
C(55)	-30.1881	-33.7103	-15.3248
C(56)	-30.0567	-32.9223	-16.6459
C(57)	-30.6979	-31.513	-16.5406
C(58)	-30.8815	-30.8408	-17.9098
O(59)	-31.5579	-34.1935	-13.3457
C(60)	-32.2754	-35.4522	-13.2934
O(61)	-29.942	-35.1106	-15.5842
O(62)	-28.6358	-32.7771	-16.9536
O(63)	-32.0225	-31.5571	-15.9203
O(64)	-29.6149	-30.3696	-18.4406
C(65)	-29.8003	-29.6575	-19.6881

C(66)	-31.1985	-28.843	-10.3337
C(67)	-31.8274	-30.2288	-10.1444
C(68)	-31.4685	-31.1378	-11.3337
C(69)	-31.7456	-30.4906	-12.7113
C(70)	-31.2117	-29.0334	-12.7533
C(71)	-31.6767	-28.2288	-13.9754
O(72)	-31.3594	-30.7967	-8.8824
C(73)	-32.4179	-31.4265	-8.1175
O(74)	-32.2338	-32.3563	-11.2227
O(75)	-31.0951	-31.3143	-13.7333
O(76)	-31.6733	-28.287	-11.5851
O(77)	-30.9939	-28.6554	-15.1841
C(78)	-31.0223	-27.6254	-16.2041
C(79)	-26.603	-27.5549	-7.8486
C(80)	-26.9792	-29.0442	-7.7118
C(81)	-27.9048	-29.4781	-8.8677
C(82)	-29.0989	-28.5187	-9.0735
C(83)	-28.5856	-27.0593	-9.1137
C(84)	-29.6779	-25.9977	-9.269
O(85)	-25.7571	-29.8457	-7.6976
C(86)	-25.7825	-30.8989	-6.7012
O(87)	-28.4001	-30.8105	-8.6125
O(88)	-29.7373	-28.8782	-10.337
O(89)	-27.8133	-26.7533	-7.9137
O(90)	-30.0053	-25.8789	-10.6776
C(91)	-31.1429	-25.0071	-10.897
H(92)	-21.042	-25.8265	-10.4483
H(93)	-21.8607	-26.0566	-8.1365
H(94)	-23.56	-28.3888	-9.2043
H(95)	-24.7022	-25.7976	-8.0084
H(96)	-24.6304	-26.2891	-11.0398
H(97)	-24.8836	-23.8271	-11.1236
H(98)	-25.1	-23.7933	-9.329
H(99)	-19.5416	-28.7281	-7.5262
H(100)	-20.9422	-27.9943	-6.6584
H(101)	-19.6894	-26.9305	-7.4482
H(102)	-23.9535	-28.8174	-7.2048
H(103)	-26.9879	-22.8017	-11.3682
H(104)	-27.3983	-22.8881	-9.5942
H(105)	-28.4637	-23.6535	-10.8266
H(106)	-19.826	-29.6132	-15.2136
H(107)	-19.5108	-29.7928	-12.8594
H(108)	-22.5598	-29.5151	-12.5279
H(109)	-20.3163	-27.5986	-11.6421
H(110)	-22.3841	-27.2753	-13.9213
H(111)	-20.872	-25.3439	-14.595
H(112)	-20.1434	-25.4313	-12.9388
H(113)	-20.3274	-33.2885	-12.8632
H(114)	-19.9809	-32.0246	-11.6249
H(115)	-18.9419	-32.1591	-13.1174
H(116)	-21.83	-29.3153	-10.2557
H(117)	-22.8597	-22.9472	-12.6711
H(118)	-21.7491	-23.1096	-14.0839
H(119)	-21.0969	-23.203	-12.3802
H(120)	-23.6771	-31.3236	-19.7708
H(121)	-21.404	-31.3271	-18.9087
H(122)	-22.6366	-31.6849	-16.0996
H(123)	-21.0433	-29.2551	-17.1319
H(124)	-24.0925	-29.36	-16.7009
H(125)	-23.9453	-27.2564	-18.1436
H(126)	-22.1815	-27.2056	-17.7414
H(127)	-21.2914	-34.8637	-18.8838
H(128)	-20.7103	-34.0499	-17.3898
H(129)	-20.3327	-33.3455	-19.028
H(130)	-20.6671	-31.9717	-15.4304
H(131)	-23.9369	-25.1557	-15.1804
H(132)	-24.4737	-25.2654	-16.897
H(133)	-22.7052	-25.0571	-16.497
H(134)	-28.7875	-34.6191	-18.0528
H(135)	-26.4329	-35.1526	-18.0328
H(136)	-26.0702	-32.6906	-16.2262
H(137)	-24.9005	-33.1909	-19.0264
H(138)	-27.2218	-31.263	-18.3319
H(139)	-27.5851	-31.3664	-20.8446
H(140)	-25.9758	-32.1763	-20.9833
H(141)	-26.8129	-36.8622	-14.9121
H(142)	-25.4777	-36.4372	-16.0493
H(143)	-27.0518	-37.1056	-16.6851
H(144)	-23.7813	-33.3011	-16.7087
H(145)	-25.1965	-28.6361	-21.5008
H(146)	-26.6053	-29.5177	-22.2071
H(147)	-24.9543	-30.2971	-22.16

H(148)	-33.038	-32.1218	-14.1904
H(149)	-32.307	-34.0737	-15.3565
H(150)	-29.4256	-33.3289	-14.6039
H(151)	-30.612	-33.4793	-17.4381
H(152)	-30.0192	-30.861	-15.9419
H(153)	-31.576	-29.9788	-17.7748
H(154)	-31.3607	-31.5572	-18.6172
H(155)	-32.1759	-35.8763	-12.2696
H(156)	-31.8507	-36.1846	-14.0182
H(157)	-33.3583	-35.2945	-13.5036
H(158)	-29.0251	-35.2957	-15.1411
H(159)	-28.8074	-29.3124	-20.0495
H(160)	-30.4462	-28.7608	-19.5452
H(161)	-30.2403	-30.3254	-20.4639
H(162)	-31.5967	-28.1879	-9.5249
H(163)	-32.9354	-30.0782	-10.154
H(164)	-30.3822	-31.3856	-11.2693
H(165)	-32.8525	-30.4255	-12.8369
H(166)	-30.0966	-29.0471	-12.7843
H(167)	-31.4636	-27.1549	-13.7538
H(168)	-32.7774	-28.3377	-14.1077
H(169)	-31.9728	-31.8857	-7.207
H(170)	-32.9155	-32.2316	-8.7052
H(171)	-33.1718	-30.6715	-7.7965
H(172)	-31.6105	-33.0851	-11.6114
H(173)	-30.3991	-27.9555	-17.0635
H(174)	-30.5904	-26.6707	-15.8296
H(175)	-32.0643	-27.457	-16.5592
H(176)	-26.0545	-27.2794	-6.9162
H(177)	-27.5572	-29.1391	-6.7596
H(178)	-27.2999	-29.5045	-9.8049
H(179)	-29.7805	-28.6436	-8.1973
H(180)	-27.9406	-26.9616	-10.0171
H(181)	-29.283	-25.0205	-8.9048
H(182)	-30.5661	-26.2617	-8.6495
H(183)	-24.8504	-31.4993	-6.7953
H(184)	-26.6508	-31.5797	-6.8557
H(185)	-25.8185	-30.4665	-5.675
H(186)	-29.1733	-30.9405	-9.2894
H(187)	-31.328	-24.931	-11.9921
H(188)	-30.9448	-23.9809	-10.5102
H(189)	-32.0595	-25.4243	-10.4208
H(190)	-25.0561	-28.674	-11.8085
H(191)	-26.4362	-30.6411	-12.2145
H(192)	-28.1265	-30.6455	-14.1456
H(193)	-28.3586	-28.6976	-15.5653
H(194)	-25.2887	-26.6128	-13.3072
H(195)	-26.4856	-25.4914	-14.8879
H(196)	-26.2799	-27.9685	-17.1556
H(197)	-26.8841	-27.7659	-19.5981
H(198)	-28.194	-25.8905	-20.3898
H(199)	-29.4193	-23.7411	-19.9766
H(200)	-30.31	-22.0617	-18.479
H(201)	-30.0213	-22.2905	-15.9829
C(202)	-25.7758	-28.6779	-12.6254
C(203)	-26.5356	-29.7625	-12.8493
C(204)	-27.5099	-29.7661	-13.9661
C(205)	-27.6362	-28.6841	-14.753
C(206)	-26.797	-27.4733	-14.5127
C(207)	-25.915	-27.4839	-13.4947
N(208)	-26.9116	-26.3145	-15.2666
C(209)	-27.3749	-26.2432	-16.5663
C(210)	-26.9297	-27.1505	-17.4639
C(211)	-27.2547	-27.0244	-18.895
C(212)	-27.9745	-25.9858	-19.3273
C(213)	-28.4767	-24.9757	-18.3641
C(214)	-28.236	-25.0905	-17.0232
C(215)	-29.2533	-23.8332	-18.9039
C(216)	-29.7455	-22.9038	-18.0808
C(217)	-29.5537	-23.0374	-16.6255
C(218)	-28.8664	-24.0738	-16.0945
S(219)	-28.8644	-24.2052	-14.3084
O(220)	-27.4582	-24.2243	-13.5994
O(221)	-29.4527	-25.5588	-13.7723
O(222)	-29.6772	-23.0803	-13.584
Na(223)	-28.1071	-25.7059	-12.1514
H(224)	-27.4045	-24.2921	-12.6614
H(225)	-29.4935	-25.7203	-12.8451
H(226)	-29.7314	-23.0695	-12.6436
H(227)	-26.7812	-24.4933	-11.5782

2.5.6 Energía conformacional y distancias de enlace obtenidas por modelización molecular del complejo 2:1.

Tabla 4. Energías conformacionales y coordenadas cartesianas (Å) del modelo 2:1 de DM-β-CD y ANS optimizado mediante mecánica molecular. El modelo es calculado mediante CHARMM y cargas Gasteiger.

Energy Term	Angle	Bond	Hybrid	Non-bond	Torsion	Total Energy
(kcal mol^{-1})	155.492462	46.431824	0.320582	333.555725	27.399172	563.199768

Atom	X (Å)	Y (Å)	Z (Å)
C(1)	3.4934	3.1436	3.3653
C(2)	3.5435	2.5044	4.7569
C(3)	2.1803	1.8616	5.0741
C(4)	0.9629	2.7834	4.8042
C(5)	1.1229	3.6149	3.5019
C(6)	0.1872	4.8265	3.3979
O(7)	4.6159	1.513	4.7858
C(8)	5.3903	1.5524	6.0107
O(9)	2.1642	1.4584	6.4616
O(10)	-0.2115	1.9281	4.671
O(11)	2.4689	4.1677	3.3925
O(12)	-1.2174	4.4744	3.2465
C(13)	-2.0151	5.6944	3.2303
C(14)	4.9934	0.5174	-1.0925
C(15)	5.1477	-0.2943	0.2075
C(16)	4.1806	0.2371	1.2805
C(17)	4.293	1.7646	1.4722
C(18)	4.2157	2.4756	0.098
C(19)	4.4477	3.9903	0.1572
O(20)	4.8894	-1.706	-0.0703
C(21)	5.8288	-2.5949	0.5852
O(22)	4.448	-0.423	2.5372
O(23)	3.1812	2.1671	2.3248
O(24)	5.2092	1.9291	-0.824
O(25)	3.2762	4.6697	0.6786
C(26)	3.4962	6.0951	0.8004
C(27)	2.0393	-1.3017	-5.157
C(28)	3.3942	-1.9171	-4.7677
C(29)	3.7746	-1.4731	-3.3387
C(30)	3.6652	0.0559	-3.1184
C(31)	2.3604	0.628	-3.7342
C(32)	2.3304	2.1634	-3.7786
O(33)	3.3111	-3.3687	-4.9165
C(34)	4.5917	-4.0218	-5.1161
O(35)	5.13	-1.8898	-3.0636
O(36)	3.6719	0.3258	-1.6836
O(37)	2.1689	0.1462	-5.1015
O(38)	2.0614	2.6956	-2.4564
C(39)	1.856	4.1281	-2.4773
C(40)	-2.2394	-4.4205	-4.067
C(41)	-0.9122	-4.9146	-3.4693
C(42)	0.0726	-3.7444	-3.3353
C(43)	0.2384	-2.9389	-4.6451
C(44)	-1.1465	-2.6177	-5.2707
C(45)	-1.0598	-2.0533	-6.6947
O(46)	-1.1528	-5.5272	-2.1645
C(47)	-0.4682	-6.7941	-1.9979
O(48)	1.3511	-4.2677	-2.9131
O(49)	0.9411	-1.7105	-4.2851
O(50)	-1.9827	-3.8154	-5.3629
O(51)	-0.5264	-0.7029	-6.7002
C(52)	-0.2962	-0.2333	-8.0504
C(53)	-6.2388	-3.0799	-0.7588
C(54)	-5.6996	-4.5154	-0.8657
C(55)	-4.3265	-4.5276	-1.5491
C(56)	-4.288	-3.7305	-2.8712
C(57)	-5.0489	-2.3853	-2.7548
C(58)	-5.3027	-1.7243	-4.1191
O(59)	-5.5994	-5.1223	0.4593
C(60)	-6.2718	-6.4034	0.5466
O(61)	-3.9686	-5.9029	-1.8141
O(62)	-2.893	-3.4475	-3.198
O(63)	-6.3501	-2.5375	-2.1025
O(64)	-4.08	-1.1465	-4.649
C(65)	-4.3229	-0.3941	-5.8619

C(66)	-5.5638	0.1228	3.5416
C(67)	-6.1691	-1.279	3.6817
C(68)	-5.8138	-2.1448	2.4592
C(69)	-6.0694	-1.4485	1.1007
C(70)	-5.5431	0.0108	1.1255
C(71)	-5.9829	0.8617	-0.0683
O(72)	-5.6748	-1.8845	4.9163
C(73)	-6.7152	-2.5498	5.6758
O(74)	-6.5939	-3.3582	2.5206
O(75)	-5.3839	-2.2204	0.0618
O(76)	-6.034	0.7146	2.3068
O(77)	-5.3831	0.3832	-1.298
C(78)	-5.3794	1.4145	-2.3118
C(79)	-1.005	1.7506	5.8844
C(80)	-1.3269	0.2633	6.138
C(81)	-2.2397	-0.2944	5.0276
C(82)	-3.467	0.6025	4.7572
C(83)	-3.0062	2.0696	4.5843
C(84)	-4.1383	3.0758	4.3388
O(85)	-0.0801	-0.4957	6.2063
C(86)	-0.058	-1.4515	7.2966
O(87)	-2.6903	-1.6171	5.3942
O(88)	-4.1031	0.1073	3.5414
O(89)	-2.2448	2.4999	5.7547
O(90)	-4.391	3.1647	2.9097
C(91)	-5.5448	3.9958	2.6194
H(92)	4.4651	3.6604	3.1835
H(93)	3.7151	3.3339	5.4866
H(94)	2.0799	0.9511	4.4357
H(95)	0.8755	3.5087	5.6486
H(96)	0.9015	2.9668	2.6229
H(97)	0.5095	5.4033	2.4962
H(98)	0.3403	5.4706	4.2967
H(99)	6.1389	0.7295	5.9838
H(100)	4.7409	1.4026	6.9035
H(101)	5.9364	2.5197	6.0981
H(102)	1.7625	0.5043	6.447
H(103)	-1.5636	6.4884	2.5916
H(104)	-2.142	6.0823	4.2666
H(105)	-3.0205	5.4831	2.8094
H(106)	5.8122	0.177	-1.7696
H(107)	6.1905	-0.121	0.571
H(108)	3.1395	-0.0135	0.9662
H(109)	5.2878	1.9651	1.9379
H(110)	3.1879	2.3254	-0.3044
H(111)	4.6391	4.348	-0.8823
H(112)	5.3502	4.2039	0.7765
H(113)	5.5251	-3.6456	0.3805
H(114)	5.8269	-2.4423	1.6887
H(115)	6.857	-2.4427	0.184
H(116)	3.8991	0.1084	3.2362
H(117)	2.5465	6.5704	1.1336
H(118)	3.7864	6.5425	-0.1782
H(119)	4.2793	6.307	1.564
H(120)	1.8312	-1.579	-6.2164
H(121)	4.1439	-1.4891	-5.4759
H(122)	3.0909	-1.9734	-2.6141
H(123)	4.5205	0.5495	-3.6396
H(124)	1.4965	0.321	-3.0956
H(125)	1.522	2.4717	-4.4828
H(126)	3.2989	2.5547	-4.1677
H(127)	4.4075	-5.0259	-5.5586
H(128)	5.1043	-4.171	-4.1397
H(129)	5.2556	-3.4575	-5.8108
H(130)	5.0946	-2.2443	-2.0914
H(131)	1.6178	4.4669	-1.4445
H(132)	0.9952	4.3983	-3.1293
H(133)	2.7774	4.6534	-2.8174
H(134)	-2.8639	-5.3311	-4.2302
H(135)	-0.4817	-5.6392	-4.2039
H(136)	-0.3066	-3.0599	-2.5387
H(137)	0.8155	-3.5728	-5.3593
H(138)	-1.6452	-1.8442	-4.6405
H(139)	-2.0898	-2.0355	-7.1224
H(140)	-0.4362	-2.7408	-7.3141
H(141)	-0.6469	-7.1611	-0.9629
H(142)	0.6308	-6.6791	-2.1418
H(143)	-0.8673	-7.5506	-2.7121
H(144)	2.0357	-3.5474	-3.1944
H(145)	0.1616	0.7778	-7.9953
H(146)	-1.2558	-0.158	-8.6111
H(147)	0.412	-0.9003	-8.5944

H(148)	-7.2687	-3.1756	-0.3403
H(149)	-6.4067	-5.067	-1.5344
H(150)	-3.5835	-4.083	-0.844
H(151)	-4.7987	-4.3338	-3.6596
H(152)	-4.4117	-1.6845	-2.1692
H(153)	-6.0682	-0.9263	-3.972
H(154)	-5.7209	-2.4732	-4.8311
H(155)	-6.1155	-6.8191	1.5668
H(156)	-5.8526	-7.1236	-0.1937
H(157)	-7.3673	-6.2824	0.3815
H(158)	-3.0408	-6.015	-1.369
H(159)	-3.3631	0.065	-6.1886
H(160)	-5.056	0.427	-5.6875
H(161)	-4.6878	-1.0641	-6.6737
H(162)	-5.9827	0.7362	4.3723
H(163)	-7.2792	-1.1443	3.69
H(164)	-4.7303	-2.405	2.524
H(165)	-7.1724	-1.3864	0.9418
H(166)	-4.4266	-0.0016	1.1098
H(167)	-5.6678	1.9122	0.1502
H(168)	-7.0932	0.8414	-0.1589
H(169)	-6.2518	-3.035	6.5635
H(170)	-7.2146	-3.3393	5.0687
H(171)	-7.4709	-1.8134	6.034
H(172)	-5.9365	-4.0997	2.2225
H(173)	-4.8737	1.0301	-3.2217
H(174)	-4.8016	2.2992	-1.9667
H(175)	-6.4205	1.7065	-2.5769
H(176)	-0.4716	2.1137	6.7957
H(177)	-1.8987	0.2232	7.0979
H(178)	-1.6387	-0.3754	4.0905
H(179)	-4.1328	0.5271	5.6508
H(180)	-2.3622	2.1111	3.6744
H(181)	-3.8152	4.0749	4.7123
H(182)	-5.0509	2.7871	4.9087
H(183)	0.8897	-2.0319	7.2412
H(184)	-0.9086	-2.1673	7.2225
H(185)	-0.0899	-0.9259	8.2785
H(186)	-3.4431	-1.8384	4.7171
H(187)	-5.6234	4.1293	1.5169
H(188)	-5.4476	5.0071	3.0781
H(189)	-6.4789	3.5059	2.9775
C(190)	-0.054	0.5981	0.7681
C(191)	-0.854	-0.5139	0.4689
C(192)	-1.7812	-0.448	-0.5814
C(193)	-1.9135	0.732	-1.3304
C(194)	-1.1108	1.8554	-1.0377
C(195)	-0.1829	1.7761	0.0168
N(196)	-1.2222	3.0724	-1.6951
C(197)	-1.6686	3.2883	-2.9884
C(198)	-1.2899	2.3699	-3.9917
C(199)	-1.5248	2.6384	-5.3398
C(200)	-2.1079	3.8462	-5.7179
C(201)	-2.5051	4.7796	-4.7453
C(202)	-2.3414	4.4996	-3.3488
C(203)	-3.0729	5.9917	-5.1758
C(204)	-3.518	6.9307	-4.2481
C(205)	-3.4417	6.6501	-2.8848
C(206)	-2.8912	5.44	-2.4128
S(207)	-3.0605	5.1381	-0.6497
O(208)	-1.7703	5.0282	0.1321
O(209)	-3.7093	3.8164	-0.3146
O(210)	-3.8838	6.154	0.0899
H(211)	0.6672	0.5475	1.5821
H(212)	-0.7552	-1.4286	1.0504
H(213)	-2.4025	-1.3114	-0.8119
H(214)	-2.6466	0.7691	-2.1308
H(215)	0.4458	2.634	0.2519
H(216)	-0.786	3.8496	-1.2396
H(217)	-0.7652	1.4513	-3.7337
H(218)	-1.2219	1.9186	-6.0969
H(219)	-2.2539	4.0545	-6.7772
H(220)	-3.1746	6.2134	-6.2386
H(221)	-3.9554	7.8688	-4.5881
H(222)	-3.8377	7.383	-2.1854
Na(223)	-2.5417	3.4921	1.4348
C(224)	2.2283	11.6884	-4.9262
C(225)	2.5875	12.4653	-6.2056
C(226)	1.9874	11.7629	-7.4382
C(227)	2.3483	10.2641	-7.4907
C(228)	2.0298	9.5907	-6.132
C(229)	2.4912	8.1233	-6.0614

O(230)	2.0967	13.8352	-6.0898
C(231)	3.0354	14.8254	-6.5796
O(232)	2.4776	12.4037	-8.6346
O(233)	1.5907	9.6437	-8.5779
O(234)	2.6938	10.3166	-5.0493
O(235)	1.4149	7.2299	-6.4551
C(236)	1.6642	5.8686	-6.028
C(237)	-1.8264	12.7487	-1.4959
C(238)	-1.3565	13.8992	-2.4037
C(239)	-0.7529	13.3342	-3.7004
C(240)	0.3669	12.3161	-3.4058
C(241)	-0.1379	11.245	-2.4035
C(242)	0.9801	10.2838	-1.9551
O(243)	-2.4718	14.792	-2.7017
C(244)	-2.1553	16.1892	-2.4806
O(245)	-0.2196	14.4249	-4.4806
O(246)	0.7873	11.703	-4.6664
O(247)	-0.6919	11.8826	-1.2063
O(248)	0.9971	9.0884	-2.783
C(249)	1.9335	8.1069	-2.2733
C(250)	-6.8355	10.6561	-1.422
C(251)	-6.6781	12.1801	-1.5049
C(252)	-5.29	12.5309	-2.0752
C(253)	-4.1321	11.8272	-1.3255
C(254)	-4.4513	10.325	-1.1171
C(255)	-3.4762	9.6137	-0.1701
O(256)	-7.7511	12.742	-2.3199
C(257)	-8.3727	13.9045	-1.717
O(258)	-5.1113	13.9602	-1.9949
O(259)	-2.9053	11.9755	-2.1128
O(260)	-5.7875	10.1578	-0.5488
O(261)	-2.2626	9.2212	-0.8657
C(262)	-1.3865	8.4768	0.0187
C(263)	-8.9256	8.0167	-5.6721
C(264)	-8.9389	9.549	-5.7555
C(265)	-7.8524	10.1166	-4.8343
C(266)	-7.9822	9.6195	-3.3764
C(267)	-8.1798	8.0741	-3.3336
C(268)	-8.7062	7.5339	-1.9876
O(269)	-8.7153	9.9652	-7.1392
C(270)	-9.6074	11.0285	-7.5596
O(271)	-7.9177	11.5575	-4.8705
O(272)	-6.7299	9.989	-2.7186
O(273)	-9.1636	7.5938	-4.3053
O(274)	-8.0006	7.9887	-0.8028
C(275)	-6.8036	7.2178	-0.5273
C(276)	-6.4103	5.1912	-9.4417
C(277)	-7.7247	5.9437	-9.6918
C(278)	-7.956	6.9764	-8.5652
C(279)	-7.8005	6.3829	-7.138
C(280)	-6.5495	5.4716	-7.0451
C(281)	-6.5021	4.6193	-5.7747
O(282)	-7.6578	6.543	-11.0229
C(283)	-8.9515	6.8621	-11.5982
O(284)	-9.288	7.517	-8.7075
O(285)	-7.6653	7.4612	-6.1585
O(286)	-6.4981	4.5275	-8.1557
O(287)	-6.362	5.4441	-4.5902
C(288)	-6.2414	4.6203	-3.4082
C(289)	-1.9237	6.832	-11.9399
C(290)	-3.1755	7.6892	-12.2069
C(291)	-4.16	7.5675	-11.0318
C(292)	-4.4826	6.0954	-10.6988
C(293)	-3.1667	5.2871	-10.5492
C(294)	-3.3954	3.7849	-10.341
O(295)	-2.7926	9.0845	-12.4091
C(296)	-3.4164	9.6776	-13.576
O(297)	-5.3767	8.2725	-11.3607
O(298)	-5.2488	6.0791	-9.4558
O(299)	-2.3231	5.4473	-11.7346
O(300)	-3.8133	3.5284	-8.9739
C(301)	-4.108	2.1298	-8.7531
C(302)	2.3849	9.0818	-9.6718
C(303)	1.8742	9.5265	-11.0498
C(304)	0.4324	9.0453	-11.2623
C(305)	0.2349	7.5436	-10.9589
C(306)	0.9903	7.0975	-9.6771
C(307)	1.1208	5.5693	-9.571
O(308)	1.9499	10.9811	-11.159
C(309)	2.5571	11.4268	-12.3976
O(310)	0.0664	9.2997	-12.6372
O(311)	-1.1925	7.3022	-10.767

O(312)	2.3511	7.6318	-9.617
O(313)	-0.1335	4.9515	-9.1781
C(314)	0.0381	3.5334	-8.9354
H(315)	2.8193	12.1539	-4.1036
H(316)	3.7009	12.4284	-6.2997
H(317)	0.8769	11.8689	-7.4043
H(318)	3.4536	10.2015	-7.6307
H(319)	0.9248	9.5955	-5.9669
H(320)	3.3779	7.9564	-6.7159
H(321)	2.8035	7.9112	-5.0124
H(322)	2.5608	15.8292	-6.5057
H(323)	3.2949	14.6424	-7.6471
H(324)	3.961	14.8294	-5.9597
H(325)	1.8318	12.0831	-9.3781
H(326)	0.8261	5.2265	-6.3788
H(327)	1.7024	5.8075	-4.9194
H(328)	2.6165	5.4824	-6.459
H(329)	-2.1349	13.2256	-0.5366
H(330)	-0.5367	14.4224	-1.8511
H(331)	-1.5586	12.8357	-4.2897
H(332)	1.1813	12.8959	-2.9099
H(333)	-0.9295	10.6283	-2.8946
H(334)	1.9721	10.7908	-1.99
H(335)	0.792	10.002	-0.894
H(336)	-3.0343	16.804	-2.7758
H(337)	-1.2836	16.5034	-3.1
H(338)	-1.943	16.3766	-1.4028
H(339)	0.1129	13.9785	-5.354
H(340)	1.8196	7.1724	-2.8632
H(341)	1.7304	7.859	-1.2062
H(342)	2.9798	8.4723	-2.3856
H(343)	-7.8124	10.4496	-0.9257
H(344)	-6.7143	12.5553	-0.4518
H(345)	-5.2603	12.2252	-3.1477
H(346)	-4.0719	12.293	-0.3137
H(347)	-4.3839	9.8	-2.0994
H(348)	-3.2389	10.2686	0.7005
H(349)	-3.9916	8.7021	0.2159
H(350)	-9.1033	14.3315	-2.4395
H(351)	-7.6174	14.6889	-1.4801
H(352)	-8.9215	13.615	-0.7915
H(353)	-4.4417	14.1763	-2.7539
H(354)	-0.6376	7.9333	-0.5961
H(355)	-1.9352	7.7192	0.6202
H(356)	-0.8569	9.1734	0.7066
H(357)	-9.7994	7.6697	-6.272
H(358)	-9.9313	9.8872	-5.3671
H(359)	-6.8581	9.8054	-5.2352
H(360)	-8.8729	10.1201	-2.9263
H(361)	-7.1946	7.5968	-3.5383
H(362)	-9.7613	7.8738	-1.8776
H(363)	-8.7403	6.4189	-2.0324
H(364)	-9.328	11.3405	-8.5904
H(365)	-9.5199	11.9164	-6.8921
H(366)	-10.6623	10.67	-7.575
H(367)	-7.2101	11.868	-4.1823
H(368)	-6.0538	7.3641	-1.3344
H(369)	-7.0317	6.1347	-0.4019
H(370)	-6.3527	7.5812	0.4227
H(371)	-6.3261	4.3858	-10.2089
H(372)	-8.5383	5.1807	-9.6417
H(373)	-7.2141	7.801	-8.6873
H(374)	-8.69	5.7433	-6.9219
H(375)	-5.6342	6.1106	-7.0355
H(376)	-7.429	4.0014	-5.7146
H(377)	-5.6233	3.9355	-5.8655
H(378)	-8.8347	6.9409	-12.7019
H(379)	-9.3043	7.8489	-11.2233
H(380)	-9.7188	6.0815	-11.3884
H(381)	-9.1622	8.5388	-8.5999
H(382)	-6.1058	5.2755	-2.5238
H(383)	-5.3465	3.9653	-3.4876
H(384)	-7.1601	4.0097	-3.2515
H(385)	-1.3099	6.8815	-12.8708
H(386)	-3.6711	7.2527	-13.1094
H(387)	-3.7057	8.0519	-10.1349
H(388)	-5.0613	5.6897	-11.5638
H(389)	-2.6271	5.6515	-9.6418
H(390)	-4.1512	3.4171	-11.0739
H(391)	-2.4346	3.2552	-10.5378
H(392)	-3.1306	10.7517	-13.6255
H(393)	-4.5273	9.6144	-13.5123

H(394)	-3.0607	9.177	-14.5059
H(395)	-6.0494	7.9901	-10.6265
H(396)	-4.4324	2.0072	-7.6964
H(397)	-3.2025	1.5024	-8.9178
H(398)	-4.9378	1.7882	-9.4137
H(399)	3.4535	9.3988	-9.6355
H(400)	2.5165	9.0117	-11.8071
H(401)	-0.2343	9.6369	-10.5899
H(402)	0.6581	6.9631	-11.8134
H(403)	0.4124	7.4432	-8.7873

H(404)	1.4711	5.1523	-10.5439
H(405)	1.9033	5.3499	-8.8085
H(406)	2.5238	12.5385	-12.43
H(407)	2.0011	11.0346	-13.2802
H(408)	3.6233	11.1068	-12.448
H(409)	-0.8325	9.809	-12.5721
H(410)	-0.9338	3.1076	-8.6051
H(411)	0.783	3.3495	-8.1269
H(412)	0.3504	3.0083	-9.8672
H(413)	-1.4884	2.045	0.8402

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.6 BIBLIOGRAFÍA.

(1) DeRosa, M. C.; Hodgson, D. J.; Enright, G. D.; Dawson, B.; Evans, C. E. B.; Crutchley, R. J. Iridium Luminophore Complexes for Unimolecular Oxygen Sensors. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (24), 7619–7626. DOI: 10.1021/ja049872h.

(2) Sadhu, V. B.; Perl, A.; Péter, M.; Rozkiewicz, D. I.; Engbers, G.; Ravoo, B. J.; Reinhoudt, D. N.; Huskens, J. Surface Modification of Elastomeric Stamps for Microcontact Printing of Polar Inks. *Langmuir* **2007**, *23* (12), 6850–6855. DOI: 10.1021/la063657s.

(3) Lemke, E. A.; Gambin, Y.; Vandelinder, V.; Brustad, E. M.; Liu, H. W.; Schultz, P. G.; Groisman, A.; Deniz, A. A. Microfluidic Device for Single-Molecule Experiments with Enhanced Photostability. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (38), 13610–13612. DOI: 10.1021/ja9027023.

(4) Lu, H. P.; Mai, C. L.; Tsia, C. Y.; Hsu, S. J.; Hsieh, C. P.; Chiu, C. L.; Yeh, C. Y.; Diau, E. W. G. Design and Characterization of Highly Efficient Porphyrin Sensitizers for Green See-through Dye-Sensitized Solar Cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (44), 10270–10274. DOI: 10.1039/b917271h.

(5) Knoll, W.; Yu, F.; Neumann, T.; Schiller, S.; Naumann, R. Supramolecular Functional Interfacial Architectures for Biosensor Applications. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5* (23), 5169–5175. DOI: 10.1039/b310317j.

(6) Yang, J.; Xiang, J.; Chen, C.; Lu, D.; Xu, G. Effect of β-Cyclodextrin on the Photoinduced Charge Transfer in Sodium 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfate (ANS)/CdS Colloidal System. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *240* (2), 425–431. DOI: 10.1006/jcis.2001.7634.

(7) Wagner, B. D.; Stojanovic, N.; Day, a I.; Blanch, R. J. Host Properties of Cucurbit[7]Uril: Fluorescence Enhancement of Anilinonaphthalene Sulfonates. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (39), 10741–10746. DOI: 10.1021/jp034891j.

(8) Wagner, B. D.; MacRae, A. I. The Lattice Inclusion Compound of 1,8-ANS and Cucurbituril: A Unique Fluorescent Solid. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (46), 10114–10119. DOI: 10.1021/jp9926342.

(9) Berenguer, J. R.; Fornie, J.; Maitlis, P. M.; Espinet, P.; Compre-, M. J. R.; Suades, J.; Menjo, B.; Grandini, P.; Mancin, F.; Tecilla, P.; Scrimin, P.; Tonellato, U. Exploiting the Self-Assembly Strategy for the Design of Selective Cu II Ion Chemosensors **. **2003**, No. 20, 3061–3064.

(10) Giovannini, A.; Savoia, D.; Umani-Ronchi, A. Organometallic Ring-Opening Reactions of N-Acyl and N-Alkoxycarbonyl Lactams. Synthesis of Cyclic Imines. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (1), 228–234. DOI: 10.1021/jo00262a048.

(11) Dsouza, R. N.; Pischel, U.; Nau, W. M. Fluorescent Dyes and Their Supramolecular Host/Guest Complexes with Macrocycles in Aqueous Solution. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (12), 7941–7980. DOI: 10.1021/cr200213s.

(12) Yu, G.; Wu, D.; Li, Y.; Zhang, Z.; Shao, L.; Zhou, J.; Hu, Q.; Tang, G.; Huang, F. A

Pillar[5]Arene-Based [2]Rotaxane Lights up Mitochondria. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (5), 3017–3024. DOI: 10.1039/c6sc00036c.

(13) Abuin, E. B.; Lissi, E. a.; Aspée, A.; Gonzalez, F. D.; Varas, J. M. Fluorescence of 8-Anilinonaphthalene-1-Sulfonate and Properties of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles in Water–Urea Mixtures. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *186* (2), 332–338. DOI: 10.1006/jcis.1996.4648.

(14) Kim, W.; Thévenot, J.; Ibarboure, E.; Lecommandoux, S.; Chaikof, E. L. Self-Assembly of Thermally Responsive Amphiphilic Diblock Copolypeptides into Spherical Micellar Nanoparticles. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49* (25), 4257–4260. DOI: 10.1002/anie.201001356.

(15) Patra, A.; Luong, T. Q.; Mitra, R. K.; Havenith, M. The Influence of Charge on the Structure and Dynamics of Water Encapsulated in Reverse Micelles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (25), 12875–12883. DOI: 10.1039/c4cp00386a.

(16) Glenn, K. M.; Palepu, R. M. Fluorescence Probing of Aerosol OT Based Reverse Micelles and Microemulsions in N-Alkanes (C6-C16) and Quenching of Safranine-T in These Systems. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2006**, *179* (3), 283–288. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2005.08.028.

(17) Takehara, K.; Morinaga, Y.; Nakashima, S.; Matsuoka, S.; Kamaya, H.; Ueda, I. Classification of the Binding Modes in Bovine Serum Albumin Using Terminally Substituted Alkane Analogues. *Anal. Sci.* **2006**, *22* (12), 1571–1575. DOI: 10.2116/analsci.22.1571.

(18) Tagore, R.; Thomas, H. R.; Homan, E. A.; Munawar, A.; Saghatelian, A. A Global Metabolite Profiling Approach to Identify Protein-Metabolite Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (43), 14111–14113. DOI: 10.1021/ja806463c.

(19) Marianayagam, N. J.; Khan, F.; Male, L.; Jackson, S. E. Fast Folding of a Four-Helical Bundle Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (33), 9744–9750. DOI: 10.1021/ja016480r.

(20) Kosower, E. M.; Kanety, H. Intramolecular Donor-Acceptor Systems. 10. Multiple Fluorescences from 8-(Phenylamino) 1 -Naphthalenesulfonates. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (20), 6236–6243.

(21) Kosower, E. M.; Kanety, H.; Dodluk, H.; Striker, G.; Jovin, T.; Boni, H.; Huppert, D. Intramolecular Donor-Acceptor Systems. VII. Solvent Dielectric Relaxation Effects on the Photophysics of 6-(Phenylamino)-N,N-Dimethyl-2-Na Phthalenesulfonamides. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87* (14), 2479–2484.

(22) Kosower, E. M.; Dodiuk, H.; Tanizawa, K.; Ottolenghi, M.; Orbachlc, N. Intramolecular Donor-Acceptor Systems. Radiative and Nonradiative Processes for the Excited States of 2-N-Arylamino-6-Naphthalenesulfonates. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97* (8), 2167–2178. DOI: 10.1021/ja00841a030.

(23) Sueishi, Y.; Fujita, T.; Nakatani, S.; Inazumi, N.; Osawa, Y. The Enhancement of Fluorescence Quantum Yields of Anilino Naphthalene Sulfonic Acids by Inclusion of Various Cyclodextrins and Cucurbit[7]Uril. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, *114*, 344–349. DOI: 10.1016/j.saa.2013.05.052.

(24) Hoenigman, S. M.; Evans, C. E. Improved Accuracy and Precision in the Determination of Association Constants. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (18), 3274–3276. DOI: 10.1021/ac960336k.

(25) Liu, Y.; Duan, Z.-Y.; Chen, Y.; Han, J.-R.; Cui, L. Cooperative Self-Assembly and Molecular Binding Behavior of Cyclodextrin-Crown Ether Conjugates Mediated by Alkali Metal Ions. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* (16), 2359–2364. DOI: 10.1039/b406656a.

(26) Schneider, H. J.; Blatter, T.; Simova, S. Host Guest Chemistry. 26. NMR and Fluorescence Studies of Cyclodextrin Complexes with Guest Molecules Containing Both Phenyl and Naphthyl Units. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (6), 1996–2000. DOI: 10.1021/ja00006a020.

(27) Liu, Y.; Li, X. Q.; Chen, Y.; Guan, X. D. Spectrophotometric Study of Selective Binding Behaviors of Dye Molecules by Pyridine-and Bipyridine-Modified β-Cyclodextrin Derivatives with a Functional Tether in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (50), 19541–19549. DOI: 10.1021/jp046363t.

(28) Peters, T. Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37* (C), 161–245. DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60065-0.

(29) Krach-Hansen, U.; Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25* (6), 695–704. DOI: 10.1248/bpb.25.695.

(30) Das, K.; Sarkar, N.; Nath, D.; Bhattacharyya, K. Non-Radiative Pathways of Anilino-Naphthalene Sulphonates: Twisted Intramolecular Charge Transfer versus Intersystem Crossing. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **1992**, *48* (11–12), 1701–1705. DOI: 10.1016/0584-8539(92)80243-P.

(31) Qa'dan, M.; Spyres, L. M.; Ballard, J. D. PH-Induced Conformational Changes in Clostridium Difficile Toxin B. *Infect. Immun.* **2000**, *68* (5), 2470–2474. DOI: 10.1128/IAI.68.5.2470-2474.2000.

(32) Ho, C.; Slater, S. J.; Stagliano, B. A.; Stubbs, C. D. Conformation of the C1 Phorbol-Ester-Binding Domain Participates in the Activating Conformational Change of Protein Kinase C. *Biochem. J.* **1999**, *344* (2), 451–460. DOI: 10.1042/0264-6021:3440451.

(33) Nandi, P. K. Polymerization of Human Prion Peptide HuPrP 106-126 to Amyloid in Nucleic Acid Solution. *Arch. Virol.* **1998**, *143* (7), 1251–1263. DOI: 10.1007/s007050050373.

(34) Kundu, B.; Guptasarma, P. Hydrophobic Dye Inhibits Aggregation of Molten Carbonic Anhydrase during Thermal Unfolding and Refolding. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1999**, *37* (3), 321–324. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0134(19991115)37:3<321::AID-PROT1>3.0.CO;2-L.

(35) Bina, J. E.; Alm, R. A.; Uria-Nickelsen, M.; Thomas, S. R.; Trust, T. J.; Hancock, R. E. W. Helicobacter Pylori Uptake and Efflux: Basis for Intrinsic Susceptibility to Antibiotics in Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44* (2), 248–254. DOI: 10.1128/AAC.44.2.248-254.2000.

(36) Wallace, L. A.; Dirr, H. W. Folding and Assembly of Dimeric Human Glutathione Transferase A1-1. *Biochemistry* **1999**, *38* (50), 16686–16694. DOI: 10.1021/bi991239z.

(37) Bertsch, M.; Mayburd, A. L.; Kassner, R. J. The Identification of Hydrophobic Sites on the Surface of Proteins Using Absorption Difference Spectroscopy of Bromophenol Blue. *Anal. Biochem.* **2003**, *313* (2), 187–195. DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00590-0.

(38) Weber, G.; Daniel, E. Cooperative Effects in Binding by Bovine Serum Albumin. II. The Binding of l-Anilino-8-Naphthalenesulfonate. Polarization of the Ligand Fluorescence and Quenching of the Protein Fluorescence. *Biochemistry* **1966**, *5* (6), 1900–1907. DOI: 10.1021/bi00870a017.

(39) Valsami, G. N.; Macheras, P. E.; Koupparis, M. A. Binding Study of the Fluorescencence Probe 1-Anailino-8-naphthalenesulsonate to Human Plasma and Human and Bovine Serum Albumin Using Potentiometric Tritation. *Pharmaceutical Research*, **1991**, *8* (7), 888-892. DOI: 10.1023/A:1015855613083.

(40) Weber, G.; Young, L. B. Fragmentation of Bovine Serum Albumin By Pepsin. Ii. Isolation, Amino. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239* (5), 1424–1431. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)91332-3.

(41) Cardamone, M.; Puri, N. K. Spectrofluorimetric Assessment of the Surface Hydrophobicity of Proteins. *Biochem. J.* **1992**, *282* (2), 589–593. DOI: 10.1042/bj2820589.

(42) Haskard, C. A.; Li-Chan, E. C. Y. Hydrophobicity of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin Determined Using Uncharged (PRODAN) and Anionic (ANS-) Fluorescent Probes. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (7), 2671–2677. DOI: 10.1021/jf970876y.

(43) Hazra, P.; Chakrabarty, D.; Chakraborty, A.; Sarkar, N. Probing Protein-Surfactant Interaction by Steady State and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *314* (2), 543–549. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.12.118.

(44) Matulis, D.; Lovrien, R. 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate Anion-Protein Binding Depends Primarily on Ion Pair Formation. *Biophys. J.* **1998**, *74* (1), 422–429. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77799-9.

(45) Naik, D. V.; Paul, W. L.; Threatte, R. M. Fluorometric Determination of Drug-Protein Association Constants. The Dinding of 8-Anilino-1-Naphthalenesulfonate by Bovine Serum Albumin. *Anal. Chem.* **1975**, *47* (2), 267–270. DOI: 10.1021/ac60352a043.

(46) Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Vayá, I. Triplet Excited States as Chiral Reporters for the Binding of Drugs to Transport Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (29), 10134–10135. DOI: 10.1021/ja0514489.

(47) Jisha, V. S.; Arun, K. T.; Hariharan, M.; Ramaiah, D. Site-Selective Binding and Dual Mode Recognition of Serum Albumin by a Squaraine Dye. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (18), 6024–6025. DOI: 10.1021/ja061301x.

CAPÍTULO 3

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 3: FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN ENTRE ANS Y PILAR[N]ARENOS.

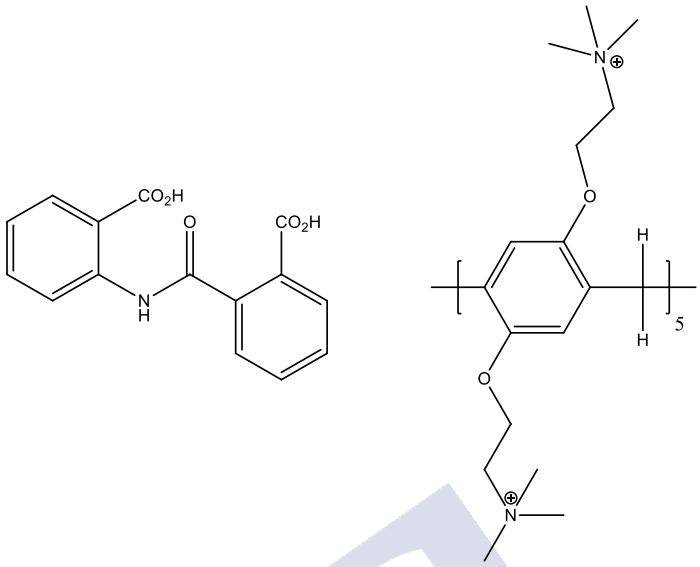
3.1 INTRODUCCIÓN.

En los últimos años, dentro del campo de la química supramolecular, se han desarrollado multitud de nuevos receptores moleculares con alta afinidad y selectividad ante diferentes moléculas. El interés de este tipo de estudios radica no solo en el potencial químico sino en las múltiples aplicaciones de este tipo de compuestos en el área de biología y de nuevos materiales. Así, en los últimos años se han sintetizado diferentes macrociclos capaces de formar numerosos complejos del tipo anfitrión-huésped [1] ; una de estas nuevas familias de receptores moleculares son los pilar[*n*]arenos.

Los pilar[*n*]arenos son sintetizados por primera vez en 2008 por el grupo de investigación de Ogoshi. Estos macrociclos están formados por *n* unidades de 1,4-dialcoxibenceno unidas entre sí mediante puentes metilénicos en posición *para*, el número de unidades *n* varía entre 5 y 15 [2,3]. Hasta el momento, dada su fácil obtención frente a sus homólogos superiores, los más estudiados son los pilararenos de cinco y seis unidades [4–9]. Esta nueva familia presenta propiedades únicas pero, a la vez, comparte características con otros macrociclos, como por ejemplo la facilidad de ser modificados (al igual que los calixarenos [10]) o la alta rigidez y simetría (como los cucurbiturilos [11,12]). Sin embargo, una de las principales desventajas que presentan los pilararenos es su reducida solubilidad en agua, afortunadamente la correcta funcionalización de los mismos hace posible aumentar esta propiedad. La generación de macrociclos solubles en agua aumenta enormemente la posibilidad de aplicación de los mismos, en el caso de los pilararenos, el primer macrociclo soluble en agua fue sintetizado por el grupo de Ogoshi en 2010 [13]. Un año después, se describió la funcionalización de pilararenos catiónicos y neutros [14,15] dando lugar a la formación de múltiples complejos de inclusión [16–20]. Algunos de los *guest* empleados fueron aminoácidos [21], sales de viológeno [13,22] y diácidos lineales, entre otras moléculas neutras o cargadas [19,23–25].

En la bibliografía, se encuentran diferentes estudios en los que pilar[5]arenos modificados con grupos trimetilamonio forman complejos con estequiometría 1:1 con 1-octanosulfonato o ácidos carboxílicos. Además, diferentes guest con grupos sulfonatos también presentan una estequiometría 1:1, los primeros estudios parecían sugerir que los huéspedes dianiónicos no podían formar complejos de inclusión, ya que, solamente se aplicaba la formación de complejos con estequiometría 1:1. Estudios más recientes han revelado que los pilararenos son capaces de formar complejos con estequiometrias múltiples (como por ejemplo 2:1, 1:2 y 1:1:1) además, es necesario el estudio de complejos tanto internos como externos. Un ejemplo es la formación de complejos entre CPA y P5TMA, estructuras en esquema 1, donde el pH determina la estequiometría, siendo 1:1 y constantes $K_{1:1}$ asociadas de (1.69-2.29) x 10^4 M^{-1} y 1:2 con constantes asociadas $K_{1:2}$ de 1.67 x 10^7 M^{-1} a 1.42 x 10^9 M^{-1} [26]; otro ejemplo de formación de estructuras complejas se encuentra en la formación de complejos entre *n*-hexano (vapor) y pilar[5]arenos modificados, dependiendo

del tipo de sustituyente los complejos formados varían desde la formación de complejos 1:1 a la constitución de estructura del tipo canales [27].



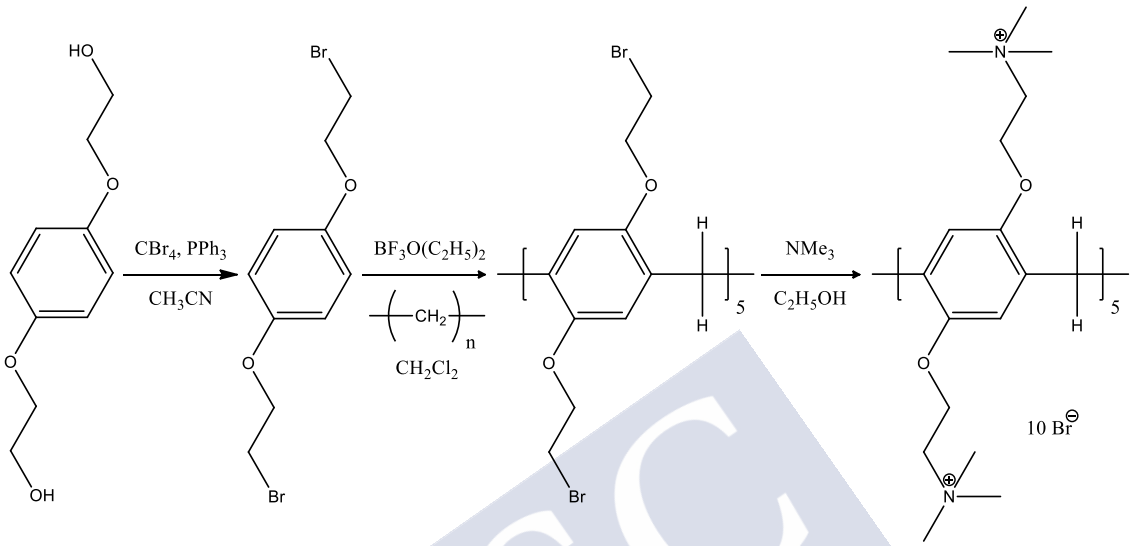
Esquema 1. Estructura de: (Izquierda) CPA (ácido 2-carboxiftálico) (Derecha) TMAP5 (bromuro de bis[(trimetilamonio)etoxi]pilar[5]areno).

Cabe destacar que en los últimos años la comunidad científica se ha esforzado en la determinación de diferentes iones ya que, muchos de ellos representan un papel fundamental en distintos procesos biológicos [28,29]. La fácil y sencilla forma de modificación de los pilar[*n*]arenos los convierte en los macrociclos perfectos para formar complejos con iones pequeños. Algunos de los cationes que se han extraído con el uso de pilararenos son Co^{+2}, Cu^{+2}, Ni^{+2}, Zn^{+2}, Cd^{+2}, Pb^{+2}, Ag^{+2} y Hg^{+2} mediante extracción líquido-líquido en disolventes orgánicos [30]. La determinación de Fe^{+3} es posible de manera selectiva a otros metales (Na^{+}, K^{+}, Ca^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}, Fe^{+2}, Co^{+2}, Ni^{+2}, Cu^{+2} y Zn^{+2}) usando como *host* un pilar[5]areno derivado de quinolonas que presenta fluorescencia. El sistema anterior permite además, la determinación de F^{-} al realizar experimentos competitivos, dando lugar a la formación de $[FeF_6]^{3-}$ y pilar[5]areno libre [31]. Otros iones que son extraíbles con pilararenos son los derivados de las denominadas tierras raras [32]: La^{+3}, Ce^{+3}, Pr^{+3}, Nd^{+3}, Sm^{+3}, Eu^{+3}, Gd^{+3}, Yb^{+3}, Lu^{+3}, Th^{+4} y UO_2^{+2}

Ante los sorprendentes resultados obtenidos al estudiar el proceso de complejación del ácido 1,8-naftalenosulfonato (ANS) con diferentes ciclodextrinas (capitulo 2) se ha evaluado la capacidad de los pilararenos para formar complejos de inclusión con esta sonda. Además, se utilizará el sistema formado para la determinación de diferentes aniones obteniendo así, un sistema de determinación mediante un método competitivo en medio acuoso de diferentes iones de pequeño tamaño.

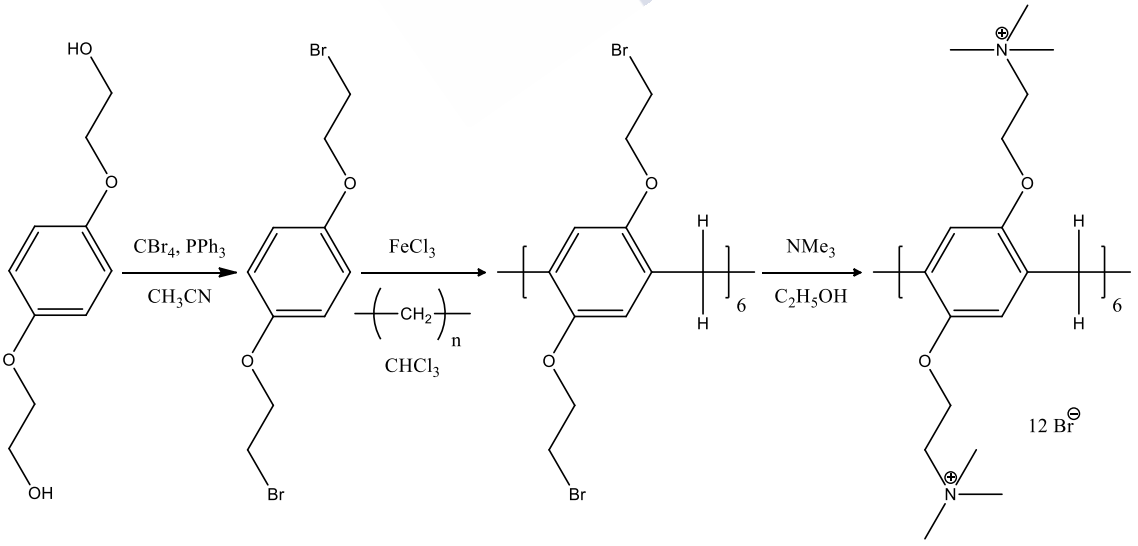
3.2 MÉTODO EXPERIMENTAL.

Preparación de reactivos y compuestos: La ruta sintética seleccionada para la obtención del bromuro de bis[(trimetilamonio)etoxi]pilar[5]areno (P5TMA) se muestra en el esquema 2. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich siendo de la mayor pureza disponible, de forma que se utilizan sin purificación adicional. La metodología y la caracterización detallada se muestran en el apéndice 3.5.1 de este capítulo.



Esquema 2. Ruta sintética seleccionada para la elaboración de P5TMA.

La ruta sintética seleccionada para la obtención del bromuro de bis[(trimetilamonio)etoxi]pilar[6]areno (P6TMA) se muestra en el esquema 3. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich siendo de la mayor pureza disponible, de forma que se utilizan sin purificación adicional. La metodología y la caracterización detallada se muestran en el apéndice 3.5.2 de este capítulo.



Esquema 3. Ruta sintética seleccionada para la elaboración de P6TMA.

Espectroscopía de RMN: los espectros de RMN fueron adquiridos a 25ºC en equipo Varian Inova 500 equipado con sonda de detección inversa ^{1}H/X de 5mm con gradiente Z.

Estos experimentos se procesan con el *software MestReNova (MestReLab Research Inc)* Las muestras se prepararon utilizando D_2O como disolvente, suministrado por Aldrich.

Espectroscopía de fluorescencia: todos los espectros de fluorescencia se registraron en un fluorímetro Cary Eclipse a temperatura constante, 25°C. El equipo cuenta con un sistema multicelda termostatizado para cubetas convencionales, se utilizaron en todos los experimentos cubetas de cuarzo de 1 mm de paso de luz. Los espectros de emisión de fluorescencia del ANS, de las mezclas ANS y pilarareno y de las mezclas con iones se realizaron a una longitud de onda de excitación de 350 nm, apertura de 10 nm tanto en rendija de excitación como de emisión. La variación de intensidad se ha recogido a 505 nm.

Dinámica Molecular: estos experimentos han sido realizados por el profesor Rodrigo Montecinos Escobar (Pontífica Universidad Católica de Chile). Las simulaciones de dinámica molecular se realizan usando el programa Gromacs [33] versión 4.6.5, el P5TMA y ANS han sido construidos con parámetros de [34] GROMOS96 54A7 incluyendo la solvatación del disolvente (agua) con el modelo SPC/E [35]. Uso del algoritmo LINCS para la restricción de la longitud de enlace de P5TMA y ANS, uso del algoritmo SETTLE para la restricciones de las moléculas de agua [36].

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.3.1 Comportamiento fotoquímico de ANS con P5TMA.

Con el fin de ampliar en el conocimiento del comportamiento fotoquímico del ANS y, ante los reveladores resultados obtenidos en su interacción con las ciclodextrinas (capítulo 2), se decide realizar un estudio homólogo al anterior usando en este caso P5TMA como receptor molecular. El principal interés del uso de este nuevo macrociclo en el estudio de este tipo de sistemas radica por una parte, en la ampliación del conocimiento en la generación de capas de solvatación heterogéneas y, por otra parte, en la contribución a la ampliación de sistemas *host:guest* formados por pilararenos.

En primer lugar, se ha evaluado la influencia de la concentración de P5TMA sobre las propiedades del ANS, con este objetivo se han realizado espectros de fluorescencia a muestras con una concentración de sonda constante (4.00×10^{-6}M) y concentraciones crecientes de macrociclo; todos los experimentos se realizaron a una temperatura constante de 25 °C (Fig. 1). Tal y como se esperaba, se produce un aumento de la intensidad de fluorescencia a la vez que la banda correspondiente al ANS se desplaza hacia menores longitudes de onda debido a la inclusión de la sonda en la cavidad del macrociclo. Tal y como esperábamos tras los resultados obtenidos en el capítulo 2, un análisis más profundo de la influencia de P5TMA sobre el comportamiento del ANS revela que la variación de sus propiedades no se produce de forma sincrónica.

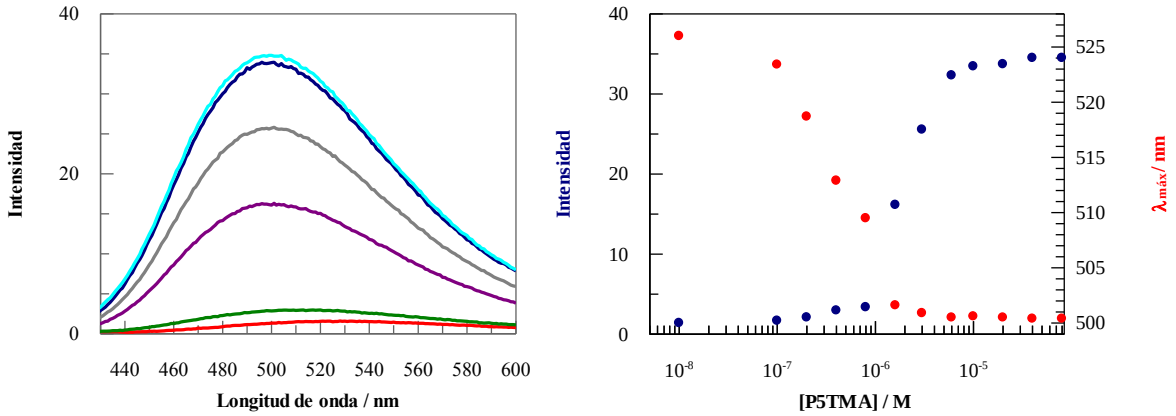


Figura 1. (Izquierda) Espectros de fluorescencia de ANS (4.00 x 10^{-6}M) con excitación a 350 nm y temperatura constante de 25ºC al variar la concentración de P5TMA en el medio. (Derecha) Variación de la intensidad (a 505 nm) y posición de la longitud de onda del máximo al variar la concentración de P5TMA.

Como primera conclusión, se puede establecer que prácticamente todo el cambio de la posición de la banda se ha completado antes de alcanzar el punto de equimolaridad entre P5TMA y ANS, en este punto, el cambio correspondiente a la intensidad es prácticamente despreciable. A pesar de los resultados obtenidos en el capítulo 2, las diferencias estructurales del P5TMA frente a las ciclodextrinas hacen que no sea correcto el planteamiento de un modelo de formación de un complejo de inclusión 1:1 que evoluciona a un complejo con estequiometría 2:1. Ante esta premisa, y para proseguir con el mismo protocolo establecido en el anterior capítulo, se plantea como primera explicación a la variación asincrónica de la intensidad y la posición de la banda del ANS, la formación de un complejo de inclusión de estequiometría 1:1 donde la sonda se introduce en la cavidad del macrociclo. Para conocer la constante de equilibrio del sistema se deduce una ecuación que relacione el cambio de intensidad y posición a partir del equilibrio formado.

$$\text{ANS} + \text{P5TMA} \rightleftharpoons 1{:}1$$

Esquema 4. Esquema de equilibrio de reacción entre ANS y P5TMA dando lugar a la formación de un complejo de estequiomería 1:1.

A partir del equilibrio planteado en el esquema 4 se establece la relación entre cada una de las moléculas con la constante de equilibrio (1) y, tras una reordenación de los términos y denominando x a la concentración de complejo formado, es decir a 1:1; se obtiene la expresión (2) que permite ajustar el modelo planteado a los datos experimentales (deducción completa del modelo en el apéndice 3.5.3). Cabe destacar que todas las concentraciones con cero como subíndice hacen referencia a concentraciones iniciales mientras que, todas aquellas que no disponen de subíndice hacen referencia a concentraciones en el equilibrio.

$$K = \frac{[1:1]}{[ANS][P5TMA]} \quad (1)$$

$$Kx^2 - K([P5TMA]_0[ANS]_0)+1]x + K[P5TMA]_0[ANS]_0 = 0 \quad (2)$$

Resolviendo la ecuación 2 se determina la proporción de complejo 1:1 formado en el medio, para el cálculo de la constante de equilibrio será necesario relacionar el cambio en la intensidad y en la posición del máximo con la formación del complejo. El cambio en la intensidad se define mediante la suma de la contribución de cada una de las especies (3) siendo I_L y I_C la intensidad del ANS libre y complejado, respectivamente y; x_L y x_C la fracción molar de ANS libre y complejado, respectivamente. Mediante un balance de materia y reorganización de la ecuación (3) se obtiene la expresión (4).

$$I = I_L x_L + I_C x_C \quad (3)$$

$$I = I_C + \frac{I_L - I_C}{[ANS]_0} x_c \quad (4)$$

En el cambio de la longitud de onda se toma como aproximación la expresión (5) donde se supone que el máximo de emisión resultante es la suma de la contribución de cada una de las especies. Se considera esta expresión como una mera herramienta de aproximación dados los buenos resultados obtenidos en el capítulo 2, la magnitud correcta para la determinación de la emisión individual de cada uno de los componentes viene dada por la deconvolucion de los espectros obtenidos tal y como se indica en el capítulo anterior. Al igual que en el caso del cambio de intensidad, la nomenclatura elegida es λ_L y λ_C para la longitud de onda correspondiente al ANS libre y complejado, respectivamente.

$$\lambda = \lambda_L x_L + \lambda_C x_C \quad (5)$$

Para calcular todos los parámetros del sistema se emplea un método iterativo utilizando el software *Solver* (Microsoft Excel), el ajuste del modelo planteado no resulta satisfactorio ya que, como se puede observar en la figura 2 no es posible ajustar de manera simultánea y satisfactoria ni el cambio en intensidad ni en la longitud de onda.

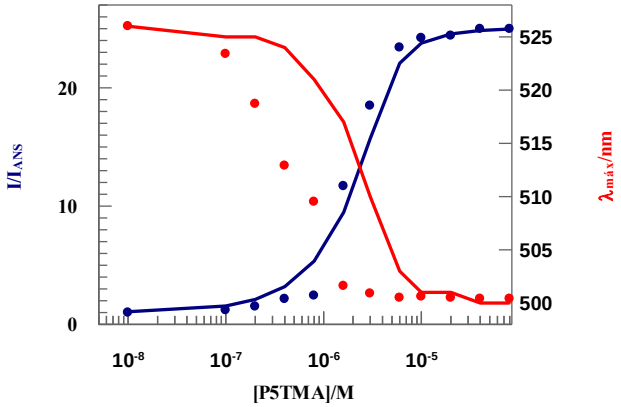


Figura 2. Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración P5TMA, ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:1 obteniendo un mal ajuste para ambos parámetros.

En vista de los resultados anteriores es necesario plantear un modelo más complejo en el que intervengan un mayor número de moléculas, dadas las características estructurales del ANS y P5TMA se plantea un nuevo modelo donde se forma un primer complejo de estequiometría 1:2. En este caso, cuando la concentración de P5TMA es mucho menor que la concentración de ANS se formará un complejo de inclusión con estequíometría 1:2 donde dos moléculas de ANS se introducen mediante el anillo de anilino en la cavidad del pilarareno (uno por el portal superior y otro por el portal inferior). Este sistema permite explicar el comportamiento del ANS ya que, justifica la modificación de la posición de la banda correspondiente a la sonda y la invariabilidad del segundo parámetro, la intensidad. A concentraciones superiores de P5TMA, una vez alcanzado el punto de equimolaridad de concentraciones de anfitrión y huésped, el sistema evoluciona para dar lugar a la formación de un complejo de estequiometría 1:1. En este nuevo sistema, el ANS penetra más profundamente en la cavidad del pilarareno dando lugar a modificaciones en la solvatación del anillo de naftaleno; esta teoría permite explicar el cambio en el rendimiento cuántico del ANS cuando la concentración de P5TMA es lo suficientemente alta. En este estudio, se descarta la posibilidad de formación de un complejo de inclusión con estequiometría 2:1 dada la naturaleza catiónica del pilarareno, si se formara este tipo de complejo se situarían diez cargas positivas muy próximas entre sí, con la única estabilización de una carga negativa aportada por la sonda. Esta situación establecería un sistema muy inestable, produciéndose la repulsión entre los dos macrociclos. El modelo planteado se muestra en el esquema 5.

$$2\ \text{ANS} + \text{P5TMA} \overset{K_1}{\rightleftharpoons} 1{:}2$$

$$1{:}2 + \text{P5TMA} \overset{K_2}{\rightleftharpoons} 1{:}1$$

Esquema 5. Esquema de equilibrio de reacción entre ANS y P5TMA dando lugar a la formación de un complejo 1:2 y, a continuación, un complejo de estequiometría 1:1 al aumentar la concentración de P5TMA.

En este caso, para la resolución del sistema y determinación de las constantes de equilibrio se ha empleado el *software Dynafit*, iterando el valor de las constantes de equilibrio, la intensidad asociada al complejo 1:2 y la intensidad asociada al complejo 1:1 hasta alcanzar una concordancia aceptable entre los valores obtenidos experimentalmente y, los resultantes del ajuste. Cabe destacar que la intensidad asociada al ANS libre (en agua pura) se mantiene constante al tratarse de un valor conocido. Tal y como puede observarse en la figura 3, el ajuste global del modelo planteado proporciona un resultado óptimo dando lugar a la determinación del valor de las constantes de equilibrio: $K_1 = (4.7 \pm 0.63) \times 10^8\ M^{-1}$ y $K_2 = (8.29 \pm 0.75) \times 10^5\ M^{-1}$.

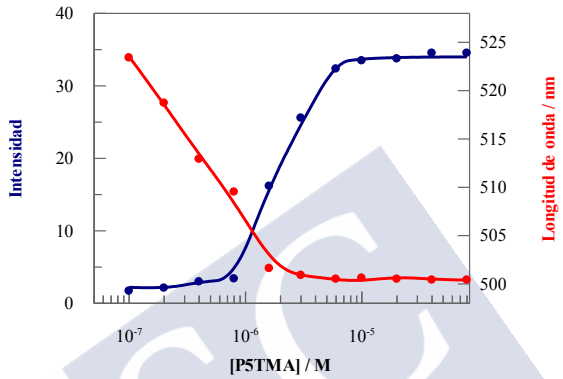


Figura 3. Variación de: (•) intensidad y (•) longitud de onda en función de la concentración P5TMA y ajuste de los datos experimentales al modelo de complejación 1:2 y 1:1 obteniendo un buen ajuste para la intensidad y el máximo de emisión.

Siguiendo el protocolo establecido en el capítulo 2, la determinación de la longitud de onda de emisión se ha calculado suponiendo que se trata de una magnitud aditiva, para garantizar la validez de la simplificación se ha realizado la deconvolución de cada uno de los espectros de emisión en los que la concentración de P5TMA es inferior a 10^{-6}M (Fig. 4), concentraciones en las que sólo se observa presencia del complejo 1:2. Mediante este tratamiento se puede calcular tanto la constate de equilibrio K_1 del sistema establecido en el esquema 5 como la fracción molar de complejo 1:2 en función de la concentración de P5TMA. La constante de equilibrio K_1 determinada para el sistema ANS P5TMA es $(5.3 \pm 0.47) \times 10^8\ M^{-1}$ (Fig 5). El segundo parámetro que se valora es la posición del complejo 1:2, la deconvolución de los espectros muestran dos bandas con forma gaussiana. La primera banda con centro en 18818 cm^{-1}, correspondiente a una longitud de onda de 531 nm, se identifica con el ANS libre en agua mientras que, la segunda con centro en 19333 cm^{-1}, correspondiente a 517 nm, se identifica con el ANS, el grupo anilino, que se encuentra en la cavidad del P5TMA. Es importante destacar que los valores obtenidos para la constante K_1 y las posiciones en el espectro mediante su deconvolución son compatibles a los obtenidos en el ajuste global del sistema. La razón de esta similitud se encuentra en el hecho de que con concentraciones inferiores a 10^{-6}M es posible la formación de un complejo de inclusión con estequiometría 1:2.

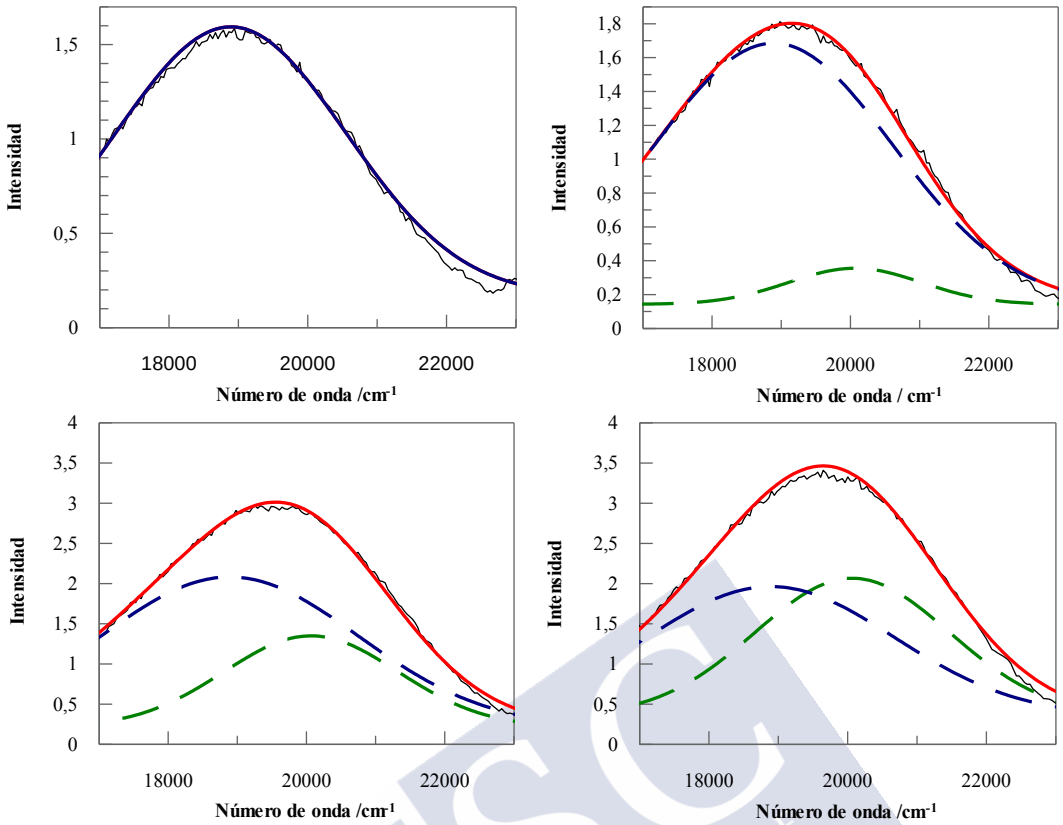


Figura 4. Deconvolución de espectros de fluorescencia mostrándose (—) espectro de fluorescencia, (—) ajuste global, (- -) ANS en agua y (- -) complejo 1:1 de muestras con concentración constante de ANS 4.00 x 10^{-6} M y concentración de P5TMA: a) 0.00M, b) 1.00 x 10^{-7}M, c) 4.00 x 10^{-7}M y d) 8.00 x 10^{-7}M.

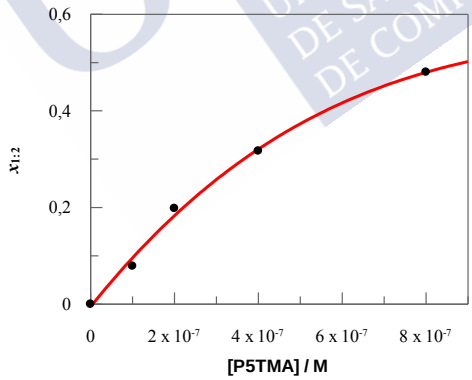


Figura 5. Fracción molar de complejo 1:2 frente a la concentración total de P5TMA y ajuste del modelo en color rojo.

Ante los resultados obtenidos y, para confirmar la formación de complejos con estequiometría 1:2 se emplea el método de la variación continua o *Job´s Plot* [37]. Este método [38], junto al método de relación de pendientes o de relación molar, se ha desarrollado con el fin de esclarecer la estequiometría de las reacciones de equilibrio químico. La utilidad y sencillez de este método lo ha convertido en el más usado, siendo especialmente útil para estudiar sistemas de metal:ligando, compuestos metalórganicos, interación de sondas fluorescentes con ADN y, por supuesto, el estudio de la interacción entre huéspedes y anfitriones. En este método, la concentración de complejo formado (o la variable que es proporcional a la

concentración; ya sea medidas de absorbancia UV-Vis, infrarrojo o posiciones en el espectro de RMN) se representa frente a la fracción molar de uno de los reactivos de forma que la suma de concentraciones totales es siempre constante. Para explicar el método se parte de un sistema ejemplo (esquema 6) del que se obtiene la ecuación 6 siendo x el valor de la fracción molar máxima.

$$A_n + G_m \overset{K_1}{\rightleftharpoons} A_n{:}\,G_m$$

Esquema 6. Ejemplo de reacción para el método de la variación continúa.

$$x = \frac{n}{n+m} \qquad (6)$$

Como se puede observar en la figura 6, el máximo de variación se haya en 0.65 para el ANS respecto a la concentración total. Empleando la ecuación 6 se determina que el parámetro m tiene un valor de 2 mientras que, el parámetro n posee un valor de 1. Por lo tanto, podemos concluir que la estequiometría puede llegar a ser la de un complejo 1:2. Este tipo de complejos ha sido estudiado ampliamente en nuestro grupo de investigación, uno de los ejemplos más característicos es la formación de un complejo 1:2 entre el P5TMA y *p*-toluensulfonato sódico (TSNa) [20].

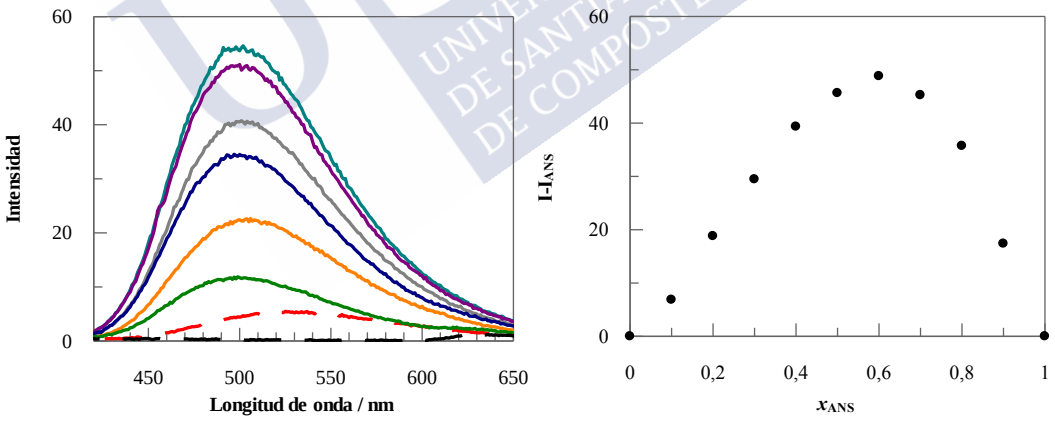


Figura 6. (Izquierda) Espectros de emisión de ANS (——), P5TMA (——) y mezclas P5TMA:ANS con fracción molar de ANS x_{ANS}: (—) 0.1, (—) 0.3, (—) 0.5, (—) 0.6, (—) 0.8 y (—) 0.9. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de ANS en presencia de P5TMA frente a la fracción molar de ANS en disolución, valores de emisión recogidos a una longitud de onda de 505 nm.

3.3.2 Comportamiento de ANS con P5TMA mediante espectroscopía de ^{1}H-RMN.

La segunda parte de este estudio se centra en una nueva técnica, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Esta técnica es una de las más utilizadas en el estudio de la formación de complejos de inclusión dado que, los cambios en los desplazamientos químicos o el cambio de multiplicidad, aportan una valiosa información sobre la interacción y estequiometría de la interacción.

Para confirmar la estequiometría 1:2 y su futura evolución a 1:1 se han realizado experimentos con una mezcla con concentración constante de ANS de 0.5 mM y variación de la concentración de P5TMA. Las señales correspondientes al macrociclo no sufren modificaciones significativas, sin embargo, las correspondientes al ANS varían considerablemente tanto en multiplicidad como en el desplazamiento químico observado. Especialmente significativo es el comportamiento de H_m (asignación de señales de ANS libre en figura 7) ya que, a relaciones molares menores de uno, las señales se desplazan hacia desplazamientos químicos menores, es decir, hacia campo alto; sin embargo, a una concentración de ANS de 0.6 mM se puede observar un ligero cambio de dirección. El protón H_m se desplaza ligeramente hacia un mayor desplazamiento químico, hacia campo bajo. Este tipo de comportamiento no es trivial, ya que es característico de procesos en los que se forman complejos con estequiometrías diferentes (figura 8). Cabe destacar que para muestras con concentración mayor a 0.3 mM es necesario realizar distintos experimentos para la asignación de cada una de las señales (apéndices 3.5.6 a 3.5.9).

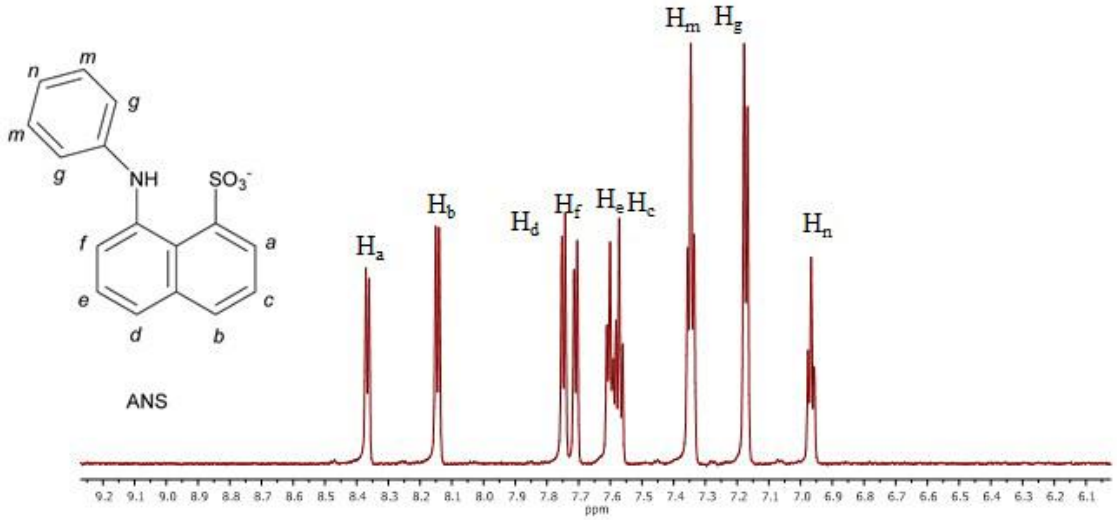


Figura 7. Espectro de RMN de una muestra de ANS 0.5 mM con su correspondiente asignación.

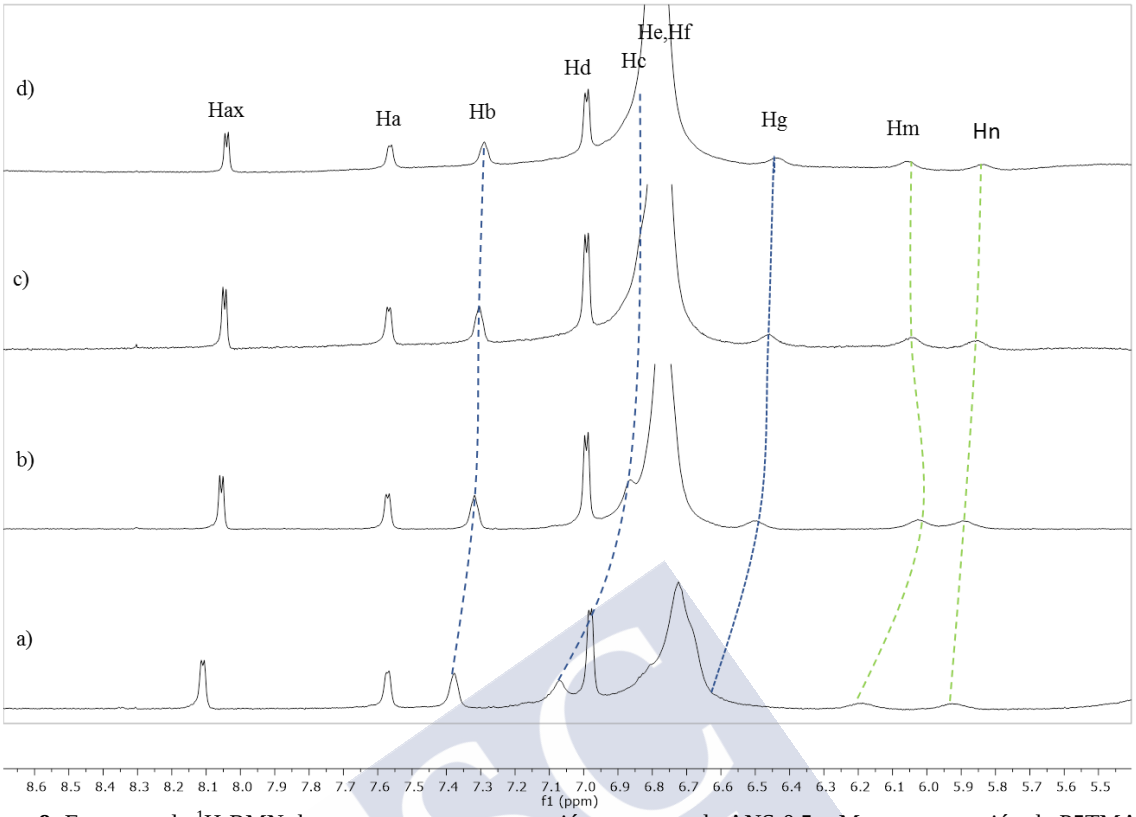


Figura 8. Espectros de ^{1}H-RMN de muestras con concentración constante de ANS 0.5 mM y concentración de P5TMA: a) 0.3 mM, b) 0.6 mM, c) 0.8 mM y d) 1.3 mM. Asignación de cada una de las señales de ANS siguiendo la nomenclatura de la figura 10.

Un análisis más detallado de la figura 8 permite esclarecer que los protones más afectados son los correspondientes al grupo anilino, los protones H_n sufren el mayor cambio con un desplazamiento de 1.51 ppm lo que nos permite confirmar que el ANS se incluye a través de este grupo dentro de la cavidad del pilarareno. Estos cambios son debidos al efecto de las corrientes de los anillos aromáticos del P5TMA al generar interacciones del tipo C-H···π y π···π dada la alta riqueza de electrones de la cavidad del macrociclo. En el caso del grupo naftaleno, los protones más afectados son H_e y H_f con un desplazamiento final de 0.95 ppm mientras que, los protones H_a y H_c sufren el menor cambio con un desplazamiento de 0.56 ppm. Esta diferencia permite postular que el ANS debe introducirse dentro de la cavidad de forma que el grupo sulfonato se sitúe hacia el exterior estableciéndose una interacción electrostática con los grupos catiónicos del pilarareno. El cambio en el desplazamiento de los protones H_m concuerda con los resultados obtenidos a partir de los experimentos de fluorescencia, los anillos de anilino de dos moléculas de ANS se encuentran en la cavidad del P5TMA, cuando la concentración de *host* es lo suficientemente alta (se supera la equimolaridad) una de las moléculas de ANS se incluye más internamente dentro de la cavidad haciendo que la segunda molécula de ANS se desplace hacia el exterior. En la figura 9 se representan los cambios en el desplazamiento del protón H_m, en la gráfica se pueden observar dos procesos completamente diferenciados. Cabe destacar que sólo se ha realizado el seguimiento de los protones H_m dada la complejidad de los espectros resultantes en los que se

producen solapamientos que impiden establecer de forma precisa la posición de cada uno de ellos. Los valores experimentados obtenidos se ajustan al modelo (2) haciendo uso de las constantes de equilibrio determinadas mediante fluorescencia, tal y como puede observarse el modelo se ajusta al comportamiento experimental observado mediante RMN.

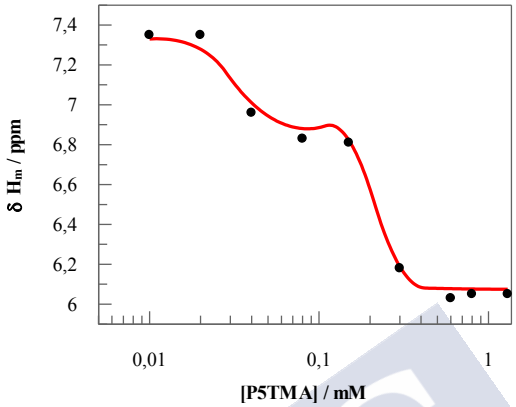


Figura 9. Desplazamiento de los protones H_m al variar la concentración de P5TMA en muestras de concentración constante de ANS (0.5 mM) y ajuste con las constantes obtenidas mediante los experimentos de fluorescencia.

3.3.3 Comportamiento de ANS con P5TMA mediante dinámica molecular.

Con el fin de confirmar la estabilidad de los complejos propuestos se realizó un estudio de dinámica molecular. En la figura 10 se muestra la estructura más probable del complejo de inclusión 1:2 donde se observa que ambas moléculas de ANS orientan su fragmento anilino hacia el interior de la cavidad. En la figura 11 muestra la distancia entre los hidrógenos *n* de cada molécula de ANS, y el centro de la cavidad siendo la distancia de interacción cercana a los 0.2 nm; es importante destacar que esta distancia es similar para las dos moléculas de ANS. Adicionalmente, se estudió el ángulo dihedrico de ambas moléculas huésped, la evolución de este ángulo se muestra en la figura 11 y está formado por los átomos C(8a)-C(8)-N-C(1'), mostrándose una amplitud entorno a los 155°. Es importante destacar que se mantiene la estructura conformacional del ANS dentro de la cavidad, es posible afirmar mediante este estudio que el fragmento naftaleno queda expuesto en mayor extensión al disolvente formando un complejo estable. Esta estructura es compatible con los resultados obtenidos anteriormente, el cambio en la longitud de onda observado mediante fluorescencia se debe a la inclusión del grupo anilino dentro de la cavidad del P5TMA. Tal y como se puede observar en la figura 10, el anillo de naftaleno está prácticamente expuesto al medio, esta estructura explicaría el efecto tan pequeño sobre el rendimiento cuántico a bajas concentraciones de P5TMA.

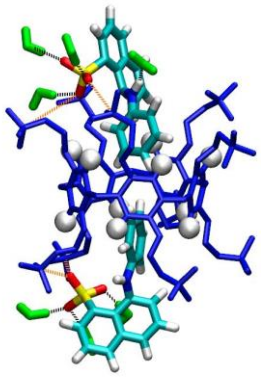


Figura 10. Estructura del complejo formado por P5TMA y ANS con estequiometría 1:2. El P5TMA es en color azul mientras que, el ANS es representado con los carbonos de color cyan, los hidrógenos en blanco, azufre en amarillo y oxígeno en rojo. En verde se representan las moléculas de agua que interactúan con el complejo.

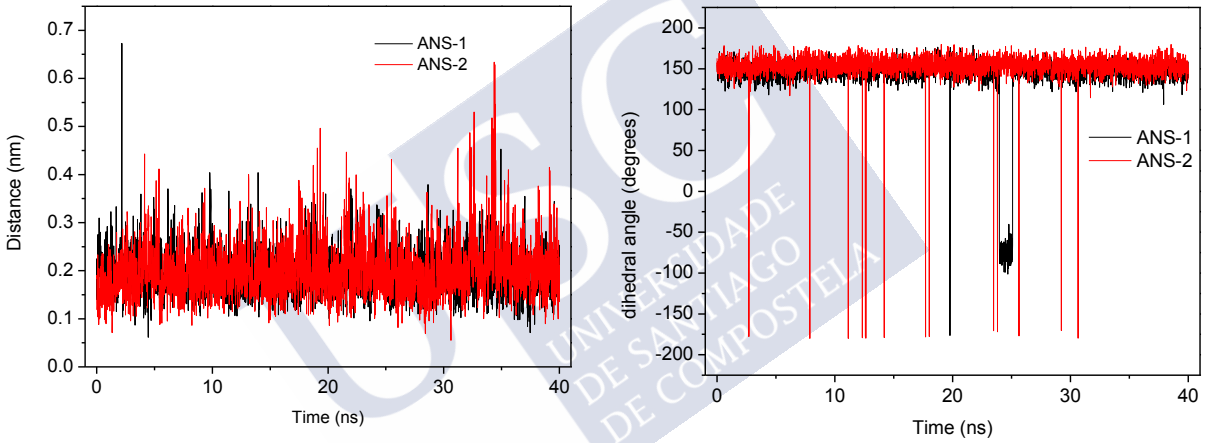


Figura 11. (Izquierda) Gráfico de la distancia entre hidrógeno n de cada sonda y el centro geométrico del macrociclo en función del tiempo. (Derecha) Gráfico de la evolución del ángulo dihédrico formado por C(8a)-C(8)-N-C(1') para cada molécula de ANS.

El siguiente paso consistió en estudiar la estabilidad del complejo con estequiometría 1:1, como una medida general de la inserción del fragmento de anilino en la cavidad se calculó de nuevo la distancia entre el hidrogeno *n* y el centro geométrico de la cavidad. En la figura 13 se muestra la distancia entre las especies mencionadas en función del tiempo, a partir de este experimento se puede determinar que la distancia de interacción es cercana a 0.15 nm. Una distancia de equilibrio estable para la interacción P5TMA:ANS involucraría una estabilidad conformacional de la molécula de ANS en el interior de la cavidad del macrociclo. En la figura 13 se muestra la evolución del ángulo dihedrico formado por los átomos C(8a)-C(8)-N-C(1') de ANS en el interior de la cavidad siendo este de 155°, este valor por tanto coincide en ambas estructuras. La estabilidad en el valor del ángulo dihedrico, y por lo tanto, de la conformación de ANS dentro de la cavidad tiene diversas contribuciones, tales como: interacción electrostática entre el grupo sulfonato de ANS y los grupos amonio de P5TMA, la interacción entre el hidrogeno del grupo amino y los distintos oxígenos del grupo

sulfonato, la formación de enlace de hidrógeno entre los oxígenos del grupo sulfonato y los hidrógenos del agua y, por último, la interacción del anillo anilino dentro de la cavidad hidrofóbica. En la figura 12 se muestra la conformación más probable del complejo 1:1 entre ANS y P5TMA, la mayor inclusión del anillo anilino de ANS en la cavidad hidrofóbica y, por tanto, la mayor inclusión del anillo de naftaleno, permite explicar el cambio en el rendimiento cuántico observado en los experimentos de fluorescencia al aumentar la concentración de huésped. Además, el pequeño cambio en la inclusión (la diferencia de la distancia de interacción entre el complejo 1:2 y el complejo 1:1 es de 0.5 nm) concuerda con la sutil variación en el desplazamiento químico observado en el protón H_m, el cambio de ambiente de los protones no es lo suficientemente grande como para observar cambios mayores mediante resonancia magnética nuclear.

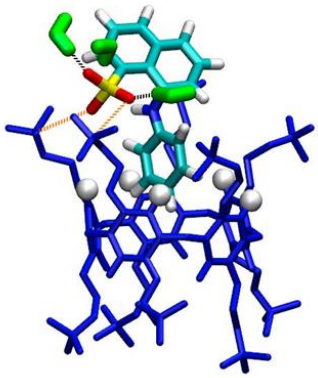


Figura 12. Estructura del complejo P5TMA:ANS con estequiometría 1:1. El P5TMA se representa en color azul mientras que el ANS se representa con los carbonos de color cyan, los hidrógenos en blanco, azufre en amarillo y oxígeno en rojo. En verde se representan las moléculas de agua que interaccionan con el complejo.

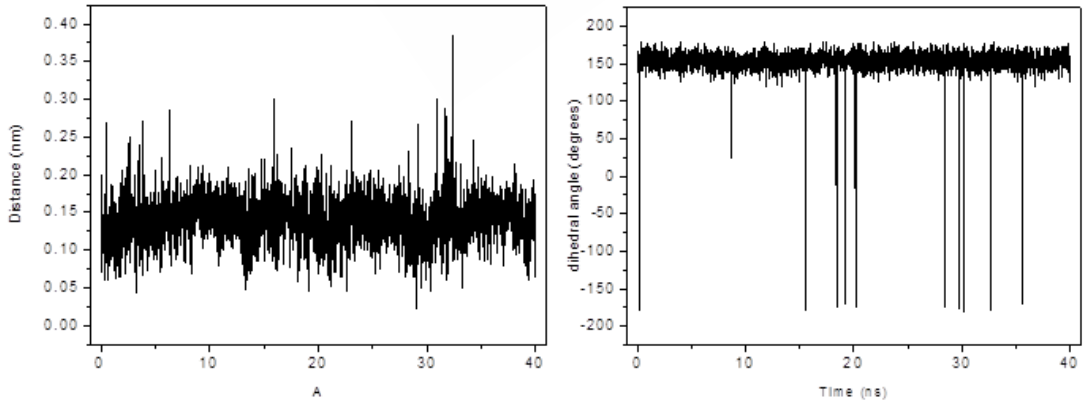


Figura 13. (Izquierda) Gráfico de la distancia entre hidrógeno n de ANS y el centro geométrico del macrociclo en función del tiempo. (Derecha) Gráfico de la evolución del ángulo dihédrico formado por C(8a)-C(8)-N-C(1').

3.3.4 Evidencia de la complejación de iones pequeños por P5TMA.

Tras la determinación del tipo de complejos formados por P5TMA:ANS y la consiguiente determinación de las constantes de equilibrio, se decide emplear este sistema con el objetivo de estudiar la formación de complejos de inclusión de especies que no presenten sensibilidad espectroscópica. A partir de la disociación competitiva del complejo medida por la desaparición de la intensidad de fluorescencia al ser desplazada la sonda, ANS, al medio de reacción será posible la determinación de las constantes de equilibrio de diferentes iones. Como especies competitivas se han seleccionado varios iones derivados de sus correspondientes sales: KBF_4, NaBr, NaCl, $NaClO_4$, NaSCN y CH_3SO_3Na. Tal y como se ha explicado en la introducción de este capítulo, los pilararenos pueden formar complejos de inclusión con una alta variedad de metales, sin embargo, la determinación de constantes de equilibrio entre el P5TMA y los aniones seleccionados no ha sido estudiado por el momento.

En la realización de este estudio se han mantenido constante tanto la concentración de ANS como la de P5TMA, para facilitar el estudio del sistema se han seleccionado condiciones en las que solo es posible la formación de un complejo de estequiometría 1:1; de tal forma que una adicción de forma gradual del anión correspondiente derive en una disminución de la intensidad de emisión. Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo donde se asume la formación de un único complejo entre P5TMA y ANS de estequiometría 1:1 en el que el ANS es desplazado por el correspondiente anión formando un nuevo complejo. Para la realización de estos ajustes se utiliza de nuevo el *software Dynafit*, iterando el valor de la constante de equilibrio entre el P5TMA y el ión, la intensidad del complejo P5TMA:ión y la intensidad del complejo P5TMA:ANS obtenidos hasta alcanzar una concordancia aceptable entre los valores obtenidos experimentalmente y, los resultantes del ajuste. Cabe destacar que el valor de la constante de equilibrio entre el P5TMA y ANS se mantiene fija en todos los casos ya que, ha sido determinada previamente. En las figuras 14 a 16 se representa el ajuste de los datos experimentales al modelo seleccionado para cada uno de los iones mencionados, las constantes de asociación se recogen en la tabla 1.

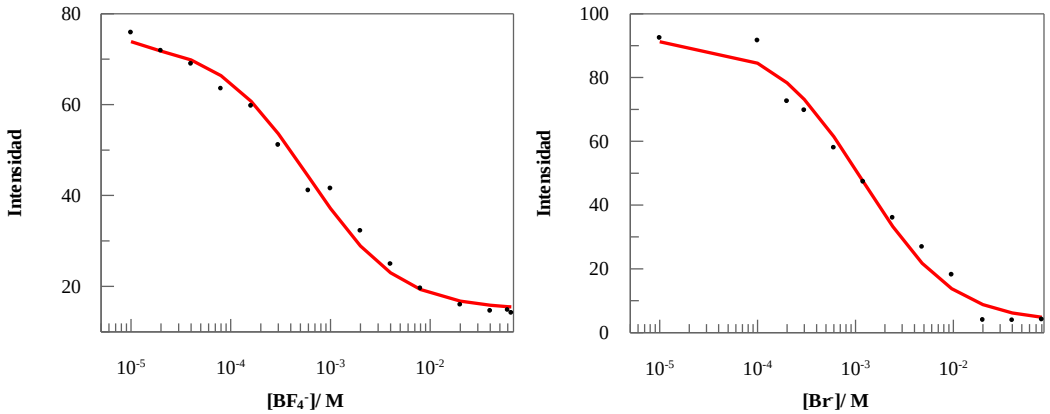


Figura 14. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración constante de [ANS] = 2.00 x 10^{-6} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-6} M al variar la concentración de $BF4^-$. Los valores de intensidad son tomados a 505 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo obteniendo una constante de (9.70 ± 1.2) x 10^3 M^{-1}. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración constante de [ANS] = 2.00 x 10^{-6} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-6} M al variar la concentración de Br^-. Los valores de intensidad son tomados a 505 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo obteniendo una constante de (4.84 ± 0.82) x 10^3 M^{-1}.

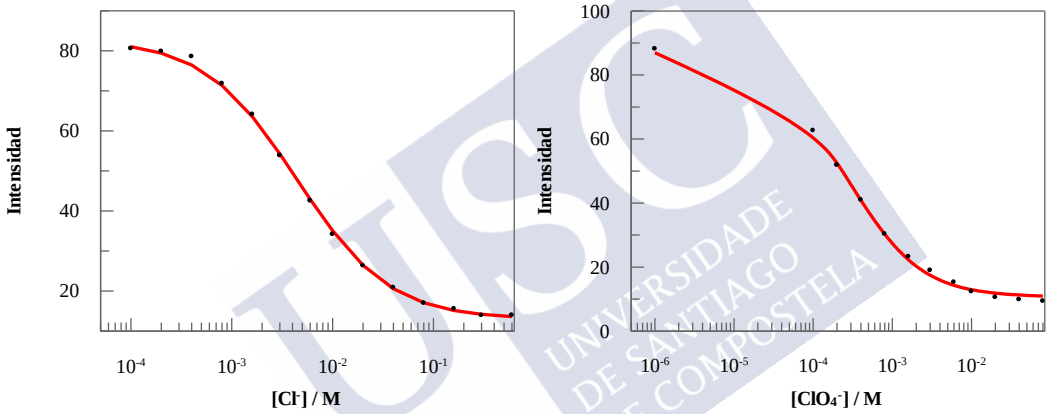


Figura 15. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración constante de [ANS] = 2.00 x 10^{-6} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-6} M al variar la concentración de Cl^-. Los valores de intensidad son tomados a 505 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo obteniendo una constante de (1.283 ± 0.056) x 10^3 M^{-1}. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración constante de [ANS] = 2.00 x 10^{-6} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-6} M al variar la concentración de ClO_4^-. Los valores de intensidad son tomados a 505 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo obteniendo una constante de (2.31 ± 0.17) x 10^4 M^{-1}.

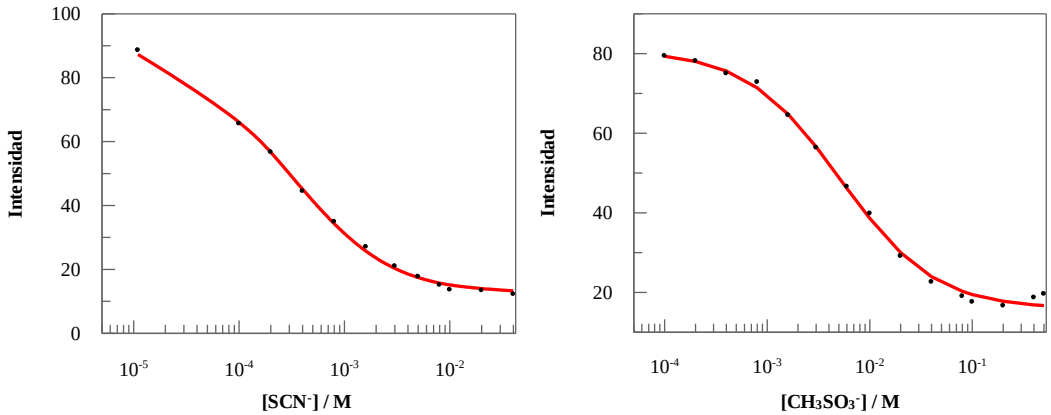


Figura 16. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración constante de [ANS] = 2.00 x 10^{-6} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-6} M al variar la concentración de SCN^-. Los valores de intensidad son tomados a 505 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo obteniendo una constante de (1.93 ± 0.13) x 10^4 M^{-1}. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración constante de [ANS] = 2.00 x 10^{-6} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-6} M al variar la concentración de $CH_3SO_3^-$. Los valores de intensidad son tomados a 505 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo obteniendo una constante de (1.093 ± 0.074) x 10^3 M^{-1}.

Tabla 1. Constantes de asociación determinadas mediante el desplazamiento del ANS de la cavidad del P5TMA ($K_{P5TMA:IÓN}$). Valores obtenidos mediante el ajuste previamente descrito en este capítulo manteniendo fija la constante de asociación del complejo P5TMA:ANS en 8.29 x $10^5 M^{-1}$ ($K_{1:1}$).

Ión	$K_{P5TMA:IÓN}$ / M^{-1}
BF_4^-	(9.70 ± 1.2) x 10^3
B_r^-	(4.84 ± 0.82) x 10^3
Cl^-	(1.283 ± 0.056) x 10^3
ClO_4^-	(2.31 ± 0.17) x 10^4
SCN^-	(1.93 ± 0.13) x 10^4
$CH_3SO_3^-$	(1.093 ± 0.074) x 10^3

Los buenos resultados obtenidos en esta serie de experimentos abren una importante vía de investigación ya que, la determinación de constantes de equilibrio de moléculas que no presentan una propiedad que puede ser medible directamente es, generalmente, un proceso arduo y complejo. Mediante el desplazamiento del ANS del interior del P5TMA por parte de otra sonda se hace posible la ampliación de la biblioteca existente actualmente para complejos formados por P5TMA. Ante estos resultados, se decidió estudiar el sistema utilizando sondas de mayor tamaño. Por una parte, se desarrolló el estudio con TSNa, sonda especialmente interesante por contar con una estructura similar al ANS. Por otra parte, se desarrolló el sistema con 1-hexanosulfonato sódico (C_6SO_3Na), esta sonda es especialmente interesante por tratarse de una molécula capaz de formar estructuras complejas del tipo micelas.

3.3.5 Evidencia de la complejación de alcanosulfonatos lineales.

Dada la buena afinidad de P5TMA hacia aniones de pequeño tamaño se decide ampliar el campo de sondas utilizadas en el estudio. Para ello, se selecciona un alcanosulfonato lineal, el 1-hexasulfonato sódico (C_6SO_3Na). Al igual que en el anterior estudio, se realizan diferentes espectros de emisión a una muestra de concentraciones constantes de ANS y P5TMA, 2.00 x 10^{-6} M y 6.00 x 10^{-6} M respectivamente.

Los datos experimentales fueron ajustados según el modelo propuesto en los experimentos anteriores, asumiendo la formación de un único complejo entre P5TMA y ANS de estequiometría 1:1, donde de nuevo el ANS es desplazado por el 1-hexanosulfonato sódico dando lugar a un nuevo complejo. Para la realización de estos ajustes se utiliza de nuevo el *software Dynafit*, iterando el valor de la constante de equilibrio entre el P5TMA y el 1-hexanosulfonato sódico, la intensidad relativa del complejo formado con el P5TMA y la intensidad asociada al complejo P5TMA:ANS obtenidos hasta alcanzar una concordancia aceptable entre los valores obtenidos experimentalmente y los resultantes del ajuste. Cabe destacar que la constante de equilibrio del complejo P5TMA:ANS se mantienen constante dado que ya ha sido calculada previamente. En la figura 17 se representa la variación en la intensidad y en la longitud de onda a medida que aumenta la concentración de C_6SO_3Na en el medio. Tal y como se puede observar se produce un desplazamiento del ANS del interior al exterior de la cavidad del P5TMA, cabe destacar que en este caso la variación de las dos propiedades del ANS, rendimiento cuántico y posición de la banda, lo hacen de forma sincrónica, evidenciándose la formación de un complejo de estequíometría 1:1 entre P5TMA y C_6SO_3Na, quedando descartado por tanto la formación de algún complejo del tipo 1:1:1. Además, en la figura 17 se representa el ajuste del modelo a los datos experimentales, tal y como se puede observar el ajuste es satisfactorio obteniéndose una constante de asociación para el complejo P5TMA:C_6SO_3Na de (1.74 ± 0.37) x 10^7 M^{-1}. El valor obtenido para el sistema está en concordancia con estudios previos en nuestro grupo de investigación donde la constante para este sistema fue determinada de manera directa, mediante técnicas de valoración calorimétrica y resonancia magnética nuclear, mediante estos experimentos se obtuvo un valor de (1.67 ± 0.03) x 10^7 M^{-1} [39].

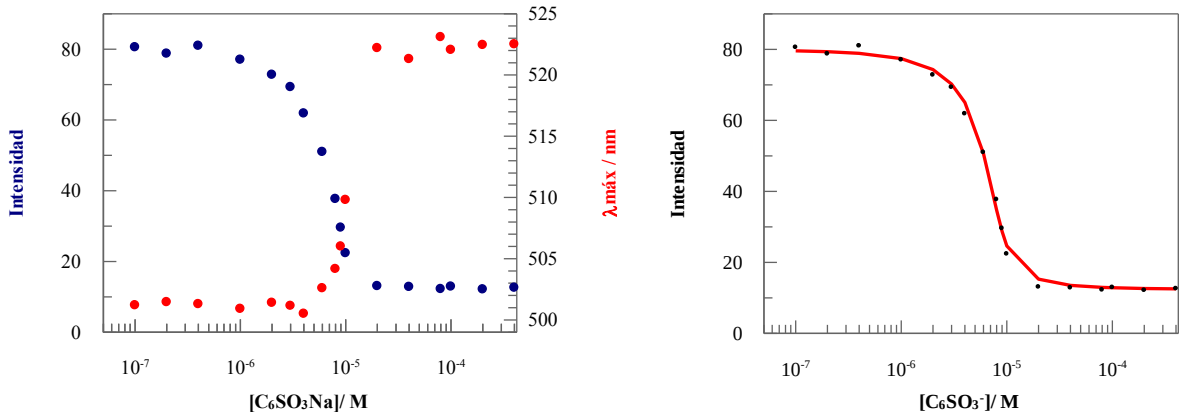
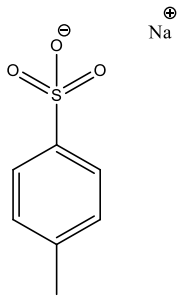


Figura 17. (Izquierda) Variación de: (•) intensidad a 505 nm y (•) longitud de onda en función de la concentración de C_6SO_3Na en una muestra de [ANS] = 2.00 x 10^{-6} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-6} M (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración constante de [ANS] = 2.00 x 10^{-6} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-6} M al variar la concentración de C_6SO_3Na. Los valores de intensidad son tomados a 505 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo obteniendo una constante de (1.74 ± 0.37) x 10^3 M^{-1}.

La constante observada es uno de los valores más altos obtenidos en la formación de complejos con un pilarareno de cinco unidades actuando como receptor molecular, este resultado se explica mediante la formación de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, la cavidad altamente hidrofóbica del P5TMA estabiliza la cadena alquílica del C_6SO_3Na mediante interacciones del tipo C-H···π. Por otra parte, los grupos catiónicos trimetilaminio del pilarareno interactúan con el grupo sulfonato mediante interacciones electrostáticas.

3.3.6 Evidencia de la complejación de p-toluensulfonato sódico.

Como último grupo de sondas se seleccionó el *p*-toluensulfonato (TSNa) sódico dado que se trata de una molécula orgánica aniónica cuya estructura cuenta con un anillo aromático al igual que en el caso del ANS (esquema 7). Al igual que en los estudios anteriores, se realizan diferentes espectros de emisión a una muestra de concentraciones constantes de ANS y P5TMA, 2.00 x 10^{-6} M y 6.00 x 10^{-6} M respectivamente.



Esquema 17. Estructura de *p*-toluensulfonato sódico (TSNa)

Los datos experimentales se representan en la figura 18 (en el apéndice 3.5.8 se muestra el mismo experimento con diferentes condiciones), tal y como puede observarse el comportamiento del sistema es completamente diferente al estudio con C_6SO_4Na. El cambio en las propiedades del ANS es sincrónico, pero no presenta una única tendencia. Analizando la intensidad se puede observar cómo aumenta ligeramente hasta una concentración aproximada de TSNa de 2.00 x 10^{-5}M para después, disminuir hasta alcanzar un valor compatible con el rendimiento cuántico del ANS en agua. En el caso de la longitud de onda, la banda correspondiente al ANS se desplaza hacia menores longitudes de onda hasta llegar a una concentración de aproximadamente 1.00 x 10^{-4}M, a partir de esta concentración de TSNa se produce un cambio de sentido en la banda de forma que, se produce un nuevo desplazamiento hasta alcanzar el punto original.

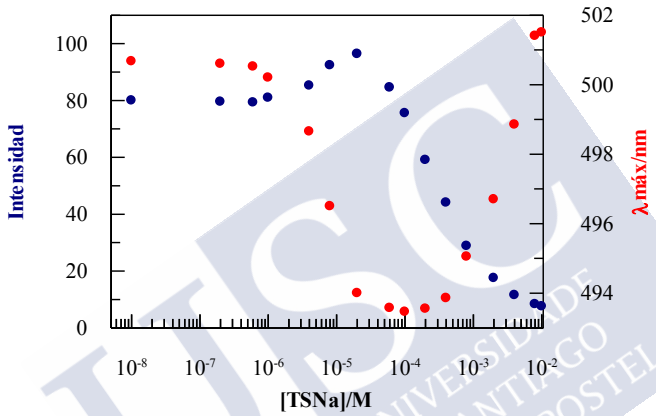


Figura 17. Variación de: (•) intensidad a 505 nm y (•) longitud de onda en función de la concentración de TSNa en una muestra de [ANS] = 2.00 x 10^{-6} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-6} M.

El comportamiento de este nuevo sistema no se puede explicar con el desplazamiento del ANS del interior de la cavidad dando lugar a un nuevo complejo 1:1 por dos motivos: el valor de la intensidad no debería aumentar en ningún momento y, además, la posición de la banda correspondiente al ANS es la misma que al inicio del experimento por lo que, el anillo de naftaleno se encuentra dentro de la cavidad. La segunda hipótesis descartada es la posible formación de complejos de inclusión con estequiometrias superiores a 1:1 entre el P5TMA y TSNa; aunque sea posible la formación de complejos con estequiometría 1:2 entre ambos no sería posible explicar el efecto sobre la posición de la banda del ANS.

Descartadas las dos hipótesis anteriores se plantea la formación de un complejo con estequiometría 1:1:1, es decir, el TSNa se introduciría por uno de los portales mientras que, el ANS se situaría en el otro portal del P5TMA. Un análisis más detallado del cambio en la intensidad nos indica que, el aumento medido solo puede ser justificable ante un desplazamiento del anillo de naftaleno hacia el interior de la cavidad donde la hidrofobicidad sea mayor. Paralelamente, la posición de la banda del ANS se desplaza hacia menores longitudes de onda, este comportamiento es compatible con un mayor desplazamiento de la sonda hacia el interior de la cavidad. A concentraciones mayores de TSNa se observa una

disminución en la intensidad, este comportamiento es un indicador de que el anillo de naftaleno del ANS se encuentra en contacto con el medio acuoso si bien, no se recupera el valor del rendimiento cuántico del ANS en agua. Sin embargo, la banda del ANS se desplaza hacia mayores longitudes de onda, alcanzando un valor próximo a la posición inicial del experimento; esto debería de ser un indicativo de que el anillo de anilino se encuentra en el interior de la cavidad del P5TMA y, además, su disposición debe ser similar a la del ANS cuando forma complejos 1:1 con el P5TMA.

Ante la imposibilidad de plantear un mecanismo de reacción con la información aportada por los experimentos de fluorescencia, se realiza un nuevo estudio de dinámica molecular con el objetivo de esclarecer los cambios observados. Optimizando la formación de un complejo 1:1:1 (Fig 18) se obtiene una estructura estable en la que tanto el anillo del fragmento anilino del ANS como el del TSNa se encuentran insertos en la cavidad. Estudiando las distancias entre el centro de cavidad y los hidrógenos *n* de ANS así como, las distancias correspondientes al grupo metilo de TSNa con respecto a la cavidad; se determina que el TSNa se encuentra más al interior de esta. Estos resultados son compatibles con estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, en los que se establecía que el TSNa podía formar un complejo de estequiometría 1:1 con P5TMA situándose en el centro de su cavidad [39]. Este fenómeno produce, durante el primer tercio del cálculo, el desplazamiento del ANS hacia el exterior de la cavidad, siendo este mayor de 1 Å con respecto a su localización en el complejo 1:1. Durante el primer tercio del cálculo, el fragmento naftaleno está mayormente expuesto al agua, sin embargo, a partir del segundo tercio de simulación, ocurre un cambio conformacional en ANS en el cual el ángulo dihédrico C(8a)-C(8)-N-C(1') pasa de 155° a -70° (Fig 19) Este cambio conformacional produce un "acercamiento" entre el fragmento naftalenico de ANS y las cadenas de P5TMA lo que permite explicar el anómalo comportamiento de la intensidad con la formación del complejo 1:1:1. Adicionalmente, el cambio de conformación en ANS va acompañado de una mayor incorporación del fragmento anilino en la cavidad del macrociclo, este factor sumado a la hidrofobicidad aportada por TSNa a la cavidad permitiría explicar el cambio en la posición de la banda de la sonda. En la figura 20, se representa la molécula de ANS con los dos ángulos dihédricos calculados para favorecer la interpretación de la figura 18.

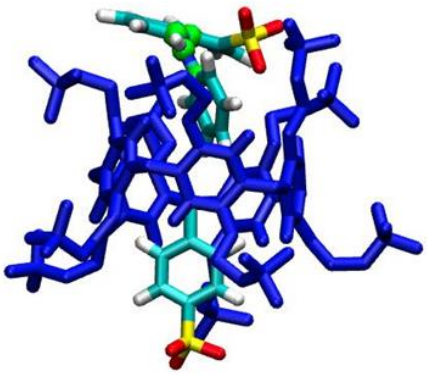


Figura 18. Estructura del complejo 1:1:1 formado por ANS:P5TMA:TSNA. El P5TMA es representado en color azul, el ANS y TSNA se representan con los carbonos de color cyan, los hidrógenos en blanco, azufre en amarillo y oxígeno en rojo y; las moléculas de agua del medio se representan en color verde.

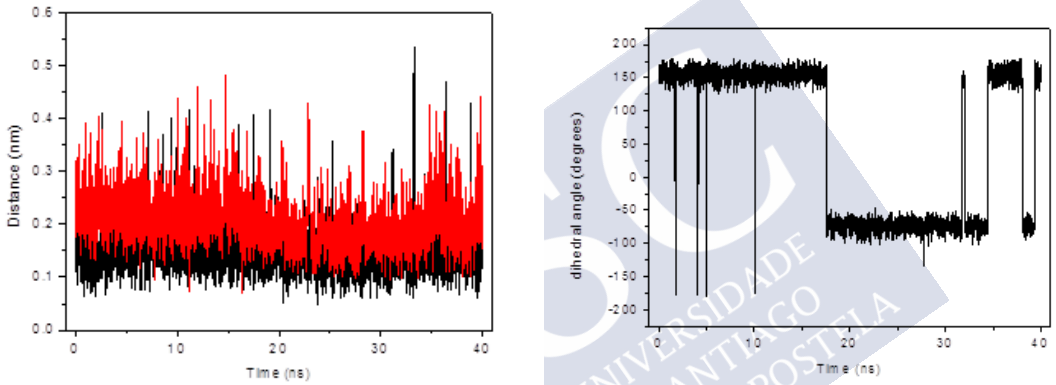


Figura 19. (Izquierda) Distancia entre hidrógeno n del ANS con el centro geométrico del macrociclo en función del tiempo. (Derecha) Evolución del ángulo dihédrico formado por C(8a)-C(8)-N-C(1') para cada molécula de ANS.

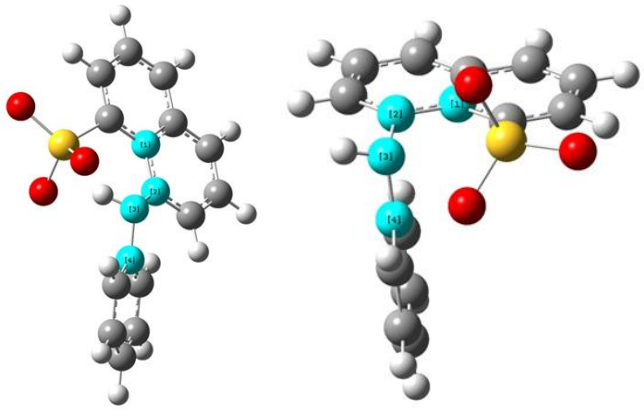


Figura 20. (Izquierda) Conformación de la molécula de ANS con un ángulo dihédrico de 155º (Derecha) Conformación de la molécula de ANS con un ángulo dihédrico de -70º.

3.3.7 Influencia del tamaño del receptor en el comportamiento fotoquímico de ANS.

Como último factor se evaluó el tamaño de la cavidad del macrociclo, evidentemente el mayor tamaño de un pilar[6]areno (≈ 7.5 Å) [40] frente al P5TMA del estudio (≈ 5.0 Å) podrían dar lugar a cambios en la formación de los diferentes complejos. Con este objetivo se sintetizó un nuevo macrociclo, P6TMA , formado por seis unidades e idéntica funcionalización al P5TMA siguiendo una versión modificada de los métodos descritos por los grupos de Feihe Huang y Jean-François Nierengarten [23,41] (Apéndice 3.5.2).

En este estudio, se ha evaluado la influencia de la concentración de P6TMA sobre las propiedades del ANS, con este objetivo se han realizado espectros de fluorescencia a muestras con una concentración de sonda constante (4.00 x 10^{-6}M) y concentraciones crecientes de macrociclo; todos los experimentos se realizaron a una temperatura constante de 25 °C (Fig. 21) Tal y como se esperaba, se produce un aumento de la intensidad de fluorescencia a la vez que la banda correspondiente al ANS se desplaza hacia menores longitudes de onda debido a la inclusión de la sonda en la cavidad del macrociclo. Tal y como esperábamos tras los resultados obtenidos en el capítulo 2 y 3 de esta tesis doctoral, la variación de la intensidad y la posición de la banda es asincrónica, si bien es importante recalcar que en este caso es mucho más sutil que con el pilarareno de cinco unidades.

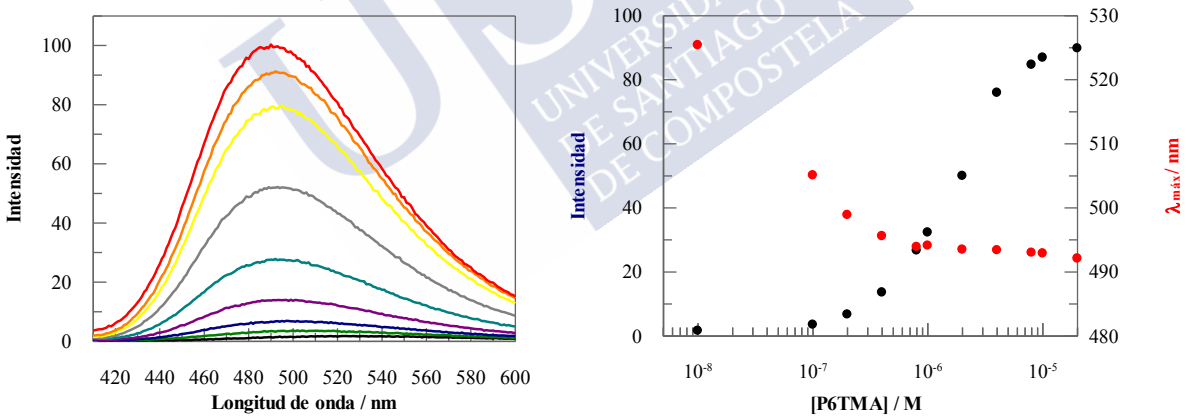


Figura 21. (Izquierda) Espectros de fluorescencia de ANS (4.00 x 10^{-6}M) con excitación a 350 nm y temperatura constante de 25°C al variar la concentración de P6TMA en el medio. (Derecha) Variación de: (•) intensidad (a 505 nm) y (•)posición de la longitud de onda del máximo al variar la concentración de P5TMA.

Como primera conclusión se puede establecer que prácticamente todo el cambio de la posición de la banda se ha completado antes de alcanzar el punto de equimolaridad entre P6TMA y ANS, si bien la intensidad alcanza un cambio de un 30% con respecto a su valor final. Siguiendo con el protocolo descrito con anterioridad y, ante la variación de la intensidad antes de alcanzar el punto de equimolaridad entre P6TMA y ANS, se descarta la formación de un complejo de inclusión de estequiometría 1:1 donde la sonda se introduce en la cavidad del macrociclo. Para conocer la constante de equilibrio del sistema se plantea el esquema 8, el ajuste del modelo a los datos experimentales se realiza mediante el *sotfware Dynafit*

obteniendo los resultados representados en la figura 22. Tal y como se puede observar, el modelo no reproduce el comportamiento del sistema; no siendo posible, además, alcanzar un grado de optimización óptimo.

$$ANS + P6TMA \rightleftharpoons 1:1$$

Esquema 8. Esquema de equilibrio de reacción entre ANS y P5TMA dando lugar a la formación de un complejo de estequiomería 1:1.

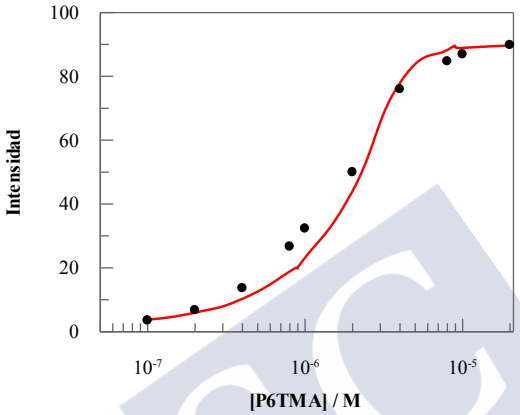


Figura 22. Variación de intensidad de ANS a 505 nm al variar la concentración de P6TMA en el medio, ajuste al modelo de formación de complejos con estequiometría 1:1 en rojo.

En vista de los resultados anteriores es necesario plantear un modelo más complejo en el que intervengan un mayor número de moléculas, dados los resultados obtenidos anteriormente para P5TMA actuando como receptor molecular, se plantea el mismo modelo de formación de un complejo con estequíometría 1:2 que evoluciona a un complejo con estequiometría 1:1 (esquema 9) La resolución del sistema y determinación de las constantes de equilibrio se ha empleado el *software Dynafit*, iterando el valor de las constantes de equilibrio K_1 y K_2 así como las intensidades relativas al complejo 1:2 y 1:1 obtenidos hasta alcanzar una concordancia aceptable entre los valores obtenidos experimentalmente y, los resultantes del ajuste. La intensidad del ANS libre (en agua) se mantiene constante ya que, se trata de un parámetro conocido. Tal y como puede observarse en la figura 23, el ajuste global del modelo planteado proporciona un resultado óptimo dando lugar a la determinación del valor de las constantes de equilibrio: $K_1 = (9.93 \pm 0.63) \times 10^{10}\ M^{-1}$ y $K_2 = (1.46 \pm 0.09) \times 10^{11}\ M^{-1}$.

$$2\ ANS + P6TMA \overset{K_1}{\rightleftharpoons} 1:2$$

$$1:2 + P6TMA \overset{K_2}{\rightleftharpoons} 1:1$$

Esquema 9. Esquema de equilibrio de reacción entre ANS y P6TMA dando lugar a la formación de un complejo 1:2 y, a continuación, un complejo de estequiometría 1:1 al aumentar la concentración de P5TMA.

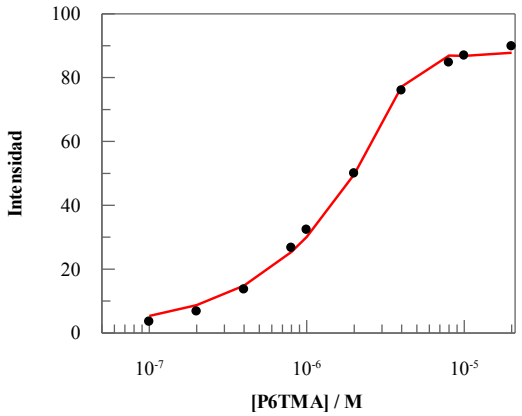


Figura 23. Variación de intensidad de ANS a 505 nm al variar la concentración de P6TMA en el medio, ajuste al modelo de formación de complejos con estequiometría 1:2 y 1:1 en rojo.

Los altos valores obtenidos para las constantes de asociación muestran la gran capacidad de P6TMA para actuar como receptor molecular de aniones en medio acuoso. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores realizados en nuestro grupo de investigación donde, se pudo determinar que las constantes de asociación de los pilar[6]arenos son mayores que en el caso de los P5TMA. Además, se comprobó la posibilidad de P6TMA para formar complejos de inclusión de estequiometría múltiple con sondas orgánicas de características similares al ANS [39]. Un aspecto importante que ha de ser resaltado es que la constante de asociación K_2 es mayor a K_1, esto es debido en gran medida a la mayor complementariedad de tamaños existente entre P6TMA y ANS presentando así una diferencia con el P5TMA donde la constante de asociación K_1 es mayor a K_2. La cavidad del P6TMA es suficientemente grande como para que se puedan introducir las dos moléculas de ANS más profundamente, esto implica que los anillos de anilino se pueden situar de tal manera que se permita el establecimiento de interacciones del tipo π-π. Comparando los valores finales de intensidad se puede concluir que en el caso del P6TMA aumenta en un factor de 3.6 con respecto a los resultados obtenidos con P5TMA; el desplazamiento de la banda del ANS es consistente con una mayor penetración por parte de la sonda en el P6TMA ya que el valor final es 495 nm frente a 500 nm (longitud de onda final en el estudio de P5TMA y ANS).

3.4 CONCLUSIONES.

En este capítulo se ha estudiado la capacidad del P5TMA para actuar como receptor molecular de sondas aniónicas. Con la primera de ellas, el ANS, se ha revelado la capacidad de este pilarareno de formar complejos con estequiometía múltiple, dando lugar a un primer complejo 1:2 que evoluciona a 1:1 cuando la concentración de huésped es lo suficientemente alta; las constantes de asociación calculadas son K_1 = (4.7 ± 0.63) x 10^8 M^{-1} y K_2 = (8.29 ± 0.75) x 10^5 M^{-1} para la formación del complejo 1:2 y 1:1, respectivamente. Mediante un experimento competitivo, se han podido determinar las constantes de equilibrio para diferentes iones de pequeño tamaño, así como para una molécula lineal. Las constantes $K_{P5TMA:IÓN}$ determinadas son: (9.70 ± 1.2) x 10^3, (4.84 ± 0.82) x 10^3, (1.283 ± 0.056) x 10^3, (2.31 ± 0.17) x 10^4, (1.93 ± 0.13) x 10^4, (1.093 ± 0.074) x 10^3 y (1.74 ± 0.37) x 10^7 M^{-1} siendo el ión $BF4^-$, Br^-, Cl^-, $Clo4^-$, SCN^-, $CH3SO3^-$ y $C6SO3^-$, respectivamente. El uso de TSNa como sonda competitiva reveló un nuevo modo de complejación dando lugar a la formación de complejos con estequiometría 1:1:1, especialmente importante es el cambio en la configuración que sufre el ANS para dar lugar a este sistema, el ángulo dihedro se modifica de 155º a -70º con la consiguiente variación de sus dos propiedades, rendimiento cuántico y posición de la banda en el espectro de emisión de fluorescencia.

Por último, se ha evaluado la capacidad del P6TMA para actuar como receptor de la sonda de interés, ANS, comprobando que la modificación de la intensidad y posición de la banda varían de forma asincrónica, de igual forma que con el pilarareno homólogo de cinco unidades. El P6TMA da lugar al mismo sistema que el P5TMA, formación de complejos de inclusión 1:2 y 1:1, si bien sus constantes de asociación son mucho mayores siendo K_1 = (9.93 ± 0.63) x 10^{10} M^{-1} y K_2 = (1.46 ± 0.09) x 10^{11} M^{-1} para la formación de complejos 1:2 y 1:1, respectivamente. Además, en el caso del P6TMA la constante de asociación K_1 es menor a K_2 marcando una importante diferencia con respecto a su homólogo de cinco unidades. Este cambio está asociado al tamaño del macrociclo y la formación de interacciones del tipo π-π, siendo la cavidad del P6TMA idónea para el acomodamiento del ANS en su interior.

3.5 APÉNDICES.

3.5.1 Síntesis y caracterización de P5TMA.

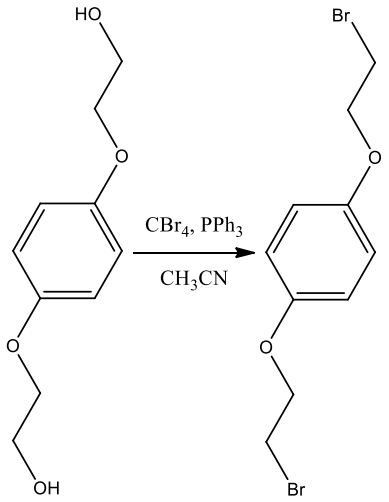
Todos los reactivos y disolventes utilizados en esta ruta sintética han sido obtenidos comercialmente, siendo de la máxima pureza posible y, usada sin ninguna purificación adicional.

Las reacciones sensibles al oxígeno o humedad se han llevado a cabo bajo atmósfera de argón desoxigenado y seco. El material utilizado en este tipo de reacciones se seca en la estufa a 150 ºC al menos durante 24 horas, los matraces se flamean y enfrían bajo una corriente de argón.

Los espectros de RMN se adquieren e un espectrofotómetro Mercury INOVA 300 (300 MHz para ^{1}H y 75 MHZ para ^{13}C) usando disolventes deuterados ($CDCl_3$ y D_2O) Los desplazamientos químicos se dan en unidades de δ (ppm) en la escala de TMS ($\delta = 0.0$ ppm), las constantes de acoplamiento J se dan en unidades de Hz. La referencia interna es la señal del disolvente, 7.26 y 4.80 ppm en ^{1}H para $CDCl_3$ y D_2O, respectivamente y; 77.16 ppm en ^{13}C para $CDCl_3$. Los espectros se procesan en el software MestReNova (MestReLab Research Inc).

Los espectros de masas de ionización por electroespray, ESI-MS modo positivo, de resolución alta se realizan en un espectofotómetro Bruker Amazon ETD con analizador de trampa iónica. La difracción de rayos X se realiza en un difractómetro de monocristal Bruker X8 Kappa APEXII a baja temperatura, 100K. Estas dos técnicas se llevan a cabo en el Centro de Apoyo Científico y Tecnológico de la Universidad de Santiago de Compostela (CACTUS)

En la síntesis del bromuro de bis[(trimetilamonio)etoxi]pilar[5]areno (P5TMA) se ha seguido una ruta sintética modificada basada en el método descrito por Feihe Huang [23].



1 2

Preparación de una disolución de (1) (10.0 g, 50.5 mmol) y PPh_3 (31.5 g, 120 mmol) en 230 mL en acetonitrilo seco. La disolución se enfrió hasta 0 ºC para tratarla con CBr_4 (39.8 g, 120 mmol) el cual se añade en pequeñas porciones. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente y con agitación durante 4 horas para a continuación, añadir 200 mL de agua fría. El sólido de color blanco resultante se filtra en placa y se lava con una mezcla de metanol/agua (60:40) Tras el secado del sólido obtenido en línea de vacío, se obtiene el producto final, 2, con un rendimiento del 83 %.

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): 6.86 (s, 4H); 4.25 (t, J=6.3, 4H); 3.61 (t, J=4H)

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75 MHz): 152.9 (C, 2C); 116.2 (CH, 4C); 68.8 (CH_2, 2C); 29.4 (CH_2, 2C)

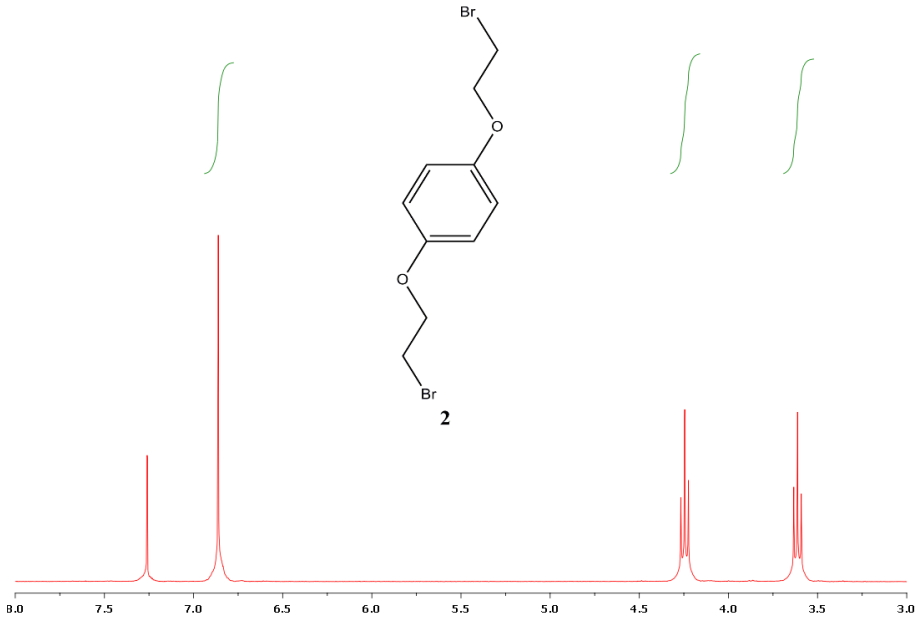


Figura A1. Espectro de ^{1}H-RMN (CDCl3, 300 MHz, 25ºC) obtenido para el compuesto 2.

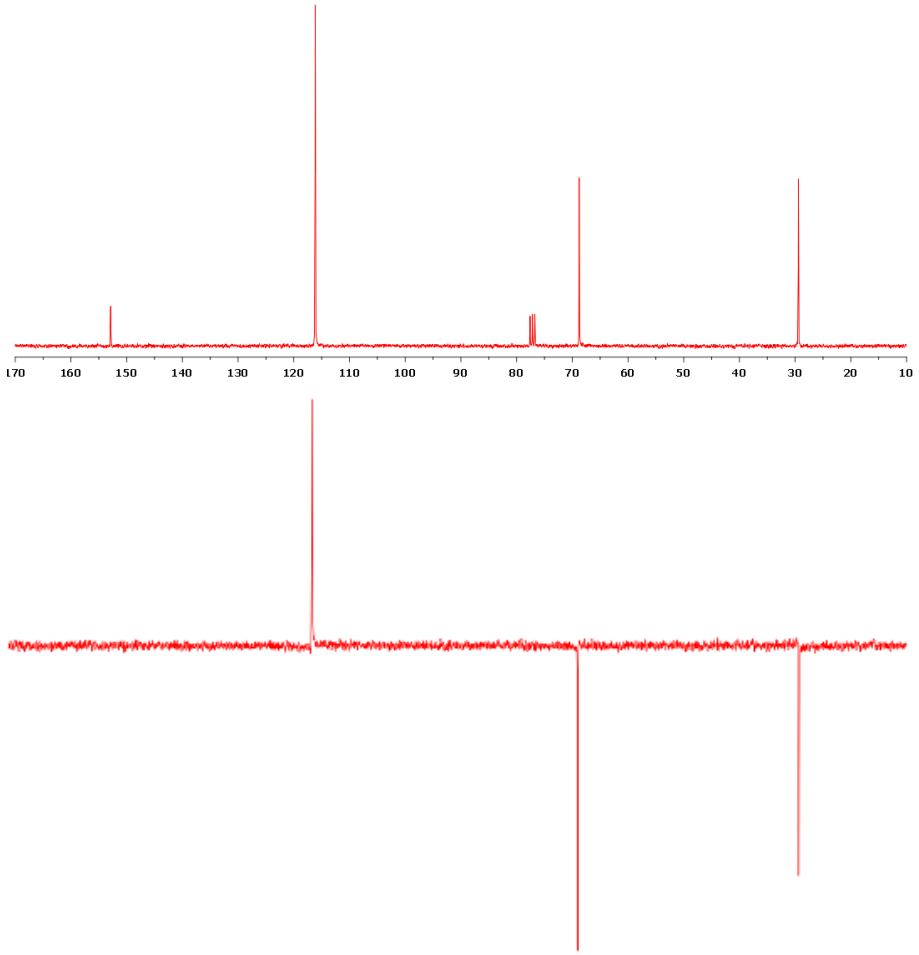
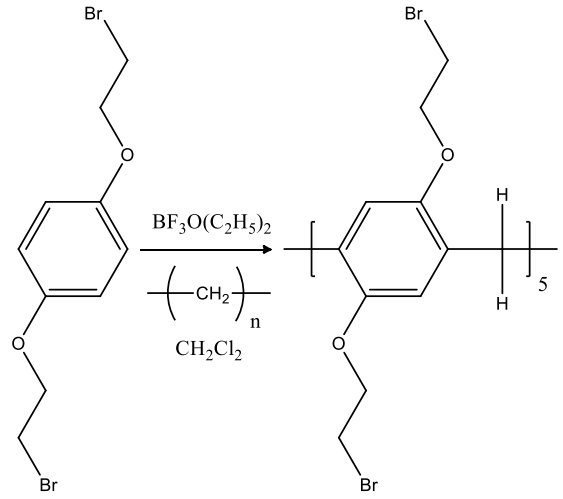


Figura A2. Espectro de ^{13}C-RMN (arriba) y DEPT (abajo) (CDCl3, 75 MHz, 25ºC) obtenido para el compuesto 2.



2 3

A una disolución de 2 (5.00 g, 15.43 mmol) en diclorometano (230 mL) se le añadió paraformaldehído (0.927 g, 30.87 mmol) y, a continuación, se trató con $BF_3O(C_2H_5)_2$(4.83 g, 33.86 mmol) La mezcla de reacción se dejó, a temperatura ambiente, bajo agitación durante 2 horas. Una vez transcurrido este tiempo se transvasó a un embudo de decantación para realizar lavados con agua (200 mL), disolución saturada de bicarbonato sódico (200 mL) y salmuera (200 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El sólido amarillo resultante se disolvió en diclorometano y se agitó en presencia de carbón activo durante 10 minutos. La suspensión se filtró en placa a través de celita, se concentró a sequedad y se secó en línea de vacío. Se obtuvo el compuesto 3 (4.70 g, 2.797 mmol) como un sólido blanco y con un rendimiento del 79%.

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): 6.92 (s, 10H); 4.23 (t, J=5.7, 20H); 3.85 (s, 10H); 3.63 (t, J=5.7, 20H)

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75 MHz): 149.7 (C, 10C); 129.1 (C, 10C); 116.0 (CH, 10C); 69.0 (CH_2, 10C); 30.8 (CH_2, 10C); 29.5 (CH_2, 5C)

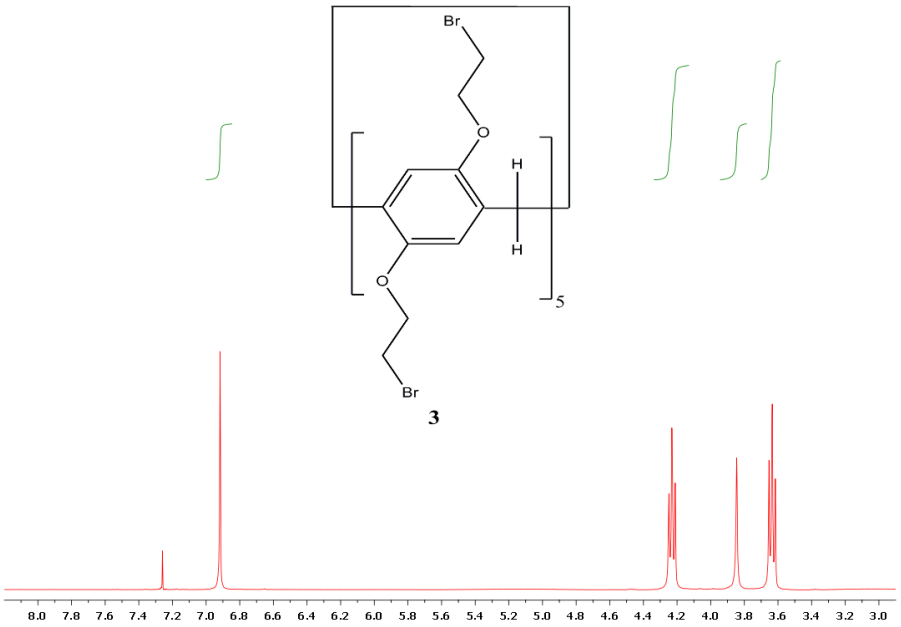


Figura A3. Espectro de ^{1}H-RMN (CDCl3, 300 MHz, 25ºC) obtenido para el compuesto 3.

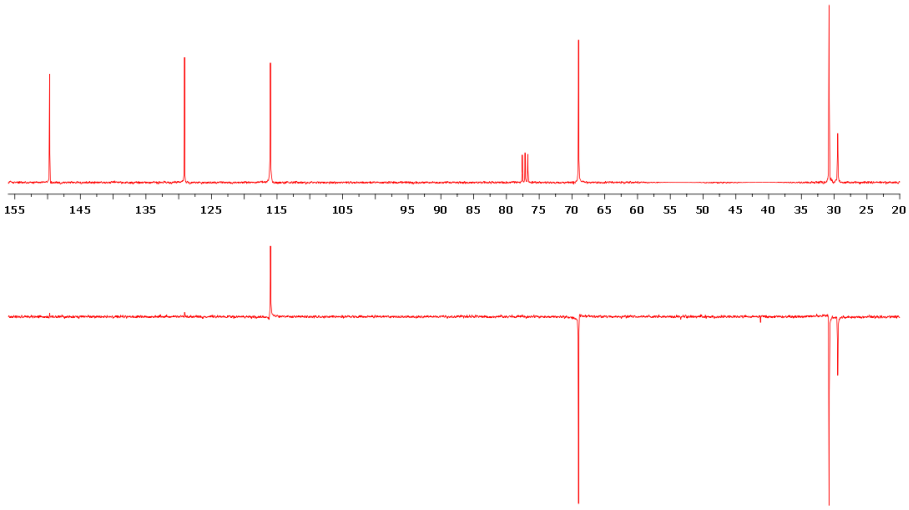


Figura A4. Espectro de ^{13}C-RMN (arriba) y DEPT (abajo) (CDCl3, 75 MHz, 25ºC) obtenido para el compuesto 2.

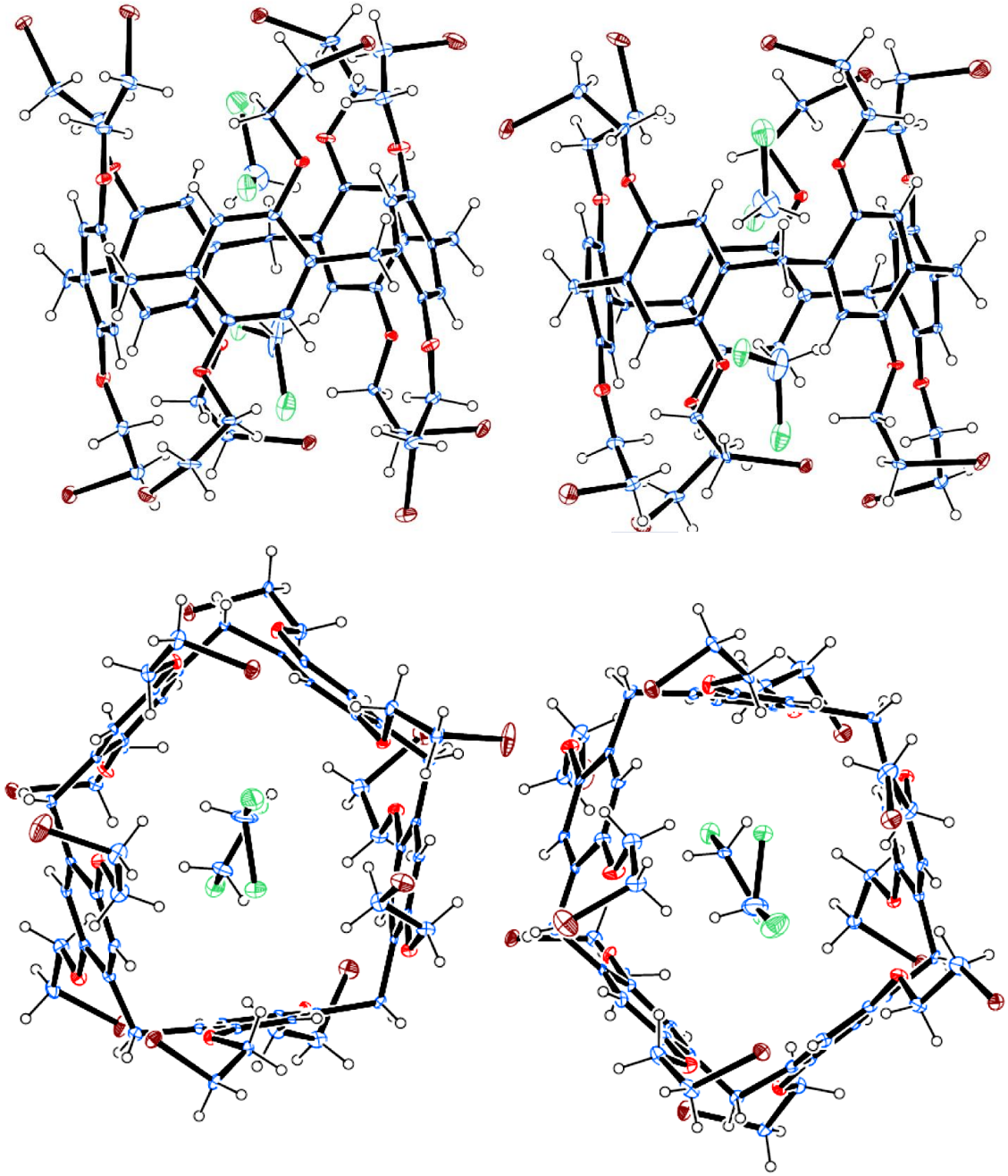
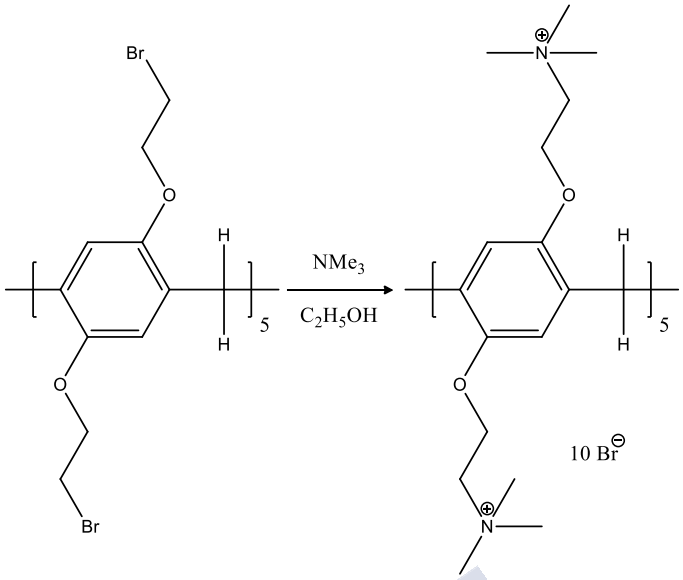


Figura A5. Estructura de 3 obtenida mediante difracción de Rayos X.

La estructura determinada mediante Difracción de Rayos X presenta dos moléculas independientes en la unidad asimétrica de la celdilla unidad. Cada una presenta dos moléculas de diclorometano en la cavidad del pilarareno. Se presentan dos moléculas de pilarareno y cuatro de diclorometano en total que son estructuralmente independientes. Los datos cristalográficos más relevantes se muestran a continuación.

Tabla A1. Datos cristalográficos del compuesto 3.

Fórmula empírica	$C_{55}H_{60}Br_{10}O_{10}$, $2(CH_2Cl_2)$
Peso / $gmol^{-1}$	1849.89
Temperatura / K	100(2)
Longitud de onda / Å	0.71073
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo	$P2_1$
Dimensiones de celda unidad	a = 13.0967(3) Å, α = 90º b = 21.4895(5) Å, β = 95.3140(10)º c = 23.5943(5) Å, γ = 90º
Volumen / $Å^3$	6611.9(3)
Z	4
Densidad (calculada) / mg m^{-3}	1.858
Coeficiente de absorción/ mm^{-1}	6.275
F (000)	3616
Tamaño de cristal / mm^3	0.37 x 0.30 x 0.18
Rango de ángulo de rastreo	0.87 a 26.73 º
Reflexiones recogidas	108500
Completo a Θ = 26.73º/ %	100
Corrección de absorción	Semiempírico desde equivalentes
Max. y min. de transmisión	0.2978 y 0.1813
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de raíz completa en F^2
Datos / contenido / parámetros	27104 / 1813 /1543
F^2	1.051
Índice R final	R1 = 0.0598, wR2 = 0.1232
Índice R	R1 = 0.0944, wR2 = 0.1359
Parámetros de estructura absoluta	0.467(8)
Mayor pico y cavidad / e $Å^{-3}$	1.802 y -1.243



3 4

El compuesto 3 (4.70 g, 2.279 mmol) se disolvió en etanol (205 mL) y se trató con NMe_3 (31-35% en etanol, 23.5 mL, 98.60 mmol). La disolución se dejó a reflujo durante 16 horas y, una vez enfriada se filtró en placa haciendo lavados con etanol. El sólido blanco obtenido se secó a vacío obteniéndose el compuesto final 4 (5.26 g, 2.316 mmol) con un rendimiento del 95%

^{1}H RMN (D_2O, 300 MHz): 6.95 (s, 10H); 4.45 (s, 20H); 3.94 (s, 10H); 3.80 (s, 20H); 3.22 (s, 90H)

^{13}C RMN (D_2O, 75 MHz): 149.3 (C, 10C); 129.9 (C, 10C); 116.5 (CH, 10C); 64.9 (CH_2, 10C); 63.4 (CH_2, 10C); 54.1 (CH_3, 30C); 29.5 (CH_2, 5C)

ESI-MS: m/z $[TMAP5^{10+}.8Br^{-}]^{2+}$ 1055.2 (calculado 1055.7)

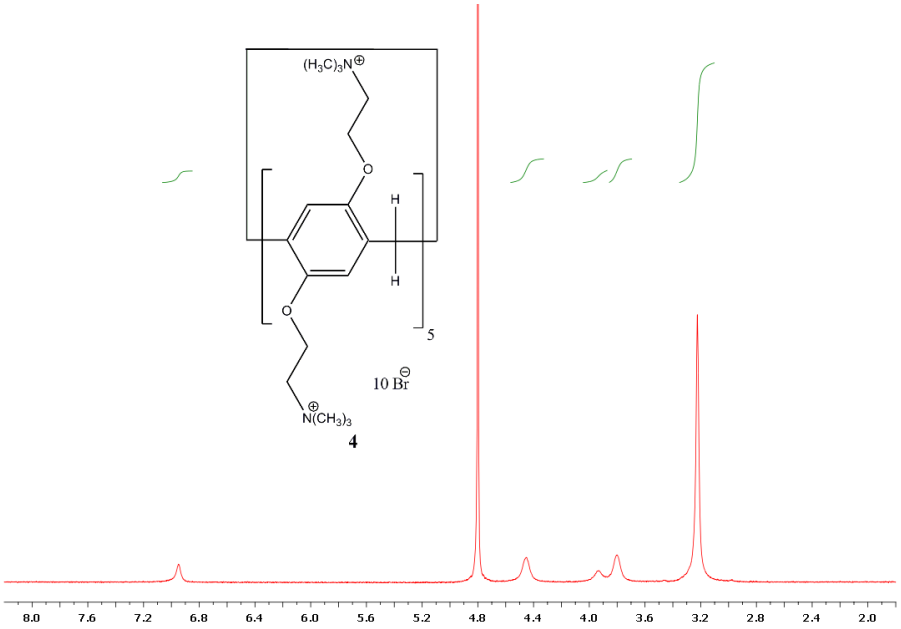


Figura A6. Espectro de ^{1}H-RMN (D_2O, 300 MHz, 25ºC) obtenido para el compuesto 3.

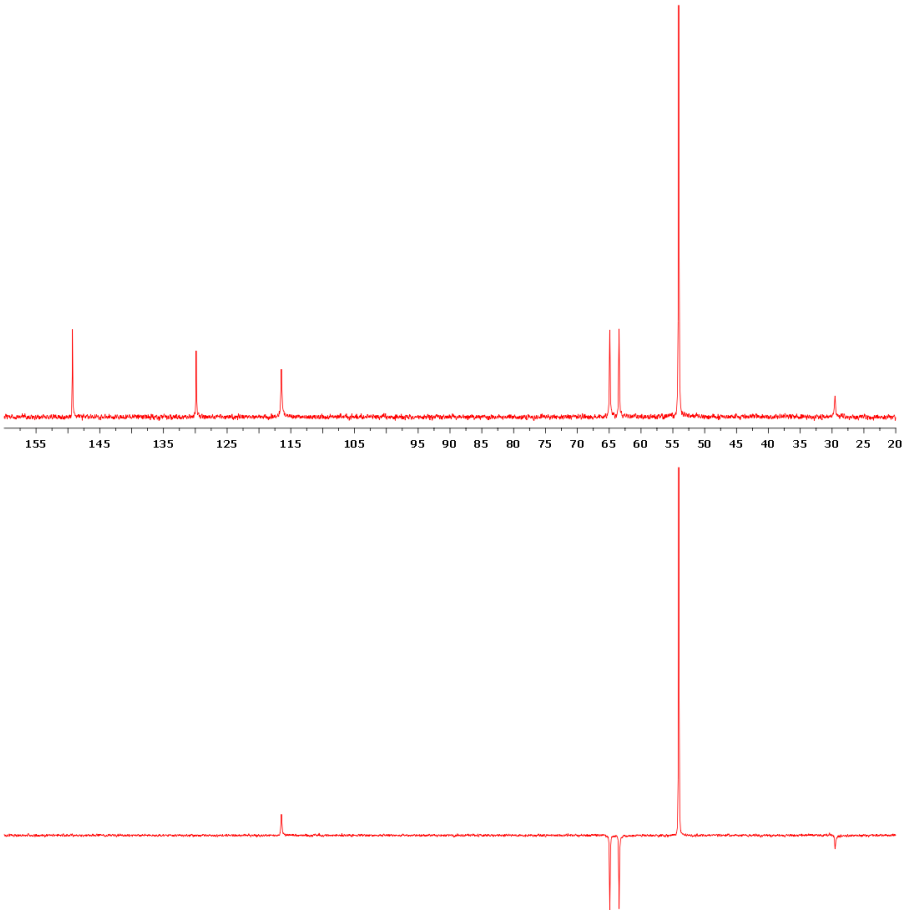


Figura A7. Espectro de ^{13}C-RMN (arriba) y DEPT (abajo) (CDCl3, 75 MHz, 25ºC) obtenido para el compuesto 2.

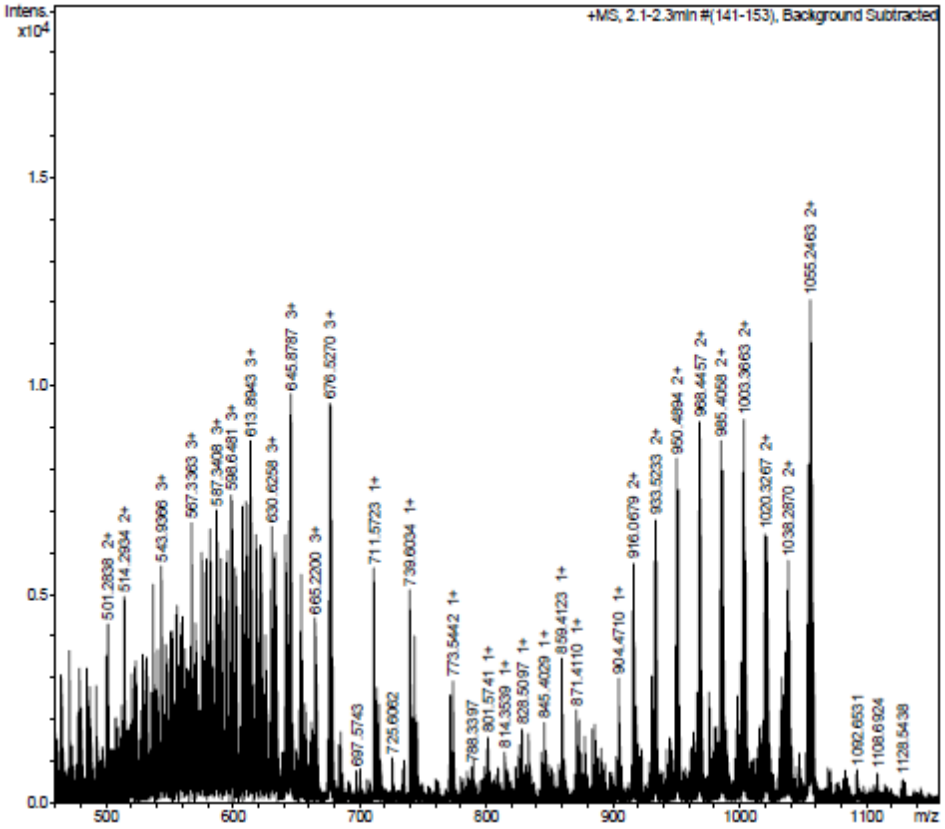


Figura A8. Espectro ESI-MS obtenido para el compuesto 4.

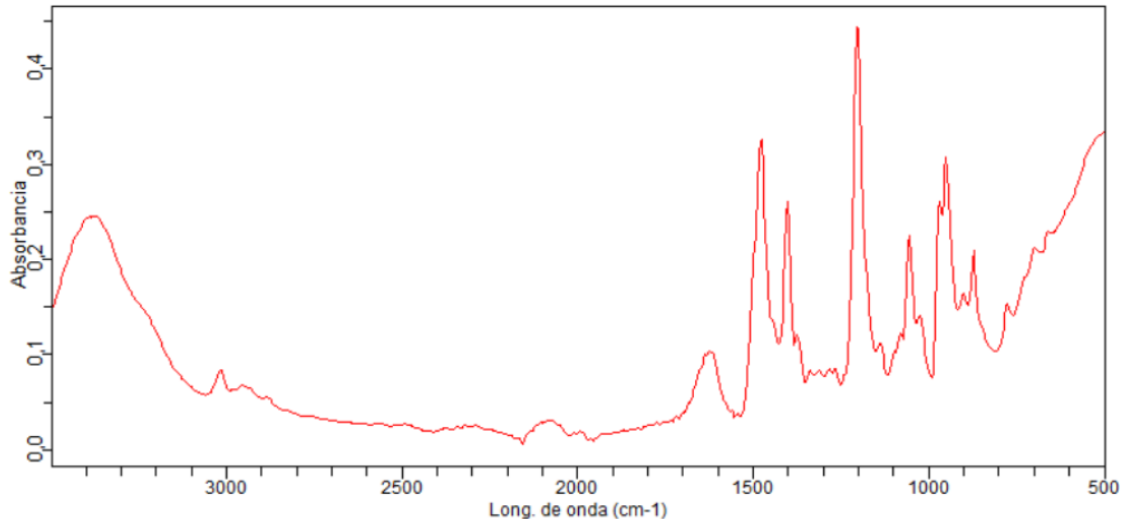


Figura A9. Espectro de IR obtenido para el compuesto 4.

3.5.2 Síntesis y caracterización de P6TMA.

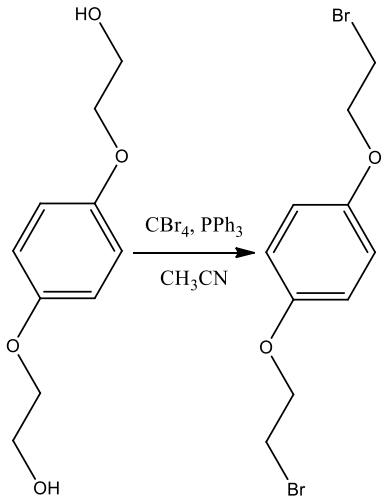
Todos los reactivos y disolventes utilizados en esta ruta sintética han sido obtenidos comercialmente, siendo de la máxima pureza posible y, usada sin ninguna purificación adicional.

Las reacciones sensibles al oxígeno o humedad se han llevado a cabo bajo atmósfera de argón desoxigenado y seco. El material utilizado en este tipo de reacciones se seca en la estufa a 150 ºC al menos durante 24 horas, los matraces se flamean y enfrían bajo una corriente de argón.

Los espectros de RMN se adquieren e un espectrofotómetro Mercury INOVA 300 (300 MHz para ^{1}H y 75 MHZ para ^{13}C) usando disolventes deuterados ($CDCl_3$ y D_2O) Los desplazamientos químicos se dan en unidades de δ (ppm) en la escala de TMS (δ = 0.0 ppm), las constantes de acoplamiento J se dan en unidades de Hz. La referencia interna es la señal del disolvente, 7.26 y 4.80 ppm en ^{1}H para $CDCl_3$ y D_2O, respectivamente y; 77.16 ppm en ^{13}C para $CDCl_3$. Los espectros se procesan en el software MestReNova (MestReLab Research Inc)

Los espectros de masas MALDI-TOF de resolución alta se realizan en un espectofotómetro Bruker Autoflex. La difracción de rayos X se realiza en un difractómetro de monocristal Bruker X8 Kappa APEXII CCD a baja temperatura, 100K. Estas dos técnicas se llevan a cabo en el Centro de Apoyo Científico y Tecnológico de la Universidad de Santiago de Compostela (CACTUS)

En la síntesis del bromuro de bis[(trimetilamonio)etoxi]pilar[6]areno (P6TMA) se ha seguido una ruta sintética modificada basada en el método descrito por Feihe Huang y Jean-FranÇois Nierengarten [23,41]



1 2

Preparación de una disolución de (1) (10.0 g, 50.5 mmol) y PPh_3 (31.5 g, 120 mmol) en 230 mL en acetonitrilo seco. La disolución se enfrió hasta 0 ºC para tratarla con CBr_4 (39.8 g, 120 mmol) el cual se añade en pequeñas porciones. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente y con agitación durante 4 horas para a continuación, añadir 200 mL de agua fría. El sólido de color blanco resultante se filtra en placa y se lava con una mezcla de metanol/agua (60:40) Tras el secado del sólido obtenido en línea de vacío, se obtiene el producto final, 2, con un rendimiento del 83 %.

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): 6.86 (s, 4H); 4.25 (t, J=6.3, 4H); 3.61 (t, J=4H)

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75 MHz): 152.9 (C, 2C); 116.2 (CH, 4C); 68.8 (CH_2, 2C); 29.4 (CH_2, 2C)

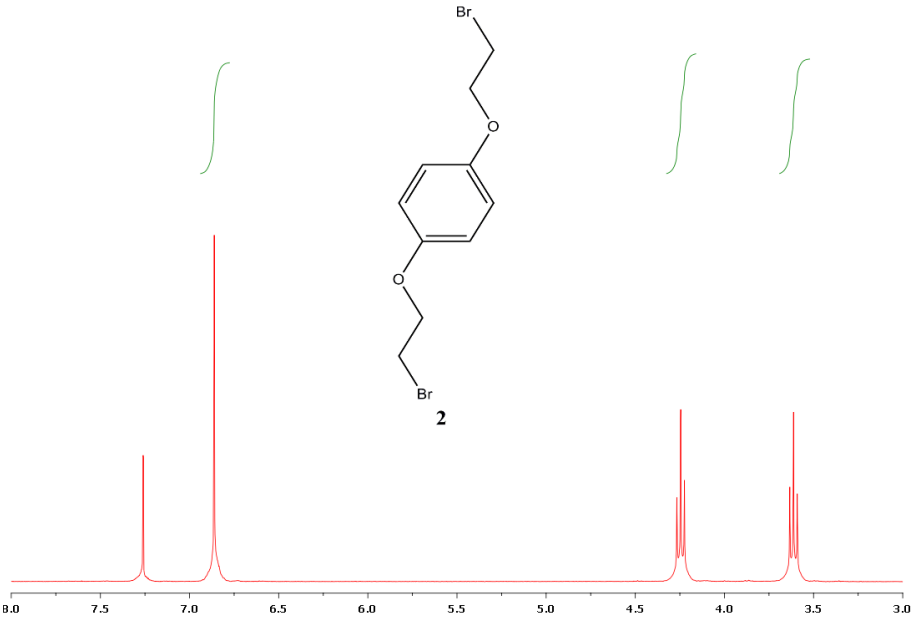


Figura A10. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz, 25ºC) obtenido para el compuesto 2.

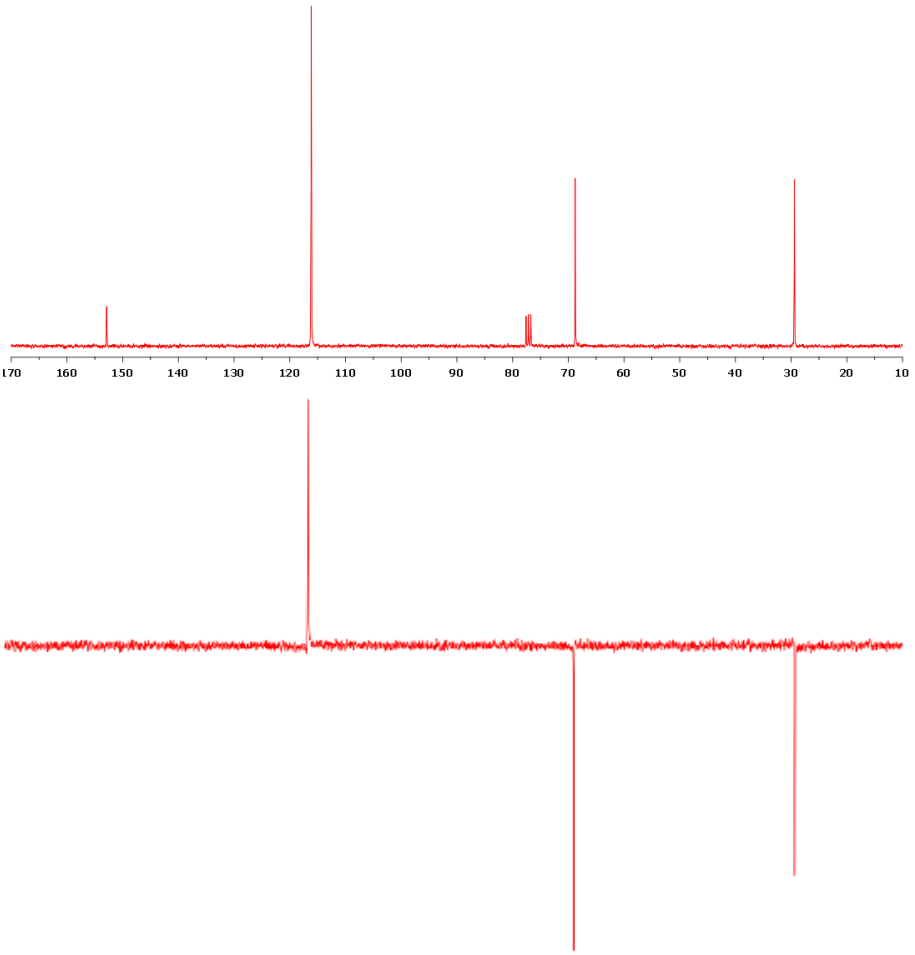
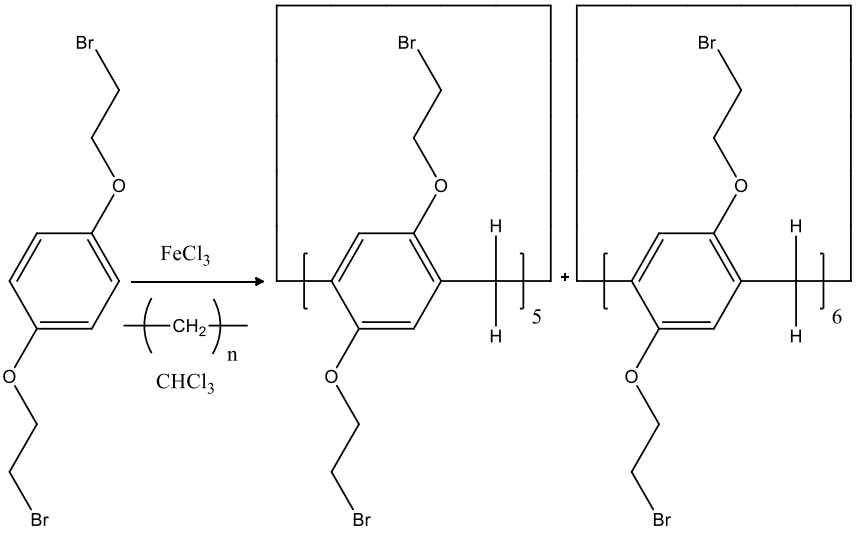


Figura A11. Espectro de ^{13}C-RMN (arriba) y DEPT (abajo) (CDCl3, 75 MHz, 25ºC) obtenido para el compuesto 2.



2 3 4

A una disolución de 2 (2 g, 6.17 mmol) en cloroformo (100 mL) se añade paraformaldehído (0.93 g, 30.87 mmol) para ser tratada con $FeCl_3$ (0.20 g, 1.24 mmol) La mezcla resultante se mantiene bajo agitación durante 72 horas y a temperatura constante de 45 ºC, al finalizar la reacción se realizan tres lavados: agua (100 mL), disolución saturada de bicarbonato sódico (100 mL) y salmuela (100 mL), a continuación, la fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a sequedad. El sólido resultante se purifica en un cromatógrafo CombiFlash Rf 200 (SiO_2; hexano/CH_2Cl_2) para obtener el compuesto 3 con un 15% de rendimiento y, el compuesto 4 con un 30% de rendimiento.

^{1}H RMN de 4 ($CDCl_3$, 300 MHz): 6.78 (s, 12H); 4.16 (t, *J* = 5.9, 24H); 3.87 (s, 12H); 3.54 (t, *J* = 5.29, 24H)

MALDI-TOF-MS de 4: *m/z* [M-H] 2015.5 (calculado 2015.5)

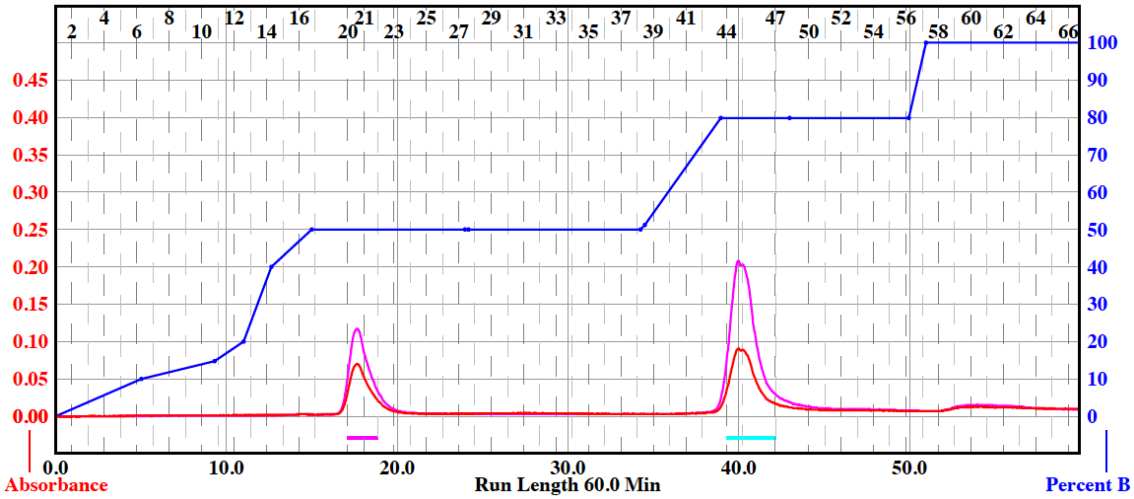


Figura A12. Cromatografía obtenida en la separación de compuestos 3 y 4.

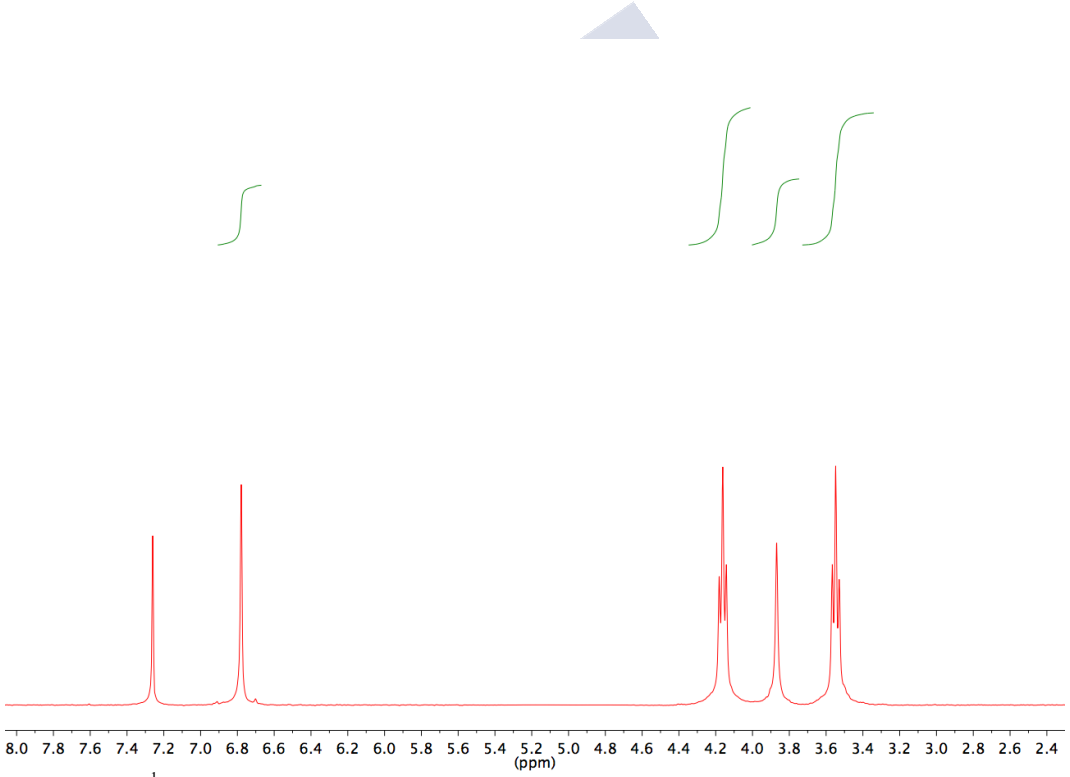


Figura A13. Espectro ^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz, 25ºC) para el compuesto 4.

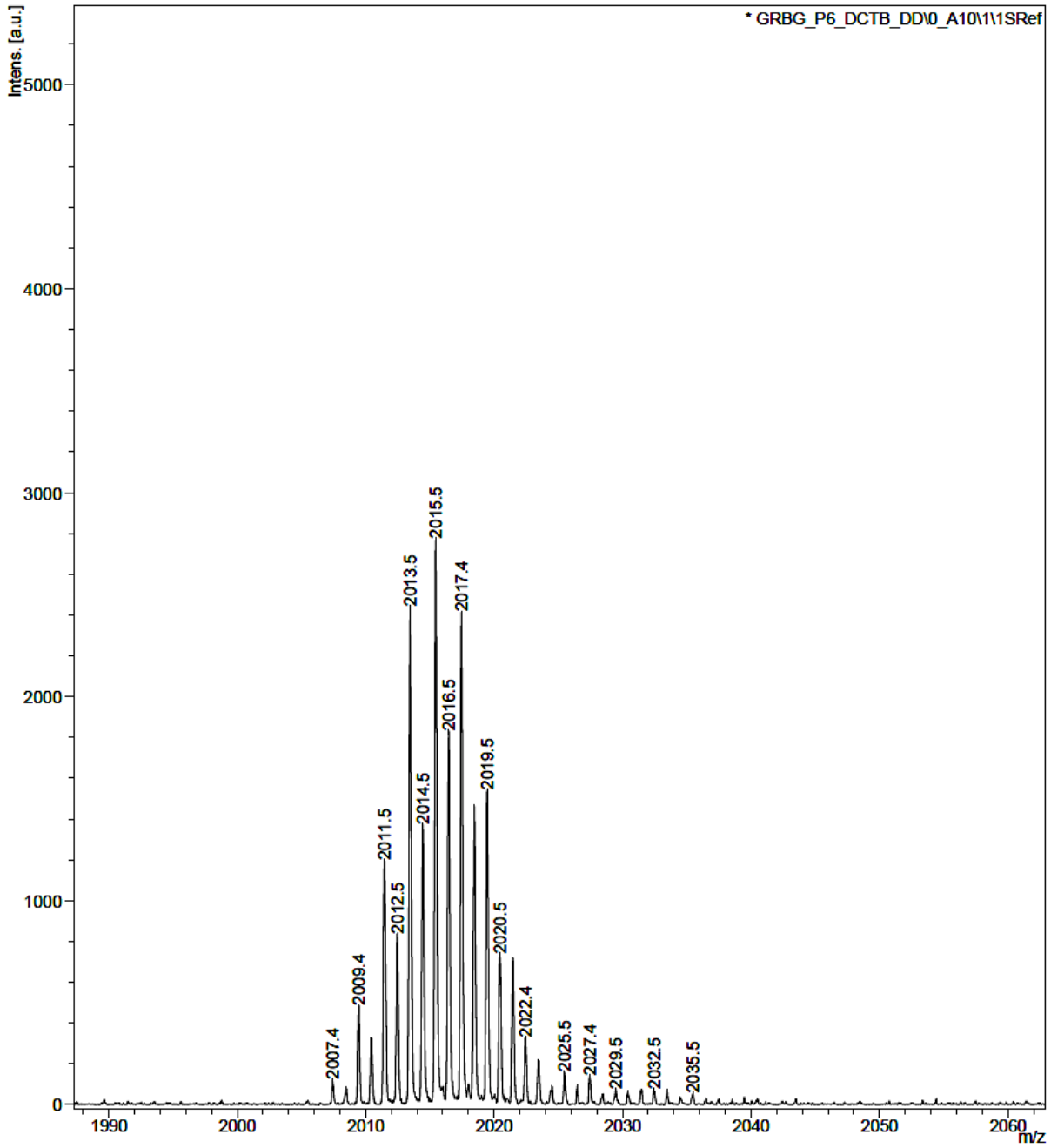


Figura A14. Espectro MALDI-TOF obtenido para compuesto 4.

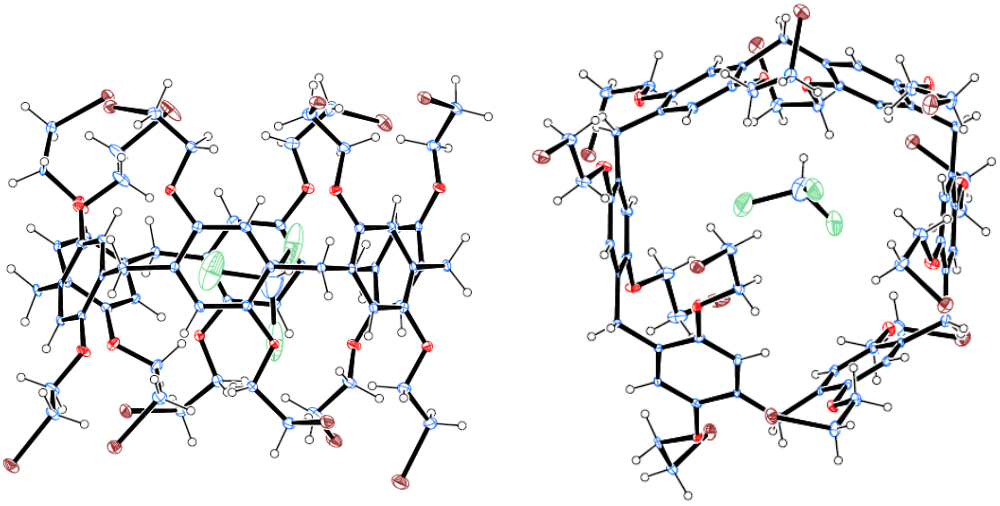
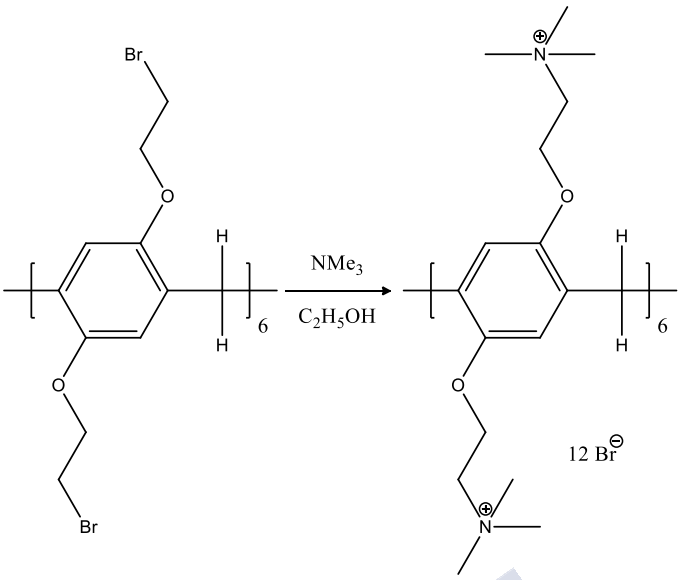


Figura A15. Estructura de compuesto 4 mediante Difracción de Rayos X.

Tabla A2. Datos cristalográficos del compuesto 3.

Fórmula empírica	$C_{66}H_{72}Br_{12}O_{12}$, $CHCl_3$
Peso / $gmol^{-1}$	2135.52
Temperatura / K	100(2)
Longitud de onda / Å	0.71073
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo	*P-1*
Dimensiones de celda unidad	a = 11.9049(3) Å, □ = 89.6990(10)º b = 13.6014(3) Å, □ = 79.4790(10)º c = 23.9218(6) Å, □ = 85.1240(10)º
Volumen / $Å^3$	3794.39(16)
Z	2
Densidad (calculada) / mg m^{-3}	1.869
Coeficiente de absorción/ mm^{-1}	6.496
F (000)	2084
Tamaño de cristal / mm^3	0.270 x 0.190 x 0.100
Rango de ángulo de rastreo	0.866 a 26.431 º
Reflexiones recogidas	119368
Completo a Θ = 25.242º/ %	99.7
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de raíz completa en F^2
Datos / contenido / parámetros	15521 / 387 / 940
F^2	1.044
Índice R final	R1 = 0.0457, wR2 = 0.1125
Índice R	R1 = 0.0756, wR2 = 0.129



4 5

Se prepara una disolución de 4 (1.5 g, 0.80 mmol) en etanol (70 mL) para tratar la mezcla con NMe_3 (30-35% en etanol, 10.2 mL, 37.9 mmol) La mezcla resultante se deja a reflujo durante 16 horas para a continuación, filtrar el sólido resultante obteniendo el compuesto 5 con un 90 % de rendimiento.

^{1}H RMN (D_2O, 300 MHz): 6.24 (s, 12H); 4.54 (s, 24H); 3.99 (s, 24H); 3.15 (s, 108H)

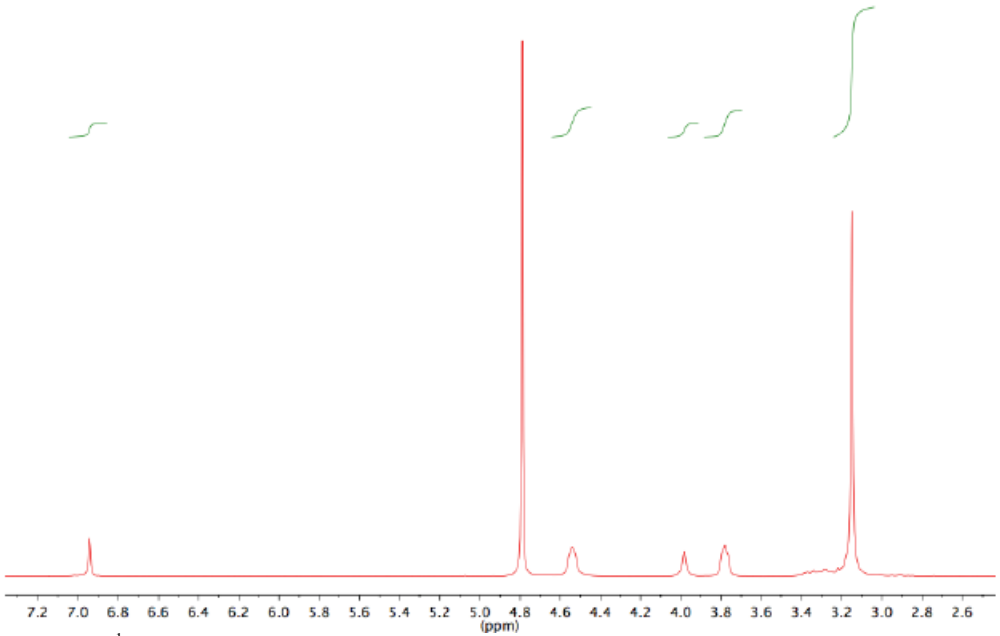


Figura A16. Espectro ^{1}H RMN (D_2O, 300MHZ, 25ºC) obtenido para compuesto 5.

3.5.3 Desarrollo de la ecuación definida para el modelo de complejación 1:1.

$$ANS + P5TMA \overset{K}{\rightleftharpoons} 1{:}1$$

$$K = \frac{[1{:}1]}{[ANS][P5TMA]}$$

Denominando a 1:1 como x:

$$K = \frac{x}{([ANS]_0 - x)([P5TMA]_0 - x)}$$

Mediante una reorganización de los términos se obtiene la siguiente expresión:

$$Kx^2 - K([ANS]_0 + [P5TMA]_0)x + K[ANS]_0[P5TMA]_0 = x$$

$$Kx^2 - [K([ANS]_0 + [P5TMA]_0) + 1]x + K[ANS]_0[P5TMA]_0 = 0$$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.5.4 Asignación de señales en ^{1}H-RMN para [P5TMA] = 0.3 mM y [ANS] = 0.5 mM.

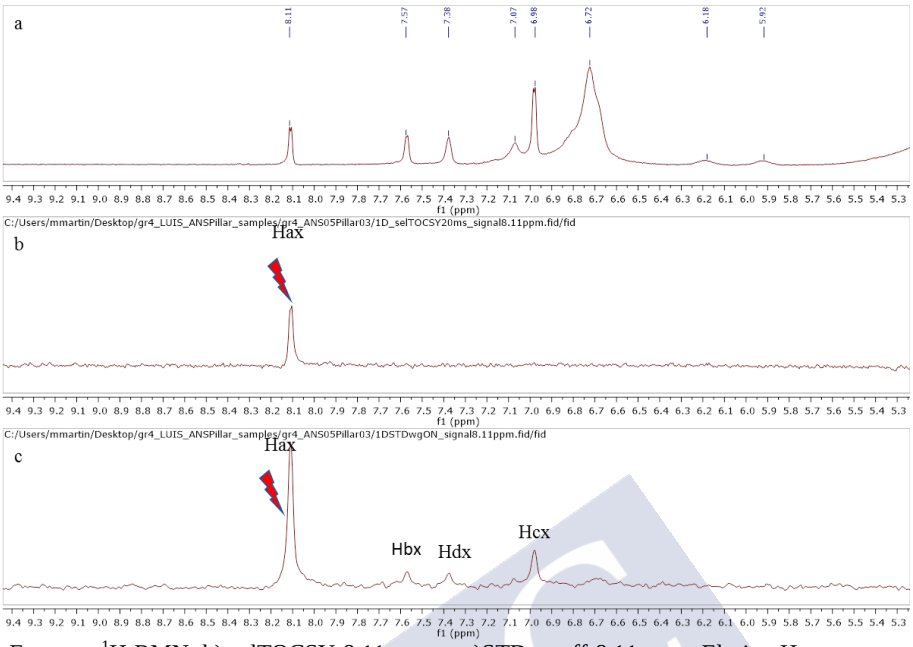


Figura A17. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 8.11 ppm y c)STDon-off 8.11 ppm. El pico Hax no presenta picos (Hbx, Hdx y Hcx pertenecen a otro naftaleno, x representa una molécula de ANS en proceso de intercambio)

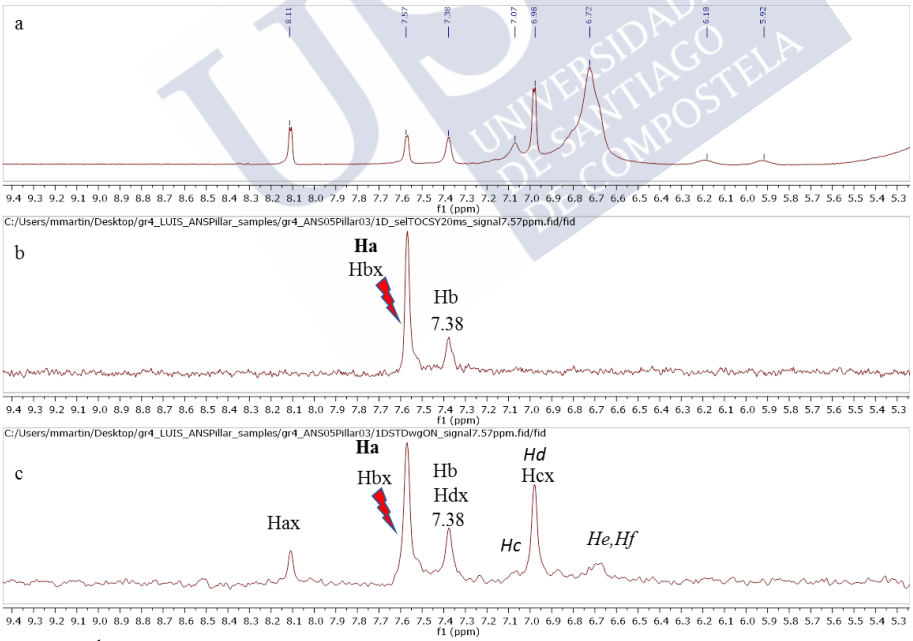


Figura A18. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 7.56 ppm y c)STDon-off 7.56 ppm. La señal a 7.56 ppm se asigna a Ha y la señal a 7.38 a Hb. Asignación inicial de Hc, Hd y He.

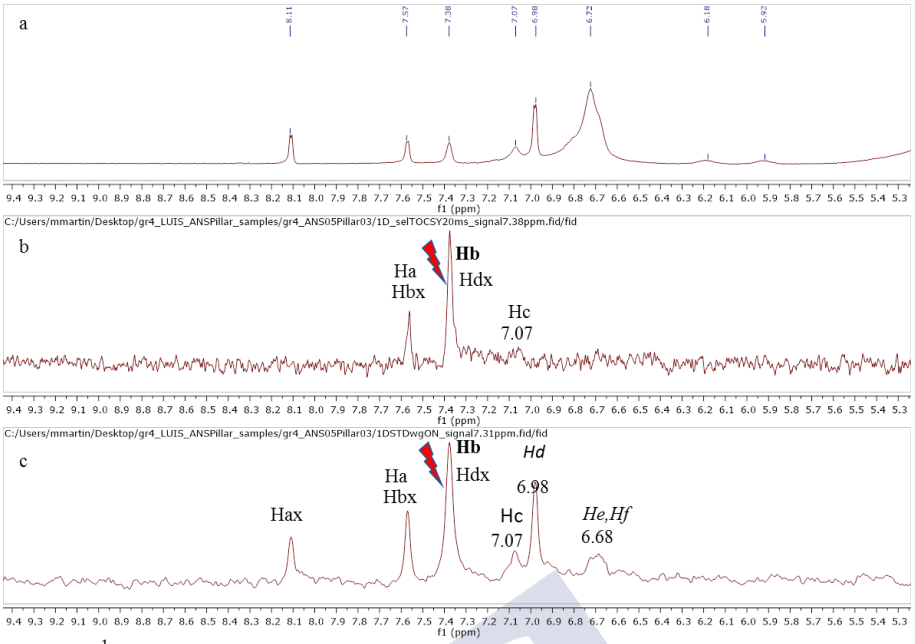


Figura A19. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 7.38 ppm y c)STDon-off 7.38 ppm. Confirmación de la asignación de Ha, asignación de Hc y asignación de Hd a 6.98 ppm.

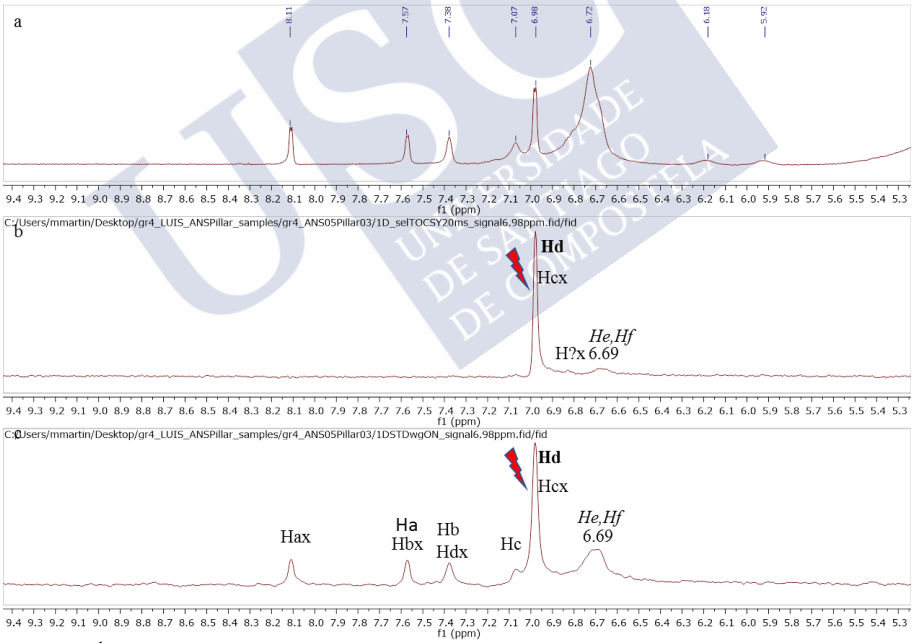


Figura A20. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 6.98 ppm y c)STDon-off 6.98 ppm. Asignación de He, Hf a 6.69 ppm.

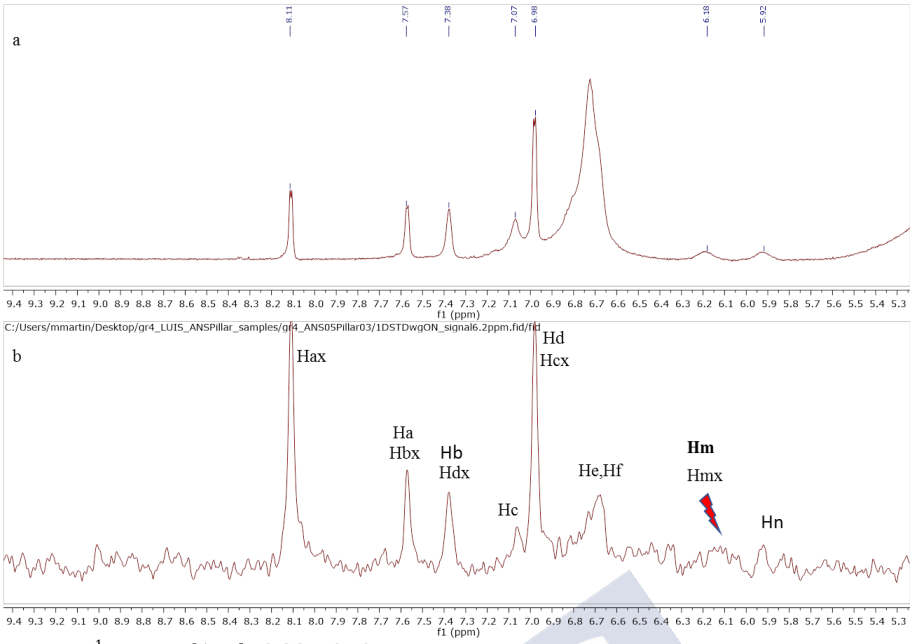


Figura A21. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 6.18 ppm.

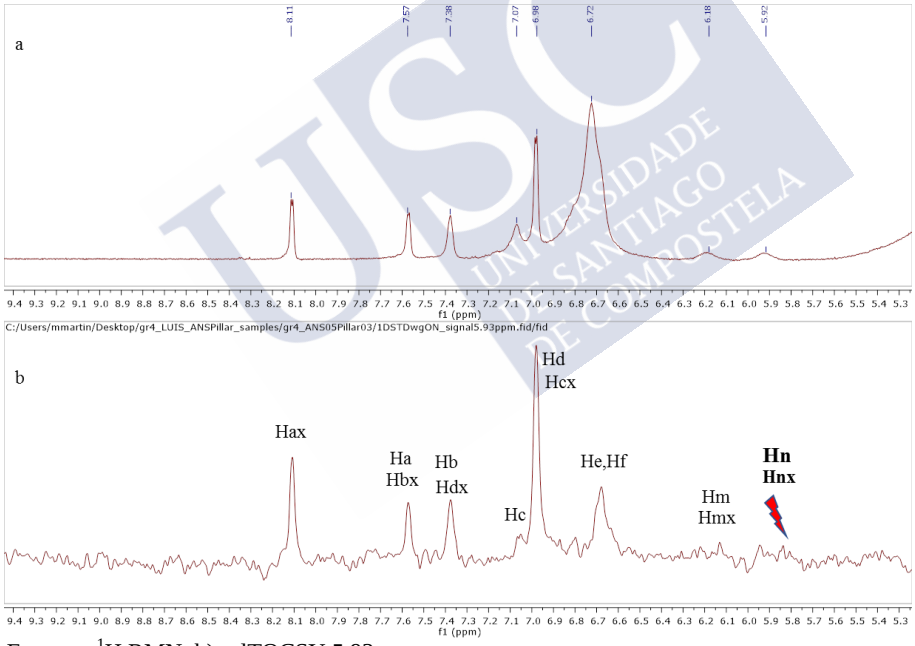


Figura A22. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 5.93 ppm.

3.5.5 Asignación de señales en ^{1}H-RMN para [P5TMA] = 0.6 mM y [ANS] = 0.5 mM.

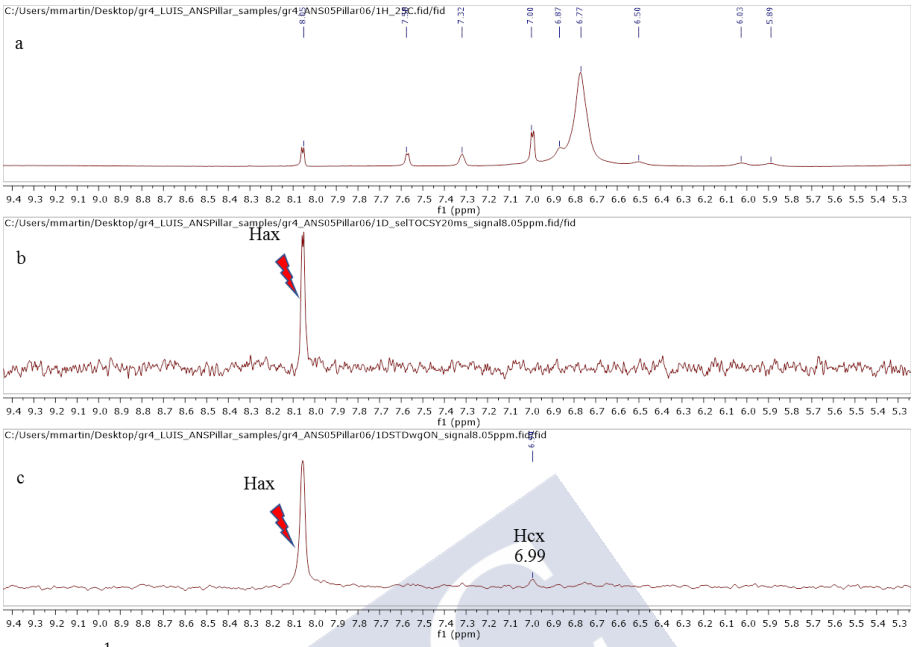


Figura A23. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 8.05 ppm y c)STDon-off 8.05 ppm. El pico Hax no presenta picos (Hbx, Hdx y Hcx pertenecen a otro naftaleno, x representa una molécula de ANS en proceso de intercambio)

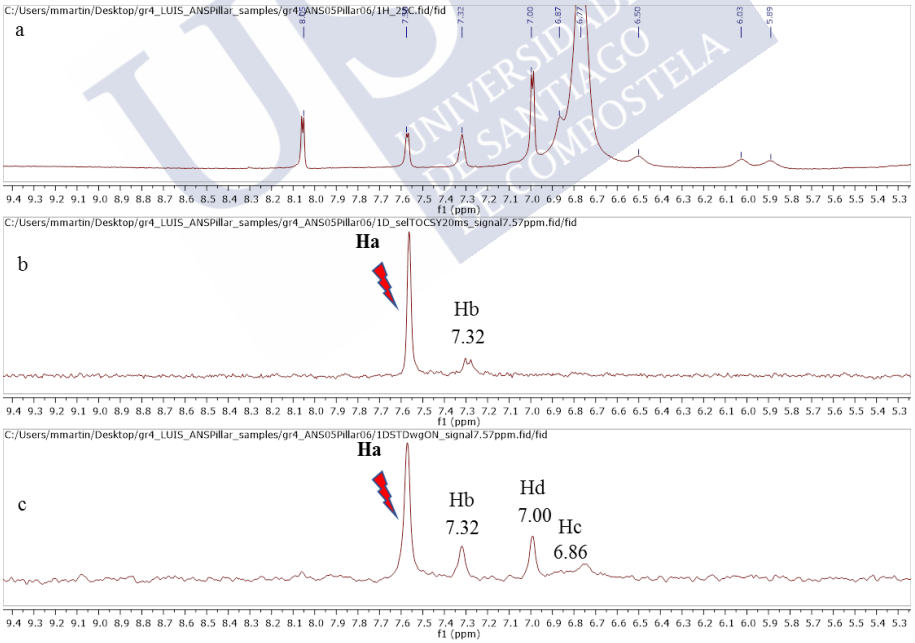


Figura A24. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 7.58 ppm y c)STDon-off 7.58 ppm. Asignación de Hb a 7.32 ppm.

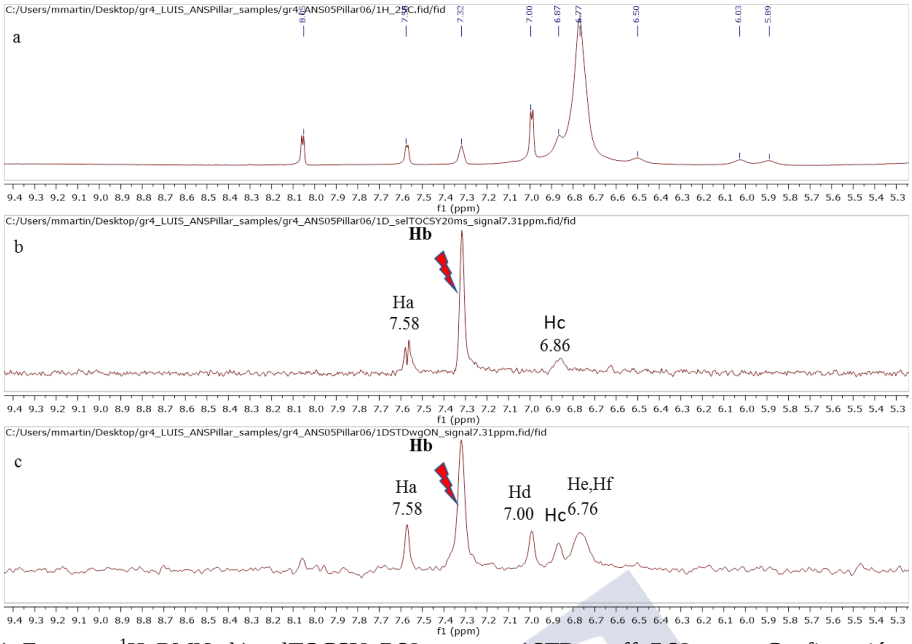


Figura A25. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 7.32 ppm y c)STDon-off 7.32 ppm. Confirmación asignación Ha. Asignación Hc, Hd, He y Hf.

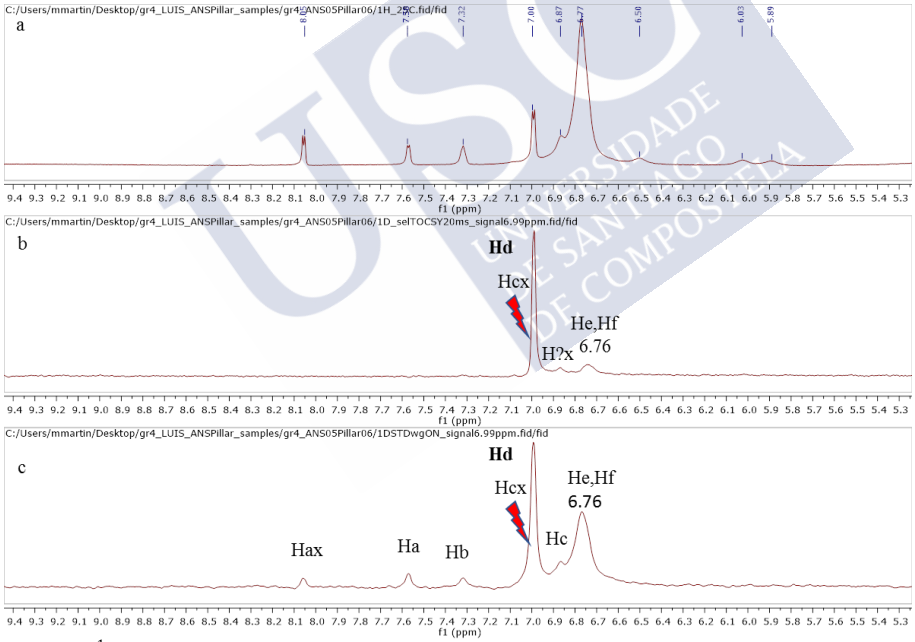


Figura A26. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 7.00 ppm y c)STDon-off 7.00 ppm. Asignación He y Hf a 6.76 ppm.

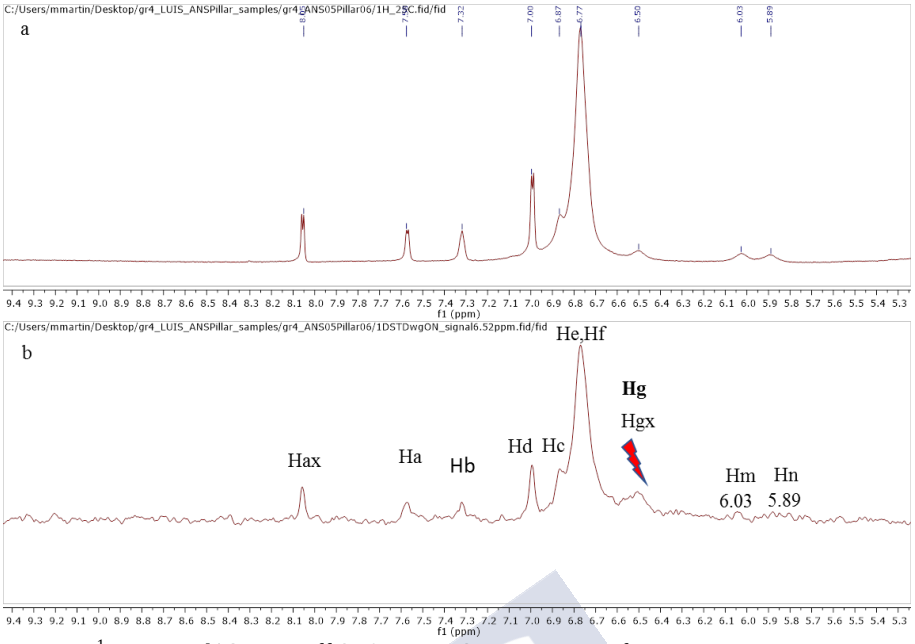


Figura A27. a) Espectro ^{1}H RMN y b)STDon-off 6.50ppm. NOE entre Hg y Hf.

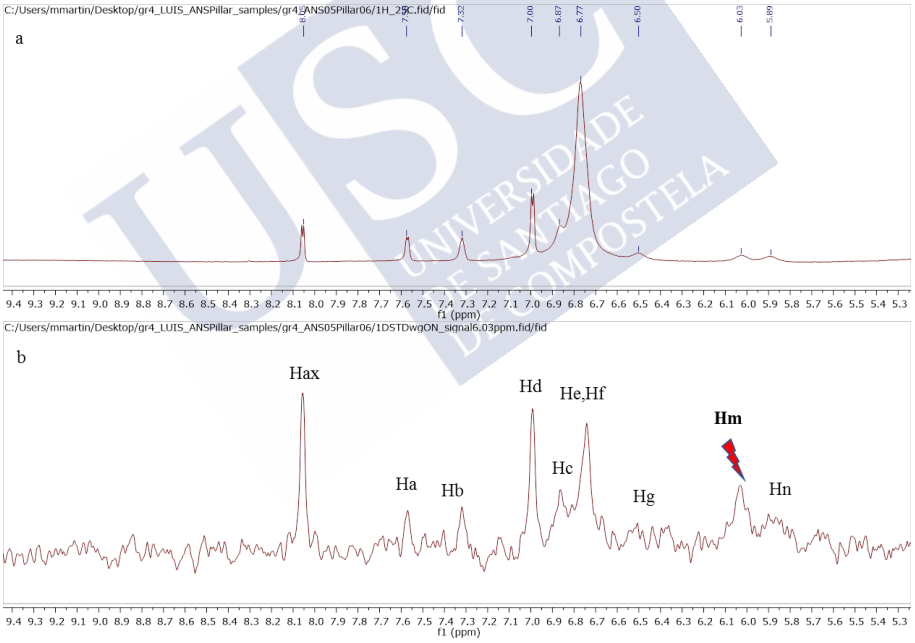


Figura A28. a) Espectro ^{1}H RMN y b)STDon-off 6.03 ppm. NOE entre Hg y Hf.

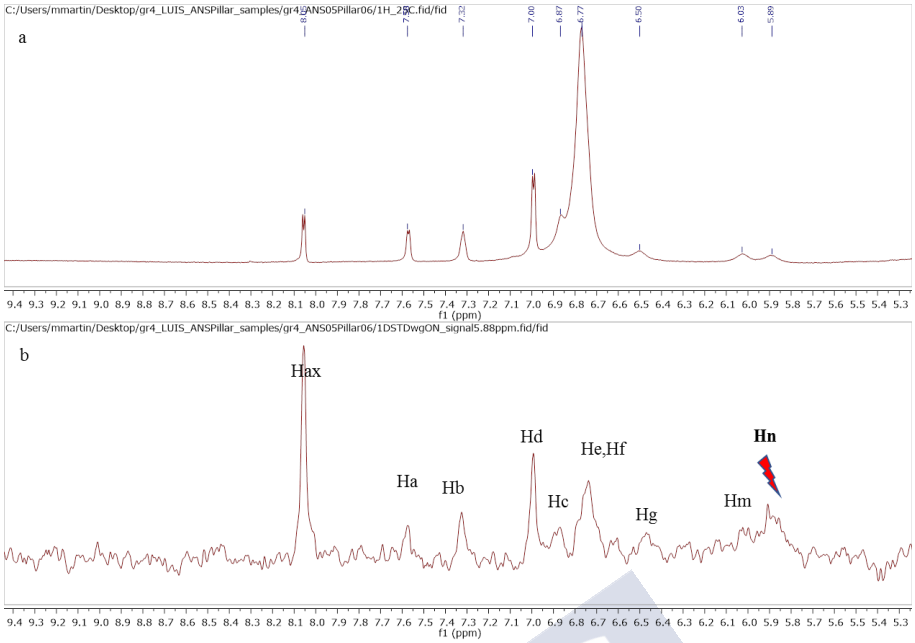


Figura A29. a) Espectro ^{1}H RMN y b)STDon-off 5.89 ppm. NOE entre Hg y Hf.

3.5.6 Asignación de señales en ^{1}H-RMN para [P5TMA] = 0.8 mM y [ANS] = 0.5 mM

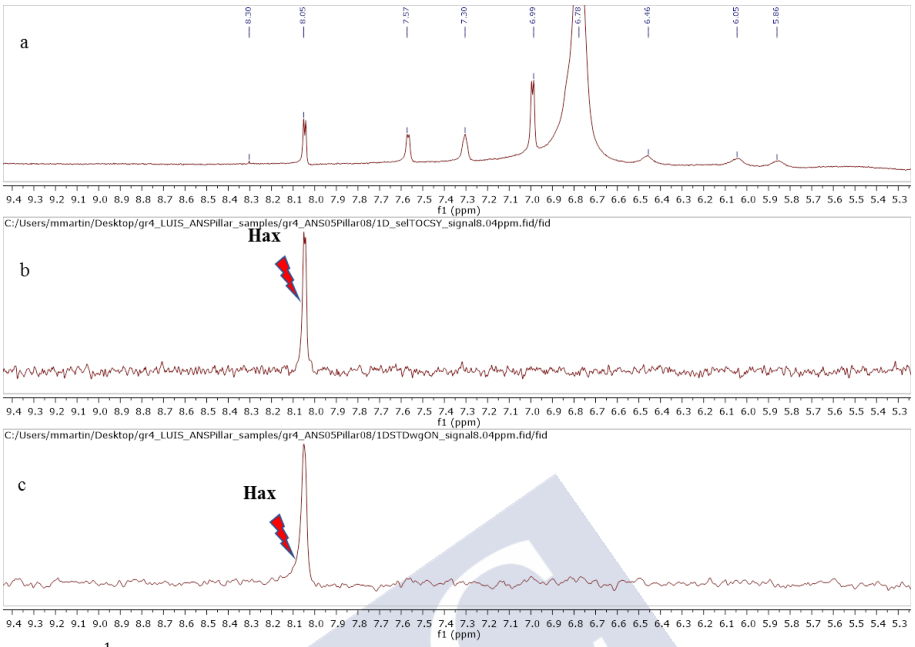


Figura A30. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 8.05 ppm y c)STDon-off 8.05 ppm. El pico Hax no presenta picos (Hbx, Hdx y Hcx pertenecen a otro naftaleno, x representa una molécula de ANS en proceso de intercambio)

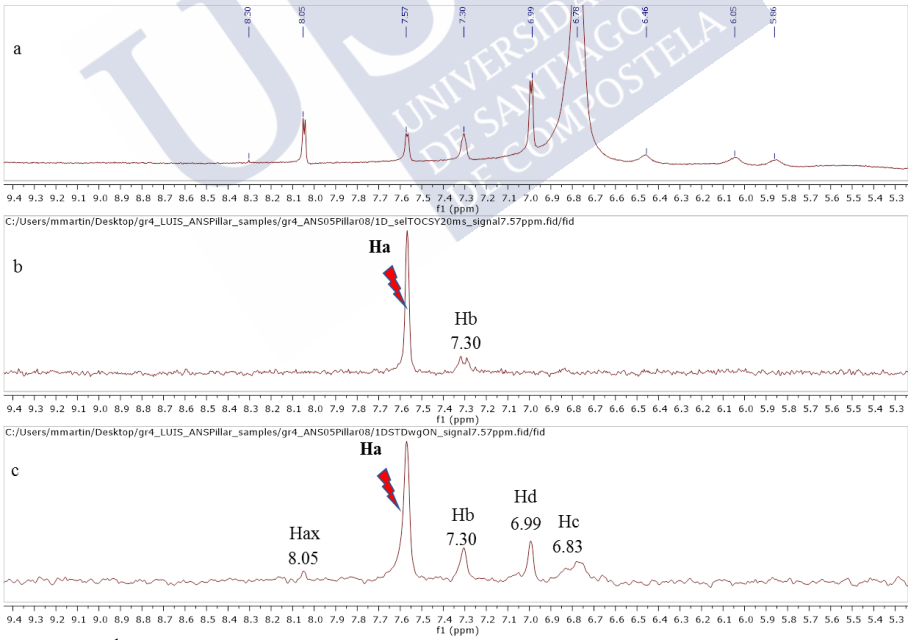


Figura A31. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 7.57 ppm y c)STDon-off 7.57 ppm. Asignación de Hb a 7.30 ppm. Asignación inicial de Hc y Hd.

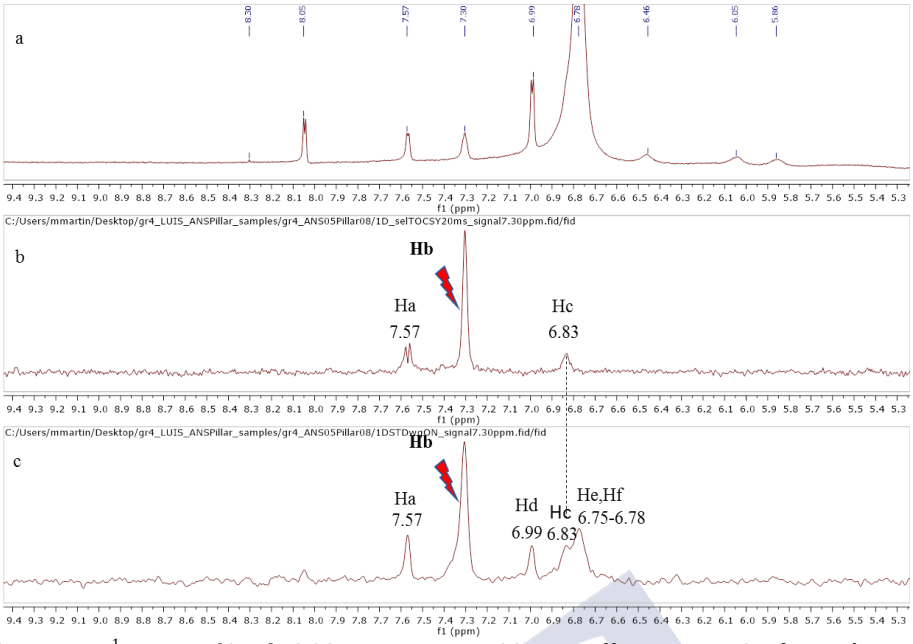


Figura A32. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 7.57 ppm y c)STDon-off 7.57 ppm. Confirmación asignación de Ha. Asignación de Hc, Hd, He y Hf.

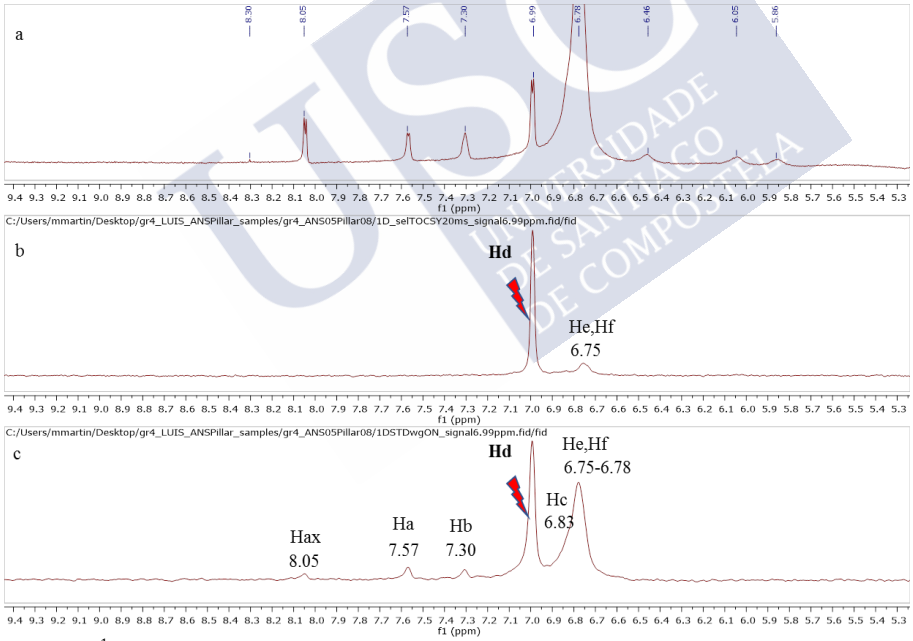


Figura A33. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 6.99 ppm y c)STDon-off 6.99 ppm. Asignación de He a 6.75 ppm y Hf a 6.78 ppm.

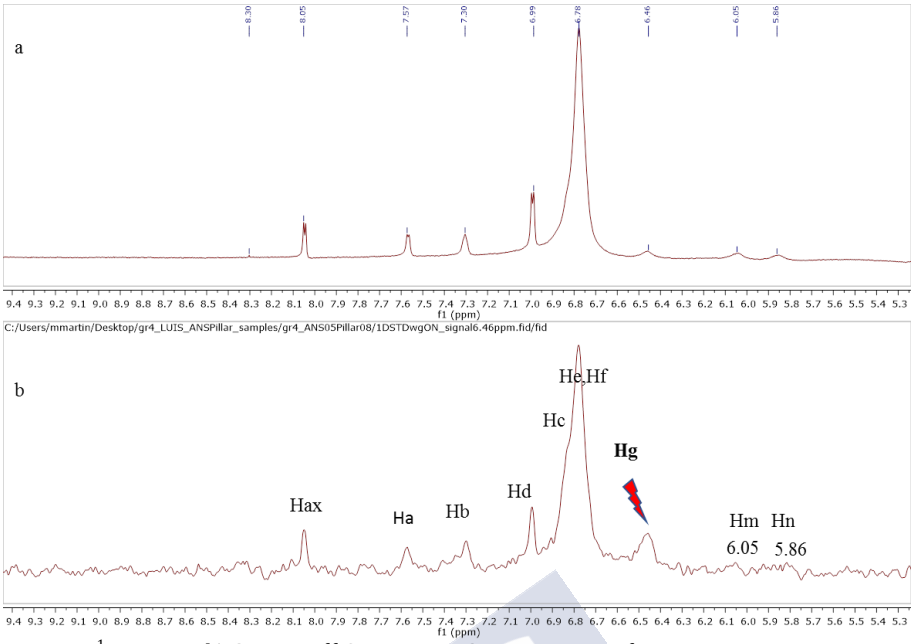


Figura A34. a) Espectro ^{1}H RMN y b) STDon-off 6.47 ppm. NOE entre Hg y Hf.

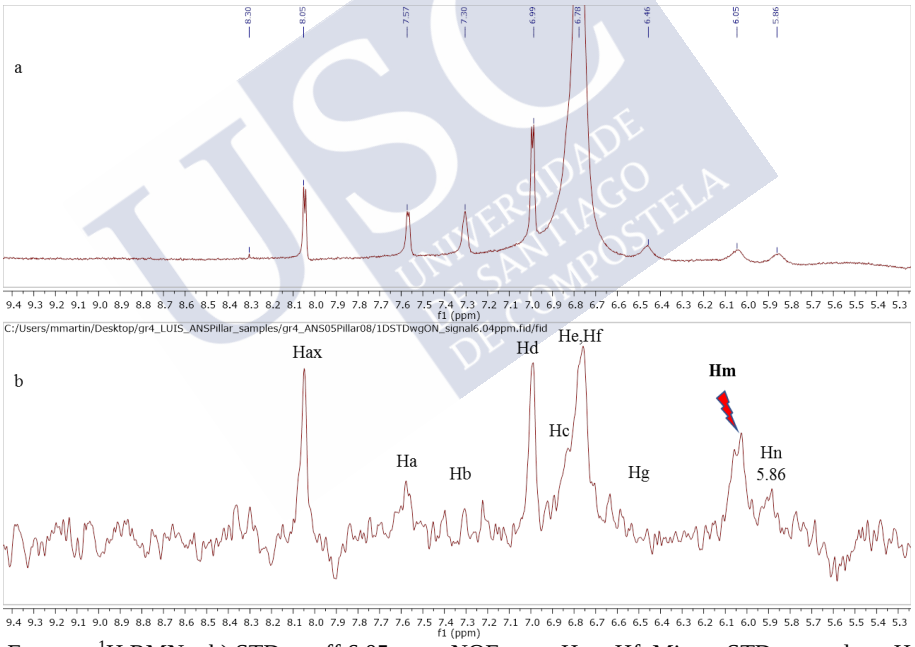


Figura A35. a) Espectro ^{1}H RMN y b) STDon-off 6.05 ppm. NOE entre Hg y Hf. Mismo STD entre el par Hm-Hd que entre Hm-He,f.

3.5.7 Asignación de señales en ^{1}H-RMN para [P5TMA] = 1.3 mM y [ANS] = 0.5 mM

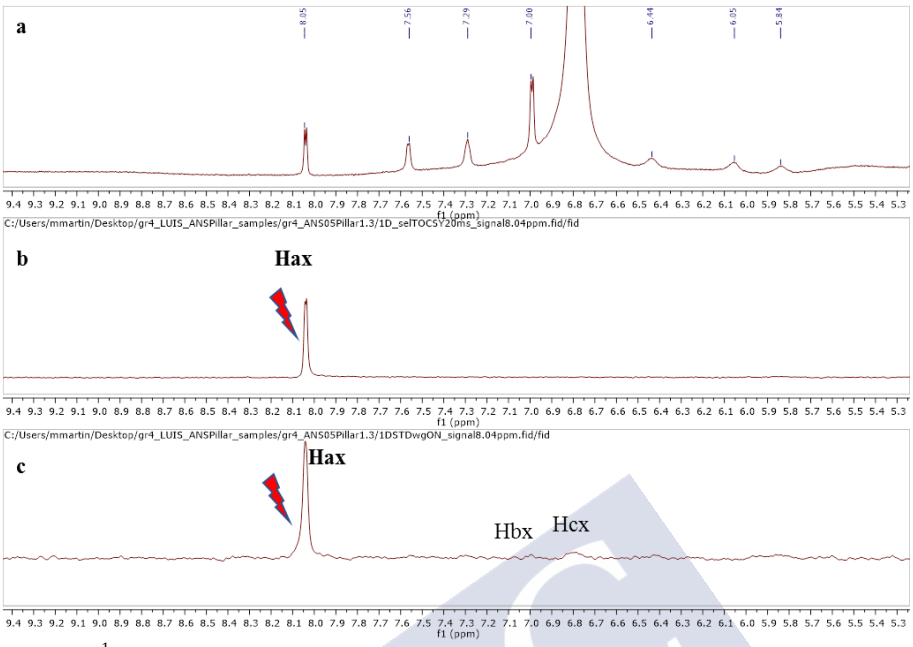


Figura A36. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 8.05 ppm y c)STDon-off 8.05 ppm. El pico Hax no presenta picos (Hbx, Hdx y Hcx pertenecen a otro naftaleno, x representa una molécula de ANS en proceso de intercambio)

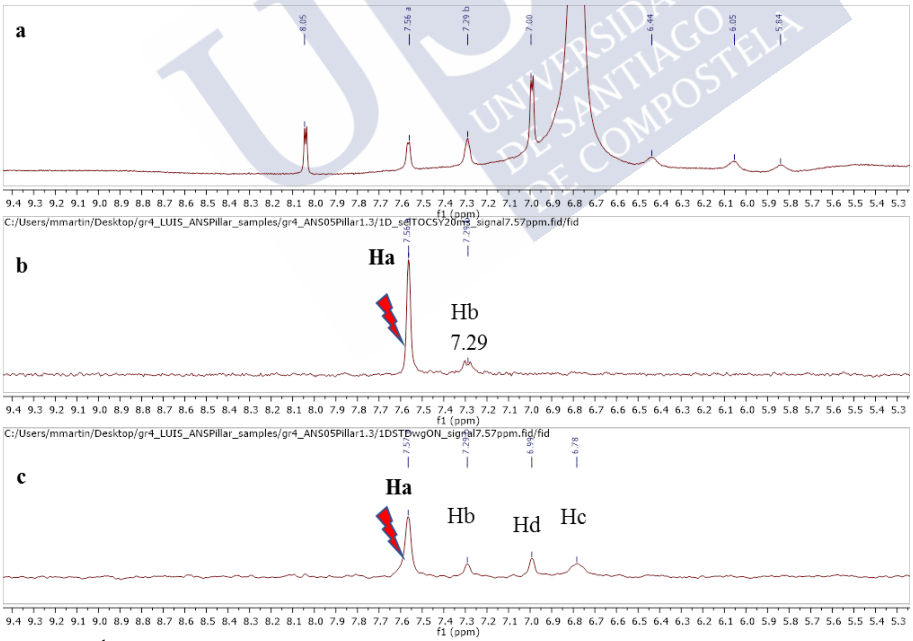


Figura A37. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 7.56 ppm y c)STDon-off 7.56 ppm. Asignación de Hb. Asignación inicial de Hd y Hc.

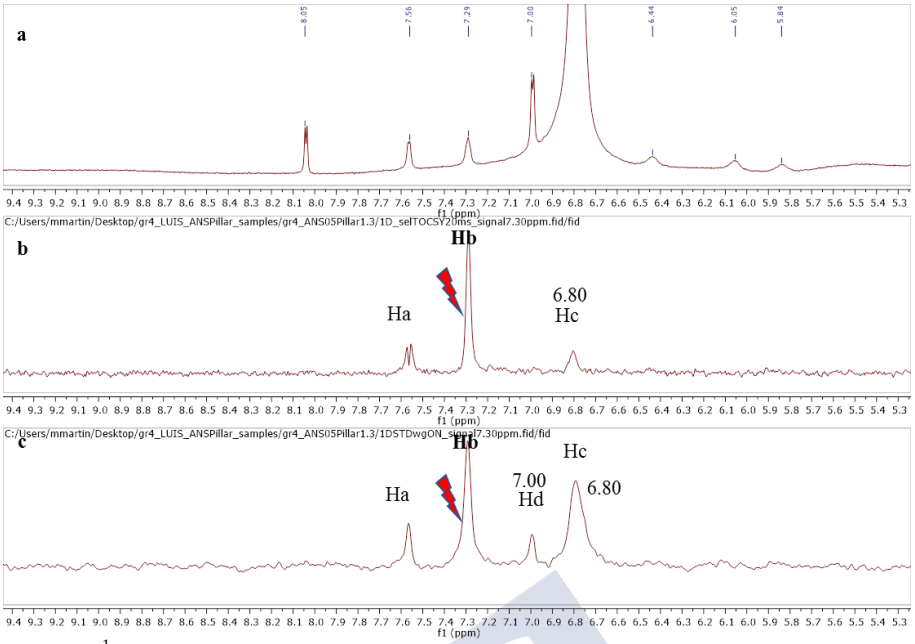


Figura A38. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 7.29 ppm y c)STDon-off 7.29 ppm. Asignación final de Hc a 6.80 ppm y Hd a 7.00. Confirmación de la asignación de Ha.

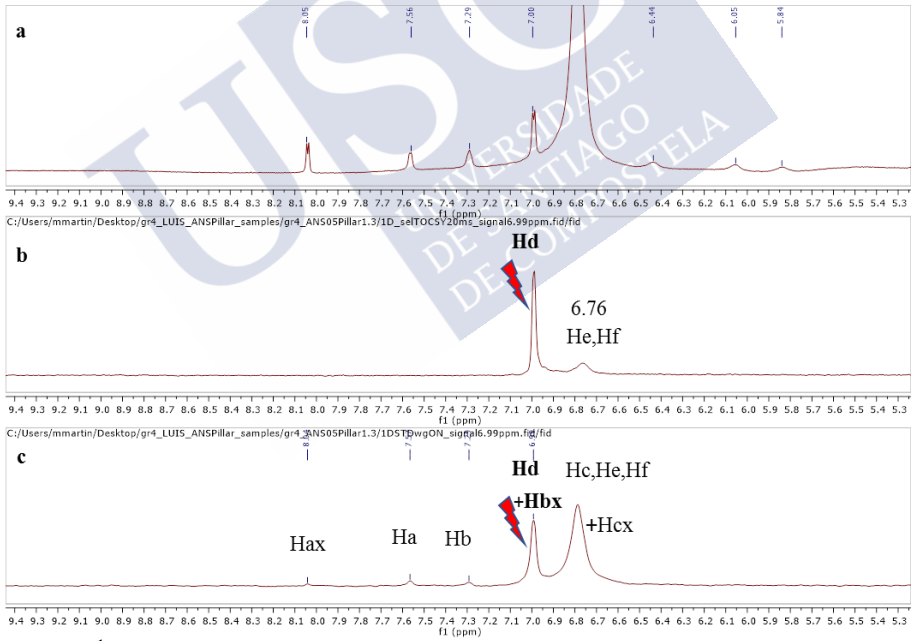


Figura A39. a) Espectro ^{1}H RMN, b) selTOCSY 7.00 ppm y c)STDon-off 7.00 ppm. Asignación He y Hf en 6.76 ppm.

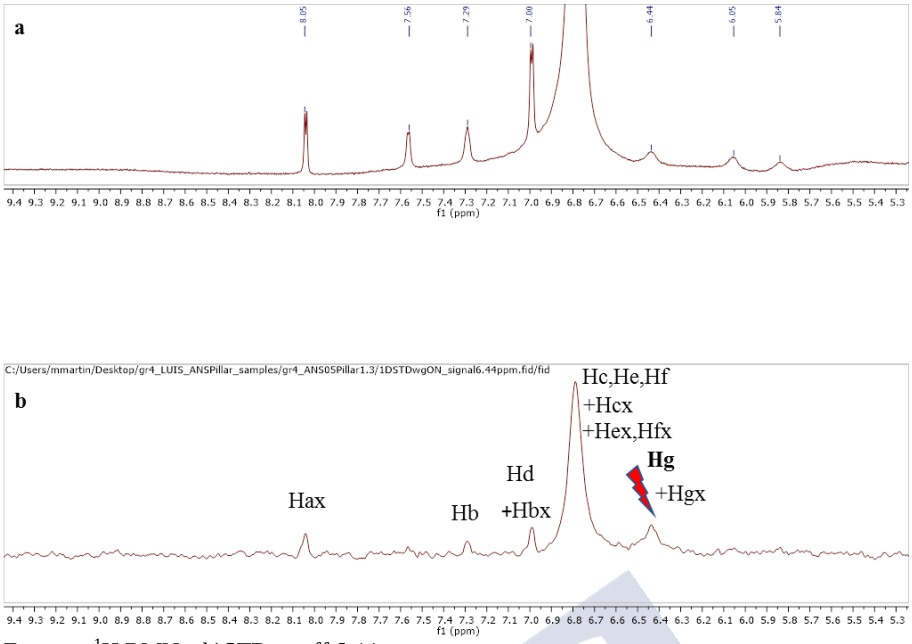


Figura A40. a) Espectro ^{1}H RMN y b)STDon-off 6.44 ppm.

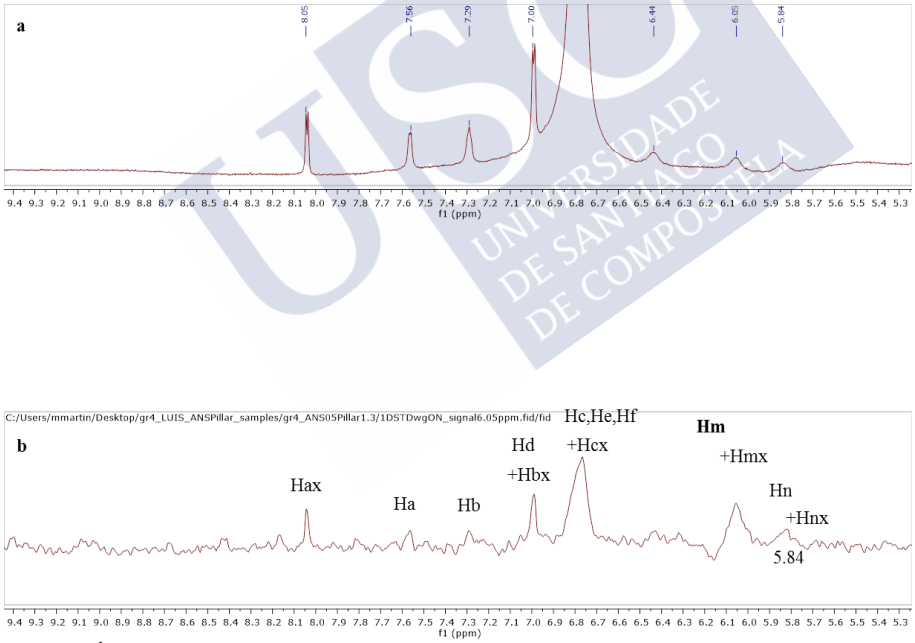


Figura A41. a) Espectro ^{1}H RMN y b)STDon-off 6.05 ppm.

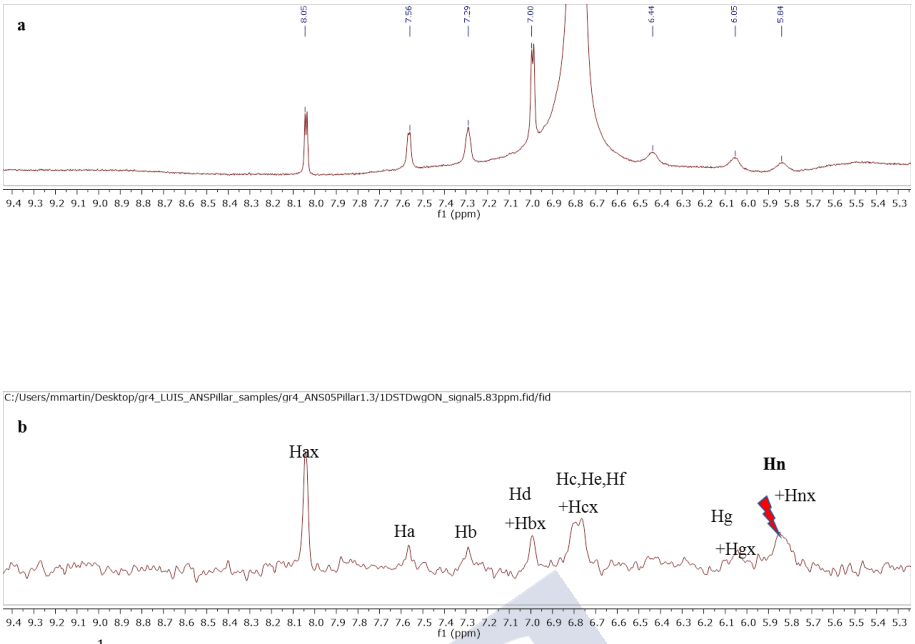


Figura A42. a) Espectro ^{1}H RMN y b)STDon-off 5.84 ppm.

3.5.8 Desplazamiento de ANS de cavidad de P5TMA por TSNa.

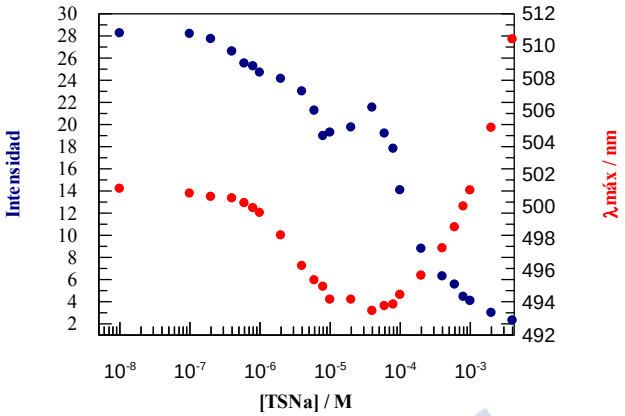


Figura A43. Variación de: (•) intensidad a 505 nm y (•) longitud de onda en función de la concentración de TSNa en una muestra de [ANS] = 2.00 x 10^{-6} M y [P5TMA] = 2.00 x 10^{-6} M.

3.6 BIBLIOGRAFÍA.

(1) Davis, F.; Higson, S. M*acromolecules: Construction, Chemistry and Nanotechnology Applications*; John Wiley & Sons, Ltd: Weinhein 2011.

(2) Ogoshi, T.; Ueshima, N.; Sakakibara, F.; Yamagishi, T. A.; Haino, T. Conversion from Pillar[5]Arene to Pillar[6-15]Arenes by Ring Expansion and Encapsulation of C60 by Pillar[n]Arenes with Nanosize Cavities. *Org. Lett.* **2014**, *16* (11), 2896–2899. DOI: 10.1021/ol501039u.

(3) Xue, M.; Yang, Y.; Chi, X.; Zhang, Z.; Huang, F. Pillararenes, a New Class of Macrocycles for Supramolecular Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (8), 1294–1308. DOI: 10.1021/ar2003418.

(4) Kou, Y.; Cao, D.; Tao, H.; Wang, L.; Liang, J.; Chen, Z.; Meier, H. Synthesis and Inclusion Properties of Pillar[n]Arenes. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2013**, *77* (1–4), 279–289. DOI: 10.1007/s10847-012-0242-5.

(5) Shu, X.; Chen, S.; Li, J.; Chen, Z.; Weng, L.; Jia, X.; Li, C. Highly Effective Binding of Neutral Dinitriles by Simple Pillar[5]Arenes. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (24), 2967–2969. DOI: 10.1039/c2cc00153e.

(6) Deng, H.; Shu, X.; Hu, X.; Li, J.; Jia, X.; Li, C. Synthesis of a Fully Functionalized Pillar[5]Arene by "click Chemistry" and Its Effective Binding toward Neutral Alkanediamines. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (34), 4609–4612. DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.06.099.

(7) Yu, G.; Yu, W.; Mao, Z.; Gao, C.; Huang, F. A Pillararene-Based Ternary Drug-Delivery System with Photocontrolled Anticancer Drug Release. *Small* **2015**, *11* (8), 919–925. DOI: 10.1002/smll.201402236.

(8) Zhang, H.; Ma, X.; Nguyen, K. T.; Zhao, Y. Biocompatible Pillararene-Assembly-Based Carriers for Dual Bioimaging. *ACS Nano* **2013**, *7* (9), 7853–7863. DOI: 10.1021/nn402777x.

(9) Li, C.; Shu, X.; Li, J.; Chen, S.; Han, K.; Xu, M.; Hu, B.; Yu, Y.; Jia, X. (ESI)Complexation of 1, 4-Bis (Pyridinium) Butanes by Negatively Charged Carboxylatopillar [5] Arene Electronic Supplementary Information (ESI). *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8458–8465. DOI: 10.1021/jo201185e.

(10) Asfari, Z.; Böhmer, V.; Harrowfield, J.; Vicens, J. *Calixarenes 2001*; Kluwer Academic Publishers:Dordrech 2001.

(11) Kim, K.; Selvapalam, N.; Ho Ko, Y.; Min Park, K.; Kim, D.; Kim, J. Functionalized Cucurbiturils and Their Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (2), 267–279. DOI: 10.1039/b603088m.

(12) Kim, K.; Selvapalam, N.; Oh, D. H. Cucurbiturils?A New Family of Host Molecules. *J. Incl. Phenom.* **2004**, *50* (1–2), 31–36. DOI: 10.1007/s10847-003-8835-7.

(13) Ogoshi, T.; Hashizume, M.; Yamagishi, T. A.; Nakamoto, Y. Synthesis, Conformational and Host-Guest Properties of Water-Soluble Pillar[5]Arene. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (21), 3708–3710. DOI: 10.1039/c0cc00348d.

(14) Hu, X. B.; Chen, L.; Si, W.; Yu, Y.; Hou, J. L. Pillar[5]Arene Decaamine: Synthesis, Encapsulation of Very Long Linear Diacids and Formation of Ion Pair-Stopped [2]Rotaxanes. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (16), 4694–4696. DOI: 10.1039/c1cc10633c.

(15) Zhang, Z.; Luo, Y.; Chen, J.; Dong, S.; Yu, Y.; Ma, Z.; Huang, F. Formation of Linear Supramolecular Polymers That Is Driven by C-Ha ⋯ π Interactions in Solution and in the Solid State. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (6), 1397–1401. DOI: 10.1002/anie.201006693.

(16) Li, C. Pillararene-Based Supramolecular Polymers: From Molecular Recognition to Polymeric Aggregates. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (83), 12420–12433. DOI: 10.1039/c4cc03170a.

(17) Wang, S.; Wang, Y.; Chen, Z.; Lin, Y.; Weng, L.; Han, K.; Li, J.; Jia, X.; Li, C. The Marriage of Endo-Cavity and Exo-Wall Complexation Provides a Facile Strategy for Supramolecular Polymerization. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (16), 3434–3437. DOI: 10.1039/c4cc08820d.

(18) Wang, Y.; Ping, G.; Li, C. Efficient Complexation between Pillar[5]Arenes and Neutral Guests: From Host-Guest Chemistry to Functional Materials. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (64), 9858–9872. DOI: 10.1039/c6cc03999e.

(19) Ma, Y.; Xue, M.; Zhang, Z.; Chi, X.; Huang, F. Neutral Guest Capture by a Cationic Water-Soluble Pillar[5]Arene in Water. *Tetrahedron* **2013**, *69* (23), 4532–4535. DOI: 10.1016/j.tet.2013.04.040.

(20) Gõmez, B.; Francisco, V.; Fernández-Nieto, F.; Garcia-Rio, L.; Martín-Pastor, M.; Paleo, M. R.; Sardina, F. J. Host-Guest Chemistry of a Water-Soluble Pillar[5]Arene: Evidence for an Ionic-Exchange Recognition Process and Different Complexation Modes. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20* (38), 12123–12132. DOI: 10.1002/chem.201403194.

(21) Li, C.; Ma, J.; Zhao, L.; Zhang, Y.; Yu, Y.; Shu, X.; Li, J.; Jia, X. Molecular Selective Binding of Basic Amino Acids by a Water-Soluble Pillar[5]Arene. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (19), 1924–1926. DOI: 10.1039/c3cc38622h.

(22) Yu, G.; Zhou, X.; Zhang, Z.; Han, C.; Mao, Z.; Gao, C.; Huang, F. Pillar[6]Arene/Paraquat Molecular Recognition in Water: High Binding Strength, PH-Responsiveness, and Application in Controllable Self-Assembly, Controlled Release, and Treatment of Paraquat Poisoning. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (47), 19489–19497. DOI: 10.1021/ja3099905.

(23) Ma, Y.; Ji, X.; Xiang, F.; Chi, X.; Han, C.; He, J.; Abliz, Z.; Chen, W.; Huang, F. A Cationic Water-Soluble Pillar[5]Arene: Synthesis and Host-Guest Complexation with Sodium 1-Octanesulfonate. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (45), 12340–12342. DOI: 10.1039/c1cc15660h.

(24) Ma, Y.; Yang, J.; Li, J.; Chi, X.; Xue, M. A Cationic Water-Soluble Pillar[6]Arene: Synthesis, Host-Guest Properties, and Self-Assembly with Amphiphilic Guests in Water. *RSC Adv.* **2013**, *3* (46), 23953–23956. DOI: 10.1039/c3ra44727h.

(25) Yakimova, L. S.; Shurpik, D. N.; Gilmanova, L. H.; Makhmutova, A. R.; Rakhimbekova, A.; Stoikov, I. I. Highly Selective Binding of Methyl Orange Dye by

Cationic Water-Soluble Pillar[5]Arenes. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (18), 4233–4238. DOI: 10.1039/c6ob00539j.

(26) Silveira, E. V.; Nascimento, V.; Wanderlind, E. H.; Affeldt, R. F.; Micke, G. a.; Garcia-Rio, L.; Nome, F. Inhibitory and Cooperative Effects Regulated by PH in Host-Guest Complexation between Cationic Pillar[5]Arene and Reactive 2-Carboxyphthalanilic Acid. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (15), 9684–9692. DOI: 10.1021/acs.joc.9b01377.

(27) Ogoshi, T.; Hamada, Y.; Sueto, R.; Sakata, Y.; Akine, S.; Moeljadi, A. M. P.; Hirao, H.; Kakuta, T.; Yamagishi, T. A.; Mizuno, M. Host–Guest Complexation Using Pillar[5]Arene Crystals: Crystal-Structure Dependent Uptake, Release, and Molecular Dynamics of an Alkane Guest. *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25* (10), 2497–2502. DOI: 10.1002/chem.201805733.

(28) Anzenbacher, P.; Gale, P. A. Supramolecular Chemistry of Anionic Species Themed Issue Chemical Society Reviews Anion Receptor Chemistry: Highlights from 2008 and 2009w. *Chem. Soc. Rev* **2010**, *39* (39), 3581–4008. DOI: 10.1039/c001871f.

(29) Duke, R. M.; Veale, E. B.; Pfeffer, F. M.; Kruger, P. E.; Gunnlaugsson, T. Colorimetric and Fluorescent Anion Sensors: An Overview of Recent Developments in the Use of 1,8-Naphthalimide-Based Chemosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (10), 3936–3953. DOI: 10.1039/b910560n.

(30) Soodan, R. K.; Pakade, Y. B.; Nagpal, A.; Katnoria, J. K. Analytical Techniques for Estimation of Heavy Metals in Soil Ecosystem: A Tabulated Review. *Talanta* **2014**, *125*, 405–410. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.02.033.

(31) Joseph, R.; Asok, A.; Joseph, K. Quinoline Appended Pillar[5]Arene (QPA) as Fe3+ Sensor and Complex of Fe3+ (FeQPA) as a Selective Sensor for F−, Arginine and Lysine in the Aqueous Medium. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *224*, 117390. DOI: 10.1016/j.saa.2019.117390.

(32) Fang, Y.; Wu, L.; Liao, J.; Chen, L.; Yang, Y.; Liu, N.; He, L.; Zou, S.; Feng, W.; Yuan, L. Pillar[5]Arene-Based Phosphine Oxides: Novel Ionophores for Solvent Extraction Separation of f-Block Elements from Acidic Media. *RSC Adv.* **2013**, *3* (30), 12376–12383. DOI: 10.1039/c3ra41251b.

(33) Pronk, S.; Páll, S.; Schulz, R.; Larsson, P.; Bjelkmar, P.; Apostolov, R.; Shirts, M. R.; Smith, J. C.; Kasson, P. M.; Van Der Spoel, D.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS 4.5: A High-Throughput and Highly Parallel Open Source Molecular Simulation Toolkit. *Bioinformatics* **2013**, *29* (7), 845–854. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt055.

(34) Schmid, N.; Eichenberger, A. P.; Choutko, A.; Riniker, S.; Winger, M.; Mark, A. E.; Van Gunsteren, W. F. Definition and Testing of the GROMOS Force-Field Versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40* (7), 843–856. DOI: 10.1007/s00249-011-0700-9.

(35) Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. The Missing Term in Effective Pair Potentials. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91* (24), 6269–6271. DOI: 10.1021/j100308a038.

(36) Miyamoto, S.; Kollman, P. A. Settle: An Analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithm for Rigid Water Models. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13* (8), 952–

962. DOI: 10.1002/jcc.540130805.

(37) Schalley, C.; Schalley, C. A. Analytical Methods in Supramolecular Chemistry. *Choice Rev. Online* **2007**, *45* (03), 45-1466-45–1466. DOI: 10.5860/choice.45-1466.

(38) Olson, E. J.; Bühlmann, P. Getting More out of a Job Plot: Determination of Reactant to Product Stoichiometry in Cases of Displacement Reactions and n: N Complex Formation. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (20), 8406–8412. DOI: 10.1021/jo201624p.

(39) Gómez, B. Reconocimiento de Aniones Por Pilararenos y Formación de Surfactates Supramoleculares. **2018**, 343.

(40) Cao, D.; Kou, Y.; Liang, J.; Chen, Z.; Wang, L.; Meier, H. A Facile and Efficient Preparation of Pillararenes and a Pillarquinone. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48* (51), 9721–9723. DOI: 10.1002/anie.200904765.

(41) Nierengarten, I.; Guerra, S.; Holler, M.; Karmazin-Brelot, L.; Barberá, J.; Deschenaux, R.; Nierengarten, J. F. Macrocyclic Effects in the Mesomorphic Properties of Liquid-Crystalline Pillar[5]- and Pillar[6]Arenes. *European J. Org. Chem.* **2013**, No. 18, 3675–3684. DOI: 10.1002/ejoc.201300356.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 4

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 4: ESTABILIZACIÓN DE PEROXINITRITO EN PILAR[5]ARENO.

4.1 INTRODUCCIÓN.

El peroxinitrito ($ONOO^-$) es una de las moléculas inorgánicas que más interés han despertado en los últimos años por parte de la comunidad científica. Este interés radica en diferentes aspectos de la química del peroxinitrito (su mecanismo de descomposición y de oxidación a sustratos no está del todo definido) así como en su implicación en numerosos procesos biológicos, atmosféricos y químicos.

Desde el punto de vista biológico, el ion $ONOO^-$ es generado fundamentalmente en la mitocondria y participa en numerosos procesos tales como nitración de residuos de tirosina o grupos tioles de proteínas [1]. Sin embargo, un exceso de peroxinitrito puede conducir a la oxidación de lípidos, proteínas y ADN provocando enfermedades como el Alzheimer, Parkinson o Huntington [2], entre otras. Estudios recientes, han mostrado la importancia del peroxinitrito en diferentes procesos atmosféricos dada la fotoisomerización del nitrato hacia peroxinitrito, la presencia de nitratos en forma de cristales ($HNO_3.3H_2O$) en la estratosfera y la posibilidad de acumulación de ácido peroxinitroso, mediante la isomerización de este gracias a los rayos ultravioleta procedentes del sol, capaz de reaccionar con compuestos clorados del medio que actúan en la destrucción de la capa de ozono [3]. Por último, el interés químico del peroxinitrito se centra en la dilucidación de los mecanismos de reacción, la detección de productos resultantes y los intermedios de reacción. Las reacciones más estudiadas hasta el momento (además de su propia descomposición) son las nitraciones, nitrosaciones e hidroxilaciones de fenoles [4], tirosina [5], triptofano [5] y fenilalanina [6].

El peroxinitrito se forma en disolución acuosa tras la reacción del radical óxido nítrico($^{\cdot}NO$) con superóxido ($O_2^{-\cdot}$) con una constante de velocidad de 9.3×10^9 $M^{-1}s^{-1}$ [7]formando ONOO-, el cual puede protonarse dando lugar al ácido peroxinitroso [8]. Una de las características de estos dos compuestos es que ambos pueden tener una configuración tanto cis como trans [9,10], en el caso del ácido peroxinitroso la configuración más estable es la cis (tanto en fase gas como acuosa) [11] sin embargo, en la configuración del peroxinitrito se encuentran numerosas discrepancias en la bibliografía [11–13]. Otra de las características que comparten el peroxinitrito y el ácido peroxinitroso es su tendencia a descomponerse, si bien en medio básico el peroxinitrito es estable a temperaturas inferiores a -20ºC durante semanas [14] mientras que, el ácido peroxinitroso cuenta con una vida media de menos de 1 s [8]. En los primeros estudios se determinó que el ácido peroxinitroso se descomponía a NO_3^- y H^+, esquema 1, siendo la constante de velocidad de primer orden y dependiente del pH del medio, esta constante k_{exp} es descrita por Keith y Powell [15] (ecuación 1) donde k_{HA} representa la constante de velocidad de descomposición del ácido y K_a la constante de disociación. Estudios experimentales revelaron que a pH 4-8.5 el valor de pK_a para el peroxinitrito era 6.80 (a 5 y 25 ºC) y 6.75 (a 37ºC) [8] ; por otra parte se determinó la constante k_{HA} a las mismas temperaturas siendo el valor 0.095, 1.3 y 4.5 s^{-1} a 5, 25 y 37 ºC, respectivamente [8].

$$HOONO \xrightarrow{k_{exp}} NO_3^- + H^+$$

Esquema 1. Ruta de descomposición de ácido peroxinitroso con una constante de velocidad asociada k_{exp}.

$$k_{exp} = \frac{k_{HA}[H^+]}{([H^+]+K_a)} \quad (1)$$

En estudios posteriores, se observó la aparición de iones nitrito como producto de reacción [16–19], este descubrimiento hizo necesario la ampliación del mecanismo de descomposición del ácido peroxinitroso (esquema 2) Dos moléculas de peroxinitrito pueden reaccionar entre sí dando lugar a NO_2^- y O_2 como productos de reacción, además, se comprobó que el aumento del pH del medio conduce a la formación de una mayor cantidad de nitritos. El estudio termodinámico de Koppenol y col. [8] reveló que el pK_a del ácido peroxinitroso es independiente de la temperatura (la entalpía de disociación estándar debe ser 0 kcal / mol). Los parámetros termodinámicos calculados son: E_a* = 18.5 kcal / mol, ΔH^* = 18±1 kcal / mol, ΔS^* = 3±2 cal / mol K y ΔG^*= 17±1 kcal / mol [8].

$$HOONO + ONOO^- \xrightarrow{k_{exp}} 2\,NO_2^- + H^+ + O_2$$

Esquema 2. Ruta de descomposición de ácido peroxinitroso con una constante de velocidad asociada k_{exp}.

Tal y como se ha especificado anteriormente, una de las características más importantes del peroxinitrito es su capacidad de actuar como agente oxidante. Si la reacción de oxidación transcurre mediante dos electrones el mecanismo será una sustitución nucleófila bimolecular S_N2 (esquema 3) mientras que, si sólo participa un electrón el mecanismo es una transferencia al ácido peroxinitroso (esquema 4) [20] Cabe destacar que hay sustratos con los que se pueden llevar a cabo ambos mecanismos [21].

$$R_2S: + HOONO \xrightarrow{k_1} R_2S^+OH + NO_2^-$$
$$R_2S^+OH \xrightarrow{k_2} R_2{=}O + H^+$$

Esquema 3. Ruta de oxidación mediante dos electrones mediante mecanismo S_N2.

$$HOONO + S \xrightarrow{k} HO^- + {}^{\cdot}NO_2 + S^{\cdot -}$$

Esquema 4. Ruta de oxidación mediante un electrón mediante transferencia al ácido peroxinitroso.

Ante los anteriores descubrimientos, los esfuerzos de la comunidad científica se centraron en la dilucidación de los mecanismos de reacción, llegando a la conclusión de que la oxidación puede ser directa, indirecta o implicar ambos procesos. En la oxidación directa, el peroxinitrito oxida directamente al sustrato mediante una reacción de primer orden con respecto al oxidante y a la concentración de sustrato [20,22]; algunos ejemplos de este tipo de oxidación lo encontramos con Br^- [23] y I^- [24,25], entre otros. El mecanismo se muestra en el esquema 5 a partir del cual se obtiene la expresión 2 para la velocidad de la reacción.

$$HOONO \overset{K_a}{\rightleftharpoons} ONOO^- + H^+$$

$$HOONO \overset{k_N}{\rightarrow} NO_3^- + H^+$$

$$HOONO + S \overset{k_2}{\rightarrow} P$$

Esquema 5. Mecanismo de reacción para la oxidación directa de un sustrato S dando lugar a un producto de reacción P.

$$k_{obs} = k_2\,[S] \qquad (2)$$

En las reacciones de oxidación indirectas [26,27], es una especie intermedia del peroxinitrito (HOONO* en esquema 6) la que oxida el sustrato en una reacción de primer orden con respecto al peroxinitrito y orden cero con respecto al sustrato, el mecanismo se muestra en el esquema 6 siendo la constante de velocidad observada definida por la ecuación 3. Algunos ejemplos de este tipo de mecanismo son los sufridos por tirosina [2,27,28] o fenilalanina [24], entre otros. La naturaleza de la especie intermedia ha sido ampliamente estudiada si bien, en la bibliografía se encuentran numerosas propuestas; un posible intermedio sería *trans*-HOONO [22,29], compuesto formado tras la evolución de *cis*-HOONO formándose así un compuesto más inestable capaz de generar un intermedio excitado vibracionalmente; el problema que presenta esta teoría es la corta vida de este tipo de intermedios (10^{-11} s) así como, la imposibilidad de formar parte de reacciones bimoleculares. La segunda propuesta fue NO_2^+ [8] el cual se forma a partir del ácido peroxinitroso, la separación de cargas inicial a ONO^+OH^- no se podría dar en medio acuoso dada la solvatación de los iones. La tercera propuesta es la caja radicalaria $[OH^{\cdot\cdot}NO_2]$ [8,18,20,30–34] desde la cual se pueden dar tres situaciones: los radicales difunden fuera de la caja para dar lugar a radicales libres, regenación del ácido peroxinitroso y formación de ácido nítrico. Por último, se plantea la formación de HOONO* [8,32], un estado de transición formado por la isomerización de ácido peroxinitroso a ácido nítrico.

$$HOONO \overset{K_a}{\rightleftharpoons} ONOO^- + H^-$$
$$HOONO \overset{K}{\rightleftharpoons} HOONO^*$$
$$HOONO^* \overset{k_N}{\rightarrow} NO_3^- + H^+$$
$$HOONO^* + S \overset{k_2}{\rightarrow} P + {}^{\cdot}NO$$

Esquema 6. Mecanismo de reacción para la oxidación indirecta de un sustrato S dando lugar a un producto de reacción P.

$$k_{obs} = \left(\frac{k_N k_1 + k_1 k_2[S]}{k_N + k_{-1} + k_2[S]}\right)\left(\frac{[H^+]}{K_a + [H^+]}\right) \quad (3)$$

Como último mecanismo de oxidación se encuentra un mecanismo que incluye tanto la oxidación directa como la indirecta (esquema 7) [35,36] a partir del cual se obtiene la expresión (4) para la velocidad de reacción. A altas concentraciones de sustrato se da una reacción de segundo orden, primer orden con respecto al estado fundamental y primer orden con respecto al sustrato (identificado con la oxidación directa) mientras que, a bajas concentraciones de sustrato la reacción es de primer orden: orden uno con respecto a la especie activada y orden cero con respecto al sustrato (identificado con la oxidación indirecta) Algunos ejemplos de sustratos que sufren este tipo de proceso son la metionina [21] o el ácido ascórbico [36], entre otros.

$$HOONO \overset{K_a}{\rightleftharpoons} ONOO^- + H^-$$
$$HOONO \overset{K}{\rightleftharpoons} HOONO^*$$
$$HOONO^* \overset{k_N}{\rightarrow} NO_3^- + H^+$$
$$HOONO + S \overset{k_2}{\rightarrow} P$$
$$HOONO^* + S \overset{k_2^*}{\rightarrow} P$$

Esquema 7. Mecanismo de reacción para la oxidación directa e indirecta de un sustrato S dando lugar a un producto de reacción P.

$$k_{obs} = \frac{a\,(1+b[S])}{1+\frac{ab}{c}[S]} \quad (4)$$

donde:

$$a = \left(\frac{k_1 k_N}{k_N + k_{-1}}\right)\left(\frac{[H^+]}{K_a + [H^+]}\right) \quad (5)$$

$$b = \frac{k_2^*}{k_N} \quad (6)$$

$$c = \frac{k_1[H^+]}{K_a + [H^+]} \quad (7)$$

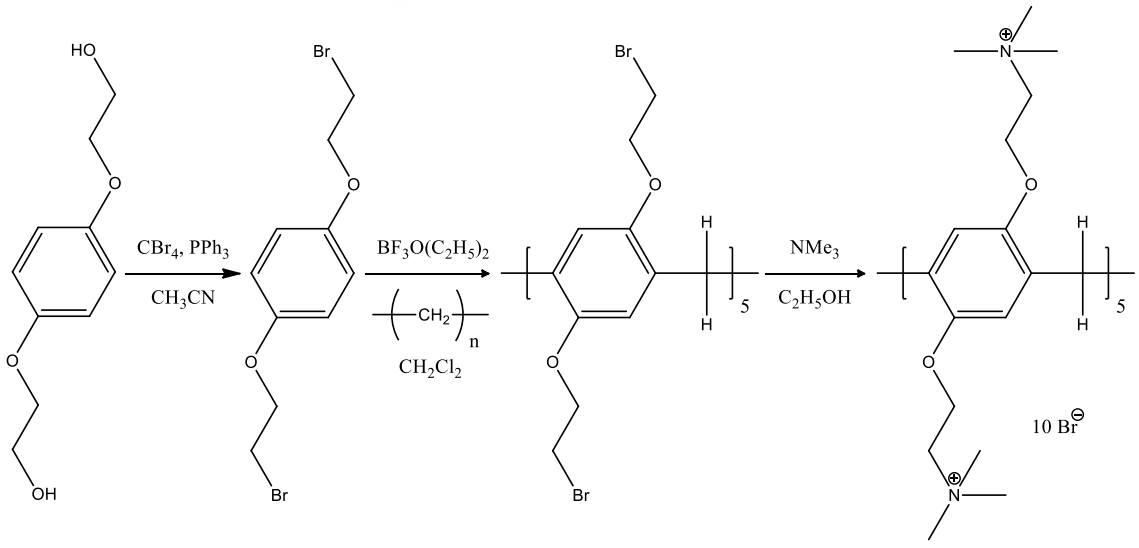
$$d = \frac{k_2[H^+]}{K_a + [H^+]} \quad (8)$$

Ante la importancia del peroxinitrito en el ámbito químico, biológico y atmosférico, así como, el gran abanico de reacciones químicas en las que interviene, se decide evaluar la interacción del peroxinitrito con los pilararenos. El objetivo principal de este estudio radica en determinar si el pilararenо seleccionado es capaz de encapsular el peroxinitrito en su interior evitando así, tanto su descomposición como la posibilidad de que actúe como agente oxidante con otras moléculas presentes en el medio de reacción.

4.2 MÉTODO EXPERIMENTAL.

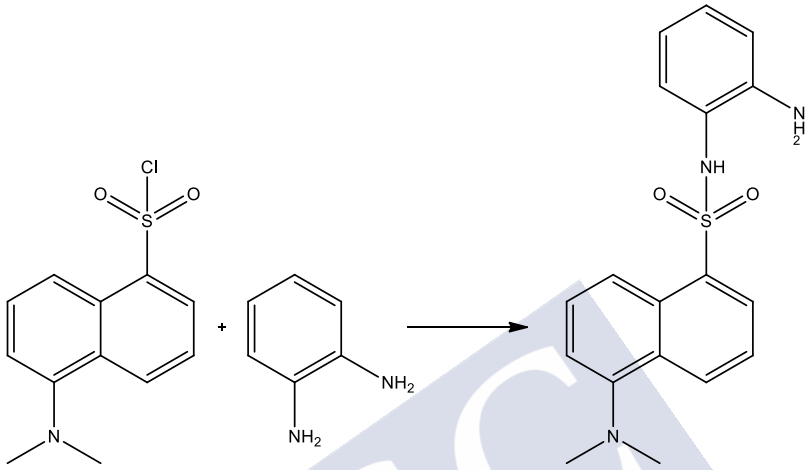
Todos los reactivos y disolventes utilizados en este trabajo fueron obtenidos comercialmente siendo en todos los casos de la máxima pureza disponible. Todas las disoluciones resultantes han sido desoxigenadas antes de ser utilizadas en los experimentos.

Preparación de reactivos y compuestos: La ruta sintética seleccionada para la obtención del bromuro de bis[(trimetilamonio)etoxi]pilar[5]areno (P5TMA) se muestra en el esquema 8. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich siendo de la mayor pureza disponible, de forma que se utilizan sin purificación adicional. La metodología y la caracterización detallada se muestran en el apéndice 3.5.1 del capítulo 3 de esta tesis doctoral.



Esquema 8. Ruta sintética seleccionada para la elaboración de P5TMA.

La ruta sintética seleccionada para la obtención N-(2-aminofenil)-5-(dimetilamino)-1-naftalenoulfamida (Ds-DAB) se muestra en el esquema 9 [37]. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich siendo de la mayor pureza disponible, de forma que se utilizan sin purificación adicional. La metodología y la caracterización detallada se muestran en el apéndice 6.5.1 de este capítulo.



Esquema 9. Ruta sintética seleccionada para la elaboración de Ds-DAB.

Espectroscopía UV-vis. Los espectros de absorción del peroxinitrito se llevan a cabo en cubetas de cuarzo de 1.0 cm de paso de luz en un espectofotómetro UV-Vis Cary 500, este equipo cuenta con un portacubetas múltiple y sistema de termostatización mediante flujo de agua para garantizar la realización de los experimentos a 25.0 ± 0.1 ºC. En el estudio cinético, es necesario el uso de un espectrofotómetro de flujo detenido (*stopped-flow*); el equipo es de la marca Applied Photophysic (modelo SX-17). Este equipo permite realizar mezclas de forma rápida en una celda deespectofotométrica mediante una autoinyección; este equipo cuenta, además, con un sistema de termostización mediante flujo de agua para garantizar una temperatura constate en los experimentos de 25.0 ± 0.1 ºC.

Espectroscopía de RMN. Todos los espectros de ^{1}H-RMN son realizados en un equipo Varian Inova 300 (300 MHz) a temperatura constante de 25.0 ºC. El disolvente utilizado en la preparación de la muestra es D_2O, la señal correspondiente se referencia en 4.79 ppm. Los espectros son procesados y analizados con el software Mestrenova 10.0.

Espectroscopía de fluorescencia: todos los espectros de fluorescencia se registraron en un fluorímetro Cary Eclipse a temperatura constante, 25.0°C. El equipo cuenta con un sistema multicelda termostatizado para cubetas convencionales, se utilizaron en todos los experimentos cubetas de cuarzo de 1 mm de paso de luz. Los espectros de fluorescencia de las mezclas de peroximitrito y Ds-DAB se realizaron a una longitud de onda de excitación de 350

nm, apertura de 5 nm y 5 nm en rendija de excitación y emisión. La variación de intensidad se ha recogido a 505 nm.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.3.1 Descomposición de peroxinitrito.

El primer paso en el estudio cinético del peroxinitrito es su propia reacción de descomposición, con este objetivo se prepararon muestras de peroxinitrito con concentración constante de 7.40 x 10^{-4}M y 0.3 M de NaOH. Cabe destacar que en todos los casos la concentración de peroxinitrito es confirmada a través del uso de su coeficiente de absortividad molar (ε = 1670 M^{-1} cm^{-1}) Así mismo, es importante recalcar que la temperatura se mantiene constante a 25 ºC y que, todas las disoluciones sufren un proceso de desoxigenación durante un mínimo de 20 min. De forma general los experimentos con peroxinitrito se realizan a una longitud de onda constante de 302 nm ya que, a esta longitud de onda la forma predominante es el anión peroxinitrito (el ácido peroxinitroso presenta un máximo de absorción centrado en 265 nm) sin embargo, en este estudio se realizan las medidas a 320 nm dada la influencia que presenta la banda del P5TMA a 302 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.

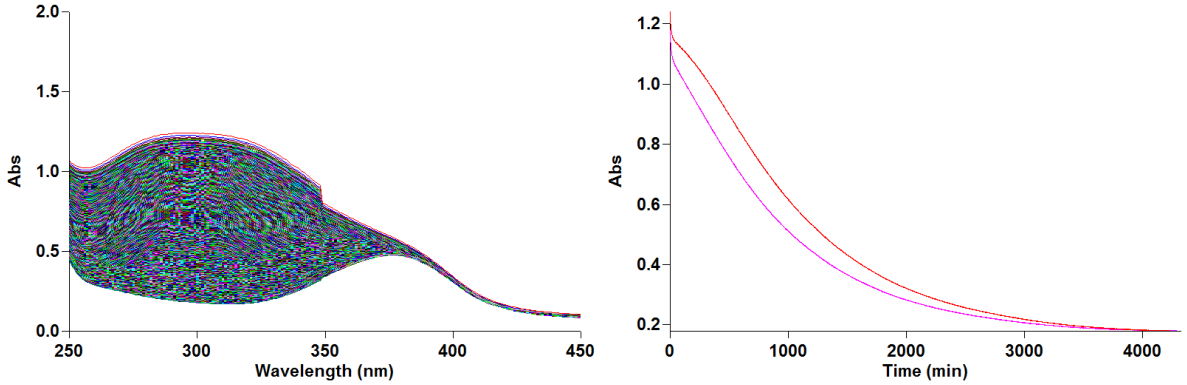


Figura 1. (Izquierda) Espectros de descomposición de una muestra de peroxinitrito de concentración 7.40 x 10^{-4}M (Derecha) Cinéticas resultantes de la descomposición de peroxinitrito a: (—) 302 nm y (—) 320 nm.

Para poder determinar la constate de asociación del peroxinitrito en el pH del medio de trabajo se plantea un mecanismo de reacción en el que el peroxinitrito se descompone dando lugar al producto P, modelo (1). El ajuste del modelo a los datos experimentales se realiza con el *software* Dynafit, iterando el valor de todos los parámetros obtenidos (coeficiente de absortividad molar de los productos de reacción y la constante de velocidad de descomposición) hasta alcanzar una concordancia aceptable entre los valores obtenidos experimentalmente y, los resultantes del ajuste. Tal y como puede observarse en la figura 2, el ajuste global del modelo planteado proporciona un resultado óptimo dando lugar a la determinación del valor de la constante de velocidad k = (6.02 ± 0.08) x 10^{-2} s^{-1}.

$$\text{Peroxinitrito} \xrightarrow{k} P \qquad (1)$$

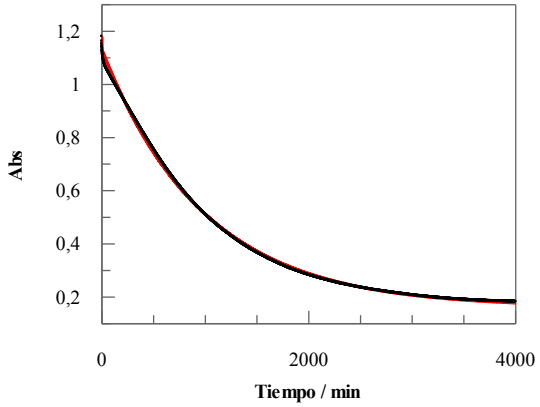


Figura 2. Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 7.40 x 10^{-4}M y su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1)

Una vez estudiado el proceso de descomposición del peroxinitrito en medio básico se realizó un experimento homólogo en medio ácido. En este caso, ante la rapidez de descomposición del peroxinitrito no fue posible la realización de los espectros de absorción a diferentes tiempos. El estudio cinético, por tanto, se realizó en un equipo de flujo detenido (*stopped-flow*) realizando las cinéticas a una longitud de onda de 320 nm y una temperatura constante de 25 ºC. Las muestras se prepararon con una concentración constante de peroxinitrito de 8.00 x 10^{-5}M a pH 5 (uso del buffer acético/acetato). El ajuste del modelo (1) a los datos experimentales se realiza con el *software* Dynafit, iterando el valor de todos los parámetros obtenidos hasta alcanzar una concordancia aceptable entre los valores obtenidos experimentalmente y, los resultantes del ajuste. En la figura 3 se muestra el ajuste del modelo planteado para una de las réplicas realizadas, el resultado obtenido se considera óptimo dando lugar a la determinación del valor de la constante de velocidad k = 1.677 ± 0.005 s^{-1}.

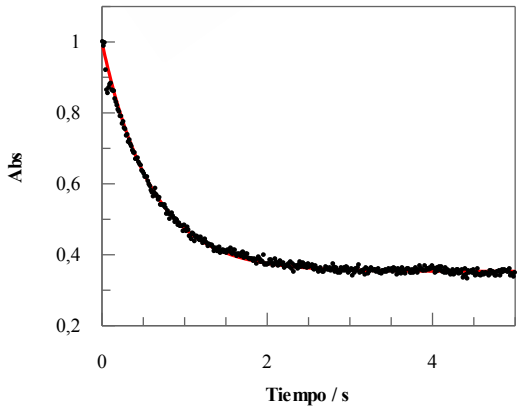


Figura 3. Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 7.00 x 10^{-5}M y su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

4.3.2 Estabilización de peroxinitrito en medio ácido.

Una vez determinada la constante de velocidad de descomposición del peroxinitrito se decide evaluar la capacidad del P5TMA para encapsular este tipo de compuestos. La importancia de este estudio radica, por una parte, en evitar que una molécula se autodescomponga y, por tanto, que tanto el peroxinitrito como los productos resultantes de este proceso puedan interaccionar con otras moléculas del medio provocando reacciones secundarias. Además, la encapsulación de peroxinitrito pondría de nuevo de manifiesto la gran versatilidad y aplicabilidad de los pilararenos.

Para la realización de este experimento se preparan muestras con dos concentraciones constantes de peroxinitrito (4.00×10^{-5}M y 2.00×10^{-5}M) y variación de P5TMA en buffer de acético/acetato para mantener el pH en 5, todas las disoluciones iniciales sufren un proceso de desoxigenación durante un mínimo de 20 min. El estudio cinético se realizó en un equipo de flujo detenido (*stopped-flow*) realizando las cinéticas a una longitud de onda de 320 nm y una temperatura constante de 25.0 ºC. En la figura 4 se muestran los perfiles cinéticos obtenidos, se puede observar como a medida que aumenta la concentración de P5TMA en el medio se produce una disminución de la capacidad del peroxinitrito para descomponerse. El ajuste del modelo (1) a los datos experimentales se realiza con el *software* Dynafit, iterando el valor del coeficiente de absortividad molar del producto de reacción y la constante de velocidad hasta alcanzar una concordancia aceptable entre los valores obtenidos experimentalmente y, los resultantes del ajuste. En la figura 5 se muestra un ejemplo del ajuste del modelo planteado para una de las réplicas realizadas, las constantes de velocidad obtenidas se muestran en las tablas 1 y 2. Todos los ajustes realizados se incluyen en el apéndice 6.5.2 de este capítulo.

El valor de las constantes de velocidad obtenidas es prácticamente idéntico, a excepción de aquellos casos donde la mayor parte del peroxinitrito se encuentra estabilizado dentro de la cavidad y, por lo tanto, es difícil cuantificar el efecto; indicando que el único proceso posible es la autodescomposición de las moléculas de $^{-}$OONO libres en disolución. Se produce en todos los casos una disminución paulatina del ΔAbs al incrementar la concentración de P5TMA en el medio.

El ajuste de los valores de ΔAbs frente a la concentración de P5TMA a un modelo de complejación 1:1 permiten determinar la constante de asociación así, para una concentración de peroxinitrito de 2.00×10^{-5}M se obtiene un valor de $(2.04 \pm 0.19) \times 10^{4}$M tal y como se muestra en la figura 6.

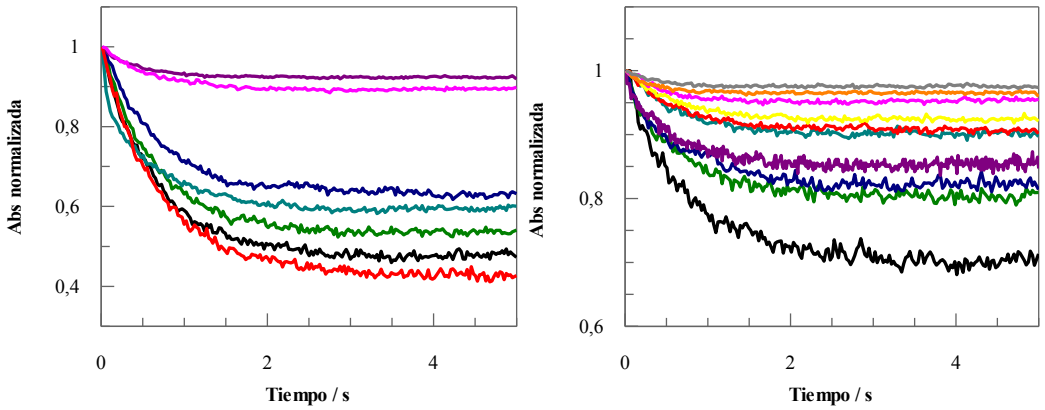


Figura 4. (Izquierda) Perfiles cinéticos a 320 nm, pH 5 y temperatura constante de 25ºC de mezclas de peroxinitrito (4.00 x 10^{-5} M) y variación de P5TMA: (—) 0.00 M, (—) 1.00 x 10^{-5}M, (—) 2.00 x 10^{-5}M, (—) 4.00 x 10^{-5}M, (—) 5.00 x 10^{-5}M, (—) 2.50 x 10^{-4}M y (—) 5.00 x 10^{-4}M (Derecha)) Perfiles cinéticos a 320 nm, pH 5 y temperatura constante de 25ºC de mezclas de peroxinitrito (2.00 x 10^{-5} M) y variación de P5TMA: (—) 0.00 M, (—) 1.00 x 10^{-5}M, (—) 2.00 x 10^{-5}M, (—) 4.00 x 10^{-5}M, (—) 8.00 x 10^{-5}M, (—) 1.00 x 10^{-4}M, (—) 2.00 x 10^{-4}M, (—) 4.00 x 10^{-4}M, (—) 8.00 x 10^{-4}M y (—) 1.00 x 10^{-3}M.

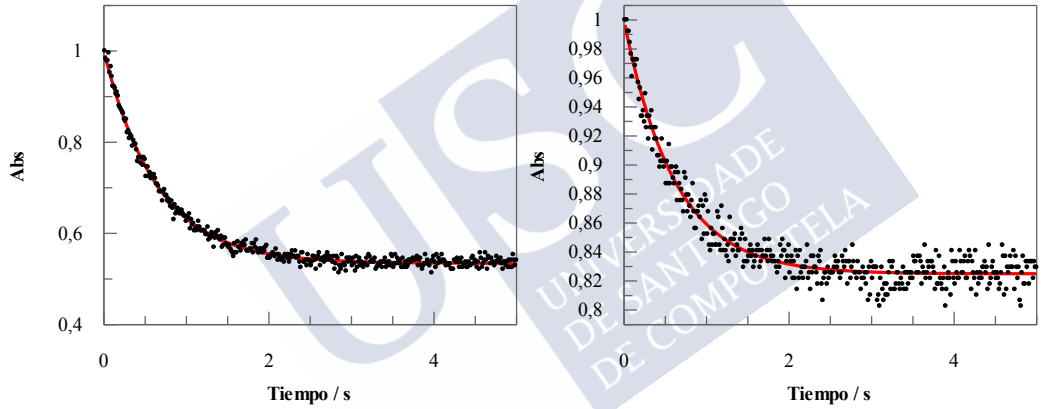


Figura 5. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M y P5TMA 1.00 x 10^{-5} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1) (Derecha) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 2.00 x 10^{-5}M y P5TMA 1.00 x 10^{-5} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1)

Tabla 1. Constantes de velocidad (k) y cambio en la absorción para el proceso de descomposición de peroxinitrito (4.00 x 10^{-5}M) al variar la concentración de P5TMA.

[P5TMA] / M	k / s^{-1}	ΔAbs
0.00	1.50 ± 0.06	0.577
1.00 x 10^{-5}	1.57 ± 0.08	0.518
2.00 x 10^{-5}	1.50 ± 0.11	0.465
4.00 x 10^{-5}	1.47 ± 0.08	0.401
5.00 x 10^{-5}	1.67 ± 0.14	0.360
2.50 x 10^{-4}	1.69 ± 0.15	0.105
5.00 x 10^{-4}	2.30 ± 0.21	0.067

Tabla 2. Constantes de velocidad (k) y cambio en la absorción para el proceso de descomposición de peroxinitrito (2.00 x 10^{-5}M) al variar la concentración de P5TMA.

[P5TMA] / M	k / s^{-1}	ΔAbs
0.00	1.42 ± 0.16	0.268
1.00 x 10^{-5}	1.62 ± 0.19	0.200
2.00 x 10^{-5}	1.65 ± 0.11	0.176
4.00 x 10^{-5}	1.79 ± 0.17	0.133
8.00 x 10^{-5}	1.68 ± 0.11	0.102
1.00 x 10^{-4}	1.40 ± 0.06	0.087
2.00 x 10^{-4}	1.75 ± 0.17	0.073
4.00 x 10^{-4}	2.00 ± 0.20	0.048
8.00 x 10^{-4}	2.60 ± 0.35	0.032
1.00 x 10^{-3}	1.94 ± 0.60	0.025

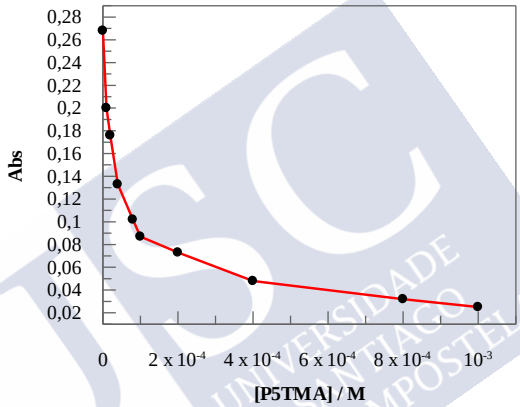


Figura 6. Variación de la absorbancia frente a la concentración de P5TMA y ajuste a modelo de complejación con estequiometría 1:1 en color rojo.

Como primera prueba de control y, ante las numerosas reacciones que tienen lugar mediante el uso de peroxinitrito o algún reactivo procedente de su autodescomposición, se realizó un experimento de resonancia magnética nuclear (^{1}H-RMN) para comprobar la ausencia de cambios en la integración de las señales correspondientes al P5TMA tal y como se muestra en la figura 7. La muestra se prepara con concentraciones equivales de P5TMA y peroxinitrito (0.5 mM) y 0.3 M de NaOH, el tiempo de reacción es de 25 horas.

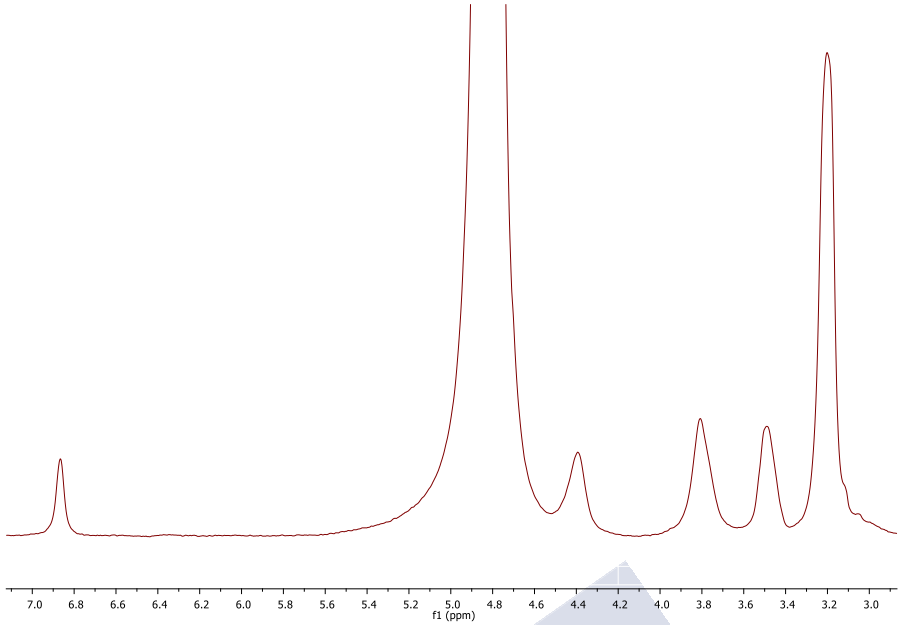


Figura 7. Espectro de ^{1}H-RMN de una muestra de [P5TMA] = 0.5 mM, [peroxinitriro] = 0.5 mM y [NaOH] = 0.3 mM realizado a temperatura ambiente y tras 25 horas de reacción.

Para confirmar la formación de un complejo de inclusión entre el peroxinitrito y el P5TMA y confirmar así, su estabilización dentro de la cavidad del macrociclo se realizaron distintas pruebas de control. La primera de ellas es la evaluación de una reacción de oxidación del hexacianoferrato (II), el peroxinitrito es capaz de oxidar a este sustrato (E^{o} = 0.36 V) en una cinética de primer orden siendo la constante de velocidad observada independiente de la concentración de sustrato inicial [22]. La reacción tiene lugar mediante un mecanismo indirecto en el cual, el ferrocianato (II) reacciona con una especie intermendia activada. Sin embargo, al pH de trabajo se produce un aumento de la constante de velocidad experimental además de un aumento en el rendimiento de la reacción [18]. Estudios del grupo de investigación de Goldstein y Czapski revelaron que en estas condiciones de trabajo existe una mezcla de oxidación directa e indirecta. El primer mecanismo propuesto es de naturaleza no radicalaria [22] (esquema 10) sin embargo estudios posteriores postulan un mecanismo radicalario [18] (esquema 11).

$$cis\text{-}ONOO^- + H^+ \overset{K_1}{\rightleftharpoons} cis\text{-}HOONO$$

$$cis\text{-}HOONO \overset{k_1}{\rightarrow} NO_3^- + H^+$$

$$cis\text{-}ONOOH \overset{K_2}{\rightleftharpoons} trans\text{-}HOONO$$

$$trans\text{-}HOONO + Fe(CN)_6^{4-} \overset{k_2}{\rightarrow} Fe(CN)_6^{3-} + {}^{\cdot}NO_2$$

$$Fe(CN)_6^{4-} + {}^{\cdot}NO_2 \overset{k3}{\rightarrow} Fe(CN)_6^{3-} + {}^{\cdot}NO_2$$

Esquema 10. Mecanismo de reacción para la oxidación de $Fe(CN)_6^{4-}$ de naturaleza no radicalaria.

$$HOONO \xrightarrow{k_1} {}^{\cdot}NO + {}^{\cdot}OH$$
$${}^{\cdot}OH + 0NOO^{-} \xrightarrow{k_2} H^{+} \; {}^{\cdot}O_2^{-} + NO_2^{-}$$
$${}^{\cdot}O_2 + {}^{\cdot}NO2 \xrightarrow{k_3} O_2 + NO_2^{-}$$
$$Fe(CN)_6^{4-} + {}^{\cdot}OH \xrightarrow{k4} Fe(CN)_6^{3-} + {}^{\cdot}OH^{-}$$

$$Fe(CN)_6^{4-} + {}^{\cdot}NO_2 \xrightarrow{k5} Fe(CN)_6^{3-} + {}^{\cdot}NO_2$$
$${}^{\cdot}OH + NO_2^{-} \xrightarrow{k_6} 0H^{-} + {}^{\cdot}NO_2$$
$$OONO^{-} \xrightarrow{k_7} {}^{\cdot}O_2^{-} + {}^{\cdot}NO$$

Esquema 11. Mecanismo de reacción para la oxidación de $Fe(CN)_6^{4-}$ de naturaleza radicalaria.

Ante la complejidad del sistema y dado que el mecanismo de oxidación no ha sido hasta el momento completamente definido, se decide trabajar con constantes aparentes. El primer paso de este experimento consiste en evaluar la reacción de oxidación del $Fe(CN)_6^{4-}$ con peroxinitrito en nuestras condiciones de trabajo. Se preparan muestras con concentración constante de peroxinitrito de 2.00×10^{-4} M en buffer de acético/acetato para mantener el pH en 5 mientras que, se varia la concentración de $Fe(CN)_6^{4-}$ en el medio. A continuación, se realiza el mismo experimento con peroxinitrito estabilizado, la concentración de peroxinitrito es igualmente 2.00×10^{-4}M y, la concentración de macrociclo 1.00×10^{-3}M. Un ejemplo de las cinéticas resultantes se muestra en la figura 7, el cálculo de las constantes de velocidad aparentes se realiza con el *software* Dynafit suponiendo un modelo (2) en el que se producen dos procesos, la descomposición del peroxinitrito y, la reacción de este con el sustrato de estudio para dar lugar a los productos de reacción. Tal y como puede observarse en la figura 8, en las muestras de peroxinitrito estabilizado tiene lugar una pequeña traza de reacción que probablemente es debida a la pequeña fracción de peroxinitrito que no se estabiliza, tal y como se observa en el anterior experimento. El cálculo de las constantes de velocidad aparentes indican además, una disminución de la velocidad de reacción.

$$\text{Peroxinitrito} \xrightarrow{k_1} P$$
$$\text{Peroxinitrito} + Fe(CN)_6^{4-} \xrightarrow{k_2} Fe(CN)_6^{3-} + P$$

Modelo (2). Modelo de reacción entre peroxinitrito y $Fe(CN)_6^{4-}$ donde P representa los productos de reacción derivados de la descomposición del peroxinitrito.

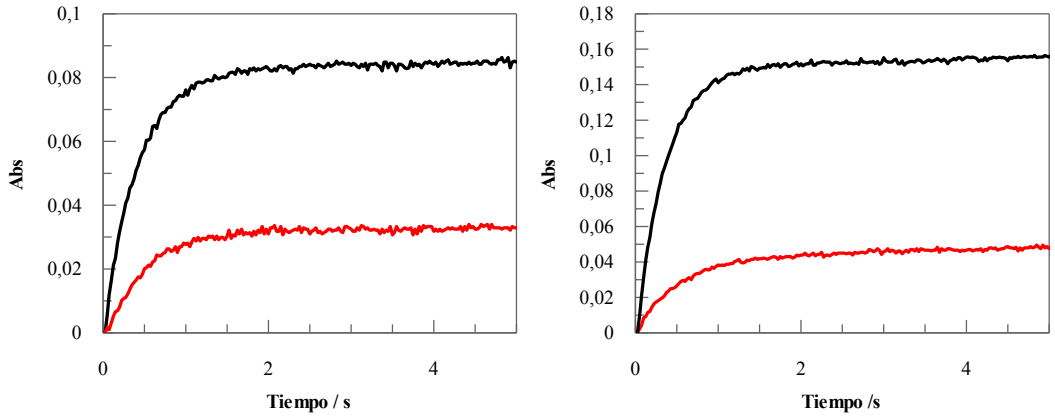


Figura 8. Perfiles cinéticos recogidos a 420 nm y 25 °C de una muestra de (—) peroxinitrito estabilizado y (—) peroxinitrito en presencia de (izquierda) $[Fe(CN)_6^{4-}] = 1.00 \times 10^{-4}M$ y (derecha) $[Fe(CN)_6^{4-}] = 1.00 \times 10^{-3}M$

4.3.3 Estabilización de peroxinitrito en medio básico.

Una vez estudiado la estabilización del peroxinitrito en medio ácido usando P5TMA como receptor molecular, se decide realizar un experimento homólogo modificando el pH para trabajar en condiciones básicas.

Para la realización de este experimento se preparan muestras con concentración constante de peroxinitrito ($4.70 \times 10^{-4}M$) y variación de P5TMA, todas las disoluciones iniciales sufren un proceso de desoxigenación durante un mínimo de 20 min. El estudio cinético se realizó en un espectrofotómetro UV-vis realizando las cinéticas a una longitud de onda de 320 nm y una temperatura constante de 25.0 ºC. En la figura 9 se muestran varios ejemplos de los perfiles cinéticos obtenidos, se puede observar como a medida que aumenta la concentración de P5TMA en el medio se produce una disminución de la capacidad del peroxinitrito para descomponerse. El ajuste del modelo (1) a los datos experimentales se realiza con el *software* Dynafit, iterando el valor de todos los parámetros obtenidos hasta alcanzar una concordancia aceptable entre los valores obtenidos experimentalmente y, los resultantes del ajuste. En la figura 5 se muestra un ejemplo del ajuste del modelo planteado para una de las réplicas realizadas, las constantes de velocidad obtenidas se muestran en la tabla 3. Todos los ajustes realizados se incluyen en el apéndice 6.5.3 de este capítulo.

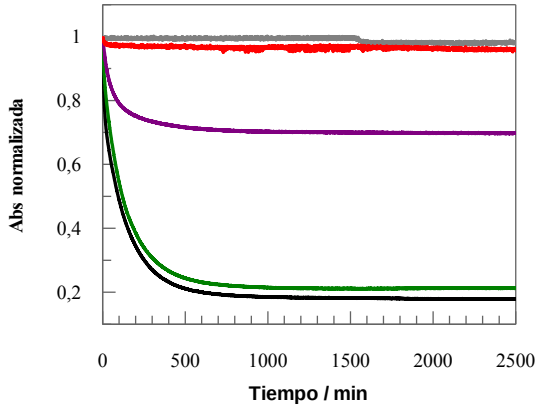


Figura 8. Perfiles cinéticos a 320 nm y temperatura constante de 25ºC de mezclas de peroxinitrito (4.00 x 10^{-5} M) y variación de P5TMA: (—) 0.00 M, (—) 1.00 x 10^{-5}M, (—) 1.00 x 10^{-4}M, (—) 1.00 x 10^{-3}M y (—) 5.00 x 10^{-3}M

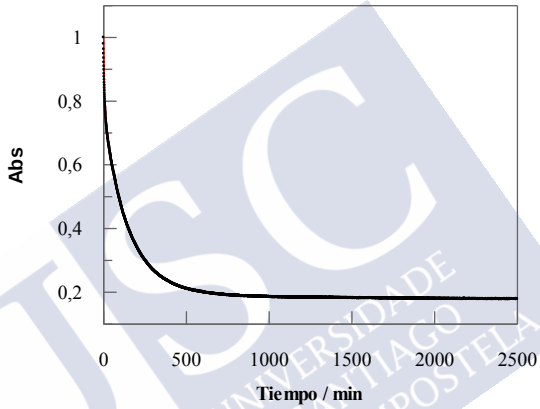


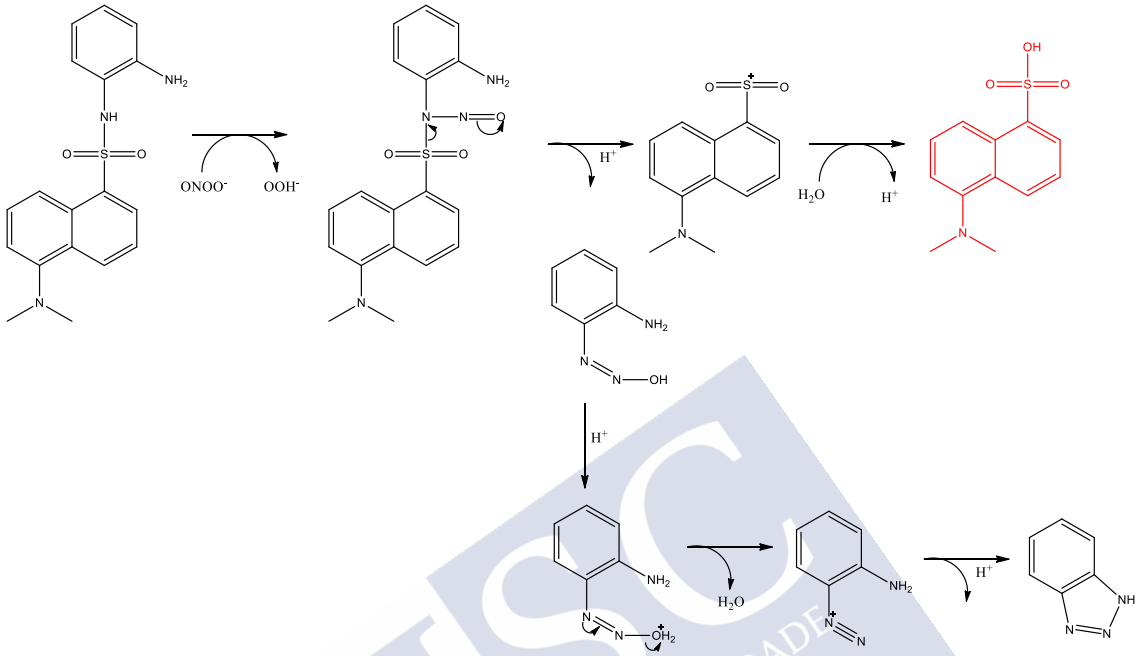
Figura 9. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M y su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

Tabla 3. Constantes de velocidad (k) y cambio en la absorción para el proceso de descomposición de peroxinitrito (4.00 x 10^{-5}M) al variar la concentración de P5TMA.

[P5TMA] / M	k / s^{-1}	ΔAbs
0.00	(2.39 ± 0.17) x 10^{-2}	0.831
1.00 x 10^{-5}	(2.14 ± 0.23) x 10^{-2}	0.784
5.00 x 10^{-5}	(2.39 ± 0.19) x 10^{-2}	0.751
1.00 x 10^{-4}	(1.69 ± 0.60) x 10^{-2}	0.298
1.00 x 10^{-3}	-	-
5.00 x 10^{-3}	-	-

Para confirmar la formación de un complejo de inclusión entre el peroxinitrito y el P5TMA y confirmar así, su estabilización dentro de la cavidad del macrociclo se realizaron distintas pruebas de control. Al igual que en el estudio de la estabilización del peroxinitrito con P5TMA en medio ácido se decide seleccionar una reacción mediada por peroxinitrito para así, poder comparar el efecto de la presencia de P5TMA en el medio. En este caso, se selecciona una sonda cuyo producto de reacción con el peroxinitrito conduce a una molécula fluorescente, el N-(2-aminofenil)-5-(dimetilamino)-1-naftalenoulfamida (Ds-DAB) y que además sea compatible con la basicidad del medio. El mecanismo de reacción ha sido descrito

como una reacción del peroxinitrito sobre la amina secundaria de Ds-DAB para formar una nitrosamina mediante una nitrosación nucleofílica directa, a continuación tiene lugar una protonación e hidrólisis que conducen a los productos de reacción (esquema 12) [37]



Esquema 12. Mecánismo de reacción entre Ds-DAB y peroxinitrito, la molécula marcada en rojo es la sonda fluorescente de estudio.

Para la realización de este experimento se prepararon dos tipos de muestras, por una parte, aquellas en las que el peroxinitrito no está estabilizado ([HOONO] = 4.00 x 10^{-5}M, [NaOH] = 0.3 M y [Ds-DAB] = 4.00 x 10^{-5}M) y, muestras con peroxinitrito estabilizado ([HOONO] = 4.00 x 10^{-5}M, [NaOH] = 0.3 M, [Ds-DAB] = 4.00 x 10^{-5}M y [P5TMA]= 1.00 x 10^{-3}M) En ambas muestras se encuentra un porcentaje final de DMSO del 0.72% necesario para la solubilización del Ds-DAB en medio acuoso. El estudio cinético se realizó en un fluorímetro Cary Eclipse realizando las cinéticas a una longitud de onda de 505 nm y una temperatura constante de 25.0 ºC. En la figura 10 se muestra un ejemplo de los perfiles cinéticos obtenidos, se puede observar como en el caso del peroxinitrito estabilizado, la reacción tiene lugar en menor proporción, de forma idéntica a los resultados obtenidos en la estabilización del peroxinitrito en medio ácido. El cambio en la intensidad es especialmente significativo pasando de un factor 3.5 a 0.5 según el peroxinitrito esté o no estabilizado, reforzándose así la teoría de la inclusión del peroxinitrito en la cavidad del P5TMA.

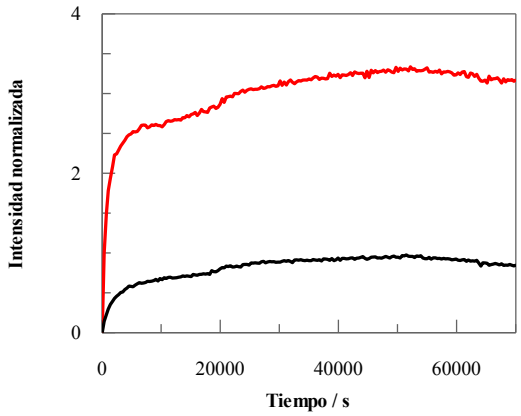


Figura 10. Perfiles cinéticos a 505 nm de: (—) [HOONO] = 4.00 x 10^{-5}M, [NaOH] = 0.3 M y ([Ds-DAB] = 4.00 x 10^{-5}M y (—) [HOONO] = 4.00 x 10^{-5}M, [NaOH] = 0.3 M, ([Ds-DAB] = 4.00 x 10^{-5}M y [P5TMA]= 1.00 x 10^{-3}M.

La confirmación de la estabilización del peroxinitrito abre una importante vía en cuanto a la aplicabilidad de los pilararenos ya que, se confirma que además de su capacidad de actuar como receptores moleculares pueden hacerlo como agentes protectores de moléculas inestables. La posibilidad de estabilizar peroxinitrito cobra importancia también desde el punto de vista atmosférico y biológico ya que, evitar las reacciones de esta molécula (o alguno de sus derivados) puede suponer la interrupción de procesos que conduzcan a determinadas enfermedades o procesos sobre la capa de ozono tal y como se explica en la introducción de este capítulo.

4.4 CONCLUSIONES.

En este capítulo se ha estudiado la autodescomposición del peroxinitrito en medio ácido y básico determinándose la constante de velocidad de estos procesos. Además, se ha estudiado la estabilización del peroxinitrito dentro de la cavidad del P5TMA en ambos medios calculándose igualmente la constante de velocidad asociada a cada uno de los procesos. Esta estabilización ha sido demostrada mediante la inhibición de dos reacciones de oxidación, en medio ácido se ha estudiado la reacción de peroxinitrito con hexacianoferrato (II) y, en medio básico la reacción de peroxinitrito con N-(2-aminofenil)-5-(dimetilamino)-1-naftalenoulfamida (Ds-DAB). Además, se ha realizado un experimento de ^{1}H-RMN para descartar la posibilidad de una reacción entre el peroxintrito y el propio macrociclo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

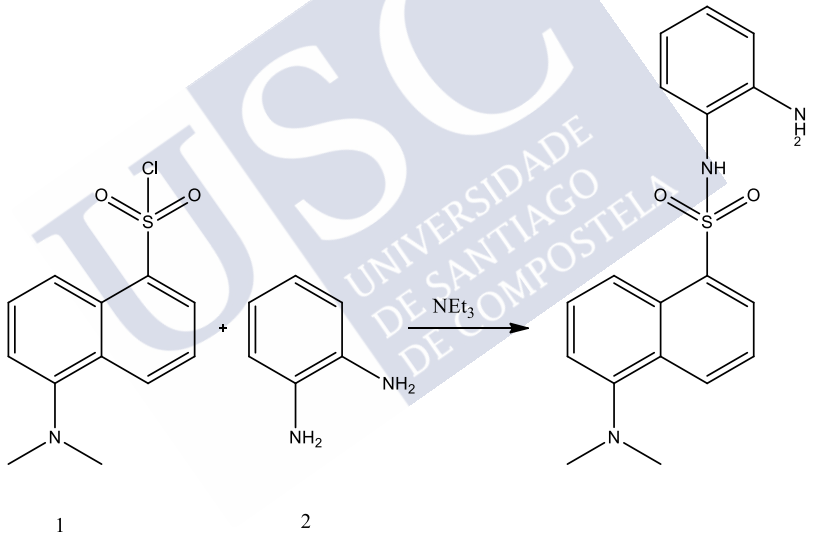
4.5 APÉNDICES.

4.5.1 Síntesis y caracterización de N-(2-aminofenil)-5-(dimetilamino)-1-naftalenoulfamida.

Todos los reactivos y disolventes utilizados en esta ruta sintética han sido obtenidos comercialmente, siendo de la máxima pureza posible y, usada sin ninguna purificación adicional.

Los espectros de RMN se adquieren en un espectrofotómetro Mercury INOVA 300 (300 MHz para ^{1}H) usando disolventes deuterados ($CDCl_3$) Los desplazamientos químicos se dan en unidades de δ (ppm) en la escala de TMS ($\delta = 0.0$ ppm), las constantes de acoplamiento J se dan en unidades de Hz. La referencia interna es la señal del disolvente, 7.26 ppm en ^{1}H para $CDCl_3$. Los espectros se procesan en el software MestReNova (MestReLab Research Inc)

En la síntesis del N-(2-aminofenil)-5-(dimetilamino)-1-naftalenoulfamida (Ds-DAB) se ha seguido una ruta sintética modificada basada en el método descrito por Yun-Ming Wang [37].



1 2

Preparación de una disolución de 1 (2.97 g, 11 mmol) y 2 (1.10 g, 10 mmol) en cloroformo, con agitación constante se añade gota a gota 1.6 mL de trietilamina para a continuación dejar la mezcla a reflujo durante 12 horas. Una vez transcurridas las 12 horas se deja evapora el disolvente dando lugar a un sólido anaranjado que se lava con una mezcla MeOH/CH_2Cl_2, el sólido amarillo obtenido se trata con CH_2Cl_2/ n-hexano para la cristalización del producto deseado con un rendimiento del 85%.

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): 8.51 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 8.40 (d, 1H, J = 8.6 Hz),8.07 (d, 1H, J = 7.2 Hz), 7.59 (t, 1H, J = 8.1 Hz), 7.40 (t, 1H, J = 7.9 Hz), 7.19 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 6.92 (t, 1H, J = 7.6 Hz), 6.62 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.59 (s, 1H), 6.37-6.255 (m, 6H), 4.00 (s, 2H), 2.89 (s, 6H)

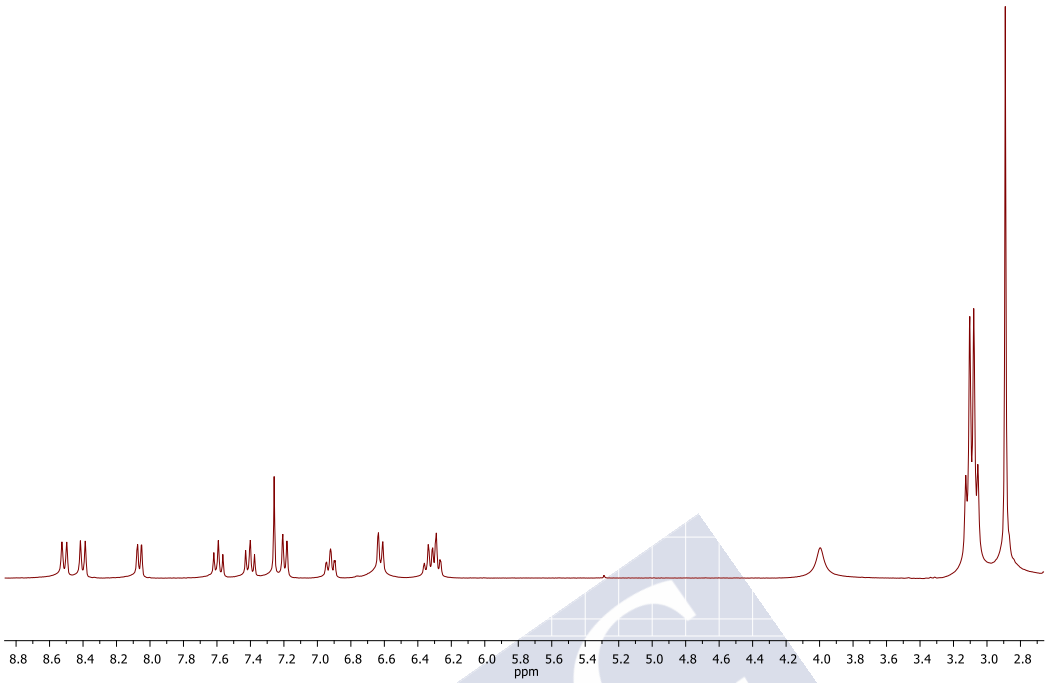


Figura A1. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz, 25ºC) obtenido para Ds-DAB.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.5.2 Ajustes de estabilización de perxonitrito en P5TMA en medio ácido.

4.5.2.1 Muestras con [peroxinitrito] = 4.00 x 10^{-5}M.

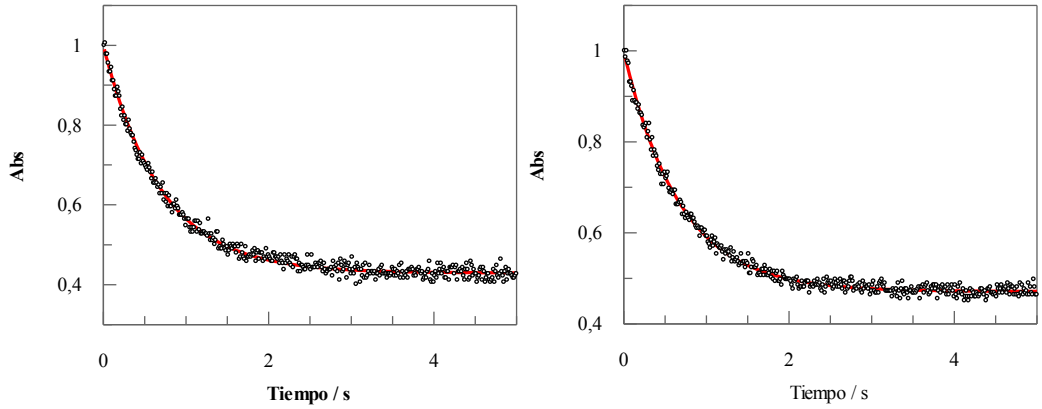


Figura A2. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1). (Derecha) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M y P5TMA 1.00 x 10^{-5} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

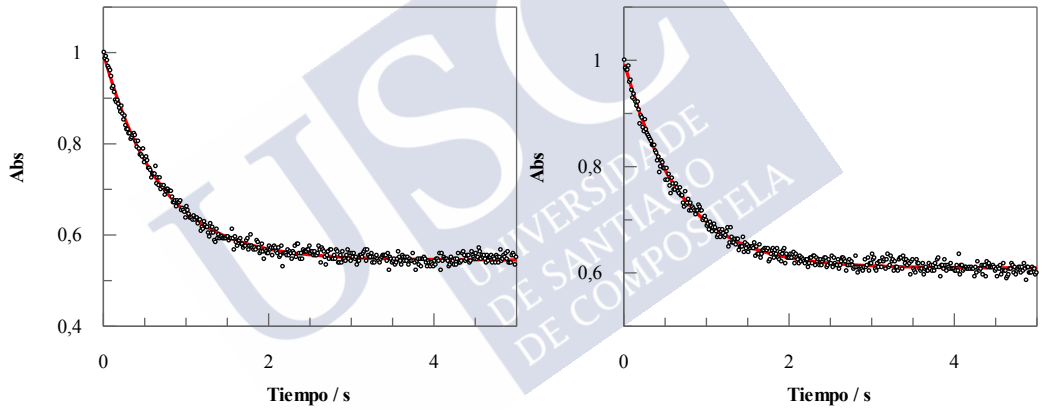


Figura A3. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M y P5TMA 2.00 x 10^{-5}M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1). (Derecha) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M y P5TMA 4.00 x 10^{-5} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

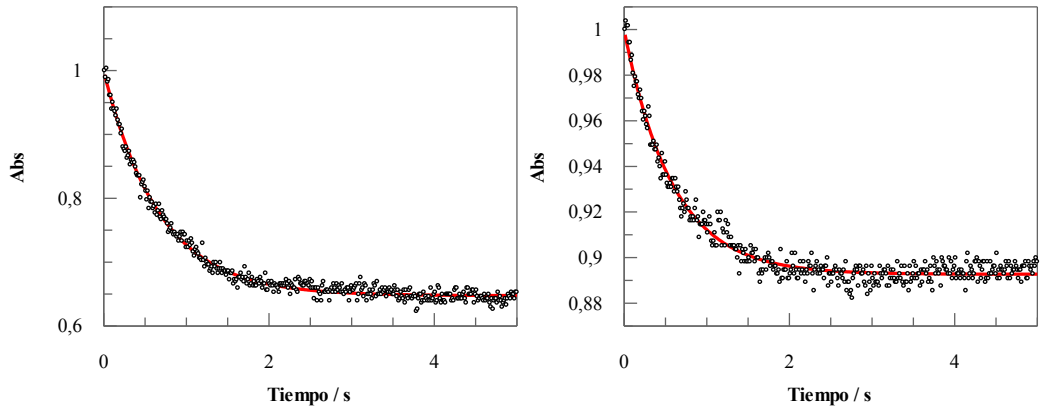


Figura A4. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M y P5TMA 5.00 x 10^{-5}M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1). (Derecha) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M y P5TMA 2.50 x 10^{-4} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

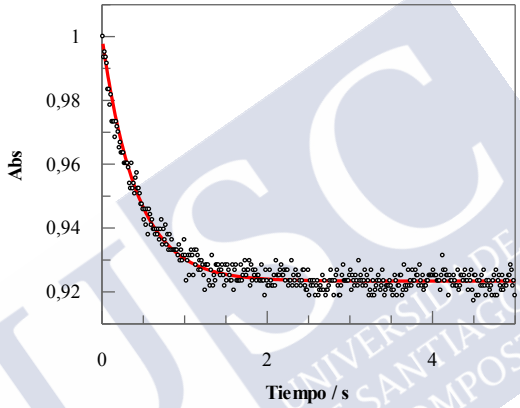


Figura A5. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M y P5TMA 5.00 x 10^{-4} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

4.5.2.2 Muestras con [peroxinitrito] = 2.00 x 10^{-5}M.

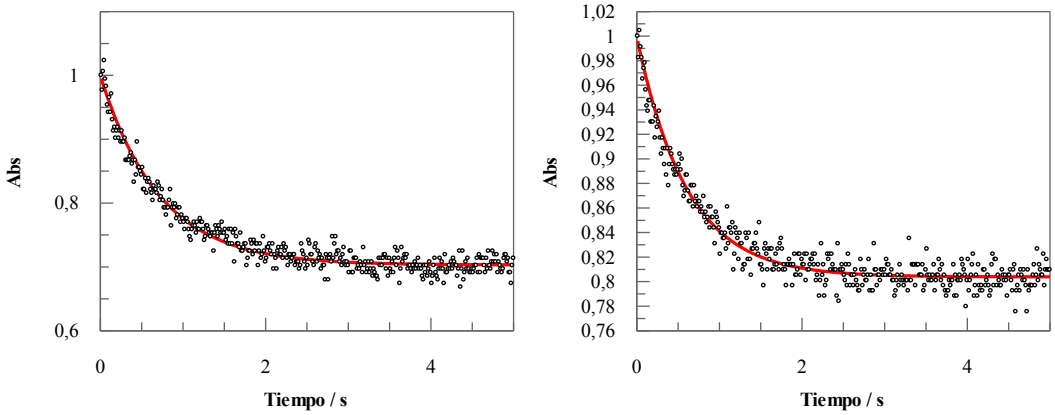


Figura A6. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 2.00 x 10^{-5}M con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1). (Derecha) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 2.00 x 10^{-5}M y P5TMA 1.00 x 10^{-5} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

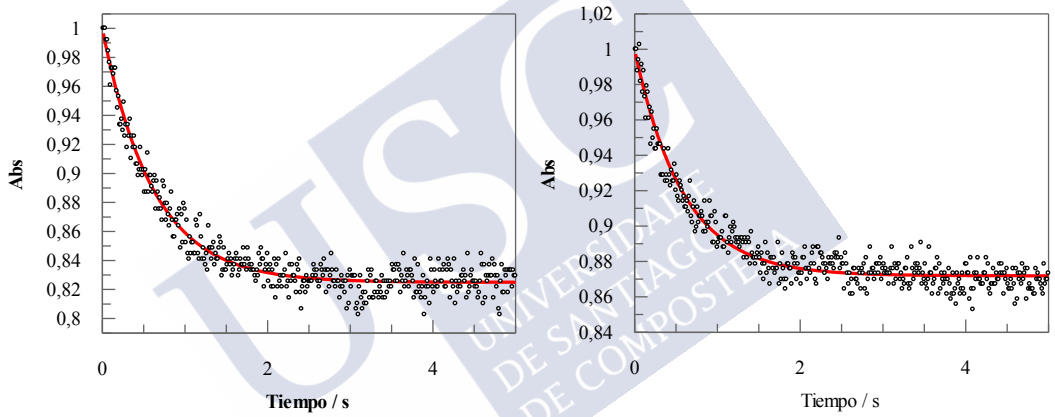


Figura A7. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 2.00 x 10^{-5}M y P5TMA 2.00 x 10^{-5} M con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1). (Derecha) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 2.00 x 10^{-5}M y P5TMA 4.00 x 10^{-5} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

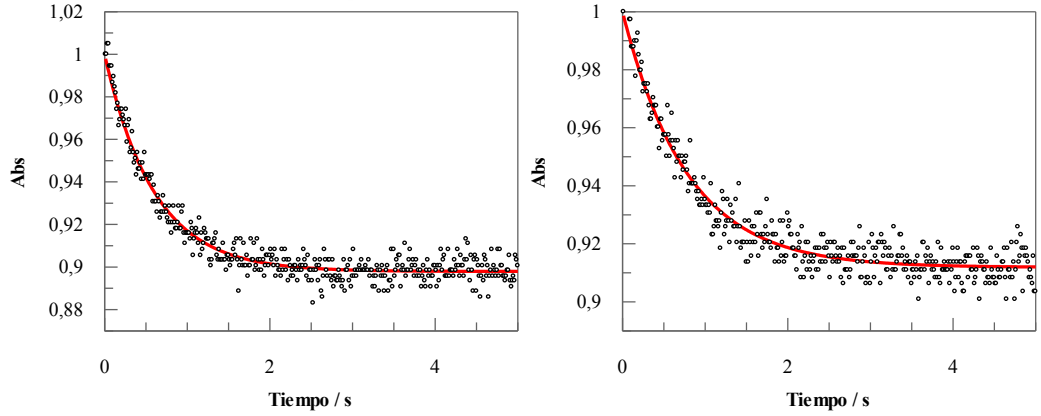


Figura A8. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 2.00 x 10^{-5}M y P5TMA 8.00 x 10^{-5} M con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1). (Derecha) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 2.00 x 10^{-5}M y P5TMA 1.00 x 10^{-4} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

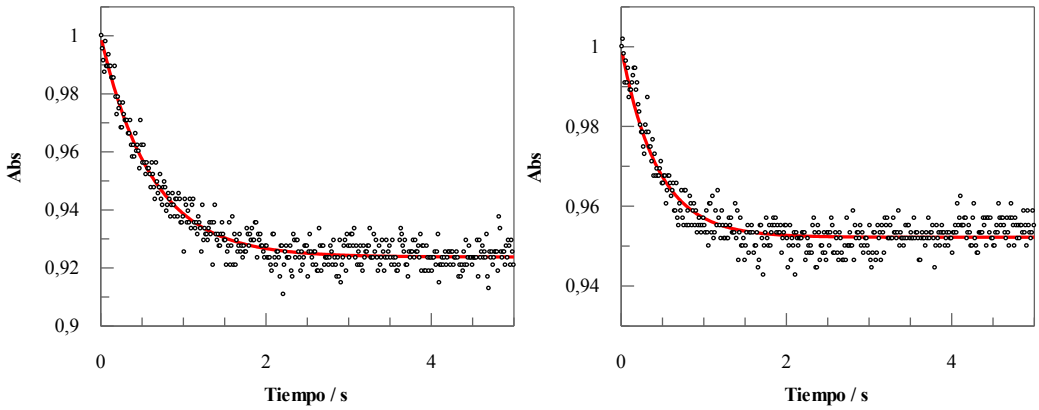


Figura A9. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 2.00 x 10^{-5}M y P5TMA 2.00 x 10^{-4} M con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1). (Derecha) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 2.00 x 10^{-5}M y P5TMA 4.00 x 10^{-4} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

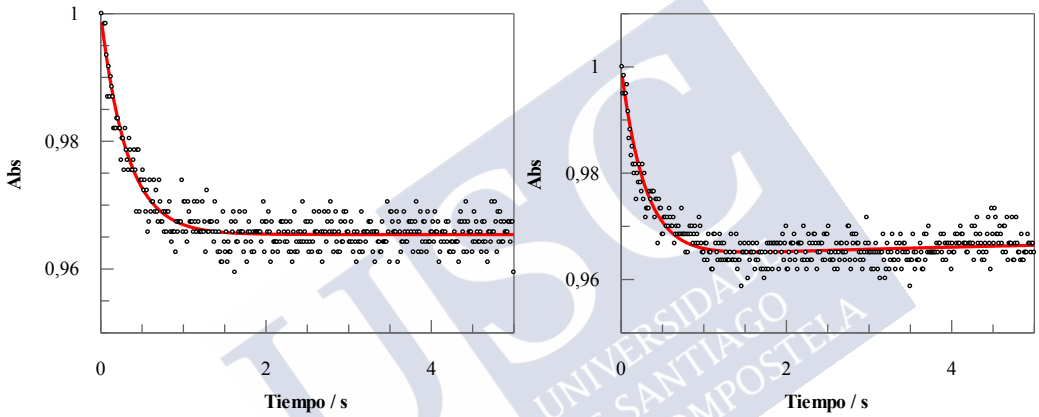


Figura A10. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 2.00 x 10^{-5}M y P5TMA 8.00 x 10^{-4} M con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1). (Derecha) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 2.00 x 10^{-5}M y P5TMA 1.00 x 10^{-3} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

4.5.3 Ajustes de estabilización de peroxinitrito en P5TMA en medio básico.

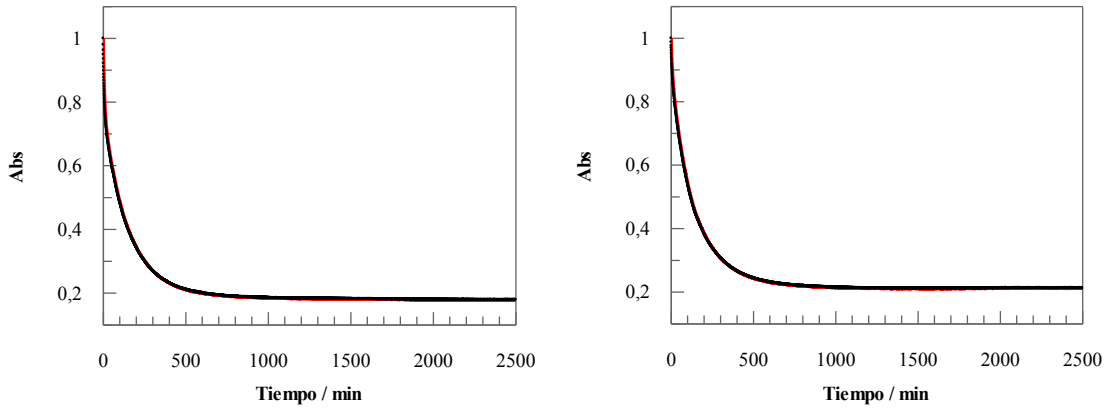


Figura A10. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1). (Derecha) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M y P5TMA 1.00 x 10^{-6} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

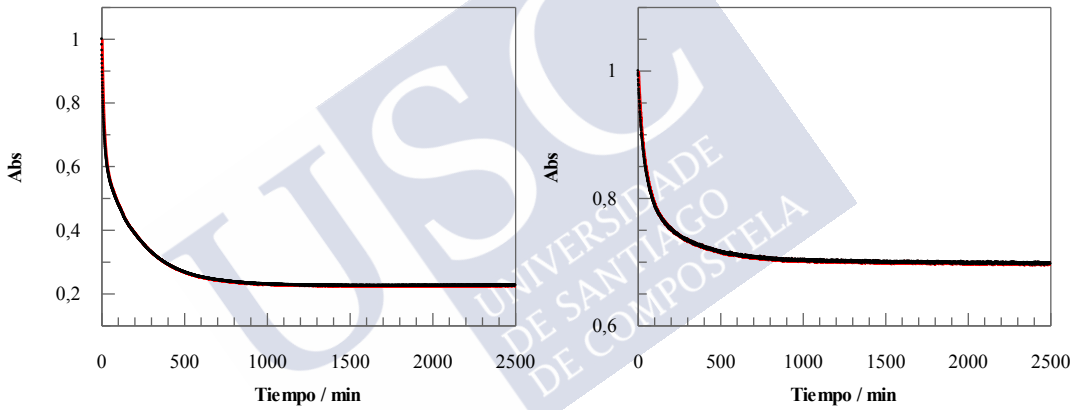


Figura A11. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M y P5TMA 1.00 x 10^{-5} M con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1). (Derecha) Perfil cinético recogido a 320 nm y 25 °C de una muestra de peroxinitrito 4.00 x 10^{-5}M y P5TMA 1.00 x 10^{-4} M, con su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (1).

4.6 BIBLIOGRAFÍA.

(1) Bartesaghi, S.; Radi, R. Fundamentals on the Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 618–625. DOI: 10.1016/j.redox.2017.09.009.

(2) Ferrer-Sueta, G.; Campolo, N.; Trujillo, M.; Bartesaghi, S.; Carballal, S.; Romero, N.; Alvarez, B.; Radi, R. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (3), 1338–1408. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00568.

(3) Papée, H. M.; Petriconi, F. L. Formation and decomposition of alkaline `pernitrite´. *Nature*. **1964**, *204*, 142-144. DOI: 10.1038/204142a0.

(4) Eiserich, J. P.; Estévez, A. G.; Bamberg, T. V.; Ye, Y. Z.; Chumley, P. H.; Beckman, J. S.; Freeman, B. A. Microtubule Dysfunction by Posttranslational Nitrotyrosination of α-Tubulin: A Nitric Oxide-Dependent Mechanism of Cellular Injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (11), 6365–6370. DOI: 10.1073/pnas.96.11.6365.

(5) Bartlett, D., Church, D., Bounds, P., Koppenol, W. The Kinetics of the Oxidation of L-Ascorbic Acid. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18* (l), 85–92. DOI: 10.1016/0891-5849(94)E0133-4.

(6) Kumar, V.; Khare, T.; Sharma, M.; Wani, S. H. ROS-Induced Signaling and Gene Expression in Crops under Salinity Stress. *React. Oxyg. Species Antioxid. Syst. Plants Role Regul. under Abiotic Stress* **2017**, *288* (2), 159–184. DOI: 10.1007/978-981-10-5254-5_7.

(7) Goldstein, S.; Czapski, G. The Reaction of NO· with O2·- and HO2·-: A Pulse Radiolysis Study. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19* (4), 505–510. DOI: 10.1016/0891-5849(95)00034-U.

(8) Koppenol, W. H.; Moreno, J. J.; Pryor, W. A.; Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S. Peroxynitrite, a Cloaked Oxidant Formed by Nitric Oxide and Superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5* (6), 834–842. DOI: 10.1021/tx00030a017.

(9) Koppenol, W. H. The Chemistry of Peroxynitrite, a Biological Toxin. Química Nova 1998, 21 (3), 326-331. DOI: 10.1590/S0100-40421998000300014.

(10) Liang, B.; Andrews, L. Infrared Spectra of Cis- and Trans-Peroxynitrite Anion, Oono-, in Solid Argon. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (40), 9848–9854. DOI: 10.1021/ja0114299.

(11) Tsai, H. H.; Hamilton, T. P.; Tsai, J. H. M.; Van Der Woerd, M.; Harrison, J. G.; Jablonsky, M. J.; Beckman, J. S.; Koppenol, W. H. Ab Initio and NMR Study of Peroxynitrite and Peroxynitrous Acid: Important Biological Oxidants. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (37), 15087–15095. DOI: 10.1021/jp961091i.

(12) Doclo, K.; Rothlisberger, U. Conformational Equilibria of Peroxynitrous Acid in Water: A First-Principles Molecular Dynamics Study. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104* (27), 6464–6469. DOI: 10.1021/jp0012193.

(13) Cordeir, R. M. Reactive Oxygen and Nitrogen Species at Phospholipid Bilayers: Peroxynitrous Acid and Its Homolysis Products. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122* (34), 8211–8219. DOI: 10.1021/acs.jpcb.8b07158.

(14) Beckman, J. S.; Chen, J. u. n.; Ischiropoulos, H.; Crow, J. P. Oxidative Chemistry of Peroxynitrite. *Methods Enzymol.* **1994**, *233* (C), 229–240. DOI: 10.1016/S0076-6879(94)33026-3.

(15) Keith, W. G.; Powell, R. E. Kinetics of decomposition of Peroxynitrous Acid. *J. Am. Chem. Soc. (A).* **1969**, 90-90. DOI: 10.1039/J1969000090.

(16) Pfeiffer, S.; Gorren, A. C. F.; Schmidt, K.; Werner, E. R.; Hansert, B.; Bohle, D. S.; Mayer, B. Metabolic Fate of Peroxynitrite in Aqueous Solution. Reaction with Nitric Oxide and PH-Dependent Decomposition to Nitrite and Oxygen in a 2:1 Stoichiometry. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (6), 3465–3470. DOI: 10.1074/jbc.272.6.3465.

(17) Lymar, S. V.; Hurst, J. K. CO2-Catalyzed One-Electron Oxidations by Peroxynitrite: Properties of the Reactive Intermediate. *Inorg. Chem.* **1998**, *37* (2), 294–301. DOI: 10.1021/ic970946i.

(18) Kissner, R.; Koppenol, W. H. Product Distribution of Peroxynitrite Decay as a Function of PH, Temperature, and Concentration. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (2), 234–239. DOI: 10.1021/ja010497s.

(19) Benedict, K. B.; McFall, A. S.; Anastasio, C. Quantum Yield of Nitrite from the Photolysis of Aqueous Nitrate above 300 Nm. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (8), 4387–4395. DOI: 10.1021/acs.est.6b06370.

(20) Pryor, W. A.; Squadrito, G. L. The Chemistry of Peroxynitrite: A Product from the Reaction of Nitric Oxide with Superoxide. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **1995**, *268* (5 12-5). DOI: 10.1152/ajplung.1995.268.5.l699.

(21) Indira Priyadarsini, K.; Kapoor, S.; Naik, D. B. One- and Two-Electron Oxidation Reactions of Trolox by Peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14* (5), 567–571. DOI: 10.1021/tx000239t.

(22) Goldstein, S.; Squadrito, G. L.; Pryor, W. A.; Czapski, G. Direct and Indirect Oxidations by Peroxynitrite, Neither Involving the Hydroxyl Radical. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *21* (7), 965–974. DOI: 10.1016/S0891-5849(96)00280-8.

(23) Liebhafsky, H. A. The Reaction Between Arsexious Acid and Iodine. *J. Phys. Chem.* **1951**, *35* (6), 1648–1654. DOI: 10.1021/j150324a006.

(24) Hughes, N.; Nicklin, G. H.; Sackrule, W. A. The Chemistry of Peroxonitrites. Part 111.l The Reaction of Peroxo- nitrite with Nucleophiles in Alkali, and other Nitrite producing Reactions. *J. Chem. Soc. A*, **1971**, 3722-3725. DOI: 10.1039/J19710003722.

(25) Goldstein, S.; Czapski, G. Direct and Indirect Oxidations by Peroxynitrite. *Inorg. Chem.* **1995**, *34* (16), 4041–4048. DOI: 10.1021/ic00120a006.

(26) Gatti, R. M.; Alvarez, B.; Vasquez-Vivar, J.; Radi, R.; Augusto, O. Formation of Spin Trap Adducts during the Decomposition of Peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *349* (1), 36–46. DOI: 10.1006/abbi.1997.0451.

(27) Radi, R. The Origins of Nitric Oxide and Peroxynitrite Research in Uruguay: 25 years of Contributions to the Biochemical and Biomedical Sciences. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **2019**, *87*, 83–89. DOI: 10.1016/j.niox.2019.03.003.

(28) van der Vliet, A.; O'Neill, C. A.; Halliwell, B.; Cross, C. E.; Kaur, H. Aromatic Hydroxylation and Nitration of Phenylalanine and Tyrosine by Peroxynitrite. Evidence for Hydroxyl Radical Production from Peroxynitrite. *FEBS Lett.* **1994**, *339* (1–2), 89–92. DOI: 10.1016/0014-5793(94)80391-9.

(29) Crow, J. P.; Spruell, C.; Chen, J.; Gunn, C.; Ischiropoulos, H.; Tsai, M.; Smith, C. D.; Radi, R.; Koppenol, W. H.; Beckman, J. S. On the PH-Dependent Yield of Hydroxyl Radical Products from Peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *16* (3), 331–338. DOI: 10.1016/0891-5849(94)90034-5.

(30) Loegager, T.; Sehested, K. ChemInform Abstract: Formation and Decay of Peroxynitrous Acid: A Pulse Radiolysis Study. *ChemInform* **2010**, *24* (38), 6664–6669. DOI: 10.1002/chin.199338025.

(31) Koppenol, W. H.; Serrano-Luginbuehl, S.; Nauser, T.; Kissner, R. Thinking Outside the Cage: A New Hypothesis That Accounts for Variable Yields of Radicals from the Reaction of CO2with ONOO-. *Chem. Res. Toxicol.* **2020**, *33* (7), 1516–1527. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.9b00309.

(32) Koppenol, W. H.; Kissner, R. Can O = NOOH Undergo Homolysis? *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11* (2), 87–90. DOI: 10.1021/tx970200x.

(33) Coddington, J. W.; Wherland, S.; Hurst, J. K. Pressure Dependence of Peroxynitrite Reactions. Support for a Radical Mechanism. *Inorg. Chem.* **2001**, *40* (3), 528–532. DOI: 10.1021/ic981359f.

(34) Merényi, G.; Lind, J. Free Radical Formation in the Peroxynitrous Acid. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11* (4), 243–246. DOI: 10.1021/tx980026s.

(35) Ford, P. C.; Miranda, K. M. The Solution Chemistry of Nitric Oxide and Other Reactive Nitrogen Species. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **2020**, *103* (May), 31–46. DOI: 10.1016/j.niox.2020.07.004.

(36) Squadrito, G. L.; Jin, X.; Pryor, W. A. Stopped-Flow Kinetic Study of the Reaction of Ascorbic Acid with Peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1995, pp 53–59. DOI: 10.1006/abbi.1995.1435.

(37) Lin, K.; Wu, S.; Hsu, K.; Hung, C.; Liaw, W.; Wang, Y. A N - (2-Aminophenyl) -5- (Dimethylamino) - Based Fluorescent Chemosensor for Peroxynitrite. *Org. Lett.* **2013**, *4*, 2011–2014. DOI: 10.1021/ol401932p.

CAPÍTULO 5

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 5: ESTABILIZACIÓN DE INTERMEDIOS DE REACTIVOS DEL TIPO COMPLEJO DE MEISENHEIMER CON PILAR[N]ARENOS.

5.1 INTRODUCCIÓN.

Un complejo de Meisenheimer o complejo de Jackson-Meisenheimer es un intermedio proveniente de una reacción entre un areno con sustituyentes atractores de electrones y un nucleófilo, es decir, son los intermedios de reacción en las sustituciones aromáticas nucleófilas en las que se produce una transferencia de carga [1]. El descubrimiento de estos compuestos data de 1900 en el que se propone una estructura quinoidea para el aducto formado a partir de éteres de picrilo y alcóxidos potásicos. En 1902, Meisenheimer aísla el producto 1 (Figura 1) a partir de la reacción de 2,4,6-trinitroanisol y 2,4,6-trinitrofenetol con etóxido potásico y metóxido potásico, respectivamente; este descubrimiento fue determinante en la dilicidación de la estructura del intermedio de reacción. Desde ese momento se han realizado numerosos estudios desde el punto de vista de la caracterización de las estructuras resultantes [2–8] y desde el punto de vista cinético y termodinámico [2,9].

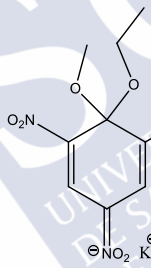
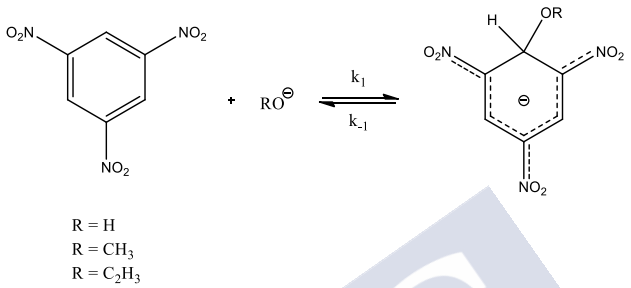


Figura 1. Estructura del producto de reacción entre 2,4,6-trinitroanisol y 2,4,6-trinitrofenetol con etóxido potásico y metóxido potásico.

La formación de complejos de tipo Meisenheimer presenta una gran ventaja ya que este tipo de estructuras conforma nuevos cromóforos que absorben la radiación [10]; un ejemplo es el trinitrotolueno (TNT) que actuando como un ácido de Bronsted-Lowry da lugar a especies coloreadas de fácil estudio mediante espectroscopía UV-vis. Una de las últimas aplicaciones de la formación de complejos de Meisenheimer como sensores es el estudio de la formación de trazas de TNT mediante un simple análisis de SERS [9] si bien en la bibliografía existen muchos más ejemplos de sensores basados en complejos de Meisenheimer [10–12].

La reacción predominante del 1,3,5-trinitrobenceno (TNB) con una gran variedad de nucleófilos transcurre también a partir de la formación de un complejo de Meisenheimer, la reacción de TNB con alcóxidos e hidróxidos se representa en el esquema 1. Si bien es cierto que la reacción de TNB con ciertos nucleófilos puede dar reacciones secundarias en las que se forman radicales aniónicos [13], sustracción de protones [14–16] del anillo aromático o ataques sobre alguno de los grupos nitro [17], estas transcurren en mucho menor medida. La reacción de formación de complejos de Meisenheimer con nucleófilos como el hidróxido ha sido

ampliamente estudiada tanto en medio acuoso como en mezclas de disolventes; a partir de los estudios realizados seleccionando como disolvente agua se ha podido determinar los parámetros termodinamicos asociados a la reacción (esquema 1). Desde el punto de vista de la entalpía se ha determinado que: $\Delta H_1^{\#} = 15.6 \pm 0.8$ kcal / mol, $\Delta H_{-1}^{\#} = 7.3 \pm 0.8$ kcal / mol y $\Delta H = 8.3 \pm 1.6$ kcal / mol; desde el punto de vista entrópico se ha determinado: $\Delta S_1^{\#} = 1.1 \pm 2.7$ J / K, $\Delta S_{-1}^{\#} = -29.4 \pm 2.7$ J / K y $\Delta S = 30.5 \pm 5.4$ J / K [18]. Además de hidróxidos también se ha estudiado esta reacción con metóxidos y etóxidos.



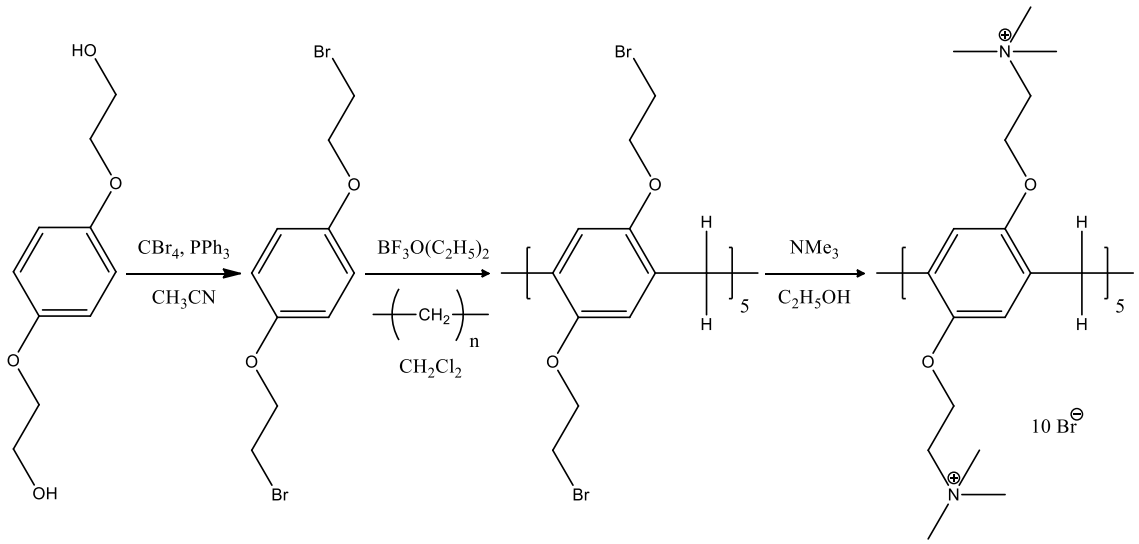
Esquema 1. Formación de complejo de Meisenheimer mediante reacción de alcóxidos e hidróxidos con TNB.

Ante la importancia de este tipo de reactividad y dado que el intermedio de reacción es relativamente estable en las condiciones de trabajo, en este capítulo se ha planteado la posibilidad de estabilizar el complejo de Meisenheimer formado dentro de la cavidad de los pilararenos ya que, existen muy pocas referencias bibliográficas de estabilización de intermedios de reacción por parte de macrociclos.

5.2 MÉTODO EXPERIMENTAL.

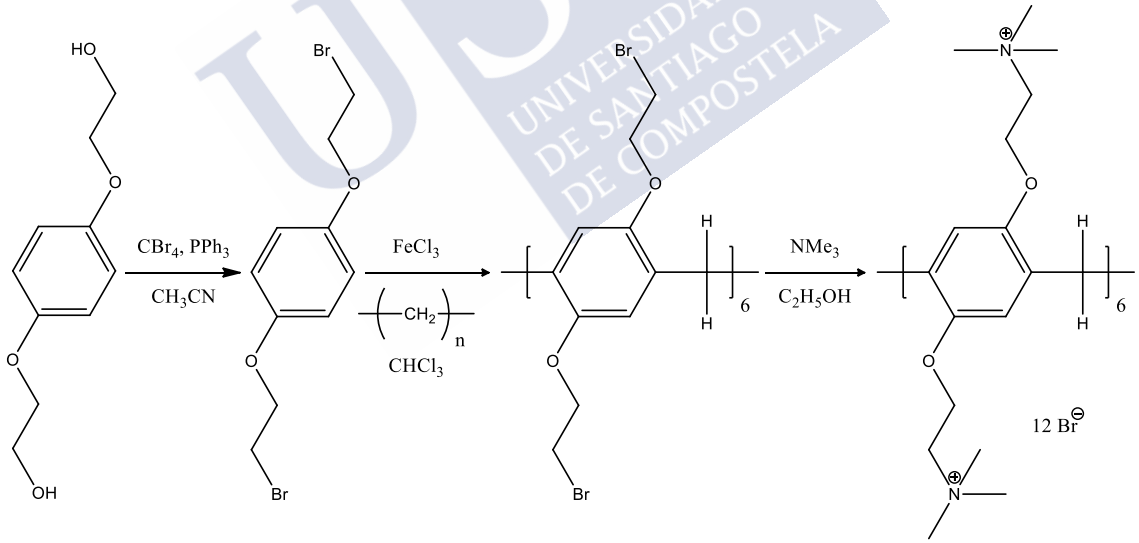
Todos los reactivos y disolventes utilizados en este trabajo fueron obtenidos comercialmente siendo en todos los casos de la máxima pureza disponible a excepción del P5TMA y P6TMA.

Preparación de reactivos y compuestos: La ruta sintética seleccionada para la obtención del bromuro de bis[(trimetilamonio)etoxi]pilar[5]areno (P5TMA) se muestra en el esquema 3. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich siendo de la mayor pureza disponible, de forma que se utilizan sin purificación adicional. La metodología y la caracterización detallada se muestran en el apéndice 3.5.1 del capítulo 3.



Esquema 2. Ruta sintética seleccionada para la elaboración de P5TMA.

La ruta sintética seleccionada para la obtención del bromuro de bis[(trimetilamonio)etoxi]pilar[6]areno (P6TMA) se muestra en el esquema 3. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich siendo de la mayor pureza disponible, de forma que se utilizan sin purificación adicional. La metodología y la caracterización detallada se muestran en el apéndice 3.5.2 del capítulo 3.



Esquema 3. Ruta sintética seleccionada para la elaboración de P6TMA.

Espectroscopía UV-Vis. El seguimiento cinético se realiza en un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped-flow) de la marca Applied Photophysics (modelo SX-17) que permite realizar mezclas de dos disoluciones en una celda espectrofotométrica que cuenta con un sistema de termostatización mediante agua que permite manter la temperatura constante en 25.0 ± 0.1 ºC. Las trazas cinéticas son medidas a 450 nm.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.3.1 Estudio cinético de la reacción de 1,3,5-trinitrobenceno (TNB) con NaOH.

La reacción estudiada (esquema 1) es un proceso muy rápido ya que tiene lugar en segundos por lo que, es necesario realizar el estudio bajo la metodología de espectrofotometría de flujo detenido. Los experimentos se realizaron preparando muestras de concentración constante de TNB 4.72 x 10^{-5} M y variación de concentración de NaOH si bien, en todos los casos del estudio se mantuvieron condiciones experimentales de pseudoprimer orden en los que, la concentración de NaOH es siempre mucho más alta que la concentración de TBN. El ajuste de las cinéticas conduce a los resultados mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Constantes calculadas (k_{obs}) para cada una de las condiciones experimentales propuestas en la reacción de TBN con NaOH.

[TNB] / M	[NaOH] / M	k_{obs} / s^{-1}
4.72 x 10^{-5}	0.100	15.93
4.72 x 10^{-5}	0.200	18.22
4.72 x 10^{-5}	0.301	20.53
4.72 x 10^{-5}	0.403	25.42
4.72 x 10^{-5}	0.532	33.06
4.72 x 10^{-5}	0.607	37.71

En la figura 2 se muestra la influencia de la concentración de NaOH en la constante de velocidad de pseudoprimerorden (k_{obs}), bajo las condiciones experimentales se puede emplear la ecuación 1 para determinar el valor de las constantes k_1 y k_{-1}. Además, mediante el cociente de estas constantes es posible determinar la constante de equilibrio del proceso tal y como indica la ecuación 2.

$$k_{obs} = k_1[NaOH] + k_{-1} \quad (1)$$

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (2)$$

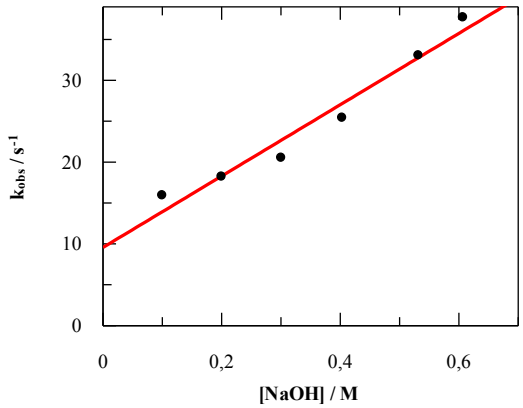


Figura 2. Influencia de la concentración de NaOH sobre la constante de velocidad k_{obs} y ajuste a la ecuación 1 en color rojo.

A partir de la pendiente obtenida se determina la constante k_1 cuyo valor es 43.6 ± 4.3 $M^{-1}s^{-1}$ mientras que, el valor de la ordena en el origen permite calcular el valor de k_{-1} siendo este de 9.55 ± 1.75 s^{-1}. La aplicación de la ecuación 2 permite calcular la constante de equilibrio del proceso obteniéndose un valor de 4.56 ± 0.27 M^{-1}. Los resultados obtenidos son compatibles con los valores cinéticos obtenidos por el grupo de Bernasconi para el TBN y estructuras similares en diferentes condiciones [18].

Para completar el estudio de esta reacción se decide evaluar la influencia de la fuerza iónica, para ello se realiza un experimento homologo al anterior manteniendo la fuerza iónica constante a 1M con NaCl. Las muestras se preparan igualmente con una concentración constante de TNB de 4.72 x 10^{-5} M y variación de concentración de NaOH, las condiciones experimentales siguen concordando con un proceso de pseudoprimerorden. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del ajuste de las cinéticas.

Tabla 2. Constantes calculadas (k_{obs}) para cada una de las condiciones experimentales propuestas en la reacción de TBN con NaOH manteniendo la fuerza iónica en 1M.

[TNB]/M	[NaOH] / M	k_{obs} / s^{-1}
4.72 x 10^{-5}	0.090	13.41
4.72 x 10^{-5}	0.200	15.76
4.72 x 10^{-5}	0.300	17.98
4.72 x 10^{-5}	0.400	22.48
4.72 x 10^{-5}	0.500	30.57
4.72 x 10^{-5}	0.670	42.83

En la figura 3 se muestra la influencia de la concentración de NaOH en la constante de velocidad (k_{obs}), bajo las condiciones experimentales se puede emplear la ecuación 1 para determinar el valor de las constantes k_1 y k_{-1}. Además, mediante el cociente de estas constantes es posible determinar la constante de equilibrio del proceso tal y como indica la ecuación 2.

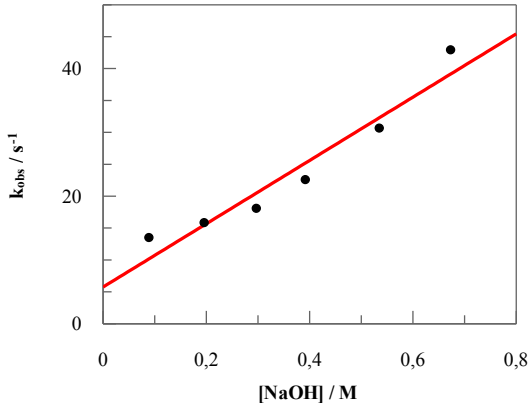


Figura 3. Influencia de la concentración de NaOH sobre la constante de velocidad k_{obs} y ajuste a la ecuación 1 en color rojo.

A partir de la pendiente obtenida se determina la constante k_1 cuyo valor es 40.0 ± 6.6 $M^{-1}s^{-1}$ mientras que, el valor de la ordena en el origen permite calcular el valor de k_{-1} siendo este de 8.40 ± 1.86 s^{-1}. La aplicación de la ecuación 2 permite calcular la constante de equilibrio del proceso obteniéndose un valor de 4.76 ± 0.38 M^{-1}. Los resultados obtenidos son compatibles con los valores cinéticos obtenidos por el grupo de Bernasconi para el TBN y estructuras similares en diferentes condiciones [18]. Tal y como puede observarse, el valor de la constante de equilibrio del sistema no parece estar afectado por la fuerza iónica del medio ya que las constantes obtenidas son compatibles.

5.3.2 Estudio cinético de la reacción de 1,3,5-trinitrobenceno (TNB) con NaOH en presencia de pilar[n]arenos.

A continuación, se ha estudiado el mismo proceso en presencia de P5TMA ya que, tal y como se ha determinado anteriormente es un receptor que presenta gran afinidad con diferentes aniones. La posibilidad de estabilizar un intermedio de reacción abriría una importante vía de investigación ya que, se trata de un proceso muy complejo del que apenas existen ejemplos en la bibliografía. Como ejemplo se muestra el estudio del sistema con una concentración de P5TMA de 1.00 x 10^{-3} M en el que se mantienen las condiciones indicadas en el apartado 5.3.1 de este capítulo, ante los resultados obtenidos con el estudio de la influencia de la fuerza iónica se decide no mantenerla constante para así, evitar cualquier tipo de influencia sobre el P5TMA. Los resultados obtenidos en el análisis de las trazas cinéticas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Constantes calculadas (k_{obs}) para cada una de las condiciones experimentales propuestas en la reacción de TBN con NaOH en presencia de P5TMA.

[P5TMA] / M	[TNB] / M	[NaOH] / M	k_{obs} / s^{-1}
1.00×10^{-3}	4.72×10^{-5}	0.025	4.213
1.00×10^{-3}	4.72×10^{-5}	0.075	6.674
1.00×10^{-3}	4.72×10^{-5}	0.010	3.559
1.00×10^{-3}	4.72×10^{-5}	0.050	5.813
1.00×10^{-3}	4.72×10^{-5}	0.100	7.682
1.00×10^{-3}	4.72×10^{-5}	0.200	10.91
1.00×10^{-3}	4.72×10^{-5}	0.300	18.11
1.00×10^{-3}	4.72×10^{-5}	0.400	24.86
1.00×10^{-3}	4.72×10^{-5}	0.560	34.99

En la figura 4 se muestra la influencia de la concentración de NaOH en la constante de velocidad (k_{obs}), bajo las condiciones experimentales se puede emplear la ecuación 1 para determinar el valor de las constantes k_1 y k_{-1}. Además, mediante el cociente de estas constantes es posible determinar la constante de equilibrio del proceso tal y como indica la ecuación 2.

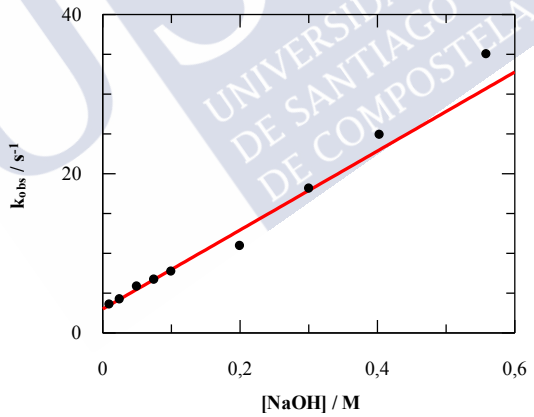


Figura 4. Influencia de la concentración de NaOH sobre la constante de velocidad k_{obs} en presencia de P5TMA y ajuste a la ecuación 1 en color rojo.

A partir de la pendiente obtenida se determina la constante k_1 cuyo valor es 49.6 ± 2.9 $M^{-1}s^{-1}$ mientras que, el valor de la ordena en el origen permite calcular el valor de k_{-1} siendo este de 2.99 ± 0.24 s^{-1}. La aplicación de la ecuación 2 permite calcular la constante de equilibrio del proceso obteniéndose un valor de 16.60 ± 0.12 M^{-1}. Comparando los resultados obtenidos sin y con presencia de P5TMA podemos concluir que la constante k_1 prácticamente se mantiene invariable (la constante sin P5TMA en el medio es de 43.9 ± 4.3 $M^{-1}s^{-1}$ frente al valor de 49.6 ± 2.9 $M^{-1}s^{-1}$) por lo que el proceso de formación del complejo de Meisenheimer es idéntico bajo ambas condiciones. Sin embargo, la constante k_{-1} varía notablemente, mientras que sin presencia de P5TMA tiene un valor de 9.55 ± 1.75 s^{-1}, con P5TMA en el

medio el valor es de 2.99 ± 0.24 s^{-1}; la constante, por tanto, disminuye en un factor de aproximadamente 3. Este cambio, es debido a la inclusión del complejo de Meisenheimer dentro de la cavidad del macrociclo, dado que las condiciones electrónicas de la cavidad permitirían la estabilización del intermedio. Por último, la constante de equilibrio aumenta en un factor de aproximadamente 3.7 con respecto al experimento con ausencia de P5TMA en el medio confirmando la estabilización del complejo de Meisenheimer dentro de la cavidad.

Para evaluar la influencia del tamaño de la cavidad, al igual que en otros experimentos presentes en esta tesis doctoral, se seleccionó el P6TMA como receptor cuyo tamaño de cavidad es de (≈ 7.5 Å) frente al P5TMA del estudio (≈ 5.0 Å) [19]. Como ejemplo se muestra el estudio del sistema con una concentración de P6TMA de 1.00 x 10^{-3} M en el que se mantienen las condiciones indicadas en el estudio anterior. Los resultados obtenidos en el análisis de las trazas cinéticas se muestran en la tabla 4 (en el apéndice 5.5.1 se muestran algunas de las trazas cinéticas obtenidas).

Tabla 4. Constantes calculadas (k_{obs}) para cada una de las condiciones experimentales propuestas en la reacción de TBN con NaOH en presencia de P6TMA.

[P6TMA] / M^{-1}	[TNB] / M	[NaOH] / M	k_{obs} / s^{-1}
1.00 x 10^{-3}	4.72 x 10^{-5}	0.01	2.74
1.00 x 10^{-3}	4.72 x 10^{-5}	0.075	5.60
1.00 x 10^{-3}	4.72 x 10^{-5}	0.30	19.02
1.00 x 10^{-3}	4.72 x 10^{-5}	0.60	36.71

En la figura 5 se muestra la influencia de la concentración de NaOH en la constante de velocidad (k_{obs}), bajo las condiciones experimentales se puede emplear la ecuación 1 para determinar el valor de las constantes k_1 y k_{-1}. Además, mediante el cociente de estas constantes es posible determinar la constante de equilibrio del proceso tal y como indica la ecuación 2.

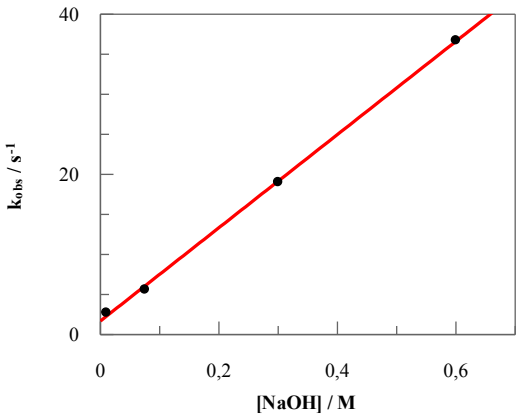


Figura 5. Influencia de la concentración de NaOH sobre la constante de velocidad k_{obs} en presencia de P5TMA y ajuste a la ecuación 1 en color rojo.

A partir de la pendiente obtenida se determina la constante k_1 cuyo valor es 58.2 ± 1.0 $M^{-1}s^{-1}$ mientras que, el valor de la ordena en el origen permite calcular el valor de k_{-1} siendo este de 1.69 ± 0.35 s^{-1}. La aplicación de la ecuación 2 permite calcular la constante de equilibrio del proceso obteniéndose un valor de 34.91 ± 0.03 M^{-1}. Comparando los resultados obtenidos sin y con presencia de P6TMA podemos concluir que la constante k_1 aumenta ligeramente con respecto al estudio sin y con P5TMA en el medio (la constante sin P5TMA en el medio es de 43.9 ± 4.3 $M^{-1}s^{-1}$ y la constante con P5TMA es de 49.6 ± 2.9 $M^{-1}s^{-1}$).De forma análoga al estudio con P5TMA, la constante k_{-1} varía notablemente, mientras que sin presencia de P5TMA tiene un valor de 9.55 ± 1.75 s^{-1}, con P6TMA en el medio el valor es de 1.69 ± 0.35 s^{-1}; la constante por tanto, disminuye en un factor de aproximadamente 6 (frente al cambio de con P5TMA de un factor de 3). Por último, la constante de equilibrio aumenta en un factor de aproximadamente 8 con respecto al experimento con ausencia de macrociclos en el medio y, un cambio de un factor 3.7 a 8 según el macrociclo cuente con cinco o seis unidades, respectivamente. Estos resultados confirman la estabilización del complejo de Meisenheimer de estudio dentro de la cavidad de los pilararenos siendo este efecto mucho más importante con P6TMA que con P5TMA.

5.4 CONCLUSIONES.

En este capítulo se ha estudiado la formación de un complejo de Meisenheimer mediante la reacción entre TNB y NaOH en diferentes condiciones. Se ha determinado las constantes de velocidad asociadas al proceso, así como las constantes de equilibrio sin fijar la fuerza iónica: k_1 = 43.6 ± 4.3 $M^{-1}s^{-1}$, k_{-1} = 9.55 ± 1.75 s^{-1} y K = 4.56 ± 0.27 M^{-1}. Se ha determinado las constantes de velocidad asociadas al proceso, así como las constantes de equilibrio fijando la fuerza iónica: k_1 = 40.0 ± 6.6 $M^{-1}s^{-1}$, k_{-1} = 8.40 ± 1.86 s^{-1} y K = 4.76 ± 0.38 M^{-1}.

El mismo proceso se ha estudiado con presencia de P5TMA en el medio determinándose las siguiente constantes k_1 = 49.6 ± 2.9 $M^{-1}s^{-1}$, k_{-1} = 2.99 ± 0.24 s^{-1} y K = 16.60 ± 0.12 M^{-1}. Se obtiene una estabilización del complejo de Meisenheimer de un factor de 3.7 con respecto al experimento sin P5TMA. El estudio de estabilización con P6TMA conduce a las siguientes constantes: k_1 = 58.2 ± 1.0 $M^{-1}s^{-1}$, k_{-1} = 1.69 ± 0.35 s^{-1} y K = 34.91 ± 0.03 M^{-1}. Se obtiene una estabilización del complejo de Meisenheimer de un factor de 8con respecto al experimento sin P5TMA.

Se confirma la capacidad de estabilización de intermedios de reacción por parte de los pilararenos siendo este, uno de los pocos ejemplos existentes de estabilización de intermedios de reacción con el uso de macrociclos convencionales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.5 APÉNDICES.

5.5.1 Ajuste cinéticas con presencia de P6TMA en el medio.

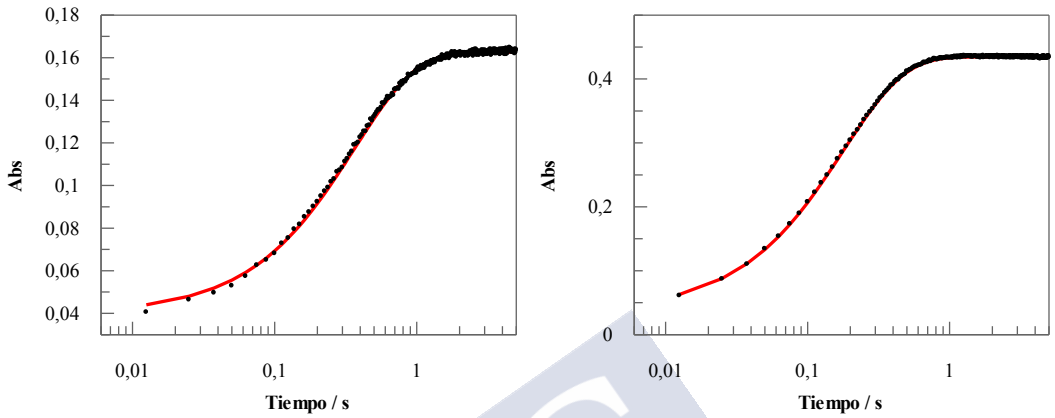


Figura 1A. (Derecha) Perfil cinético medido a 450 nm de una muestra de [P6TMA] = 1.00 x 10^{-3}M, [TBN] = 4.72 x 10^{-5}M y [NaOH] = 0.01M. (Izquierda) Perfil cinético medido a 450 nm de una muestra de [P6TMA] = 1.00 x 10^{-3}M, [TBN] = 4.72 x 10^{-5}M y [NaOH] = 0.075M.

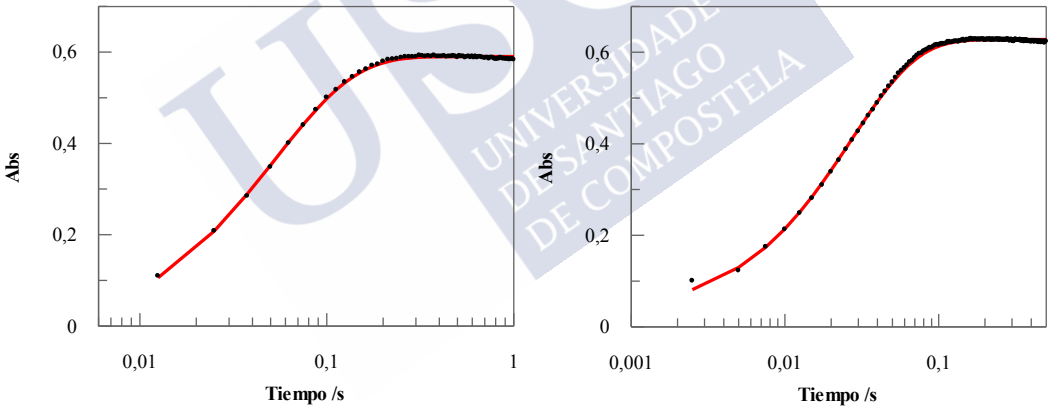


Figura 2A. (Derecha) Perfil cinético medido a 450 nm de una muestra de [P6TMA] = 1.00 x 10^{-3}M, [TBN] = 4.72 x 10^{-5}M y [NaOH] = 0.3M. (Izquierda) Perfil cinético medido a 450 nm de una muestra de [P6TMA] = 1.00 x 10^{-3}M, [TBN] = 4.72 x 10^{-5}M y [NaOH] = 0.6M.

5.6 BIBLIOGRAFÍA.

(1) Lou, Z.; Cui, Y.; Yang, M.; Chen, J. The Mechanism of 2,4,6-Trinitrotoluene Detection with Amino Acid-Capped Quantum Dots: A Density Functional Theory Study. *RSC Adv.* **2015**, *5* (60), 48406–48412. DOI: 10.1039/c5ra07088k.

(2) Olah, G. A.; Mayr, H. Meisenheimer Complexes and Their Charge Distribution Pattern. *J. Org. Chem.*,**1976**, *41* (21), 3448–3451. DOI: 10.1021/jo00883a028.

(3) Strauss, M. J. Anionic Sigma Complexes. *Chem. Rev.* **1970**, *70* (6), 667–712. DOI: 10.1021/cr60268a003.

(4) Buncel, E.; Norris, A. R.; Russell, K. E. The Interaction of Aromatic Nitro-Compounds with Bases. *Q. Rev. Chem. Soc.* **1968**, *22* (2), 123–146. DOI: 10.1039/qr9682200123.

(5) Campodónico, P. R.; Olivares, B.; Tapia, R. A. Experimental Analyses Emphasize the Stability of the Meisenheimer Complex in a SNAr Reaction Toward Trends in Reaction Pathways. *Front. Chem.* **2020**, *8* (July), 1–9. DOI: 10.3389/fchem.2020.00583.

(6) Błaziak, K.; Danikiewicz, W.; Mąkosza, M. How Do Aromatic Nitro Compounds React with Nucleophiles? Theoretical Description Using Aromaticity, Nucleophilicity and Electrophilicity Indices. *Molecules* **2020**, *25* (20). DOI: 10.3390/molecules25204819.

(7) Ormozábal-Toledo, R.; Richter, S.; Robles-Navarro, A.; Maulén, B.; Matute, R. A.; Gallardo-Fuentes, S. Meisenheimer Complexes as Hidden Intermediates in the aza-SNAr Mechanism. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 4238-4247. DOI: 10.1039/D0OB00600A.

(8) Zhou, Y.; Yang, Z.; Wei, T.; Gu, L.; Zhu, Y. A Density Functional Theory Study toward Ring-Opening Reaction Mechanisms of 2,4,6-Trinitrotoluene's Meisenheimer Complex for the Biodegradation of Old Yellow Enzyme Flavoprotein Reductase. *ACS Omega* **2020**, *5* (37), 23613–23620. DOI: 10.1021/acsomega.0c02162.

(9) Sharma, N.; Biswas, R.; Lourderaj, U. Dynamics of a Gas-Phase SNAr Reaction: Non-Concerted Mechanism despite the Meisenheimer Complex Being a Transition State. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22* (45), 26562–26567. DOI: 10.1039/d0cp05567k.

(10) Hughes, S.; Dasary, S. S. R.; Begum, S.; Williams, N.; Yu, H. Meisenheimer Complex between 2,4,6-Trinitrotoluene and 3-Aminopropyltriethoxysilane and Its Use for a Paper-Based Sensor. *Sens. Bio-Sensing Res.* **2015**, *5*, 37–41. DOI: 10.1016/j.sbsr.2015.06.003.

(11) Pablos, J. L.; Vallejos, S.; Muñoz, A.; Rojo, M. J.; Serna, F.; García, F. C.; García, J. M. Solid Polymer Substrates and Coated Fibers Containing 2,4,6-Trinitrobenzene Motifs as Smart Labels for the Visual Detection of Biogenic Amine Vapors. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21* (24), 8733–8736. DOI: 10.1002/chem.201501365.

(12) Mohar, M. A Metallogel Based on a Zwitterionic Spirocyclic Meisenheimer Complex: Sensing of Fluoride Ions in Water and Moisture Content in Organic Solvents. *ChemistrySelect* **2019**, *4* (18), 5308–5314. DOI: 10.1002/slct.201900939.

(13) Gold, B. V. Gold and Rochester : Reactions of Aromatic Nitro-compounds in Alkaline Media. Part II. The Interaction of 1,3,5- Trinitrobenxene and Methanolic Xodiurn Methoxide. *J. Chem. Soc*.,**1964**, *111*, 1692-1697. DOI: 10.1039/JR9640001692.

(14) Crampton, M. R.; Gold, V. Reactions of Aromatic Nitro-compouns in Alkaline Media. Part XI. Structural Investigations by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Chem. Soc. B*. **1966**, 893-900. DOI: 10.1039/J296600000893.

(15) Buncel, E.; Symons, A. Hydrogen Exchange in S-Trinitrobenzene. Canadian Journal of Chemistry **1965**, *44* (23), 111–114. DOI: 10.1139/v66-110.

(16) Servis, K. L. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Meisenheimer Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (6), 1508–1514. DOI: 10.1021/ja00982a039.

(17) Bernasconi, C. F. Intermediates in Nucleophilic Aromatic Substitution. II. Temperature-Jump Study of the Interation in 10%Dioxane-90%Water. Concurrent Nucleophilic Attack on the Aromatic Carbon and on the Nitro Group? J. Am. Chem. Soc. 1970, 92 (1), 129-137. DOI: 10.1021/ja00744a021.

(18) Bacaloglu, R.; Bunton, C. A.; Cerichelli, G. Intermediates in Nucleophilic Aromatic Substitution. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (2), 621–623. DOI: 10.1021/ja00236a072.

(19) Cao, D.; Kou, Y.; Liang, J.; Chen, Z.; Wang, L.; Meier, H. A Facile and Efficient Preparation of Pillararenes and a Pillarquinone. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48* (51), 9721–9723. DOI: 10.1002/anie.200904765.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 6

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 6: FORMACIÓN DE [2]ROTAXANOS ENTRE P5TMA Y DIÁCIDOS LINEALES DE DIFERENTE LONGITUD DE CADENA.

6.1 INTRODUCCIÓN.

La química supramolecular se caracteriza por el reconocimiento molecular direccional, específico y reversible; esta característica ha propiciado un rápido desarrollo de procesos en numerosos campos basados en este tipo de química [1–5]. En particular, la formación de arquitecturas moleculares mecánicamente enlazadas (conocidas como MIMs [6]) ha despertado un especial interés [7–9]. Este tipo de estructuras [10–12] están formadas por dos o más componentes que se encuentran unidas mecánicamente, un ejemplo de MIMs son los rotaxanos y pseudorotaxanos formados por un macrociclo y una molécula huésped. Uno de los macrociclos que da lugar a la formación de este tipo de estructuras son los pilararenos, su cavidad rica en electrones π le confieren una gran capacidad para formar este tipo de estructuras. La formación de complejos de inclusión basados en pilararenos son sistemas reversibles y fácilmente adaptables que permiten una gran aplicabilidad [13,14].

Los rotaxanos, una de las estructuras que se clasifica como MIMs, están formados por un macrociclo (un pilarareno, en este caso) y un eje que consta de grupos voluminosos al final de su estructura; ambas moléculas se encuentran unidas mediante interacciones no covalentes (Fig 1). En la bibliografía se encuentran numerosos métodos de construcción de rotaxanos mediante el uso de pilararenos si bien, los más importantes son: pilararenos como macrociclos, pilararenos como macrociclos y ejes y, por último, pilararenos que actúan como moléculas de unión en la formación de dendrímeros y polímeros. Generalmente la formación de rotaxanos implica una segunda reacción para situar grupos voluminosos al final del eje impidiendo así que la formación del rotaxano sea reversible, la reacción de ``click´´, las esterificaciones o amidaciones son las más utilizadas para la formación del primer tipo de rotaxanos [15].

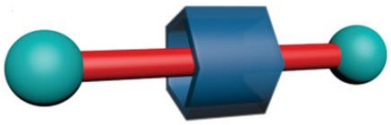


Figura 1. Estructura de un rotaxano formado por un pilarareno y un eje.

Un ejemplo de formación de rotaxanos es el estudio de la influencia de la longitud del eje sobre el movimiento del pilarareno realizado por el grupo de Ogoshi, de forma contraria a lo esperado los resultados revelaron que la longitud del eje no es un parámetro que influya en el movimiento del pilarareno sobre el eje, según este estudio este movimiento depende de la polaridad del disolvente utilizado. Dos de los rotaxanos sintetizados para este estudio se muestran en la figura 2 [16]. Otro ejemplo de rotaxano basado en pilarareno fue diseñado por el

grupo de Nierengaten al sintetizar un sistema fotoactivo mediante la modificación de un pilar[5]areno con futboleno (C60). El C60 actúa como aceptor mientras que los grupos porfirina del eje actúan como dadores, es decir, la emisión de los grupos porfirinas es especificamente desactivada por C60 generándose así, un rotaxano basado en pilararenos que constituye un nuevo ejemplo de máquina molecular. La estructura del rotaxano formado se muestra en la figura 3 [17].

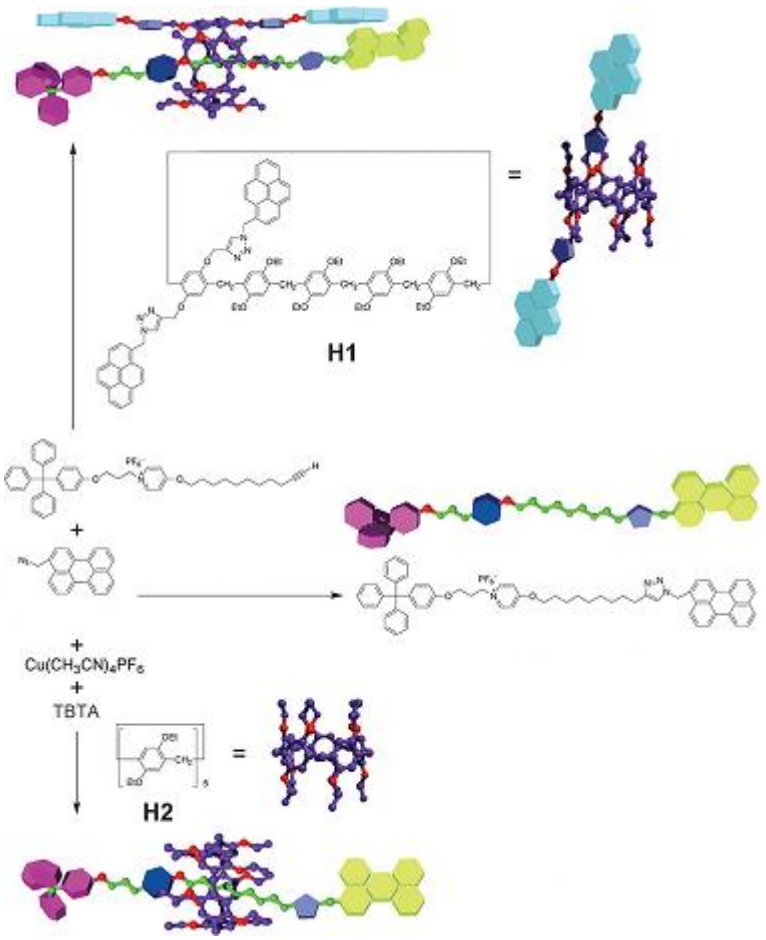


Figura 2. Síntesis de dos [2]rotaxanos mediante el uso de dos macrociclos diferentes (H1 y H2). Reproducido con permiso de referencia 16.

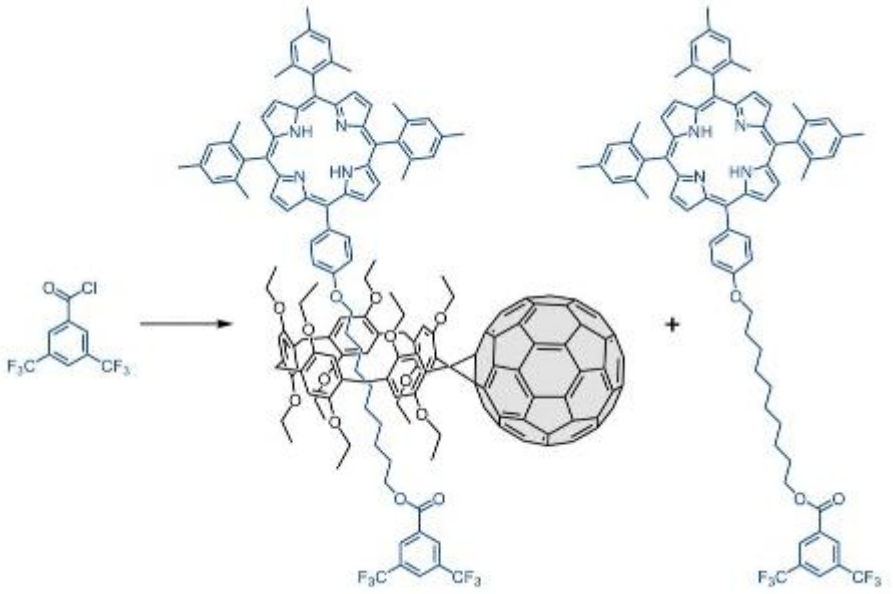


Figura 3. Síntesis de rotaxano haciendo uso de un pilar[5]areno modificado con C60. Reproducido con permiso de referencia 17.

Los pseudorotaxanos son un tipo de complejo supramolecular que se diferencia de los rotaxanos en el tipo de eje, para la formación de pseudorotaxanos es necesario que el eje no contenga grupos voluminosos al final de su estructura. La construcción de pseudorotaxanos con pilararenos se puede clasificar en dos tipos, aquellos en los que el pilarareno actúa sólo como macrociclo y, un segundo grupo donde además el eje forma parte de la estructura del pilarareno [15]. El grupo de Lin estudió la formación de pseudorotaxanos entre un pilar[5]areno funcionalizado con grupos etilo y diferentes derivados de biscarbamato de dibencil tetrametileno [18], las estructuras formadas se pueden observar en la figura 4. Otro ejemplo de este tipo de pseudorotaxanos fue estudiado por el grupo de Yao entre un pilar[5]areno monofuncionalizado con un grupo etilenglicol y 1,2-bis(imidazol)etano a través de la formación de interacciones del tipo C-H···π y enlace de hidrógeno [19]. En 2016, el grupo de Wang y colaboradores estudia la estabilidad de [1]pseudorotaxanos con dipilar[5]arenos comprobando que la longitud de la cadena juega un papel crucial en la formación y estabilidad de este tipo de estructuras [20,21], un ejemplo de la síntesis de [1]pseudorotaxanos se muestra en la figura 5. Recientemente, el grupo de Hu y colaboradores han obtenido psudorotaxanos usando un pilar[5]areno monofuncionalizado con biotina [22] que permite estudiar su actividad biológica en medio acuoso.

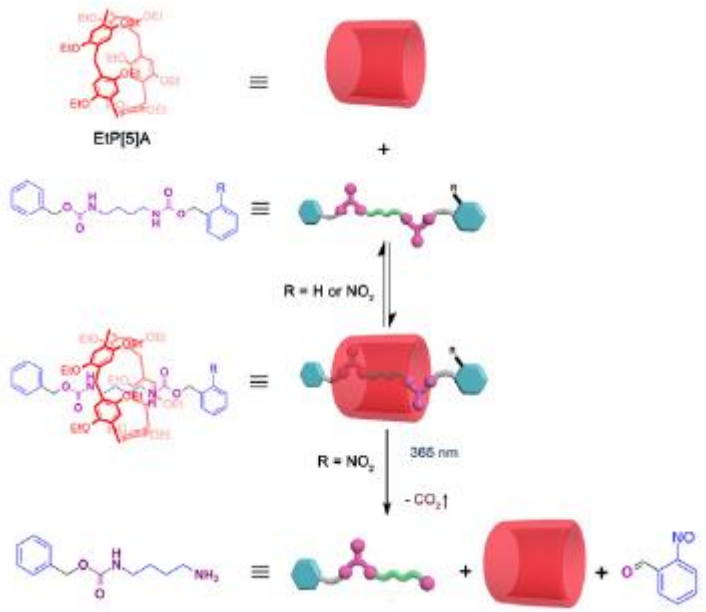


Figura 4. Síntesis de rotaxano haciendo uso de un pilar[5]areno(EtP[5]A) con dos ejes diferentes. Reproducido con permiso de referencia 18.

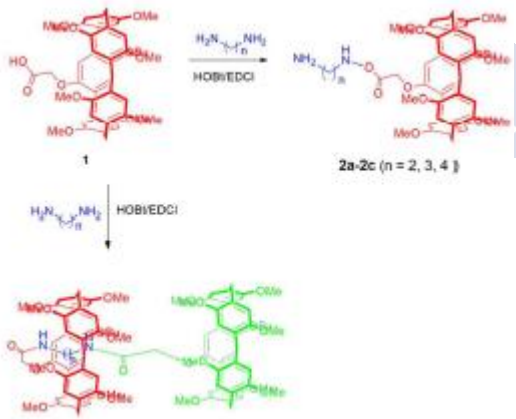
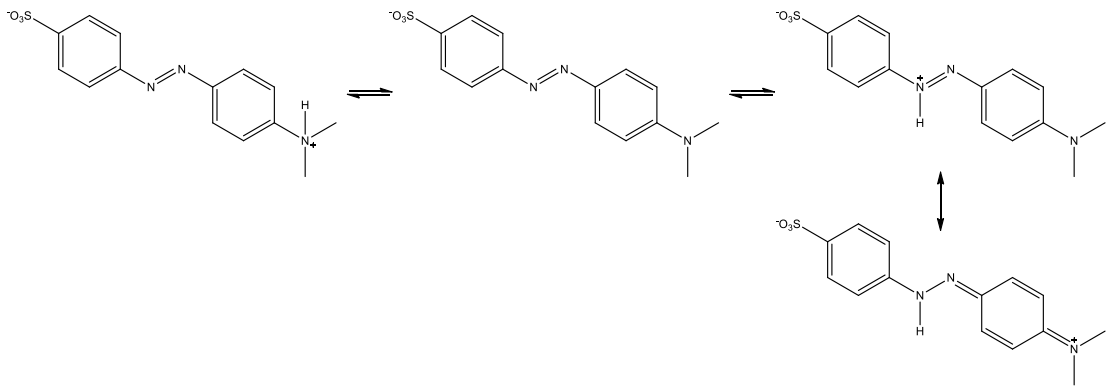


Figura 5. Síntesis de [1]pseudorotaxano con pilar[5]areno modificado. Reproducido con permiso de referencia 20.

En este capítulo se ha estudiado la formación de pseudorotaxanos entre el P5TMA y diferentes diácidos carboxilicos con diferente longitud de cadena, al tratarse de huéspedes que no presentan cambios en sus propiedades en espectroscopía UV-vis al incluirse dentro de la cavidad del macrociclo es necesario realizar un experimento competitivo usando una sonda, el naranja de metilo (MO). El naranja de metilo es un colorante azoico que presenta una gran sensibilidad a la polaridad y pH del medio, en el esquema 1 se presentan todas las especies que se forman en medio acuoso [23,24]. El MO sufre una hidrólisis en medio ácido dada la presencia del grupo para-dimetilamino capaz de activar el grupo azo; en medio ácido el MO protona el grupo dimetilamino (formando el ión amonio) o el grupo azo (formando el ión azonio) [25]. El espectro de absorción y emisión es distinto para cada una de las especies lo que hace que el MO sea considerado como una de las sondas más útiles en el estudio de formación de agregados moleculares [26–28] y complejos de inclusión [29–31].

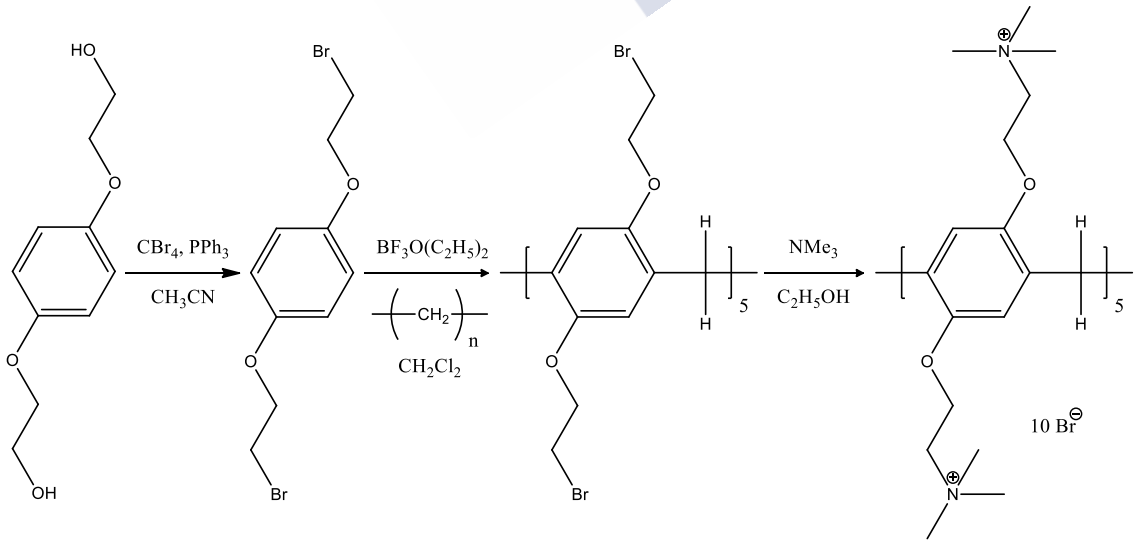


Esquema 1. Especies formadas por la protonación del MO.

6.2 MÉTODO EXPERIMENTAL.

Todos los reactivos y disolventes utilizados en este trabajo fueron obtenidos comercialmente siendo en todos los casos de la máxima pureza disponible a excepción del P5TMA.

Preparación de reactivos y compuestos: La ruta sintética seleccionada para la obtención del bromuro de bis[(trimetilamonio)etoxi]pilar[5]areno (P5TMA) se muestra en el esquema 3. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich siendo de la mayor pureza disponible, de forma que se utilizan sin purificación adicional. La metodología y la caracterización detallada se muestran en el apéndice 3.5.1 del capítulo 3.



Esquema 2. Ruta sintética seleccionada para la elaboración de P5TMA.

Espectroscopía RMN. Los experimentos se realizan en un espectrofotómetro Bruker NEO-750 equipado con sonda HCN y gradiente PFG para el uso de tubos convencionales de 5 mm, los espectros se toman a una temperatura constante de 25ºC.

Espectroscopía UV-Vis. Los espectros de absorción se registran en un espectofotómetro Cary 500 equipado con soporte de celda termostatizado mediante flujo de agua. El seguimiento cinético se realiza en un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped-flow) de la marca Applied Photophysics (modelo SX-17) que permite realizar mezclas de dos disoluciones en una celda espectrofotométrica que cuenta con un sistema de termostatización mediante agua que permite manter la temperatura constante en 25.0 ± 0.1 ºC. Las trazas cinéticas son medidas a 420 nm para el naranja de metilo. Para el ajuste de los datos experimentales se ha utilizado el *software* comercial *Dynafit* utilizando los modelos mencionados posteriormente.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.3.1 Formación de complejo de inclusión entre MO y P5TMA.

Teniendo en cuenta la alta afinidad del P5TMA hacia aniones pequeños, moléculas orgánicas pequeñas y moléculas lineales iónicas, en este capítulo se decide abordar la formación de complejos de inclusión entre P5TMA y diácidos carboxilicos de diferente longitud de cadena. Al igual que en el capítulo 3, el estudio de este tipo de sistemas requiere utilizar como metodología un experimento competitivo ya que, este tipo de molécula no presentan cambios medibles mediante espectroscopía UV-vis.

En este capítulo se ha seleccionado como sonda el naranja de metilo (MO) ya que la formación de las distintas especies, tal y como se comenta en la introducción de este capítulo, permite identificar los cambios de polaridad y pH del medio. Con este motivo, el primer experimento que se realiza es la caracterización del MO (puro y en presencia de P5TMA) en medio neutro, ácido y básico (Fig 6). Los espectros de absorción se realizan manteniendo constante la concentración de MO en 5.00×10^{-4} M en todos los casos.

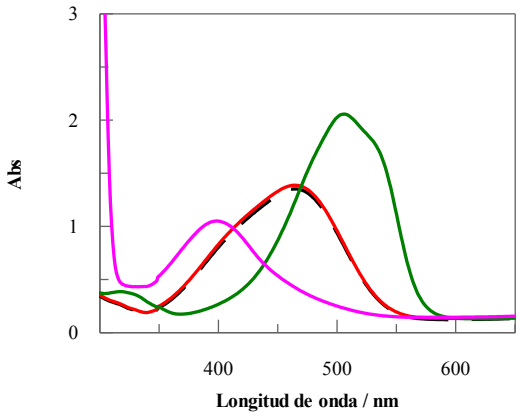


Figura 6. Espectros de absorción de 5.00 x 10^{-4} M de MO a 25.0 ºC en: (- -) medio neutro, H_20; (—) medio básico, 2.00 mM de NaOH; (—) medio ácido, 2.00 mM de HCl y (—) 5.00 x 10^{-4}M de P5TMA.

A continuación, se realizó la influencia de P5TMA sobre el espectro UV-vis del MO manteniendo la concentración de la sonda constante en 5.00 x 10^{-5}M. Tal y como se puede observar en la figura 3, se produce un desplazamiento de la banda hacia menores longitudes de onda a medida que aumenta la concentración de P5TMA en el medio, este comportamiento es compatible con el cambio de polaridad que sufre MO al introducirse dentro de la cavidad del macrociclo. Tomando los datos de absorbancia a 465 nm y planteando el modelo de complejación (1) se obtiene la constante de equilibrio entre el MO y el P5TMA (Fig 7). El ajuste del modelo se realiza con el software Dynafit iterando el valor de todos los parámetros obtenidos (constante de equilibrio entre MO y P5TMA, absortividad molar de MO libre y absortividad molar de MO encapsulado) hasta alcanzar una concordancia aceptable entre los valores obtenidos experimentalmente y, los resultantes del ajuste, la constante de equilibrio calculada es (1.05 ± 0.44) x 10^6 M^{-1}.

$$MO + P5TMA \underset{}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} MO{:}P5TMA$$

Modelo (1). Modelo de complejación entre MO y P5TMA dando lugar a un complejo de inclusión con estequiometría 1:1.

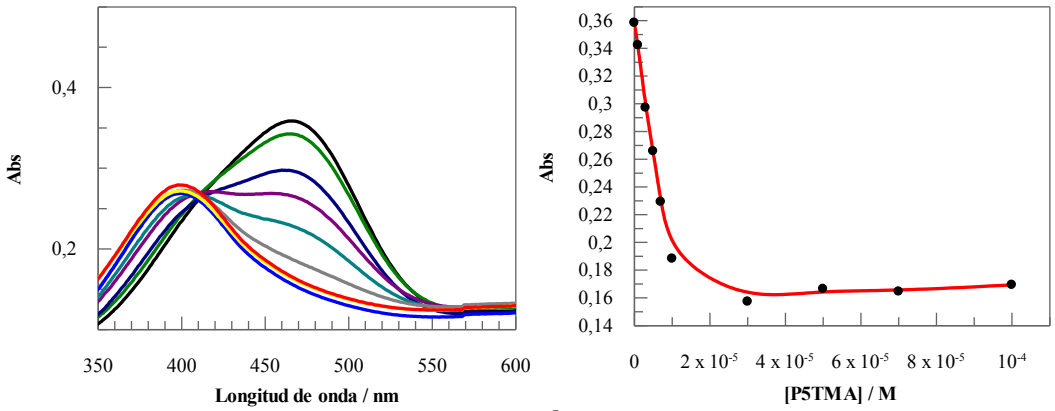


Figura 7. (Izquierda) Espectros de absorción de MO (5.00 x 10^{-5}M) y variación de MO: (—) 0.00 M, (—) 1.00 x 10^{-6} M, (—) 3.00 x 10^{-6} M, (—) 5.00 x 10^{-6} M, (—) 7.00 x 10^{-6} M, (—) 1.00 x 10^{-5} M, (—) 3.00 x 10^{-5} M, (—) 5.00 x 10^{-5} M y (—) 7.00 x 10^{-5} M (Derecha) Valores de absorción a 456 nm en negro y ajuste al modelo (1) representado en rojo.

Tras comprobar la posibilidad de formar un complejo de inclusión entre el MO y el P5TMA y, antes de utilizar este sistema para el estudio de nuevos huéspedes se decide testar el sistema con una molécula conocida ampliamente por el grupo de investigación, el *p*-toluensulfonato sódico (TSNa). En la realización de este experimento se estudió la influencia de la concentración de TSNa sobre el complejo P5TMA:MO (las concentraciones de MO y P5TMA se mantienen constantes siendo ambas de 5.00 x 10^{-5}M). Tal y como puede observarse en la figura 8, a medida que aumenta la concentración de TSNa en el medio se produce un desplazamiento de la banda hacia mayores longitudes de onda y un aumento de la absorbancia a 465 nm, este comportamiento es compatible con el desplazamiento del MO del interior de la cavidad al medio acuoso. El ajuste de los datos experimentales a un modelo (2) permite determinar la constante de equilibrio K_2 cuyo valor calculado es (8.50 ± 0.39) x 10^5 M, este resultado es compatible con los resultados obtenidos para el estudio de este sistema en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación. Cabe destacar, que el ajuste se ha realizado mediante el software Dynafit iterando el valor de la constante de equilibrio K_2 así como las absortividades molares relativas al MO en agua y MO dentro de la cavidad, obtenidos hasta alcanzar una concordancia aceptable entre los valores obtenidos experimentalmente y, los resultantes del ajuste. La constate de equilibrio K_1 se mantiene constante ya que ha sido calculada previamente.

$$MO + P5TMA \overset{K_1}{\rightleftharpoons} MO{:}P5TMA$$

$$P5TMA{:}\,MO + TSNa \overset{K_2}{\rightleftharpoons} MO{:}TSNa + MO$$

Modelo (2) Modelo de complejación competitiva entre MO, TSNa y P5TMA.

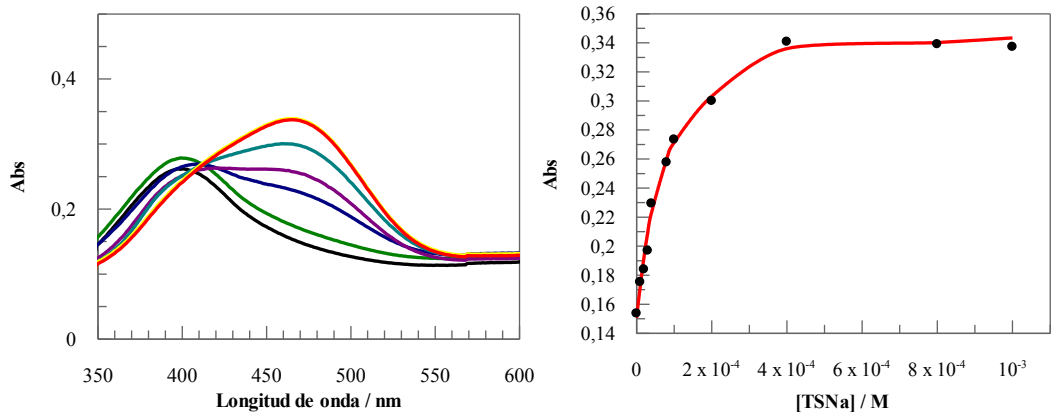
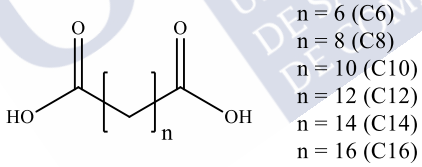


Figura 8. (Izquierda) Espectros de absorción de MO (5.00 x 10^{-5}M) y variación de MO: (—) 0.00 M, (—) 1.00 x 10^{-5} M, (—) 4.00 x 10^{-5} M, (—) 8.00 x 10^{-6} M, (—) 2.00 x 10^{-4} M, (—) 8.00 x 10^{-4} M y (—) 1.00 x 10^{-3} M (Derecha) Valores de absorción a 456 nm en negro y ajuste al modelo (2) representado en rojo.

6.3.2 Formación de complejo de inclusión entre P5TMA y diácidos carboxílicos.

Una vez verificada la posibilidad de utilizar el sistema P5TMA:MO en estudios competitivos y ante los buenos resultados obtenidos anteriormente con moléculas lineales (el 1-hexasulfonato sódico, capítulo 3) se decide ampliar el estudio a *guests* que cuenten con dos grupos aniónicos en su estructura, se selecciona por tanto la familia de los diácidos carboxilicos (Fig 9).



n = 4 (C4)
n = 6 (C6)
n = 8 (C8)
n = 10 (C10)
n = 12 (C12)
n = 14 (C14)
n = 16 (C16)
n = 18 (C18)

Figura 9. Estructura de los diácidos carboxilicos estudiados con la nomenclatura seleccionada.

El primer experimento planteado para estudiar la formación de estos nuevos complejos de inclusión fue un experimento competitivo homologo al realizado en el apartado anterior con el TSNa. Se prepararon muestras con concentración constante de MO y P5TMA (1.00 x 10^{-5} M para cada uno de ellos) a las que se adicionó concentraciones crecientes de diácidos (en la figura 10 se muestra el comportamiento para C10). Tal y como ocurría con el TSNa, se produce un desplazamiento de la banda del MO hacia mayores longitudes de onda aumentando la intensidad, a 465 nm, a medida que aumenta la concentración de C10 en el medio. En la figura 10 se muestra además el resultado del ajuste de los datos experimentales al modelo (2), en este caso el ajuste final no resulta satisfactorio. Ante la tendencia en la variación de intensidad registrada, es decir, toda la variación de la absorbancia tiene lugar antes del punto de equimolaridad, se decide repetir el mismo experimento aumentando la concentración de MO en el medio para así, intentar conseguir un cambio más paulatino que

permita el ajuste del sistema. Desafortunadamente aun aumentando la concentración de MO a 5.00 x 10^{-5}M y 1.00 x 10^{-4} M (manteniendo constante la concentración de P5TMA en 1.00 x 10^{-5}M) no fue posible ajustar el sistema de forma satisfactoria.

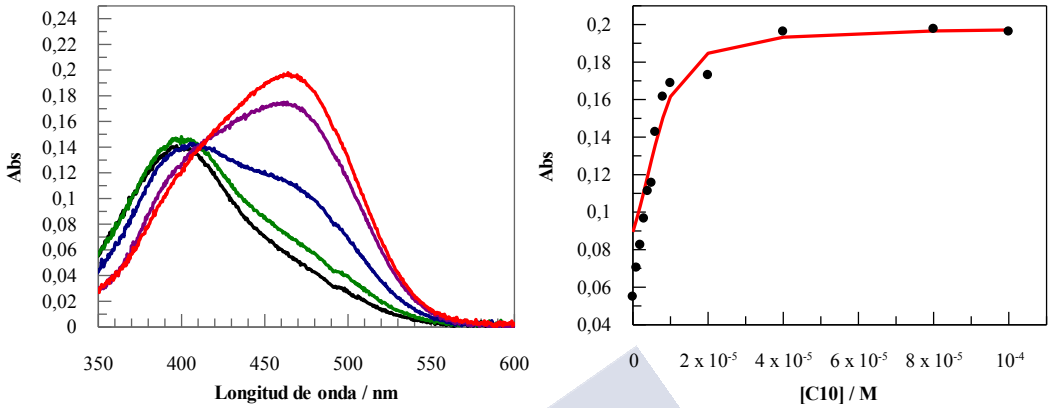


Figura 10. (Izquierda) Espectros de absorción de MO (5.00 x 10^{-5}M) y variación de MO: (—) 0.00 M, (—) 1.00 x 10^{-6} M, (—) 4.00 x 10^{-6} M, (—) 8.00 x 10^{-6} M y (—) 1.00 x 10^{-4} M. (Derecha) Valores de absorción a 456 nm en negro y ajuste al modelo (2) representado en rojo.

Ante los resultados obtenidos fue necesario un cambio de estrategia, dado que el comportamiento observado denota la formación de un nuevo complejo de inclusión entre el P5TMA y el diácido de estudio C10, se decide estudiar el perfil cinético asociado a este proceso. El estudio cinético se realizó haciendo uso de la técnica *stopped-flow* dada la velocidad de la reacción, en todos los casos se prepararon muestras con concentración constante de MO y P5TMA (1.00 x 10^{-5} M para cada uno de ellos) mientras que se varía la concentración de diácido en las distintas muestras (Fig 11). Como método de control, se realiza un estudio cinético de la formación del complejo de inclusión entre MO y P5TMA, se preparan muestras de concentración constante de MO (1.00 x 10^{-5}M) y variación de P5TMA. Todos los experimentos se realizan a temperatura constante (25.0ºC) y a una longitud de onda de 465 nm. Tal y como puede observarse en la figura 11, la velocidad de inclusión de MO en la cavidad del P5TMA es lo suficientemente alta como para poder realizar experimentos competitivos con C10 ya que, se trata de un proceso demasiado rápido como para ser medido en las escalas de tiempos de la técnica de *stopped-flow*.

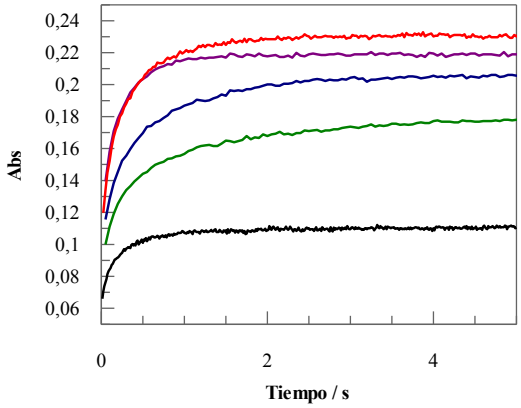


Figura 11. Perfil cinético de una muestra de [MO] = 1.00 x 10^{-5}M, [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M y [C10]: (—) 5.00 x 10^{-6}M, (—) 1.00 x 10^{-5} M, (—) 2.00 x 10^{-5} M, (—) 4.00 x 10^{-5} M y (—) 5.00 x 10^{-5} M.

. El procedimiento de análisis de las trazas cinéticas se realiza nuevamente con el *software* Dynafit siguiendo el modelo de complejación (3) según la plantilla de ajuste mostrada en el apéndice 6.5.9. Se itera el valor de las constantes de velocidad obtenidas hasta alcanzar una concordancia aceptable entre los valores obtenidos experimentalmente y los resultantes del ajuste. En la figura 12 se muestra un ejemplo del ajuste obtenido (el resto de ajustes se encuentran en el apéndice 6.5.3) y las constantes k_2 determinadas, tal y como puede observarse el valor de la constante de velocidad varía en función de la concentración de C10.

$$\mathrm{MO} + \mathrm{P5TMA} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{MO{:}P5TMA}$$

$$\mathrm{P5TMA{:}\,MO} + \mathrm{C10} \xrightarrow{k_{2,exp}} \mathrm{P5TMA{:}C10} + \mathrm{MO}$$

Modelo (3). Modelo de complejación de P5TMA con C10.

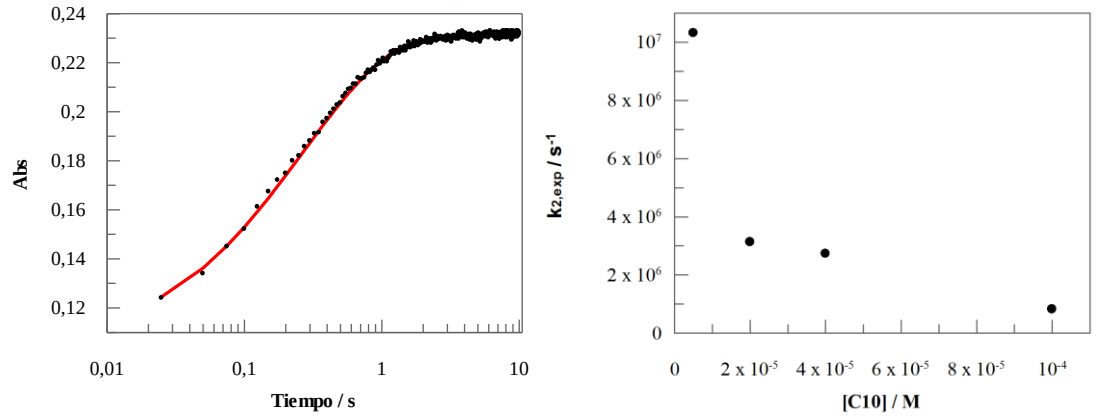


Figura 12. (Izquierda) Perfil cinético de una muestra de [MO] = 1.00 x 10^{-5}M, [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M y [C10] = 5.00 x 10^{-5}M y ajuste en color rojo al modelo (3). (Derecha) Constantes de velocidad k_2 calculadas según el modelo (3) con respecto a la variación de la concentración de C10.

Dado que según el análisis planteado la constante de velocidad debería mantenerse constante, es necesario ampliar el mecanismo propuesto para explicar los resultados obtenidos. Ante la similitud del comportamiento estudiado con los resultados obtenidos en otros capítulos de esta tesis doctoral y, dadas las estructuras de P5TMA y C10, se plantea la formación de un precomplejo entre ambos compuestos. En la figura 13 se plantean algunas de las posibilidades: (i) C10 puede situarse de forma que una de sus cargas negativas interaccione electrostáticamente con las cargas positivas de P5TMA, (ii) C10 puede situarse de forma que cada una de las cargas interaccione con los grupos trimetilamonio de cada uno de los portales de P5TMA o, por último (iii) C10 se sitúa de forma que sus dos grupos carboxilicos interacionen electrostaticamente con los grupos trimetilamonio de un solo portal del P5TMA.

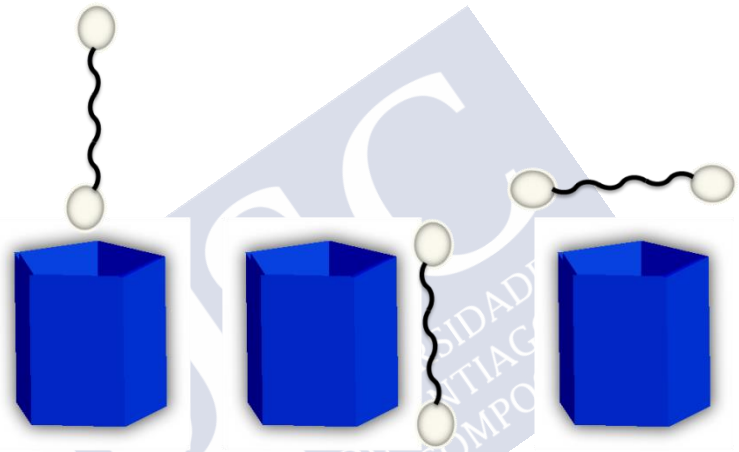


Figura 13. Posibles estructuras del precomplejo formado entre P5TMA y C10.

Por lo tanto, es necesario incluir una nueva etapa en el mecanismo de formación de un complejo de inclusión entre P5TMA y C10 tal y como se muestra en modelo (4) en el que el precomplejo se define como PC.

$$MO + P5TMA \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} MO{:}P5TMA$$

$$P5TMA{:}\,MO + C10 \overset{K_{PC}}{\rightleftharpoons} PC \xrightarrow{k_2} P5TMA{:}\,C10$$

Modelo (4). Modelo de complejación de P5TMA con C10 incluyendo la formación de un precomplejo.

Para la obtención de la constante de equilibrio (K_{PC}) y de velocidad real del proceso (k_2) es necesario encontrar una relación entre ambos parámetros. En primer lugar, se define el equilibrio entre P5TMA:MO y C10 dando lugar a la ecuación (1).

$$\text{P5TMA: MO} + \text{C10} \overset{K_{PC}}{\rightleftharpoons} \text{PC}$$

$$K_{PC} = \frac{[PC]}{[P5TMA:MO][C10]} \rightarrow [PC] = K_{PC}[P5TMA:MO][C10] \quad (1)$$

El balance de materia permite obtener las expresiones (2) y (3):

$$[P5TMA:MO]_T = [P5TMA:MO] + [PC] \quad (2)$$

$$[C10]_T = [C10] + [PC] \quad (3)$$

Combinando las expresiones (1) y (2) se obtiene la expresión (5):

$$[P5TMA:MO]_T = [P5TMA:MO] + K_{PC}[P5TMA:MO][C10] = [P5TMA:MO](1 + K_{PC}[C10]) \quad (4)$$

$$[P5TMA:MO] = \frac{[P5TMA:MO]_T}{1 + K_{PC}[C10]} \quad (5)$$

Definición de la ecuación de velocidad (6):

$$v = k_2 [PC] \quad (6)$$

Combinación de las expresiones (1), (6) y (5); reorganización de los términos para obtener la expresión (7):

$$v = k_2 K_{PC}[P5TMA:MO][C10] \xrightarrow{\text{Reorganización}} v = \frac{k_2}{1 + K_{PC}[C10]}[PC] \quad (7)$$

Por lo tanto, se obtiene la relación entre k_2 y $k_{2,exp}$, la linealización de la ecuación resultante conduce a la expresión (8):

$$k_{2,exp} = \frac{k_2}{1 + K_{PC}[C10]} \xrightarrow{\text{Linealización}} \frac{1}{k_{2,exp}} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_{PC}}{k_2}[C10] \quad (8)$$

La representación de $1/k_{2,exp}$ frente a la concentración de C10 y el ajuste de los datos experimentales mediante la ecuación (8) permite obtener la expresión y = 0.0116x + 2.11x10^{-8} por lo tanto, k_2 = 4.74 x 10^8 s^{-1} mientras que K_{PC} = 5.50 x 10^5 M^{-1} (Fig 14).

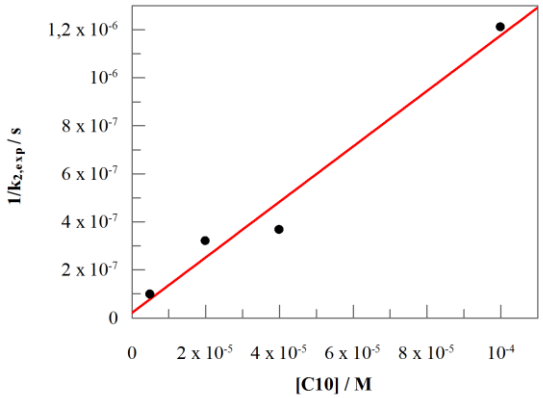


Figura 14. Variación de $1/k_{2,exp}$ frente a la concentración de C10 y ajuste a la expresión (8).

Una vez determinada la constante de velocidad y de equilibrio del precomplejo, se decide determinar las constantes de equilibrio asociadas a la formación de complejos de inclusión entre P5TMA y C10. Ya que este estudio no es posible mediante el desplazamiento de MO (tal y como se explica anteriormente), es necesario el uso de otra sonda. Para este estudio, se selecciona el ácido 4,4´-estilbendicarboxilico cuyo comportamiento con P5TMA se describe en el capítulo 7 de esta tesis doctoral.

En primer lugar, es necesario generar el complejo P5TMA:estilbeno, para ello se incuba una muestra inicial durante el tiempo suficiente para generar el complejo termodinámico. Una vez transcurrido este período se procede a preparar las muestras de estudio en las que se mantiene constante la concentración de P5TMA y estilbeno en 5.00 x 10^{-6}M y se varía la concentración de C10. Las trazas cinéticas se realizan a temperatura constante (25.0ºC) y a una longitud de onda de 327 nm (en la figura 15 se encuentran varios ejemplos de las cinéticas obtenidas), el análisis de las mismas se realiza de nuevo con el *software* Dynafit siguiendo el modelo de complejación (5), un ejemplo del ajuste se muestra en la figura 15.

$$\text{Estilbeno} + \text{P5TMA} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{P5TMA:estilbeno}$$

$$\text{P5TMA: estilbeno} + \text{C10} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} \text{P5TMA:C10}$$

Modelo (5). Modelo de complejación de C10 con P5TMA mediante el desplazamiento de estilbeno.

La determinación de las constantes de velocidad k_2 y k_{-2} permiten el cálculo de la constante de equilibrio del sistema según la ecuación 9. Mediante este protocolo se determina que la constante de equilibrio de formación del complejo P5TMA:C10 para cada una de las muestras estudiadas. Los valores obtenidos son 4.00 x 10^8M^{-1}, 9.90 x 10^7M^{-1}, 7.94 x 10^7M^{-1} y 1.00 x 10^8M^{-1} para concentración de C10 1.00 x 10^{-3}M, 5.00 x 10^{-3}M, 1.00 x 10^{-2}M y 2.50 x 10^{-2}M, respectivamente. Cabe destacar que los valores obtenidos son relativamente constantes

y, por tanto, independientes de la concentración de C10 presente en el medio de reacción. A partir de todos los resultados obtenidos se puede establecer que la constante de equilibrio para la formación del complejo P5TMA:C10 es (1.68 ± 0.70) x $10^8 M^{-1}$.

$$K_{P5TMA:C10} = \frac{k_2}{k_{-2}} \qquad (9)$$

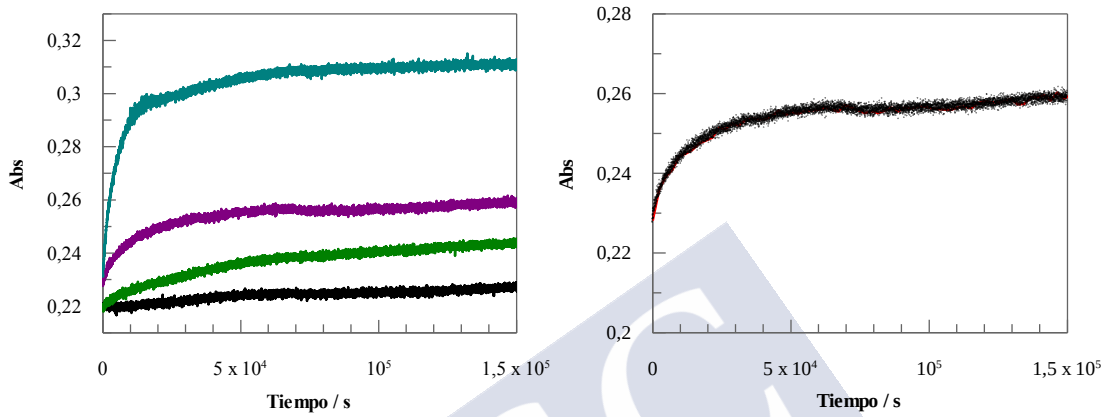


Figura 15. (Derecha) Perfiles cinéticos medidos a 327 nm y 25ºC de muestras de [P5TMA] = 5.00 x 10^{-6}M, [Estilbeno] = 5.00 x 10^{-6}M y variación de C10: (—) 1.00 x 10^{-3}M, (—) 5.00 x 10^{-3}M, (—) 1.00 x 10^{-2}M y (—) 2.50 x 10^{-2}M. (Izquierda) Perfil cinético de [P5TMA] = 5.00 x 10^{-6}M, [Estilbeno] = 5.00 x 10^{-6}M y [C10] = 1.00 x 10^{-2}M y ajuste en color rojo.

Una vez establecido el protocolo de análisis, se repite el mismo experimento para cada uno de los diácidos de estudio. En primer lugar, se lleva a cabo el estudio cinético, se realizó en todos los casos haciendo uso de la técnica *stopped-flow* dada la velocidad de la reacción, se prepararon muestras con concentración constante de MO y P5TMA (1.00 x 10^{-5} M para cada uno de ellos) mientras que se varía la concentración de diácido en las distintas muestras. Como ejemplo de los perfiles cinéticos obtenidos se muestran en las figuras 16 y 17. El procedimiento de análisis de las trazas cinéticas se realiza nuevamente con el *software* Dynafit siguiendo el modelo de complejación (3) según la plantilla de ajuste mostrada en el apéndice 6.5.9. Se itera el valor de las constantes de velocidad obtenidas hasta alcanzar una concordancia aceptable entre los valores obtenidos experimentalmente y los resultantes del ajuste. En las figuras 18 y 19 se muestran varios ejemplos de los ajustes obtenidos (el resto de ajustes se encuentran en los apéndices 6.5.1 a 6.5.8).

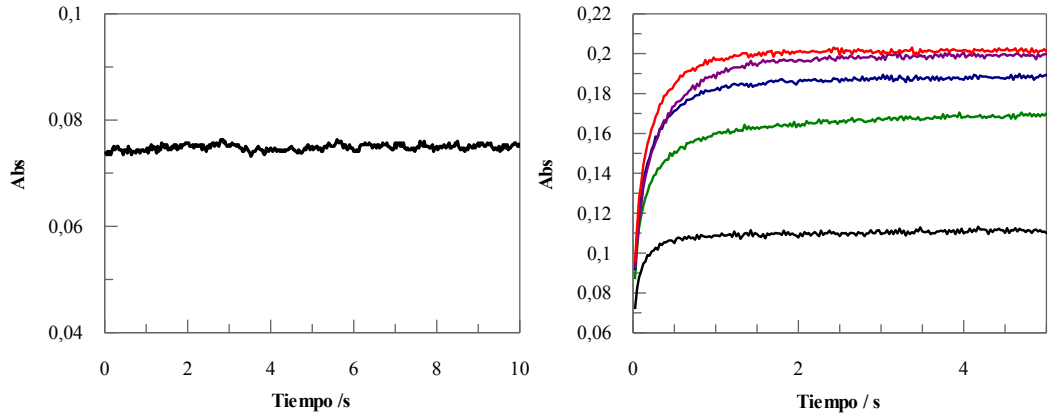


Figura 16. (Izquierda) Perfil cinético de una muestra de [MO] = 1.00 x 10^{-5}M, [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M y [C4] = 2.00 x 10^{-5}M. (Derecha) Perfil cinético de una muestra de [MO] = 1.00 x 10^{-5}M, [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M y [C6]: (—) 5.00 x 10^{-6}M, (—) 1.00 x 10^{-5} M, (—) 2.00 x 10^{-5} M, (—) 4.00 x 10^{-5} M y (—) 5.00 x 10^{-5} M.

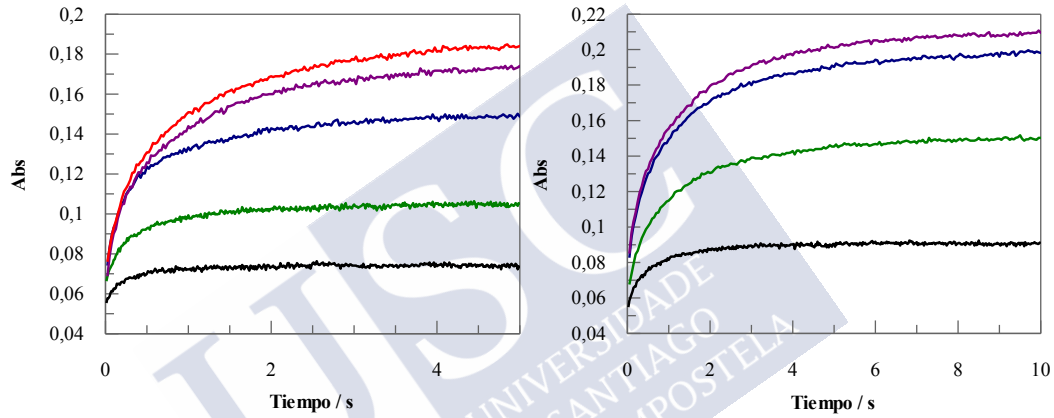


Figura 17. (Izquierda) Perfil cinético de una muestra de [MO] = 1.00 x 10^{-5}M, [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M y [C12]: (—) 5.00 x 10^{-6}M, (—) 1.00 x 10^{-5} M, (—) 2.00 x 10^{-5} M, (—) 4.00 x 10^{-5} M y (—) 5.00 x 10^{-5} M. (Derecha) Perfil cinético de una muestra de [MO] = 1.00 x 10^{-5}M, [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M y [C16]: (—) 5.00 x 10^{-6}M, (—) 1.00 x 10^{-5} M, (—) 2.00 x 10^{-5} M y (—) 4.00 x 10^{-5} M.

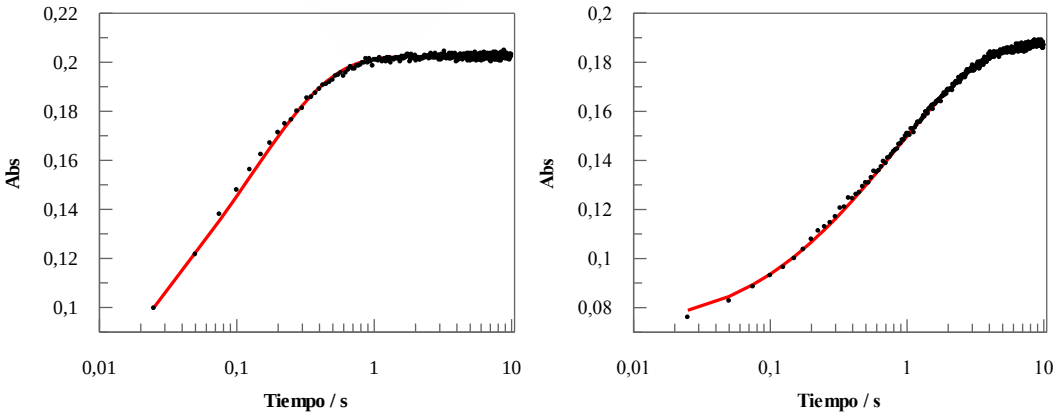


Figura 18. (Izquierda) Perfil cinético de una muestra de [MO] = 1.00 x 10^{-5}M, [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M y [C6] = 5.00 x 10^{-5}M y ajuste en color rojo al modelo (3). (Derecha) Perfil cinético de una muestra de [MO] = 1.00 x 10^{-5}M, [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M y [C12] = 5.00 x 10^{-5}M y ajuste en color rojo al modelo (3).

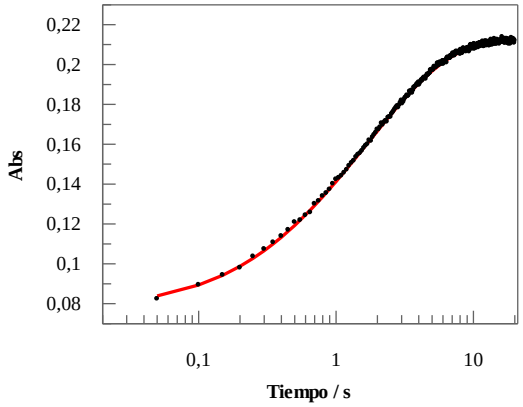


Figura 19. Perfil cinético de una muestra de [MO] = 1.00 x 10^{-5}M, [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M y [C16] = 5.00 x 10^{-5}M y ajuste en color rojo al modelo (3).

Tal y como se puede observar en las figuras 20 a 22 el comportamiento de todos los diácidos de estudio es el mismo, la velocidad $k_{2,exp}$ disminuye a medida que aumenta la concentración de diácido en el medio. De forma análoga al estudio de C10, se plantea la posibilidad de formación de precomplejos entre P5TMA y los diácidos para justificar este comportamiento. Cabe destacar que en el caso de C4 no se observa ninguna reacción (Fig 15), esto puede ser debido a dos factores: (i) la velocidad de la reacción se encuentra fuera de los límites de la técnica de *stopped-flow*, es decir, es demasiado rápida o (ii) C4 es demasiado pequeño como para introducirse dentro de la cavidad del P5TMA y desplazar a MO.

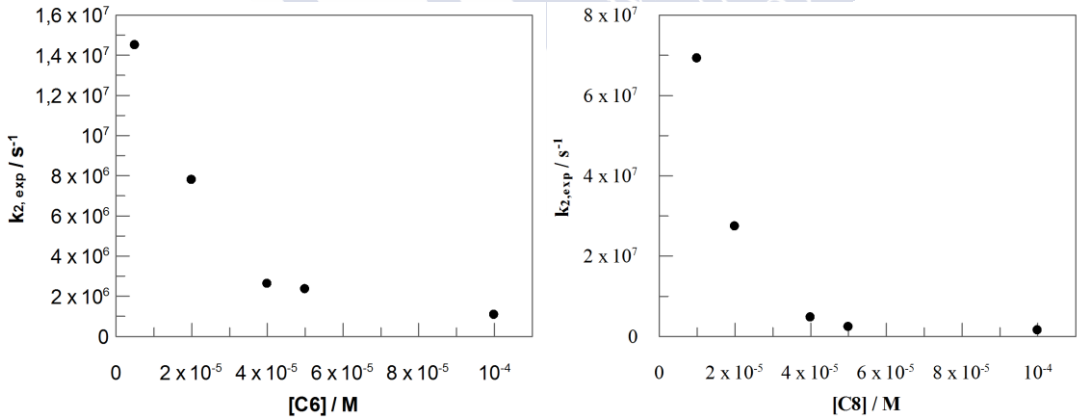


Figura 20. (Izquierda) Constantes de velocidad $k_{2,\ exp}$ calculadas según el modelo (3) con respecto a la variación de la concentración de C6. (Derecha) Constantes de velocidad $k_{2,\ exp}$ calculadas según el modelo (3) con respecto a la variación de la concentración de C8.

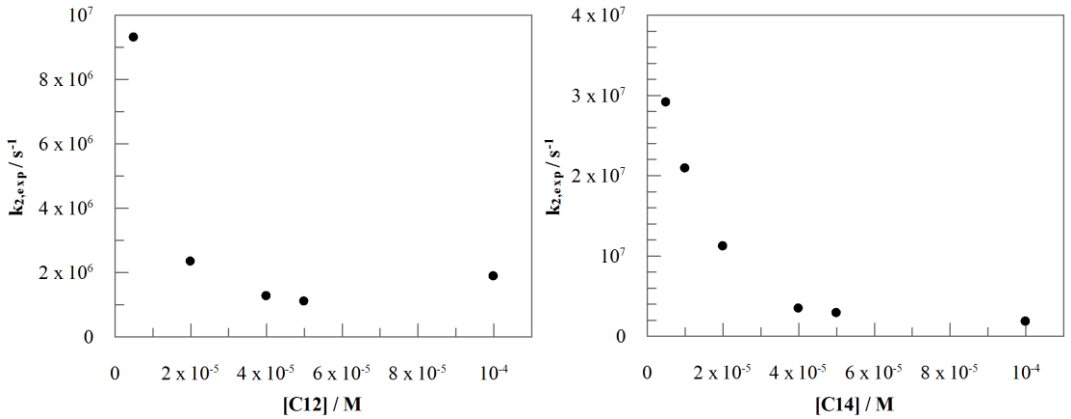


Figura 21. (Izquierda) Constantes de velocidad $k_{2,\ exp}$ calculadas según el modelo (3) con respecto a la variación de la concentración de C12. (Derecha) Constantes de velocidad $k_{2,\ exp}$ calculadas según el modelo (3) con respecto a la variación de la concentración de C14.

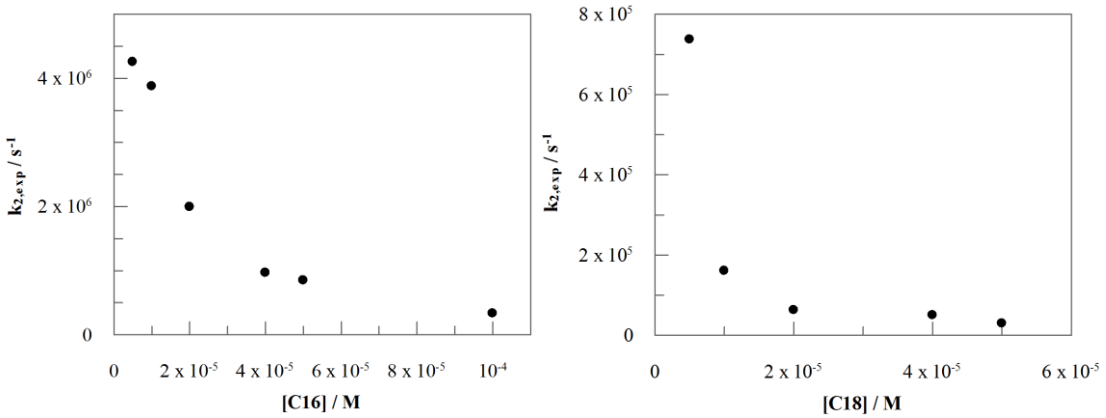


Figura 22. (Izquierda) Constantes de velocidad $k_{2,\ exp}$ calculadas según el modelo (3) con respecto a la variación de la concentración de C16. (Derecha) Constantes de velocidad $k_{2,\ exp}$ calculadas según el modelo (3) con respecto a la variación de la concentración de C18.

Al igual que en el estudio de C10 se emplea la ecuación 8 para determinar las constantes k_2 y K_{PC} para cada uno de los sistemas estudiados. Los resultados obtenidos así como el ajuste se muestran en las figuras 23 a 25, en la tabla 1 se resumen todos los resultados.

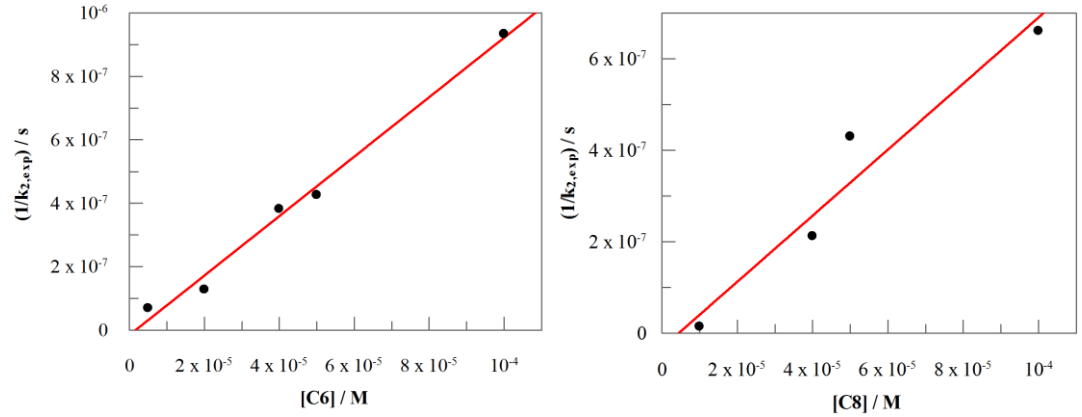


Figura 23. (Izquierda) Variación de $1/k_{2,exp}$ frente a la concentración de C6 y ajuste a la expresión (8). (Derecha) Variación de $1/k_{2,exp}$ frente a la concentración de C8 y ajuste a la expresión (8).

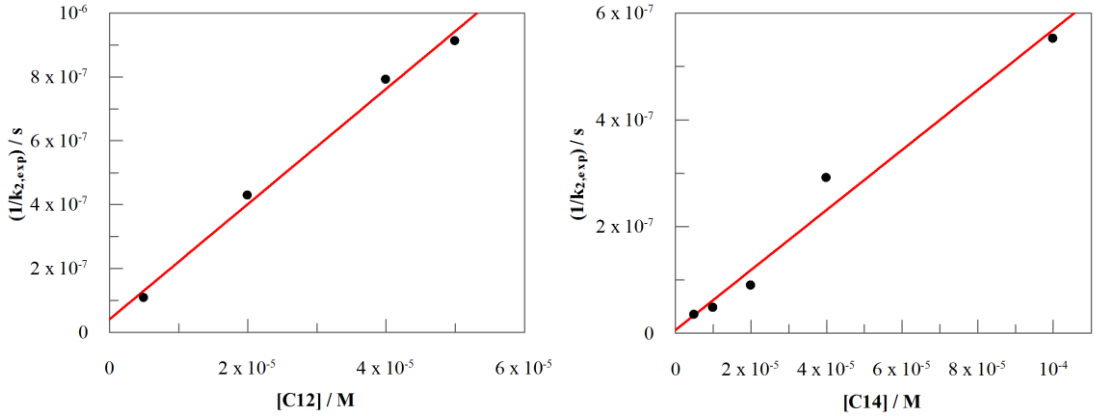


Figura 24. (Izquierda) Variación de $1/k_{2,exp}$ frente a la concentración de C12 y ajuste a la expresión (8). (Derecha) Variación de $1/k_{2,exp}$ frente a la concentración de C14 y ajuste a la expresión (8).

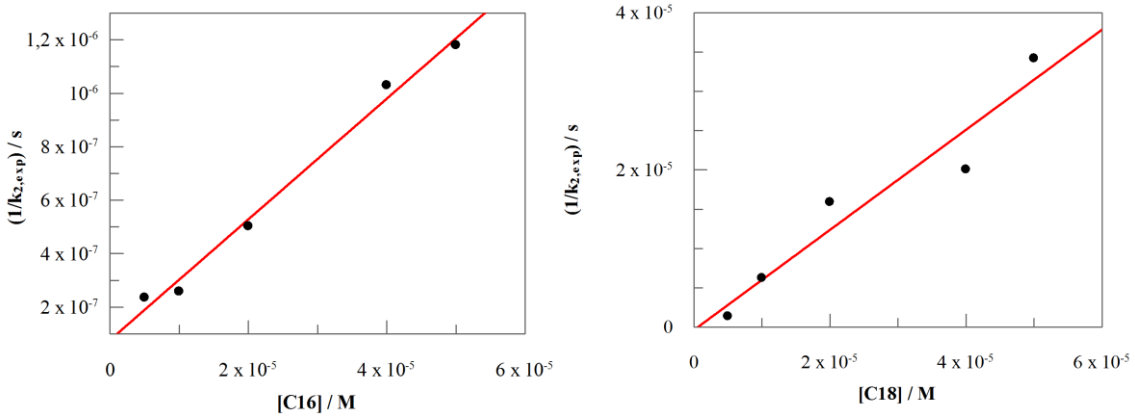


Figura 25. (Izquierda) Variación de $1/k_{2,exp}$ frente a la concentración de C16 y ajuste a la expresión (8). (Derecha) Variación de $1/k_{2,exp}$ frente a la concentración de C18 y ajuste a la expresión (8).

Tabla 1. Determinación de la pendiente (K_{PC}/k_2), ordenada en el origen ($1/k_2$), k_2 y K_{PC} para los diácidos de estudio mediante la ecuación 8.

Diácido	(K_{PC}/k_2) / s	$(1/k_2)$ / M s	k_2 / $M^{-1}s^{-1}$	K_{PC} / M^{-1}
C6	$(9.4 \pm 0.50) \times 10^{-3}$	$-(1.5 \pm 2.9) \times 10^{-8}$	-	-
C8	$(7.2 \pm 0.13) \times 10^{-3}$	$-(3.2 \pm 7.6) \times 10^{-8}$	-	-
C10	$(1.2 \pm 0.14) \times 10^{-2}$	$(2.1 \pm 1.5) \times 10^{-8}$	4.78×10^{8}	5.50×10^{5}
C12	$(1.8 \pm 0.11) \times 10^{-2}$	$(4.1 \pm 3.8) \times 10^{-8}$	2.46×10^{7}	4.42×10^{5}
C14	$(5.6 \pm 0.50) \times 10^{-3}$	$(5.9 \pm 2.6) \times 10^{-8}$	1.70×10^{7}	9.01×10^{4}
C16	$(2.3 \pm 0.13) \times 10^{-2}$	$(7.6 \pm 4.0) \times 10^{-8}$	1.31×10^{7}	8.38×10^{4}
C18	$(6.4 \pm 1.0) \times 10^{-2}$	$-(3.9 \pm 3.1) \times 10^{-7}$	-	-

Ante los resultados obtenidos, no es posible determinar las constantes k_2 y K_{PC} para todos los diácidos. La representación de K_{PC} / k_2 (término con menor error estadístico) indica que está relación es prácticamente constante para todos los diácidos de estudio, si bien con C18 parece que existe un cambio de tendencia ya que, el valor de este cociente aumenta ligeramente. Esto puede ser debido a que el gran tamaño de C18 permite la formación de complejos externos con estructuras similares a las indicadas en la figura 13 (ii). De los resultados obtenidos para las constantes K_{PC} y k_2 se puede determinar que tanto la constante de velocidad como la constante de equilibrio del precomplejo disminuyen ligeramente a medida que aumenta la longitud de la cadena del diácido tal y como puede observarse en la figura 27.

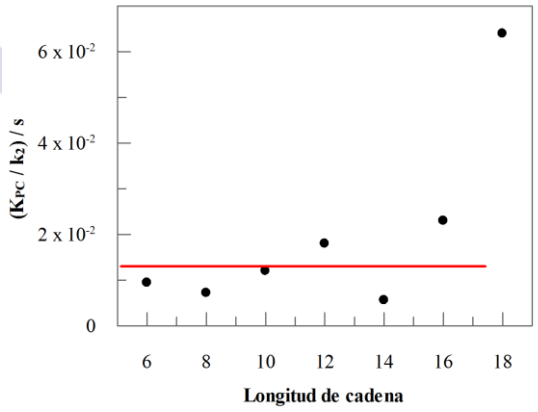


Figura 26. Variación de KPC / k2 con respecto a la longitud de la cadena de los diácidos.

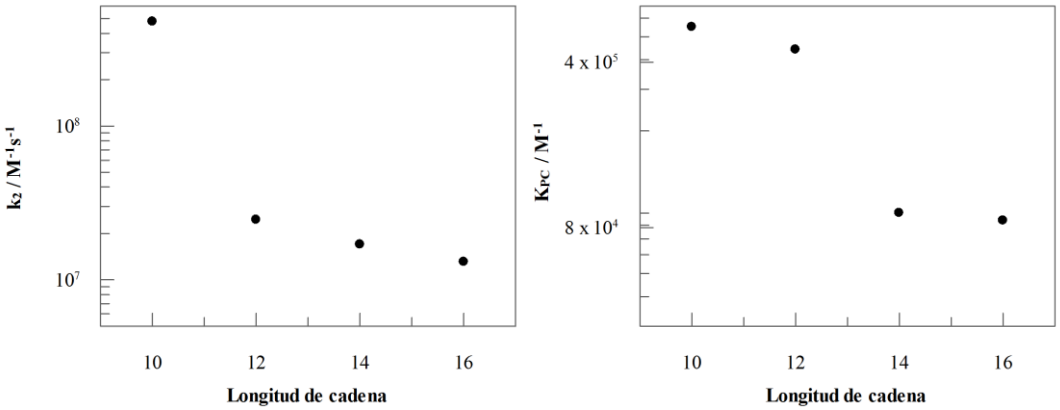


Figura 27. (Izquierda) Variación de k_2 con respecto a la longitud de la cadena de los diácidos. (Derecha) Variación de K_{PC} con respecto a la longitud de la cadena de los diácidos.

Una vez determinadas las constantes k_2 y K_{PC} para aquellos diácidos en los que es posible, se determina la constante de equilibrio para la formación de complejos de inclusión entre P5TMA y los diferentes diácidos siguiendo el protocolo establecido para C10. Desafortunadamente, no es posible determinar esta constante para todos los casos ya que las concentraciones necesarias para el estudio son superiores a la solubilidad de algunos de los diácidos en las condiciones de trabajo. Por lo tanto, se determinará la contante de equilibrio para C4, C6, C8 y C12. Una vez generado el complejo P5TMA:estilbeno se procede a preparar las muestras de estudio en las que se mantiene constante la concentración de P5TMA y estilbeno en 5.00 x 10^{-6}M y se varía la concentración de diácidos. Las trazas cinéticas se realizan a temperatura constante (25.0ºC) y a una longitud de onda de 327 nm, el análisis de las mismas se realiza de nuevo con el *software* Dynafit siguiendo el modelo de complejación (5), en las figuras 28 y 29 se puede observar un ejemplo del ajuste obtenido para cada uno de los diácidos estudiados. Cabe destacar que el comportamiento del C4 es idéntico al observado en el experimento anterior (desplazamiento de MO del interior de la cavidad del P5TMA) por lo que, dado el mecanismo de formación del complejo P5TMA:estilbeno, parece evidente que el tamaño de C4 impide la formación de complejos de inclusión con P5TMA.

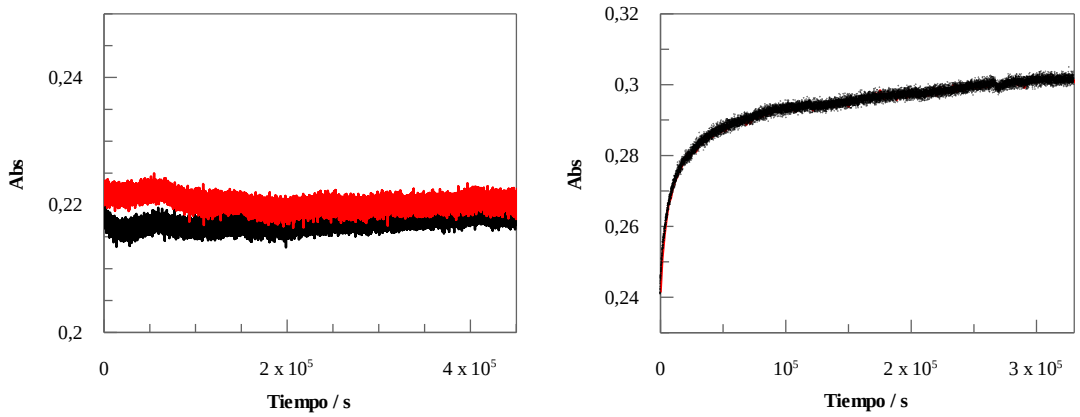


Figura 28. (Izquierda) Perfil cinético de una muestra de [P5TMA] = 5.00 x 10^{-6}M, [Estilbeno] = 5.00 x 10^{-6}M y [C4]: (—) 1.00 x 10^{-3}M, (—) 2.50 x 10^{-2} M. (Derecha) Perfil cinético de una muestra de [P5TMA] = 5.00 x 10^{-6}M, [estilbeno] = 5.00 x 10^{-6}M y [C6] = 1.00 x 10^{-3}M con ajuste en color rojo al modelo (5).

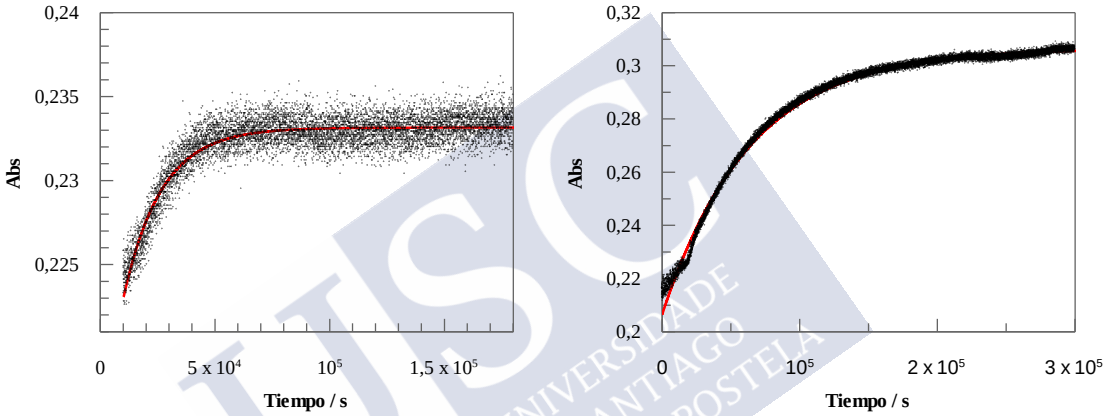


Figura 29. (Izquierda) Perfil cinético de una muestra de [P5TMA] = 5.00 x 10^{-6}M, [Estilbeno] = 5.00 x 10^{-6}M y [C8] = 1.00 x 10^{-3}M con ajuste en color rojo al modelo (5). (Derecha) Perfil cinético de una muestra de [P5TMA] = 5.00 x 10^{-6}M, [estilbeno] = 5.00 x 10^{-6}M y [C12] = 5.00 x 10^{-3}M con ajuste en color rojo al modelo (5).

La determinación de las constantes de velocidad k_2 y k_{-2} permiten el cálculo de la constante de equilibrio del sistema según la ecuación 9. Mediante este protocolo se determinan las constantes de equilibrio de formación del complejo entre P5TMA y los diferentes diácidos para cada una de las muestras estudiadas. Los resultados de los diferentes ajustes permiten determinar que las constantes de equilibrio son: (4.75 ± 0.5) x 10^7 M^{-1}, (6.25 ± 0.33) x 10^7 M^{-1} y (1.04 ± 0.21) x 10^8 M^{-1} para C6, C8 y C12, respectivamente.

La evaluación de la constante de equilibrio en función de la longitud de la cadena de los diácidos, conduce a un revelador comportamiento. Tal y como puede observarse en la figura 30, se producen dos tendencias. La constante de equilibrio aumenta conforme lo hace la longitud de la cadena para C6, C8 y C10, sin embargo, con diádidos con un mayor número de carbonos se produce un cambio en el que la constante de equilibrio disminuye, tal y como se puede observar para C12.

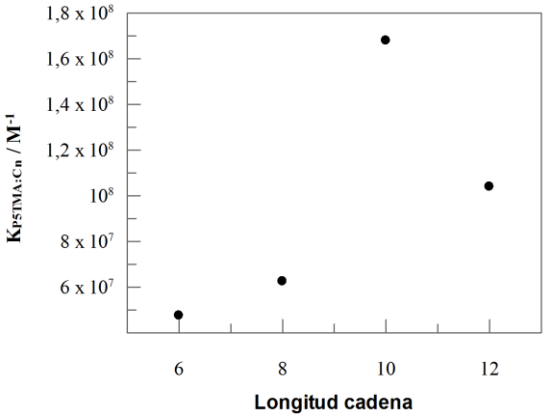


Figura 30. Relación de la constante de equilibrio de los diferentes diácidos (KP5TMA:Cn) con la longitud de la cadena.

La explicación para este tipo de comportamiento debe residir en el número de interacciones electrostáticas que tienen lugar en la formación del complejo de inclusión, es por ello que se decide evaluar el sistema mediante resonancia magnética nuclear con el objetivo de esclarecer la posición del P5TMA sobre la cadena de los diácidos.

6.3.3 Formación de complejo de inclusión entre P5TMA y C10 mediante RMN.

Con el objetivo de confirmar la formación de complejos de inclusión entre el P5TMA y los diácidos de estudio se realizaron experimentos de resonancia magnetica nuclear que permitieran esclarecer la estructura del rotaxano formado. Se prepararon muestras de concentración 1.00 mM con los diferentes diácidos puros (C6, C8, C10 y C12) y, muestras con mezclas equimolares de P5TMA y diácido; los experimentos con diácidos de cadena superior a 12 átomos de carbono no han sido realizados por problemas de solubilidad. Dado que el comportamiento en todos los casos es idéntico en cuanto a patrón de desdoblamiento se analizará más en profundidad el rotaxano formado por P5TMA y C10. En la figura 31 se muestran los espectros correspondientes a ambas muestras, así como la asignación de los protones referentes a C10. Cabe destacar que se analiza solo las señales correspondientes al C10 ya que sufren los cambios más significativos. Tal y como se puede observar se produce un desplazamiento de todas las señales hacia campo alto indicativo de que C10 se encuentra dentro de la cavidad hidrófoba del P5TMA. Además, es especialmente significativo el desdoblamiento de todas las señales. En la tabla 2 se especifican los desplazamientos químicos de C10 libre y complejado así como el cambio final ($\Delta\delta = \delta_{libre} - \delta_{complejado}$), el valor de $\Delta\delta$ es muy ilustrativo en cuanto a la posición de C10 en la cavidad del pilarareno.

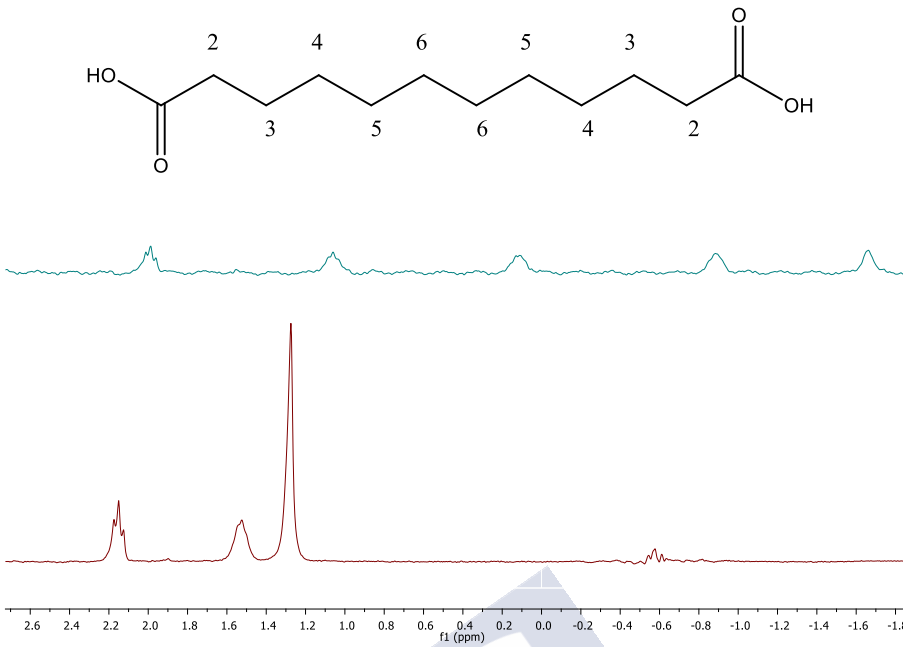


Figura 31. Espectro ^{1}H-RMN de una muestra de C10 1.00 mM en rojo y muestra de mezcla equimolar de P5TMA y C10 (1.00 mM) en azul.

Tabla 2. Variación de desplazamiento químico de C10 en presencia y ausencia de P5TMA.

H	δ_{libre} / ppm	$\delta_{complejado}$ / ppm	$\Delta\delta$ / ppm
2	2.15	1.98	0.17
3	1.52	1.07	0.45
4	1.28	0.10	0.10
5	1.28	-0.89	2.17
6	1.28	-1.67	2.95

El análisis de los desplazamientos químicos nos indica que los protones con un mayor $\Delta\delta$ son los identificados como 6, en este tipo de sistemas los protones más afectados son aquellos que se encuentran más adentrados en la cavidad por lo que, se puede prever la estructura final resultante. El P5TMA se sitúa en el centro de C10 de forma que se produce una doble estabilización, la cadena establece múltiples interacciones del tipo C-H$\cdots\pi$ mientras que la cercanía entre los grupos carboxilo del C10 y los grupos trimetilamonio del P5TMA generan interacciones electrostáticas que confieren gran estabilidad al sistema. La estructura del rotaxano formado se puede observar en la figura 32.

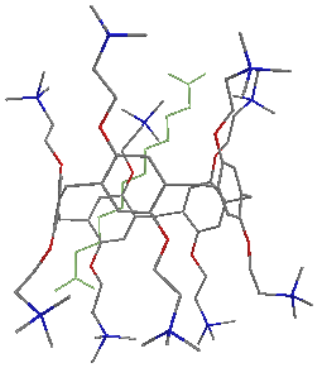


Figura 32. Estructura del rotaxano formado entre P5TMA y C10 (estructura en color verde).

La dilucidación de la estructura de P5TMA:C10 explica los resultados obtenidos en el apartado anterior, el tamaño de C10 permite que la disposición espacial de las cargas de P5TMA y C10 se encuentren suficientemente cerca como para establecer dos fuertes interacciones electrostáticas formándose así, el complejo más estable y, por tanto, el que posee la constante de equilibrio más elevada.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.4 CONCLUSIONES.

En este capítulo se ha estudiado la formación de complejos de inclusión entre P5TMA y MO, una de las sondas más utilizadas actualmente. Este estudio permite la realización de experimentos competitivos con sondas que no muestran cambios de absorbancia al incluirse en la cavidad de los macrociclos, tales como el TSNa o los diácidos de diferente cadena estudiados. El estudio cinético del desplazamiento del MO del interior del P5TMA con diácidos permite la dilucidación de las constantes de velocidad asociadas al proceso, así como para establecer la relación entre la velocidad y el tamaño de la cadena; determinándose así que la velocidad de inclusión de los diácidos disminuye de forma proporcional al aumento del tamaño de la cadena. Además, la determinación de las constantes de velocidad permite establecer el mecanismo de formación de complejos entre P5TMA y C10 esclareciéndose que este presenta dos etapas diferenciadas, la formación de un precomplejo y la posterior inclusión del diácido en la cavidad del P5TMA.

La determinación de las constantes de equilibrio es posible mediante la realización de experimentos competitivos basados en el complejo de inclusión P5TMA:Estilbeno. Este estudio revela que la constante de equilibrio aumenta a medida que lo hace la longitud de la cadena hasta alcanzar un máximo de 10 átomos de carbono. A partir de C10, se produce un cambio de tendencia en la que, la constante de equilibrio disminuye.

Mediante RMN se ha podido estudiar la estructura formada entre P5TMA y C10 revelándose que el P5TMA se encuentra situado en el centro de la cadena de C10 formando un [2]rotaxano. La posición de P5TMA explica las dos tendencias observadas en el estudio de las constantes de equilibrio, la disposición espacial de ambas moléculas permite el establecimiento de dos interacciones electrostáticas, esto confiere una gran estabilidad al complejo P5TMA:C10.

6.5 APÉNDICES.

6.5.1 Ajustes del sistema P5TMA:C6.

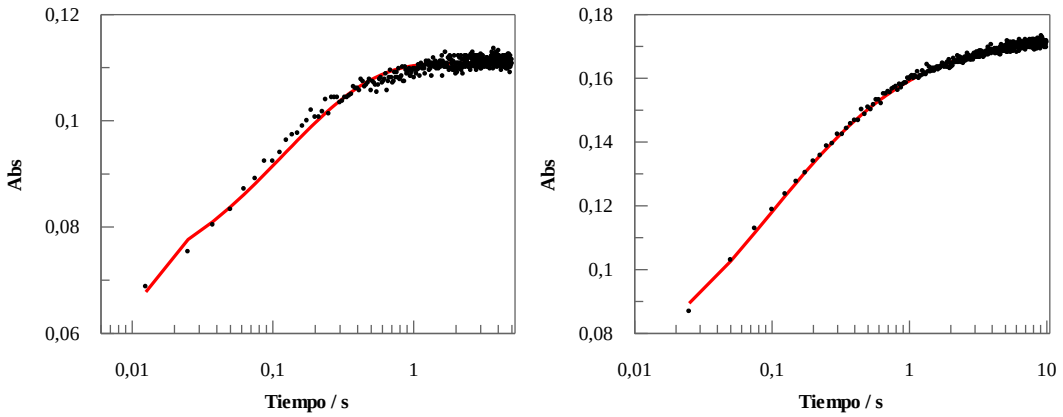


Figura A1. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C6] = 5.00 x 10^{-6} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C6] = 1.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

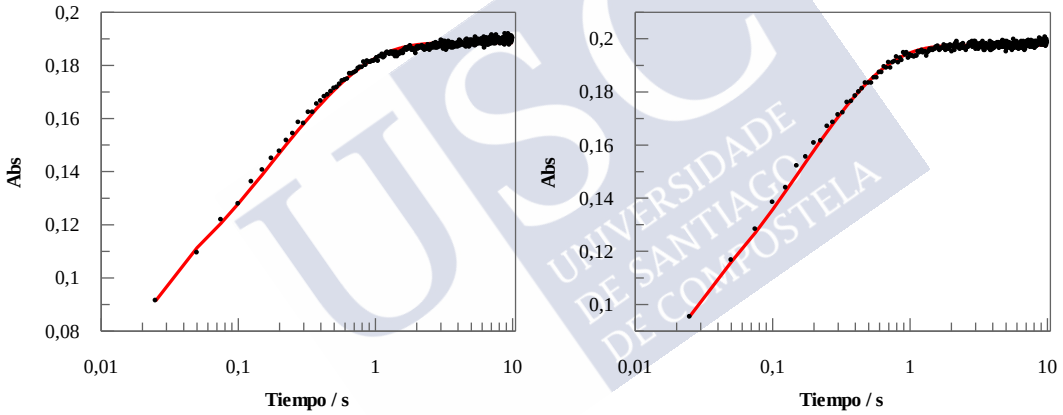


Figura A2. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C6] = 2.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C6] = 4.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

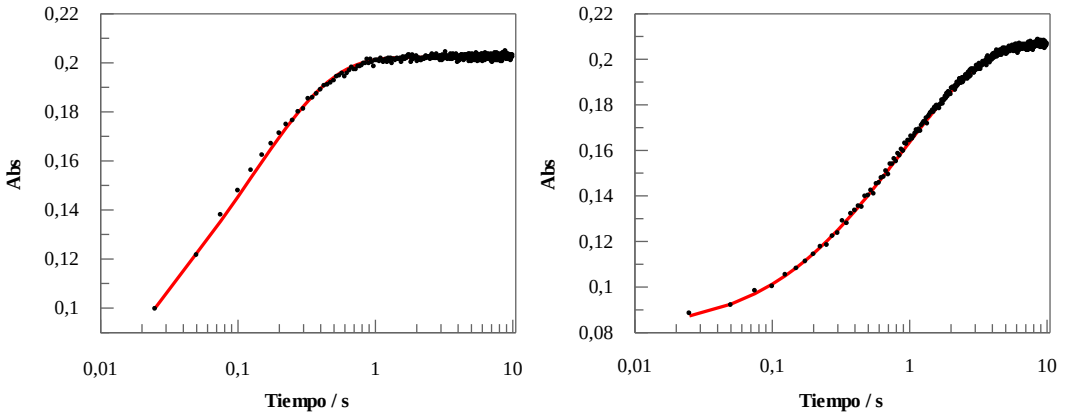


Figura A3. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C6] = 5.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C6] = 1.00 x 10^{-4} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

6.5.2 Ajustes del sistema P5TMA:C8.

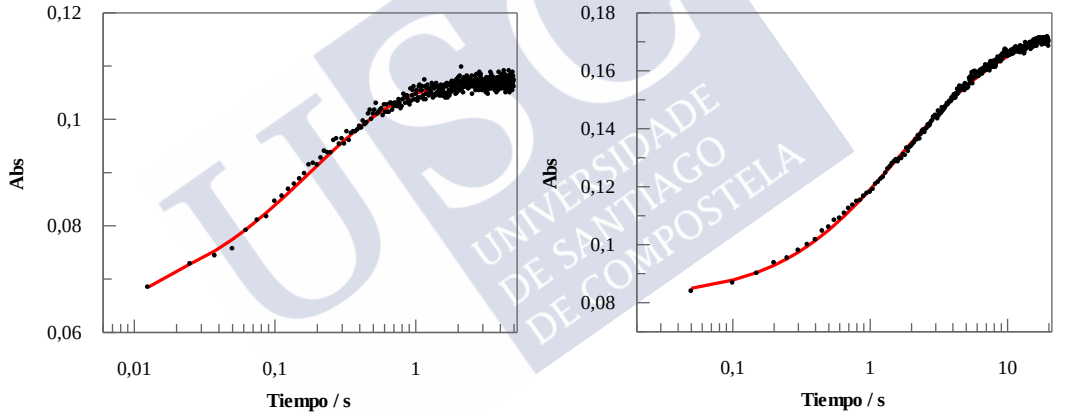


Figura A4. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C8] = 5.00 x 10^{-6} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C8] = 1.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

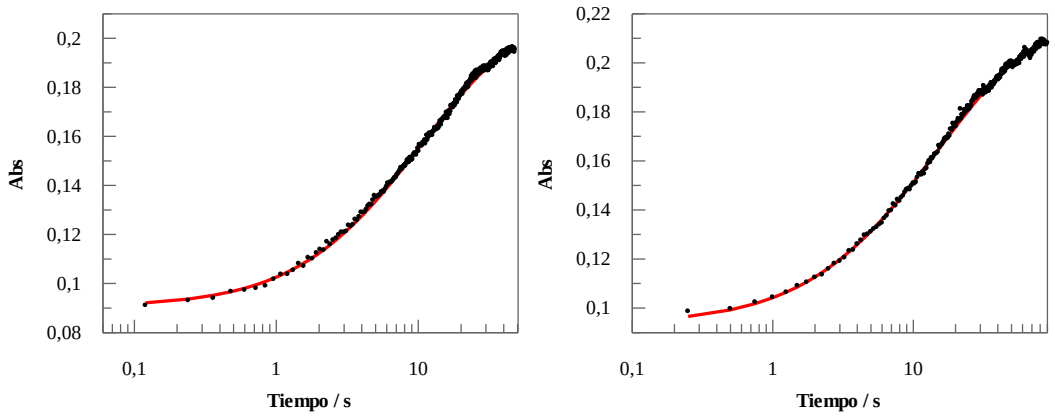


Figura A5. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C8] = 2.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C8] = 4.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

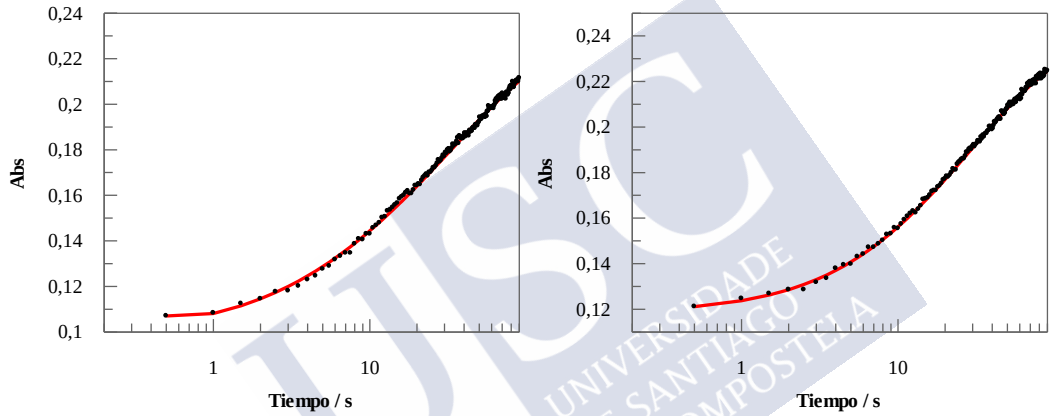


Figura A6. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C8] = 5.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C8] = 1.00 x 10^{-4} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

6.5.3 Ajustes del sistema P5TMA:C10.

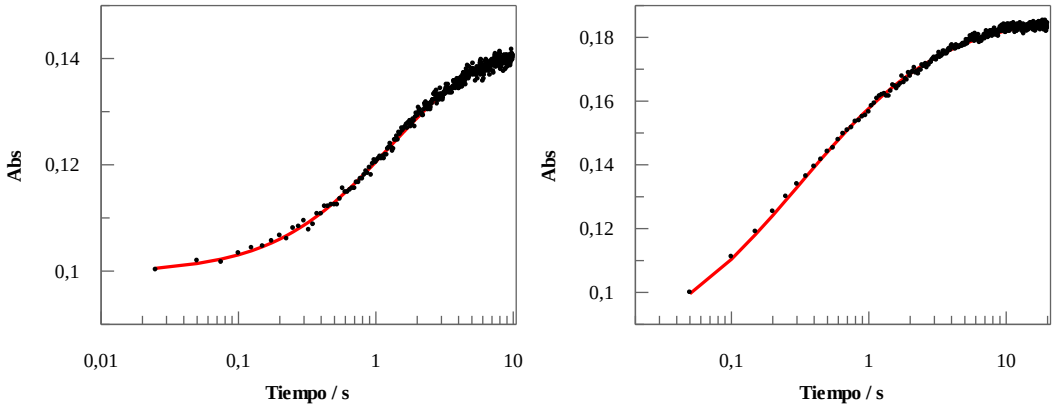


Figura A7. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C10] = 5.00 x 10^{-6} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C10] = 1.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

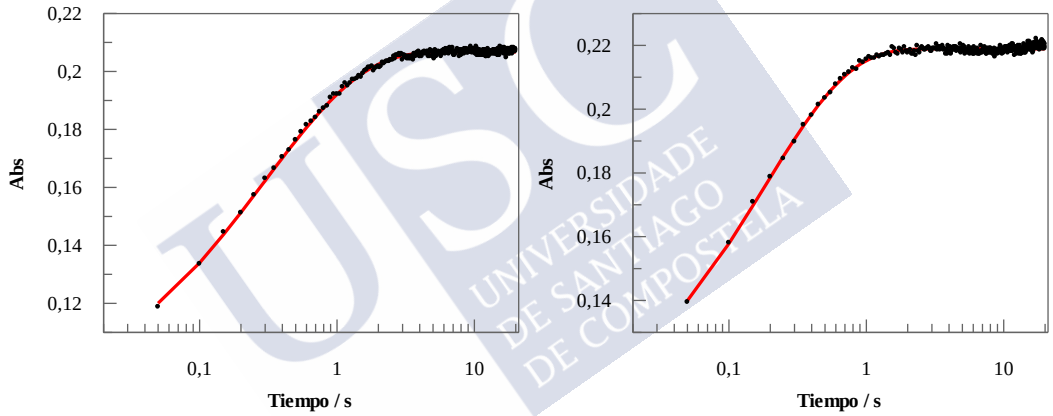


Figura A8. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C10] = 2.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C10] = 4.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

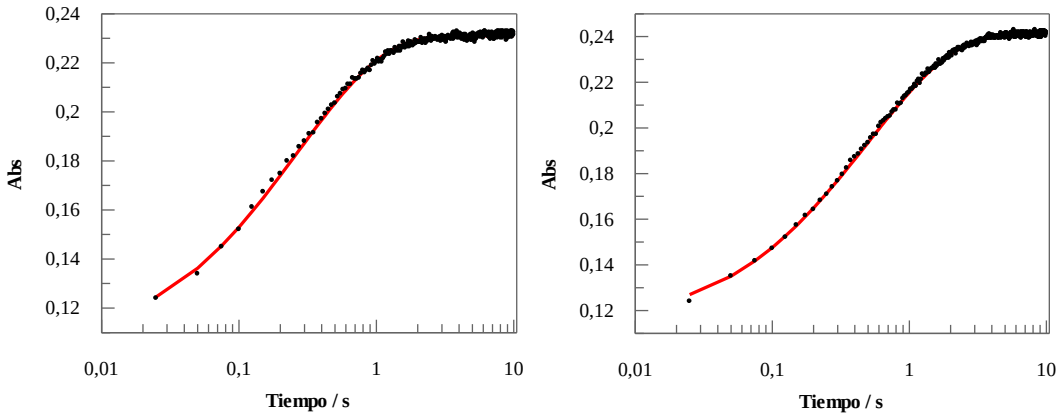


Figura A9. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C10] = 5.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C10] = 1.00 x 10^{-6} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

6.5.4 Ajustes del sistema P5TMA:C12.

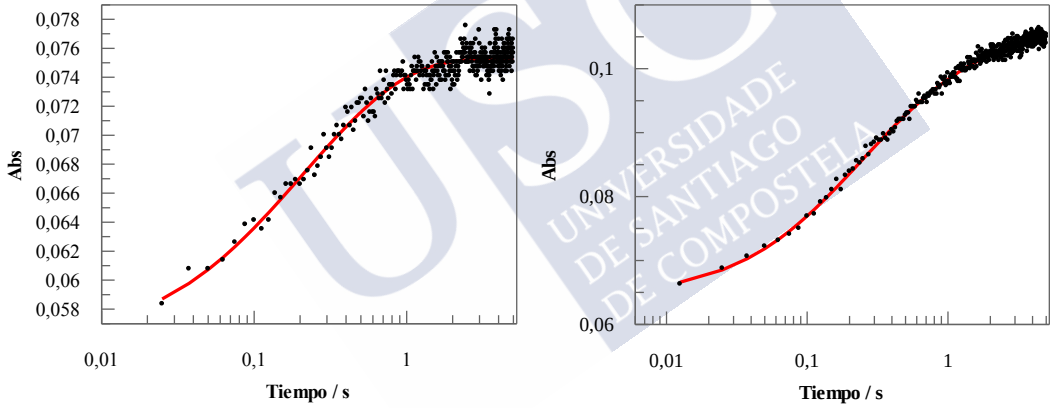


Figura A10. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C12] = 5.00 x 10^{-6} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C12] = 1.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

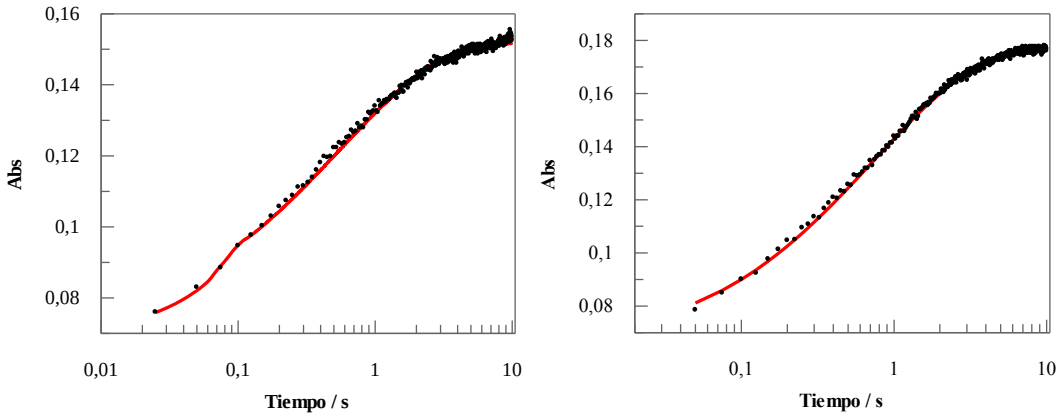


Figura A11. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C12] = 2.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C12] = 4.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

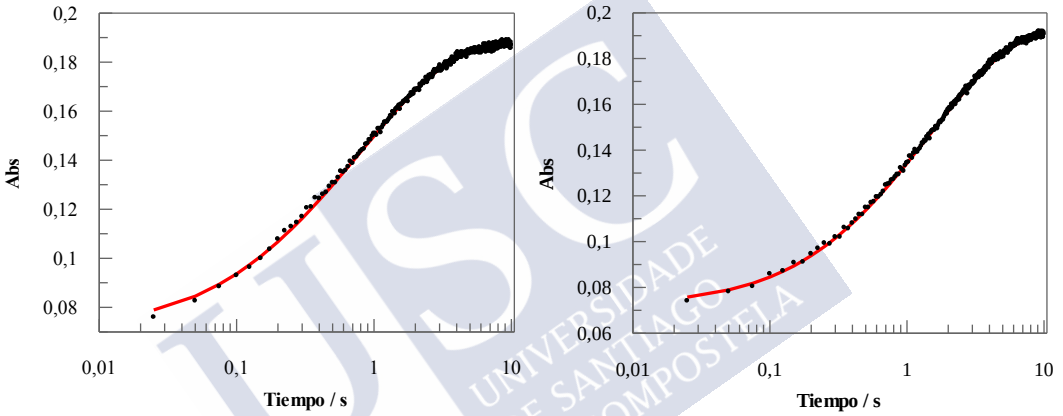


Figura A12. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C12] = 5.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C12] = 1.00 x 10^{-4} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

6.5.5 Ajustes del sistema P5TMA:C14.

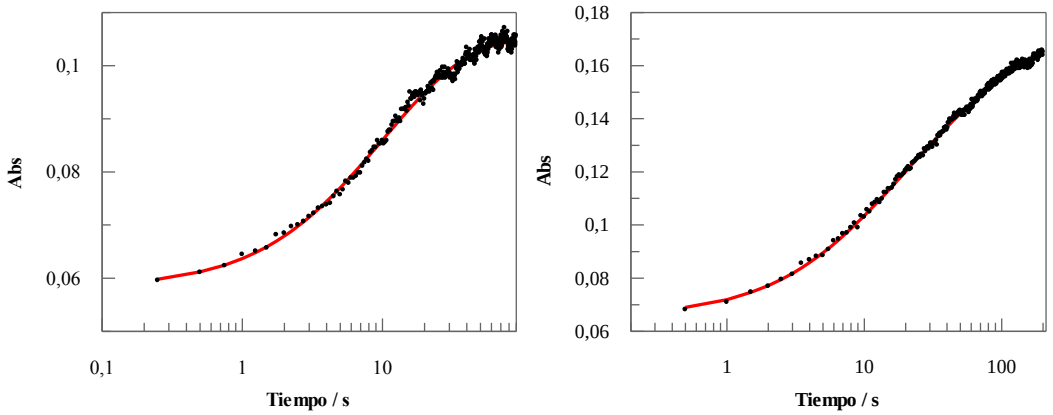


Figura A13. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C14] = 5.00 x 10^{-6} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C14] = 1.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

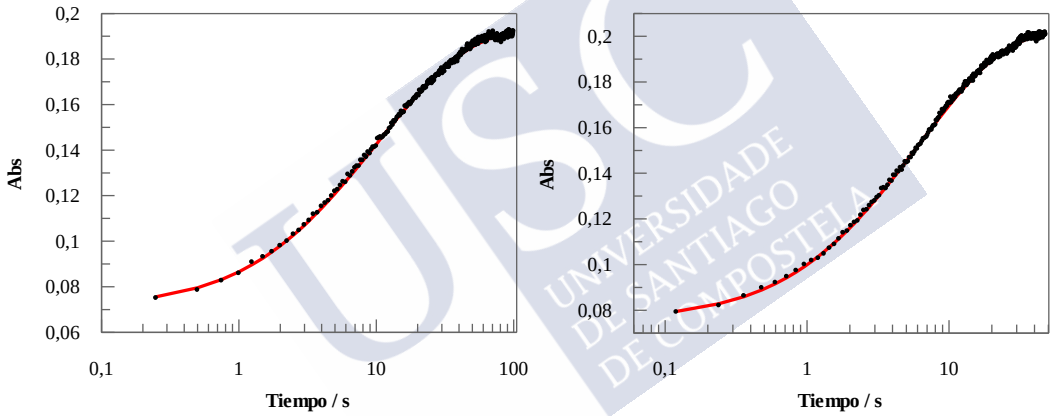


Figura A14. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C14] = 2.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C14] = 4.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

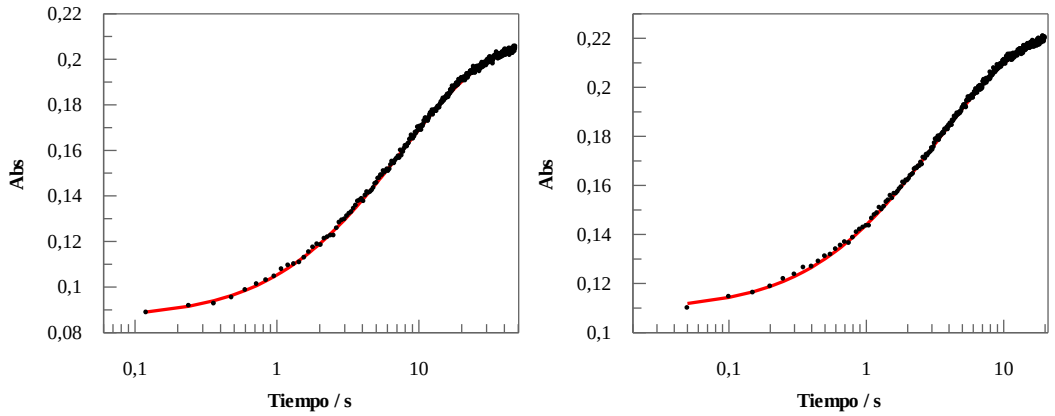


Figura A15. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C14] = 5.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C14] = 1.00 x 10^{-4} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

6.5.6 Ajustes del sistema P5TMA:C16.

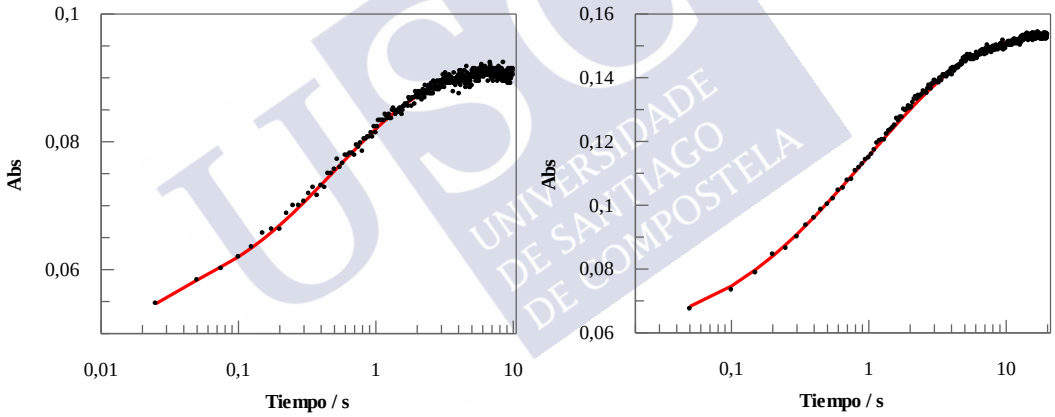


Figura A16. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C16] = 5.00 x 10^{-6} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C16] = 1.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

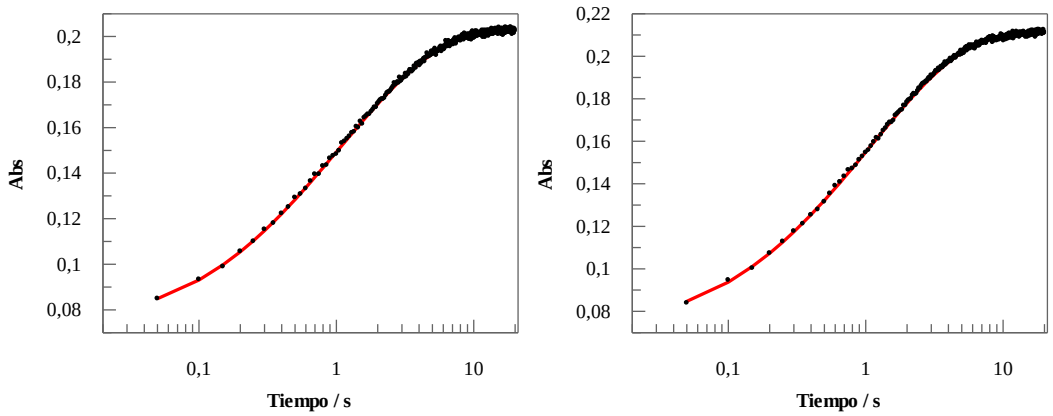


Figura A17. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C16] = 2.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C16] = 4.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

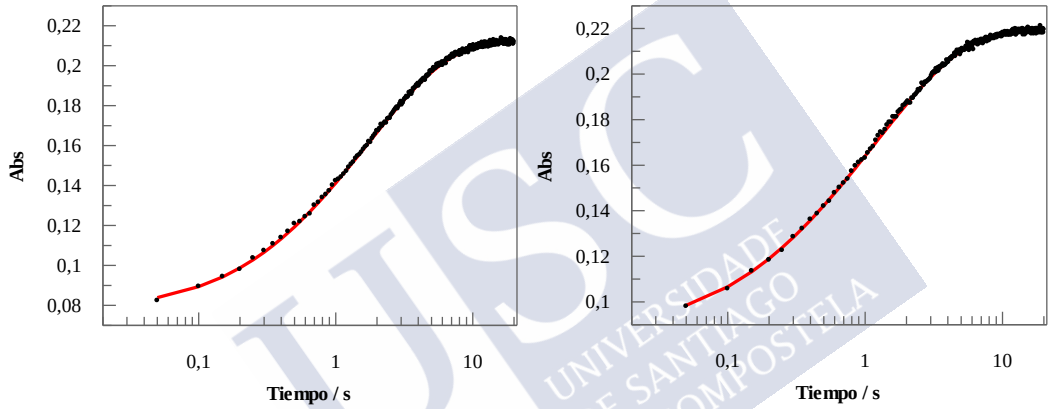


Figura A18. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C16] = 5.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C16] = 1.00 x 10^{-4} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

6.5.7 Ajustes del sistema P5TMA:C18.

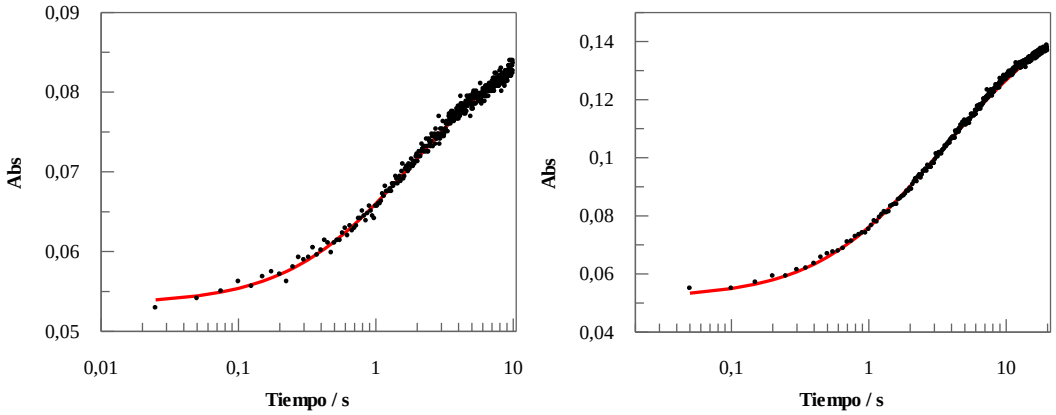


Figura A19. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C18] = 5.00 x 10^{-6} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C18] = 1.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

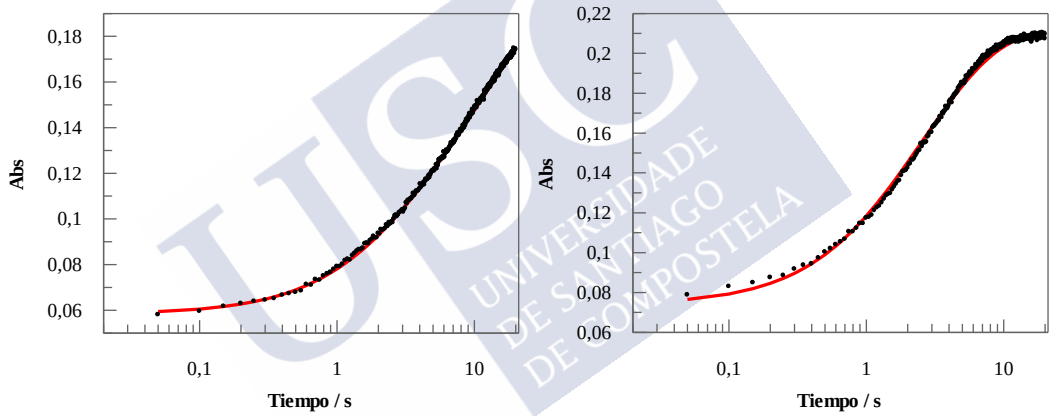


Figura A20. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C18] = 2.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C18] = 4.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

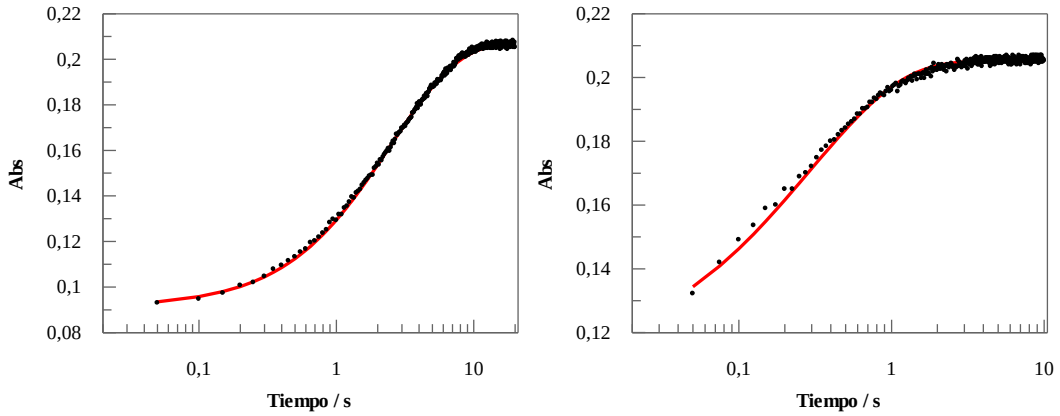


Figura A21. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C18] = 5.00 x 10^{-5} M y su ajuste representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 465 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5}M, [MO] = 1.00 x 10^{-5}M y [C18] = 1.00 x 10^{-4} M y su ajuste representado mediante una línea roja.

6.5.8 Plantilla de ajuste de cinéticas de Dynafit.

Welcome to DynaFit. Please complete the script template below.
To get started, choose menu Help :: Getting Started.

```
[task]
  data = progress
  task = fit
[mechanism]
        MO + P  <==>  MOP          : k1 k-1
        E + P --> R1               : k2
[constants]
        k1 = 1E8
        k-1 = 20 ?
        k2 = 2e7 ?
[concentrations]
        MO = 1e-5
        P = 1e-5
        E = 5e-5
[responses]
        MO = 23102.3
        MOP = 7890
[data]
plot logarithmic
  file ./Alba/Carboxilatos/Dod_var/5e-5M/Réplica1.txt
[output]
  directory ./Alba/Carboxilatos/Dod_var/5e-5M/Replica1_r

[settings]
{Output}
  XAxisLabel = time, s
  YAxisLabel = Absorbance
[end]
```

6.6 BIBLIOGRAFÍA.

(1) Yu, G.; Jie, K.; Huang, F. Supramolecular Amphiphiles Based on Host-Guest Molecular Recognition Motifs. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (15), 7240–7303. DOI: 10.1021/cr5005315.

(2) Yang, L.; Tan, X.; Wang, Z.; Zhang, X. Supramolecular Polymers: Historical Development, Preparation, Characterization, and Functions. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (15), 7196–7239. DOI: 10.1021/cr500633b.

(3) Ma, X.; Zhao, Y. Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host-Guest Interactions. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (15), 7794–7839. DOI: 10.1021/cr500392w.

(4) Mako, T. L.; Racicot, J. M.; Levine, M. Supramolecular Luminescent Sensors. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (1), 322–477. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00260.

(5) You, L.; Zha, D.; Anslyn, E. V. Recent Advances in Supramolecular Analytical Chemistry Using Optical Sensing. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (15), 7840–7892. DOI: 10.1021/cr5005524.

(6) Lewis, J. E. M.; Galli, M.; Goldup, S. M. Properties and Emerging Applications of Mechanically Interlocked Ligands. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (2), 298–312. DOI: 10.1039/C6CC07377H.

(7) Fang, L.; Olson, M. A.; Benítez, D.; Tkatchouk, E.; Goddard, W. A.; Stoddart, J. F. Mechanically Bonded Macromolecules. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (1), 17–29. DOI: 10.1039/b917901a.

(8) Hou, X.; Ke, C.; Fraser Stoddart, J. Cooperative Capture Synthesis: Yet Another Playground for Copper-Free Click Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (14), 3766–3780. DOI: 10.1039/c6cs00055j.

(9) Stoddart, J. F. The Chemistry of the Mechanical Bond. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (6), 1802–1820. DOI: 10.1039/b819333a.

(10) Sathiyajith, C. W.; Shaikh, R. R.; Han, Q.; Zhang, Y.; Meguellati, K.; Yang, Y. W. Biological and Related Applications of Pillar[n]Arenes. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (4), 677–696. DOI: 10.1039/c6cc08967d.

(11) Ke, C.; Strutt, N. L.; Li, H.; Hou, X.; Hartlieb, K. J.; McGonigal, P. R.; Ma, Z.; Iehl, J.; Stern, C. L.; Cheng, C.; Zhu, Z.; Vermeulen, N. A.; Meade, T. J.; Botros, Y. Y.; Stoddart, J. F. Pillar[5]Arene as a Co-Factor in Templating Rotaxane Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (45), 17019–17030. DOI: 10.1021/ja407229h.

(12) Ogoshi, T.; Yamagishi, T. A.; Nakamoto, Y. Pillar-Shaped Macrocyclic Hosts Pillar[n]Arenes: New Key Players for Supramolecular Chemistry. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (14), 7937–8002. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00765.

(13) Wang, Y.; Ping, G.; Li, C. Efficient Complexation between Pillar[5]Arenes and Neutral Guests: From Host-Guest Chemistry to Functional Materials. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (64), 9858–9872. DOI: 10.1039/c6cc03999e.

(14) Hu, W. B.; Hu, W. J.; Liu, Y. A.; Li, J. S.; Jiang, B.; Wen, K. Multicavity Macrocyclic

Hosts. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (82), 12130–12142. DOI: 10.1039/c6cc03651a.

(15) Yang, K.; Chao, S.; Zhang, F.; Pei, Y.; Pei, Z. Recent Advances in the Development of Rotaxanes and Pseudorotaxanes Based on Pillar[: N] Arenes: From Construction to Application. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (88), 13198–13210. DOI: 10.1039/c9cc07373f.

(16) Ogoshi, T.; Kotera, D.; Nishida, S.; Kakuta, T.; Yamagishi, T. A.; Brouwer, A. M. Spacer Length-Independent Shuttling of the Pillar[5]Arene Ring in Neutral [2]Rotaxanes. *Chem A Eur. J.* **2018**, *24* (24), 6325–6329. DOI: 10.1002/chem.201800104.

(17) Meichsner, E.; Nierengarten, I.; Holler, M.; Chessé, M.; Nierengarten, J. F. A Fullerene-Substituted Pillar[5]Arene for the Construction of a Photoactive Rotaxane. *Helv. Chim. Acta* **2018**, *101* (6). DOI: 10.1002/hlca.201800059.

(18) Paquin, F.; Rivnay, J.; Salleo, A.; Stingelin, N.; Silva, C. Multi-Phase Semicrystalline Microstructures Drive Exciton Dissociation in Neat Plastic Semiconductors. *J. Mater. Chem. C* **2015**, *3*, 10715–10722. DOI: 10.1039/b000000x.

(19) Zhou, Y.; Jie, K.; Thompson, C.; Li, N.; Yao, Y. An Ag2O-Responsive [2]Pseudorotaxane Based on the Pillar[5]Arene/Bis(Imidazolium) Dication Molecular Recognition Motif. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (16), 2091–2093. DOI: 10.1016/j.tetlet.2015.03.006.

(20) Jiang, S.; Han, Y.; Cheng, M.; Sun, J.; Yan, C. G.; Jiang, J.; Wang, L. Self-Locked Dipillar[5]Arene-Based Pseudo[1]Rotaxanes and Bispseudo[1]Rotaxanes with Different Lengths of Bridging Chains. *New J. Chem.* **2018**, *42* (10), 7603–7606. DOI: 10.1039/c7nj05192a.

(21) Cheng, M.; Wang, Q.; Cao, Y.; Pan, Y.; Yang, Z.; Jiang, J.; Wang, L. Two Pillar[5]Arene-Based Mechanically Selflocked Molecules (MSMs): Planar Chirality in Crystals and Conformer Inversion in Solutions. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57* (37), 4133–4137. DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.07.038.

(22) Wu, X.; Ni, M.; Xia, W.; Hu, X. Y.; Wang, L. A Novel Dynamic Pseudo[1]Rotaxane Based on a Mono-Biotin-Functionalized Pillar[5]Arene. *Org. Chem. Front.* **2015**, *2* (9), 1013–1017. DOI: 10.1039/c5qo00159e.

(23) Dutta, R. K.; Bhat, S. N. Interaction of Phenazinium Dyes and Methyl Orange with Micelles of Various Charge Types. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **1996**, *106* (2–3), 127–134. DOI: 10.1016/0927-7757(95)03374-2.

(24) Gehlen, M. H.; Ferreira, M.; Neumann, M. G. Interaction of Methyl Orange with Cationic Micelles and Its Effect on Dye Photochemistry. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1995**, *87* (1), 55–60. DOI: 10.1016/1010-6030(94)03956-U.

(25) Oakes, J.; Gratton, P. Kinetic Investigations of the Oxidation of Methyl Orange and Substituted Arylazonaphthol Dyes by Peracids in Aqueous Solution. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, No. 12, 2563–2568. DOI: 10.1039/a807272h.

(26) Buwalda, R. T.; Jonker, J. M.; Engberts, J. B. F. N. Aggregation of Azo Dyes with Cationic Amphiphiles at Low Concentrations in Aqueous Solution. *Langmuir* **1999**, *15* (4), 1083–1089. DOI: 10.1021/la980824i.

(27) Buwalda, R. T.; Stuart, M. C. A.; Engberts, J. B. F. N. Interactions of an Azobenzene-Functionalized Anionic Amphiphile with Cationic Amphiphiles in Aqueous Solution. *Langmuir* **2002**, *18* (17), 6507–6512. DOI: 10.1021/la020210k.

(28) Buwalda, R. T.; Engberts, J. B. F. N. Aggregation of Dicationic Surfactants with Methyl Orange in Aqueous Solution. *Langmuir* **2001**, *17* (4), 1054–1059. DOI: 10.1021/la001277f.

(29) Thendral P and Thulasidhasan J. Inclusion Complexation of Methyl Orange and Methyl Red with α- and β-Cyclodextrin: Spectral and Theoretical Study. *Int. J. Chem. Pharm. Sci.* **2018**, *9* (1), 25–33.

(30) Carrazana-García, J.; Al-Soufi, W.; Novo-Rodriguez, M.; Vazquez-Tato, J. Influence of pH on the Stability of the Incluxion Complex of Methyl Orange and β-cyclodextrin. n. In: Torres Labandeira, J. J., Vila Jato, J. L. (eds) Proc. 9th Int. Symp. Cyclodextrins, Kluwer Akademic Publishers, Dordrecht, pp 179±183.DOI: 10.1007/978-94-011-4681-4_42.

(31) Carrazana, J.; Reija, B.; Cabrer, P. R.; Al-Soufi, W.; Novo, M.; Tato, J. V. Complexation of Methyl Orange with β-Cyclodextrin: Detailed Analysis and Application to Quantification of Polymer-Bound Cyclodextrin. *Supramol. Chem.* **2004**, *16* (8), 549–559. DOI: 10.1080/10610270412331315235.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 7

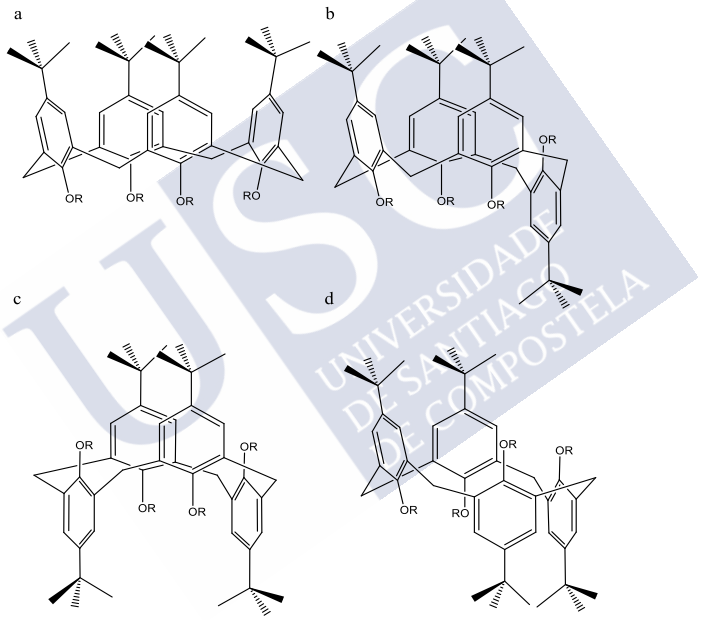
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 7: MECANISMO DE FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE ESTILBENO Y AZOBENCENO CON P5TMA Y P6TMA.

7.1 INTRODUCCIÓN.

La conformación del anfitrión determina tanto el tipo de complejo de inclusión como la estequiometría de este, por ello cobra gran importancia el estudio estructural de los macrociclos a la hora de evaluar sus propiedades como agente complejante. Ciertos macrociclos como por ejemplo los calixarenos, presentan un gran número de conformaciones debido a los dos posibles modos de rotación de las unidades fenólicas sobre el eje. El calix[4]areno, el de menor tamaño, puede adoptar cuatro diferentes : cono, cono parcial, 1,2-alternada y 1,3-alternada [1-10] (Esquema 1).



Esquema 1. Conformación de calix[4]areno: a) cono, b) cono parcial, c) 1,3-alternada y d)1,2-alternada.

Las estructuras cristalinas del calix[4]areno han revelado que este macrociclo tiende a adoptar una estructura de tipo cono, esto es debido a la estabilización que supone formar enlaces de hidrógeno entre grupos hidroxilo adyacentes [11-17] Cabe destacar que la estructura de tipo cono, aunque ligeramente deformada, se mantiene cuando se funcionalizan los hidroxilos por otros grupos funcionales [18-21]. Además, y dependiendo de los sustituyentes, los calix[4]arenos pueden adoptar la conformación de cono parcial [22], 1,2-alternada y 1,3-alternada [23-25]. Las estructuras cristalinas de calixarenos más grandes, calix[5]arenos, muestran también una conformación de cono; al igual que en el caso de los calixarenos de cuatro unidades los enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilos ayudan a estabilizar esta conformación [26]. Sin embargo, para el calix[6]areno se encuentran dos estructuras claramente diferenciadas : un calixareno con todos los grupos hidroxilo hacia el mismo lado o, una

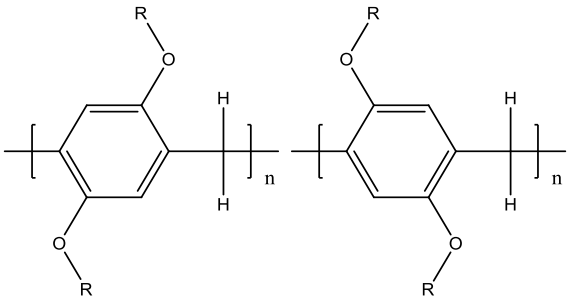
disposición en la que solo tres de ellos compartan el mismo plano [27]. En el caso de calixarenos con más de seis unidades es necesario un estudio más complejo [28,29].

En disolución, los estudios estructurales se han llevado a cabo fundamentalmente mediante ^{1}H-RMN, ya que, la multiplicidad y desplazamiento químico de las diferentes señales aportan una valiosa información estructural; por ejemplo, en el caso del calix[4]areno, el colapso de las señales a alta temperatura indican una inversión de los hidroxilos de forma que, se produce un equilibrio entre la disposición ecuatorial y axial dando lugar a dos estructuras cono opuestas pero idénticas [1, 30,31]. Los estudios de resonancia magnética nuclear han revelado que a baja temperatura los singuletes se desdoblan en un par de dobletes en el calix[5]areno mientras que, en el caso del calix[6]areno y calix[7]areno estos se desdoblan para dar tres y siete pares, respectivamente [32]. Los resultados obtenidos para el calix[8]areno fueron, sorprendentemente, muy similares al calix[4]areno [33] donde la alta flexibilidad de calixarenos grandes sólo es remarcable con disolventes capaces de romper las interacciones entre grupos hidroxilo, por ejemplo la piridina. Así mismo, se han encontrado evidencias de las conformaciones 1,3-alternada y 1,2-alternada también en disolución [23, 25a]

Finalmente, se ha determinado que los factores que influyen en las distintas conformaciones que pueden adoptar estes macrociclos son: falta de enlaces de hidrógeno en calixarenos funcionalizados [34,35], el disolvente [35-37] y efecto del sustituyente en las posiciones *para* [35-37]; estas estructuras y las constantes de interconversión asociadas pueden ser calculadas a partir de experimentos mono o bidimensionales de RMN [38]. Tal y como es de suponer, la conformación del anfitrión va a determinar tanto el tipo de complejación [39] como la estequiometria del sistema.

A diferencia de los calixarenos, los pilar[n]arenos son estructuras relativamente rígidas. Esta nueva clase de macrociclos fue sintetizada por primera vez en 2008 por el grupo de Ogoshi, la estructura está formada por unidades de 1,4-dialcoxibenceno unidas entre sí en posición para a través de puentes metileno [40]. Su estructura ha hecho posible que estos macrociclos tengan un gran número de aplicaciones en química host-guest [41], química de autoensamblaje [42] y en nuevos materiales [43] entre otros.

Hasta el momento los más estudiados son los pilararenos que contienen cinco unidades, la libertad conformacional en la cavidad permite la obtención de dos esteroisómeros quirales (pR y pS, esquema 2) en estado sólido, así como isómeros conformacionales cuando una de las unidades gira en torno al eje [44]. Las propiedades como anfitrión dependerán, por tanto, de la conformación del pilarareno en disolución, para revelar estas características se han estudiado la evolución de distintos macrociclos. La rotación de las unidades fenólicas ha sido estudiada fundamentalmente, al igual que en el caso de los calixarenos, mediante ^{1}H-RMN evaluando dos variables: el disolvente y, por tanto, el cambio en las interacciones con el medio y los sustituyentes de las cadenas.



Esquema 2. (Izquierda) Estructura de pS-Pilarareno siendo n el número de unidades de 1,4-dialcoxibenceno que forma el macrociclo. (Derecha) Estructura de pR-Pilarareno siendo n el número de unidades de 1,4-dialcoxibenceno que forma el macrociclo

El estudio del medio permite examinar la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares del P5OH; en medios apróticos como por ejemplo la acetona, esta interacción se vuelve más fuerte a medida que disminuye la temperatura, esto se traduce en un desplazamiento de la señal correspondiente al OH a campo bajo y un desdoblamiento del singulete inicial. Este cambio en la multiplicidad indica que la interconversión de las unidades fenólicas entorno al eje formado por los puentes metilénicos es lenta en la escala de tiempos del experimento de RMN. Sin embargo, cuando el disolvente es metanol, medio prótico y polar, no se observa este comportamiento incluso a bajas temperaturas; esto indica que las interacciones son más débiles y, por tanto, las unidades fenólicas pueden rotar libremente en torno al eje [45,46].

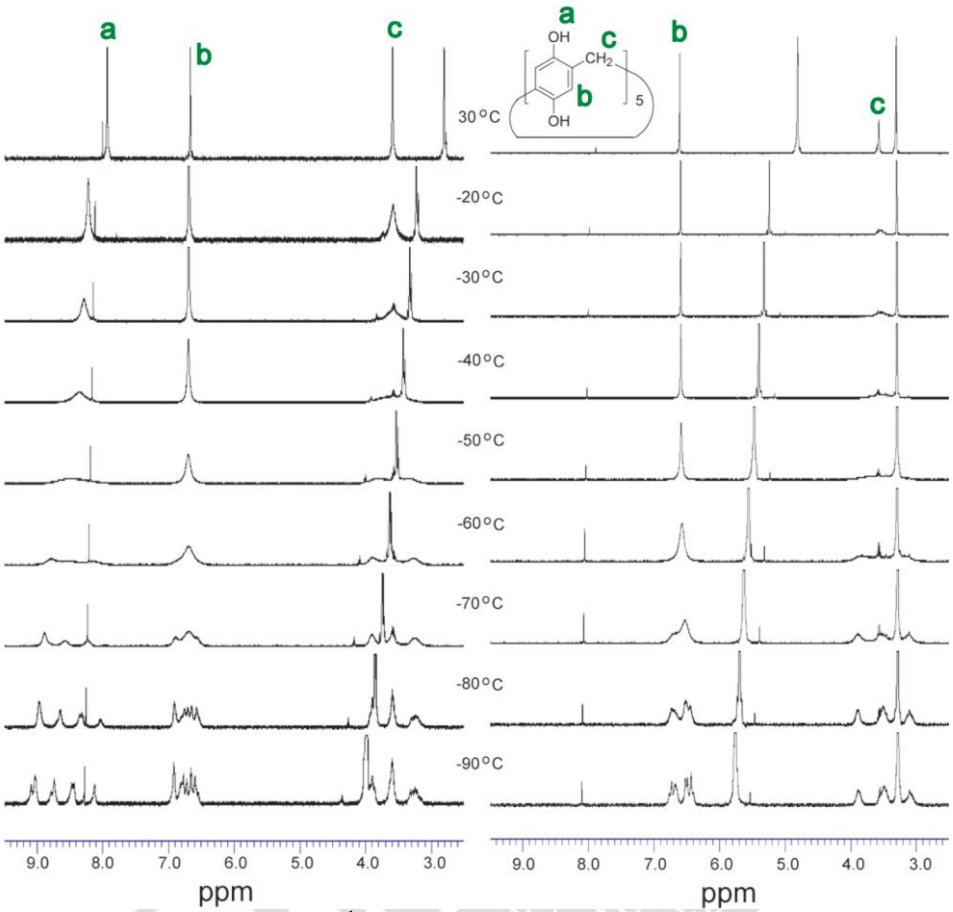
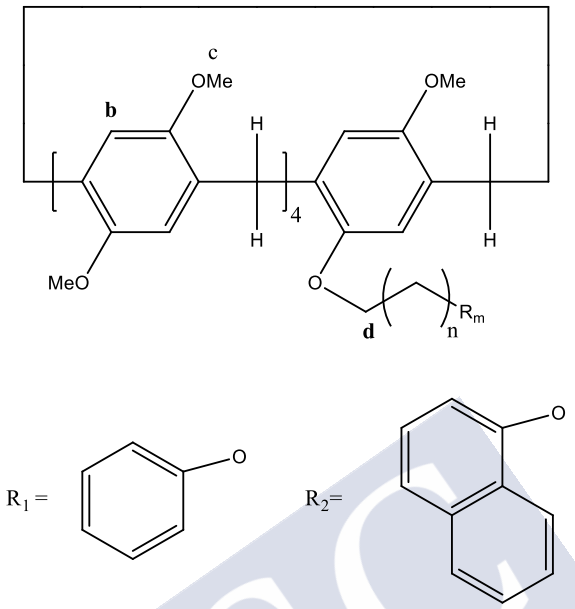


Figura 1. (Izquierda) Variación del espectro de ^{1}H-RMN de P5OH en acetona-d_6. (Derecha) Variación del espectro de ^{1}H-RMN de P5OH en metanol-d_4. Reproducido con permiso desde ref 45.

La sencilla funcionalización de los pilar[n]arenos ha permitido ampliar el estudio planteado anteriormente. En el caso del P5OMe la ausencia de enlace de hidrógeno permite una rotación entorno al eje mucho más rápida que en el caso del P5OH, no se observa el desdoblamiento de las señales a baja temperatura [45-46]. La funcionalización con cadenas alquílicas ha revelado que se obtiene tanto el producto *pS* como el *pR* como resultado de la síntesis, en tolueno las señales correspondientes al puente colapsan a medida que aumenta la temperatura (0ºC) mientras que con disolventes como cloroformo o acetona lo hacen a 25ºC; el movimiento es tan rápido que es imposible distinguir ambas estructuras [47]. Algunos estudios proponen que a medida que aumenta el tamaño de las cadenas alquílicas disminuye la libertad conformacional impidiéndose la rotación a partir de cadenas de seis carbonos [46] mientras que, en otras referencias bibliográficas, se encuentran evidencias de que la rotación no se impide incluso con cadenas alquílicas de doce carbonos [48,49]. La inclusión de grupos más voluminosos en el extremo de las cadenas alquílicas permitió estudiar de nuevo la importancia de la longitud de la cadena, llegando a la conclusión de que, en este caso, el tamaño de la cadena afecta de manera crítica a la rotación; se abre por tanto una importante aplicación de los pilar[n]arenos como receptores quirales [48]. En el estudio de copilararenos, se pone de nuevo de manifiesto la importancia de la longitud de la cadena, así como de la presencia de grupos voluminosos; la libertad conformacional se ve reducida cuanto mayor sea

la longitud de esta y, cuanto mayor sea la proximidad entre grupos voluminosos y la cavidad del macrociclo [50].



Esquema 3. Estructura de copilarareno (P5C) con nomenclatura de cada uno de los protones analizados en la figura 2.

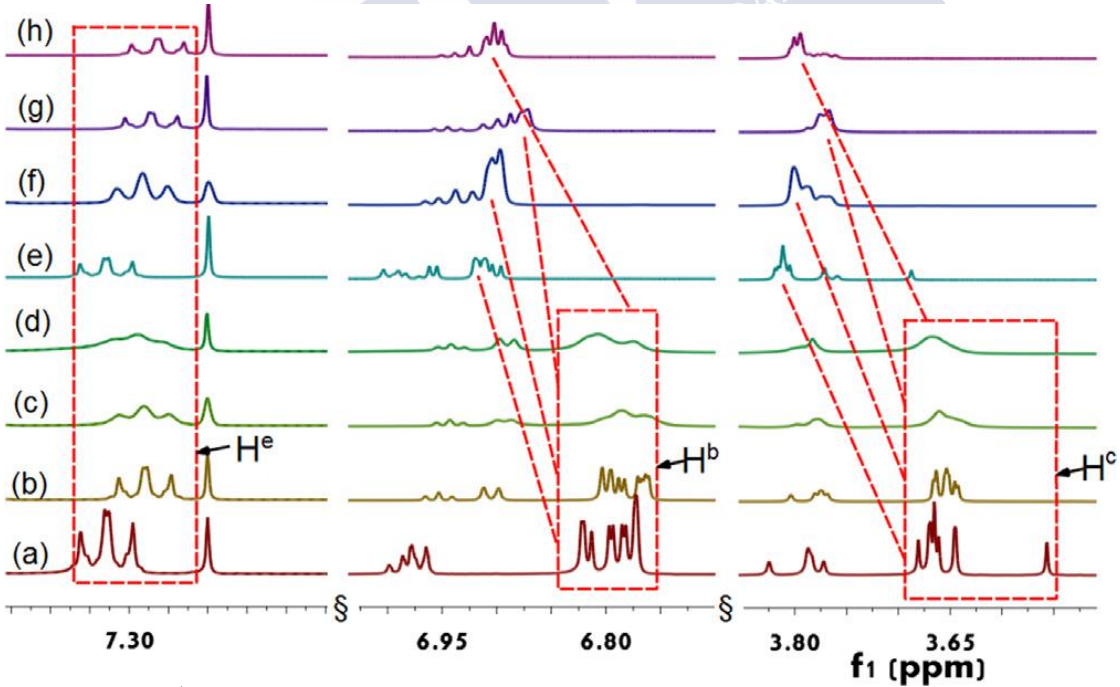


Figura 2. Espectro de ^{1}H-RMN (600 MHz, $CDCl_3$, 298 K) de (a-f) P5C con n = 2,4,6,8 y m = 1 (e-h) P5C con n = 2,4,6,8 y m = 2 en mezclas equimolares con 1,4-dibromobutano (18.8 mM). Reproducido con permiso desde ref 50.

Paralelamente a los estudios mediante resonancia magnética nuclear, se han llevado a cabo estudios computacionales que han determinado que la estructura más estable, la de menor energía, es aquella donde se encuentran dos posiciones alternas invertidas. Los

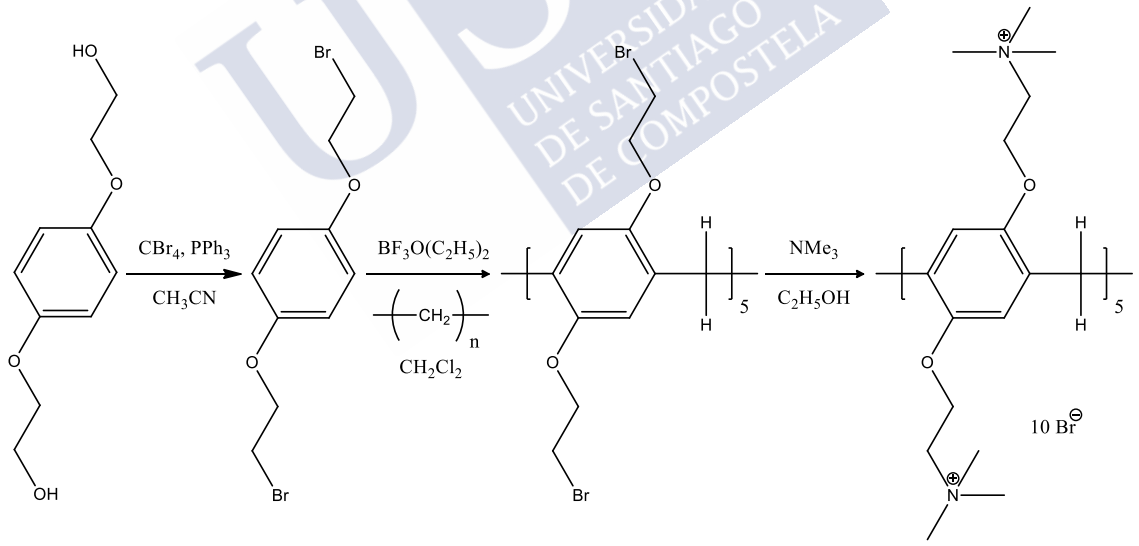
estudios se han llevado a cabo mediante la modelización en fase gas y, también, incluyendo diversos disolventes; estos estudios han permitido calcular la distribución electrónica [51].

Por último, se ha estudiado la influencia de la formación de complejos de inclusión sobre la rotación; en todos los casos, la inclusión de una sonda en la cavidad del pilar[n]areno impide la rotación de las cadenas fijando, por tanto, una disposición [45,47,50].

7.2 MÉTODO EXPERIMENTAL.

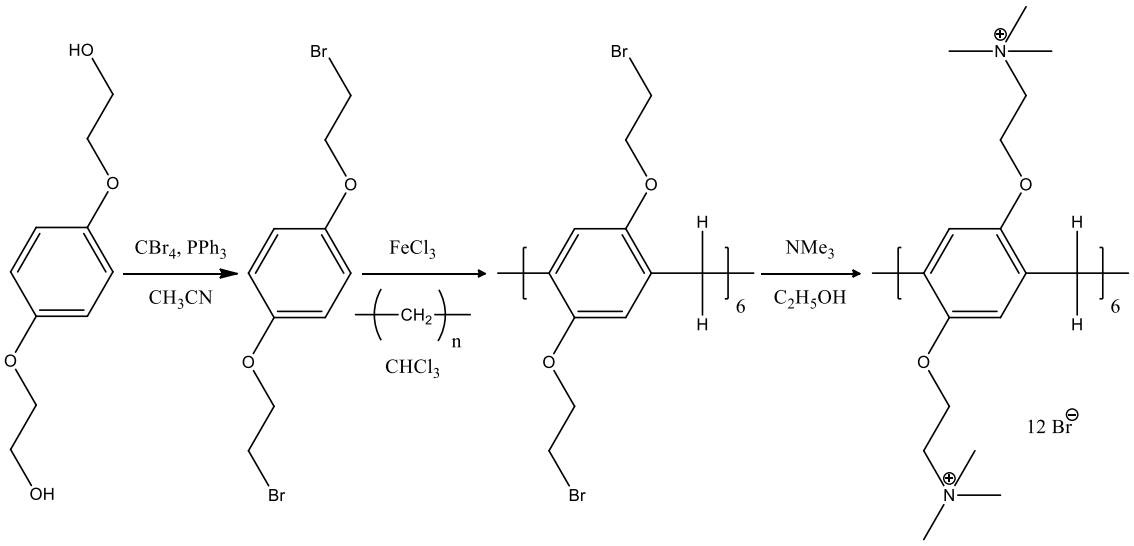
Todos los reactivos y disolventes utilizados en este trabajo fueron obtenidos comercialmente siendo en todos los casos de la máxima pureza disponible a excepción del P5TMA y P6TMA.

Preparación de reactivos y compuestos: La ruta sintética seleccionada para la obtención del bromuro de bis[(trimetilamonio)etoxi]pilar[5]areno (P5TMA) se muestra en el esquema 4. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich siendo de la mayor pureza disponible, de forma que se utilizan sin purificación adicional. La metodología y la caracterización detallada se muestran en el apéndice 3.5.1 del capítulo 3.



Esquema 4. Ruta sintética seleccionada para la elaboración de P5TMA.

La ruta sintética seleccionada para la obtención del bromuro de bis[(trimetilamonio)etoxi]pilar[6]areno (P6TMA) se muestra en el esquema 5. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich siendo de la mayor pureza disponible, de forma que se utilizan sin purificación adicional. La metodología y la caracterización detallada se muestran en el apéndice 3.5.2 del capítulo 3.



Esquema 5. Ruta sintética seleccionada para la elaboración de P6TMA.

Espectroscopía RMN. Los experimentos se realizan en un espectrofotómetro Bruker NEO-750 equipado con sonda HCN y gradiente PFG para el uso de tubos convencionales de 5 mm, los espectros se toman a una temperatura constante de 25ºC.

El estudio del del ácido 4,4´-estilbendicarboxilico puro se mide a partir de una muestra de concentración 1mM en D_2O, se realizan un espectro monodimensional de protón y, además, varios experimentos bidimensionales: HSQC y HMBC. El estudio del P5TMA se realiza sobre una muestra de concentración 1mM en D_2O. En este caso sólo es necesario la obtención de un espectro monodimensional de ^1H.

El estudio de la mezcla de estilbeno y P5TMA se realiza sobre una mezcla con relación 1:1 usando D_2O como disolvente. Los espectros de ^1H monodimensionales se toman a los 5 minutos, 25 horas, 9 días y 14 días tras la preparación de la mezcla; la muestra se mantiene a 25ºC durante todo el proceso. Tras el transcurso de las primeras 25 horas se realizan varios experimentos bidimensionales: TOCSY, HSQC y HMBC. Al cabo de 14 días se realiza otro experimento bidimensional, en este caso un NOESY.

Realización de un espectro SELINCOR [52] monodimensional de ^{13}C de acopamiento doblemente selectivo, realización mediante la secuencia ``*1dghsqcdosel´´* de la base de datos de Bruker; el experimento se realiza tanto para el estilbeno puro como para la mezcla P5TMA:estilbeno (tras 14 días de realizar la mezcla de ambos compuestos) El pulso es del tipo *"Q3_surbop"* con un tiempo de duración de 522 µs, el pulso se aplica en el centro de la región aromática de 130 ppm cubriendo una banda de 50 ppm; cada uno de los espectros es obtenido tras 4096 *scans* siendo el tiempo espera entre pulsos de 1s (d_1) y el tiempo de adquisición del FID (AQ) 2.4s.

Modelización molecular. Los modelos de complejos formados entre el P5TMA y el estilbeno se realizan con el programa ChemDraw y Chem3D incluidos en el *software* ChemOffice v16.0 (PerkinElmer inc). Los dos modelos iniciales del P5TMA son establecidos

con una configuración completamente simétrica del tipo 11111 y, con una configuración no simétrica del tipo 10101; se genera, además, un modelo para la molécula de estilbeno. La geometría de cada uno de los modelos es optimizada hasta alcanzar el mínimo de energía. A continuación, se construyen los modelos iniciales de los complejos formados por P5TMA y el estilbeno de forma manual, se sitúa el estilbeno en el centro de la cavidad del P5TMA con configuración 11111 y 10101, para a continuación, optimizar el proceso. El proceso de minimización de la energía se realiza mediante la base MMFF94 incluida en el *software* Vega ZZ v3.1 (*Drug Design Lab*.)

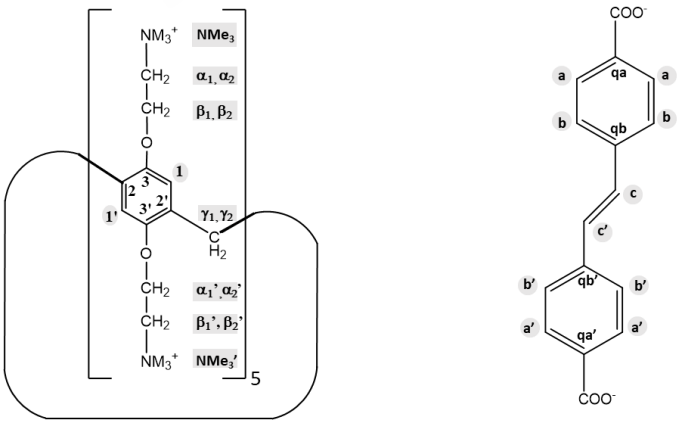
Espectroscopía UV-Vis. Los espectros de absorción y el estudio cinético se registran en un espectofotómetro Cary 500 equipado con soporte de celda termostatizado mediante flujo de agua. Las trazas cinéticas son medidas a 327 y 350 nm para ácido 4,4´-estilbendicarboxilico y ácido azobenceno-4,4´-dicarboxilico, respectivamente. Para el ajuste de los datos experimentales se ha utilizado el *software* comercial *Dynafit* utilizando los modelos mencionados posteriormente.

7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.3.1 Estudio del ácido 4,4'-estilbendicarboxílico.

7.3.1.1 Estudio mediante RMN.

La evolución temporal de la mezcla de estilbeno y P5TMA (esquema 6) se ha monitorizado mediante experimentos de ^{1}H-RMN realizados a los 5 minutos, 25 horas, 9 días y 14 días después de mezclar ambas moléculas con una estequiometria 1:1 (1.00 mM cada una de ellas) La región aromática y alifática del espectro se muestra en las Fig.3 y Fig.4, respectivamente.



Esquema 6. Estructura del P5TMA y del estilbeno con la asignación y nomenclatura de cada uno de sus protones.

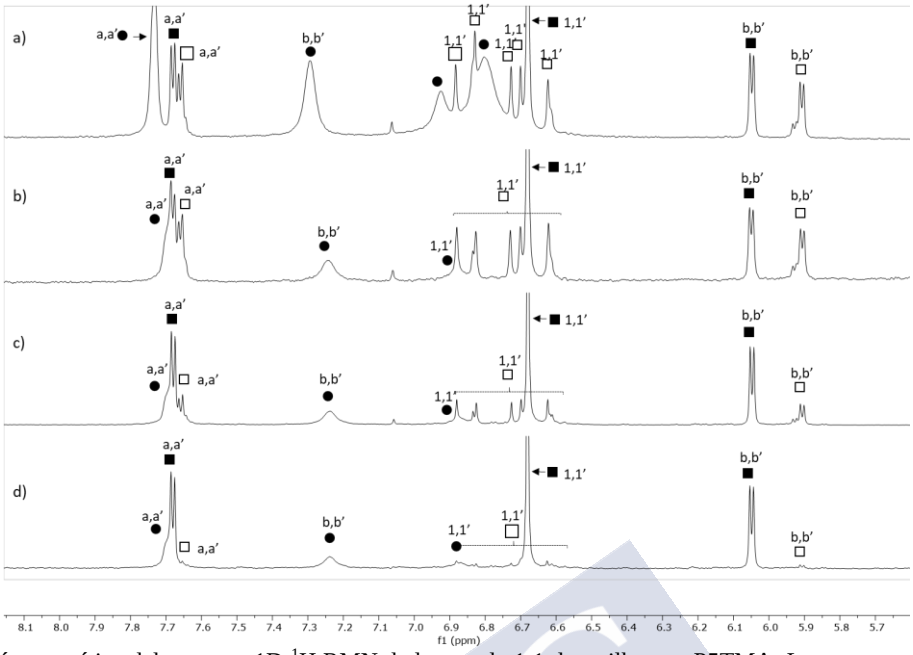


Figura 3. Región aromática del espectro 1D ^{1}H RMN de la mezcla 1:1 de estilbeno y P5TMA. Los espectros de a) a d) han sido tomados tras un tiempo de mezclado de: a) 5 min., b) 25 horas, c) 9 días, y d) 14 días. Las señales correspondientes al complejo cinético y termodinámico se indican mediante cuadrados blancos y negros, respectivamente. Las señales del complejo externo se indican mediante círculos negros. La intensidad está normalizada respecto a la intensidad de la señal 1, 1´ marcada con un cuadrado negro.

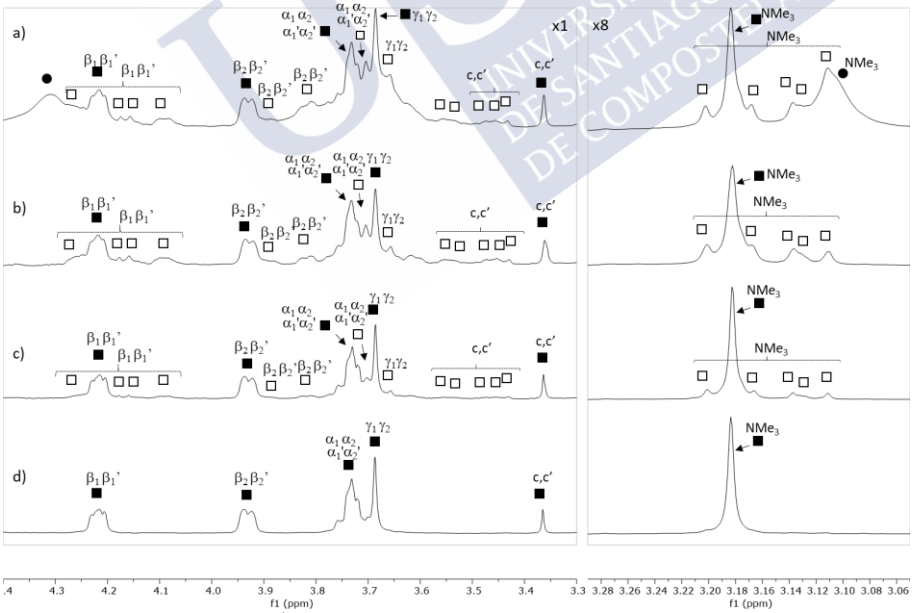


Figura 4. Región alifática del espectro 1D ^{1}H RMN de la mezcla 1:1 de estilbeno y P5TMA. Los espectros de a) a d) han sido tomados tras un tiempo de mezclado de: a) 5 min., b) 25 horas, c) 9 días, y d) 14 días. Las señales correspondientes al complejo cinético y termodinámico se indican mediante cuadrados blancos y negros, respectivamente. Las señales del complejo externo se indican mediante círculos negros. La intensidad está normalizada al igual que en la Figura 2.

La formación de un complejo de inclusión entre el P5TMA y el estilbeno se evidencia en este conjunto de espectros mediante la aparición de numerosas señales en la zona

aromática. Además, las señales correspondientes a los compuestos puros sufren grandes modificaciones al ser comparadas con las señales de la mezcla de reacción (Fig. 6 y Fig. 7).

Mediante la combinación de experimentos bidimensionales (TOCSY, HSQC y HMBC) se han podido asignar las señales de la mezcla de ambos componentes. El espectro de TOCSY (Fig. 7) ha sido especialmente útil para la identificación de las señales correspondientes a los anillos aromáticos del estilbeno, especialmente significativo es el hecho de que la resonancia de estos protones se encuentre cuatro unidades por debajo del estilbeno puro, la asignación fue posible mediante la combinación de HSQC y HMBC (Fig. 8)

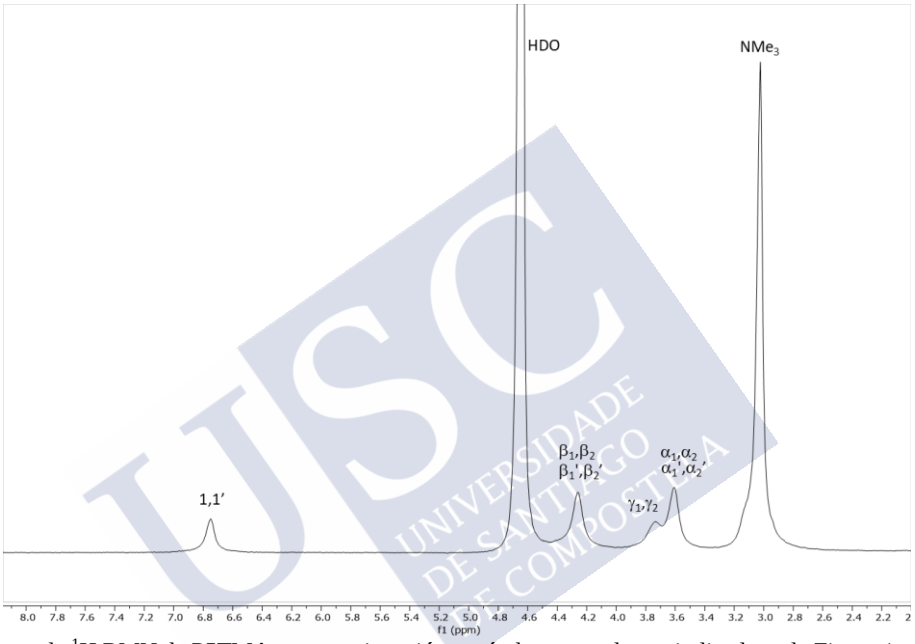


Figura 5. Espectro de ^{1}H RMN de P5TMA puro y asignación según la nomenclatura indicada en la Figura 1.

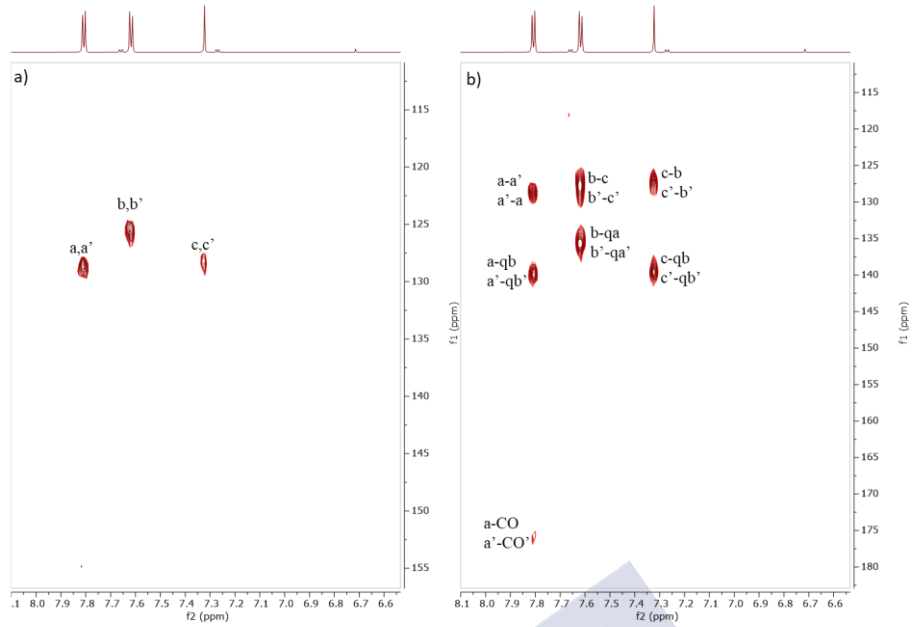


Figura 6. Asignación del estilbeno puro según la nomenclatura indicada en la Figura 1 mediante a) HSQC b) HMBC.

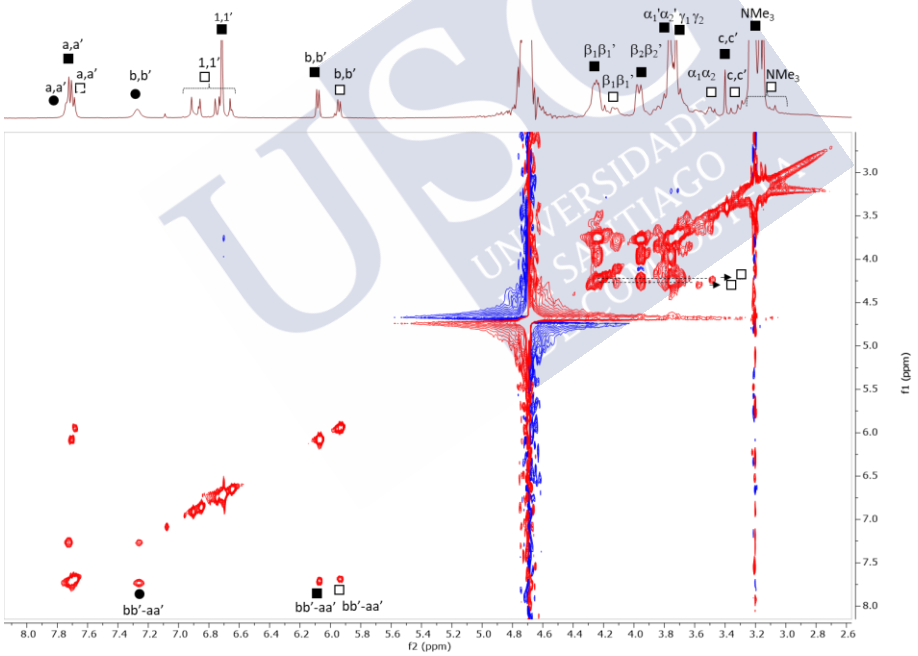


Figura 7. Espectro 2D TOCSY (mix. 80 ms) de la mezcla 1:1 de estilbeno y P5TMA después de 14 de preparación de la muestra. Las señales correspondientes al complejo cinético y termodinámico se indican mediante cuadrados blancos y negros, respectivamente.

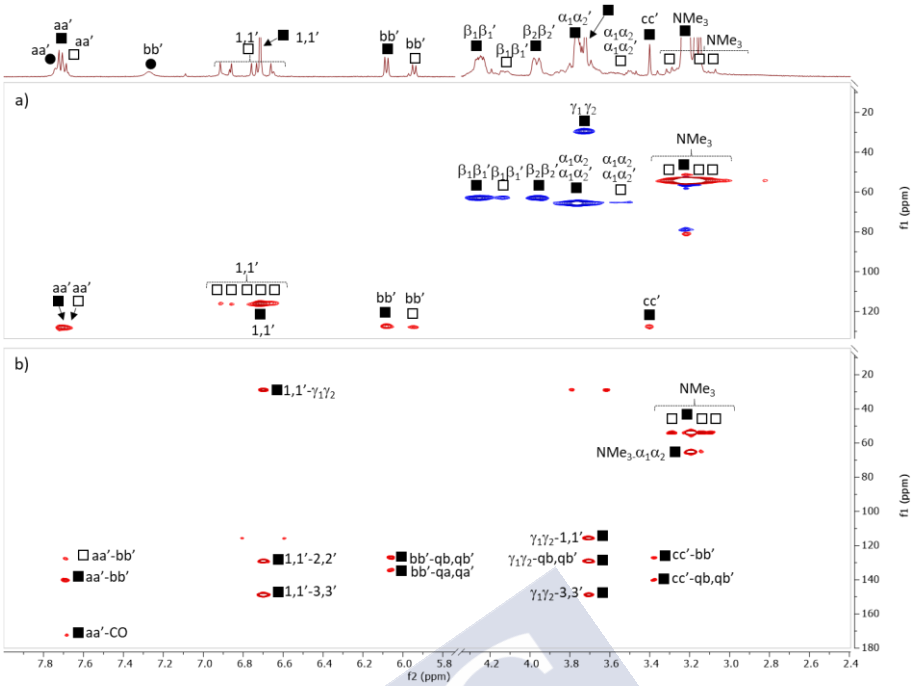


Figura 8. a) espectro 2D HSQC b) espectro 2D HMBC de la mezcla 1:1 de estilbeno y P5TMA después de 25 horas de preparación de la muestra.

La asignación de las señales en los diferentes espectros de la mezcla ha permitido identificar tres tipos de complejos diferentes: complejos externos, complejo cinético y complejo termodinámico.

Complejos externos: el conjunto de señales correspondiente a este tipo de complejo se indica en la figura 3 y 4 con círculos negros; todas las señales son considerablemente anchas y solo algunas de ellas pueden ser asignadas específicamente a protones del estilbeno o del P5TMA. Cabe destacar que las señales correspondientes a aproximadamente 6.9, 6.8, 4.31 y 3.10 ppm solo aparecen en el espectro de ^{1}H-RMN tomado a los 5 min (Fig. 3a y 4a) desapareciendo por completo en los siguientes experimentos (Figura 3b a 3d y 4b a 4d). La intensidad de los picos situados en 7.7 y 7.25 ppm se mantiene prácticamente constante después de un brusco descenso al transcurrir los primeros 5 min de reacción. Los experimentos de TOCSY después de 25h (Fig. 7) y NOESY después de 14 días (Fig. 9) permiten la asignación de los protones a, a´, b, b´ y de 1, 1´. Considerando el desplazamiento químico de este par de picos se puede apreciar como estos no están afectados por la cavidad del macrociclo, tal y como sucederá tanto en el complejo cinético como en el termodinámico. La única explicación posible, por tanto, sería la formación de un complejo externo entre ambas moléculas; el estilbeno estará ligado al P5TMA pero no dentro de la cavidad del mismo. El hecho de que estos picos no sean especialmente anchos denota que los complejos formados tienen una cierta heterogeneidad conformacional y, con una dinámica de intercambio lenta o intermedia con respecto a la escala de tiempos. Por lo tanto, las señales que desaparecen transcurridos los primeros 5 min pueden ser asignados a complejos externos inestables mientras que las que permanecen tras 14 días representarían complejos externos estables.

Complejo cinético: las señales correspondientes a este tipo de complejo se señalizan con cuadrados en las figuras 3 y 4. La intensidad relativa de estas señales aumenta hasta alcanzar un máximo desde la mezcla de ambas moléculas y, una vez alcanzada, disminuye progresivamente en un período de 14 días. Este comportamiento se asocia a la rápida formación de un complejo cinético que evoluciona lentamente para dar lugar a un complejo mucho más estable, el termodinámico. El desplazamiento químico de los protones b, b´ y c, c´ del estibeno (Fig. 2) que forma parte de este complejo aparecen a 5.9 y aproximadamente 3.45-3.6 ppm, respectivamente. El desplazamiento químico de estas señales es significativamente diferente al estilbeno puro cuyas señales aparecen a 7.62 y 7.32 ppm, respectivamente (Fig. 6). Los cambios anteriormente mencionados solo pueden justificarse si el estilbeno se introduce en la cavidad del P5TMA, una disposición en la que alguno de los protones del estilbeno se coloquen en un plano paralelo a algunos o todos los protones aromáticos del macrociclo. Es especialmente interesante el comportamiento del P5TMA dado que, ciertas señales correspondientes al macrociclo se desdoblan para dar lugar a cinco señales en el espectro tomado a 25h, como ejemplo de este comportamiento se encuentra en las señales 1, 1´ (Fig. 3) y las correspondientes al grupo NMe_3 (Fig. 4), el experimento de TOCSY (Fig. 7) fue fundamental para la asignación. Este patrón de desdoblamiento ocurre en todas las señales, sin embargo, su asignación es menos clara debido al ensanchamiento y solapamiento de las mismas. El desdoblamiento de las señales del P5TMA indica que en la formación del complejo se pierde la simetría con respecto al P5TMA puro.

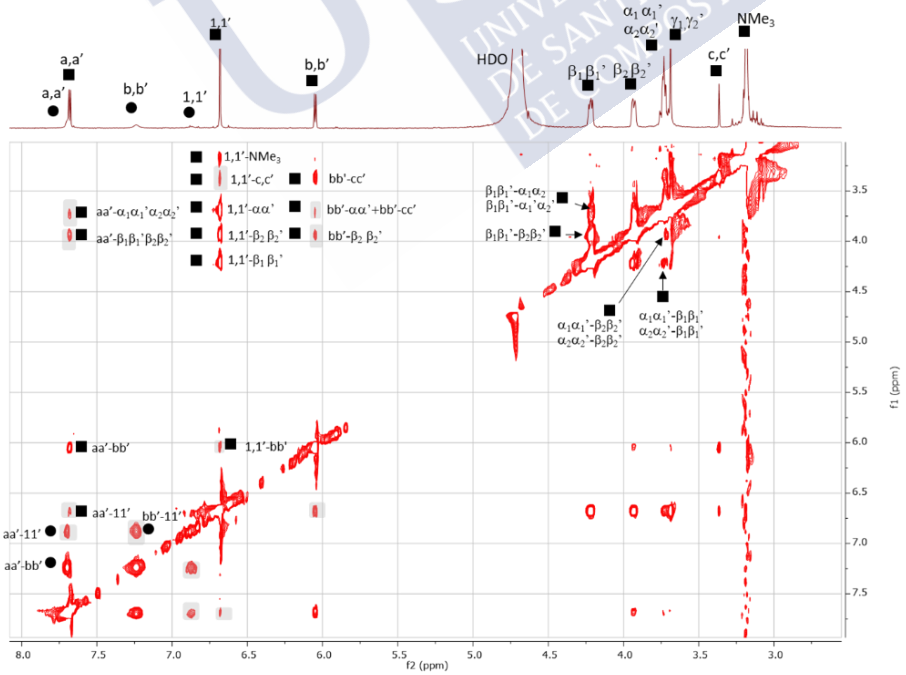


Figura 9. Espectro de 2D NOESY (tiempo de 250 ms) de una mezcla 1:1 de estilbeno y P5TMA después de 14 días de preparación de la muestra. Las señales correspondientes al complejo termodinámico y a los complejos externos se indicant con cuadrados negros y círculos negros, respectivamente.

Complejo termodinámico: las señales correspondientes a este complejo se indican con cuadrados blancos en las figuras 3 y 4. La intensidad relativa de las señales correspondientes a este tercer complejo aumenta durante el tiempo de estudio alcanzando un máximo a los 14 días de reacción, siendo este proceso paralelo a la disminución de intensidad explicado en el apartado 2. Este comportamiento, por tanto, indica la conversión del complejo cinético en un nuevo complejo mucho más estable. Alguna de las señales asociadas al complejo termodinámico sufre un cambio en el desplazamiento químico análogo al mencionado anteriormente para el complejo cinético. Los cambios más significativos se corresponden al cambio de los protones b, b´ y c, c´ del estilbeno asignados en 6.05 y 3.36 ppm, respectivamente, en comparación a las señales del estilbeno puro donde estas aparecen a 7.62 y 7.32 ppm, respectivamente (Fig. 5 y 6) El extremo cambio en los desplazamientos químicos indica la total internalización del estilbeno en la cavidad del P5TMA. Es especialmente relevante el hecho de que, en contraste con lo sucedido con el complejo cinético, las señales correspondientes tanto al estilbeno como al P5TMA aparecen como singuletes; la nueva multiplicidad indica, por tanto, que el complejo formado entre ambos compuestos debe tener una alta simetría.

Tomando como referencia los estudios previos, en este estudio se propone un mecanismo que explique la formación y evolución de los tres tipos de complejos explicados anteriormente (Fig. 10).

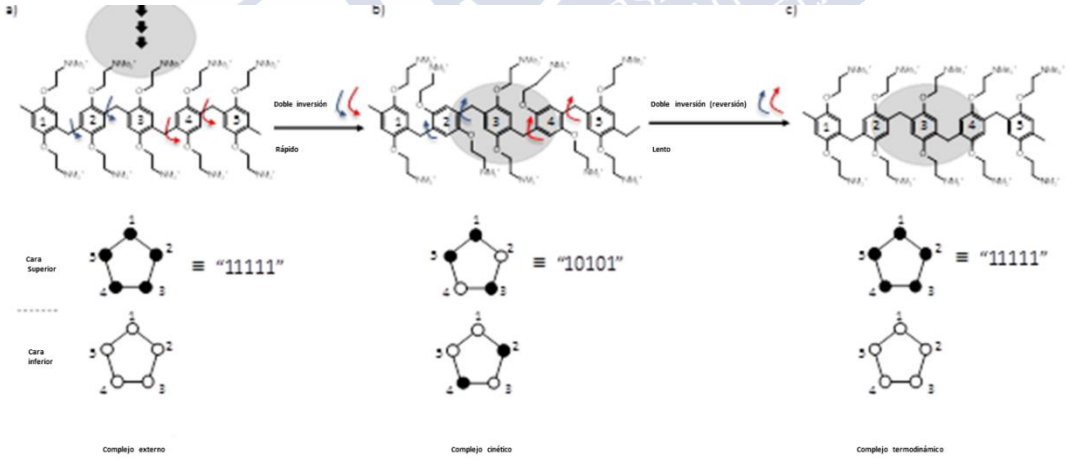


Figura 10. Mecanismo propuesto para la formación de complejos entre el estilbeno y el P5TMA que implica diferentes etapas: a) formación de complejos externos, b) formación de complejo cinético y c) formación de complejo termodinámico. La elipse gris representa a la molécula de estilbeno. La simetría del P5TMA se indica en cada uno de los complejos mediante la notación 10101 o 11111.

El primer paso consiste en la rápida formación de complejos externos (Figura 10a) donde el estilbeno no se introduce en la cavidad del P5TMA.

En el segundo paso se plantea un proceso relativamente rápido donde dos unidades del P5TMA no consecutivos invierten su posición dando lugar a una cavidad asimétrica del tipo 10101 (Fig. 10b), de esta forma se abre un espacio mayor en la cavidad que permite la

inserción del estilbeno. Además, la neutralización de una de las cargas facilita la inserción. Este proceso de inversión ocurre de forma simultánea a la entrada del anfitrión dando lugar al complejo cinético cuya estructura se puede modelizar (Fig. 11) La asimetría de la cavidad es consistente con el desdoblamiento de las señales estudiadas anteriormente para el protón 1, 1´ así mismo, la inserción en la cavidad es justificada mediante la gran perturbación sufrida por los protones c, c´ correspondientes al estilbeno.

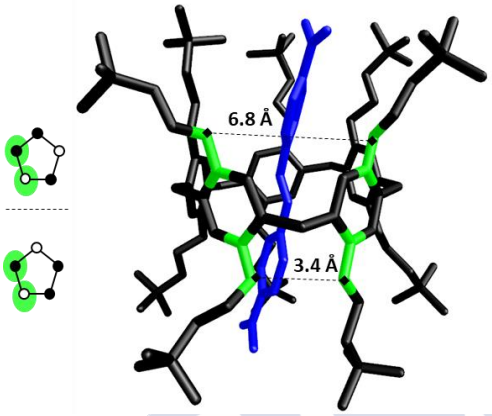


Figura 11. Modelo molecular optimizado del complejo cinético formado entre el estilbeno y P5TMA con configuración de cavidad del tipo 10101. Se indican también las distancias intermoleculares.

En el último paso se plantea la transformación del complejo cinético en un nuevo complejo mucho más estable. Tal y como se indica en la Figura 10c se produce la inversión de las dos unidades de P5TMA que habían girado anteriormente de forma sincrónica con la completa penetración del estilbeno en la cavidad del P5TMA. En este proceso es necesario superar las barreras energéticas, mayores que en los pasos anteriores, dado que las unidades tienen que girar con la presencia del estilbeno en la cavidad; esto explica que sea una etapa mucho más lenta. Al final de este proceso se forma el complejo termodinámico (Fig. 12) que presenta una alta simetría siendo la cavidad del tipo 1111. La cavidad 11111 es consistente con los resultados discutidos anteriormente donde las señales correspondientes a los diez protones 1, 1´aparecen como un singulete. De forma análoga, la inclusión del estilbeno en la cavidad de P5TMA es consistente con el gran desplazamiento químico que sufren los protones c, c´. Mediante los experimentos de NOESY (Fig. 9) se ha obtenido información adicional que permite confirmar esta estructura, hay NOEs intermoleculares para las señales correspondientes al complejo termodinámico tales como NOE 1,1´-c,c´y NOE 1,1´, αα´ que prueban la inserción del estilbeno en la cavidad del pilararenо.

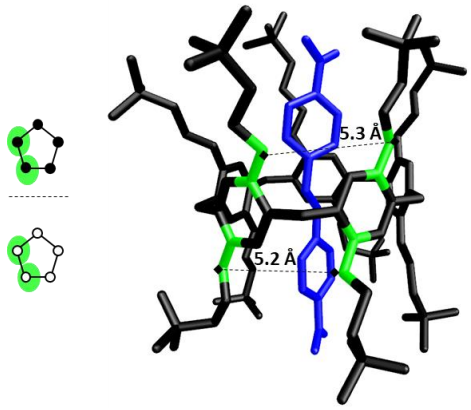


Figura 12. Modelo molecular optimizado del complejo cinético formado entre el estilbeno y P5TMA con configuración del tipo 11111. Se indican también las distancias intermoleculares.

La configuración Z/E del estilbeno que forma parte del complejo termodinámico fue determinado midiendo el valor de la constante de acoplamiento $^{3}J_{HcHc'}$ mediante el espectro SELINCOR [53] obteniéndose un valor de 16.2 Hz (Fig. 13). Se realizó el mismo experimento con el estilbeno puro calculándose un valor de $^{3}J_{HcHc'}$ de 16.7 Hz (Fig. 14) Ambos valores, el del estilbeno puro y el del estilbeno que forma parte del complejo termodinámico, son consistentes con una configuración E del doble enlace. Este último experimento nos ha permitido descartar que los cambios observados en los experimentos de RMN sean el resultado de un cambio en la configuración del E-estilbeno a Z-estilbeno [53].

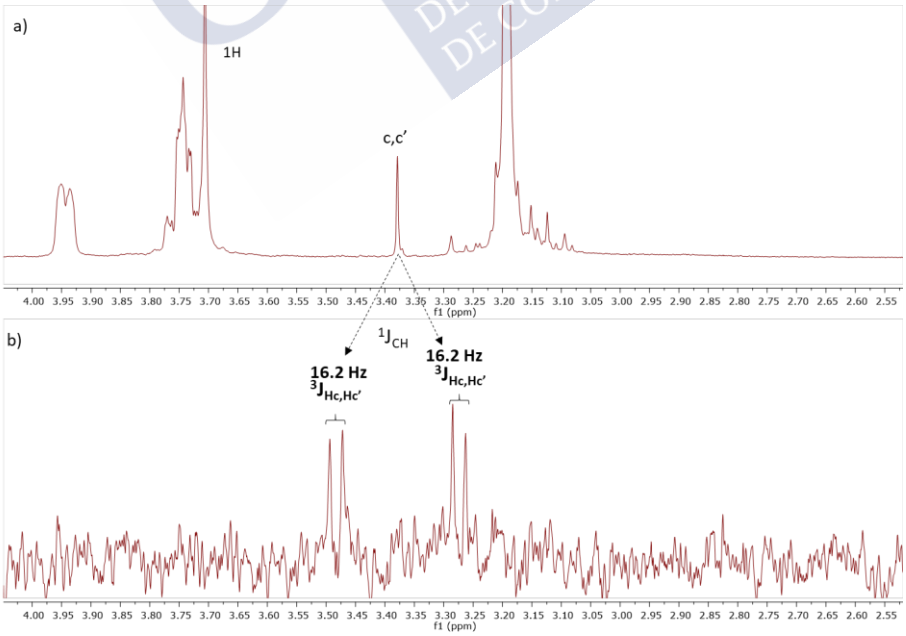


Figura 13. Espectro de RMN de la mezcla 1:1 de estilbeno y P5TMA después de 14 días de preparación de la muestra a) espectro de ^{1}H con la asignación de los protones c,c´y b) 1D SELINCOR doble selectivo usado para los pares ^{1}H-^{13}C. El archivo FID se toma sin desacoplamiento de 13C y las señales se desdoblan por el acoplamiento de enlace 1H-13C y acoplamiento 1H-1H. La medida de la constante $^{3}J_{HcH}$ se determina mediante los protones simétricos del doble enlace.

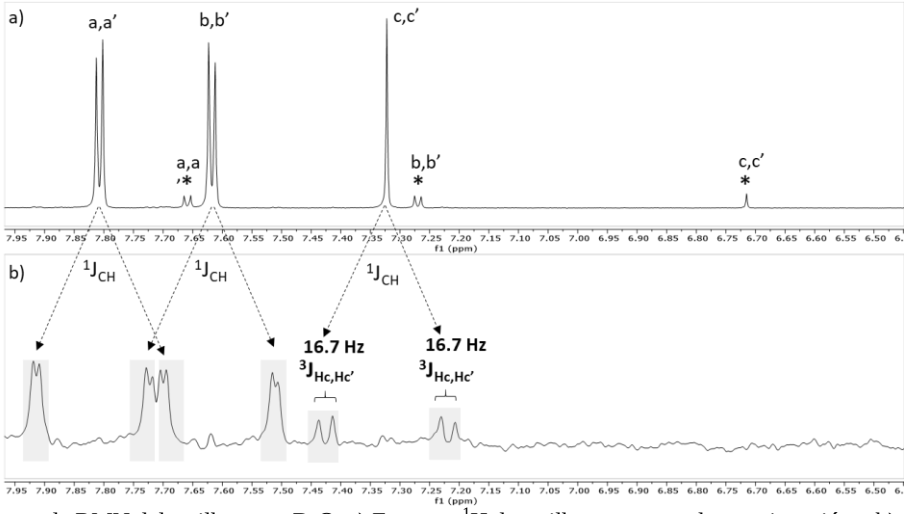


Figura 14. Espectro de RMN del estilbeno en D_2O. a) Espectro ^1H de estilbeno mostrando su asignación y b) 1D SELINCOR doble selectivo usado para los pares ^1H-^{13}C. El archivo FID se toma sin desacoplamiento de ^{13}C y las señales se desdoblan por el acoplamiento de enlace ^1H-^{13}C y acoplamiento ^1H-^1H La medida de la constante $^3J_{HcH}$ se determina mediante los protones simétricos del doble enlace. La medida de la constante $^3J_{HcH}$ se determina mediante los protones simétricos del doble enlace. Los asteriscos señalan complejos minoritarios que se forman mediante acoplamiento entre moléculas de estilbeno, el ratio entre monómero:dímer integrado es de 96:4.

7.3.1.2 Estudio mediante espectroscopía UV-Vis.

Con el fin de profundizar en el estudio del mecanismo propuesto anteriormente mediante experimentos de resonancia magnética nuclear, se ha propuesto la determinación de las constantes de velocidad y equilibrio asociadas a cada uno de los procesos mediante espectroscopía UV-vis.

En primer lugar, y dado que uno de los aspectos más significativos del estilbeno es su capacidad de presentar una estructura *E* ó *Z*, se ha determinado tanto su espectro de absorción en configuración *E* como la influencia de la irradiación sobre su estructura para dar lugar a la configuración *Z* (Fig. 15). La modificación de estos dobles enlaces se consigue mediante la correcta irradiación a 350 nm del *E*-estilbeno durante diferentes intervalos de tiempo; tal y como se puede observar en la figura 15 el tiempo de irradiación no es especialmente significativo ya que, a partir de un minuto de irradiación se consigue desplazar el equilibrio de la isomerización. Este experimento será utilizado, al igual que en la determinación del valor de las constantes $^3J_{HcHc'}$ del estudio mediante RMN, para descartar la posibilidad de que los cambios observados se deban a una modificación en la isomería del estilbeno y no a un proceso de inclusión.

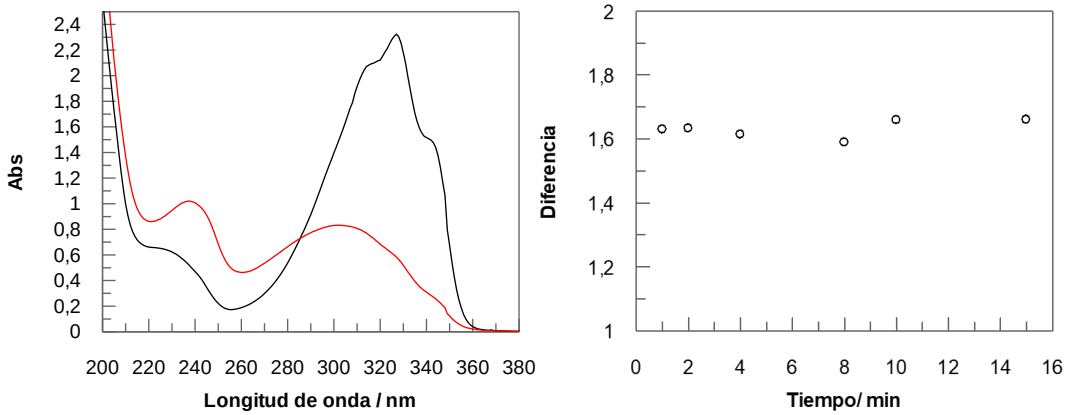


Figura 15. (Izquierda) Espectro de absorción de una muestra de: (—) *E*-estilbeno de concentración 3.50 x 10^{-5}M y (—) *Z*-estilbeno al irradiar el *E*-estilbeno a 350 nm durante 15 min. (Derecha) Influencia del tiempo de irradiación en el cambio de configuración de *E*-estilbeno a *Z*-estilbeno en muestras de concentración inicial de 3.50 x 10^{-5}M al ser irradiado a 350 nm durante diferentes intervalos de tiempo (de 1 a 15 min)

A continuación, se realiza la influencia del P5TMA sobre el proceso de inclusión del estilbeno. Los experimentos cinéticos fueron llevados a cabo manteniendo constante la concentración de estilbeno (3.50 x 10^{-5}M y 2.50 x 10^{-5}M) realizando las medidas a 327 nm (Fig. 16).

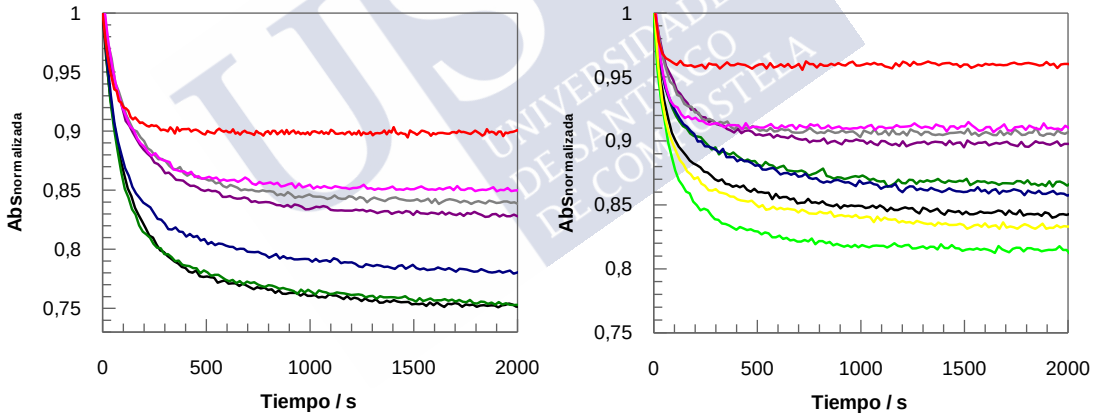


Figura 16.(Izquierda) Perfiles cinéticos medidos a 327 nm y temperatura monitorizada a 25°C de una concentración constante de estilbeno (3.50 x 10^{-5}M) y variación de P5TMA: (—) 3.50 x 10^{-5}M, (—) 6.00 x 10^{-5}M, (—) 9.00 x 10^{-5}M, (—) 3.00 x 10^{-4}M, (—) 3.50 x 10^{-4}M, (—) 5.00 x 10^{-4}M y (—) 7.00 x 10^{-4}M. b) Perfiles cinéticos medidos a 327 nm y temperatura monitorizada a 25°C de una concentración constante de estilbeno (2.50 x 10^{-5}M) y variación de P5TMA: (—) 3.50 x 10^{-5}M, (—) 6.00 x 10^{-5}M, (—) 9.00 x 10^{-5}M, (—) 3.00 x 10^{-4}M, (—) 3.50 x 10^{-4}M, (—) 5.00 x 10^{-4}M y (—) 7.00 x 10^{-5}M. (Derecha) Perfiles cinéticos medidos a 327 nm y temperatura monitorizada a 25°C de una concentración constante de estilbeno (2.50 x 10^{-5}M) y variación de P5TMA: (—)2.50 x 10^{-5}M ,(—) 3.50 x 10^{-5}M, (—) 6.00 x 10^{-5}M, (—) 9.00 x 10^{-5}M, (—) 3.00 x 10^{-4}M, (—) 3.50 x 10^{-4}M, (—) 5.00 x 10^{-4}M y (—) 7.00 x 10^{-4}M.

Inicialmente se propuso un modelo 1:1 en el que se contempla la inclusión del estilbeno en la cavidad del P5TMA dando lugar a un complejo estable para cada uno de los perfiles cinéticos (1) con una constante de velocidad k_1 asociada para cada uno de ellos; tal y como se esperaba tras los resultados aportados por resonancia magnética nuclear, el modelo propuesto no se ajusta a los datos experimentales, un ejemplo de este ajuste no satisfactorio se

representa en la figura 17, los ajustes del resto de cinéticas se representan en el apéndice 4.5.1 de este capítulo.

$$\text{P5TMA+estilbeno} \xrightarrow{k1} \text{Complejo termodinámico}$$

Modelo (1) Modelo de formación de un complejo 1:1 entre P5TMA y estilbeno

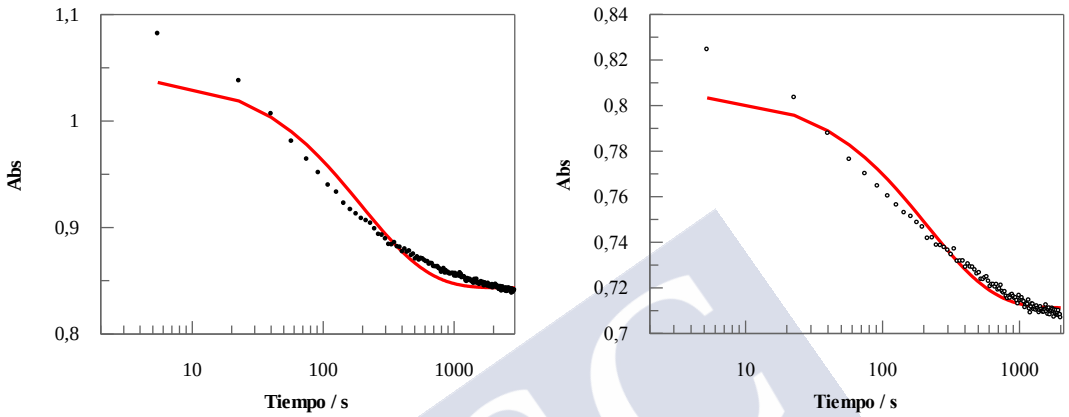


Figura 17. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 327 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 9.00 x 10^{-5}M y [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5}M y su ajuste al modelo (1) representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 327 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 9.00 x 10^{-5}M y [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5}M y su ajuste al modelo (1) representado mediante una línea roja.

En vista de que el proceso no se puede explicar mediante un modelo simple y apoyándonos en los resultados del apartado 2.3.1 de esta tesis doctoral, se sugiere un modelo más complejo (2) que en este caso si se ajusta satisfactoriamente a los resultados experimentales (Fig. 18), se obtiene así el valor de velocidad aparente para cada una de las etapas de la reacción (Fig.19 y 20). El resto de ajustes se incluyen en el apéndice 4.5.2 de este capítulo. Especialmente significativo es el hecho de que los valores obtenidos para la constante de velocidad k_1 en el ajuste de los datos experimentales al modelo (2) se puede observar como el valor obtenido no es constate, sino que, esta disminuye a medida que aumenta la concentración de P5TMA en el medio. La constante k_2, sin embargo, presenta un comportamiento contrario, el valor de la constante de velocidad k_2 aparente aumenta conforme se incrementa la concentración de P5TMA en el medio de reacción. La tendencia observada es una evidencia de que las constantes están afectadas por otro proceso anterior a la formación de un complejo cinético; se pone de manifiesto, de nuevo, la formación de complejos externos como primera etapa del mecanismo de reacción.

$$\text{P5TMA} + \text{estilbeno} \xrightarrow{k1} \text{Complejo cinético} \xrightarrow{k2} \text{Complejo termodinámico}$$

Modelo (2) Modelo de formación de un primer complejo cinético que evoluciona a termodinámico.

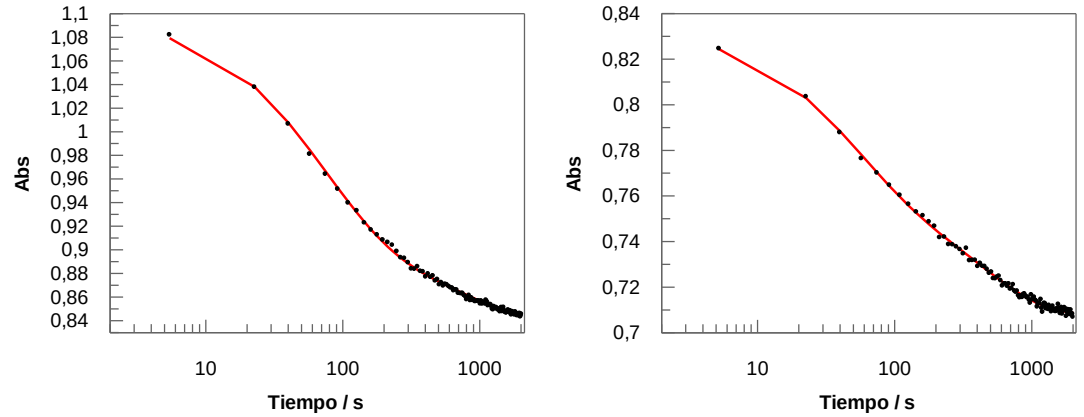


Figura 18. (Izquierda) Perfil cinético recogido a 327 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 9.00 x 10^{-5}M y [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5}M y su ajuste al modelo (2) representado mediante una línea roja. (Derecha) Perfil cinético recogido a 327 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 9.00 x 10^{-5}M y [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5}M y su ajuste al modelo (2) representado mediante una línea roja.

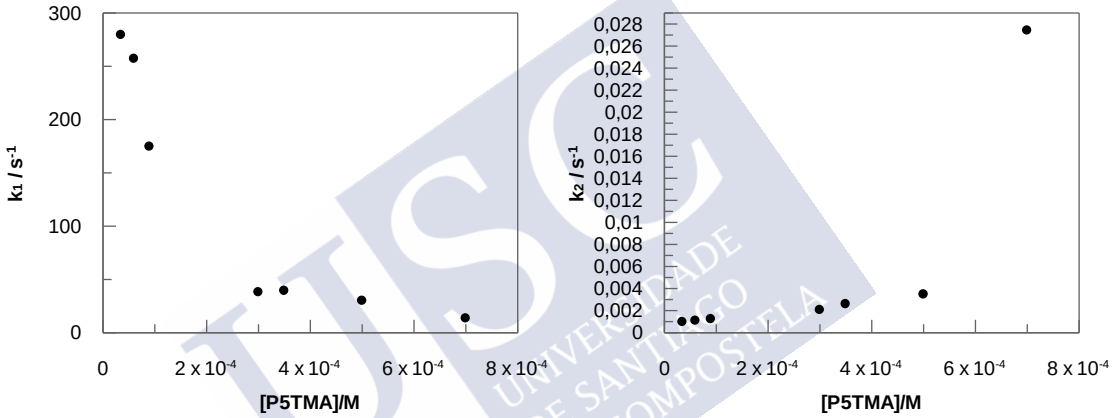


Figura 19. (Izquierda) Variación de los valores de k_1 obtenidos mediante el ajuste del modelo (2) a los datos experimentales al variar la concentración de P5TMA del medio para una concentración constante de estilbeno de 2.50 x 10^{-5}M. (Derecha) Variación de los valores de k_2 obtenidos mediante el ajuste del modelo (2) a los datos experimentales al variar la concentración de P5TMA del medio para una concentración constante de estilbeno de 3.50 x 10^{-5}M.

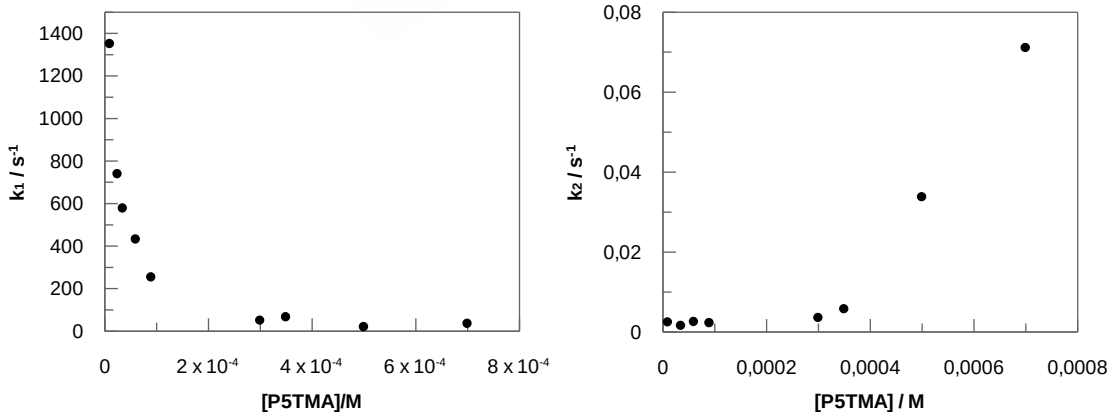


Figura 20. (Izquierda) Variación de los valores de k_1 obtenidos mediante el ajuste del modelo (2) a los datos experimentales al variar la concentración de P5TMA del medio para una concentración constante de estilbeno de 2.50 x 10^{-5}M. (Derecha) Variación de los valores de k_2 obtenidos mediante el ajuste del modelo (2) a los datos experimentales al variar la concentración de P5TMA del medio para una concentración constante de estilbeno de 2.50 x 10^{-5}M.

Mediante la linealización de las ecuaciones resultantes del modelo (2) se puede establecer la relación entre la formación del complejo externo y su evolución al complejo cinético (modelo (3)), la deducción completa se muestra en el apéndice 4.5.3 de este capítulo. Este proceso hace posible la determinación de las constantes de equilibrio y velocidad asociadas a cada proceso (Fig. 21) a partir de la ecuación resultante del ajuste, siendo k_{obs} la constante de velocidad aparente determinada mediante el modelo (2) para el proceso de formación de un complejo cinético, $k_{1'}$ la constante de velocidad real para la formación del complejo cinético y K_E la constante de equilibrio de la formación del complejo termodinámico.

$$\text{P5TMA} + \text{estilbeno} \overset{K_E}{\rightleftharpoons} \text{Complejo externo} \overset{k1'}{\rightarrow} \text{Complejo cinético}$$

Modelo (3) Modelo de complejación entre P5TMA y estilbeno definido por la formación de precomplejos que evolucionan a un complejo cinético.

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k_{1'}} + \frac{K_E}{k_{1'}}[P] \qquad (1)$$

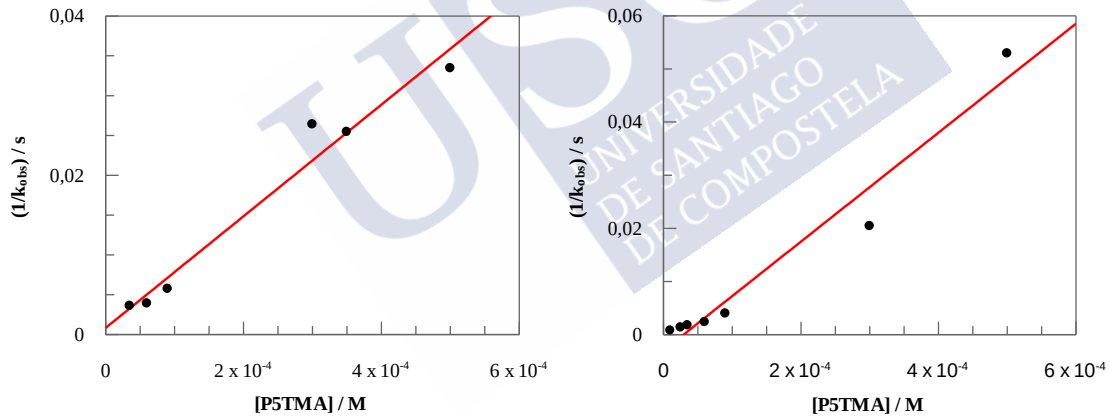


Figura 21. Ajuste de la variación de $1/k_{obs}$ frente a la concentración de P5TMA con una concentración constante de estilbeno de: (izquierda) 3.50×10^{-5}M y (derecha) 2.50×10^{-5}M.

Mediante el ajuste anterior se obtiene la ecuación y = 70.108x + 0.0008 para el estudio con una concentración constante de estilbeno de 3.50×10^{-5}M y la ecuación y = 69.5616x - 0.0009 para una concentración de estilbeno constante de 2.50×10^{-5}M; a partir de estas dos ecuaciones es posible la determinación de las constantes de velocidad real en la formación del complejo cinético así como la obtención de la constante de equilibrio de la formación de complejos externos, $k_{1'} = (1.25 \pm 0.14) \times 10^3$ s^{-1} y $K_E = (8.76 \pm 0.80) \times 10^4$ M^{-1} para una concentración de estilbeno de 3.50×10^{-5}M. La determinación de las constantes con concentración de estilbeno de 2.50×10^{-5}M no es posible dado el valor negativo de la ordenada en elorigen.

Una vez desarrollado el estudio cinético en condiciones diluidas, se reprodujeron las condiciones de RMN, es decir, un estudio cinético con concentraciones equivalentes (1 mM de cada una de ellas) observandose que el patrón cinético es compatible con los resultados dados por resonancia magnética nuclear (Fig. 22). En estas condiciones de reacción es necesario modificar la longuitud de onda a la que se toman los datos ya que, la concentración de macrociclo es tan alta que se produce un solapamiento de las bandas de P5TMA y del estilbeno, este factor dificulta el seguimiento de la reacción en las mismas condiciones que en el resto de estudio cinético. Mediante este experimento, se confirma que los datos obtenidos por ambas técnicas (UV-vis y RMN) son compatibles, las diferencias en las escalas de tiempos se deben a que en ambos estudios las concentraciones utilizadas de P5TMA y estilbeno son diferentes.

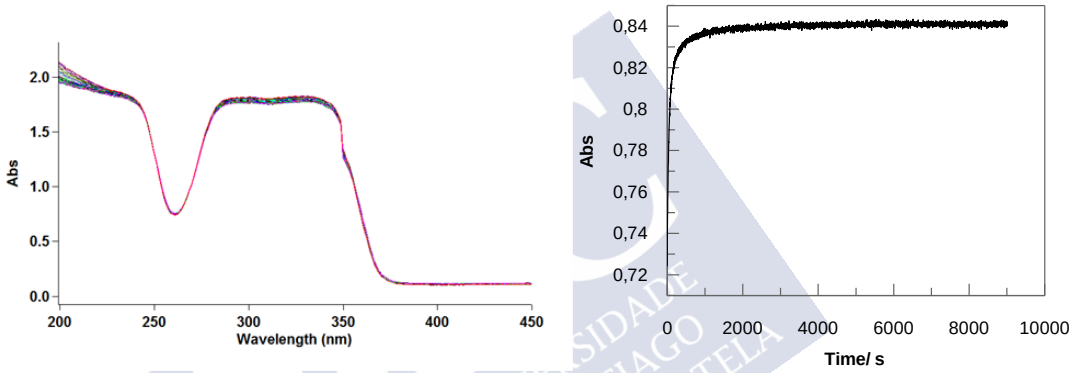


Figura 22. (Izquierda) Variación del espectro de absorción de una mezcla 1:1 de estilbeno y P5TMA en cubeta de 0.1 mm y temperatura constante de 25°C. (Derecha) Perfil cinético de una mezcla 1:1 de estilbeno y P5TMA medido a 358 mn, en una cubeta de 0.1 mm y temperatura constante de 25°C.

7.3.1.3 Influencia de la temperatura.

De forma general se puede establecer que la velocidad de una reacción aumenta al aumentar la temperatura favoreciéndose, de este modo, la posibilidad de alcanzar y superar la energía de activación asociada al proceso. En 1889, Svanthe Arrhenius estableció empíricamente la relación entre las constantes de velocidad de muchas reacciones y su variación con la temperatura.

Con el objetivo de determinar los parámetros termodinámicos del sistema P5TMA:estilbeno se lleva a cabo la influencia de la temperatura sobre el mecanismo de formación del complejo. Con este proposito, se realizaron estudios cinéticos con una concentración constante de [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4}M y [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5}M, la temperatura se varío entre el rango 15-40°C (Fig. 23) obteniendose como resultado el aumento de la velocidad de reacción a medida que aumenta la temperatura del medio.

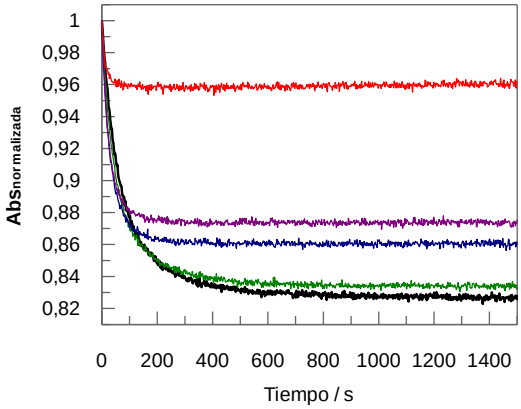


Figura 23. Perfil cinético medido a 327 nm de una muestra de concentración de P5TMA 7.00 x 10^{-4}M y estilbeno 3.50 x 10^{-5}M, temperatura: (—)15°C, (—)20°C, (—)25°C, (—)30°C y (—) 40°C.

Al igual que en el estudio anterior, y dado que el mecanismo de reacción se podría ver alterado al incrementar la temperatura del medio, se ha planteado en primer lugar el ajuste de los datos experimentales al modelo (1), tal y como se muestra en la figura 24, el modelo no reproduce satisfactoriamente el comportamiento del sistema ni a temperaturas inferiores ni superiores a la anteriormente estudiada. El resto de ajustes se muestran en el apéndice 4.5.4 de este capítulo. Por lo tanto, se ha estudiado la reacción mediante el modelo (2) observando que, en este caso el modelo reproduce el comportamiento del sistema (Fig 25); es posible, por tanto, obtener las constantes de velocidad asociadas al sistema. El resto de ajustes se muestran en el apéndice 4.5.5 de este capítulo.

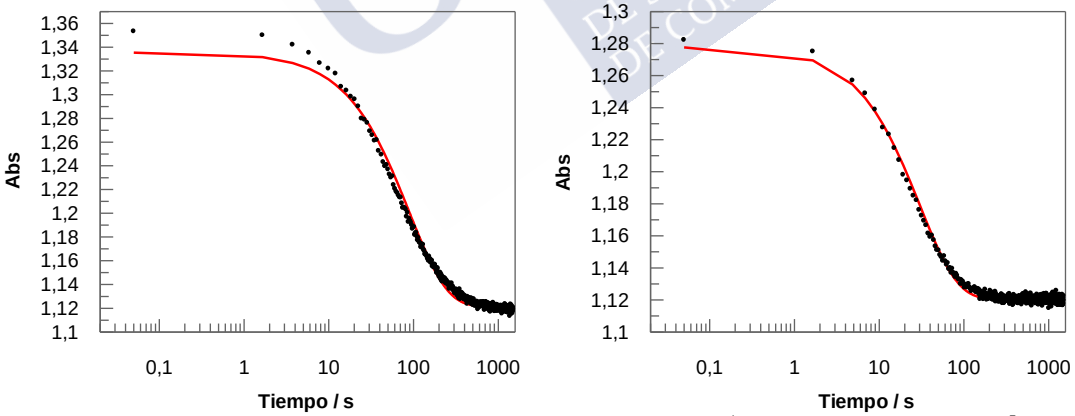


Figura 24. Variación de la absorbancia en una muestra de [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4}M y [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5}M y su ajuste al modelo (1) representado por una línea roja con temperatura constante de: (izquierda) 15°C y (derecha) 30°C.

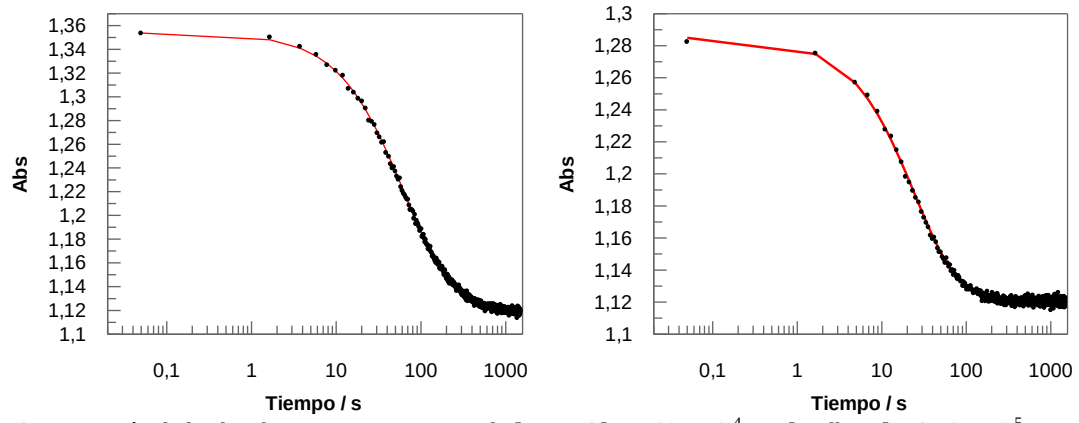


Figura 25. Variación de la absorbancia en una muestra de [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4}M y [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5}M y su ajuste al modelo (2) representado por una línea roja con temperatura constante de: (izquierda) 15°C y (derecha) 30°C.

Mediante el ajuste de todos los perfiles cinéticos se han podido determinar los valores de velocidad k_1 y k_2 para cada una de las temperaturas estudiadas (Fig 26). Tal y como se puede obsservar el comportamiento de ambas constantes es análogo, aumentan a medida que aumenta la temperatura; un comportamiento del tipo Arrhenius.

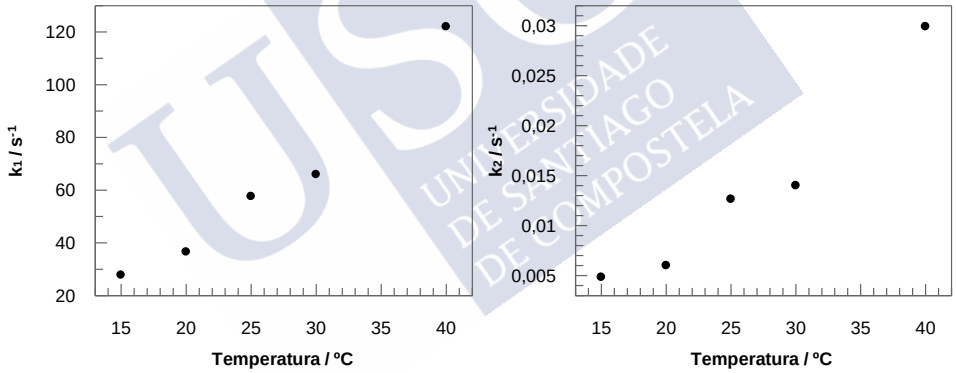


Figura 26. Valores de las constantes de velocidad k_1 y k_2 determinadas mediante el ajuste del modelo (2) en función de la temperatura del medio de reacción.

Tal y como se mencionaba al comienzo de este apartado, Svanthe Arrhenius estableció de forma empírica la relación entre las constantes de velocidad y la temperatura mediante la expresión (2), donde k es la velocidad de reacción, E_a la energía de activación y A la constante de Arrhenius. Tomando logaritmos naturales se transforma la ecuación (2) en la ecuación (3), la representación de lnk frente a 1/T permite determinar la energía de activación del proceso (Fig 27).

$$k_{obs} = Ae^{\left(-\frac{E_a}{RT}\right)} \qquad (2)$$

$$\ln k_{obs} = \ln A - \frac{E_a}{RT} \qquad (3)$$

El ajuste de los datos experimentales a la ecuación Eq 3 para la formación del complejo cinético da como resultado la ecuación y = -5319.2397x + 21.7985, expresión a partir de la que se puede determinar un valor de E_a = (44 ± 2.9) kJ/ mol. Por otra parte, se obtiene la expresión y = -6710.5894x + 17.9429 en el ajuste de la formación del complejo termodinámico, el valor obtenido para la energía de activación es de E_a = (56 ± 6.0) kJ/ mol. El análisis de las energías de activación determinadas permiten establecer que la formación de un complejo cinético entre el P5TMA y el estilbeno presenta una energía de activación menor que la formación de un complejo termodinámico. Estos resultados concuerdan con las conclusiones obtenidas tanto por RMN como por el estudio cinético en el que se establecía que la etapa lenta del mecanismo es la conversión del complejo cinético a complejo termodinámico. Desde el punto de vista energético es lógico que el proceso de reconversión que sufre el P5TMA sea más costoso cuando la molécula de estilbeno ya se encuentra encapsulada en su interior.

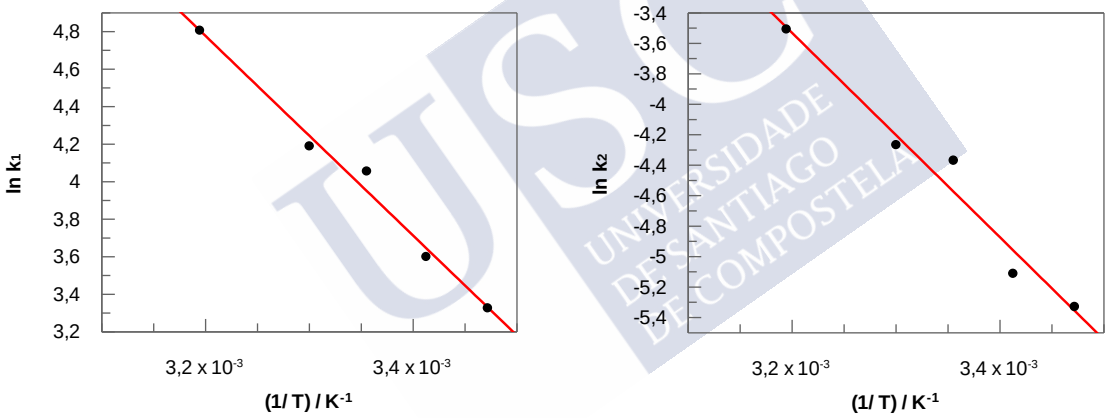


Figura 27. Variación de $\ln k_{obs}$ frente a 1/T para cada una de las temperaturas estudiadas para la mezcla 1:1 de estilbeno y P5TMA con ajuste a la ecuación 2 en línea roja para (izquierda) complejo cinético (derecha) complejo termodinámico.

7.3.1.4 Influencia del tamaño de la cavidad.

Como último factor se evaluó el tamaño de la cavidad del macrociclo, evidentemente el mayor tamaño de un pilar[6]areno (≈ 7.5 Å) [54] frente al P5TMA del estudio ((≈ 5.0 Å) debería dar lugar a cambios en la velocidad de formación de los diferentes complejos o, incluso, variar el mecanismo; con este objetivo se sintetizó un nuevo macrociclo, P6TMA , formado por seis unidades e idéntica funcionalización al P5TMA siguiendo una versión modificada de los métodos descritos por los grupos de Feihe Huang y Jean-François Nierengarten [55,56]

El estudio cinético se realizó en idénticas condiciones al realizado con el P5TMA, la concentración de estilbeno se mantiene constante en todos los experimentos en 3.50 x 10^{-5}M,

temperatura constante de 25.0 °C, y variación de la concentración de P6TMA (Fig. 28). Sin embargo, en este caso la reacción es tan rápida que es necesario el uso de la técnica de *Stopped-Flow*.

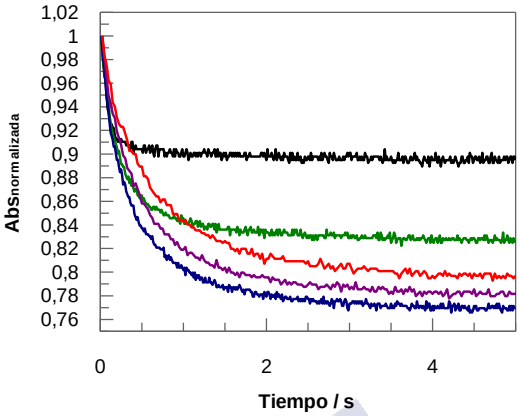


Figura 28. Perfiles cinéticos medidos a 327 nm y temperatura monitorizada a 25°C de una concentración constante de estilbeno (3.50 x 10^{-5}M) y variación de P6TMA: (—) 2.00 x 10^{-5}M, (—) 3.50 x 10^{-5}M, (—) 6.00 x 10^{-5}M, (—) 9.00 x 10^{-5}M y (—) 1.00 x 10^{-5}M

Inicialmente, y en base al cambio brusco de velocidad con respecto a los experimentos con P5TMA, se plantea un modelo de complejación simple consistente en la inclusión de una molécula de estilbeno en la cavidad del P6TMA según se plantea en el modelo (3); con una constante de velocidad k_1 asociada al proceso; el modelo propuesto no se ajusta a los datos experimentales tal y como se muestra en el ejemplo de la figura 29; el resto de ajustes se muestran en el apéndice 4.5.6 de este capítulo. Ante estos resultados y tomando como referencia el mecanismo propuesto para el P5TMA se planteó un nuevo modelo (5) concordante con el modelo (2). Este modelo se ajusta a los datos experimentales tal y como se puede observar en la figura 29, obteniéndose así las constantes de velocidad para cada una de las etapas (Fig 30) El resto de ajustes se muestran en el apéndice 4.5.7 de este capítulo. El análisis de las constantes obtenidas evidencia la misma tendencia que en el estudio anterior, la constante de velocidad k_1 disminuye a medida que aumenta la concentración de P6TMA en el sistema, claro indicativo, de nuevo, de la formación de complejos externos como primera etapa en el mecanismo de complejación. Este resultado es especialmente interesante ya que, evidencia que el comportamiento descrito por P5TMA y estilbeno no se trata de una particularidad.

$$\text{P6TMA+estilbeno} \xrightarrow{k1} \text{Complejo termodinámico}$$

Modelo 4. Modelo de formación de un complejo 1:1 entre P6TMA y estilbeno.

$$\text{P6TMA+estilbeno} \xrightarrow{k1} \text{Complejo cinético} \xrightarrow{k2} \text{Complejo termodinámico}$$

Modelo 5. Modelo de formación de un complejo cinético que evoluciona a termodinámico entre P6TMA y estilbeno.

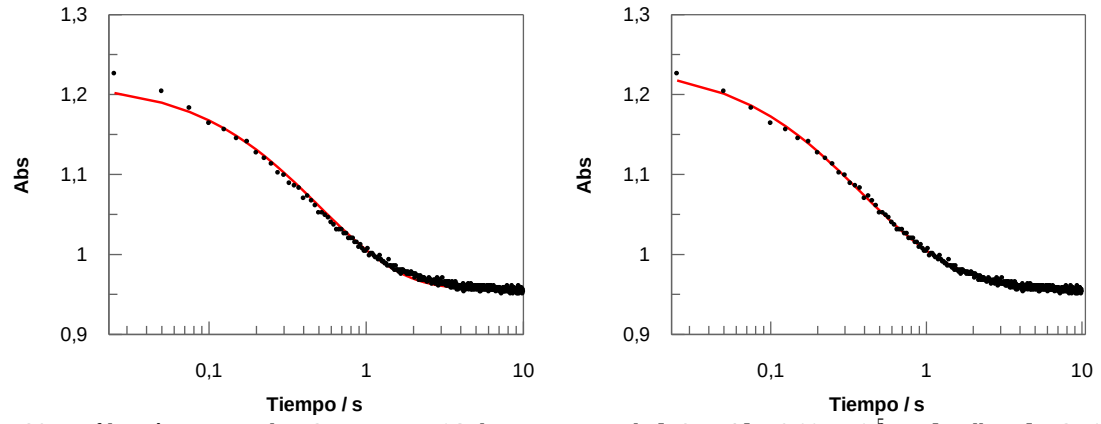


Figura 29. Perfil cinético recogido a 327 nm y 25 °C de una muestra de [P6TMA] = 9.00 x 10^{-5}M y [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5}M y su ajuste representado mediante una línea roja al modelo: (izquierda) (3) y (derecha) (4).

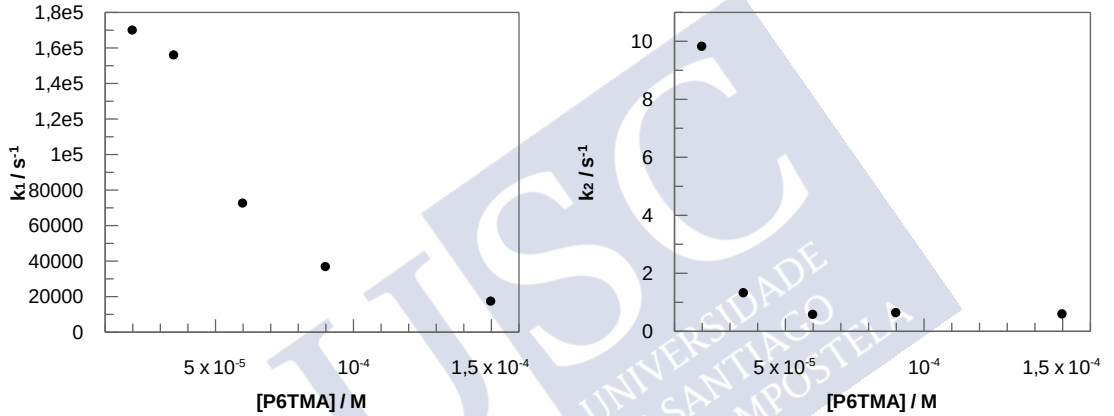


Figura 30 (Izquierda)Variación de los valores de k_1 obtenidos mediante el ajuste del modelo (4) a los datos experimentales al variar la concentración de P6TMA del medio para una concentración constante de estilbeno de 3.50 x 10^{-5}M. (Derecha) Variación de los valores de k_2 obtenidos mediante el ajuste del modelo (4) a los datos experimentales al variar la concentración de P6TMA del medio para una concentración constante de estilbeno de 3.50 x 10^{-5}M.

Repitiendo el mismo análisis de datos que en el apartado 4.3.2 a partir de la linealización de las ecuaciones resultantes del modelo (5) se establecen la relación entre la formación del complejo externo y su evolución al complejo cinético, que se definen igualmente con la ecuación 1. La ecuación obtenida del ajuste es y = 0.7245x – 1.525 x 10^{-5} por lo que no es posible la determinación de las constantes de velocidad y equilibrio para P6TMA. Es necesario por tanto, trabajar con la relación $K_E/k_{1'}$ cuyo valor es (7.25 ± 0.72) x 10^{-1}. La comparación de la velocidad de inclusión del estilbeno en P5TMA y P6TMA para dar lugar a la formación de un complejo termodinámico indica que el proceso está fuertemente afectado por el tamaño de la cavidad. Esto es devido a que la cavidad del P6TMA permite que las unidades del macrociclo puedan girar sobre su eje facilmente devido a que, el impedimento estérico es mucho menor; el proceso se ve así favorecido.

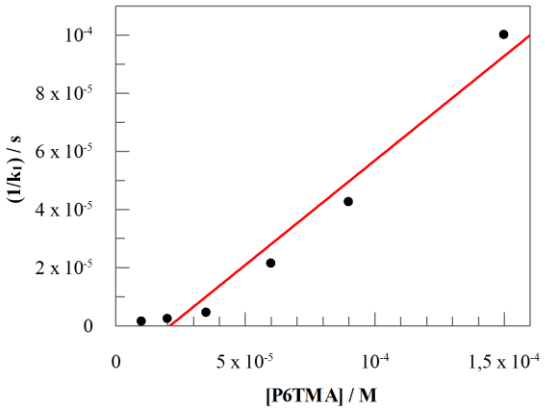
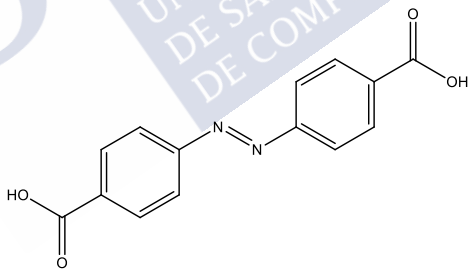


Figura 31. Ajuste de la variación de $1/k_{obs}$ frente a la concentración de P6TMA con una concentración constante de estilbeno de 3.50 x 10^{-5}M.

7.3.2 Estudio del ácido azobenceno-4,4'-dicarboxílico.

7.3.2.1 Influencia de la concentración de P5TMA.

Con el fin de profundizar en el mecanismo propuesto para el P5TMA y el estilbeno, así como en su generalización, se ha propuesto estudiar el proceso de inclusión del azobenceno homologo, el ácido azobenceno-4,4´-dicarboxilico (esquema 7), tanto con el pilarareno de cinco (P5TMA) como de seis unidades (P6TMA).



Esquema 7. Estructura del ácido azobenceno-4,4´-dicarboxilico en disposición trans.

En primer lugar, y dado que el azobenceno también presenta capacidad de isomerización dando lugar a una estructura *E* ó *Z*, se ha determinado tanto su espectro de absorción en configuración *E* como la influencia de la irradiación sobre su estructura para dar lugar a la configuración *Z* (Fig. 32) La modificación de estos dobles enlaces se consigue mediante la correcta irradiación a 350 nm del *E*-azobenceno durante diferentes intervalos de tiempo; tal y como se puede observar el la Figura 32b el tiempo de irradiación, a diferencia del estilbeno, si es un factor importante, considerándose que a partir de cinco minutos se consigue desplazar el equilibrio de la isomerización. Este experimento será utilizado, al igual que en el estudio del estilbeno, para descartar la posibilidad de que los cambios obtenidos se deban a una modificación en la isomería de la sonda.

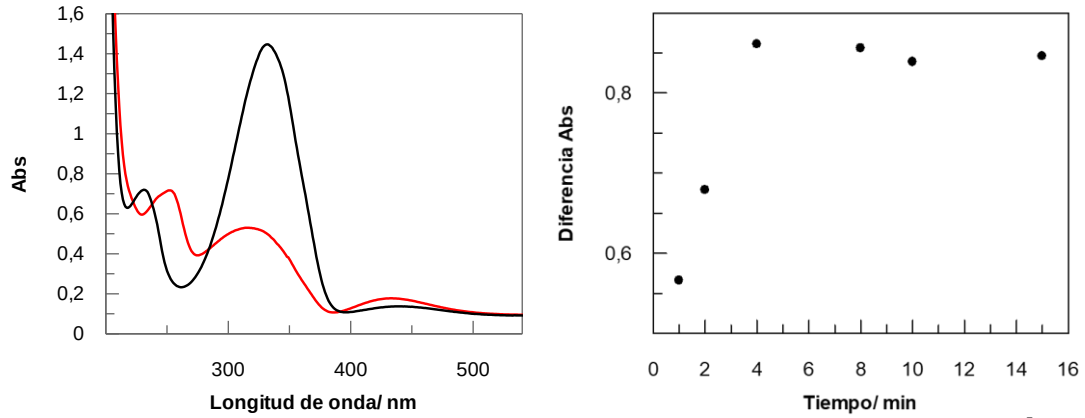


Figura 32. (Izquierda) Espectro de absorción de una muestra de: (—) *E*-azobenceno de concentración 3.50 x 10^{-5}M y (—) *Z*-azobenceno al irradiar el *E*-estilbeno a 350 nm durante 15 min. (Derecha) Influencia del tiempo de irradiación en el cambio de configuración de *E*-azobenceno a *Z*-azobenceno en muestras de concentración inicial de 3.50 x 10^{-5}M al ser irradiado a 350 nm durante diferentes intervalos de tiempo (de 1 a 15 min), diferencia de absorbancia medida a 350 nm.

A continuación, se realiza la influencia del P5TMA sobre el proceso de inclusión del azobenceno. Los experimentos cinéticos fueron llevados a cabo manteniendo constante la concentración de azobenceno (3.50 x 10^{-5}M) realizando las medidas a 350 nm (Fig. 33) Como primera aproximación, cabe destacar que el proceso de inclusión del azobenceno es significativamente más lento que en el caso del estilbeno, mientras que el estilbeno necesita aproximadamente 2000 segundos para llevar a acabo la inclusión, en el caso del azobenceno son necesarios unos 200 min.

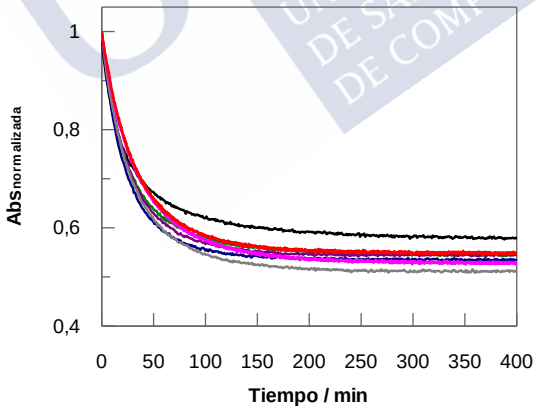


Figura 33. a) Perfiles cinéticos medidos a 350 nm y temperatura monitorizada a 25°C de una concentración constante de azobenceno (3.50 x 10^{-5}M) y variación de P5TMA: (—) 3.50 x 10^{-5}M, (—) 6.00 x 10^{-5}M, (—) 9.00 x 10^{-5}M, (—) 1.50 x 10^{-4}M, (—) 3.00 x 10^{-4}M, (—) 7.00 x 10^{-4}M y (—) 1.00 x 10^{-3}M.

Inicialmente, y ante la variación del tiempo necesario para la inclusión con respecto al estilbeno, se planteó el modelo (1) en el que se define la formación de un complejo con estequiometría 1:1 entre una molécula de P5TMA y una de azobenceno; el proceso está definido por la velocidad de reacción k_1. Sin embargo, y al igual que en el estudio realizado anteriormente, el ajuste del modelo (1) a los datos experimentales no fue satisfactorio (Fig 34) El resto de ajustes se muestran en el apéndice 4.5.8 de este capítulo. En vista de que el

proceso tampoco se puede explicar mediante un modelo simple y apoyándonos en los resultados anteriores, se sugiere un modelo más complejo (2) que se ajusta de nuevo satisfactoriamente a los resultados experimentales (Fig. 34), se obtiene así el valor de velocidad aparente para cada una de las etapas de la reacción (Fig.35). El resto de ajustes se muestran en el apéndice 4.5.9 de este capítulo. Observando los valores de la constante de velocidad k_1 para el modelo (2) se puede observar como la tendencia es idéntica a la observada para el estilbeno; el valor obtenido no es constate, sino que, esta disminuye a medida que aumenta la concentración de P5TMA en el medio. La constante k_2, sin embargo, permanece prácticamente constante conforme se incrementa la concentración de P5TMA en el medio de reacción. La tendencia observada es una evidencia de que la constante k_1 está afectada por otro proceso anterior a la formación de un complejo cinético; dado los estudios anteriores, se plantea de nuevo la formación de complejos externos como primera etapa del mecanismo de reacción.

$$\text{P5TMA} + \text{azobenceno} \xrightarrow{k1} \text{Complejo termodinámico}$$

Modelo 1. Formación de complejo 1:1 entre P5TMA y el azobenceno.

$$\text{P5TMA} + \text{azobenceno} \xrightarrow{k1} \text{Complejo cinético} \xrightarrow{k2} \text{Complejo termodinámico}$$

Modelo 2. Formación de complejo cinético que evoluciona a termodinámico entre P5TMA y azobenceno.

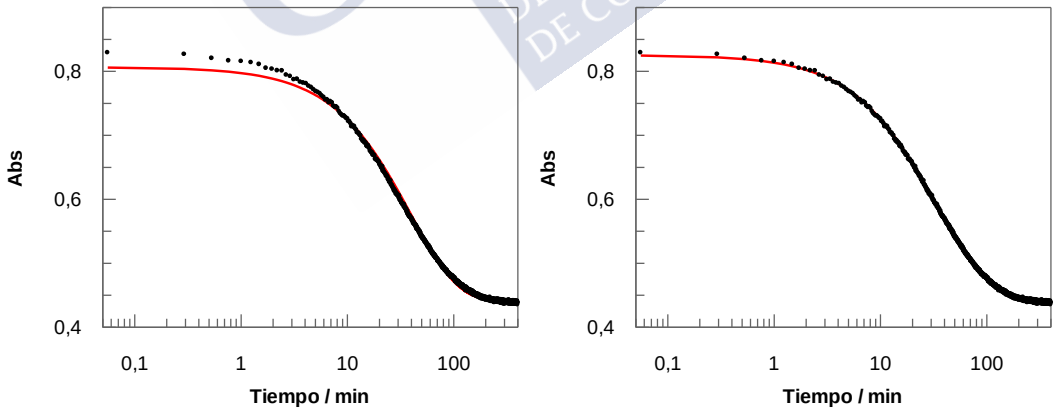


Figura 34. a) Perfil cinético recogido a 350 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4}M y [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5}M y su ajuste representado mediante una línea roja al modelo a) (1) y b) (2).

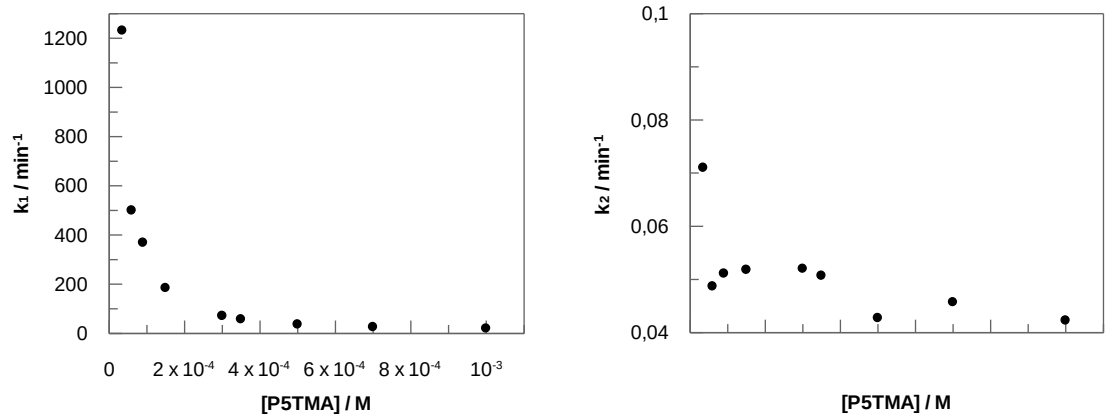


Figura 35. a)Variación de los valores de k_1 obtenidos mediante el ajuste del modelo (2) a los datos experimentales al variar la concentración de P5TMA del medio para una concentración constante de azobenceno de 3.50 x 10^{-5}M. b)Variación de los valores de k_2 obtenidos mediante el ajuste del modelo (2) a los datos experimentales al variar la concentración de P5TMA del medio para una concentración constante de azobenceno de 3.50 x 10^{-5}M.

En base a los resultados obtenidos anteriormente y utilizando de nuevo la linealización de las ecuaciones resultantes del modelo (2), desarrollado en el estudio del estilbeno, se puede establecer la relación entre la formación del complejo externo y su evolución al complejo cinético (ecuación 1) determinándose así, la constante de equilibrio para la formación del complejo externo entre el P5TMA y el azobenceno y, además, la velocidad real asociada a la formación del complejo cinético (Fig. 36)

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k_1} + \frac{K_E}{k_1}[P] \qquad (1)$$

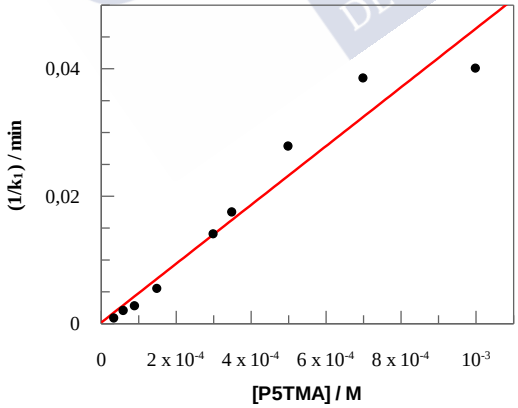


Figura 36. Ajuste de la variación de $1/k_{obs}$ frente a la concentración de P5TMA con una concentración constante de azobenceno de 3.50 x 10^{-5}M según la ecuación 1.

El ajuste de los valores de las constantes obtenidas a la ecuación (1) presenta una tendencia lineal cuya ecuación se define como y = 46.1493x + 0.002 obteniendose un valor de la constante de velocidad de k_1 = (83 ± 0.15) s^{-1} y una constante de equilibrio de K_E = (2.30 ± 0.18) x 10^5 M^{-1} El análisis de estos resultados nos indican que los complejos externos formados entre el P5TMA y el azobenceno estudiado presentan una constante de equilibrio

ligeramente superior que para el estilbeno (K_E = 8.76 x 10^4 M^{-1}). Sin embargo, el cambio más significativo se encuentra en la variación de la constante de velocidad de formación del complejo cinético, la constante obtenida con el azobenceno es aproximadamente cien veces inferior a la del estilbeno.

7.3.2.2 Influencia de la concentración de azobenceno.

Ante los cambios observados en el proceso de complejación se plantea conocer la influencia de la concentración de sonda sobre el sistema, con este objetivo se han realizado estudios cinéticos con concentración constante de P5TMA (7.00 x 10^{-4}M) y variación de la concentración de azobenceno. El resto de condiciones experimentales tales como longitud de onda de trabajo y temperatura son identicas a las del apartado anterior, las medidas se realizan a 350 nm y A 25ºC. Las trazas cinéticas se muestran en la Fig. 37 donde se puede obserbar como la escala de tiempos es muy similar a la del apartado anterior.

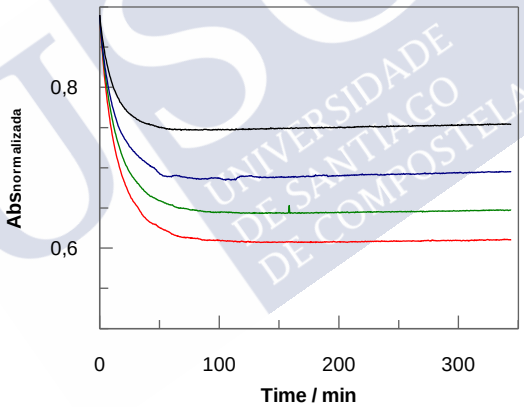


Figura 37. Perfiles cinéticos medidos a 350 nm y temperatura monitorizada a 25°C de una concentración constante de P5TMA (7.00 x 10^{-4}M) y variación de azobenceno: (—) 1.00 x 10^{-5}M, (—) 1.75 x 10^{-5}M, (—) 2.50 x 10^{-5}M y (—) 3.50 x 10^{-3}M.

El análisis de las trazas cinéticas se realizó de igual manera que en el apartado anterior, planteando inicialmente el modelo simple (1). Como se puede observar en la figura 38, el ajuste del modelo (1) a los datos experimentales no es satisfactorio. Por lo tanto, se procederá a estudiar el sistema con el modelo (2); en este caso, y de forma complementaria al estudio anterior, se obtiene un buen ajuste (Fig. 38). El resto de ajustes se muestran en el apéndice 4.5.10 y 4.5.11. La constante de velocidad k_1 presenta el mismo comportamiento que en el proceso anterior, el valor de la constante disminuye a medida que aumenta la concentración de azobenceno. Ante esta nueva evidencia de la formación de complejos externos se procede a analizar los resultados obtenidos mediante la ecuación 1 para conocer la constante de velocidad $k_{1'}$ y la contante de equilibrio de K_E. La ecuación resultante del ajuste es y =

207.9006x + 0.0066 a partir de la cual se determina un valor de $k_{1'}$ = 2.5 ± 0.1 s^{-1} y K_E = (3.15 ± 0.23) x 10^4 M. Tal y como puede observarse, la constante de velocidad en la formación del complejo cinético es inferior a la calculada en el apartado anterior, resultado compatible debido a que en este último estudio el P5TMA se encuentra siempre en un amplio exceso con respecto al azobenceno. En cuanto a la constante de equilibrio de la formación de complejos externos entre el P5TMA y el azobenceno, cabe destacar que se obtiene un valor complementario al obtenido en el apartado anterior (K_E = 3.44 x 10^4 M^{-1}).

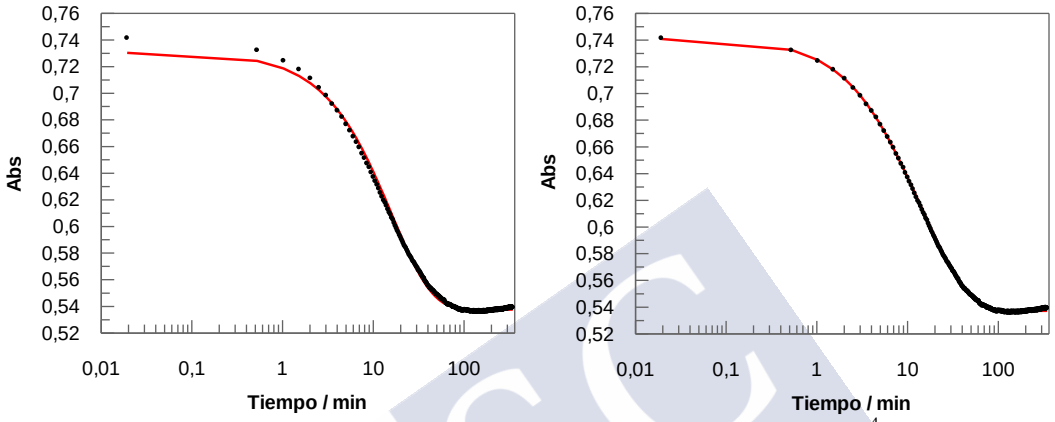


Figura 38. a) Perfil cinético recogido a 350 nm y 25 °C de una muestra de [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4}M y [azobenceno] = 2.50 x 10^{-5}M y su ajuste representado mediante una línea roja al modelo (izquierda) (1) y (derecha) (2).

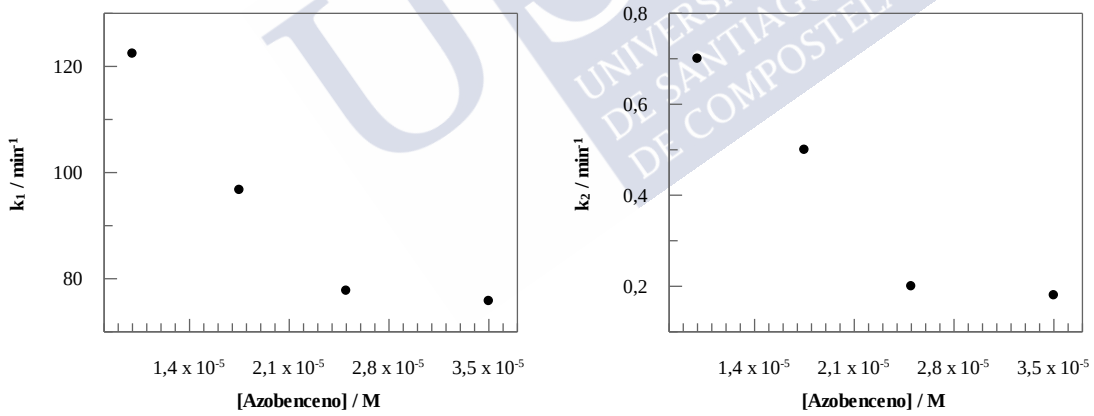


Figura 39. (Izquierda)Variación de los valores de k_1 obtenidos mediante el ajuste del modelo (2) a los datos experimentales al variar la concentración de azobenceno del medio para una concentración constante de P5TMA de 7.00 x 10^{-4}M. (Derecha) Variación de los valores de k_2 obtenidos mediante el ajuste del modelo (2) a los datos experimentales al variar la concentración de azobenceno del medio para una concentración constante de P5TMA de 7.00 x 10^{-4}M.

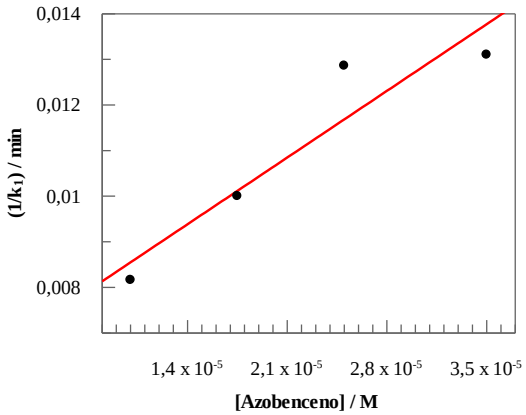


Figura 40. Ajuste de la variación de $1/k_1$ frente a la concentración de Azobenceno con una concentración constante de P5TMA de 7.00 x 10^{-4}M .

7.3.2.3 Influencia de la temperatura.

Con el fin de ampliar el conocimiento del sistema formado entre el P5TMA y el azobenceno y, así generalizar el comportamiento del complejo P5TMA:estilbeno estudiado anteriormente, se han determinado los parámetros termodinámicos del sistema. Con este objetivo, se evaluó la influencia de la temperatura sobre el mecanismo de formación del complejorealizando estudios cinéticos con una concentración constante de [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4}M y [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5}M, la temperatura se varío entre el rango 15-40°C (Fig. 41) obteniendose como resultado el aumento de la velocidad de reacción a medida que aumenta la temperatura del medio.

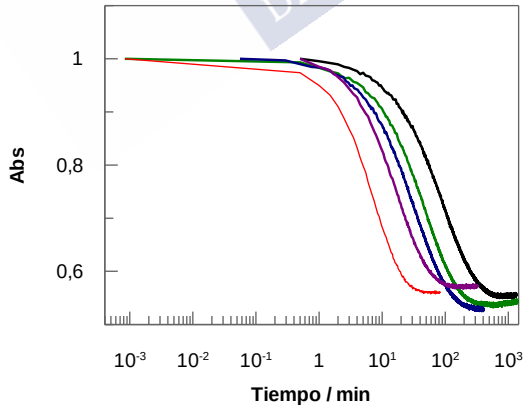


Figura 41. Perfil cinético medido a 350 nm de una muestra de concentración de P5TMA 7.00 x 10^{-4}M y azobenceno 3.50 x 10^{-5}M, temperatura: (—)15°C, (—)20°C, (—)25°C, (—)30°C y (—) 40°C.

De igual modo que en el estudio anterior, ante la posibilidad de un cambio en el mecanismo, se ha planteado en primer lugar el ajuste de los datos experimentales al modelo (1), tal y como se muestra en la figura 42, el modelo no reproduce satisfactoriamente el comportamiento del sistema ni a temperaturas inferiores ni superiores a la anteriormente estudiada. Por lo tanto, se ha estudiado la reacción mediante el modelo (2) observando que, en

este caso el modelo reproduce el comportamiento del sistema (Fig 43) tanto para temperaturas superiores como inferiores con respecto al estudio anterior; es posible, por tanto, obtener las constantes de velocidad asociadas al sistema. El resto de ajustes se muestran en los apéndices 4.5.12 y 4.5.13 de este capítulo.

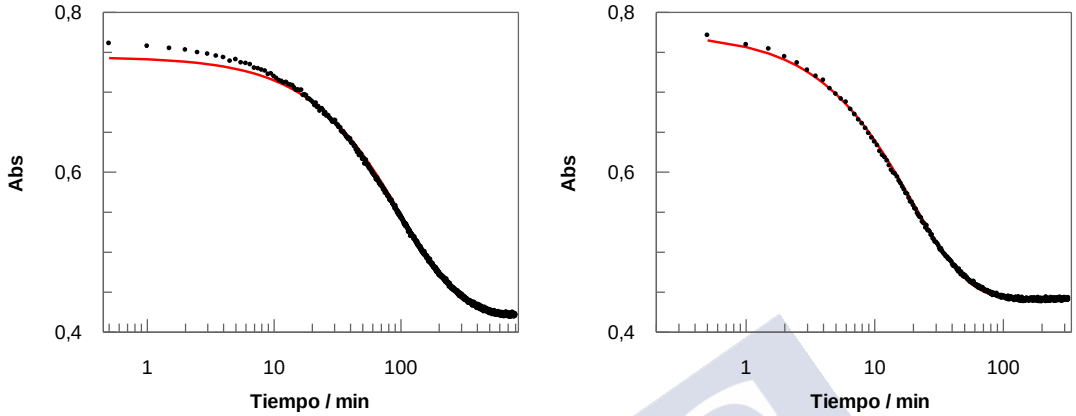


Figura 42. Variación de la absorbancia en una muestra de [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4}M y [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5}M con su ajuste al modelo (1) representado por una línea roja con temperatura constante de: (izquierda) 15°C y (derecha) 30°C.

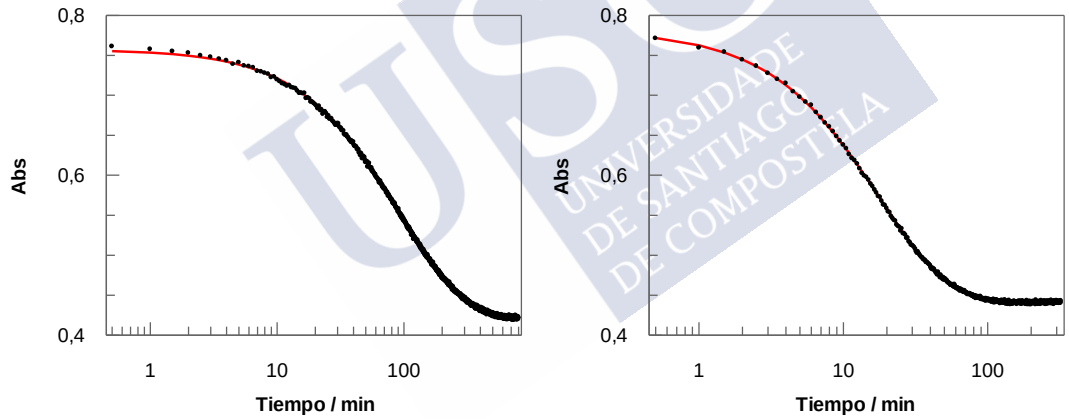


Figura 43. Variación de la absorbancia en una muestra de [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4}M y [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5}M con su ajuste al modelo (2) representado por una línea roja con temperatura constante de: (izquierda) 15°C y (derecha) 30°C.

Mediante el ajuste de todos los perfiles cinéticos se han podido determinar los valores de velocidad k_1 y k_2 para cada una de las temperaturas estudiadas (Fig 44). Tal y como se puede obsservar el comportamiento de ambas constantes es análogo, aumentan a medida que aumenta la temperatura; un comportamiento del tipo Arrhenius.

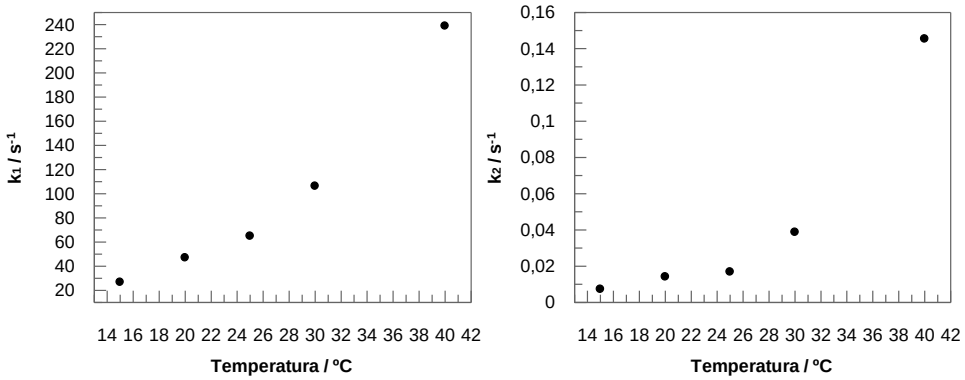


Figura 44. Valores de las constantes de velocidad k_1 y k_2 determinadas mediante el ajuste del modelo (2) en función de la temperatura del medio de reacción.

Tal y como se mencionaba en el estudio anterior con estilbeno, Svanthe Arrhenius estableció de forma empírica la relación entre las constantes de velocidad y la temperatura mediante la expresión (ecuación 2), donde k es la velocidad de reacción, E_a la energía de activación y A la constante de Arrhenius. Tomando logaritmos naturales se transforma la ecuación 2 en la ecuación 3, la representación de lnk frente a 1/T permite determinar la energía de activación del proceso (Fig 45)

$$k_{obs} = Ae^{\left(\frac{E_a}{RT}\right)} \quad (2)$$

$$\ln k_{obs} = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (3)$$

El ajuste de los datos experimentales a la ecuación Eq 3 para la formación del complejo cinético permite determinar un valor de E_a = (65 ± 2.1) kJ/ mol. Además, se puede determinar el valor de la energía de activación para el complejo termodinámico, E_a = (89 ± 8.5) kJ/ mol. El análisis de las energías de activación determinadas permiten establecer que la formación de un complejo cinético entre el P5TMA y el estilbeno presenta una energía de activación menor que la formación de un complejo termodinámico; estos resultados concuerdan con las conclusiones obtenidas en el capitulo anterior. La comparación de las energías de activación del sistema P5TMA:estilbeno y P5TMA:azobenceno permite confirmar que en el caso del azobenceno ambas energias de activación son superiores, estos resultados por tanto, justifican las diferencias entre ambos sistemas.

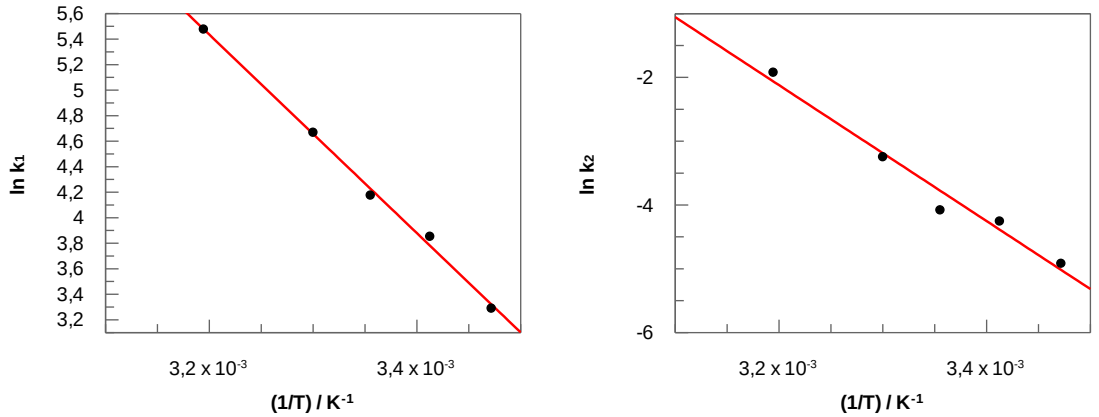


Figura 45. Variación de $\ln k_{obs}$ frente a 1/T para cada una de las temperaturas estudiadas para la mezcla 1:1 de estilbeno y P5TMA con ajuste a la ecuación 2 en línea roja para (izquierda) complejo cinético (derecha) complejo termodinámico.

7.3.2.4 Procesos competitivos.

Buscando una nueva evidencia que confirme el mecanismo propuesto se han llevado a cabo el desplazamiento del azobenceno por parte de una sonda competitiva, mediante este experimento se podra determinar el número de etapas del desplazamiento. Se han seleccionado tres sondas cuya inclusión en el P5TMA ha sido ampliamente estudiada en anteriores trabajos de nuestro grupo de investigación: el *p*-toluensulfonato sódico (TSNa), hexasulfonato sódico (C_6SO_3Na) y octasulfonato sódico (C_8SO_3Na).

1. Desplazamiento con TSNa

La cavidad y funcionalización del P5TMA le confiere una gran capacidad de actuar como receptor de moléculas aniónicas motivo por el que la complejación TSNa ha sido estudiada mediante diferentes técnicas determinandose que el P5TMA es capaz de encapsular al TSNa formando un complejo de estequiometría 1:1 y, además, cuando la concentración de sonda es lo suficientemente alta, se llegan a formar complejos con estequiometría 1:2; donde la segunda molécula de TSNa se coloca de manera externa sobre uno de los portales del macrociclo.

El alto conocimiento del sistema permitió usar al TSNa como sonda competitiva. Para la realización de este experimento se realizaron dos experimentos cinéticos, se siguió la formación del complejo termódinámico en condiciones equimolares ([P5TMA] = [Azobenceno]= 3.50 x 10^{-5}M) y con exceso de P5TMA en el medio ([Azobenceno]= 3.50 x 10^{-5}M y [P5TMA]= 7.00 x 10^{-4}M) En ambos procesos se realizaron medidas a 350 nm y temperatura constante de 25 °C hasta que la reacción terminó y, por tanto, se forma por completo el complejo termodinámico. A continuación, se añadió una concentración conocida de TSNa registrando, bajo las mismas condiciones, el perfil cinético del desplazamiento (Fig 46) donde se pueden observar tres etapas; el trazo rojo se corresponde a la formación del complejo termodinámico, mientras que el trazo negro se corresponde a la adicción del guest

competitivo, el resultado es consistente con la formación del complejo cinético y termodinámico propuesto ya que en ambos experimentos se observa una doble etapa. Cabe destacar que en ambos perfiles cinéticos no se recupera el valor de absorbancia inicial del azobenceno, es decir, el TSNa no es capaz de desplazar por completo el equilibrio de la muestra; este experimento cualitativo es una nueva evidencia del mecanismo propuesto para el sistema P5TMA:azobenceno.

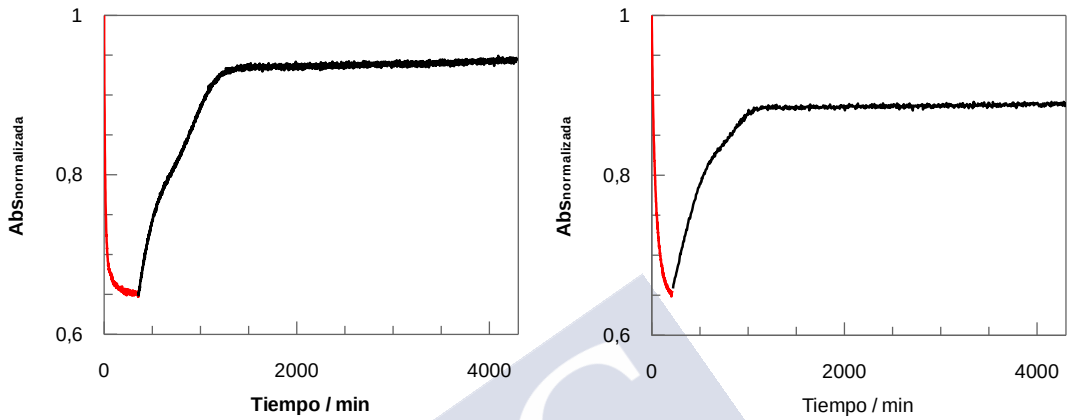


Figura 46. (Izquierda) Perfil cinético medido a 350 nm y temperatura constante de 25°C de: (—) P5TMA y Azobenceno en condiciones equimolares (3.50 x 10^{-5}M) y (—) Adicción de TSNa (16.5 x 10^{-3}M). (Derecha) Perfil cinético medido a 350 nm y temperatura constante de 25°C de: (—) P5TMA 7.00 x 10^{-4}M y azobenceno 3.50 x 10^{-5}M (—) Adicción de TSNa (13.5 x 10^{-3}M).

2. Desplazamiento con moleculas lineales (C_6SO_3Na y C_8SO_3Na)

Teniendo en cuenta la alta afinidad de P5TMA por aniones orgánicos de pequeño tamaño, se evaluó el desplazamiento del equilibio formado entre P5TMA y el azobenceno con dos moléculas lineales, C_6SO_3Na y C_8SO_3Na, cuyo modo de complejación y constantes de equilibrio han sido anteriormente determinadas en el grupo. A diferencia del TSNa, estas sondas solo son capaces de formar complejos con estequiometría 1:1.

Para la realización de estos experimentos se mantuvieron las condiciones experimentales del apartado anterior. A una mezcla de 3.50 x 10^{-5}M azobenceno y 7.00 x 10^{-4}M de P5TMA y una vez transcurrido el tiempo necesario para la formación del complejo termodinámico se ha adiccionado una concentración conocida de sonda competitiva (Fig 47), en ambos casos el comportamiento observado es parejo al definido en el apartado anterior; el trazo rojo muestra la formación del complejo termodinámico mientras que, el trazo negro representa el desplazamiento del azobenceno de la cavidad del P5TMAen dos etapas claramente diferenciadas. Este resultado es concordante, de nuevo, con el mecanismo propuesto.

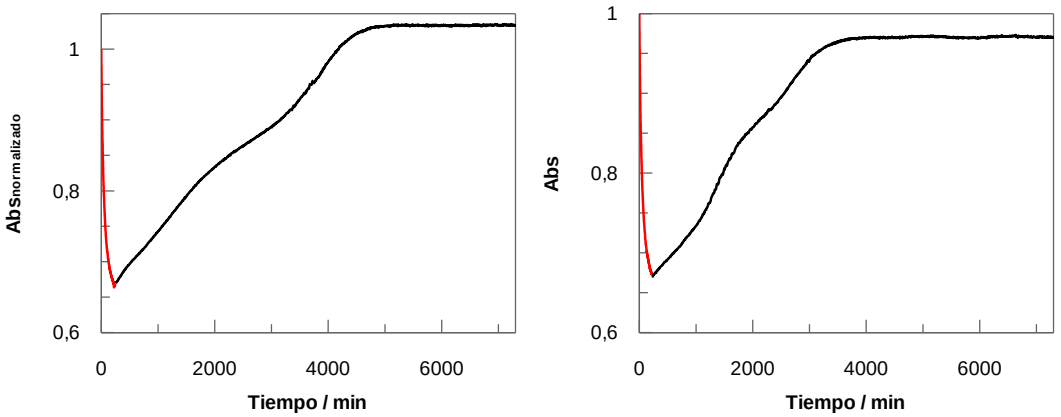


Figura 47. (Izquierda) Perfil cinético medido a 350 nm y temperatura constante de 25°C de: (—) P5TMA 7.00 x 10^{-4}M y azobenceno 3.50 x 10^{-5}M (—) Adicción de C_6SO_3Na (15.7 x 10^{-3}M). (Derecha) Perfil cinético medido a 350 nm y temperatura constante de 25°C de: (—) P5TMA 7.00 x 10^{-4}M y azobenceno 3.50 x 10^{-5}M (—) Adicción de C_8SO_3Na (1.00 x 10^{-3}M).

7.3.2.5 Influencia del tamaño de la cavidad.

Como último factor se evaluó el tamaño de la cavidad del macrociclo, seleccionando de nuevo el P6TMA, formado por seis unidades e idéntica funcionalización al P5TMA. La síntesis de este macrociclo fue realizada siguiendo una versión modificada de los métodos descritos por los grupos de Feihe Huang y Jean-François Nierengarten.

El estudio cinético se realizó en idénticas condiciones al realizado con el P5TMA, la concentración de azobenceno se mantiene constante en todos los experimentos en 3.50 x 10^{-5}M, temperatura constante de 25.0 °C, y variación de la concentración de P6TMA (Fig. 48). Sin embargo, en este caso la reacción es tan rápida que es necesario el uso de la técnica de *Stopped-Flow*.

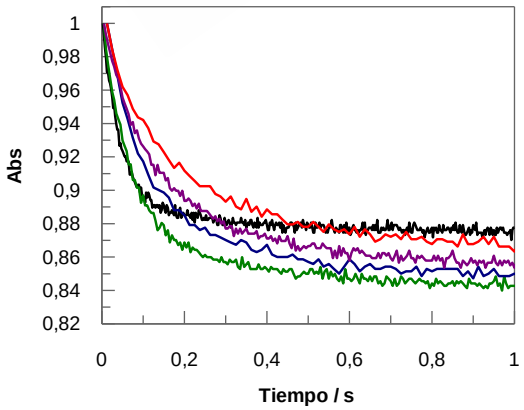


Figura 48. Perfiles cinéticos medidos a 350 nm y temperatura monitorizada a 25°C de una concentración constante de azobenceno (3.50 x 10^{-5}M) y variación de P6TMA: (—) 2.00 x 10^{-5}M, (—) 3.50 x 10^{-5}M, (—) 6.00 x 10^{-5}M, (—) 9.00 x 10^{-5}M y (—) 1.00 x 10^{-5}M.

El procedimiento de análisis de las trazas cinéticas se realiza de forma paralela al resto de experimentos, inicialmente se plantea un modelo de complejación simple consistente en la inclusión de una molécula de azobenceno en la cavidad del P6TMA según se plantea en el modelo (3); con una constante de velocidad k_1 asociada al proceso; el modelo propuesto no se ajusta a los datos experimentales tal y como se muestra en el ejemplo de la figura 49. Ante estos resultados y tomando como referencia el mecanismo propuesto para el P5TMA se planteó un nuevo modelo (4) concordante con el modelo (2). Este modelo se ajusta a los datos experimentales tal y como se puede observar en la figura 49, obteniéndose así las constantes de velocidad para cada una de las etapas (Fig. 50); de nuevo los resultados muestran la misma tendencia, la constante de velocidad k_1 disminuye a medida que aumenta la concentración de P6TMA en el sistema. Los ajustes se muestran en los apéndices 4.5.14 y 4.5.15. La tendencia observada es otra evidencia de que las constantes están afectadas por otro proceso anterior a la formación de un complejo cinético y, por lo tanto, confirman que esta característica no es, de nuevo, una particularidad del sistema P5TMA+estilbeno.

$$\text{P6TMA} + \text{azobenceno} \xrightarrow{k1} \text{Complejo termodinámico}$$

Modelo 3. Formación de un complejo 1:1 entre P6TMA y azobenceno

$$\text{P6TMA} + \text{azobenceno} \xrightarrow{k1} \text{Complejo cinético} \xrightarrow{k2} \text{Complejo termodinámico}$$

Modelo 4. Formación de un complejo cinético que evoluciona a termodinámico entre P6TMA y azobenceno.

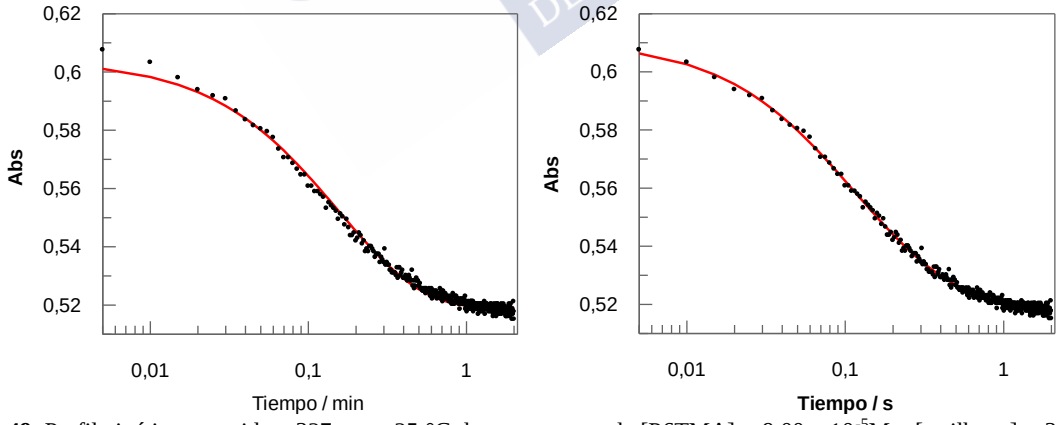


Figura 49. Perfil cinético recogido a 327 nm y 25 °C de una muestra de [P6TMA] = 9.00 x 10^{-5}M y [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5}M y su ajuste representado mediante una línea roja al modelo: (izquierda) (3) y (derecha) (4).

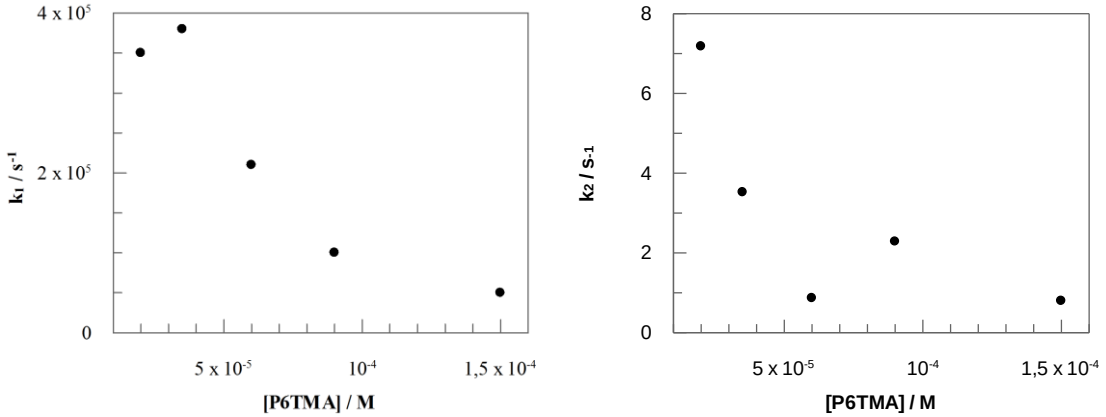


Figura 50 (Izquierda) Variación de los valores de k_1 obtenidos mediante el ajuste del modelo (4) a los datos experimentales al variar la concentración de P6TMA del medio para una concentración constante de azobenceno de 3.50 x 10^{-5}M. (Derecha) Variación de los valores de k_2 obtenidos mediante el ajuste del modelo (4) a los datos experimentales al variar la concentración de P6TMA del medio para una concentración constante de azobenceno de 3.50 x 10^{-5}M.

Repitiendo el mismo análisis de datos que en el realizado anteriormente con el estilbeno, a partir de la linealización de las ecuaciones resultantes del modelo (4) se establecen la relación entre la formación del complejo externo y su evolución al complejo cinético, que se definen igualmente con la ecuación 1. Desafortunadamente y de forma paralela al estudio con estilbeno, no es posible determina la constante de velocidad y de equilibrio siendo la relación $K_E/k_{1'}$ es de 7.39 ± 0.25.

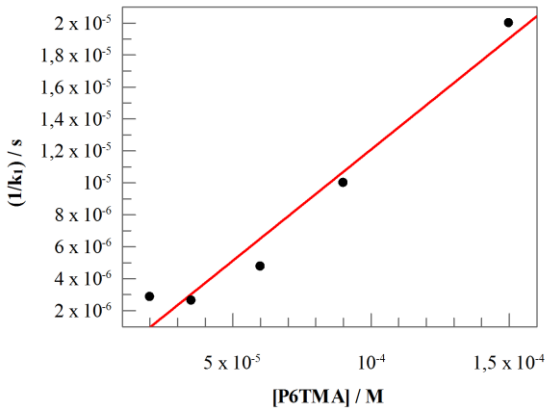


Figura 51. Ajuste de la variación de $1/k_1$ frente a la concentración de P5TMA con una concentración constante de estilbeno de 3.50 x 10^{-5}M.

La comparación de las velocidades de reacción de la formación de complejos termodinámicos entre azobenceno y P5TMA o P6TMA nos indican que, al igual que ocurre con el estilbeno, el proceso de rotación de las unidades del pilarareno sobre su eje está más favorecido cuanto mayor sea la cavidad del macrociclo. Además, se puede concluir que el proceso de inversión de varias unidades del pilarareno no es una particularidad del sistema P5TMA:estilbeno, abriendose una importante vía de investiación en el conocimiento de la estructura y conformación de este macrociclo al formar complejos de inclusión.

7.3.2.6 Estudio mediante RMN.

La evolución temporal de la mezcla de azobenceno y P5TMA se ha monitorizado mediante experimentos de ^{1}H-RMN realizados a los 5 minutos, 28 horas, 9 días, 14 días y 20 días después de mezclar ambas moléculas con una estequiometria 1:1 (1.00 mM cada una de ellas). La región aromática y alifática del espectro se muestra en las Fig.52 y Fig.53, respectivamente.

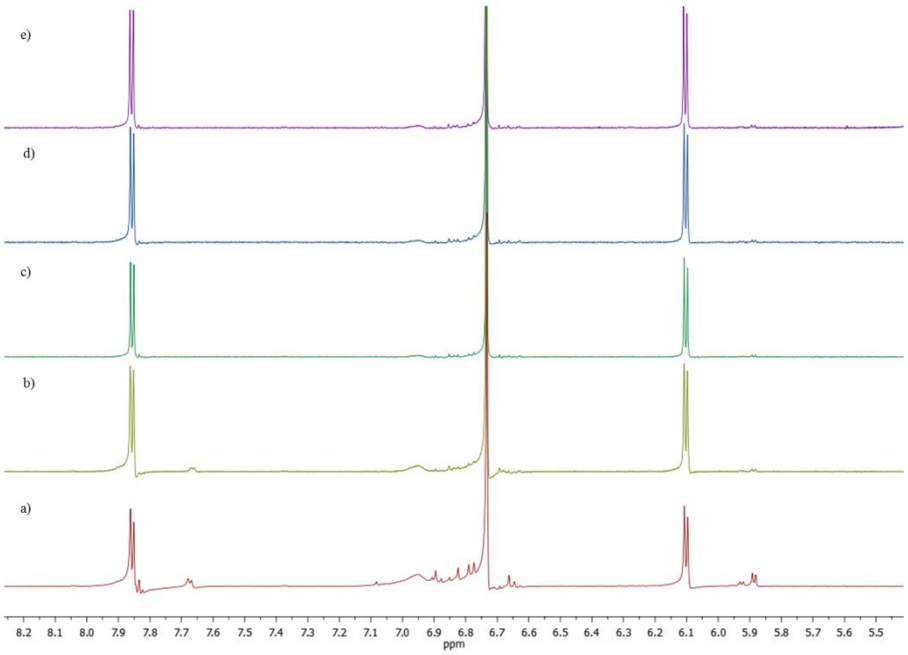


Figura 52. Región aromática del espectro 1D ^{1}H RMN de la mezcla 1:1 de azobenceno y P5TMA. Los espectros de a) a d) han sido tomados tras un tiempo de mezclado de: a) 5 min., b) 28 horas, c) 9 días, d) 14 días y e) 20 días.

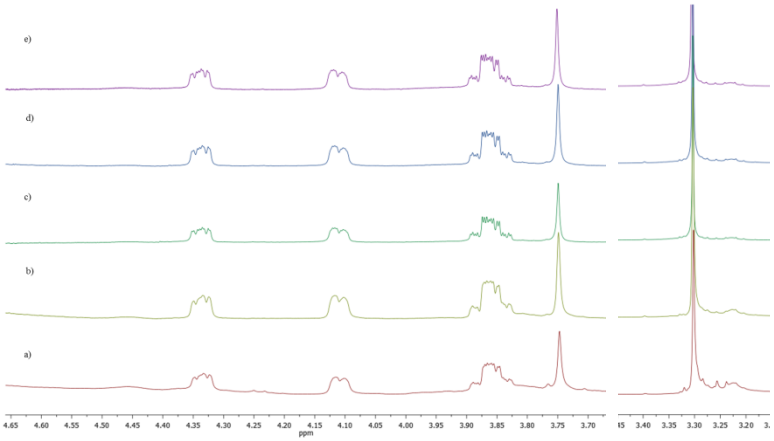


Figura 53. Región alifática del espectro 1D ^{1}H RMN de la mezcla 1:1 de azobenceno y P5TMA. Los espectros de a) a d) han sido tomados tras un tiempo de mezclado de: a) 5 min., b) 28 horas, c) 9 días, d) 14 días y e) 20 días.

La interpretación de los espectros resultantes se basa en los resultados obtenidos mediante el estudio del estilbeno. La formación de un complejo de inclusión entre el P5TMA y el azobenceno se evidencia en este conjunto de espectros mediante la aparición de numerosas señales en la zona aromática. Además, las señales correspondientes a los compuestos puros sufren grandes modificaciones al ser comparadas con las señales de la mezcla de reacción, este comportamiento es homólogo al del estilbeno.

El patrón de desdoblamientos permite justificar la formación de los tres tipos de complejos definidos anteriormente: complejos externos, complejo cinético y complejo termodinámico. La formación de complejos externos se justifica mediante la aparición de señales que solo aparecen en el primer espectro registrado, es especialmente significativo en la franja de 7.00-6.75 ppm. El hecho de que estos picos no sean especialmente anchos denotan que los complejos formados tienen una cierta heterogeneidad conformacional y, con una dinámica de intercambio lenta o intermedia con respecto a la escala de tiempos. Por lo tanto, las señales que desaparecen transcurridos los primeros 5 min pueden ser asignados a complejos externos inestables mientras que las que permanecen tras 14 días representarían complejos externos estables. La formación de un complejo cinético se justifica, al igual que en el estudio del estilbeno, por la aparición de señales cuya intensidad aumenta hasta un punto máximo para, a continuación, observarse la disminución de la intensidad. Este comportamiento evidencia la rápida formación de un complejo cinético que evoluciona paulatinamente hacia una estructura mucho más estable. Los cambios en las señales correspondientes al azobenceno solo son compatibles con la introducción de la sonda dentro de la cavidad del pilarareno. Al igual que en el estudio anterior, las señales correspondientes al NMe_3 del macrociclo sufren un desdoblamiento claro, este patrón se produce en todas las señales del macrociclo si bien, el solapamiento y ensanchamiento de las señales hacen imposible una identificación certera de cada una de ellas. Este tipo de desdoblamiento pone de manifiesto la pérdida de simetría del P5TMA con respecto al macrociclo puro. La formación del complejo termodinámico se justifica mediante la aparición de señales de forma paralela a la desaparición de las correspondientes al complejo cinético. El cambio más significativo ocurre con los protones correspondientes al grupo NMe_3 que recuperan la multiplicidad correspondiente al P5TMA puro. El extremo cambio en los desplazamientos químicos indica la total internalización del azobenceno en la cavidad del P5TMA. La suma de estos resultados a los obtenidos en los apartados anteriores a través del estudio mediante espectroscopía UV-Vis permiten esclarecer que el mecanismo propuesto para el estilbeno y el P5TMA es compatible tambien con el azobenceno.

El primer paso consiste en la rápida formación de complejos externos donde el azobenceno no se introduce en la cavidad del P5TMA. En el segundo paso se plantea un proceso relativamente rápido donde dos unidades del P5TMA no consecutivos invierten su posición dando lugar a una cavidad asimétrica del tipo 10101, de esta forma se abre un espacio mayor en la cavidad que permite la inserción del azobenceno. Este proceso de inversión ocurre de forma simultánea a la entrada del anfitrión dando lugar al complejo

cinético. El último paso consiste en la transición del complejo cinético a un complejo más estable de forma que las dos unidades que invirtieron su posición anteriormente recuperen su posición original. La formación del complejo termodinámico conduce a una cavidad tipo 1111 tal y como se especifica en la figura 9 de este capítulo.

7.4 CONCLUSIONES.

En este capítulo se ha puesto de manifiesto un nuevo modo de complejación por parte de los pilararenos ya que, hasta el momento, no existen referencias bibliográficas en las que la formación de un complejo de inclusión implique la inversión de alguna de sus unidades.

La caracterización mediante RMN permite esclarecer el mecanismo de inclusión siendo posible la identificación de tres tipos de complejos diferentes: complejos externos, complejo cinético y complejo termodinámico.

Los estudios por espectroscopía UV-vis y el ajuste de las cinéticas obtenidas permiten confirmar la presencia de estos tres tipos de complejos en las muestras estudiadas. Es posible determinar los parámetros termodinámicos asociados a cada proceso. Para una concentración de 3.50×10^{-5}M de estilbeno se determinó una constante de equilibrio para la formación de complejos externos de $(8.76 \pm 0.8) \times 10^{4}$ M^{-1}, la velocidad de formación del complejo cinético calculado es $(1.25 \pm 0.14) \times 10^{3}$ s^{-1} con el P5TMA. Para una concentración de 2.50×10^{-5}M de estilbeno no fue posible la determinación de las constantes. Mediante los estudios realizados con P6TMA no fue posible la determinación de las constantes de equilibrio y velocidad. Las energías de activación para P5TMA y estilbeno son (44 ± 2.9) y (56 ± 6.0) kJ / mol para el complejo cinético y termodinámico, respectivamente. Para una concentración de 3.50×10^{-5}M de azobenceno se determinó una constante de equilibrio para la formación de complejos externos de $(3.44 \pm 0.15) \times 10^{4}$ M^{-1}, la velocidad de formación del complejo cinético calculado es (10.42 ± 0.25) s^{-1} con el P5TMA. Mediante los estudios realizados con P6TMA no fue posible la determinación de las constantes de equilibrio y velocidad. Las energías de activación para P5TMA y azobenceno son (65 ± 2.1) y (89 ± 8.5) kJ / mol para el complejo cinético y termodinámico, respectivamente.

7.5 APÉNDICES.

7.5.1 Ajuste del sistema P5TMA:Estilbeno al modelo (1).

7.5.1.1 Muestras con [Estilbeno] = 2.50 x 10^{-5}M.

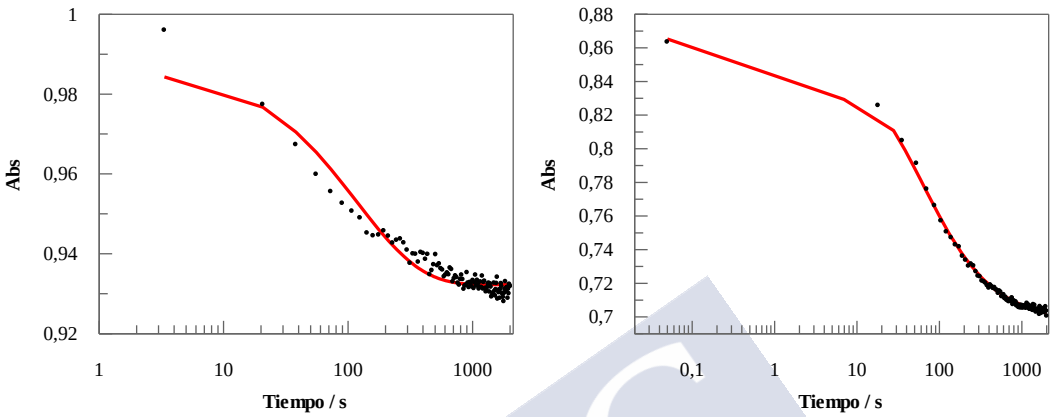


Figura A1. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 1.00 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 2.50 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

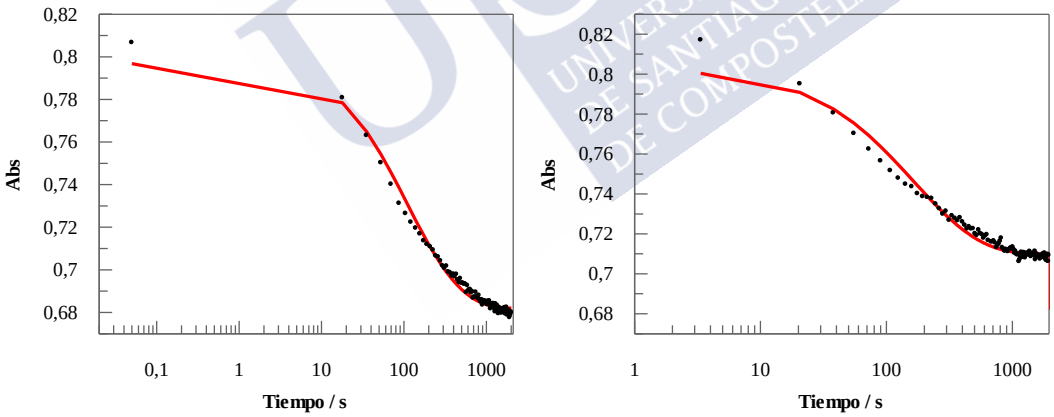


Figura A2. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.50 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

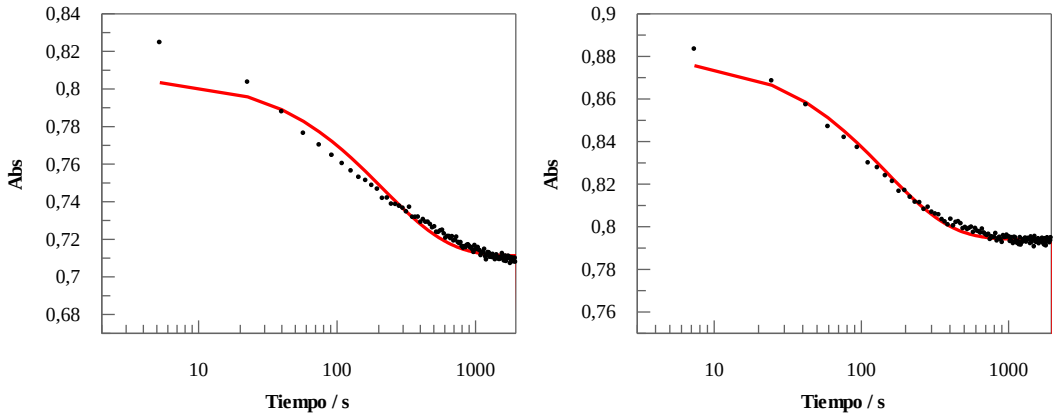


Figura A3. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 9.00 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.00 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

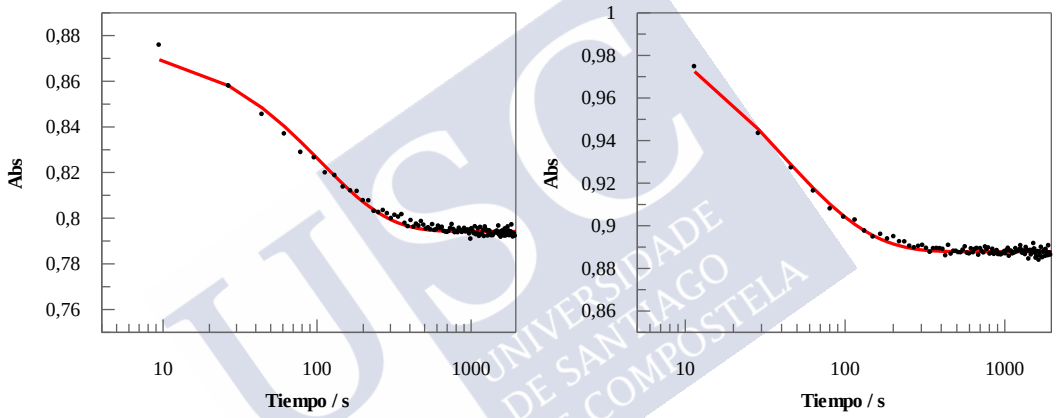


Figura A4. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.50 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 5.00 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

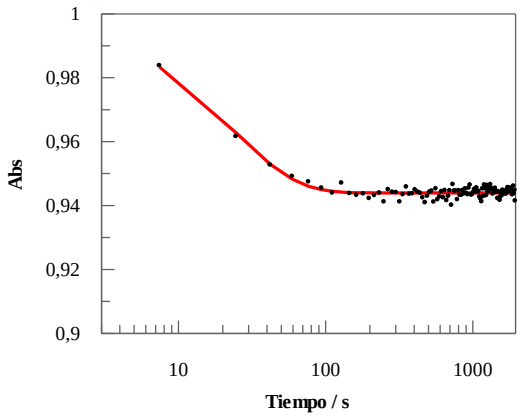


Figura A5. Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.1.2 Muestras con [Estilbeno] = 3.50 x 10^{-5}M.

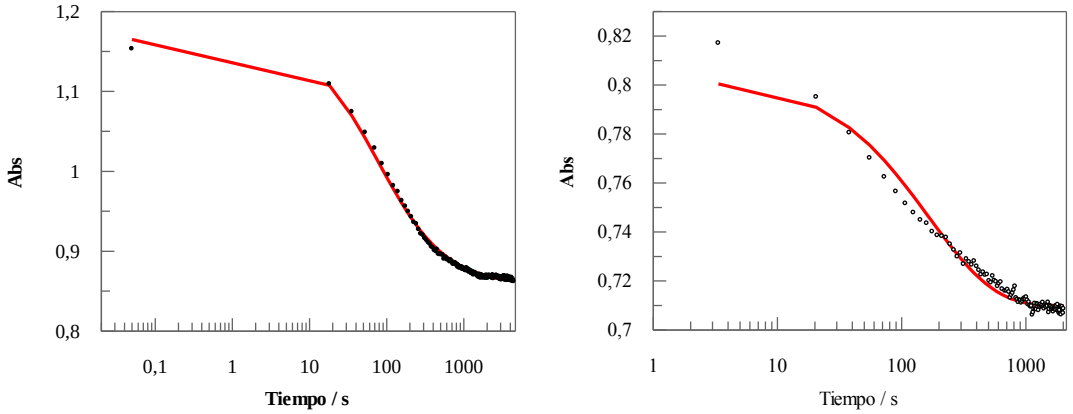


Figura A6. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.50 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

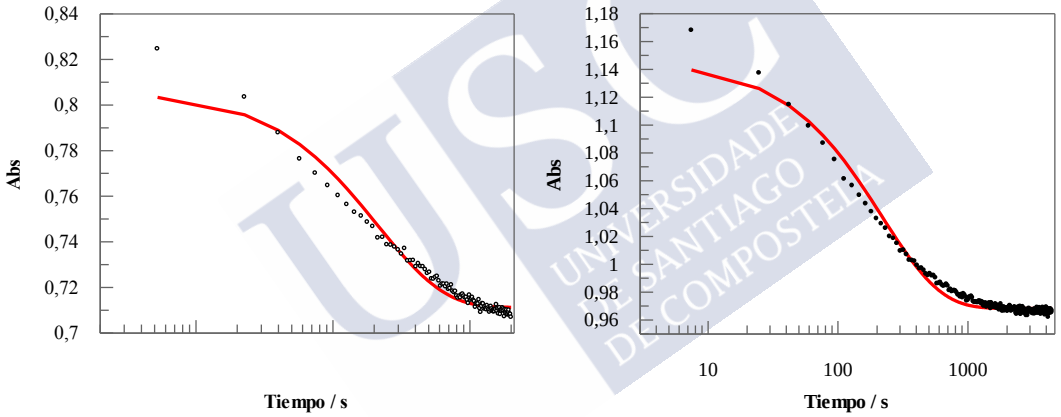


Figura A7. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 9.00 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.00 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

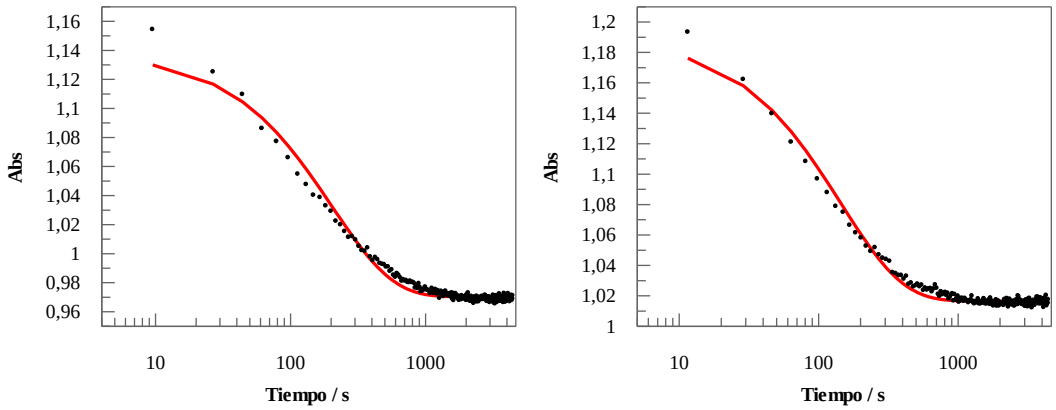


Figura A8. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.50 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 5.00 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

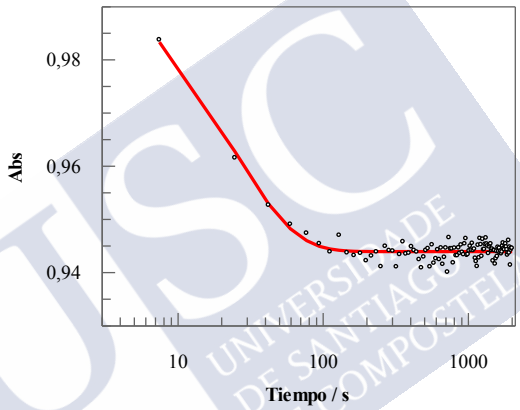


Figura A9. Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.2 Ajuste del sistema P5TMA:Estilbeno al modelo (2).

7.5.2.1 Muestras con [Estilbeno] = 2.50 x 10^{-5}M.

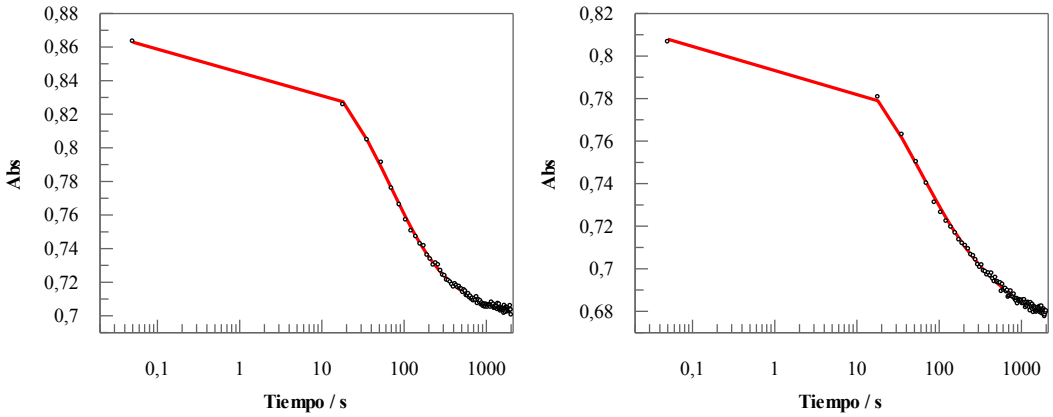


Figura A10. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 2.50 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.50 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

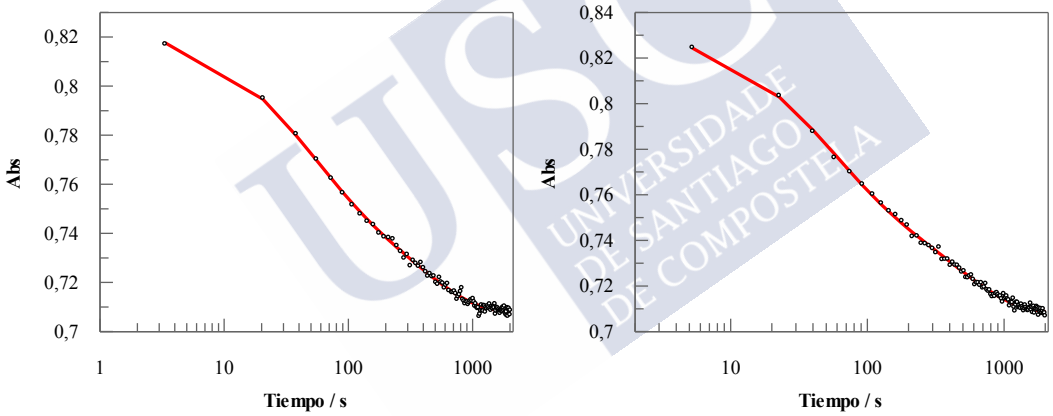


Figura A11. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 9.00 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

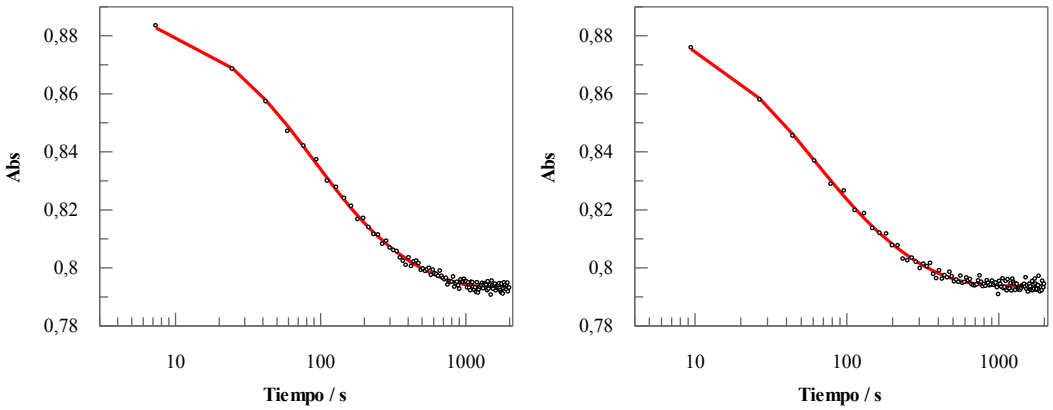


Figura A12. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.00 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.50 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

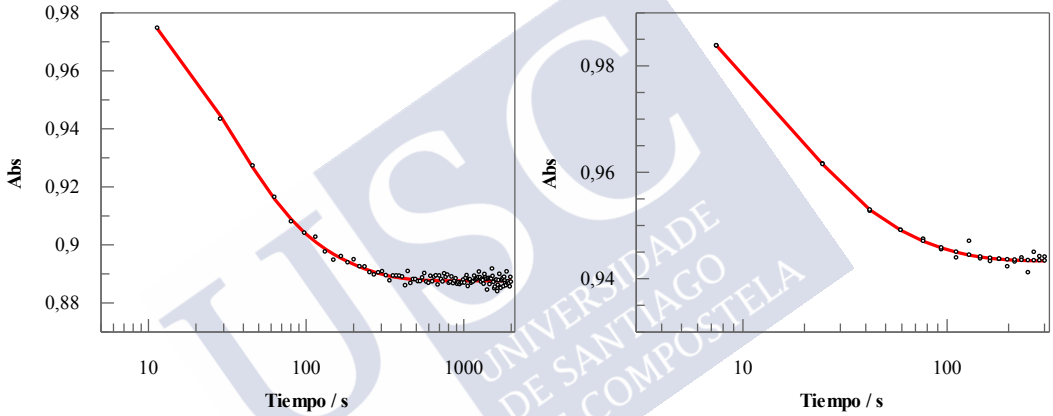


Figura A13. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 5.00 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.2.2 Muestras con [Estilbeno] = 3.50 x 10^{-5}M.

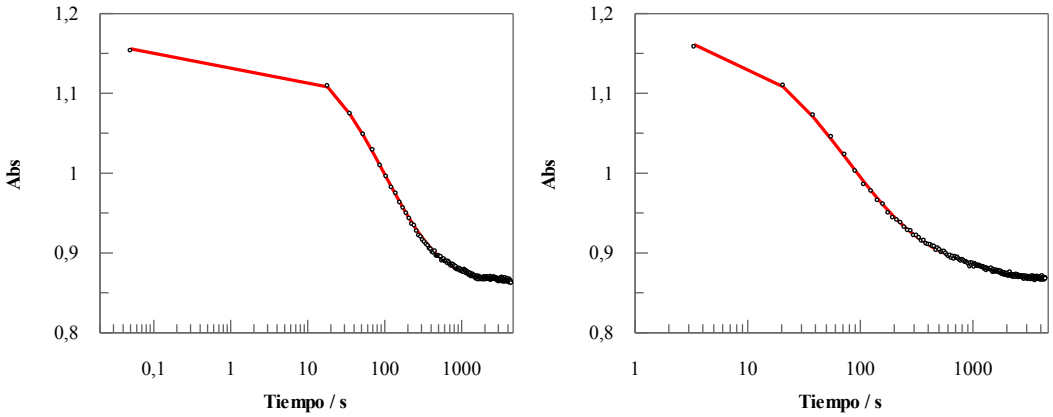


Figura A14. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.50 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

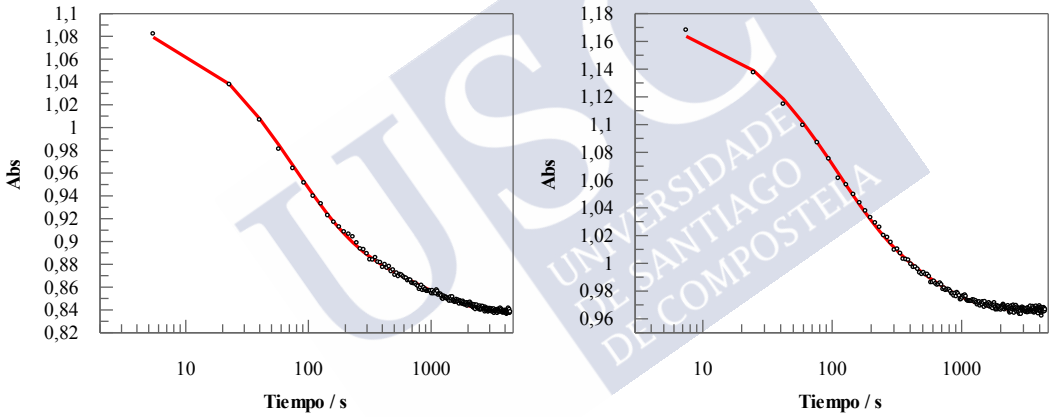


Figura A15. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 9.00 x 10^{-5} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.00 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

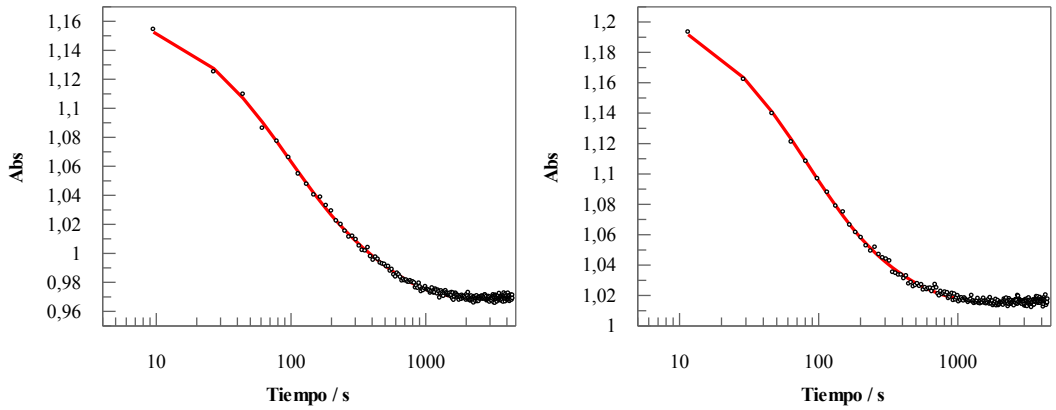


Figura A16. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.50 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 5.00 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

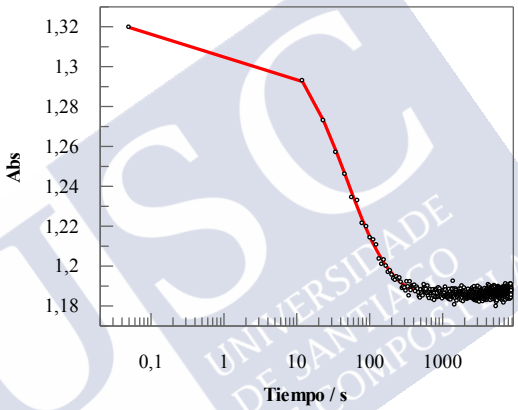


Figura A17. Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.3 Deducción y linealización del modelo (2).

$$P + S \overset{K_E}{\leftrightarrow} CE \overset{k_1'}{\rightarrow} CC \overset{k_2'}{\rightarrow} CT$$

*Equilibrio

$$P + E \overset{K_E}{\leftrightarrow} CE$$

$$K_E = \frac{[E]}{[P][S]} \rightarrow [E]=K_E[P][S] \qquad (1)$$

$$[S]_T = [S] + [E] \qquad (2)$$

*Combinando (1) y (2)

$$[S]_T = [S] + K_E[P][S] = (1 + K_E[P])\,[S]$$

$$[S] = \frac{[S]_T}{1 + K_E[P]}$$

*Definición de velocidad

$$v = k_1'[E] = k_1$$

$$v = k_1'K_E([P][S]) = k_1' \frac{K_E[P]}{1 + K_E[P]}[S]_T = \frac{k_1'}{1 + K_E[P]}[S]$$

$$k_1 = \frac{k_1'}{1 + K_E[P]}$$

*Linealización de la ecuación

$$k_1 = \frac{k_1'}{1 + K_E[P]} \xrightarrow[\text{linealización}]{} \frac{1}{k_1} = \frac{1}{k_1'} + \frac{K_E}{k_1'}[P]$$

7.5.4 Ajuste del sistema P5TMA:Estilbeno al modelo (1) con variación de temperatura.

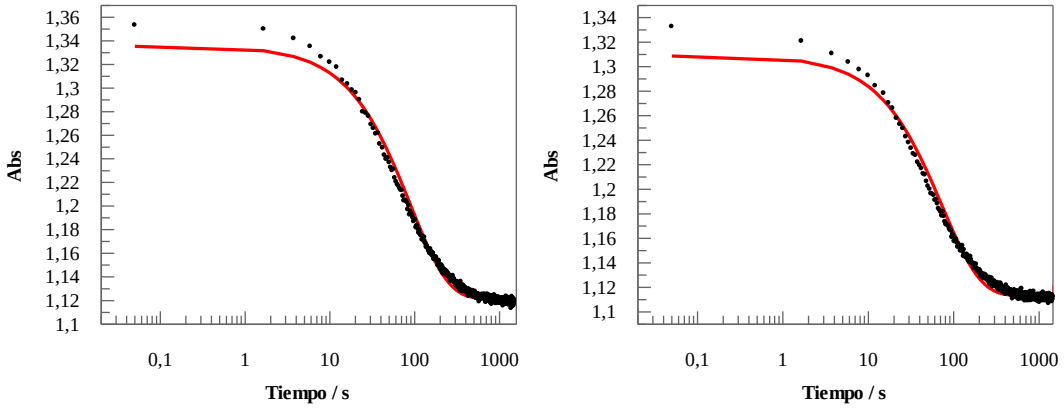


Figura A18. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 15ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 20ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

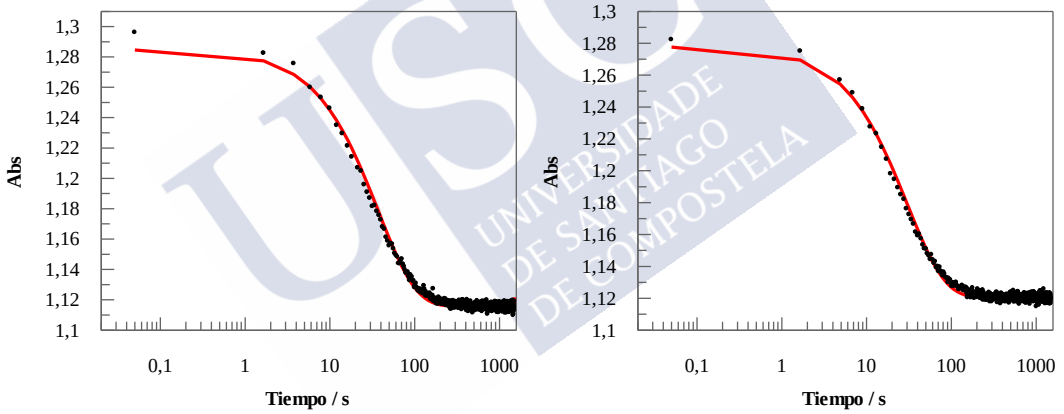


Figura A19. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 30ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

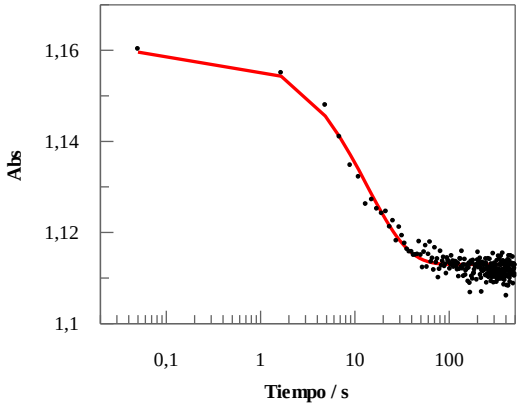


Figura A20. Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 40ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.5 Ajuste del sistema P5TMA:Estilbeno al modelo (2) con variación de temperatura.

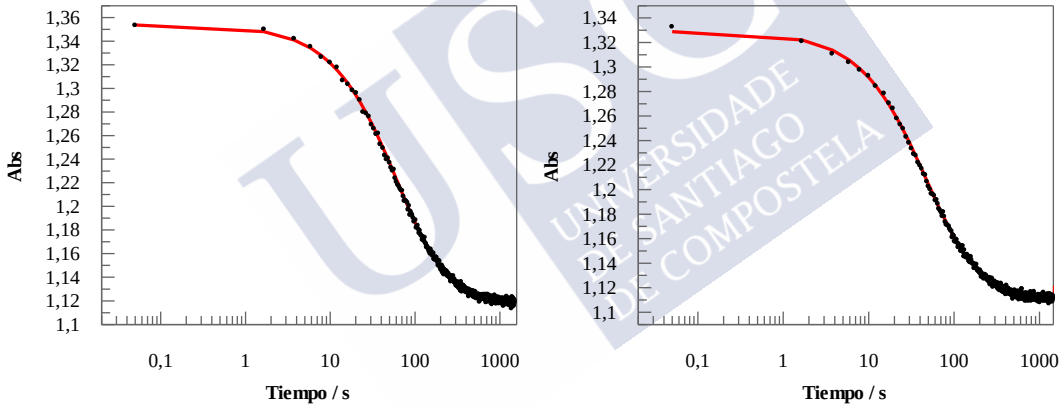


Figura A21. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 15ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 20ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

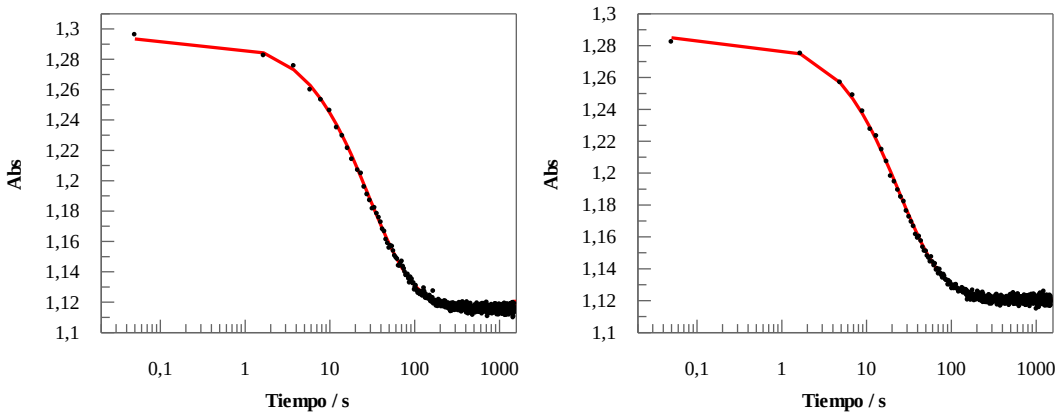


Figura A22. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 30ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

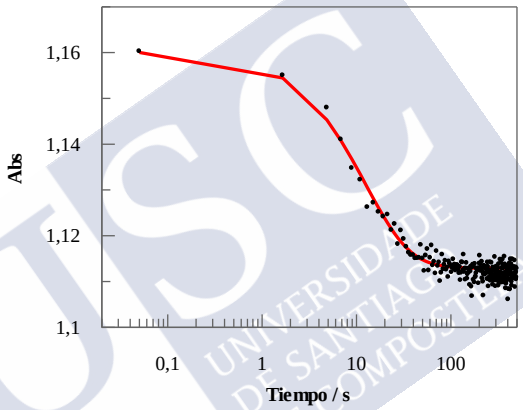


Figura A23. Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 40ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.6 Ajuste del sistema P6TMA:Estilbeno al modelo (1).

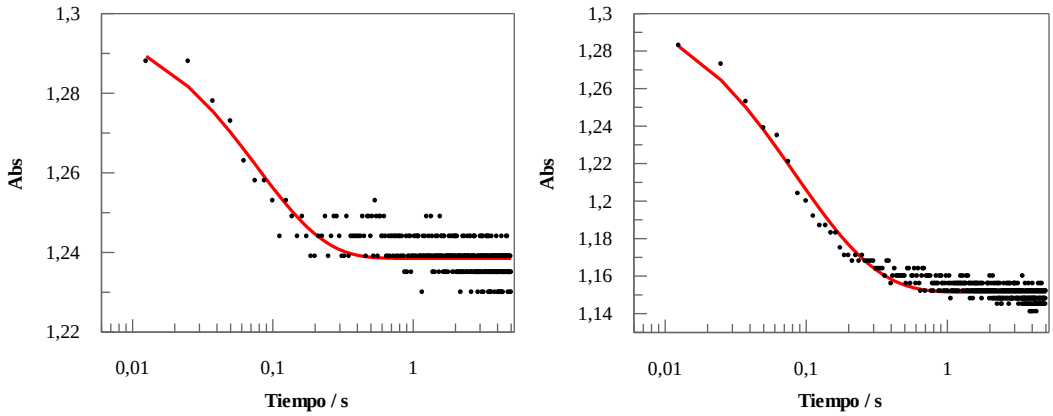


Figura A24. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 1.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 2.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

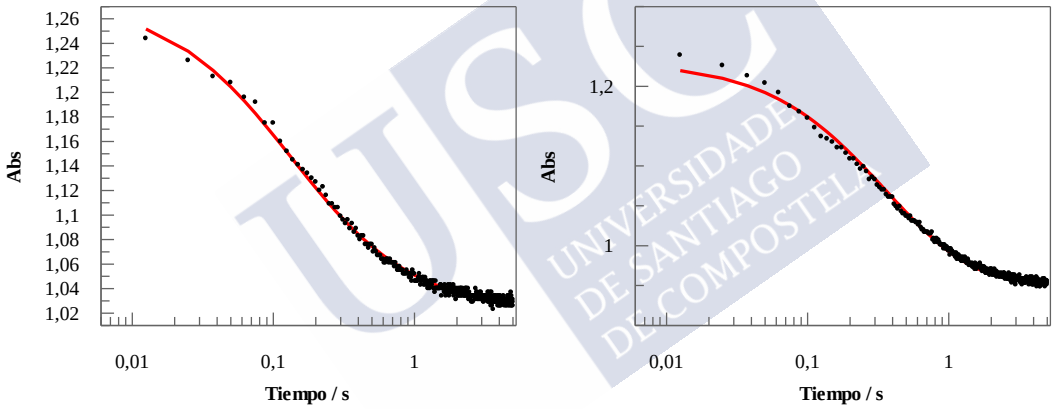


Figura A25. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 3.50 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 6.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

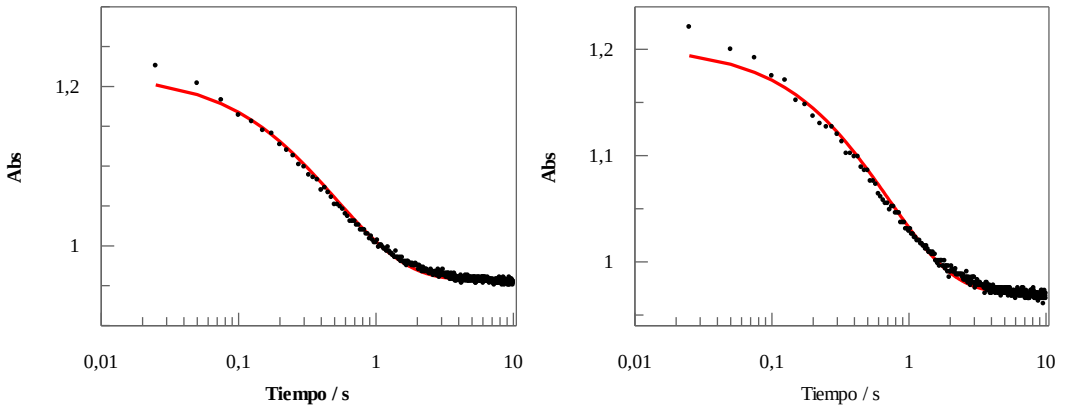


Figura A26. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 9.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 1.50 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

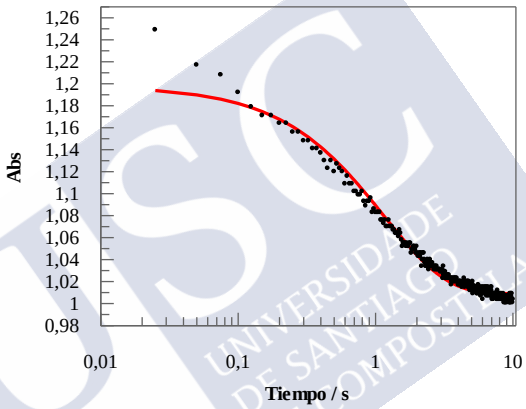


Figura A27. Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 3.50 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.7 Ajuste del sistema P6TMA:Estilbeno al modelo (2).

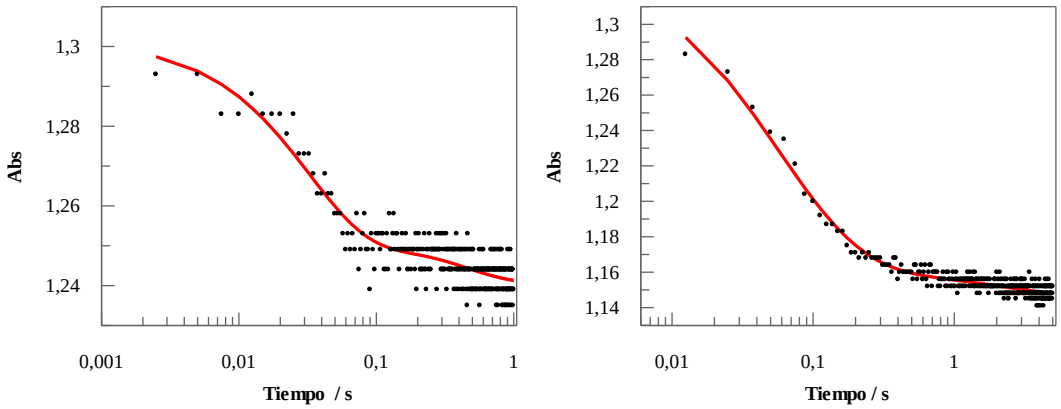


Figura A28. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 1.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 2.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

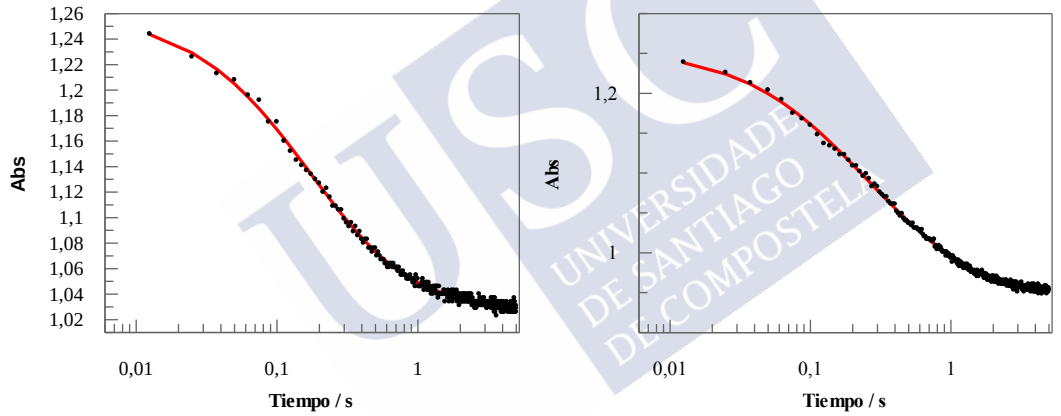


Figura A29. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 3.50 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 6.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

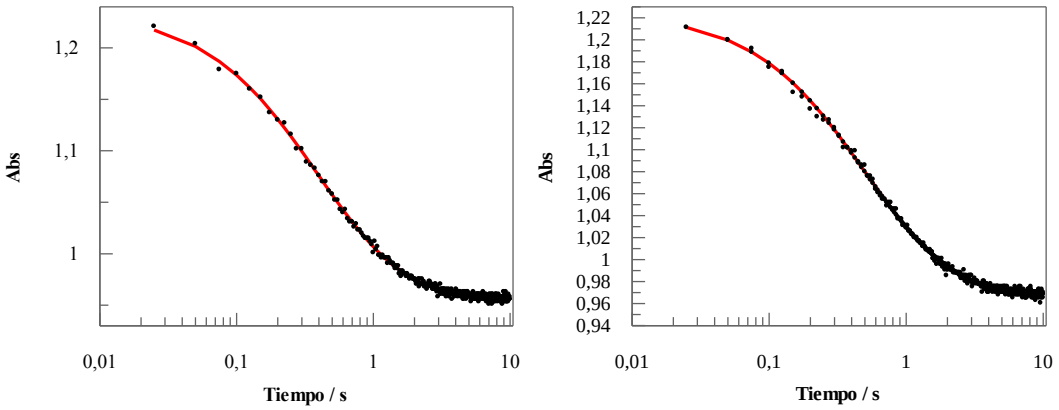


Figura A30. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 9.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 1.50 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

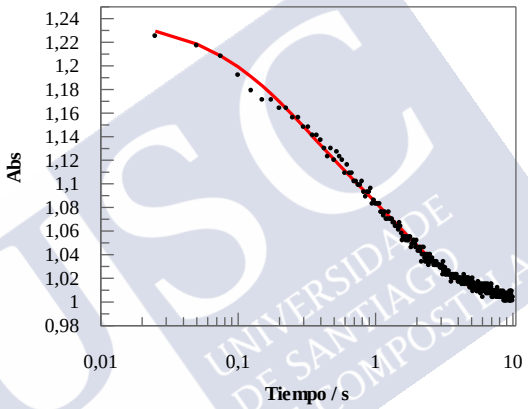


Figura A31. Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [estilbeno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] =3.50 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 337 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.8 Ajuste del sistema P5TMA:Azobenceno al modelo (1).

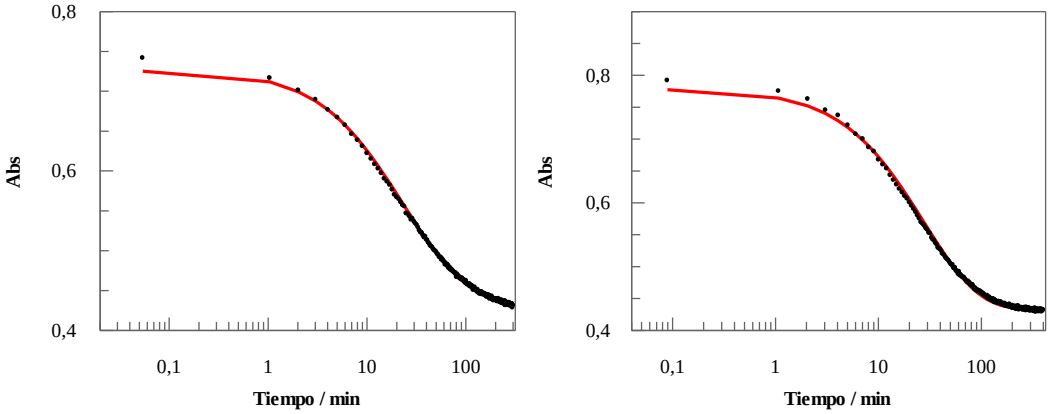


Figura A32. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.50 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

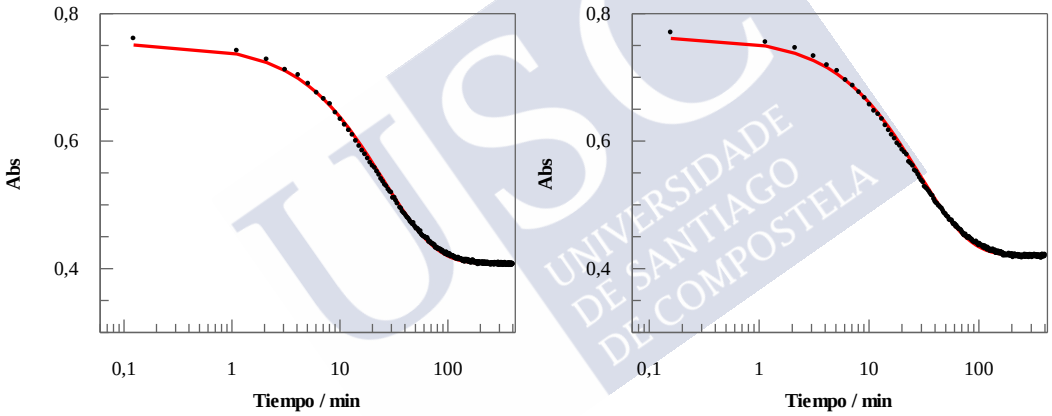


Figura A33. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 9.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 1.50 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

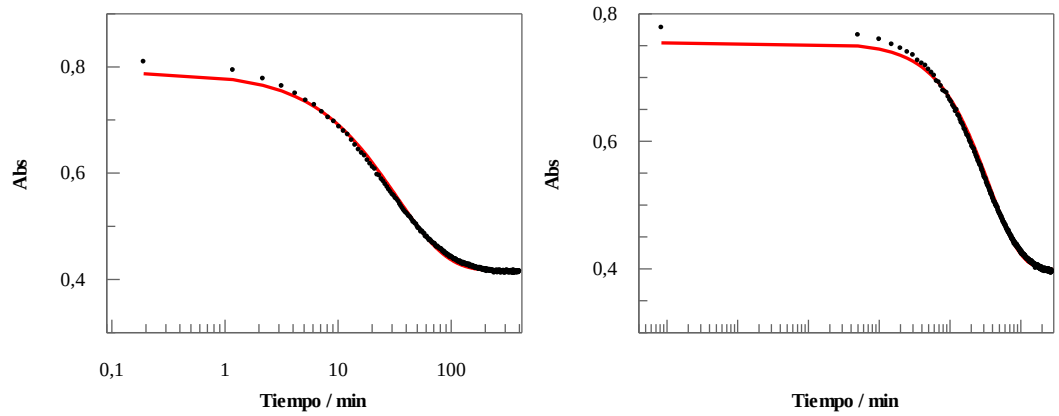


Figura A34. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.50 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

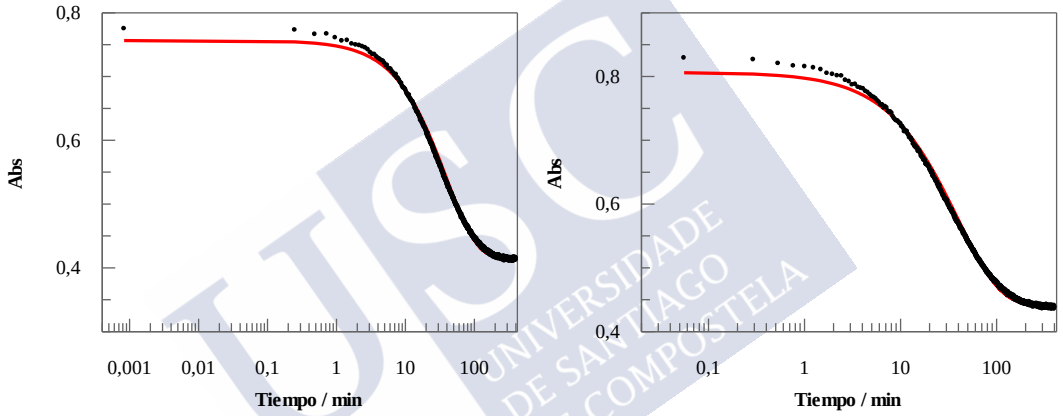


Figura A35. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 5.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.9 Ajuste del sistema P5TMA:Azobenceno al modelo (2).

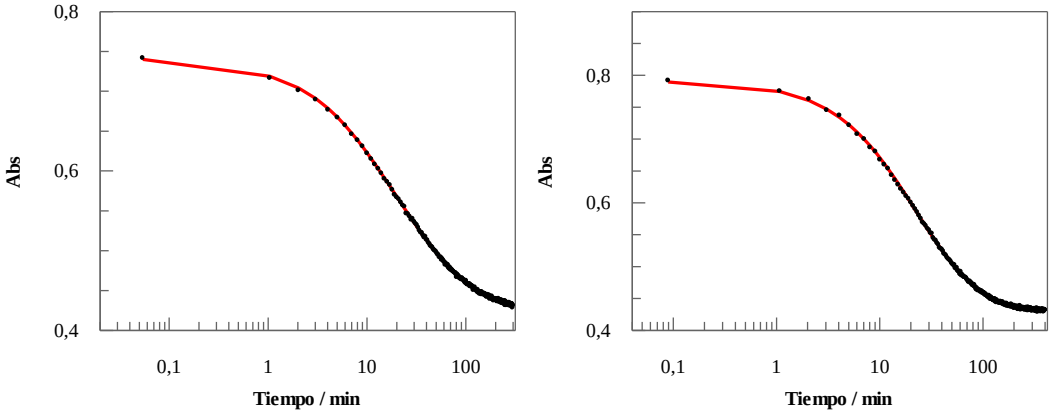


Figura A36. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.50 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 6.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

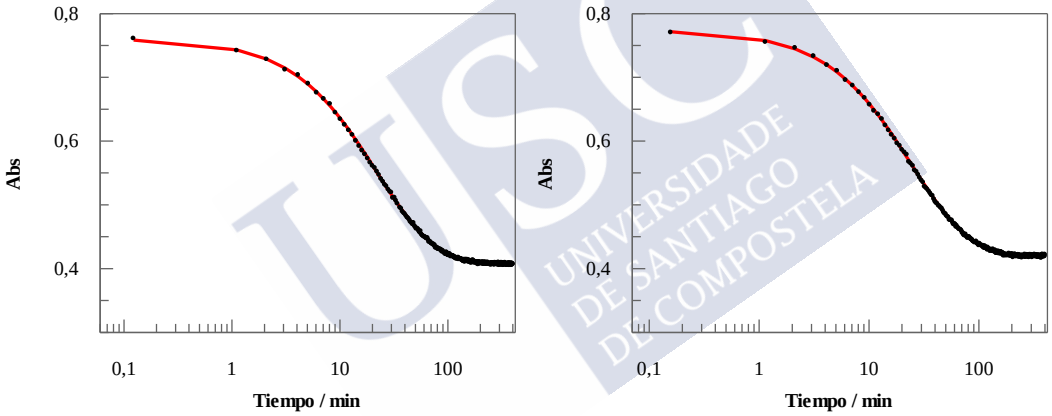


Figura A37. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 9.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 1.50 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

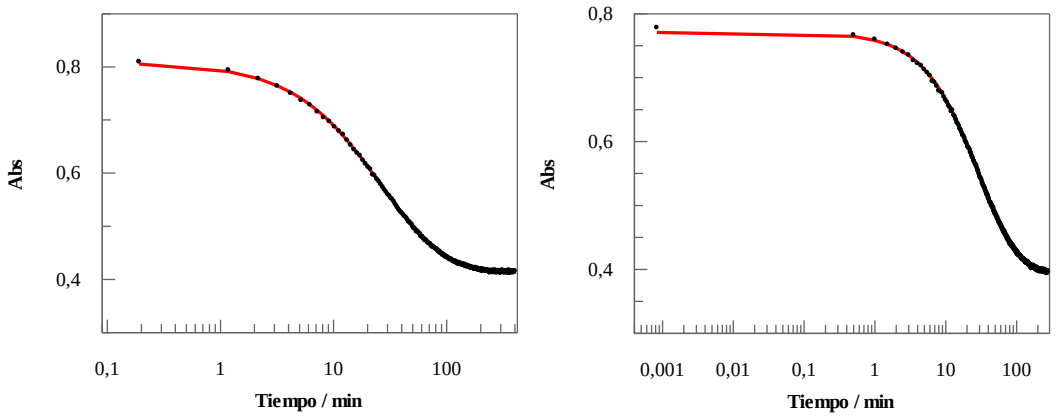


Figura A38. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 3.50 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

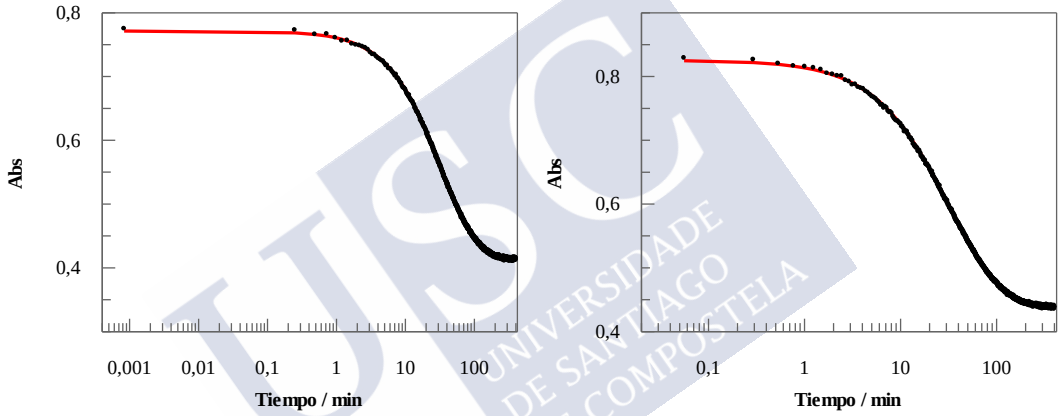


Figura A39. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 5.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.10 Ajuste del sistema P5TMA:Azobenceno al modelo (1).

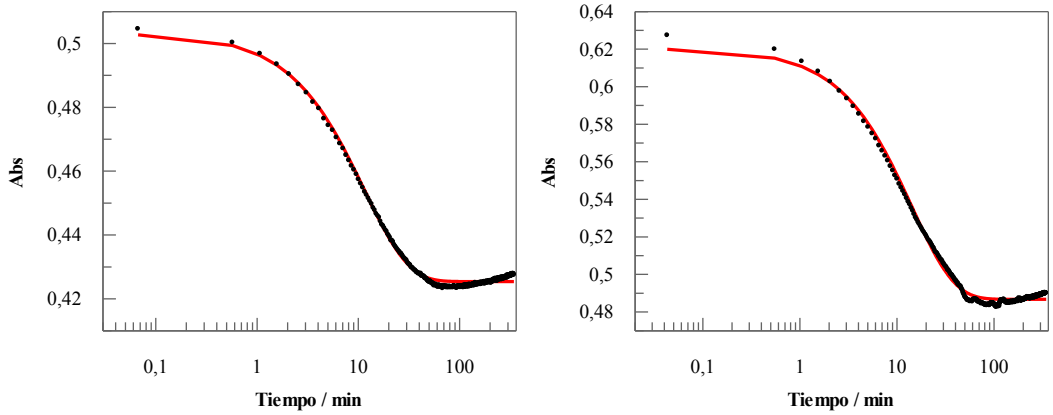


Figura A40. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 1.00 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 1.75 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

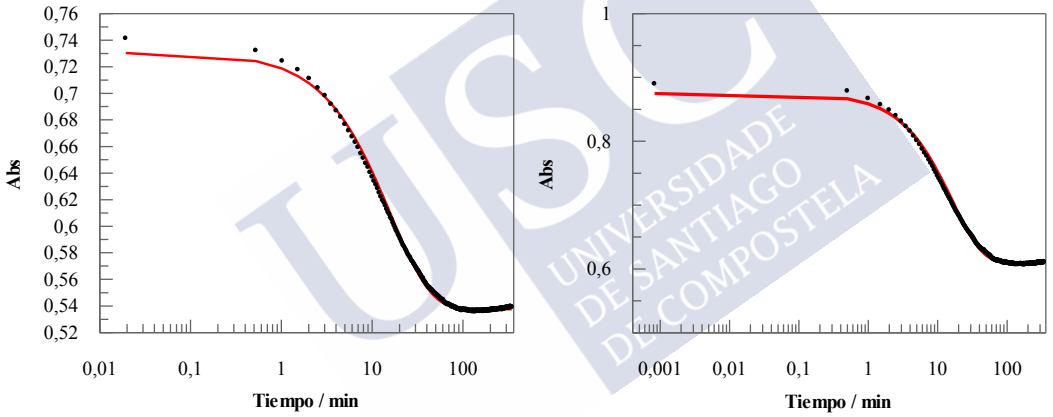


Figura A41. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.11 Ajuste del sistema P5TMA:Azobenceno al modelo (2).

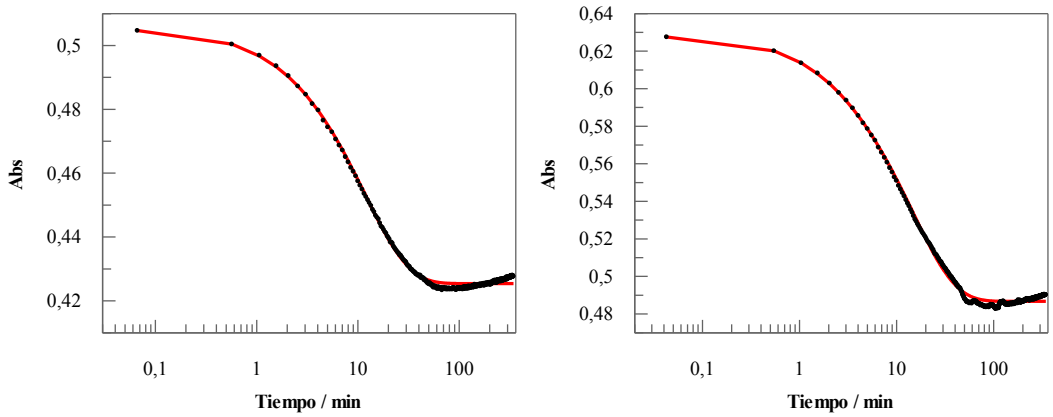


Figura A42. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 1.00 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 1.75 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

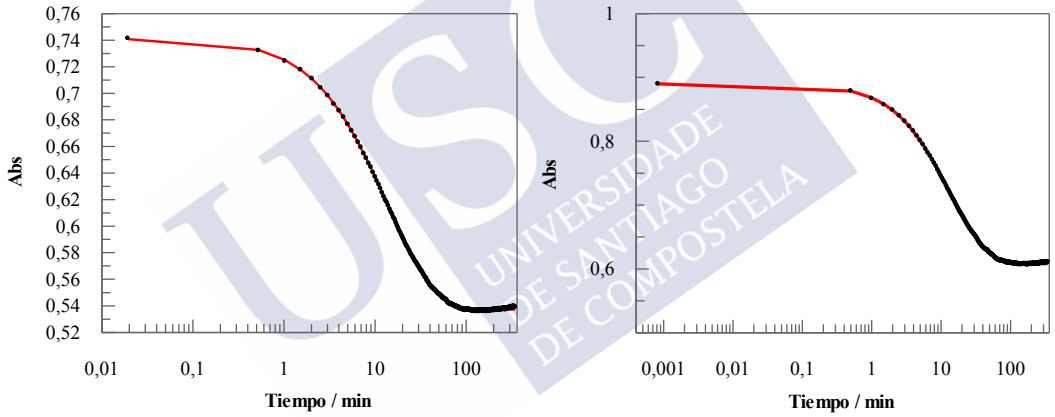


Figura A43. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 2.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.12 Ajuste del sistema P5TMA:Azobenceno al modelo (1) con variación de temperatura.

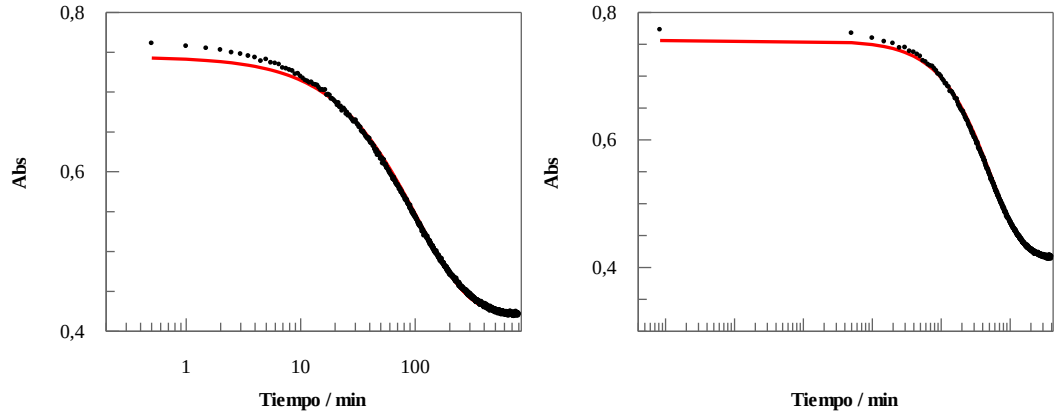


Figura A44. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 15ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 20ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

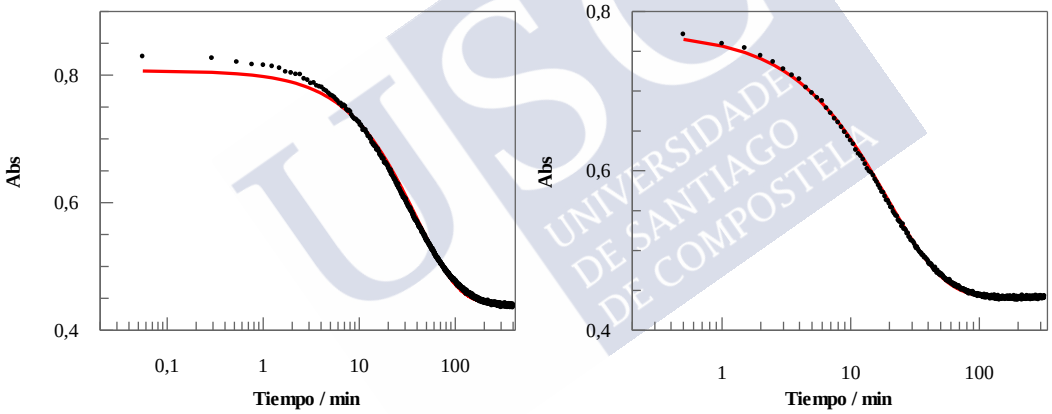


Figura A45. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 30ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

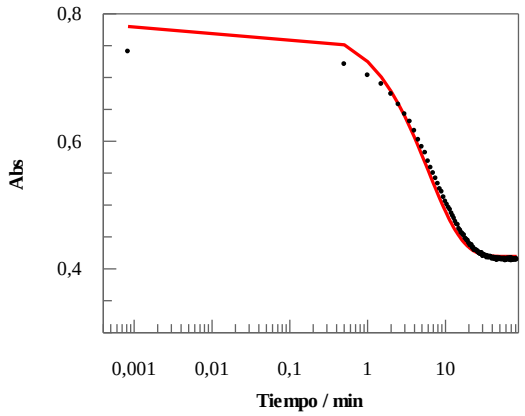


Figura A46. Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 40ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.13 Ajuste del sistema P5TMA:Azobenceno al modelo (2) con variación de temperatura.

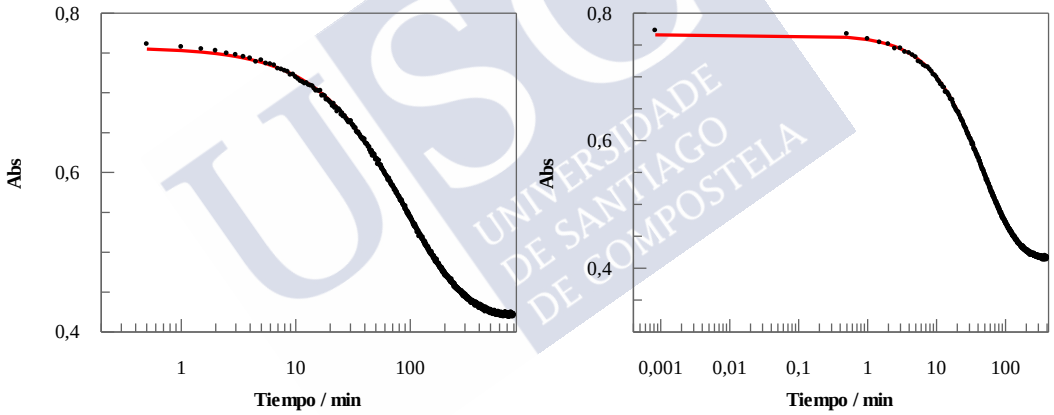


Figura A47. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 15ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 20ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

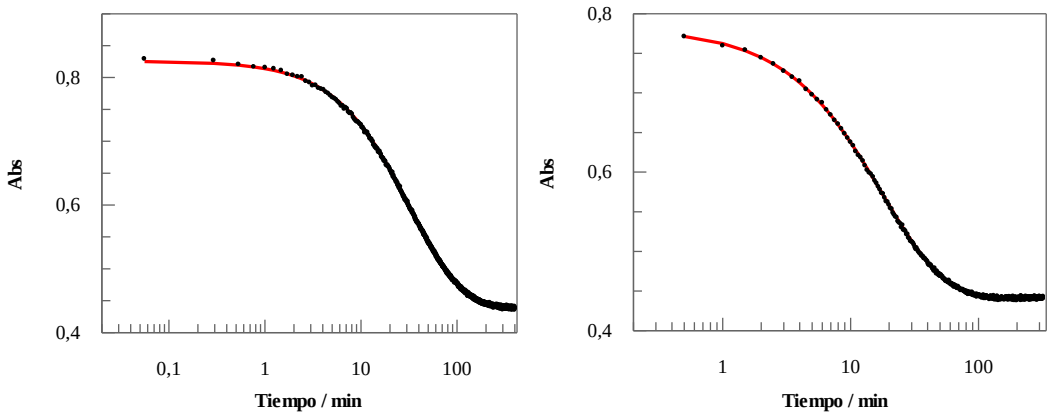


Figura A48. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 30ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

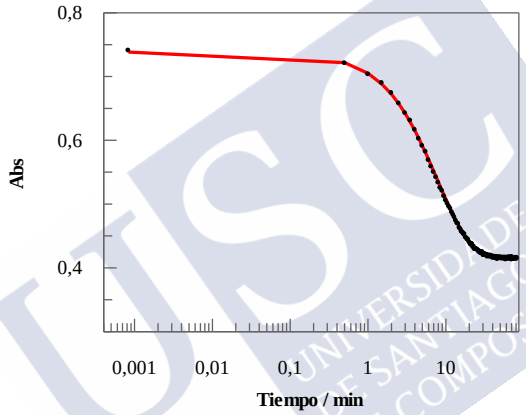


Figura A49. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4} M a 40ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.14 Ajuste del sistema P6TMA:Azobenceno al modelo (1).

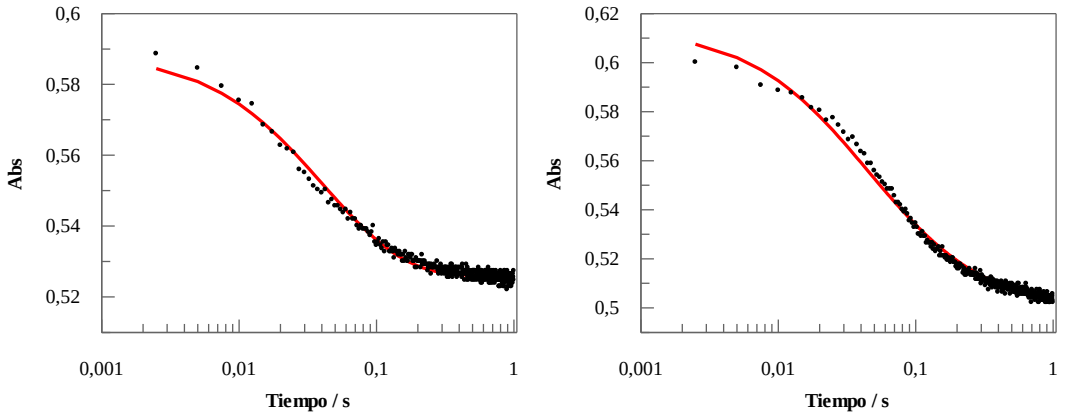


Figura A50. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 2.50 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 3.50 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

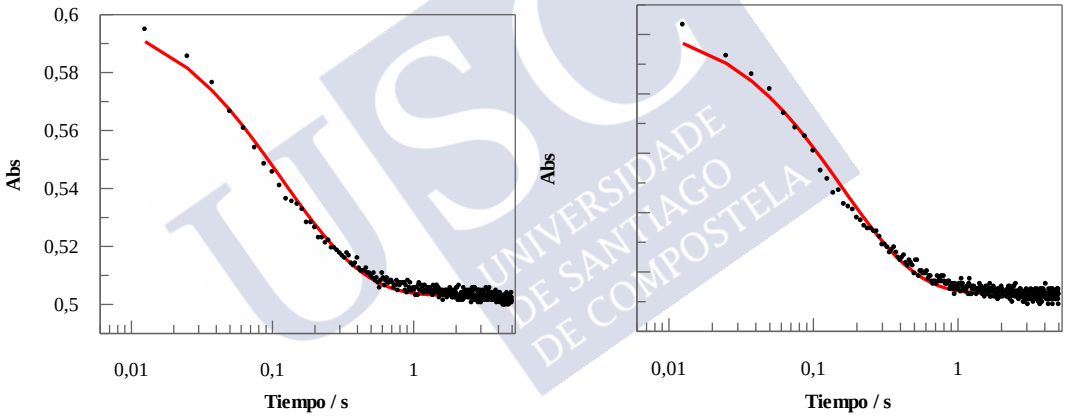


Figura A51. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 6.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 9.00 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 9.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

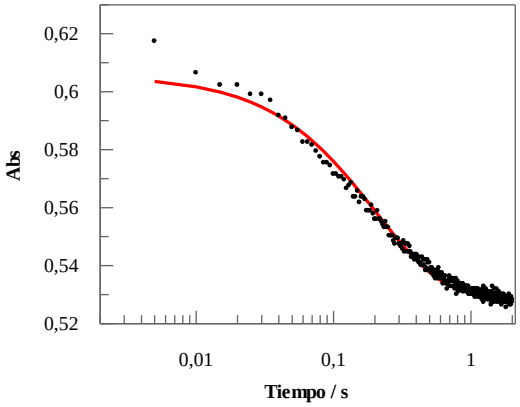


Figura A52. Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 1.50 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.5.15 Ajuste del sistema P6TMA:Azobenceno al modelo (2).

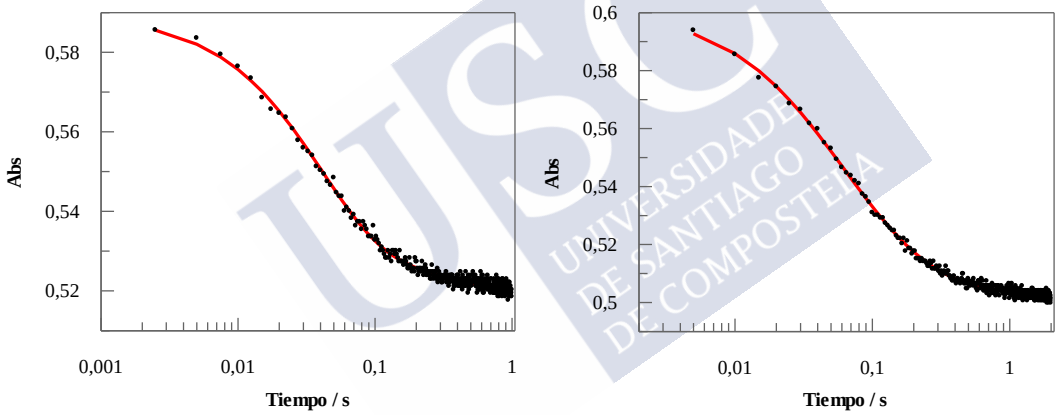


Figura A53. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 2.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 9.00 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 3.50 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

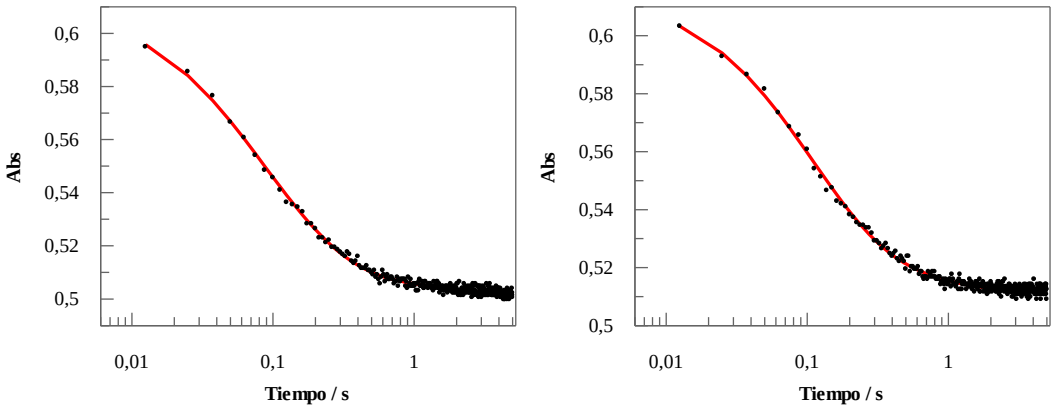


Figura A54. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 6.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo. (Derecha) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 9.00 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 9.00 x 10^{-5} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

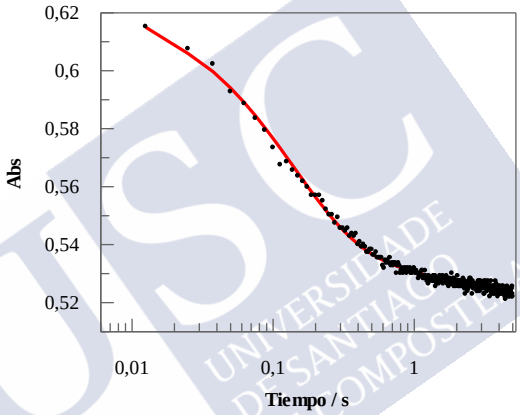


Figura A55. (Izquierda) Variación de la intensidad de emisión de una muestra con concentración de [azobenceno] = 3.50 x 10^{-5} M y [P6TMA] = 1.50 x 10^{-4} M a 25ºC. Los valores de intensidad son tomados a 350 nm y se representan en negro, el ajuste se representa en rojo.

7.6 BIBLIOGRAFÍA.

(1) Gutsche, C. D., *Calixarenes*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, **1989**.

(2) a) Danil de Namor, A. F.; Pardo, M. T.G.; Tandka, F. S. S.; Vebarde, J. D. C.; Garcia, J. D. C.; Al-Rawi, J. M. A. From neutral to ionic species: amine–p-tert-butylcalix(n)arene (n= 6, 8) interaction. Electrochemical, thermodynamic and structural studies in benzonitrile *J. Chem. Soc. Faraday Trans*, **1993**, *89*, 2727-2736. DOI: 10.1039/FT9938902727. b) Dauil de Namor, A. F. Thermodynamics of supramolecular systems: Recent developments *Pure Appl.Chem.*, **1993**, *65*, 193-202. DOI: 10.1351/pac199365020193. c) Grote Gamey, M. H. B.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. A systematic study to neutral, water soluble calix[4]arenes *Tetrahedron Lett.*,**1994**, *35*, 7127-7130. DOI: 10.1016/0040-4039(94)88243-6. d) Shi, Y.; Zhang, Z. A new water-soluble host molecule, a *p-tert*-butylcalix[8]arene bearing polyoxyethylene chains *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, 375-376. DOI: 10.1039/C39940000375.

(3) Cornforth, J. W.; D'Arcy Hart, P.; Nicholls, G. A.; Rees, R. J. W.; Stock, J. A. B. Antituberculous effects of certain surface-active polyoxyethylene ethers *J. Pharmacol.* **1955**, *10*, 73-86. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1955.tb00063.x.

(4) Gutsche, C. D.; Dhawan, B.; Levine, J. A.; No, K. H.; Bauer, L. J. Calixarenes 9 : Conformational isomers of the ethers and esters of calix[4]arenes *Tetrahedron*, **1983**, *39*, 409-426. DOI : 10.1016/S0040-4020(01)88541-0.

(5) Vicens, J.; Böhmer, V. Eds. *Calixarenes*; Kluwer Academic Press: Dordrecht, **1991**.

(6) Shinkai, S. Functionalization of Crown Ethers and Calixarenes: New Applications as Ligands, Carriers, and Host Molecules *Bioorg. Chem. Front.*, **1990**, *1*, 161-195. DOI: 10.1007/978-3-642-75256-8_5.

(7) Shinkai, S. Calixarenes - the third generation of supramolecules *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 8933-8968. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)91215-3.

(8) Ohtsuka, H.; Shinkai, S. Stereochemical control of calixarenes useful as rigid and conformationally diversiform platforms for molecular design *Supramol. Sci.*, **1996**, *3*, 189-205. DOI: 10.1016/S0968-5677(96)00038-7.

(9) Atwood, J. L.; Orr, G. W.; Robinson, K. D.; Hamada, F. Calixarenes as enzyme models *Supramol. Chem.*, **1993**, *2*, 309-317. DOI: 10.1080/10610279308029824.

(10) Böhmer, V. Calixarenes, Macrocycles with (Almost) Unlimited Possibilities *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 713-745. DOI: 10.1002/anie.199507131.

(11) a) Vicens, J.; Böhmer, V. *Calixarenes. A Versatile Class of Macrocyclic Compounds*, Kluwer, Dordrecht, **1991,** 65-85. b) Vicens, J.; Böhmer, V. *Calixarenes. A Versatile Class of Macrocyclic Compounds*, Kluwer, Dordrecht, **1991,** 87-123.

(12) a) Rantsordras, S.; Perrin, M.; Gharnati, F.; Lecocq, S.; Vogt, W.; Fey. T.; Bohmer, V. Crystal and molecular structure of the (1:1) clathrate between a calix[4]arene containing onep-nitrophenol unit and toluene *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn.,* **1990,***9,* 145-152. DOI: 10.1007/BF01041258. b) Ueda, Y.; Fujiwara, T.; Tomita, K. I.; Asfari, Z.; Vicens, J. Structural study of the 1:1 clathrate of an asymmetric calix[4]arene and acetone *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn.,* **1993,** *15,* 341 -349. DOI: 10.1007/BF00708751.

(13) a) Shinkai, S.; Nagasaki, T.; Iwamoto, K.; Ikeda, K.; He, G. X.; Matsuda, T.; Iwamoto, M. New Syntheses and Physical Properties of p-Alkylcalix[n]arenes *Bull. Chem.Soc. Jpn.*, **1991**, *64*, 381-386. DOI: 10.1246/bcsj.64.381. b) Huang, Z. T.; Wang. G. Q. Study of Calixarenes, V. Friedel-Crafts Reaction of Calixarenes *Chem. Ber.* **1994**, *127*, 519-523. DOI: 10.1002/cber.19941270310.

(14) Andreetti, G. D.; Ungaro, R.; Pochini, A. Crystal and molecular structure of cyclo{quater[(5-t-butyl-2-hydroxy-1,3-phenylene)methylene]} toluene (1:1) clathrate *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1979**,*22*, 1005-1007. DOI: 10.1039/C39790001005.

(15) Andreetti, G. D.; Pochini, A.; Ungaro, R. Molecular inclusion in functionalized macrocycles. Part 6. The crystal and molecular structures of the calix[4]arene from p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol and its 1:1 complex with toluene *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1983**, *11*, 1773-1779. DOI: 10.1039/P29830001773.

(16) Gutsche, C. D. Calixarenes *Acc. Chem. Res.*, **1983**, *16*, 161-170. DOI: 10.1021/ar00089a003.

(17) Araki, K.; Shinkai, S.; Matsuda, T. Activation Parameters for Calixarene Ring Inversion As Determined by Computer-Assisted Spectrum Simulation *Chem. Lett.*, **1989**, 581-584. DOI: 10.1246/cl.1989.581.

(18) Andreetti, G. D.; Böhmer, V.; Jordan, J. G.; Tabatabai, M.; Ugozzoli, F.; Vogt, W.; Wolff, A. Dissymmetric calix[4]arenes with C4- and C2-symmetry. Synthesis, x-ray structures, conformational fixation, and proton NMR spectroscopic studies *Org. Chem.* **1993**, *58*, 4023-4032. DOI: 10.1021/jo00067a040.

(19) Dahan. E.; Biali, S. E. Stereodynamics of 4,6,10,12,16,18,22,24-octamethylcalix[4]arene *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 7269-7274. DOI: 10.1021/jo00026a016.

(20) a) Paulus, E.; Bohmer, V.; Goldmann, H.; Vogt, W. The crystal and molecular structure of two calix[4]arenes bridged at opposite *para* positions *J. Chem. Soc. Prerkin Trans. 2.*, **1987**, 1609-1615. DOI: 10.1039/P29870001609. b) Goldmann, H.; Vogt, W.; Paulus, E.; Böhmer, V. A series of calix[4]arenes, having two opposite para positions connected by an aliphatic chain *J Am. Chem. Soc.*, **1988,** *110*, 6811-6817. DOI: 10.1021/ja00228a034.

(21) Bohmer, V.; Goldmann, H.; Vogt, W.; Paulus, E. F.; Tohiason, F. L.; Thielman, M. J. Bridged calix[4]arenes; X-ray crystal and molecular structures and spectroscopic

studies *J. Chem.* Soc. *Perkin Trans. 2,* **1990**, 1769-1775. DOI: 10.1039/P29900001769.

(22) Morita. Y.; Agawa, T.; Nomura, E.; Taniguchi, H. Syntheses and NMR behavior of calix[4]quinone and calix[4]hydroquinone *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 3658-3662. DOI: 10.1021/jo00039a027.

(23) Pappalardo, S.; Ferguson, G.; Gallagher, J. F. Mesitylene-derived 1,3-alternate [1.1.1.1]metacyclophanes *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*. 7102-7109. DOI: 10.1021/jo00052a023.

(24) a) Grynszpan. F.; Goren, Z.; Biali. S. E. Partially hydroxyl depleted calix [4] arenes *J Org. Chem.*, **1991**, *56*, 532-536. DOI: 10.1021/jo00002a010. b) Grynszpan, F.; Biali, S. E. Solution conformation and inversion barrier in p-tert-butyl-25,27-dihydroxycalix[4]arene *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 5155- 5158. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)93454-3. c) Grynszpan, F.; Aleksiuk, O.; Biali, S. E. Cyclization and Reductive Cleavage of Monospirodienone Calix[4]arene Derivatives. Trihydroxy-p-tert-butylcalix[4]arene Revisited *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 2070-2074. DOI: 10.1021/jo00087a022.

(25) a) Gibbs, C. G.; Gutsche, C. D. Calixarenes. 31. Synthesis and conformation of p-tert-butyltetramercaptocalix[4]arene *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 5338-5339. DOI: 10.1021/ja00065a073. b) Delaigue, X.; Hosseini, M. W. Synthesis of a 1,3-alternate tetramercapto [1.1.1.1]metacyclophane *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*. 8111-8112. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)61465-X.

(26) a) Coruzzi, M.; Andreetti,G. D.; Bocchi, V.; Pochini, A.; Ungaro, R. Molecular inclusion in functionalized macrocycles. Part 5. The crystal and molecular structure of 25,26,27,28,29-pentahydroxycalix[5]arene–acetone (1 : 2) clathrate *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2**, 1982,** 1133-1138. DOI: 10.1039/P29820001133. b) Perrin. M.; Lecocq, S. Crystal and molecular structures ofp-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)calix[5]arene and its 1 : 1 complex with toluene *J Incl. Phenom. Mol. Recogn.*, **1991**, *11*, 171-183. DOI: 10.1007/BF01153300. c) Gallagher, J. F.; Ferguson, G.; Bohmer, V.; Kraft, D. Self inclusion in a calix[5]arene structure; structure of the cone conformer of a pentahydroxy-p-tert-butylcalix[5]arene *Acta Cryst. C*, **1994**, *50*. 73-77. DOI: 10.1107/S0108270193007152.

(27) a) Halit, M.; Oehler, D.; Perrin, M.; Thozet, A.; Perrin, R.; Vicens, J.; Bourakhouadar, M. Crystal and molecular structure of two calix[6]arenes:p-Isopropylcalix[6]arene andp-tert-butylcalix[6]arene—benzene(1:3) complex *J. Incl. Phenom.*,**1988**, *6*, 613-623. DOI: 10.1007/BF00656343. b) Atwood, J. L.; Clark, D. L.; Juneja, R. K.; Orr, G. W.; Robinson, K. D.; Vincent, R. L. Double partial cone conformation for Na8{calix[6]arene sulfonate}.20.5H_2O and its parent acid *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 7558-7559. DOI: 10.1021/ja00045a035. d) Engelhardt, L. M.; Furphy, B. M.; Harrowfield, J. M.; Kepert. D. L.; White, A. H.; Wilner, F. M. Coordination Chemistry of the Calixarenes. II. Europium(III) and p-t-Butyl Calix[6]arene *Aust. J. Chem.*, **1988**, *41*. 1465-1476. DOI: 10.1071/CH9881465.

(28) Andreetti. G. D.; Ugozzoli, F.; Nakamoto, Y.; Ishida, S. I. Molecular inclusion in calixarenes. XVIII. Crystal and molecular structure of thep-tert-butylcalix[7]arene 1 : 3 pyridine complex/clathrate *J. Incl.. Phenom. Mol. Recogn.,* **1991**, *10,* 241 -253. DOI: 10.1007/BF01066208.

(29) a) Gutsche, C. D.; Gutsche, A. E.; Karaulov, A. I. Calixarenes 11. Crystal and molecular structure ofp-tert-butylcalix[8]arene *J. Incl. Phenom.,* **1985**, *3*, 447-451. DOI: 10.1007/BF00657496. b) Czugler, M.; Tisza, S.; Speier, G. Versatility in inclusion hosts. Unusual conformation in the crystal structure of thep-t-butylcalix[8]arene: Pyridine (1:8) clathrate *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn.*, **1991**, *11***,** ***323***-331. DOI: 10.1007/BF01041411.

(30) a) Kiimincrer. H.; Happel, G.; Caesar, F. The spectroscopic investigation of a cyclic, tetrameric compound of p-cresol and formaldehyde *Makrormol. Chem.,* **1972,** *162,* 179-197. DOI: 10.1002/macp.1972.021620116.

(31) a) Araki, K.; Shinkai, S.; Matsuda, T. On the Conformational Isomers in Tetra-O-alkylcalix[4]arenes *Chem. Lett*., **1989**, 581 -584. DOI: 10.1246/cl.1989.1747. b) Shinkai, S.; Araki, K.; Matsuda, T.; Manabe, O. NMR Determination of Association Constants for Aqueous Calixarene Complexes and Guest Template Effects on the Conformational Freedom *Bull. Chem. Soc. Jpn*., **1989**, 3856-3862. DOI: 10.1246/bcsj.62.3856. c) Araki, K.; Murakami, H.; Ohseto, F.; Shinkai, S. Acid Dissociation and Activation Parameters for Ring Inversion of Diaminocalix[4]arene *Chem. Lett.*, **1992**, 539-542. DOI: 10.1246/cl.1992.539. d) Harada, T.; Ohseto, F.; Shinkai, S.; Combined NMR spectroscopy and molecular mechanics studies of OH-depleted calix[4]arenes: On the influence of OH groups on the relative stability of calix[4]arene conformers *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 13377-13394. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)89345-5.

(32) Gutsche, C. D.; Bauer, L. J. Calixarenes. 5. Dynamic NMR characteristics of p-tert-butylcalix[4]-arene and p-tert-butylcalix[8]arene *Tetrahedron Lett*., **1981**, *22*, 4763-4766. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)92337-8.

(33) Molins, M. A.; Nieto, P. M.; Sanchez, C.; Prados, P.; de Mendoza, J.; Pons, M. Solution structure and conformational equilibria of a symmetrical calix[6]arene. Complete sequential and cyclostereospecific assignment of the low-temperature NMR spectra of a cycloasymmetric molecule *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 6924-6931. DOI: 10.1021/jo00051a046.

(34) Groenen, L. C.; van Loon, D. J.; Verboom, W.; Harkema, S.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Pochini, A.; Ugozroli, F.; Reinhoudt, D. N. The 1,2-alternate conformation of calix[4]arenes: a rare conformation? Dynamic 1H NMR studies of flexible tetraalkylated calix[4]arenes *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 2385-2392. DOI: 10.1021/ja00007a006.

(35) a) Groenen, L. C.; Steinwender, E.; Lutz, B. T. G.; van der Maas, J. H.; Reinhoudt, D. N. Solvent effects on the conformations and hydrogen bond structure of partially methylated p-tert-butylcalix[4]arenes *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.*, **1992**, 1893-1898. DOI: 10.1039/P29920001893. b) Iwamoto, K.; Ikeda, A.; Araki, K.; Harada, T.;

Shinkai, S. "Cone" - "Partial-cone" Isomerism in Tetramethoxycalix[4]arenes. Influence of Solvent Polarity and Metal Ions *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 9937-9946. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)80191-5.

(36) (a) Dijkstra, P. J.; Brunink, J. A. J.; Bugge, K. E.; Reinhoudt, D. N.; Harkema, S.; Ungaro, R.; Ugozzoli, F.; Ghidini, E. Kinetically stable complexes of alkali cations with rigidified calix[4]arenes: synthesis, x-ray structures, and complexation of calixcrowns and calixspherands *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 7567-7575. DOI: 10.1021/ja00201a045. (b) Ghidini, E.; Ugozzoli, F.; Ungaro, R.; Harkema, S.; El-Fadl, A. A.; Reinhoudt, D. N. Complexation of alkali metal cations by conformationally rigid, stereoisomeric calix[4]arene crown ethers: a quantitative evaluation of preorganization *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 6979-6985. DOI: 10.1021/ja00175a035.

(37) Ungaro, R; Casnati, A.; Ugozzoli, F.; Pochini, A.; Dozol, J. F.; Hill, C.; Rouquette, H. 1,3-Dialkoxycalix[4]arenecrowns-6 in 1,3-Alternate Conformation: Cesium-Selective Ligands that Exploit Cation-Arene Interactions *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1994**, *33*, 1506-1509. DOI: 10.1002/anie.199415061.

(38) a) van Loon, J. D.; Groenen, L. D.; Wijmengd, S.S.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. Upper rim calixcrowns: elucidation of the mechanism of conformational interconversion of calix[4]arenes by quantitative 2-D EXSY NMR spectroscopy *J. Am. Chem. Soc*., **1991**, *113*, 2378-2384. DOI: 10.1021/ja00007a005. b) Blixt, J.; Detellier, C. Conformational Dynamics of Calixarenes. Kinetics of Conformational Interconversion in 5,11,17,23-Tetra-p-tert-butyl-25,26,27,28-tetramethoxycalix[4]arene under Entropic Contro *J. Am. Chem. Soc.,* **1994**, *116*, 11957-11960. DOI: 10.1021/ja00105a040.

(39) Ikeda, A.; Shinkai, S. Novel Cavity Design Using Calix[n]arene Skeletons: Toward Molecular Recognition and Metal Binding *Chem. Rev*., **1997**, *97*, 1713-1734. DOI: 10.1021/cr960385x.

(40) Ogoshi, T.; Kanai, S.; Fujinami, S.; Yamagishi, T.; Nakamoto, Y. *para*-Bridged Symmetrical Pillar[5]arenes: Their Lewis Acid Catalyzed Synthesis and Host–Guest Property *J. Am Chem Soc*. **2008**, *130*, 5022-5023. DOI: 10.1021/ja711260m.

(41) (a) Shi, B.; Jie, K.; Zhou, Y.; Zhou, J.; Xia, D.; Huang, F. Nanoparticles with Near-Infrared Emission Enhanced by Pillararene-Based Molecular Recognition in Water *J. Am. Chem. Soc*. **2016**, *138*, 80–83. DOI: 10.1021/jacs.5b11676. (b) Chi, X.; Yu, G.; Shao, L.; Chen, J.; Huang, F. A Dual-Thermoresponsive Gemini-Type Supra-amphiphilic Macromolecular [3]Pseudorotaxane Based on Pillar[10]arene/Paraquat Cooperative Complexation *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3168–3174. DOI: 10.1021/jacs.5b13173. (c) Chen, Y.; He, M. Q.; Li, B. Q.; Wang, L. Y.; Meier, H.; Cao, D. R. A monophosphoryl copillar[5]arene: synthesis and host–guest complexation with alkanols *RSC Adv*. **2013**, *3*, 21405–21408. DOI: 10.1039/C3RA43744B. (d) Cragg, P. J.; Sharma, K. Pillar[5]arenes: fascinating cyclophanes with a bright future *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 597–607. DOI: 10.1039/C1CS15164A. (e) Gomez, B.; Francisco, V.; Fernandez-Nieto, F.; Garcia-Rio, L.; Martin-Pastor, M.; Paleo, M. R.; Sardina, F. J. Host–Guest Chemistry of a

Water-Soluble Pillar[5]arene: Evidence for an Ionic-Exchange Recognition Process and Different Complexation Modes *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 12123–12132. DOI: 10.1002/chem.201403194. (f) Liu, L. Z.; Cao, D. R.; Jin, Y.; Tao, H. Q.; Kou, Y. H.; Meier, H. Efficient synthesis of copillar[5]arenes and their host–guest properties with dibromoalkanes *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7007–7010. DOI: 10.1039/C1OB05871A. (g) Yu, G.; Han, C.; Zhang, Z.; Chen, J.; Yan, X.; Zheng, B.; Liu, S.; Huang, F. Pillar[6]arene-Based Photoresponsive Host–Guest Complexation *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8711–8717. DOI: 10.1021/ja302998q. (h) Yu, G.; Xue, M.; Zhang, Z.; Li, J.; Han, C.; Huang, F. A Water-Soluble Pillar[6]arene: Synthesis, Host–Guest Chemistry, and Its Application in Dispersion of Multiwalled Carbon Nanotubes in Water *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13248–13251. DOI : 10.1021/ja306399f.

(42) (a) Jie, K.; Zhou, Y.; Yao, Y.; Shi, B.; Huang, F. CO_2-Responsive Pillar[5]arene-Based Molecular Recognition in Water: Establishment and Application in Gas-Controlled Self-Assembly and Release *J. Am. Chem. Soc*. **2015**, *137*, 10472–10475. DOI: 10.1021/jacs.5b05960. (b) Yu, G. C.; Ma, Y. J.; Han, C. Y.; Yao, Y.; Tang, G. P.; Mao, Z. W.; Gao, C. Y.; Huang, F. H. A Sugar-Functionalized Amphiphilic Pillar[5]arene: Synthesis, Self-Assembly in Water, and Application in Bacterial Cell Agglutination *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10310–10313. DOI: 10.1021/ja405237q. (c) Yao, Y.; Xue, M.; Chen, J.; Zhang, M.; Huang, F. An Amphiphilic Pillar[5]arene: Synthesis, Controllable Self-Assembly in Water, and Application in Calcein Release and TNT Adsorption *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15712–15715. DOI: 10.1021/ja3076617. (d) Wang, Y.; Xu, J. F.; Chen, Y. Z.; Niu, L. Y.; Wu, L. Z.; Tung, C. H.; Yang, Q. Z. An anthracene-appended 2:3 copillar[5]arene: synthesis, computational studies, and application in highly selective fluorescence sensing for Fe(III) ions *Chem. Commun*. **2014**, 7001–7003. DOI: 10.1039/C5CC06682D. (e) Strutt, N. L.; Zhang, H. C.; Schneebeli, S. T.; Stoddart, J. F. Functionalizing Pillar[n]arenes *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2631–2642. DOI: 10.1021/ar500177d. (f) Si, W.; Hu, X. B.; Liu, X. H.; Fan, R. H.; Chen, Z. X.; Weng, L. H.; Hou, J. L. Self-assembly and proton conductance of organic nanotubes from pillar[5]arenes *Tetrahedron Lett*. **2011**, *52*, 2484–2487. DOI: 10.1016/j.tetlet.2011.03.019. (g) Liu, L.; Wang, L.; Liu, C.; Fu, Z.; Meier, H.; Cao, D. Dimerization Control in the Self-Assembly Behavior of Copillar[5]arenes Bearing ω-Hydroxyalkoxy Groups *J. Org. Chem*. **2012**, *77*, 9413–9417. DOI: 10.1021/jo301779y.

(43) (a) Li, Z. Y.; Zhang, Y. Y.; Zhang, C. W.; Chen, L. J.; Wang, C.; Tan, H. W.; Yu, Y. H.; Lo, X. P.; Yang, H. B. Cross-Linked Supramolecular Polymer Gels Constructed from Discrete Multi-pillar[5]arene Metallacycles and Their Multiple Stimuli-Responsive Behavior *J. Am. Chem. Soc*. **2014**, *136*, 8577–8589. DOI: 10.1021/ja413047r. (b) Jie, K. C.; Yao, Y.; Chi, X. D.; Huang, F. H. A CO_2-responsive pillar[5]arene: synthesis and self-assembly in water *Chem. Commun*. **2014**, 5503–5505. DOI: 10.1039/C4CC01704H. (c) Ogoshi, T.; Shiga, R.; Yamagishi, T. Reversibly Tunable Lower Critical Solution Temperature Utilizing Host–Guest Complexation of Pillar[5]arene with Triethylene Oxide Substituents *J. Am. Chem. Soc*. **2012**, *134*, 4577–4580. DOI: 10.1021/ja300989n. (d) Tan, L. L.; Li, H. W.; Tao, Y. C.; Zhang, S. X. A.; Wang, B.; Yang, Y. W. Pillar[5]arene-Based Supramolecular Organic Frameworks for Highly Selective CO_2-Capture at Ambient Conditions *Adv. Mater.*

2014, *26*, 7027–7031. DOI: 10.1002/adma.201401672. (e) Zhou, S. Y.; Song, N.; Liu, S. X.; Chen, D. X.; Jia, Q.; Yang, Y. W. Separation and preconcentration of gold and palladium ions with a carboxylated pillar[5]arene derived sorbent prior to their determination by flow injection FAAS *Microchim. Acta* **2014**, *181*, 1551–1556. DOI: 10.1007/s00604-014-1229-2.

(44) Ogoshi, T.; Shiga, R.; Yamagishi, T.; Nakamoto, Y. Planar-Chiral Pillar[5]arene: Chiral Switches Induced by Multiexternal Stimulus of Temperature, Solvents, and Addition of Achiral Guest Molecule *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 618–622. DOI: 10.1021/jo1021508.

(45) Ogoshi, T.; Kitajima, K.; Aoki, T.; Yamagishi, T.; Nakamoto, Y. Effect of an Intramolecular Hydrogen Bond Belt and Complexation with the Guest on the Rotation Behavior of Phenolic Units in Pillar[5]arenes *J Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 817-821. DOI: 10.1021/jz900437r.

(46) Ogoshi, T.; Kitajima, K.; Aoki, T.; Fujinami, S.; Yamagishi, T.; Nakamoto, Y. Synthesis and Conformational Characteristics of Alkyl-Substituted Pillar[5]arenes *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 3268-3273. DOI: 10.1021/jo100273n.

(47) Ogoshi, T.; Shiga, R.; Yamagishi, T.; Nakamoto, Y. Planar-Chiral Pillar[5]arene: Chiral Switches Induced by Multiexternal Stimulus of Temperature, Solvents, and Addition of Achiral Guest Molecule *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 618-622. DOI: 10.1021/jo1021508.

(48) Ogoshi, T.; Masaki, K.; Shiga, R.; Kitajima, K.; .; Yamagishi, T. Planar-Chiral Macrocyclic Host Pillar[5]arene: No Rotation of Units and Isolation of Enantiomers by Introducing Bulky Substituents *Org. Lett.*, **2011**, 13 (5), 1264-1266. DOI: 10.1021/ol200062j.

(49) Pan, M.; Xue, M. Evidence for a Bulky Unit of a Pillar[5]arene Flipping in the Solid State *Chin. J. Chem.*, **2014**, *32*, 391-395. DOI: 10.1002/cjoc.201400204.

(50) Liu, L. Z.; Hua, Z. Z.; Duan, W. G.; Huang, H. F.; Huang, Y.; Lin, G. A.; Cen, B. Selective and effective rotation mode of copillar[5]arene by mono-functionalizing bulky substituent *Tetrahedron Letts.*, **2016**, *57*, 2969-2961. DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.05.085.

(51) Peerannawar, S. R.; Gejji, S. P. Molecular interactions between pillar[5]arene and bis(pyridinium) derivatives *Computational and Theoretical Chemistry*, **2012**, *999*, 169-178. DOI: 10.1016/j.comptc.2012.08.034.

(52) Espinosa, J. F; Vidal, P.; Parella, T.; Gil, S. Measurement of long-range proton–carbon coupling constants from pure in-phase 1D multiplets *Magn. Resn. In Chem.*, **2011**, *49*, 502-507. DOI: 10.1002/mrc.2782.

(53) Chaudhari, S. R.; Nath, N.; Suryaprakash, N. C-HETSERF: distinction of cis/trans-isomers and measurement of long range couplings between chemically equivalent

nuclei in polycyclic aromatic hydrocarbons *RSC Adv.*, **2012**, *2*, 12915-12921. DOI: 10.1039/C2RA21898D.

(54) Cao, D.; Kou, Y.; Liang, J.; Chen, Z.; Wang, L.; Meier, H. A Facile and Efficient Preparation of Pillararenes and a Pillarquinone *Angew. Chem. Int. Ed*., **2009**, *48*, 9721-9723. DOI: 10.1002/anie.200904765.

(55) Ma, Y.; Ji, X.; Xiang, F.; Chi, X.; Han, C.; He, J.; Abliz, Z.; Chen, W.; Huang, F. A cationic water-soluble pillar[5]arene: synthesis and host–guest complexation with sodium 1-octanesulfonate *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12340-12342. DOI: 10.1039/C1CC15660H.

(56) Barberá, J.; Deschenaux, R.; Nierengarten, J. Macrocyclic Effects in the Mesomorphic Properties of Liquid-Crystalline Pillar[5]- and Pillar[6]arenes *Eur. J. Org. Chem*. **2013**, 3675-3684. DOI: 10.1002/ejoc.201300356.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 8

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 8: ESTUDIO DE INTERACCIONES ADN-PROTEÍNA INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE REPARACIÓN DE ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER)*.

* Este trabajo ha sido realizado en *University of St Andrews* (UK) bajo la supervisión del Profesor J. Carlos Penedo.

8.1 INTRODUCCIÓN.

La estructura en forma de dúplex del ADN le confiere una gran estabilidad y protección a los ácidos nucleicos que forman parte de la estructura de sus hebras, sin embargo, existen múltiples factores que pueden dañar la estructura química de los ácidos nucleicos que la componen y, por lo tanto, distorsionar la estructura de doble hélice, estos factores son celulares o ambientales. La detección y reparación de los daños causados al ADN es por tanto de vital importancia, este tipo de procesos evita las mutaciones y, por tanto, la modificación de la integridad genética de los organismos [1]. Las células han desarrollado mecanismos especificos de reparación de las modificaciones del ADN de doble hélice, uno de estos mecanismos es la reparación por escisión de nucleótidos (NER, *Nucleotide Excision Repair*) que elimina los daños del ADN provocados por la radiación UV; este mecanismo ha sido desarrollado tanto en células procariotas como eucariotas. En el mecanismo de NER intervienen múltiples proteínas. En los últimos años y gracias a los avances en las técnicas de crio-TEM se han logrado importantes avances en relación a los tipos de proteínas, las superficies de interacción entre ellas y su función. Sin embargo, mediante estas técnicas solo es posible la obtención de fotografías fijas del proceso por lo que es imposible conocer la dinámica de formación de estos complejos multiproteicos y el papel de cada una de las proteínas en la distorsión local del ADN mediante crio-TEM. El mecanismo de NER es iniciado por XPC (para genoma global NER) o por ARN polimerasa (para NER acoplado a transcripción) si bien el enfoque de este capítulo se encuentra en el primer caso. Los estudios actuales revelan que XPC se une al ADN dañado de forma que crea una pequeña burbuja de ADN reclutando al factor IIH (TFIIH). Este factor está formado por múltiples proteínas entre las que se incluyen las helicasas XPD y XPB, cuya función es catalizar la apertura del ADN en los promotores durante el inicio de la transcripción y en daños de ADN en NER. Durante el proceso de NER, TFIIH abre la burbuja de reparación permitiendo la acción de las proteínas de unión al ADN (XPA y RPA) a continuación, las nucleasas XPF-Ercc1 y XPG escinden la hebra a cada lado del daño para hacer posible la reparación del ADN [2].

En este capítulo, se analiza la dinámica de dos proteínas que participan en el mecanismo de NER, la proteína XPA (*Xeroderma Pigmentosum group A protein*) y RPA (*Replication Protein A*) usando la anisotropía de fluorescencia y la teoría de la transferencia de energía de Resonancia de Förster (FRET) [3]. Los estudios actuales proponen que XPA participa en el proceso NER reorganizando la posición del ADN dañado mediante la interacción con el

complejo proteico TFIIH y la proteína XPC. Por otra parte, RPA participa en múltiples procesos celulares ya que sus funciones están relacionadas con las cadenas simples de ADN, RPA proporciona protección a estos fragmentos para que no sufran ninguna reacción química secundaria. Estudios actuales sugieren que XPA y RPA actúan de forma conjunta y en la misma etapa del mecanismo NER. Sin embargo, en la bibliografía no se encuentran estudios detallados de la interacción de cada una de ellas de manera individual con las burbujas de ADN ni de su actuacción en tamdem.

8.1.1 Teoría de FRET y relación con *ratio A* o relación A.

La transferencia de energía de Resonancia de Förster (FRET) es una técnica de fluorescencia que explica el proceso en el que se transfiere energía de forma no radiante desde un fluoróforo donante excitado (denominado D) a un aceptor en estado fundamental (denominado A) mediante el acoplamiento dipolo-dipolo de largo alcance intermolecular [4]. La intensidad de D disminuye mientras que la intensidad de A aumenta cuando las dos sondas se aproximan con una eficacia FRET (E) que es proporcional a la inversa de la sexta potencia de la separación de ambas sondas (R), tal y como se indica en la ecuación 1 donde R_0 representa la distancia a la que se transfiere el 50 % de la energía (generalmente, este valor se enmarca entre 1 y 10 nm).

$$E = \frac{1}{1+\left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \qquad (1)$$

La dependencia de FRET con la distancia hace que esta técnica sea ideal para el estudio de cambios en la estructura de biomoléculas, de movimientos relativos o el estudio de las interacciones de dos moléculas que cuenten con un par dador-aceptor. Existen diferentes métodos para calcular FRET: mediante la desactivación de la fluorescencia del donor o mediante la relación A o Ratio A.

En este trabajo, se ha utilizado el valor de relación A ya que se determina a partir del espectro de emisión y de absorbancia de las muestras, en concreto, la relación A es definida como la emisión del aceptor (la cual es obtenida mediante FRET) dividida por la emisión del aceptor de la excitación directa tal y como se indica en la ecuación 2. La principal ventaja de este método de análisis es que se basa únicamente en la emisión del aceptor por lo que, las variaciones en la emisión del donor que no son causadas por FRET no influyen en el resultado. Además, al tratarse de un cálculo de relaciones de emisiones del aceptor se elimina, de igual manera, la influencia causada por cualquier otro proceso diferente a FRET.

$$\text{Relación A} = \frac{F_{DA} - NF_{DA}}{F_A} \qquad (2)$$

En la ecuación 2, F_{DA} representa la emisión del espectro resultante de excitar a la longitud de onda del donor (λ^D), se incluye la emisión del donor por excitación directa por luz a la correspondiente λ^D y, además, el espectro del aceptor mediante FRET y por una pequeña cantidad de excitación directa de la luz. F_A representa el espectro de emisión del aceptor al ser directamente excitado a la longitud de onda (λ^A). El término N se define en la ecuación 3, donde F_D representa el espectro de emisión del donor excitado a la longitud de onda λ^D.

$$N = \frac{F_{DA}(\lambda^D_{EX},\lambda^D_{EM})}{F_D(\lambda^D_{EX},\lambda^D_{EM})} \qquad (3)$$

La relación A, es un indicador de la eficiencia de FRET si los dos son linealmente proporcionales, de forma que se obtiene la ecuación 4, donde $D(\lambda^D{}_{EX})$ representa el coeficiente de extinción del donor a la longitud de onda de excitación $\lambda^D{}_{EX}$, $A(\lambda^D{}_{EX})$ representa el coeficiente de extinción de la sonda aceptora a la longitud de onda de excitación de la sonda que actúa como donor y, por último, $A(\lambda^A{}_{EX})$ representa el coeficiente de extinción de la sonda aceptora excitada directamente a la longitud de onda del aceptor ($\lambda^A{}_{EX}$) [3].

$$\text{Relación A} = \frac{D\left(\lambda^D_{EX}\right)E + A\left(\lambda^D_{EX}\right)}{A\left(\lambda^A_{EX}\right)} \qquad (4)$$

En la realización de los experimentos, las biomoléculas se marcan covalentemente con un fluoróforo; el par utilizado es Cy3-Cy5 en el que, Cy3 actúa como donor y Cy5 como aceptor. El valor de R_0 de este par es de aproximadamente 53 Å además, este sistema presenta un bajo fotoblanqueo, esta característica es de vital importancia en los estudios de *single molecule*. Los cambios en las propiedades de las sondas aportan una valiosa información acerca de los cambios conformacionales sufridos por las biomoléculas marcadas. Por este motivo, la herramienta de FRET ha sido ampliamente utilizada en el estudio de cambios conformacionales y de dinámica molecular de proteínas, entre otros muchos estudios [5,6].

8.1.2 XPA (*Xeroderma Pigmentosum group A protein*).

XPA es una proteína modular fundamental en el proceso NER, la unión de esta proteína al ADN se produce en el dominio central, sin embargo, a día de hoy el mecanismo de interacción no ha sido revelado. La estructura de XPA cuenta con 273 residuos (peso

molecular 40 kDa) por los que es considerada como una proteína de pequeño tamaño, su estructura está organizada entorno a un dominio central (residuos 98-219) [7–9] al cual rodean la parte C-terminal y N-terminal [9–11]. La región C-terminal está desordenada, sin embargo, parece ordenarse cuando interactúa con otras proteínas NER. Se ha sugerido que XPA utiliza estas regiones desordenadas para dirigir el posicionamiento de otros factores NER sobre la región de ADN dañada.

Diferentes estudios han revelado que en la unión de XPA a la cadena de ADN, la proteína se sitúa en la intersección entre la región de una y dos hebras [12] de la burbuja formada y no específicamente asociada a la cadena dañada, sin embargo, la posición de XPA (5' ó 3') sigue siendo una incógnita encontrándose numerosas contradicciones en la bibliografía [13–15].

El estudio de la interacción de XPA con otras proteínas necesarias en el mecanismo NER ha revelado que XPA forma parte de todos los procesos (desde el reconocimiento del daño a la síntesis de nuevos nucleótidos) de forma que, interactúa con XPC, XPE, el complejo TFIH, XPF/ERCC1, PCNA, ATR, PARP-1, diferentes XAB y RPA [16].

Investigaciones recientes han propuesto que XPA se enlaza al ADN de forma secuencial siendo crítica la concentración de proteína en el medio. Cuando la concentración de proteína es relativamente baja, se forma un complejo entre la proteína en forma de monómero y el ADN modificado; al aumentar la concentración XPA, se forma un dímero que se enlaza al ADN. Mediante estudios espectroscópicos se ha podido determinar como la segunda proteína estabiliza el complejo formado entre la primera XPA y el ADN mostrando un coeficiente de Hill de 1.9. Estos resultados indican que XPA tiene tendencia a unirse al ADN en forma de dímero [17].

8.1.3 RPA (Proteína de Replicación A).

RPA es una de las proteínas que forman parte del proceso de replicación, reparación y recombinación del ADN [1], su estructura está formada por tres subunidades: una grande (de 70 kDa), una mediana (de 32 kDa) y una última más pequeña (de 14 kDa) [18,19]. La mayor interacción entre el ADN y RPA ocurre en la subunidad grande (RPA70kDa) siendo el papel de las dos otras unidades suplementario [20]. La subunidad grande de RPA necesita un fragmento de diez nucleótidos mientras que las otras dos subunidades necesitan al menos treinta nucleótidos no apareados para interaccionar con el ADN. RPA70kDa presenta cuatro posiciones de complejación con el *ss*ADN mientras que, las dos otras unidades tan solo presentan una posición válida para la complejación que presenta, además, una débil afinidad [12,21]. La unidad mediana (RPA23kDa) sufre una fosforilación durante el ciclo celular en respuesta a diferentes agentes que dañan el ADN (un ejemplo es la radiación UV), una de las funciones de esta fosforilación es promover la asociación de ADN a la proteína ATR [22,23].

Desafortunadamente, el papel específico de la unidad pequeña (RPA14kDa) no ha sido todavía dilucidado. La mayor parte de esta información se ha extraído utilizando ADN monocatenario por lo que, los estudios concernientes a la burbuja de escisión de NER son limitados.

Los primeros estudios revelaron que RPA era un factor necesario para la replicación *in vitro* de SV40 ya que interviene en la activación del complejo de prereplicación y en el origen de la replicación [24–26]. Otra de sus funciones está relacionada con la reparación y escisión de nucleótidos [26–28], durante la elongación de la hebra del ADN, RPA estimula la acción diferentes polimerasas [29–35]. Además, RPA interacciona específicamente con numerosas proteínas que participan en los procesos de transcripción, replicación y reparación tales como antígenos T, factores de transcripción Gal4 y Gal6, DDB, recombinasas, helicasas, proteínas de Bloom y proteínas de Werner, entre muchas otras [36].

8.1.4 Interacción entre XPA y RPA.

Tal y como se explica en los apartados 8.1.2 y 8.1.3 de este capítulo, tanto XPA como RPA desarrollan sus funciones mediante la interacción con otras proteínas. Durante el mecanismo de NER, XPA y RPA son las proteínas encargadas de la unión y estabilización de los diferentes complejos NER. La función principal de RPA es la unión y protección de la burbuja de ADN sin daño [19,20], además, RPA está presente en la transición entre la incisión y la fase de resíntesis [14]. Actualmente, se han estudiado dos tipos de contactos entre XPA y RPA, la primera interacción tiene lugar entre RPA32C y los residuos 29-46 de XPA [37] y la segunda, entre RPA70AB y XPA_{98-219} si bien, esta segunda interacción es mucho más débil que la primera [38–40]. Numerosos estudios han tratado de estudiar de forma específica la unión de estas dos proteínas, así como, el descubrimiento del papel específico que desempeñan cada uno de ellos durante el mecanismo de NER sin obtener un resultado satisfactorio; es por ello que durante este capítulo se estudiará la interacción de XPA, RPA y el complejo formado por ambas con diferentes fragmentos de ADN dañado para así, intentar avanzar en el conocimiento del mecanismo NER.

8.2 MÉTODO EXPERIMENTAL.

Oligonucleótidos: todos los oligonucleótidos (etiquetados y sin etiquetar) fueron adquiridos en Integrated DNA Technologies. El proceso de preparación de las muestras se realiza siguiendo un protocolo preestablecido de hibridación seguido de electroforesis en gel de policrilamida (PAGE) para eliminar las hebras no hibridadas. Preparación de las muestras centrifugándolas durante un periodo corto de tiempo y calentándolas durante 2 min a 95˚C. A continuación, se dejan enfriar durante 1h en ausencia de luz; una vez transcurrido este tiempo se carga sobre un gel 10% de acrilamina. Se deja correr el gel durante aproximadamente 4h a

140V, las bandas resultantes se visualizaron mediante una lámpara UV. Se cortaron las etiquetas para extraerlas del gel y, a continuación, estas fracciones se sumergieron en buffer Tris 10 mM durante toda una noche protegidas de la luz y a 4˚C para garantizar la difusión del ADN hibridado del gel al medio. Tras este período de tiempo se retira el sobrenadante y se precipita el ADN añadiendo NaAc y EtOH, las muestras se centrifugan durante 30 min y, finalmente, se retira el sobrenadante obteniendo así el ADN purificado y de composición homogénea. La concentración de las muestras se obtuvo tras medir su espectro de absorción y utilizando la ley de Lambert-Beer ya que el ADN presenta un máximo de banda característico a 258 nm. El coeficiente de extinción es característico para cada una de las construcciones y se calcula sumando los coeficientes de extinción de cada una de las hebras usadas (estos valores son aportados por la casa comercial).

Proteínas: las proteínas han sido proporcionadas por el grupo de investigación del Profesor Malcolm White.

Espectroscopía de fluorescencia: todos los experimentos han sido realizados en un espectofotómetro Cary Eclipse (Varian Inc) equipados con un controlador de temperatura Peltier que permite mantenerla constante a 25.0 ºC. Los espectros de fluorescencia de las sondas Cy3 y Cy5 se han realizado excitando a 547 y 640 nm, respectivamente. En los experimentos de anisotropía se ha usado como sonda FAM (derivado de la carboxifluoresceina) dado su largo tiempo de vida media (aproximadamente 4 ns). Esta característica proporciona un rango dinámico más amplio para estudios de polarización en comparación a Cy3 y Cy5 cuyos tiempos de vida media son de aproximadamente 0.3 y 1 ns, respectivamente.

8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.3.1 Interacción de XPA con burbujas de tres nucleótidos (B3) mediante experimentos de anisotropía.

Con el objetivo de estudiar la dinámica de unión de XPA a la cadena de ADN de estudio (Fig 1) se realiza una valoración fluorimétrica de anisotropía con B3 (5 nM) en presencia de concentraciones crecientes de XPA. B3 representa una etapa del proceso NER, con anterioridad XPC reconocería el daño causado sobre la hebra abriendo una burbuja de 2 ó 3 nucleótidos, a continuación, THIIH sería reclutado y solo o junto a XPA y RPA aumentarían el tamaño de la burbuja hasta un máximo de 30 nucleótidos. Todas las muestras se preparan en Tris-buffer para mantener constante el pH en 7.5 y, con una concentración

constante de 10 mM de NaCl. Como método de control se realizan dos espectros fluorescencia, uno a la muestra de B3 y otro a la muestra correspondiente a la última adicción; este experimento permite controlar los procesos de desactivación o aumento de la fluorescencia. Los experimentos de anisotropía solo serán adecuados si el tiempo de vida de la sonda no cambia al adicionar proteína en el medio. A veces, el aumento de la concentración de proteína se traduce en cambios de la viscosidad del entorno de la sonda (FAM) produciéndose un aumento / disminución de fluorescencia que cambiará el tiempo de vida de FAM. Tal y como se puede observar en la figura 2, se produce un aumento en el valor de la anisotropía a medida que aumenta la concentración de XPA en el medio, este comportamiento es compatible con la unión de XPA a B3. El ajuste de los datos al modelo de complejación de Hill (ecuación 5) permite conocer la constante asociada al proceso (K_D) así como el coeficiente de Hill (n). Este término indica cooperatividad, es decir, si la unión de una proteína favorece la unión de otra. Si n = 1 no hay cooperatividad, si n > 1 la cooperatividad es positiva y, si n < 1 la cooperatividad es negativa (la unión de una proteína dificulta la interacción de una segunda proteína con la burbuja).

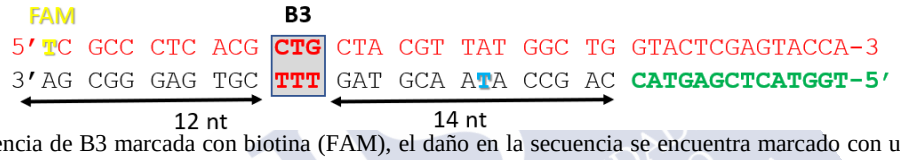


Figura 1. Secuencia de B3 marcada con biotina (FAM), el daño en la secuencia se encuentra marcado con un cuadrado y se corresponde a una serie de tres nucleótidos.

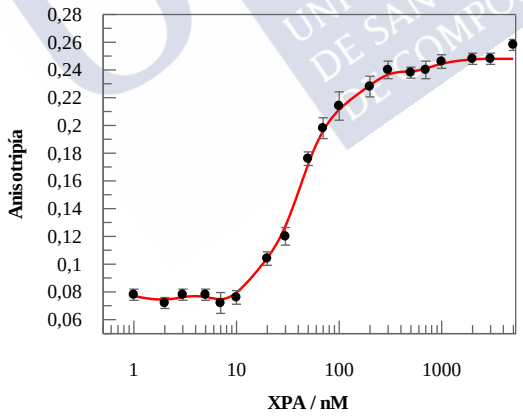


Figura 2. Variación de anisotropía en función de la concentración de XPA y ajuste al modelo de Hill en rojo.

$$\text{Anisotropía} = \frac{a + b[\text{XPA}]^n}{K_D^n + [\text{XPA}]^n} \qquad (5)$$

El ajuste de los datos permite determinar que la constante K_D tiene un valor de 43 ± 1.7 nM mientras que el valor obtenido para n es 2.07 ± 0.16, por lo que la unión de una segunda proteína a B3 está favorecida. Una posible explicación a esta cooperatividad positiva es la formación de dímeros sobre el ADN si bien, se necesitarían experimentos adicionales para confirmar esta teoría.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la salinidad del medio se realiza un experimento con las mismas condiciones descritas anteriormente a excepción de la concentración de NaCl que, en este experimento es de 50 mM. Los estudios de salinidad son especialmente importantes ya que, la mayor parte de las proteínas que se unen al ADN presentan un fuerte carácter electrostático para, por ejemplo, proteger la carga negativa de los fosfatos del ADN. Los resultados obtenidos, así como el ajuste al modelo de Hill (ecuación 5) se muestran en la figura 3. El ajuste representado en color negro permite determinar que la constante K_D tiene un valor de 221 ± 17 nM mientras que el valor obtenido para n es 1.72 ± 0.19. Estos resultados indican que un aumento de la salinidad del medio conduce a constantes de disociación mayores, así mismo el valor de n permite postular que confirmar que se unen dos unidades de XPA a B3.

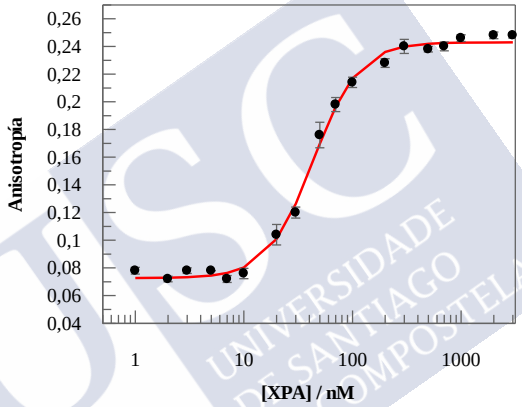


Figura 3. Variación de anisotropía en función de la concentración de XPA y ajuste al modelo de Hill en rojo.

Además del efecto de la salinidad, es importante evaluar el efecto de la estructura de B3. La hebra utilizada está diseñada para la realización de experimentos de *single molecule* en los que existe un triple marcaje (Cy3, Cy5 y biotina) por lo que es importante comparar los resultados obtenidos con una nueva hebra B3 que no posea estas características (en la figura 4 se encuentra una comparativa de las diferentes hebras B3). La estructura con biotina (figura 4 izquierda) está diseñada para permitir la inmovilización de B3 a la superficie durante los experimentos de *single molecule*. La generación de este tipo de estructuras con tres cadenas se debe a varios factores: (i) la incorporación de tres modificaciones sobre una estructura con dos hebras es muy laborioso a nivel sintético y (ii) este tipo de diseño permite rediseños de la burbuja, por ejemplo, la modificación de la distancia del par dador-aceptor o el aumento del tamaño de una región. Sin embargo, el sistema de tres hebras induce una modificación dada la falta de un enlace fosfoéster que podría ser interpretado como un daño por las proteínas de estudio. Por este motivo, es necesario evaluar este impacto sobre el comportamiento De las proteínas.

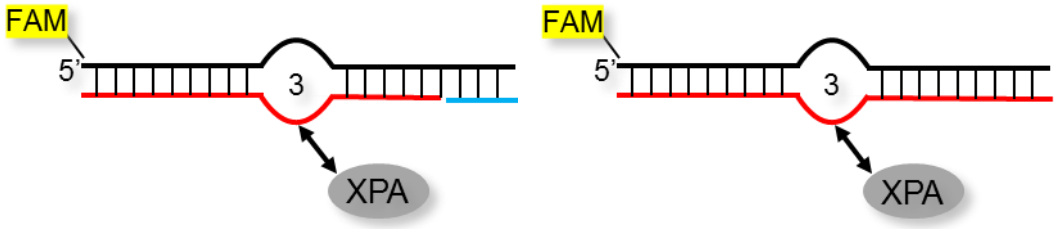


Figura 4. (Izquierda) Estructura de B3 diseñada para experimentos de *single molecule* con tres hebras (diferenciadas por colores: negro, rojo y azul). (Derecha) Estructura de B3 con dos hebras (diferenciadas por colores: negro y rojo).

Para la realización de este nuevo experimento se preparan muestras de la nueva burbuja B3 (5 nm) en Tris-buffer para mantener el pH en 7.5, la concentración de NaCl seleccionada es de 50 mM. Al igual que en los experimentos anteriores, se añaden concentraciones crecientes de XPA al medio. En la figura 5 se pueden observar dos réplicas de experimentos con B3 de tres hebras (trazo negro y rojo) y una réplica del experimento realizado con B3 de dos hebras (trazo azul). Tal y como se muestra en la figura 5, el comportamiento de XPA frente a las dos burbujas B3 es muy similar, en ambos casos se produce un aumento del valor de la anisotropía a medida que aumenta la concentración de XPA en el medio; el ajuste de los datos al modelo de Hill nos permite conocer el valor de la constante K_D y de n para el nuevo sistema (ajuste en color azul). En este caso el valor de K_D determinado es de 168 ± 10 nM mientras que, el valor de n calculado es de 1.99 ± 0.18. Además, los valores obtenidos para las constantes K_D son similares en ambos casos, estos resultados permiten avanzar en el conocimiento del papel desarrollado por XPA en el proceso NER.

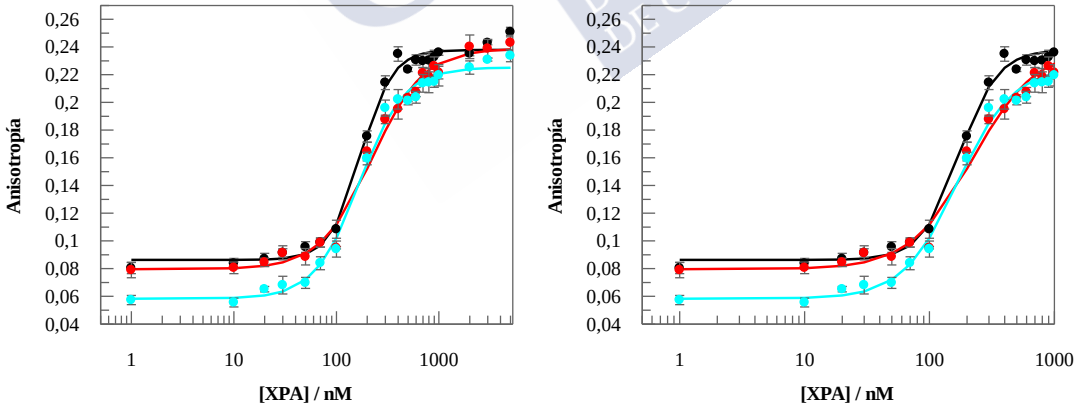


Figura 5. (Izquierda) Variación de anisotropía con respecto a la concentración de XPA en el medio y ajuste del modelo de Hill para B3 de tres hebras (negro y rojo) y B3 de dos hebras (azul). (Derecha) Ampliación del experimento en la región de baja concentración de XPA.

8.3.2 Interacción de XPA con burbujas de doce nucleótidos (B12) mediante experimentos de anisotropía.

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento del comportamiento de XPA ante los daños ocasionados en el ADN, se ha realizado un estudio complementario al de apartado 8.2.1 seleccionando esta vez una burbuja de mayor tamaño (B12) cuya estructura se muestra en la figura 6. En este experimento, se realiza una valoración fluorimétrica de anisotropía con B12 (5 nm) en presencia de concentraciones crecientes de XPA. Todas las muestras se preparan en Tris-buffer para mantener constante el pH en 7.5 y, con una concentración constante de 10 mM de NaCl. Como método de control se realizan dos espectros fluorescencia, uno a la muestra de B12 y otro a la muestra correspondiente a la última adicción; este experimento permite controlar que la desactivación de la fluorescencia se encuentre dentro de los límites permitidos. Tal y como se puede observar en la figura 7, se produce un aumento en el valor de la anisotropía a medida que aumenta la concentración de XPA en el medio, este comportamiento es compatible con la unión de XPA a B12. El ajuste de los datos al modelo de complejación de Hill (ecuación 5) permite conocer la constante asociada al proceso (K_D) así como el número de unidades de XPA que interaccionan con B3 (n).

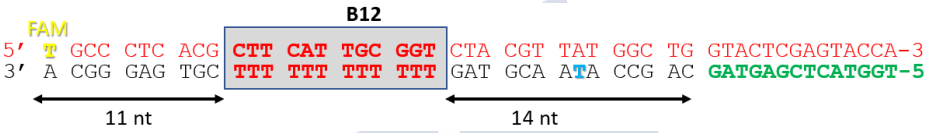


Figura 6. Estructura de burbuja B12 indicando el daño en un rectángulo.

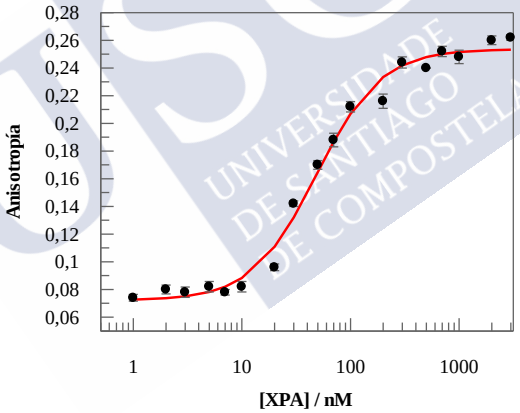


Figura 7. Variación de anisotropía en función de la concentración de XPA y ajuste al modelo de Hill en rojo.

El ajuste de los datos observados en la figura 7 permite determinar que la constante K_D tiene un valor de 48 ± 4.0 nM mientras que el valor obtenido para n es 1.47 ± 0.17. De nuevo, el valor de n indica una cooperación positiva. Un aspecto importante a destacar es que ambos ajustes conducen a valores de las constantes K_D compatibles entre sí, además los valores obtenidos para B3 y B12 son complementarios indicando que el tamaño de la burbuja no parece tener relación con la fortaleza del complejo formado entre XPA y el ADN. Por el contrario, el número de unidades de XPA que se unen a la burbuja no está del todo establecido, siendo necesarios estudios complementarios con otras técnicas.

8.3.3 Cambios conformacionales en burbuja B3 por interacción con XPA usando FRET.

Tal y como se indica en la introducción de este capítulo la técnica de Transferencia de energía de Resonancia de Förster (FRET) es una de las más utilizadas ya que aporta una valiosa información acerca de los cambios configuracionales de las biomoléculas. Para este trabajo, se ha seleccionado el par Cy3-Cy5 como dador-aceptor ya que se tratan de dos cianinas ampliamente estudiadas en la bibliografía.

En este estudio, se realiza una valoración fluorimétrica a una muestra de B3 marcada con Cy3 y Cy5 (estructura en la figura 8) de concentración constante 15 nM a la que se adicionan concentraciones crecientes de XPA, cabe destacar que en este caso la concentración final de NaCl es de 50 mM. Los espectros de excitación se realizan seleccionando la longitud de onda adecuada, 535 nm para Cy3 y 640 nm para Cy5, estas medidas permitirán calcular el valor de Ratio A tal y como se explica en la introducción de este capítulo (ecuación 4).

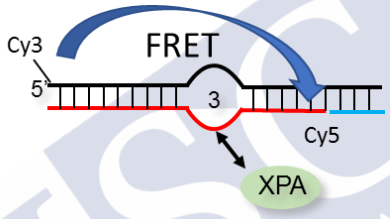


Figura 8. Estructura de B3 (de tres hebras) marcada con Cy3 y Cy5.

Los resultados obtenidos mediante el análisis del sistema se muestran en la figura 9, tal y como se puede observar se produce un incremento del valor de Ratio A a medida que aumenta la concentración de XPA en el medio, esto significa que aumenta la eficacia de FRET y por tanto, indica que la distancia entre Cy3 y Cy5 disminuye a medida que XPA se asocia a B3 provocando cambios conformacionales. El análisis de los valores obtenidos al modelo de Hill para la unión de dos XPA a B3 permite determinar que la constante K_D tiene un valor de 252 ± 37 nM.

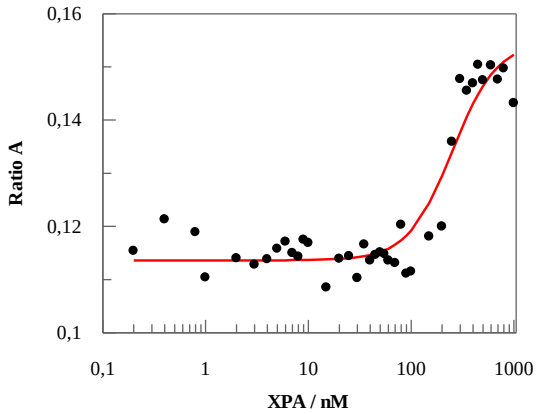


Figura 9. Variación de Ratio A en función de la concentración de XPA y ajuste al modelo de Hill en color rojo.

8.3.4 Cambios conformacionales en burbuja B12 por interacción con XPA usando FRET.

De forma paralela al estudio realizado mediante anisotropía donde se evaluaban los cambios en la afinidad de XPA según el tamaño de la burbuja formada, se realiza un experimento homologo al realizado en el apartado 8.3.3 siendo en este caso la burbuja de estudio B12 (estructura en figura 10). Además, dado que la concentración de sales es crítica para la mayor parte de los procesos biológicos, se ha decidido ampliar este estudio con una influencia de la concentración de NaCl sobre el reconocimiento y enlace de XPA sobre B12.

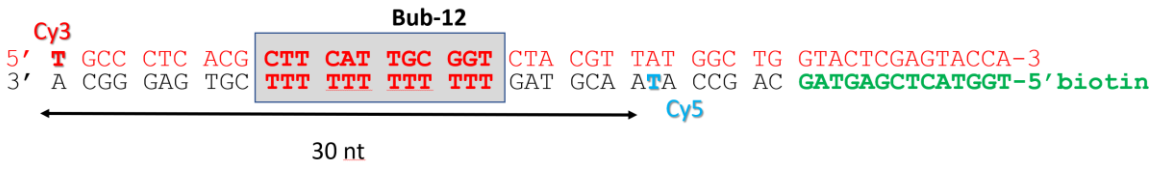


Figura 10. Estructura de B12 (de tres hebras) marcada con Cy3 y Cy5.

La valoración fluorimétrica se realiza a muestras de concentración constante de B12 (15 nM), concentración constante de NaCl (50, 150 y 200 mM para cada uno de los experimentos) y adicción de concentraciones crecientes de XPA. Los espectros de excitación se realizan seleccionando la longitud de onda correcta, 535 nm para Cy3 y 640 nm para Cy5; estas medidas permitirán calcular el valor de Ratio A tal y como se explica en la introducción de este capítulo (ecuación 4).

Los resultados obtenidos mediante el análisis del sistema se muestran en la figura 11, tal y como se puede observar se produce un incremento del valor de Ratio A a medida que aumenta la concentración de XPA en el medio, esto significa que aumenta la eficacia de FRET y por tanto, indica que la distancia entre Cy3 y Cy5 disminuye a medida que XPA se

asocia a B12 provocando cambios conformacionales. Este comportamiento es el mismo que se observa en el estudio de B3. El análisis de los valores obtenidos al modelo de Hill para una concentración de NaCl de 50 mM permite determinar que la constante K_D tiene un valor de 373 ± 15 nM mientras que n es 2.17 ± 0.18 . El análisis de los valores obtenidos al modelo de Hill para una concentración de NaCl de 150 mM permite determinar que la constante K_D tiene un valor de 394 ± 43 nM mientras que n es 2.48 ± 0.51. Por último, el análisis de los valores obtenidos al modelo de Hill para una concentración de NaCl de 200 mM permite determinar que la constante K_D tiene un valor de 715 ± 203 nM mientras que n es 1.92 ± 0.64.

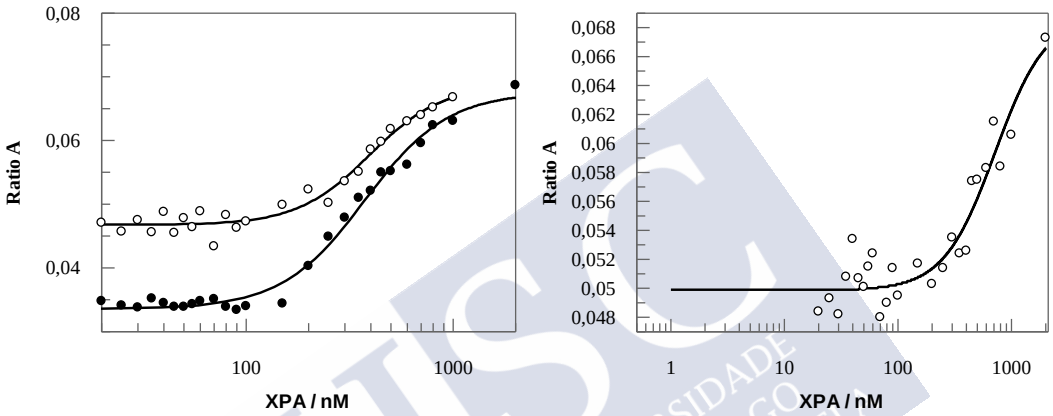


Figura 11. (Izquierda) Variación de Ratio A frente a la concentración de XPA de una muestra de concentración constante de B12 de 15 nM y concentración de NaCl: (●) 50 mM y (○) 150 mM. (Derecha) Variación de Ratio A frente a la concentración de XPA de una muestra de concentración constante de B12 de 15 nM y concentración de NaCl 200 mM.

Los resultados obtenidos permiten esclarecen que el cambio en el valor de K_D para la muestra con concentración salina de 200 mM indican que, la afinidad de XPA sobre B12 presenta un fuerte componente electrostático. Además, un análisis del incremento de los valores de Ratio A indican que a medida que aumenta la concentración de NaCl en el medio disminuye este cambio; este hecho se justifica debido a que un aumento de la concentración de sales provoca una mayor compactación de la burbuja de ADN. Este hecho, además, justifica que el valor de Ratio A inicial sea mayor a medida que aumenta la concentración de NaCl en el medio. Por último, esta serie de experimentos permite establecer que el aumento del valor de Ratio A implica una mayor cercanía entre Cy3 y Cy5 es decir, se confirma que XPA al unirse a B12 distorsiona su estructura.

8.3.5 Cambios conformacionales en burbuja B12 por interacción con RPA usando FRET y anisotropía.

La segunda proteína de estudio es RPA (Proteína de Replicación A) que tal y como se especifica en la introducción está formada por tres subunidades cuyos papeles en el mecanismo NER no se encuentran del todo clarificados. Con el fin de avanzar en el conocimiento del modo de enlace de RPA al ADN, se realiza una variación fluorimétrica de una muestra de concentración constante de B12 (estructura en figura 12) de 15 nM a la que se adicionan concentraciones crecientes de RPA, la concentración de NaCl se mantiene constante en 50 mM. Los espectros de excitación se realizan seleccionando como longitud de onda de excitación 535 nm para Cy3 y 640 nm para Cy5; estos experimentos permiten calcular el Ratio A para cada una de las muestras según la ecuación 4.

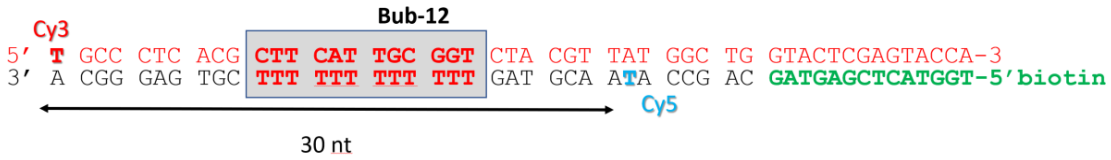


Figura 12. Estructura de B12 (de tres hebras) marcada con Cy3 y Cy5.

Los resultados obtenidos mediante el análisis del sistema se muestran en la figura 13, tal y como se puede observar se produce un incremento del valor de Ratio A a bajas concentraciones de RPA, esto indica que se produce una pequeña distorsión de la burbuja de forma que Cy3 y Cy5 se acercan cuando una proteína de RPA se enlaza a B12; a medida que aumenta la concentración de RPA en el medio se produce una disminución del valor de Ratio A de forma que, a altas concentraciones de RPA el valor obtenido es incluso menor que el valor de Ratio A inicial. Este cambio en la tendencia de Ratio A implica que, una segunda proteína de RPA se enlaza a B12 induciendo una conformación más linear, incluso más lineal que la conformación de B12 en ausencia de proteína en el medio.

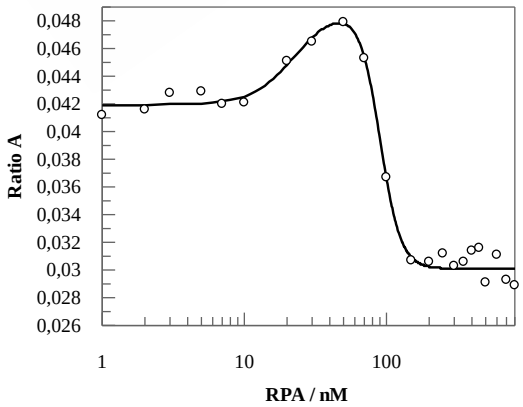


Figura 13. Variación de Ratio A frente a la concentración de RPA de una muestra de concentración constante de B12 de 15 nM y concentración constante de NaCl de 50 mM. Ajuste al modelo de Hill representado con una línea negra.

El análisis de los valores experimentales obtenidos mediante el modelo de Hill permite determinar las constantes asociadas a cada una de las proteínas. El valor de K_{D1} calculado es 23 ± 9.5 nM mientras que K_{D2} es 90 ± 6.2 nM; estos resultados indican una cooperación clara

entre la primera y la segunda proteína, es decir, la unión de la primera RPA a B12 facilita la unión de la segunda RPA.

Para confirmar la cooperación entre las dos RPA se realiza un experimento de anisotropía con un fragmento de B12 compatible con la técnica (estructura en la figura 14), es decir sin marcar con Cy3 ni Cy5. El experimento se realiza sobre una muestra de concentración constante de B12 de 5 nM y NaCl 50 mM, adicionándose concentraciones crecientes de RPA al medio. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15, el ajuste de los valores experimentales obtenidos al modelo de Hill permite determinar las constantes de asociación de cada una de las proteínas, el valor de K_{D1} calculado es 6.7 ± 1.2 nM mientras que K_{D2} es 225 ± 77 nM. Estos resultados confirman de nuevo la clara cooperación entre las dos proteínas de RPA que se unen a B12.

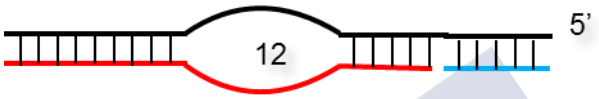


Figura 14. Exquema de la estructura de B12 (de tres hebras) sin marcaje de Cy3 y Cy5.

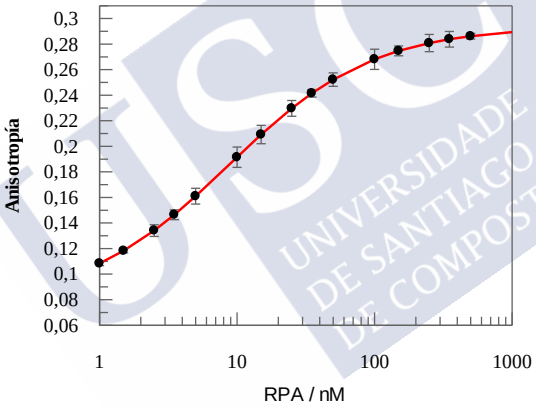


Figura 15. Variación de anisotropía frente a la concentración de RPA de una muestra de concentración constante de B12 de 5 nM y concentración constante de NaCl de 50 mM. Ajuste al modelo de Hill representado con una línea negra.

8.3.6 Cambios conformacionales en burbuja B12 por interacción conjunta de RPA y XPA.

Ante la evidencia de que XPA y RPA pueden actuar como un complejo en el mecanismo NER tal y como sugieren diferentes fuentes bibliográficas (apartado 8.1.4) y, una vez estudiado el comportamiento de cada una de las proteínas ante diferentes fragmentos de ADN dañados, se decide avanzar en el conocimiento del mecanismo NER diseñando varios experimentos en los que se trabaje de forma conjunta con XPA y RPA.

8.3.6.1 Influencia de XPA sobre RPA.

A partir de los resultados obtenidos en el apartado 8.3.5 se diseña un experimento de fluorescencia en el que a una muestra con concentración constante de RPA (200 nM, concentración de saturación) se le adicionan concentraciones crecientes de XPA; la concentración de B12 es 15 nM. A continuación, se calculará el Ratio A para cada una de las muestras generadas y así, evaluar los cambios conformacionales en la estructura de B12 enlazada a dos RPA en presencia de XPA. Tal y como se puede observar en la figura 16, no se produce ningún cambio significativo en el Ratio A, esto implica que XPA no es capaz de enlazarse a B12 cuando esta burbuja ya cuenta con dos RPA unidas, es decir, XPA no es capaz de competir con RPA.

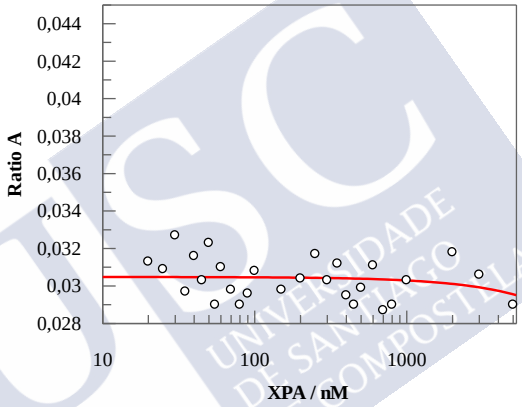


Figura 16. Variación de Ratio A frente a la concentración de XPA de una muestra de concentración constante de B12 de 15 nM y concentración constante de RPA de 200 nM. Ajuste al modelo de Hill representado con una línea negra.

8.3.6.2 Influencia de RPA sobre XPA.

Finalmente, se diseña un experimento complementario al del apartado anterior, en este caso, se realiza una influencia fluorimétrica a una muestra de concentración constante de XPA (2 µM, concentración de saturación) a la que se adicciona una concentración creciente de RPA, la concentración de B12 al igual que en el resto de experimentos se mantiene constante en 15 nM.

El análisis del cambio del Ratio A ante el incremento de concentración de RPA en el medio aporta una valiosa información (Fig 17). La tendencia observada es idéntica al proceso de reconocimiento de RPA a B12 cuando no existen proteínas competidoras en el medio, este experimento revela que RPA es capaz de desplazar a XPA de B12 lo que confirma la gran afinidad de RPA por el ADN de estudio.

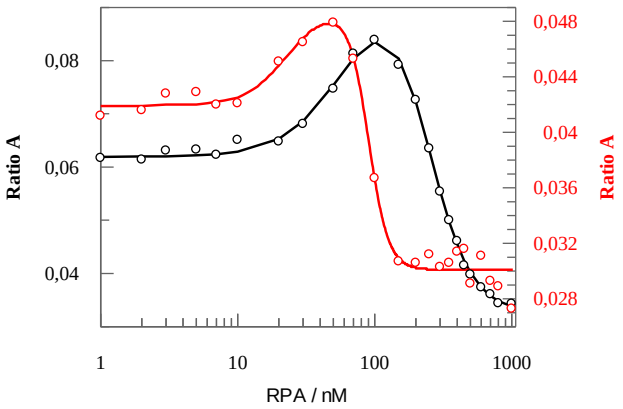


Figura 17. Variación de Ratio A frente a la concentración de RPA de una muestra de concentración constante de B12 de 15 nM y concentración constante de XPA de 2 µM (en color negro) y variación de Ratio A frente a la concentración de RPA de una muestra de concentración constante de B12 de 15 nM (en color rojo).

Comparando la distorsión de la burbuja B12 con presencia o ausencia de ambas proteínas se puede concluir que solo cuando ambas están presentes en B12 se induce la mayor distorsión, es decir, se alcanza el mayor valor de Ratio A. Este comportamiento sugiere que ambas proteínas actúan de forma conjunta en la reorganización de la estructura para preparar el sistema ante el siguiente paso del mecanismo NER, la acción de las endonucleasas XPG y XPF, enzimas que catalizan la ruptura de enlaces fosfodiéster de la cadena polinucleótida.

8.4 CONCLUSIONES.

En este capítulo se ha estudiado la interacción de XPA y RPA, dos proteínas que forman parte del mecanismo NER, con diferentes fragmentos de ADN dañados (burbujas B3 y B12). Se han determinado las constantes K_D asociados a cada proceso, así como el número de proteínas que se unen a cada una de las burbujas. El estudio de XPA se ha realizado además en diferentes condiciones de salinidad determinándose que se trata de una variable fundamental ya que, la unión de XPA al ADN cuenta con un fuerte componente electrostático.

Una vez establecidos los cambios estructurales inducidos por cada una de las proteínas de manera individual se llevan a cabo experimentos competitivos que revelan dos importantes factores, por una parte, XPA no es capaz de competir con RPA y, por otra parte, el comportamiento de RPA con B12 saturada de XPA es muy similar al comportamiento individual de RPA. La comparación de la distorsión de la burbuja B12 con presencia o ausencia de ambas proteínas permite concluir que solo cuando ambas están presentes en B12 se induce la mayor distorsión. Este comportamiento sugiere que ambas proteínas actúan de forma conjunta en la reorganización de la estructura para preparar el sistema ante el siguiente paso del mecanismo NER.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8.5 BIBLIOGRAFÍA.

(1) Kerr, I. D.; Wadsworth, R. I. M.; Cubeddu, L.; Blankenfeldt, W.; Naismith, J. H.; White, M. F. Insights into SsDNA Recognition by the OB Fold from a Structural and Thermodynamic Study of Sulfolobus SSB Protein. *EMBO J.* **2003**, *22* (11), 2561–2570. DOI: 10.1093/emboj/cdg272.

(2) Sugasawa, K. Molecular Mechanisms of DNA Damage Recognition for Mammalian Nucleotide Excision Repair. *DNA Repair (Amst).* **2016**, *44*, 110–117. DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.05.015.

(3) Blouin, S.; Craggs, T. D.; Lafontaine, D. A.; Penedo, J. C. Functional Studies of DNA-Protein Interactions Using FRET Techniques. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1334*, 115–141. DOI: 10.1007/978-1-4939-2877-4_8.

(4) Clegg, R. M. *Chapter 1 Förster Resonance Energy Transfer-FRET What Is It, Why Do It, and How It's Done*, 1st ed.; Elesvier B.V., 2009; Vol. 33. DOI: 10.1016/S0075-7535(08)00001-6.

(5) Masters, B. R. Paths to Förster's Resonance Energy Transfer (FRET) Theory. *Eur. Phys. J. H* **2014**, *39* (1), 87–139. DOI: 10.1140/epjh/e2013-40007-9.

(6) Hohng, S.; Lee, S.; Lee, J.; Jo, M. H. Maximizing Information Content of Single-Molecule FRET Experiments: Multi-Color FRET and FRET Combined with Force or Torque. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (4), 1007–1013. DOI: 10.1039/c3cs60184f.

(7) Hilton, B.; Shkriabai, N.; Musich, P. R.; Kvaratskhelia, M.; Shell, S.; Zou, Y. A New Structural Insight into XPA-DNA Interactions. *Biosci. Rep.* **2014**, *34* (6), 831–840. DOI: 10.1042/BSR20140158.

(8) Sugitani, N.; Shell, S. M.; Soss, S. E.; Chazin, W. J. Rede Fi Ning the DNA-Binding Domain of Human XPA. **2015**, 10–13. DOI: 10.1021/ja503020f.

(9) Kuraoka, I.; Morita, E. H.; Saijo, M.; Matsuda, T.; Morikawa, K.; Shirakawa, M.; Tanaka, K. Identification of a Damaged-DNA Binding Domain of the XPA Protein. *Mutat. Res. - DNA Repair* **1996**, *362* (1), 87–95. DOI: 10.1016/0921-8777(95)00038-0.

(10) Buchko, G. W.; Ni, S.; Thrall, B. D.; Kennedy, M. A. Structural Features of the Minimal DNA Binding Domain (M98-F219) of Human Nucleotide Excision Repair Protein XPA. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26* (11), 2779–2788. DOI: 10.1093/nar/26.11.2779.

(11) Ikegami, T.; Kuraoka, I.; Saijo, M.; Kodo, N.; Kyogoku, Y.; Morikawa, K.; Tanaka, K.; Shirakawa, M. Solution Structure of the DNA- and RPA-Binding Domain of the Human Repair Factor XPA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1998**, *5* (8), 701–706. DOI: 10.1038/1400.

(12) Yang, Z.; Roginskaya, M.; Colis, L. C.; Basu, A. K.; Shell, S. M.; Liu, Y.; Musich, P. R.; Harris, C. M.; Harris, T. M.; Zou, Y. Specific and Efficient Binding of Xeroderma Pigmentosum Complementation Group A to Double-Strand/Single-Strand DNA Junctions with 3′- and/or 5′-SsDNA Branches. *Biochemistry* **2006**, *45* (51), 15921–15930. DOI: 10.1021/bi061626q.

(13) Giglia-Mari, G.; Miquel, C.; Theil, A. F.; Mari, P. O.; Hoogstraten, D.; Ng, J. M. Y.; Dinant, C.; Hoeijmakers, J. H. J.; Vermeulen, W. Dynamic Interaction of TTDA with TFIIH Is Stabilized by Nucleotide Excision Repair in Living Cells. *PLoS Biol.* **2006**, *4* (6), 0952–0963. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040156.

(14) Ziani, S.; Nagy, Z.; Alekseev, S.; Soutoglou, E.; Egly, J. M.; Coin, F. Sequential and Ordered Assembly of a Large DNA Repair Complex on Undamaged Chromatin. *J. Cell Biol.* **2014**, *206* (5), 589–598. DOI: 10.1083/jcb.201403096.

(15) Krasikova, Y. S.; Rechkunova, N. I.; Maltseva, E. A.; Petruseva, I. O.; Lavrik, O. I. Localization of Xeroderma Pigmentosum Group A Protein and Replication Protein A on Damaged DNA in Nucleotide Excision Repair. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (22), 8083–8094. DOI: 10.1093/nar/gkq649.

(16) Sugitani, N.; Sivley, R. M.; Perry, K. E.; Capra, J. A.; Chazin, W. J. XPA: A Key Scaffold for Human Nucleotide Excision Repair. *DNA Repair (Amst).* **2016**, *44*, 123–135. DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.05.018.

(17) Liu, Y.; Liu, Y.; Yang, Z.; Utzat, C.; Wang, G.; Basu, A. K.; Zou, Y. Cooperative Interaction of Human XPA Stabilizes and Enhances Specific Binding of XPA to DNA Damage. *Biochemistry* **2005**, *44* (19), 7361–7368. DOI: 10.1021/bi047598y.

(18) Tumbarello, D. A.; Turner, C. E. Hic-5 Contributes to Transformation Through a RhoA / ROCK-Dependent Pathway. *J. Cell. Physiol.* **2006**, *211(3)* (May), 736–747. DOI: 10.1002/JCP.

(19) Wold, M. S. Replication Protein A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 61–92. DOI: 10.1146/annurev.biochem.66.1.61.

(20) Fanning, E.; Klimovich, V.; Nager, A. R. A Dynamic Model for Replication Protein A (RPA) Function in DNA Processing Pathways. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (15), 4126–4137. DOI: 10.1093/nar/gkl550.

(21) Bochkarev, A.; Bochkareva, E.; Frappier, L.; Edwards, A. M. The Crystal Structure of the Complex of Replication Protein A Subunits RPA32 and RPA14 Reveals a Mechanism for Single-Stranded DNA Binding. *EMBO J.* **1999**, *18* (16), 4498–4504. DOI: 10.1093/emboj/18.16.4498.

(22) Ünsal-Kaçmaz, K.; Sancar, A. Quaternary Structure of ATR and Effects of ATRIP and Replication Protein A on Its DNA Binding and Kinase Activities. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24* (3), 1292–1300. DOI: 10.1128/mcb.24.3.1292-1300.2003.

(23) Zou, L.; Elledge, S. J. Sensing DNA Damage through ATRIP Recognition of RPA-SsDNA Complexes. *Science.* **2003**, *300* (5625), 1542–1548. DOI: 10.1126/science.1083430.

(24) Wobbe, C. R.; Weissbach, L.; Borowiec, J. A.; Dean, F. B.; Murakami, Y.; Bullock, P.; Hurwitz, J. Replication of Simian Virus 40 Origin-Containing DNA in Vitro with Purified Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84* (7), 1834–1838. DOI: 10.1073/pnas.84.7.1834.

(25) Wold, M. S.; Kelly, T. Purification and Characterization of Replication Protein A, a Cellular Protein Required for in Vitro Replication of Simian Virus 40 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85* (8), 2523–2527. DOI: 10.1073/pnas.85.8.2523.

(26) Hübscher, U.; Maga, G.; Spadari, S. Eukaryotic DNA Polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 133–163. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.090501.150041.

(27) Buschta-Hedayat, N.; Buterin, T.; Hess, M. T.; Missura, M.; Naegeli, H. Recognition of Nonhybridizing Base Pairs during Nucleotide Excision Repair of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (11), 6090–6095. DOI: 10.1073/pnas.96.11.6090.

(28) Zhong, X.; Garg, P.; Stith, C. M.; McElhinny, S. A. N.; Kissling, G. E.; Burgers, P. M. J.; Kunkel, T. A. The Fidelity of DNA Synthesis by Yeast DNA Polymerase Zeta Alone and with Accessory Proteins. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (17), 4731–4742. DOI: 10.1093/nar/gkl465.

(29) Fortune, J. M.; Stith, C. M.; Kissling, G. E.; Burgers, P. M. J.; Kunkel, T. A. RPA and PCNA Suppress Formation of Large Deletion Errors by Yeast DNA Polymerase δ. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (16), 4335–4341. DOI: 10.1093/nar/gkl403.

(30) Maga, G.; Shevelev, I.; Villani, G.; Spadari, S.; Hübscher, U. Human Replication Protein A Can Suppress the Intrinsic in Vitro Mutator Phenotype of Human DNA Polymerase λ. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (5), 1405–1415. DOI: 10.1093/nar/gkl032.

(31) Haracska, L.; Unk, I.; Johnson, R. E.; Phillips, B. B.; Hurwitz, J.; Prakash, L.; Prakash, S. Stimulation of DNA Synthesis Activity of Human DNA Polymerase κ by PCNA. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22* (3), 784–791. DOI: 10.1128/mcb.22.3.784-791.2002.

(32) Maga, G.; Ramadan, K.; Locatelli, G. A.; Shevelev, I.; Spadari, S.; Hübscher, U. DNA Elongation by the Human DNA Polymerase λ Polymerase and Terminal Transferase Activities Are Differentially Coordinated by Proliferating Cell Nuclear Antigen and Replication Protein A. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (3), 1971–1981. DOI: 10.1074/jbc.M411650200.

(33) Sancar, A.; Lindsey-Boltz, L. A.; Ünsal-Kaçmaz, K.; Linn, S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 39–85. DOI: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723.

(34) Kastan, M. B.; Bartek, J. Cell-Cycle Checkpoints and Cancer. *Nature* **2004**, *432* (7015), 316–323. DOI: 10.1038/nature03097.

(35) Iftode, C.; Daniely, Y.; Borowiec, J. A. Replication Protein A (RPA): The Eukaryotic SSB. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *34* (3), 141–180. DOI: 10.1080/10409239991209255.

(36) Sakaguchi, K.; Ishibashi, T.; Uchiyama, Y.; Iwabata, K. The Multi-Replication Protein A (RPA) System - A New Perspective. *FEBS J.* **2009**, *276* (4), 943–963. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06841.x.

(37) Mer, G.; Bochkarev, A.; Gupta, R.; Bochkareva, E.; Frappier, L.; Ingles, C. J.; Edwards, A. M.; Chazin, W. J. Structural Basis for the Recognition of DNA Repair Proteins UNG2, XPA, and RAD52 by Replication Factor RPA. *Cell* **2000**, *103* (3), 449–456. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00136-7.

(38) Buchko, G. W.; Daughdrill, G. W.; De Lorimier, R.; Sudha Rao, B. K.; Isern, N. G.; Lingbeck, J. M.; Taylor, J. S.; Wold, M. S.; Gochin, M.; Spicer, L. D.; Lowry, D. F.; Kennedy, M. A. Interactions of Human Nucleotide Excision Repair Protein XPA with DNA and RPA70ΔC327: Chemical Shift Mapping and 15-N NMR Relaxation Studies. *Biochemistry* **1999**, *38* (46), 15116–15128. DOI: 10.1021/bi991755p.

(39) Lee, S. H.; Kim, D. K.; Drissi, R. Human Xeroderma Pigmentosum Group A Protein Interacts with Human Replication Protein A and Inhibits DNA Replication. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (37), 21800–21805. DOI: 10.1074/jbc.270.37.21800.

(40) Daughdrill, G. W.; Buchko, G. W.; Botuyan, M. V.; Arrowsmith, C.; Wold, M. S.; Kennedy, M. A.; Lowry, D. F. Chemical Shift Changes Provide Evidence for Overlapping Single-Stranded DNA- and XPA-Binding Sites on the 70 KDa Subunit of Human Replication Protein A. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (14), 4176–4183. DOI: 10.1093/nar/gkg451.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CHAPTER 9

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CHAPTER 9: SUMMARY AND CONCLUSIONS.

This thesis describes main types of inclusion complexes always in the field of supramolecular chemistry. In **Chapter 1** a brief introduction is given of supramolecular chemistry, cyclodextrins and pillar[n]arenes. Furthermore, an exhaustive bibliographic report on inclusion complexes is reviewed in chapter 1.

In **Chapter 2**, it has been confirmed that ANS is sensitive to changes in solvation since the quantum yield and the position of the band are modified synchronously by changes in solvation layer. The photochemical behavior has been studied with mixtures of methanol / water and 1,4-dioxane / water. The modification of ANS properties makes it a useful tool to understand colloid and biological systems.

The encapsulation on ANS into a macromolecule, a natural or modified cyclodextrin, originates a non-homogeneous solvation layer around the dye. The formation of inclusion complexes generates microenvironments. An asynchronous change in the properties of the dye is observed when the ANS penetrates the cavity of the cyclodextrin. The inclusion of a second molecule of ANS generates a 2:1 complex, that situation produces an increase in the quantum yield. The formation of 1:1 and 2:1 inclusion complexes are confirmed by Nuclear Magnetic Resonance. For this reason it is necessary to analyze properties, quantum yield and the position of the band.

The biological relevance has been revealed by studying the interaction of ANS and BSA, it has been confirmed that ANS can interact with the protein by two different ways. Furthermore, BSA has more than one biding site confirmed by STD experiments.

In **Chapter 3**, it has been confirmed the ability of P5TMA to act as a molecular receptor for anion dyes. The ability of P5TMA to form complexes with multiple stoichiometry has been revealed (formation of 1:2 and 1:1 host guest complexes). The association constants calculated are $K_1 = (4.7 \pm 0.63) \times 10^8\ M^{-1}$ and $K_2 = (8.29 \pm 0.75) \times 10^5\ M^{-1}$ for the formation of the complex 1:2 and 1:1, respectively. Through a competitive experiment, it has been possible the determination of the equilibrium constants for small ions as well as a linear molecule. The equilibrium constants $K_{P5TMA:Ion}$ are $(9.70 \pm 1.2) \times 10^3$, $(4.84 \pm 0.82) \times 10^3$, $(1.283 \pm 0.056) \times 10^3$, $(2.31 \pm 0.17) \times 10^4$, $(1.93 \pm 0.13) \times 10^4$, $(1.093 \pm 0.074) \times 10^3$ and $(1.74 \pm 0.37) \times 10^7\ M^{-1}$ for the ion $BF4^-$, Br^-, Cl^-, ClO4-, SCN^-, $CH_3SO_3^-$ and $C_6SO_3^-$, respectively. The use of TSNa as a competitive dye showing a new mode of complexation led to the formation of 1:1:1 complex, it is especially important the behavior of ANS. The configuration of ANS changes to form the 1:1:1 complex, the initial dihedral angle (150 º) develops to -70º so there are a variation in the properties of ANS (quantum yield and position of the band in the fluorescence emission spectrum of the dye).

Moreover, it has been confirmed the ability of P6TMA to act as molecular receptor too. The behavior of the complex P6TMA:ANS is quite similar to the P5TMA:ANS complex, the modification of the intensity and the position of the band varies asynchronously too. The

ability of P6TMA to form complexes with multiple stoichiometry has been revealed (formation of 1:2 and 1:1 host guest complexes). The association constants calculated are K_1 = (9.93 ± 0.63) x 10^{10} M^{-1} and K_2 = (1.46 ± 0.09) x 10^{11} M^{-1} for the formation of the complex 1:2 and 1:1, respectively. In contrast with P5TMA, in the case of P6TMA K_1 is lower than K_2, it seems that the size of the macrocycle and the π-π interactions boosted the formation of the 1:1 complex.

In **Chapter 4**, the decomposition of peroxynitrite in acidic and basic medium has been studied by the determination of the rate constant of these processes. Furthermore, the stabilization of peroxynitrite into the cavity of the P5TMA has been studied in acidic and basic medium and the rate constant of these processes have been determinate. This stabilization has been evaluated by the inhibition of two oxidation reactions, in an acid medium the reaction of peroxinitrite with hexacyanoferrate (II) has been studied. In basic medium the reaction of peroxinitrite with N-(2-aminophenyl)-5-(dimethylamino)-1-naphthalenoulfamide (Ds-DAB) has been reported. In addition, a ^{1}H-NMR experiment has been used as a control assay to the reaction of peroxynitrite and P5TMA.

In **Chapter 5**, the formation of a Meisenheimer complex has been studied by the reaction of TNB and NaOH under different conditions. The constants associated with the process have been determinate without fixing ionic strength are k_1 = 43.6 ± 4.3 $M^{-1}s^{-1}$, k_{-1} = 9.55 ± 1.75 s^{-1} and K = 4.56 ± 0.27 M^{-1}. The constants associated with the process have been determinate with fixing ionic strength are k_1 = 40.0 ± 6.6 $M^{-1}s^{-1}$, k_{-1} = 8.40 ± 1.86 s^{-1} and K = 4.76 ± 0.38 M^{-1}.

The same process has been studied with P5TMA in the medium, the constants of the process are k_1 = 49.6 ± 2.9 $M^{-1}s^{-1}$, k_{-1} = 2.99 ± 0.24 s^{-1} and K = 16.60 ± 0.12 M^{-1}. A stabilization of the Meisenheimer complex is obtained by the use of P5TMA (a factor of 3.7). The same process has been studied with P6TMA in the medium, the constants of the process are k_1 = 58.2 ± 1.0 $M^{-1}s^{-1}$, k_{-1} = 1.69 ± 0.35 s^{-1} and K = 34.91 ± 0.03 M^{-1}. A stabilization of the Meisenheimer complex is obtained by the use of P5TMA (a factor of 8).

The stabilization of reaction intermediates by pillar[n]arenes is confirmed. This study is one on the few examples of stabilization reaction intermediates with the use of conventional macrocycle.

In **Chapter 6**, it has been studied the formation of inclusion complexes between P5TMA and MO because MO is one of the most widely used dye. The P5TMA:MO complex is a useful tool in competitive experiments with dyes that do not change their properties in UV-vis experiments. Examples of this kind of dyes are TSNa or different diacids. The displacement of MO with diacids allows the elucidation of the kinetic constants as well as to establish the relationship between the constants and the size of the chain. The mechanism of the process indicates the formation of a pre-complex between the P5TMA:MO and the diacid. To calculate the equilibrium constants it is necessary to change the P5TMA:MO complex to P5TMA:Stil complex (Chapter 7).

In **Chapter 7**, a new mode of complexation by pillararenes has been reported since there are no bibliographic references in which the formation of an inclusion complex implies the inversion of any units.

The NMR characterization clarifies the inclusion mechanism by the identification of three types of complexes: external, kinetic and thermodynamic complexes.

UV-vis experiments allow confirming the presence of these three types of complexes. It is possible to determinate the thermodynamic parameters associated with each process, the equilibrium constant to the external complex is (8.76 ± 0.8) x 10^4 M^{-1} and the kinetic constant to the kinetic complex is (1.25 ± 0.4) x 10^3 s^{-1} ([stilbene] = 3.50 x 10^{-5} M and [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4}M). The activation energies for P5TMA:stilbene are 44 ± 2.9 and 56 ± 0.4 kJ / mol to the kinetic and thermodynamic complex, respectively.

The equilibrium constant to the external complex is (3.44 ± 0.15) x 10^4 M^{-1} and the kinetic constant to the kinetic complex is (10.42 ± 0.25) x 10^3 s^{-1} ([azobencene] = 3.50 x 10^{-5} M and [P5TMA] = 7.00 x 10^{-4}M. The activation energies for P5TMA:azobencene are 65 ± 2.1 and 89 ± 8.5 kJ / mol to the kinetic and thermodynamic complex, respectively.

In **Chapter 8**, it has been studied the interaction of XPA and RPA (proteins of the NER mechanism) with different damaged DNA fragments (bubble B3 and B12). The K_D constants associated with each process have been determined, as well as the number of proteins that bind to each of the bubbles. The study of XPA under different salinity conditions show that it is a fundamental variable since the binding of XPA to DNA has a strong electrostatic component.

Once the dynamics of each protein have been established individually, competitive experiments are carried out. On the one hand, XPA is not capable of competing with RPA. On the other hand, RPA behavior with B12 saturated with XPA is very similar to individual behavior of RPA. Comparing the distortion of B12 with the presence and absence of both proteins allows us to conclude that the greatest distortion of B12 is induced with both proteins. This behavior suggests that both proteins act together in the reorganization of the structure to prepare the system for the next step of the NER mechanism.

ANEXO I: PERMISOS DE REVISTAS CIENTÍFICAS.

Capítulo 1: Introducción.

1. Esquema 13.

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jan 21, 2021

This Agreement between 6 Unidade Street, Apt 3º Izq ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4993721427470
License date	Jan 21, 2021
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Progress in Polymer Science
Licensed Content Title	Water-insoluble β-cyclodextrin–epichlorohydrin polymers for removal of pollutants from aqueous solutions by sorption processes using batch studies: A review of inclusion mechanisms
Licensed Content Author	Nadia Morin-Crini,Peter Winterton,Sophie Fourmentin,Lee D. Wilson,Éva Fenyvesi,Grégorio Crini
Licensed Content Date	Mar 1, 2018
Licensed Content Volume	78
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	23
Start Page	1
End Page	23
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation

Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Síntesis y caracterización de pilar[n]arenos y su uso como receptores moleculares
Institution name	Universidade Santiago de Compostela
Expected presentation date	Mar 2021
Portions	Figure 3
Requestor Location	6 Unidade Street, Apt 3º Izq 6 Unidade Street, Apt 3º Izq Lugo, Spain 27004 Spain Attn: 6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk here). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation**: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website**: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx or the Elsevier homepage for books at http://www.elsevier.com; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at http://www.elsevier.com . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation**: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by/4.0.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the

work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

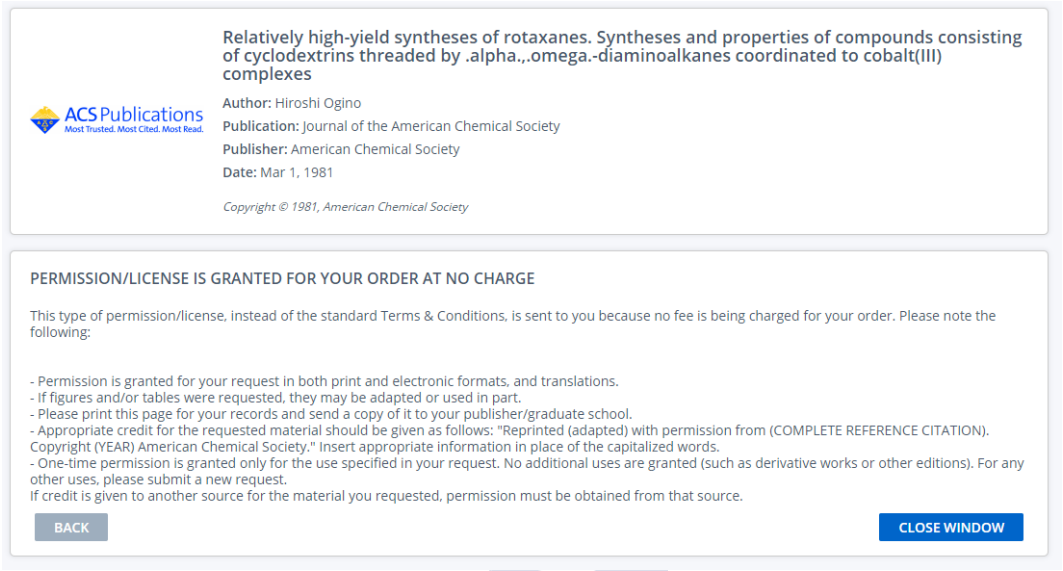
Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. **Other Conditions**:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

2. Esquema 21.



Relatively high-yield syntheses of rotaxanes. Syntheses and properties of compounds consisting of cyclodextrins threaded by .alpha.,.omega.-diaminoalkanes coordinated to cobalt(III) complexes

Author: Hiroshi Ogino
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: Mar 1, 1981

Copyright © 1981, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

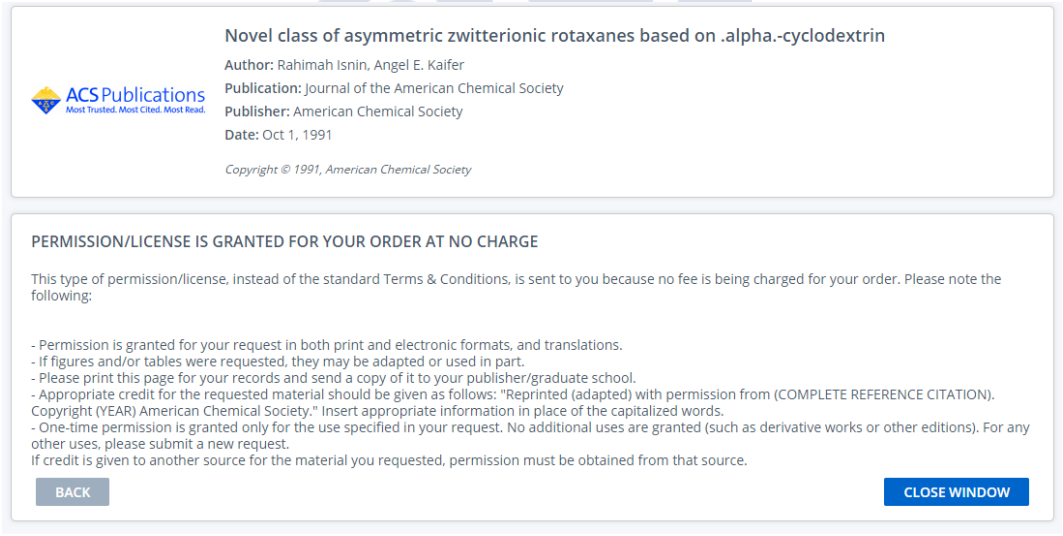
This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

3. Esquema 22.



Novel class of asymmetric zwitterionic rotaxanes based on .alpha.-cyclodextrin

Author: Rahimah Isnin, Angel E. Kaifer
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: Oct 1, 1991

Copyright © 1991, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

4. Esquema 23 y 24.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jan 21, 2021

This Agreement between 6 Unidade Street, Apt 3º Izq ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4993730656866
License date	Jan 21, 2021
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	European Journal of Organic Chemistry
Licensed Content Title	Cyclodextrin-Based Rotaxanes: from Rotaxanes to Polyrotaxanes and Further to Functional Materials
Licensed Content Author	Akira Harada, Hiroyasu Yamaguchi, Akihito Hashidzume
Licensed Content Date	Apr 5, 2019
Licensed Content Volume	2019
Licensed Content Issue	21
Licensed Content Pages	14
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic

Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	2
Will you be translating?	No
Title	Síntesis y caracterización de pilar[n]arenos y su uso como receptores moleculares
Institution name	Universidade Santiago de Compostela
Expected presentation date	Mar 2021
Portions	Scheme 4 and Scheme 5
Requestor Location	6 Unidade Street, Apt 3º Izq 6 Unidade Street, Apt 3º Izq Lugo, Spain 27004 Spain Attn: 6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that

you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY,

INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions,

these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

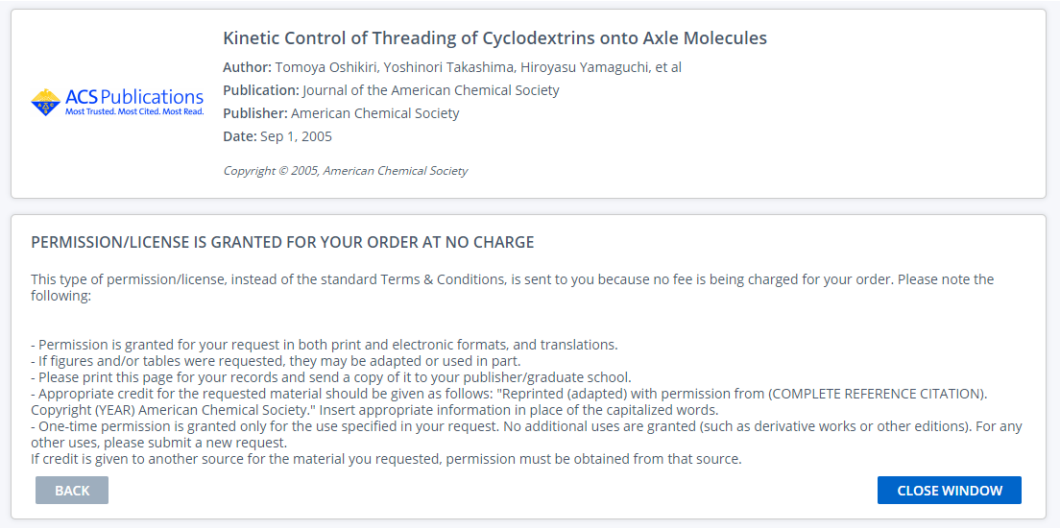
Further details can be found on Wiley Online Library
http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

5. Esquema 25.



Kinetic Control of Threading of Cyclodextrins onto Axle Molecules

Author: Tomoya Oshikiri, Yoshinori Takashima, Hiroyasu Yamaguchi, et al
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: Sep 1, 2005

Copyright © 2005, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. Esquema 26.

Copyright Clearance Center Marketplace™

Order Confirmation

Thank you, your order has been placed. An email confirmation has been sent to you. Your order license details and printable licenses will be available within 24 hours. Please access Manage Account for final order details.

This is not an invoice. Please go to manage account to access your order history and invoices.

CUSTOMER INFORMATION

Payment by invoice: You can cancel your order until the invoice is generated by contacting customer service.

Billing Address

Miss Alba Pereira
6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Lugo, Spain 27004
Spain

+34 606873661
alpevi92@gmail.com

Customer Location

Miss Alba Pereira
6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Lugo, Spain 27004
Spain

PO Number (optional)

N/A

Payment options

Invoice

PENDING ORDER CONFIRMATION

Confirmation Number: Pending

Order Date: 21-Jan-2021

1. Chemical communications

0,00 EUR

Order license ID	Pending	Publisher	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY
ISSN	1364-548X		
Type of Use	Republish in a thesis/dissertation	Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Chemical communications	Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain)	Rightsholder	Royal Society of Chemistry
Date	01/01/1996	Publication Type	e-Journal

Language	English

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	Distribution	Worldwide
Number of images / photos / illustrations	1	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Academic institution	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	EUR
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	Síntesis y caracterización de pillar[n]arenos para su uso como receptores moleculares.	Institution name	uNIVERSIDADE sANTIAGO DE cOMPOSTELA
Instructor name	Alba Pereira Vilar	Expected presentation date	2021-04-09

ADDITIONAL DETAILS

Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	Universidade Santiago de Compostela

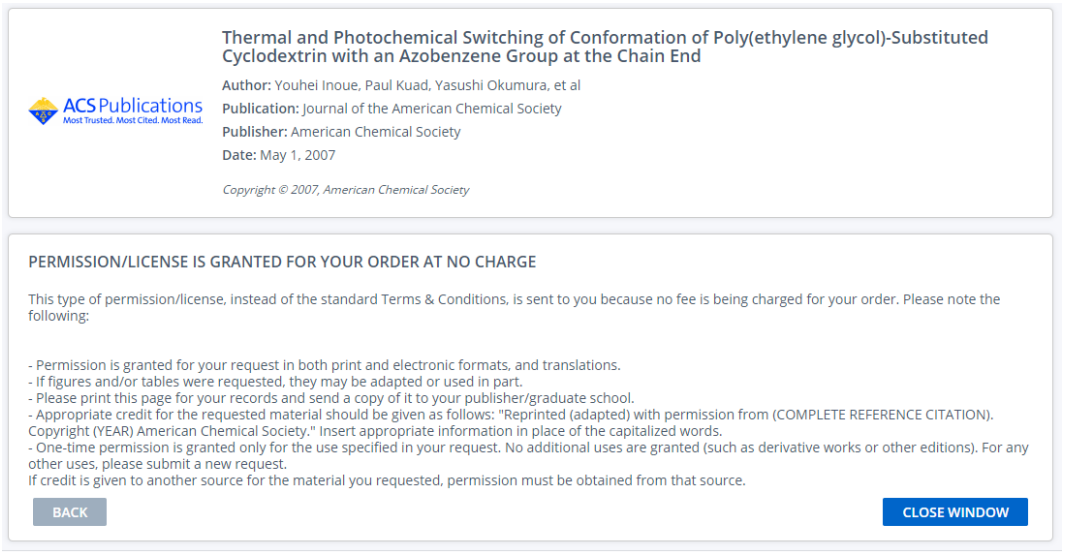
REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	Figure 3	Title of the article/chapter the portion is from	n/a
Editor of portion(s)	N/A	Author of portion(s)	Royal Society of Chemistry (Great Britain)
Volume of serial or monograph	N/A	Issue, if republishing an article from a serial	N/A
Page or page range of portion	5516	Publication date of portion	1996-01-01

Total Items: 1 **Total Due: 0,00 EUR**

Accepted: All Publisher and CCC Terms and Conditions

7. Esquema 27.



Thermal and Photochemical Switching of Conformation of Poly(ethylene glycol)-Substituted Cyclodextrin with an Azobenzene Group at the Chain End

Author: Youhei Inoue, Paul Kuad, Yasushi Okumura, et al
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: May 1, 2007

Copyright © 2007, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8. Esquema 28.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jan 21, 2021

This Agreement between 6 Unidade Street, Apt 3º Izq ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4993740191318
License date	Jan 21, 2021
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Chemistry - An Asian Journal
Licensed Content Title	Light-Switchable Janus [2]Rotaxanes Based on α-Cyclodextrin Derivatives Bearing Two Recognition Sites Linked with Oligo(ethylene glycol)
Licensed Content Author	Shujing Li, Daisuke Taura, Akihito Hashidzume, et al
Licensed Content Date	Jul 28, 2010
Licensed Content Volume	5
Licensed Content Issue	10
Licensed Content Pages	9

Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	Síntesis y caracterización de pilar[n]arenos y su uso como receptores moleculares
Institution name	Universidade Santiago de Compostela
Expected presentation date	Mar 2021
Portions	Figure 7
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	6 Unidade Street, Apt 3º Izq 6 Unidade Street, Apt 3º Izq Lugo, Spain 27004 Spain Attn: 6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the

continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is

properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

9. Figura 6.

Copyright Clearance Center Marketplace™

Order Confirmation

Thank you, your order has been placed. An email confirmation has been sent to you. Your order license details and printable licenses will be available within 24 hours. Please access Manage Account for final order details.

This is not an invoice. Please go to manage account to access your order history and invoices.

CUSTOMER INFORMATION

Payment by invoice: You can cancel your order until the invoice is generated by contacting customer service.

Billing Address

Miss Alba Pereira
6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Lugo, Spain 27004
Spain

+34 606873661
alpevi92@gmail.com

Customer Location

Miss Alba Pereira
6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Lugo, Spain 27004
Spain

PO Number (optional)

N/A

Payment options

Invoice

PENDING ORDER CONFIRMATION

Confirmation Number: Pending

Order Date: 25-Mar-2021

1. Chemical communications

0,00 EUR

Order license ID	Pending	**Publisher**	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY
ISSN	1364-548X		
Type of Use	Republish in a thesis/dissertation	**Portion**	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Chemical communications	**Country**	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain)	**Rightsholder**	Royal Society of Chemistry
Date	01/01/1996	**Publication Type**	e-Journal

Language	English

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	Distribution	Worldwide
Number of images / photos / illustrations	1	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Academic institution	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	EUR
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	Síntesis y caracterización de pillar[n]arenos para su uso como receptores moleculares.	Institution name	Universidade Santiago de Compostela
		Expected presentation date	2021-05-28
Instructor name	Alba Pereira Vilar		

ADDITIONAL DETAILS

Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	Universidade Santiago de Compostela

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	Figure 1	Title of the article/chapter the portion is from	n/a
Editor of portion(s)	N/A	Author of portion(s)	Royal Society of Chemistry (Great Britain)
Volume of serial or monograph	N/A	Issue, if republishing an article from a serial	N/A
Page or page range of portion	11000	Publication date of portion	1996-01-24

2. Chemical communications

0,00 EUR

Article: Pillar[n]arenes (n = 8-10) with two cavities: synthesis, structures and complexing properties.

Order license ID	Pending	Publisher	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY
ISSN	1364-548X		
Type of Use	Republish in a thesis/dissertation	Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Chemical communications	**Rightsholder**	Royal Society of Chemistry
Article Title	Pillar[n]arenes (n = 8-10) with two cavities: synthesis, structures and complexing properties.	**Publication Type**	e-Journal
		Start Page	10999
		End Page	11001
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain)	**Issue**	89
		Volume	48
Date	01/01/1996		
Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	**Distribution**	Worldwide
Number of images / photos / illustrations	1	**Translation**	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print, Electronic	**Copies for the disabled?**	No
		Minor editing privileges?	No
Who will republish the content?	Academic institution		
		Incidental promotional use?	No
Duration of Use	Life of current edition		
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	**Currency**	EUR
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	Síntesis y caracterización de pillar[n]arenos para su uso como receptores moleculares.	**Institution name**	Universidade Santiago de Compostela
		Expected presentation date	2021-03-25
Instructor name	Alba Pereira Vilar		

ADDITIONAL DETAILS

Order reference number	N/A	**The requesting person / organization to appear on the license**	Alba Pereira Vilar

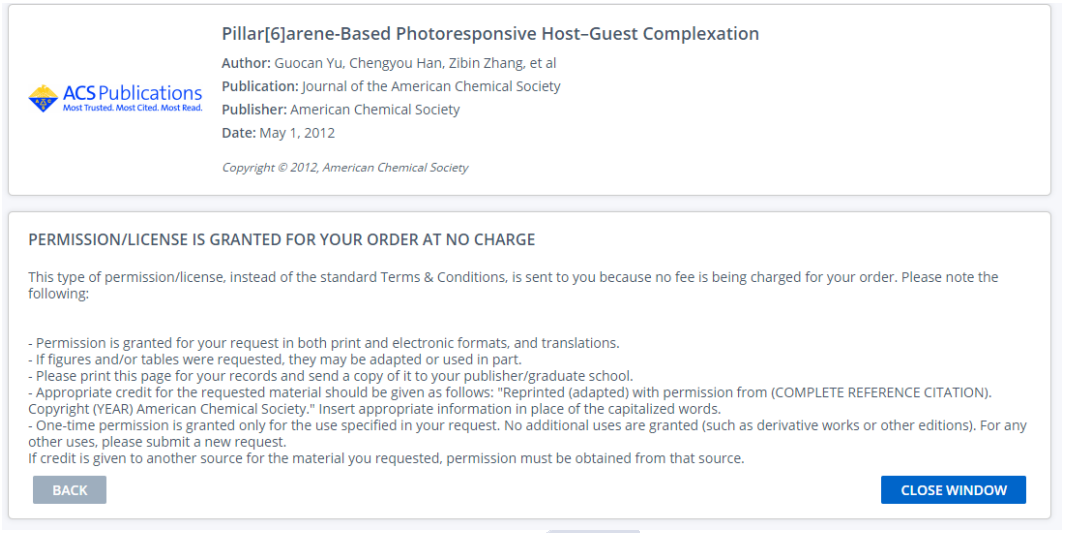
REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	Figure 1	**Title of the article/chapter the portion is from**	Pillar[n]arenes (n = 8-10) with two cavities: synthesis, structures and complexing properties.
Editor of portion(s)	Hu, Xiao-Bo; Chen, Zhenxia; Chen, Lei; Zhang, Ling; Hou, Jun-Li; Li, Zhan-Ting	**Author of portion(s)**	Hu, Xiao-Bo; Chen, Zhenxia; Chen, Lei; Zhang, Ling; Hou, Jun-Li; Li, Zhan-Ting
Volume of serial or monograph	48	**Issue, if republishing an article from a serial**	89
Page or page range of portion	10999-11001	**Publication date of portion**	2012-11-18

Total Items: 2 Total Due: 0,00 EUR

Accepted: All Publisher and CCC Terms and Conditions

10. Figura 7.



ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Pillar[6]arene-Based Photoresponsive Host–Guest Complexation

Author: Guocan Yu, Chengyou Han, Zibin Zhang, et al
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: May 1, 2012

Copyright © 2012, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

11. Figura 14.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Mar 25, 2021

This Agreement between 6 Unidade Street, Apt 3º Izq ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5036110281109
License date	Mar 25, 2021
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Angewandte Chemie International Edition
Licensed Content Title	Formation of a Pillar[5]arene-Based Two-Dimensional Poly-Pseudo-Rotaxane: Threading and Crosslinking by the Same Guest Molecules
Licensed Content Author	Shim Sung Lee, Yoichi Habata, Jong Hwa Jung, et al
Licensed Content Date	Jul 9, 2019
Licensed Content Volume	58
Licensed Content Issue	33
Licensed Content Pages	5

Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Title	Síntesis y caracterización de pilar[n]arenos y su uso como receptores moleculares
Institution name	Universidade Santiago de Compostela
Expected presentation date	Mar 2021
Portions	Figure 1
Requestor Location	6 Unidade Street, Apt 3º Izq 6 Unidade Street, Apt 3º Izq Lugo, Spain 27004 Spain Attn: 6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement

may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Capítulo 6: Formación de [2]rotaxanos entre P5TMA y diácidos lineales de diferente longitud de cadena.

1. Figura 2.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Mar 25, 2021

This Agreement between 6 Unidade Street, Apt 3º Izq ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5036120181013
License date	Mar 25, 2021
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Chemistry - A European Journal
Licensed Content Title	Spacer Length-Independent Shuttling of the Pillar[5]arene Ring in Neutral [2]Rotaxanes
Licensed Content Author	Tomoki Ogoshi, Daisuke Kotera, Shungo Nishida, et al
Licensed Content Date	Mar 8, 2018
Licensed Content Volume	24
Licensed Content Issue	24
Licensed Content Pages	5
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic

Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Title	Síntesis y caracterización de pilar[n]arenos y su uso como receptores moleculares
Institution name	Universidade Santiago de Compostela
Expected presentation date	Mar 2021
Portions	Image
Requestor Location	6 Unidade Street, Apt 3º Izq 6 Unidade Street, Apt 3º Izq Lugo, Spain 27004 Spain Attn: 6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

2. Figura 3.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Mar 25, 2021

This Agreement between 6 Unidade Street, Apt 3º Izq ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5036120394608
License date	Mar 25, 2021
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Helvetica Chimica Acta
Licensed Content Title	A Fullerene-Substituted Pillar[5]arene for the Construction of a Photoactive Rotaxane
Licensed Content Author	Jean-François Nierengarten, Matthieu Chessé, Michel Holler, et al
Licensed Content Date	Jun 3, 2018
Licensed Content Volume	101
Licensed Content Issue	6
Licensed Content Pages	11
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic

Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Title	Síntesis y caracterización de pilar[n]arenos y su uso como receptores moleculares
Institution name	Universidade Santiago de Compostela
Expected presentation date	Mar 2021
Portions	Figure 1
Requestor Location	6 Unidade Street, Apt 3º Izq 6 Unidade Street, Apt 3º Izq Lugo, Spain 27004 Spain Attn: 6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED

BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

3. Figura 4.

Copyright Clearance Center Marketplace™

Order Confirmation

Thank you, your order has been placed. An email confirmation has been sent to you. Your order license details and printable licenses will be available within 24 hours. Please access Manage Account for final order details.

This is not an invoice. Please go to manage account to access your order history and invoices.

CUSTOMER INFORMATION

Payment by invoice: You can cancel your order until the invoice is generated by contacting customer service.

Billing Address

Miss Alba Pereira
6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Lugo, Spain 27004
Spain

+34 606873661
alpevi92@gmail.com

Customer Location

Miss Alba Pereira
6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Lugo, Spain 27004
Spain

PO Number (optional)

N/A

Payment options

Invoice

PENDING ORDER CONFIRMATION

Confirmation Number: Pending

Order Date: 26-Mar-2021

1. Chemical communications

0,00 EUR

Order license ID	Pending	**Publisher**	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY
ISSN	1364-548X		
Type of Use	Republish in a thesis/dissertation	**Portion**	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Chemical communications	**Country**	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain)	**Rightsholder**	Royal Society of Chemistry
Date	01/01/1996		

Language	English	**Publication Type**	e-Journal

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	**Distribution**	Worldwide
Number of images / photos / illustrations	1	**Translation**	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print, Electronic	**Copies for the disabled?**	No
Who will republish the content?	Academic institution	**Minor editing privileges?**	No
Duration of Use	Life of current edition	**Incidental promotional use?**	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	**Currency**	EUR
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	Síntesis y caracterización de pillar[n]arenos para su uso como receptores moleculares.	**Institution name**	Universidade Santiago de Compostela
		Expected presentation date	2021-03-26
Instructor name	Alba Pereira Vilar		

ADDITIONAL DETAILS

Order reference number	N/A	**The requesting person / organization to appear on the license**	Alba Pereira Vilar

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	SCHEME 1	**Title of the article/chapter the portion is from**	n/a
Editor of portion(s)	N/A	**Author of portion(s)**	Royal Society of Chemistry (Great Britain)
Volume of serial or monograph	N/A	**Issue, if republishing an article from a serial**	N/A
Page or page range of portion	10715	**Publication date of portion**	1996-01-01

Total Items: 1 **Total Due: 0,00 EUR**

Accepted: All Publisher and CCC Terms and Conditions

4. Figura 5.

Copyright Clearance Center Marketplace™

Order Confirmation

Thank you, your order has been placed. An email confirmation has been sent to you. Your order license details and printable licenses will be available within 24 hours. Please access Manage Account for final order details.

This is not an invoice. Please go to manage account to access your order history and invoices.

CUSTOMER INFORMATION

Payment by invoice: You can cancel your order until the invoice is generated by contacting customer service.

Billing Address

Miss Alba Pereira
6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Lugo, Spain 27004
Spain

+34 606873661
alpevi92@gmail.com

Customer Location

Miss Alba Pereira
6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Lugo, Spain 27004
Spain

PO Number (optional)

N/A

Payment options

Invoice

PENDING ORDER CONFIRMATION

Confirmation Number: Pending

Order Date: 26-Mar-2021

1. New journal of chemistry

0,00 EUR

Order license ID	Pending	**Publisher**	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY
ISSN	1369-9261		
Type of Use	Republish in a thesis/dissertation	**Portion**	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	New journal of chemistry	**Country**	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Author/Editor	Centre national de la recherche scientifique (France), Royal Society of Chemistry (Great Britain)	**Rightsholder**	Royal Society of Chemistry

Date	01/01/1987	Publication Type	e-Journal
Language	English	URL	http://www.rsc.org/njc

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	Distribution	Worldwide
Number of images / photos / illustrations	1	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Academic institution	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	EUR
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	síntesis y caracterización de pilar[n]arenos para su uso como receptores moleculares.	Institution name	Universidade Santiago de Compostela
		Expected presentation date	2021-03-26
Instructor name	Alba Pereira Vilar		

ADDITIONAL DETAILS

Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	Alba Pereira Vilar

REUSE CONTENT DETAILS

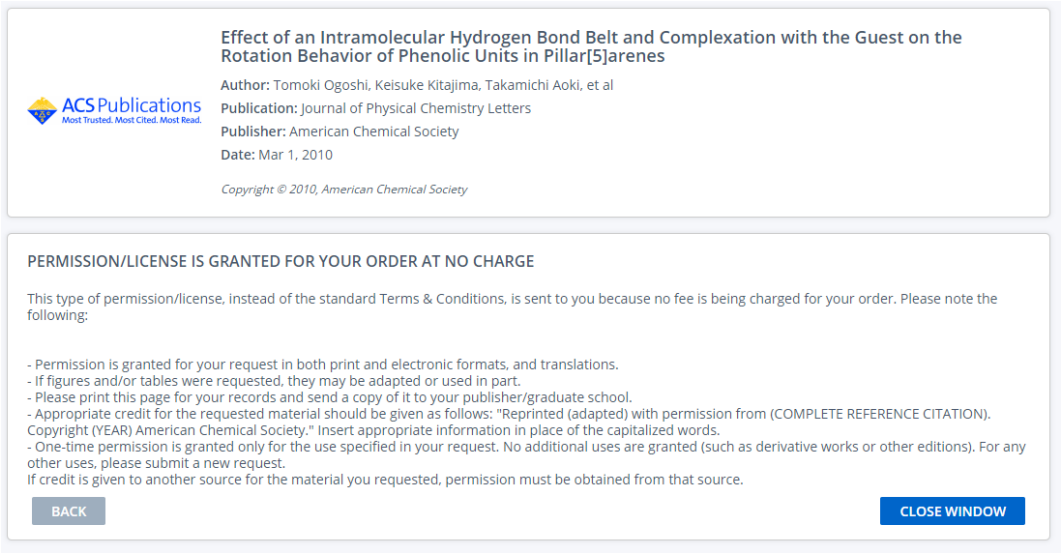
Title, description or numeric reference of the portion(s)	Schreme	Title of the article/chapter the portion is from	n/a
Editor of portion(s)	n/a	Author of portion(s)	Centre national de la recherche scientifique (France); Royal Society of Chemistry (Great Britain)
Volume of serial or monograph	n/a		
Page or page range of portion	7606	Issue, if republishing an article from a serial	N/A
		Publication date of portion	1987-01-01

Total Items: 1 **Total Due: 0,00 EUR**

Accepted: All Publisher and CCC Terms and Conditions

Capítulo 7: Formación de [2]rotaxanos entre P5TMA y diácidos lineales de diferente longitud de cadena.

1. Figura 1.



Effect of an Intramolecular Hydrogen Bond Belt and Complexation with the Guest on the Rotation Behavior of Phenolic Units in Pillar[5]arenes

Author: Tomoki Ogoshi, Keisuke Kitajima, Takamichi Aoki, et al
Publication: Journal of Physical Chemistry Letters
Publisher: American Chemical Society
Date: Mar 1, 2010

Copyright © 2010, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

2. Figura 2.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jan 23, 2020

This Agreement between 6 Unidade Street, Apt 3º Izq ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4754920324777
License date	Jan 23, 2020
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Angewandte Chemie International Edition
Licensed Content Title	A Half Adder Based on a Photochemically Driven [2] Rotaxane
Licensed Content Author	He Tian, Qiao-Chun Wang, Da-Hui Qu
Licensed Content Date	Aug 15, 2005
Licensed Content Volume	44
Licensed Content Issue	33
Licensed Content Pages	4
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic

Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	spanish
Title of your thesis / dissertation	Síntesis y caracterización de pilar[n]arenos y su uso como receptores moleculares
Expected completion date	Jul 2020
Expected size (number of pages)	1
Requestor Location	6 Unidade Street, Apt 3º Izq 6 Unidade Street, Apt 3º Izq Lugo, Spain 27004 Spain Attn: 6 Unidade Street, Apt 3º Izq
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with

which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding

("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.