

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**Departamento de Química**



**APLICACIÓN DE FENÓMENOS DE AUTO-ENSAMBLAJE Y ASOCIACIÓN  
SUPRAMOLECULAR CON CUCURBIT[n]URIL PARA EL DESARROLLO DE  
MATRICES DE SENSORES Y MATERIALES FUNCIONALES.**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Mireia Buaki Sogó**

Dirigida por:

**Dr. Hermenegildo García Gómez**

**Dra. Mercedes Álvaro Rodríguez**

Valencia, 2012



D. Hermenegildo García Gómez y D<sup>a</sup>. Mercedes Álvaro Rodríguez, Catedráticos de la Universidad Politécnica de Valencia, certifican que la tesis doctoral, titulada: **“Aplicación de fenómenos de auto-ensamblaje y asociación supramolecular con cucurbit[n]uril para el desarrollo de matrices de sensores y materiales funcionales”**, ha sido desarrollada por MIREIA BUAKI SOGÓ, bajo su dirección en el Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia.

D. Hermenegildo García Gómez.

D<sup>a</sup>. Mercedes Álvaro Rodríguez





*A mi familia*



## AGRADECIMIENTOS

Han pasado 5 años desde el comienzo de esta tesis y son muchas las personas que han contribuido, me han ayudado y apoyado durante todo este tiempo. A todos ellos me gustaría darles las gracias, porque hay momentos, en los que una palabra, un gesto...incluso una mirada me han servido para seguir adelante y conseguir alcanzar mi objetivo: "*mi tesis*".

Quiero dar las gracias a mis directores de tesis los profesores Hermenegildo García Gómez y Mercedes Álvaro Rodríguez por darme la oportunidad de unirme a su grupo de investigación y poner todos los medios y técnicas disponibles a mi alcance gracias a lo cual hemos podido desarrollar todo el trabajo cuyo resultado final es esta tesis. No es solo conocimiento, organización y disciplina en el trabajo lo que me habéis enseñado, en lo personal también he aprendido mucho.

Mis compañeros de laboratorio han sido una parte muy importante y especial durante esta etapa. Sergio Navalón, Roberto Martín, Maykel de Miguel y Amarajothi Dhakshinamoorthy "Moorthy". Muchas gracias a los cuatro, por cuidarme, ayudarme y enseñarme desde el primer día; gracias por los buenos ratos que hemos compartido; gracias por estar ahí en los menos buenos y gracias, muchas gracias por vuestra paciencia; Belén, a ti también me gustaría darte las gracias por tu apoyo y por estar siempre ahí, no ha hecho falta que dijeras nada para saber que podía contar contigo. David Sempere, Rafa Ballesteros, Herme y Roberto mis compis actuales de laboratorio; con vosotros también he pasado muy buenos ratos; cafés, camino al ITQ...donde está la otra parte del grupo: Raquel Juarez, mi gran amiga y compañera, gracias por tu ayuda siempre, sin condiciones; Canijo, por tu ayuda y por tu tiempo aún cuando no lo tenías; Pedro Atienzar, Marco ,Abde, Fran, Nacho, Marcos, Amparo, Ana y Xesc gracias por la ayuda que me habéis prestado cuando he estado en el ITQ.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio 2.2 con algunos he compartido muchos y grandes momentos en la sala de becarios: Raúl, Dani, Neus; con otros, momentos de ocio y cervecitas: Nacho, Inma Andreu, Carlos, Paula, Pavel; las chicas y chicos del laboratorio 2.6 (Andrea, Elena, Alessandro, Cristina, Estela, Carmen,...y todas las demás con las que he compartido muy buenos ratos tomando café cuando salía del gimnasio. No me quiero olvidar del resto de profesores de la segunda planta del departamento de química, especialmente Rosa Tormos, Sara Iborra, M<sup>a</sup> José Climent, Chelo Jiménez y Luis Villaescusa con quien también he compartido muchos cafés y horas de comida; Luis gracias por tus consejos y experiencia que me ha ayudado en los días menos buenos.

## AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que compartieron conmigo los inicios de esta tesis en el ITQ (Dr. Laurent Baumes, Isabel Millet, Isabel Minuesa, Dr. Angel Cantín, Carmen y Pablo) me gustaría darles las gracias por el trato amable y sincero que me dieron desde el primer día y especialmente a Laurent, darle las gracias por su paciencia y por lo bien que me ha tratado todos estos años.

También me gustaría dar las gracias a todo el personal técnico tanto del departamento como del ITQ; Loli, Manolo Adelantado, Enrique, Estrella, Rosa, Amparo y Maribel, Adelina...así como al personal del Servicio de Microscopia Electrónica de la UPV: Manolo, José Luis, Alicia y Merche...gracias a todos por lo bien que me habéis tratado.

También quiero dar las gracias a todos mis amigos, que han estado ahí para todo lo que he necesitado estos años y a Elena, con la que he compartido parte de mis mejores años, durante la carrera y ahora durante la tesis. Gracias también a mis tíos, Amparo y Vicente por esos jueves que me han hecho algunas semanas más llevaderas. Gracias a mis hermanas Montse y Amparo por estar siempre ahí, siempre que las he necesitado y para lo que las he necesitado, por escucharme, apoyarme y aconsejarme...gracias "*sus hermanas*", os quiero mucho.

Hay una persona muy especial a la que también tengo mucho que agradecerle. Sergio, ha estado conmigo siempre, desde que empecé Ingeniería Química hasta ahora, que llega el momento de dar un paso más. Gracias por todo; por tu cariño, por tu apoyo, tu paciencia, tus consejos, por cuidarme cuando lo he necesitado...hemos compartido mucho juntos y espero seguir compartiendo muchos más momentos como este contigo.

Gracias a mis padres Nati y Alfredo, es mucho lo que tengo que agradecerlos y reconocerlos, porque nada de esto hubiera sido posible sin vuestro esfuerzo durante todos estos años para darnos la educación que nos habéis dado; os habéis tenido que superar y trabajar muy duro para llegar donde habéis llegado y conseguir ser lo que sois ahora: excelentes personas, con grandes valores que me habéis inculcado y a las que me gustaría parecerme en muchísimos aspectos de la vida. Gracias por vuestro apoyo, por vuestros consejos y sobre todo gracias por creer en mí; sois y seréis muy importantes para mí y nada me haría más feliz que saber que os sentís orgullosos y espero haberlo logrado.

Gracias a todos, de corazón.

# ÍNDICE GENERAL

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Química Supramolecular en agua	13
1.1.1. Interacciones Intermoleculares	15
1.1.2. Sistemas Hospedador-Huésped	18
1.2. Cucurbit[n]uril	20
1.2.1. Formación de complejos entre CBs y acetanilidas sustituidas	32
1.2.2. Formación de complejos huésped-hospedador entre CBs y colorantes tricíclicos básicos	34
1.2.3. Matriz de Sensores	41
1.3. Auto-ensamblaje y organización molecular	44
1.3.1. Auto-ensamblaje de compuestos anfifílicos bipodales.	47
1.4. Alginato natural como agente plantilla en la formación de nanopartículas de dióxido de titanio	53
1.5. Referencias	57

## CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1. Objetivos	63
----------------	----

## CAPÍTULO 3: SENSORES COLORIMÉTRICOS BASADOS EN SERIES DE COLORANTES Y SUS COMPLEJOS Y ENCAPSULACIÓN CON CICLODEXTRINAS Y CUCURBIT[n]URILES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SALES DE AMONIO Y AMINOÁCIDOS.

3.1. Introducción	67
3.2. Resultados y Discusión	74
3.2.1. Matriz de sensores colorimétricos para detección de sales de amonio cuaternario (SAC)	75
3.2.2. Matriz de sensores colorimétricos para la detección de $\alpha$ -aminoácidos.	80
3.3. Conclusiones	90
3.4. Referencias	90

## CAPÍTULO 4: MATRIZ DE SENSORES COLORIMÉTRICOS PARA LA DETECCIÓN DEL ÁCIDO $\gamma$ -HIDROXIBUTÍRICO.

4.1. Introducción	95
4.2. Resultados y Discusión	99

4.2.1. Metodología	99
4.2.2. La matriz de sensores	100
4.2.3. Experimentos	103
4.2.4. Mecanismo de reconocimiento	108
4.3. Conclusiones	112
4.4. Referencias	112

## **CAPÍTULO 5: COMPLEJOS SUPRAMOLECULARES ENTRE CUCURBITURILES Y ACETANILIDAS DERIVADAS DE LA ANILINA Y DE LA ORTO Y PARA FENILENDIAMINA.**

5.1. Introducción	115
5.2. Resultados	116
5.2.1. Estudio de los complejos de inclusión entre las acetanilidas <b>12</b> , <b>13</b> y <b>14</b> y los CBs.	118
5.2.2. Formación de complejos de inclusión con CB[n] en fase solida.	124
5.3. Conclusiones	134
5.4. Referencias	135

## **CAPÍTULO 6: FORMACIÓN DE LIPOSOMAS POR POLIMERIZACIÓN DE LÍQUIDOS IÓNICOS CON ESTRUCTURA DE IMIDAZOLIO Y SU USO COMO MICROREACTORES EN LA OXIDACIÓN DE ALCOHOLES CATALIZADA POR NANOPARTICULAS DE ORO**

6.1. Introducción	137
6.2 Resultados y Discusión	140
6.2.1 Síntesis y caracterización de liposomas polimericos	140
6.2.2. Formación de nanopartículas de oro en el interior de vesículas poliméricas	149
6.2.3. Actividad catalítica de las muestras <b>Au-P21</b> en la oxidación aeróbica del 2-hidroxibencil alcohol	155
6.3. Conclusiones	157
6.4. Referencias	157

## **CAPÍTULO 7: INFLUENCIA DEL AUTO-ENSAMBLAJE DE LÍQUIDOS IÓNICOS ANFIFÍLICOS CON ESTRUCTURA DE IMIDAZOLIO EN LOS COMPLEJOS SUPRAMOLECULARES DE ESTOS COMPUESTOS CON CUCURBIT[n]URILES.**

7.1. Introducción	161
7.2 Resultados y Discusión	163

7.2.1 Formación de complejos huésped-hospedador de líquidos iónicos con CB[7] y CB[8]	163
7.2.2 Auto-ensamblaje de los complejos huésped-hospedador imidazolio@CB[n]	169
7.3. Conclusiones	176
7.4. Referencias	177

## **CAPÍTULO 8: ÁCIDO ALGÍNICO COMO AGENTE PLANTILLA EN LA PREPARACIÓN DE ÓXIDOS DE TITANIO CON ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA.**

8.1. Introducción	179
8.2. Resultados y Discusión	182
8.2.1. Estudio de la actividad fotocatalítica de las muestras Au/TiO <sub>2</sub> para la generación de hidrogeno a partir del agua	192
8.3. Conclusiones	195
8.4. Referencias	195

## **CAPÍTULO 9: TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

9.1. Técnicas de Caracterización	197
9.1.1 Análisis químicos	197
9.1.2 Difracción de Rayos-X (DRX)	197
9.1.3 Espectroscopía ultravioleta-visible-infrarrojo cercano de reflectancia difusa	197
9.1.4 Espectroscopía IR	198
9.1.5 Espectroscopía Raman	198
9.1.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	199
9.1.7 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).	199
9.1.8 Espectroscopía de RMN- <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C.	199
9.1.10 Medidas de fluorescencia.	200
9.1.11. Fluorescencia de rayos X	201
9.1.12. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).	201
9.1.13. Analisis termogravimétrico e isotermas de adsorción de N <sub>2</sub> .	201
9.1.14. Conductimetría	202
9.1.15. MALDI-MS y ESI-MS	202
9.2. Procedimientos experimentales generales	203
9.2.1. Preparación de las matrices de sensores	203
9.2.2. Ensayos RMN- <sup>1</sup> H	205
9.2.3. Conductimetría	205
9.2.4. Diálisis	207

9.2.5. Valoraciones UV-Vis	207
9.2.6. Valoraciones por fluorescencia	208
9.2.7. Adsorción de CB[n] sobre sílice	209
9.2.8. Ensayos MALDI-MS	210
9.3. Síntesis y procedimientos para la preparación de materiales funcionales	212
9.3.1. Síntesis del GHB (1).	212
9.3.2. Síntesis de la cloroacetamida de la anilina (8)	213
9.3.3. Síntesis de las bis(2-cloroacetamidas) de la orto- y para-fenilendiamina (9) y (10)	214
9.3.4. Síntesis de N-fenil-2-(propilamino)acetamida (12)	215
9.3.5. Síntesis de bis-2-(propilamino)acetamida de la orto-fenilendiamina (13)	216
9.3.6. Síntesis de bis-2-(propilamino)acetamida de la para-fenilendiamina (14)	217
9.3.7. Funcionalización de la aminopropil sílice comercial (sólidos 16, 17 y 18)	218
9.3.8. Síntesis de N,N'-bis(10-undecenil)-2-metilimidazolio (21)	218
9.3.9. Síntesis de N,N'-bis(10-undecenil)-imidazolio (26)	219
9.3.10. Procedimiento general para la polimerización térmica de liposomas	220
9.3.11. Procedimiento general para la polimerización fotoquímica de liposomas	221
9.3.12. Polimerización de los complejos entre los líquidos iónicos 21 y 26 y CB[7] y CB[8].	222
9.3.13. Síntesis del fotocatalizador de TiO <sub>2</sub> (28) Au/TiO <sub>2</sub> (29) usando alginato como agente plantilla	222
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>225</b>
<b>RESÚMENES</b>	<b>227</b>
<b>SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</b>	<b>233</b>
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>235</b>



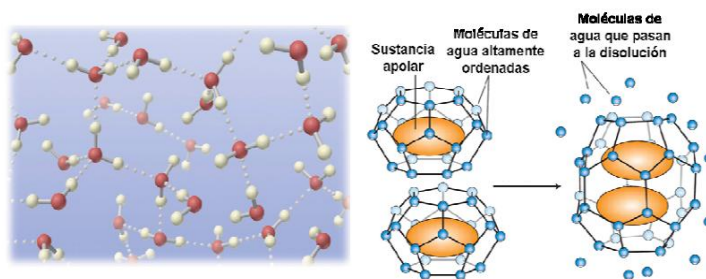
## **CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN**

---

### **1.1. Química Supramolecular en agua**

Un gran número de los receptores sintéticos descritos a lo largo de la historia han sido estudiados en disolventes orgánicos. Este hecho entra en contradicción con que todos los eventos de reconocimiento molecular en la Naturaleza tengan lugar en medio acuoso. El agua proporciona el ambiente para la vida ya que media, regula y controla muchos procesos naturales.<sup>1-3</sup> Por tanto, uno de los principales objetivos de la Química Supramolecular es la creación de receptores sintéticos que tengan tanto gran afinidad como alta selectividad para la unión de huéspedes en agua al igual que lo hacen receptores naturales como las enzimas y los anticuerpos. Este tipo de biomoléculas muestra una complejación hospedador-huésped fuerte y selectiva a través de múltiples interacciones no covalentes débiles en medio acuoso. En contraste con los sistemas biológicos, el número de familias de hospedadores sintéticos que presentan el rango de afinidades ( $K_B > 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), selectividades o actividades catalíticas de las biomoléculas, en disolución acuosa, está limitado a ciertos ciclofanos y receptores auto-ensamblados.

Las moléculas de agua forman una red dinámica infinita de puentes de hidrógeno con agregaciones localizadas y estructuradas, proceso tan favorable que causa el hecho de que las moléculas apolares y el agua se eviten las unas a las otras (Figura 1). Por otro lado, las moléculas polares experimentan una fuerte hidratación por las moléculas de agua y participan en dicha estructura de puentes de hidrógeno. Estas propiedades del disolvente son importantes en la determinación de la fuerza de la complejación hospedador-huésped: la unión es más fuerte en disolventes polares que poseen baja polarizabilidad molecular y altos factores de cohesión ya que interaccionan más fuertemente con las propias moléculas de disolvente que con las superficies apolares de las moléculas hospedadora y huésped. Así, el agua es el mejor disolvente para la unión de moléculas apolares entre sí.



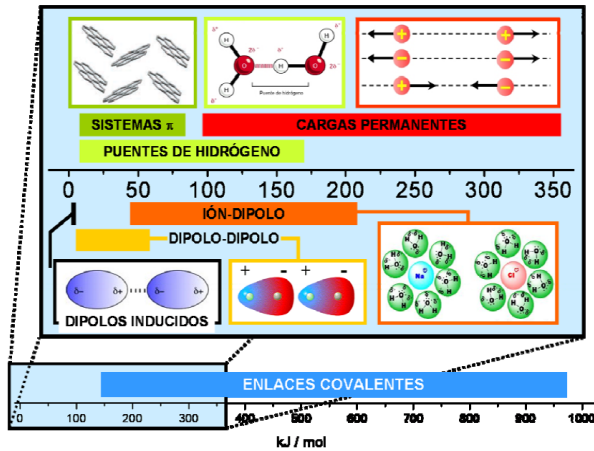
**Figura 1.1.** Estructura de puentes de hidrógeno creada por las moléculas de agua en la que deben situarse moléculas con un mayor carácter apolar, situación energéticamente desfavorable que se minimiza interaccionando entre sí, liberando las moléculas de agua que las solvatan.

Existe una tendencia en química a usar el agua cada vez más como medio de reacción porque es un disolvente barato y “verde” ya que su uso tiene un impacto medioambiental menos negativo que otros disolventes; por esta razón, la Química Supramolecular en medio acuoso presenta dos desafíos principales: cómo ganar mayor solubilidad en agua y cómo evitar, minimizar o explotar la fuerte interacción de agua en procesos no covalentes.<sup>4-6</sup> Así, el diseño de receptores sintéticos que puedan ser utilizados en agua busca, en primer lugar, que el hospedador sea hidrosoluble, lo cual limita severamente el tipo de unidades estructurales constitutivas que pueden ser utilizados para su construcción; además, deben elegirse aproximaciones e interacciones especiales que permitan superar la influencia competitiva del agua. Otra propiedad importante que deberían cumplir los receptores solubles en agua es la posibilidad de encapsulación de varios huéspedes diferentes, lo cual permitiría estudiar las interacciones moleculares en espacios confinados en el interior de una caja y desarrollar reacciones químicas entre ellos en medio acuoso. Es posible anticipar que la cavidad favorezca la catálisis, dirigiendo la síntesis y protegiendo la reacción del agua.

### **1.1.1. Interacciones Intermoleculares**

La Química Supramolecular se focaliza en interacciones entre moléculas más que dentro de las moléculas y en el estudio de los enlaces intermoleculares más que los enlaces covalentes. Esta química no está limitada a sistemas parecidos a los encontrados en Biología, sino que es libre de crear especies desconocidas e inventar procesos novedosos. Las supramoléculas pueden incluso encontrar sus aplicaciones en condiciones diferentes a las naturales; por ejemplo, pueden ser aplicadas temperaturas más altas o más bajas o incluso el uso de disolventes orgánicos, condiciones en las que las biomoléculas podrían mantener su integridad y funcionalidad aunque estén diseñadas para un ambiente acuoso y condiciones ambientales.

Gran número de estos sistemas supramoleculares se mantienen unidos por interacciones intermoleculares donde la reversibilidad es la característica clave. Pero la reversibilidad no es sólo una consecuencia de interacciones más lábiles cuando se compara con los enlaces covalentes, sino que es esencial para la función y formación de ensamblajes más grandes; uniones más estrechas e irreversibles llevarían al secuestro y no al transporte. Por tanto, las fuerzas involucradas en el reconocimiento y complejación de moléculas son interacciones intermoleculares no covalentes, algunas de las cuales son bien conocidas como los puentes de hidrógeno o las interacciones entre iones, pero la visión no es tan clara para interacciones más débiles y peor definidas como las interacciones dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, apilamiento  $\pi$ - $\pi$ , y efectos hidrofóbicos o solvofóbicos en general. En términos energéticos, las interacciones no covalentes son generalmente varios órdenes de magnitud más débiles que los enlaces covalentes; así, estos enlaces no covalentes van desde los enlaces coordinativos con una fuerza de varios cientos de  $\text{kJ mol}^{-1}$  a las interacciones débiles de van der Waals representan sólo unos pocos  $\text{kJ mol}^{-1}$ , tal como se puede observar en la Figura 2.



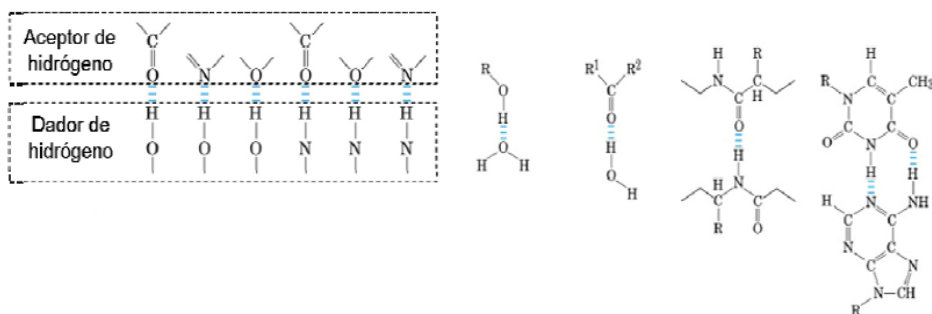
**Figura 1.2.** Diagrama de energías de las diferentes fuerzas de unión entre átomos y moléculas.

Las interacciones atractivas o repulsivas se encuentran cuando dos cargas interactúan tanto con polaridades opuestas o con la misma polaridad y juegan un papel central en la asociación molecular que ocurre en fenómenos biológicos como, por ejemplo, en el caso de proteínas y ácidos nucleicos. Las interacciones ión-ión son más fuertes, con energías de enlace en el rango de aproximadamente 100 - 350  $\text{kJ mol}^{-1}$ .

Las interacciones entre iones y dipolos son más débiles (50 - 200  $\text{kJ mol}^{-1}$ ). Aquí, la orientación del dipolo con respecto a la carga sí es importante. Incluso más débiles que las fuerzas ión-dipolo son las interacciones entre dos dipolos (5 - 50  $\text{kJ mol}^{-1}$ ). Otra vez, la orientación relativa de los dos dipolos interaccionantes juega un papel importante. La estabilidad de los complejos a través de interacciones de partículas cargadas es debida en mayor medida a la inducción de dipolos en nubes electrónicas fácilmente polarizables.

Se han utilizado muchas interacciones no covalentes diferentes por los químicos supramoleculares para la producción de agregados oligomoleculares discretos, pero debido a la facilidad de su diseño no es de extrañar que el enlace por Puentes de Hidrógeno haya estado entre los más empleados en la construcción de entidades supramoleculares bien definidas.<sup>7</sup> El enlace por puentes de hidrógeno surge de la suma de, al menos, tres

contribuciones: electrostática, dispersiva y de transferencia de carga, aunque la importancia de cada contribución depende de la naturaleza precisa del sistema involucrado. Debemos distinguir entre enlaces de hidrógeno fuertes, con energía de unión en el rango de 60 - 120 kJ mol<sup>-1</sup> y distancias heteroatómicas entre 2.2 - 2.5 Å, enlaces de hidrógeno moderados (15 - 60 kJ mol<sup>-1</sup> y 2.5 - 3.2 Å) y enlaces de hidrógeno débiles, con energías de enlace por debajo de los 15 kJ mol<sup>-1</sup> y distancias largas donador-aceptor por encima de 4 Å.<sup>8</sup> Esta clasificación corresponde al hecho de que los enlaces de hidrógeno fuertes tienen una contribución covalente mayor, mientras las moderadas y débiles son principalmente de naturaleza electrostática.



**Figura 1.3.** Ejemplos representativos de las interacciones por puentes de hidrógeno que se establecen entre diferentes grupos dadores y aceptores, así como entre diferentes moléculas típicas presentes en los sistemas naturales.

Aunque la naturaleza exacta de estas interacciones es todavía materia de debate, la transferencia de carga en sistemas  $\pi$  es una clase importante de interacciones no covalentes<sup>9</sup> que derivan de la suma de factores electrostáticos, dipolos inducidos y contribuciones dispersivas, por lo que no son tan diferentes de las interacciones simples como puentes de hidrógeno, pero son complicadas por el hecho de que implican grandes grupos funcionales. La mayor diferencia entre la transferencia de carga y los puentes de hidrógeno es que el área superficial de los contactos intermoleculares en la transferencia de carga es grande, de forma que las interacciones de van der Waals y la desolvatación son

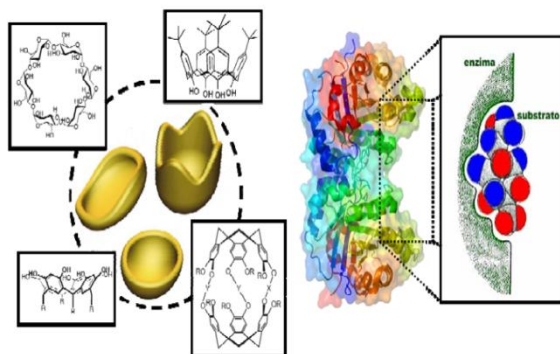
mucho más importantes: como las superficies electrónicas  $\pi$  planas de las moléculas aromáticas son no polares, las fuerzas solvofóbicas favorecen el apilamiento.

Por último, las fuerzas de van der Waals ( $<5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) son otro tipo de interacciones no covalentes y que se pueden considerar derivadas de la interacción de una nube electrónica polarizada por núcleos adyacentes.

### **1.1.2. Sistemas Hospedador-Huésped**

Donald Cram acuñó en 1970 el término Química Hospedador-Huésped,<sup>10</sup> “*Host-guest Chemistry*” en inglés, para designar las dos moléculas involucradas en un evento general de asociación molecular, de forma análoga a los conceptos de receptor y sustrato biológicos establecidos por Paul Ehrlich,<sup>11,12</sup> los receptores moleculares son definidos como estructuras orgánicas sintéticas capaces de unir selectivamente iones o sustratos moleculares mediante diferentes interacciones intermoleculares, proporcionando un ensamblado de dos o más especies.<sup>4,13-19</sup>

Es deseable que el receptor y el sustrato entren en contacto a través de una gran área, lo cual ocurre cuando el receptor es capaz de envolver su sustrato de forma que establece numerosas interacciones no covalentes y reconoce su tamaño, forma y arquitectura molecular. Éste es el caso de moléculas receptoras que contienen una cavidad intramolecular en la cual puede encajar el sustrato, proporcionando así un complejo de inclusión. En tales receptores cóncavos, la cavidad está ocupada con sitios de unión convergentemente dirigidos hacia las especies unidas, por lo que son denominados *endorreceptores* (Figura 1.4).<sup>20</sup> Así, es normal identificar la molécula que presenta el aspecto más cóncavo como el hospedador y la molécula que presenta la superficie convexa como el huésped. Estas uniones sustrato-receptor suelen ser representadas por el símbolo “@”. Pueden encontrarse analogías entre los sistemas *huésped@hospedador* con sistemas biológicos que definen los sitios activos de las enzimas donde un sustrato pequeño se une dentro de la cavidad de una proteína (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Esquema y estructuras de endorreceptores sintéticos típicos como ciclodextrinas, y calixarenos junto con un ejemplo del sitio activo definido por las cadenas polipeptídicas de un enzima donde se encaja el sustrato de forma complementaria.

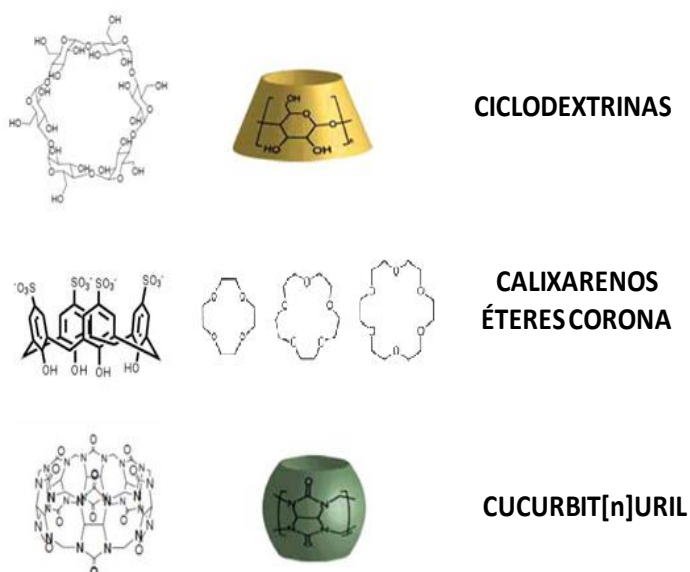
Desde el punto de vista opuesto, podría hacerse uso de una superficie externa con protuberancias y depresiones, más que una cavidad interna, como sitio de unión del sustrato. Esto podría resultar en el paso de una química convergente a una divergente y de *endo-* a *exorreceptores*.<sup>20-23</sup> Las uniones receptor-sustrato entonces ocurren por interacción superficie-superficie, lo cual puede ser denominado fijación y simbolizada por //, o por el símbolo matemático de intersección  $\cap$  si hay interconexión notable de las superficies.

La Química Hospedador-Huésped puede ser considerada como una rama de la Química Supramolecular enfocada al desarrollo y estudio de los hospedadores sintéticos que sean capaces de unir iones o moléculas huésped, mientras que la Química de Receptores, la química de las moléculas receptoras artificiales, representa la generalización de la Química de Coordinación pero se extiende a todo tipo de sustratos: catiónicos, aniónicos o especies neutras de naturaleza orgánica, inorgánica o biológica.

Las estructuras macropolíclicas reúnen los requisitos para el diseño de receptores artificiales: son estructuras grandes (macro) que contienen cavidades y hendiduras del tamaño y forma apropiadas, con numerosos brazos, puentes y conexiones (policíclicos) que permiten la construcción de una arquitectura dotada con las características dinámicas

deseadas y que permiten la disposición de grupos estructurales, sitios de unión y funciones reactivas.

Entre este tipo de receptores macrocíclicos se encuentran las ciclodextrinas (CDs), calixarenos y cucurbit[n]uriles (CBs), entre otros. Estos últimos son los macrociclos objeto de estudio en la presente tesis.



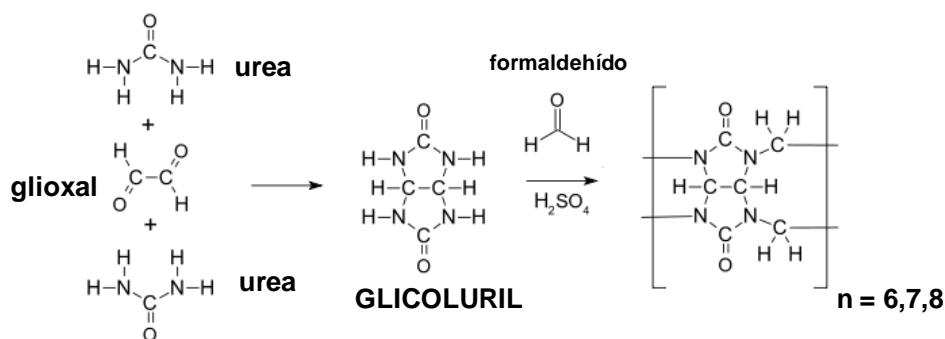
**Figura 1.5.** Algunos receptores macrocíclicos más comunes en Química Supramolecular

## 1.2. Cucurbit[n]uril

Revisando los motivos estructurales utilizados para preparar receptores sintéticos podemos llegar a la conclusión de que son los átomos de oxígeno los que preferentemente se utilizan como centros de unión a los sustratos en tales agentes complejantes macro(poli)cíclicos. De todos ellos, los oxígenos de las unidades urea cíclica son mejores ligandos que los oxígenos



del anisól o los éteres ya que los oxígenos carbonílicos son buenos formadores de puentes de hidrógeno y se pueden establecer interacciones electrostáticas.<sup>24</sup> De hecho, la propia naturaleza utiliza este motivo estructural en uno de los complejos biológicos más fuertes descritos, el complejo Avidina-Biotina, caracterizado por una constante de afinidad de aproximadamente  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ . Este paradigma de las interacciones moleculares de tan alta afinidad ha llevado a muchos investigadores a sintetizar receptores artificiales que contengan dichas unidades de reconocimiento en su estructura macrocíclica combinando la habilidad organizadora de los grupos hidroxilo y el poder ligante de las ureas.



**Esquema 1.1.** Procedimiento de preparación de los CBs a partir de la codensación del glioxal y la urea para dar la unidad monomérica de los CBs, glicoluril.

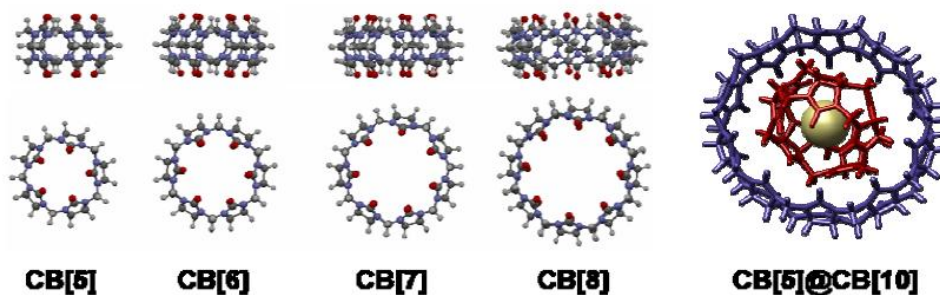
En 1905, R. Behrend y colaboradores prepararon un nuevo material mediante la condensación en medio ácido de formaldehído y glicoluril (tetrahidroimidazo[4,5-d]imidazol-2,5(1H,3H)diona), preparado previamente por condensación de glioxal y urea, obteniendo un precipitado blanco cristalino que fueron incapaces de caracterizar, aunque reconocieron su alta estabilidad en diferentes disolventes y su capacidad de formar compuestos de co-cristalización con sales inorgánicas del tipo  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{CrO}_3$  y  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ .<sup>25</sup> No fue hasta 1981 cuando Freeman, Mock y colaboradores retomaron el estudio de este material que caracterizaron mediante análisis elemental, IR, RMN y difracción de rayos X, gracias a lo cual propusieron una estructura macropolicíclica relativamente rígida constituida por un hexámero de unidades glicoluril unidas por puentes metileno que

definen una cavidad totalmente simétrica (D6h) en su interior, tal como se esquematiza en la Figura 1.6; la geometría de esta nueva cápsula orgánica es debida a que la molécula de glicoluril no es plana, sino que se encuentra curvada alrededor del enlace C-C central, forzando a los grupos carbonilo a orientarse hacia el interior de los portales.

Según las normas de la IUPAC, esta nueva estructura macrocíclica debería denominarse:

*Dodecahidro-1H,4H,14H,17H-2,16:3,15-dimetano-5H,6H,7H,8H,9H,10H,11H,12H, 13H,18H,19H,20H,21H,22H,23H,24H,25H,26H-2,3,4a,5a,6a,7a,8a,9a,10a,11a, 12a,13a,15,16,17a,18a,19a,20a,21a,22a,23a,24a,25a,26atetracosaaazabispentaleno[ 1'',6'':5'',6'',7'']cicloocta[1'',2'',3'':3',4'] pentaleno(1',6':5,6,7)cicloocta(1,2,3-gh:1',2',3',- g'h') cicloocta(1,2,3-cd:5,6,7-c'd')dipentalen-1,4,6,8,10,12,14,17,19,21,23,25-dodecano*

pero estos autores propusieron el nombre trivial de cucurbituril (CB[n]) debido, por un lado, a que la forma de este hospedador recuerda el de una calabaza, el miembro más conocido de la familia botánica de las cucurbitáceas, y por otro a la unidad monomérica que lo constituye, el glicoluril.<sup>25-28</sup>

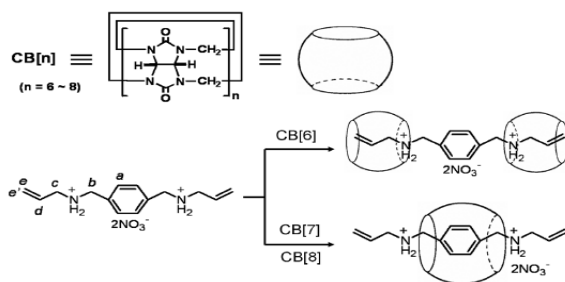


**Figura 1.6.** Modelos moleculares de la familia de hospedadores denominada cucurbit[n]uriles (CB[n]).

A partir del descubrimiento de este nuevo macrociclo sintético estructuralmente rígido, con una cavidad con espacio suficiente como para acomodar una gran variedad de moléculas en

su interior, se despertó un gran interés por conocer sus propiedades complejantes; numerosos estudios han demostrado la alta afinidad, selectividad e interacción que presentaba esta nueva estructura sintética por especies catiónicas, especialmente iones inorgánicos alcalinos, alcalinotérreos, metálicos y lantánidos;<sup>29-32</sup> además se estudió la complejación de diferentes familias de compuestos orgánicos tales como alcoholes, dioles y polioles,<sup>33-36</sup> ácidos carboxílicos y dicarboxílicos,<sup>33,36</sup> nitrilos,<sup>33</sup> aminas y diaminas,<sup>37-39</sup> aminoalcoholes y aminoácidos<sup>40</sup> e incluso dipéptidos y polipéptidos cortos,<sup>41-43</sup> así como surfactantes no iónicos,<sup>36</sup> aunque se comprobó que las sales de amonio de  $\alpha,\omega$ -diaminoalcanos protonados presentaban los valores más altos de la constante de unión, de forma que las cadenas de metilenos hidrofóbicas de los huéspedes se acomodan en la cavidad del hospedador.<sup>26,27,44-46</sup>

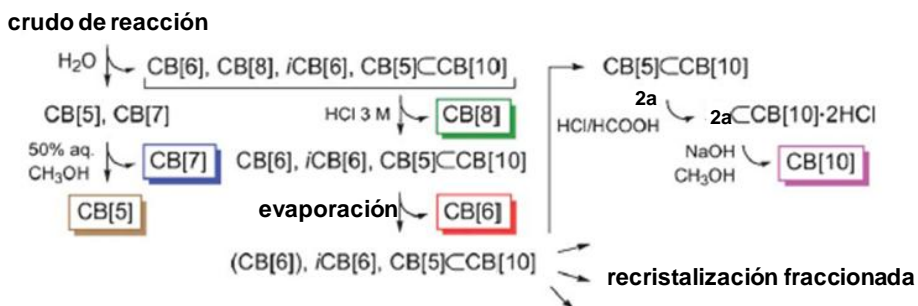
Análisis de las afinidades y selectividades presentadas por decenas de complejos entre diferentes huéspedes con CDs y CBs llevaron a la conclusión de que este nuevo macrociclo unía con mayor afinidad y selectividad sus huéspedes de lo que lo hacen las ciclodextrinas; de hecho, el valor medio de la afinidad de más de mil complejos con CDs ( $K_B = 10^{2.5 \pm 1.1} M^{-1}$ ) es un orden de magnitud inferior al correspondiente obtenido para el caso de los complejos estudiados por Mock, con un valor promedio de constante de unión de  $10^{3.8 \pm 1.5} M^{-1}$ . Estos estudios ilustraron que la capacidad de asociación del CB[n] superaba las encontradas por otras moléculas hospedadoras tan conocidas como las CDs; de esta forma, varios grupos de investigación explotaron las propiedades complejantes únicas de esta cápsula orgánica principalmente en la eliminación de colorantes y metales presentes en aguas de residuos textiles, como microrreactor en catálisis y, sobre todo, el diseño de polirrotaxanos en una, dos y tres dimensiones.<sup>47-54</sup>



**Figura 1.7.** Ejemplo de uso del CB[n] en la construcción de un pseudo-rotaxano.

A pesar de ello, el desarrollo de la química del cucurbituril fue lento debido principalmente a su baja solubilidad en disolventes de uso común, ( $2\text{-}3 \times 10^{-5}$  M en agua), siendo soluble sólo en presencia de sales de metales alcalinos o en disoluciones acuosas fuertemente ácidas, de ahí que la mayoría de sus estudios fueran realizados en una mezcla 1:1 agua:ácido fórmico. Además, los investigadores en este campo advirtieron que, en contraste con el hecho de que existen diferentes homólogos de otro tipo de macrociclos como ciclodextrinas o calixarenos, no estaban disponibles congéneres de mayor o menor número de unidades glicoluril.

Después de numerosos intentos fallidos durante varios años, no fue hasta unos veinte años después del descubrimiento del cucurbituril, en 2000, cuando se consiguió finalmente la síntesis, aislamiento y caracterización completa de homólogos que contienen diferente número de unidades glicoluril; la reacción de condensación llevada a cabo en condiciones más suaves y controladas cinéticamente dio lugar a una mezcla que contenía una familia de homólogos de CB que van desde el pentámero al octámero, cada uno en una proporción diferente, que pueden ser obtenidos en forma pura mediante su separación por cristalización fraccionada.



### 2a: derivado de melamina

**Esquema 1.2.** Procedimiento de separación de la mezcla de CB[n] obtenida tras la síntesis en condiciones más suaves.

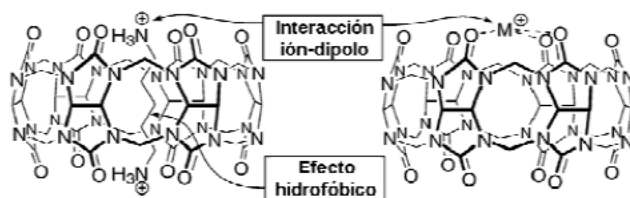
Desde ese momento, en la literatura se introdujo la denominación de cucurbit[n]uriles para designar a la familia completa de oligómeros cíclicos con diferente número (n) de unidades glicoluril unidas por puentes metileno, cuya abreviación más ampliamente utilizada en la bibliografía es CB[n], aunque también aparecen como Qn.<sup>55,56</sup> Sólo un par de años después, Day y colaboradores detectaron por espectroscopía RMN la presencia del oligómero con nueve unidades de glicoluril (CB[9]), aunque no fue posible su aislamiento, y el complejo de inclusión CB[5]@CB[10], donde el homólogo con diez unidades glicoluril retenía atrapado en su cavidad interna al miembro más pequeño de esta familia de cápsulas orgánicas, formando lo que se denomina un Giroscano, aunque fueron incapaces de obtener de forma aislada la cápsula de CB[10], resultado satisfactorio que consiguió el grupo del profesor Isaacs en 2005.<sup>57,58</sup>

Independientemente del número de unidades glicoluril, las características estructurales que poseen los cucurbit[n]uriles son las que establecen su comportamiento excepcional en procesos de complejación hospedador-huésped. En principio, la disposición altamente rígida de sus unidades constitutivas y la yuxtaposición cercana de las dos regiones de unión hacen que los procesos de reconocimiento molecular sean altamente selectivos<sup>59</sup> ya que,

cuando un ligando es más rígido, la selectividad de tamaño y los efectos de ajuste de tamaño son dominantes.<sup>60,61</sup>

Por otro lado, sus dos portales, definidos por grupos carbonilo, flanquean las estrechas entradas a la propia cavidad hidrofóbica de los CB[n]<sup>25,26,45,59</sup> lo cual resulta en una unión que produce barreras estéricas significativas para la asociación y disociación de los huéspedes, manifestándose en cinéticas lentas de intercambio de ligandos según se ha comprobado por RMN.<sup>27,28,45</sup>

Los grupos funcionales carbonilo que definen las entradas a la cavidad hacen que los efectos electrostáticos jueguen un papel crucial en los eventos de reconocimiento molecular para estas cápsulas.<sup>59</sup> Si comparamos con otras familias de hospedadores sintéticos o de origen natural como las CDs, donde las entradas a la cavidad se encuentran rodeadas por grupos hidroxilo que contribuyen a la unión del huésped principalmente a través de puentes de hidrógeno, los grupos carbonilo ureido polares en los portales de los CB[n] permiten que se establezcan interacciones carga dipolo<sup>27,45,62,63</sup> así como puentes de hidrógeno<sup>64,65</sup> con el huésped, al igual que coordinación a iones metálicos.<sup>66-68</sup>



**Figura 1.8.** Interacciones principales en los complejos con CB[n]

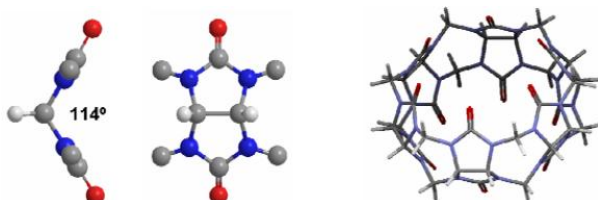
Por tanto, varias interacciones intermoleculares promueven la unión de los huéspedes con los CB[n]: igual que en el caso de las ciclodextrinas, se aplica el efecto hidrofóbico<sup>26,27</sup> que deriva de varias contribuciones entre las que cabe destacar la eliminación de moléculas con alto contenido entrópico una vez se incluyen los residuos orgánicos no polares y las diferentes interacciones de dispersión en el interior de la cavidad y en el agua. Además las interacciones ión-dipolo de los cationes metálicos o los iones amonio orgánicos con alguno

o ambos de los dos anillos carbonilos ureido que flanquean la cavidad contribuyen a la asociación intermolecular<sup>27,45,62,63</sup>, mientras que las interacciones por puentes de hidrógeno aparecen menos frecuentemente.<sup>64</sup>

Los principios y aplicaciones de la química de los diferentes CB[n] se encuentran ampliamente documentados de forma que, en general, muchas de las tendencias observadas en los procesos de complejación en el comportamiento de CB[6] pueden ser extrapoladas al resto de CB[n] en función del tamaño de la cavidad.<sup>69-71</sup> La variación del tamaño de su cavidad y portales llevan a propiedades marcadamente diferentes de las encontradas en CB[6], determinando unas altas afinidades y selectividades inusuales en procesos de reconocimiento en agua. El homólogo más pequeño (CB[5]) se puede unir a especies pequeñas tales como  $\text{NH}_4^+$  o gases del tipo  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$  o Ar en la entrada a su cavidad; este macrociclo compleja  $\text{Pb}^{2+}$  en agua con una gran selectividad sobre otros cationes alcalinos, alcalinotérreos, amonio o  $\text{Cd}^{2+}$ .<sup>72</sup> Por su parte, la cavidad más grande de CB[7] implica que se puedan formar complejos 1:1 con innumerables compuestos orgánicos, principalmente funcionalizados con grupos amino, amonio o piridinio como la adamantamina<sup>73</sup> o los dicationes viológeno<sup>69,74-77</sup>, aunque también han sido encapsulados complejos metálicos<sup>78</sup> y moléculas organometálicas como el o-carborano<sup>79</sup> o los metalocenos<sup>77,80,81</sup> de Ti, Mo, Fe y Co e incluso estructuras tan importantes como el fullereno  $\text{C}_{60}$ .<sup>82-86</sup> Por último, como la cavidad de CB[8] es similar a la de la  $\gamma$ -CD, resulta lo suficientemente grande como para incluir dos moléculas idénticas, formando complejos de estequiometría 1:2<sup>74,87,88</sup>, o bien dos moléculas de huéspedes diferentes para dar un complejo 1:1:1,<sup>89</sup> En este último caso la fuerza que dirige la asociación es el aumento marcado de la interacción por transferencia de carga entre las moléculas de huésped electrodeficiente y rica en electrones en el interior de la cavidad hidrofóbica. El CB[8] es también capaz de incorporar en su cavidad otros macrociclos<sup>90</sup> como ciclen, ciclám (ver estructura en esquema 1.3) e incluso sus complejos con metales de transición.

Además de su disponibilidad comercial en cuatro tamaños diferentes, la alta estabilidad estructural, interacción con alta afinidad, alta selectividad de unión, forma y disposición de

los grupos funcionales, asociación y disociación con cinéticas controladas y control de los procesos de reconocimiento molecular por estímulos electro- o fotoquímicos apropiados son las principales características de la química de los CB[n].<sup>55</sup> De esta forma, la principal razón que explica el interés en la aplicación de los cucurbit[n]uriles es su habilidad de encapsular reversiblemente una molécula huésped manipulando las condiciones experimentales en las que ocurre la complejación y la descomplejación. Esto hace que los CB[n] sean complementarios con las ciclodextrinas como plataforma de elección en aplicaciones de escala industrial.



**Figura 1.9.** Estructura molecular del cucurbituril (CB[n]) así como su unidad monomérica, denominada glicoluril, donde puede apreciarse su disposición espacial curvada, la cual confiere al CB[n] su peculiar geometría.

Uno de los parámetros más importantes de la familia de cucurbit[n]uriles es la dimensión de su cavidad hidrófoba, las cuales han podido ser determinadas mediante difracción de rayos X.<sup>25,70</sup> Como ocurre con la familia de las ciclodextrinas, los diferentes CB[n] son cápsulas que tienen una profundidad común (9.1 Å), aunque sus dimensiones ecuatorial, anular y volumen varían sistemáticamente con el número de unidades glicoluril (Tabla 1.1); cabe destacar que la entrada al interior de los CB[n] es aproximadamente 2 Å más estrecha que la cavidad misma, lo cual produce barreras estéricas significativas para los procesos de complejación. Por otro lado, si comparamos en términos de tamaño de cavidad se puede establecer, aunque cabe tener en cuenta la diferente geometría en la cápsula en su conjunto, un paralelismo entre CB[6], CB[7] y CB[8] con la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -ciclodextrinas, respectivamente. De esta manera, las dimensiones de las cavidades en la familia de CB[n] igualan e incluso superan los valores alcanzados por las CDs.

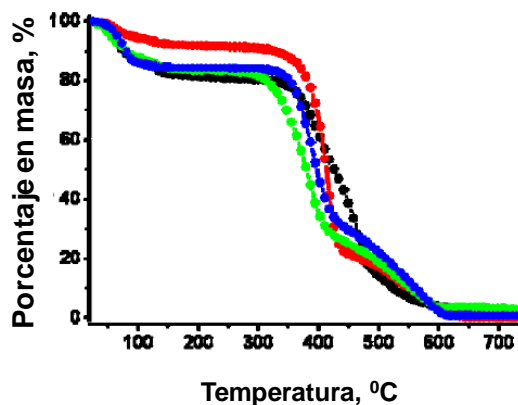


**Tabla 1.1.** Parámetros dimensionales de los diferentes CBs ( $\phi$ : diámetro)

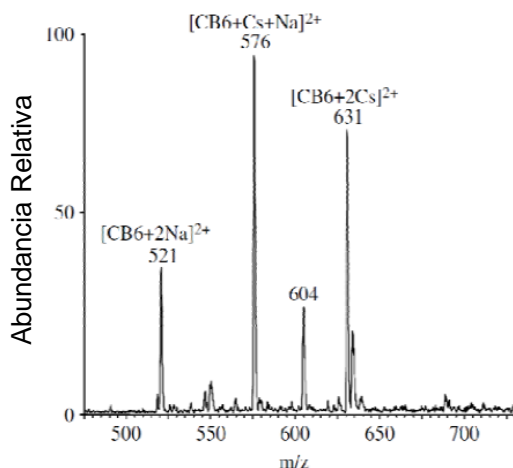
	Tamaño (Å)			
	CB[5]	CB[6]	CB[7]	CB[8]
$\Phi$ exterior	13.1	14.4	16	17.5
$\Phi$ interior	2.4	3.9	5.4	6.9
$\Phi$ cavidad	4.4	5.8	7.3	8.8
altura	9.1	9.1	9.1	9.1
Volumen (Å <sup>3</sup> )	82	164	279	479

La solubilidad de CB[n] en disolventes orgánicos comunes es menor de  $10^{-5}$  M, de ahí que la química de los cucurbit[n]uriles haya sido principalmente estudiada en medio acuoso. Incluso en este disolvente la solubilidad es relativa baja<sup>91-95</sup>: CB[6] y CB[8] son bastante insolubles, mientras CB[5] y CB[7] poseen solubilidad modesta en agua.

Una de las características que más resaltan de los CB[n] es su alta estabilidad térmica y química<sup>96,97</sup>; los análisis termogravimétricos de la Figura 1.10 muestran que la descomposición no se produce hasta los 420 °C en todos los casos menos para CB[7] que comienza a descomponerse a temperaturas cercanas a 370 °C.

**Figura 1.10.** Análisis termogravimétrico de CB[5] (•), CB[6] (•), CB[7] (•) y CB[8] (•).

La determinación del peso molecular de estos materiales puede llevarse a cabo mediante espectrometría de masas<sup>25</sup>. Estudios recientes han demostrado que la ionización por electrospray (ESI-MS) es una herramienta analítica efectiva que permite la identificación y cuantificación, en disolución acuosa, de la masa de los diferentes miembros de esta familia de cápsulas<sup>70</sup> y sus complejos hospedador-huésped.<sup>98-102</sup> La presencia de dos portales idénticos provoca que estas estructuras sintéticas suelen detectarse como iones doblemente cargados debido a la coordinación de metales alcalinos como  $\text{Na}^+$  o  $\text{Cs}^+$  presentes en la disolución.

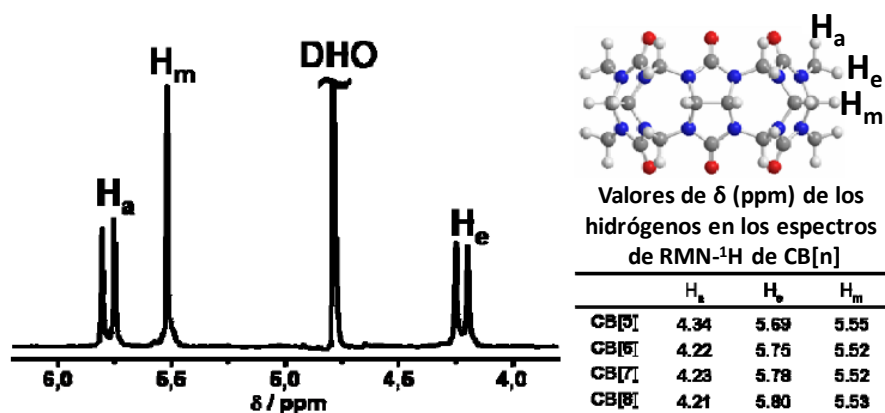


**Figura 1.11.** Espectros de masas de CB[6] (10  $\mu\text{M}$ ) mediante ionización por electrospray en  $\text{NaCl}+\text{KCl}$  1mM.

El espectro de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  de los  $\text{CB}[n]$  (Figura 1.12) contiene sólo tres señales de igual intensidad en la zona alifática, indicando una estructura no aromática de alta simetría<sup>25,70</sup>: un singlete, debido a los hidrógenos metilénicos ( $\text{H}_m$ ) del núcleo de glicoluril, y dos dobletes acoplados, con un valor de constante de acoplamiento geminal típico ( $J_{\text{gem}} = 15.5 \text{ Hz}$ ), correspondientes a los hidrógenos de los metilenos puente que no son equivalentes; esta diferencia entre los hidrógenos metileno ecuatorial ( $\text{H}_e$ ) y axial ( $\text{H}_a$ ) es debida a la

anisotropía magnética que se establece en las proximidades de los grupos carbonilo portales.

La cavidad de la molécula de CB[n] es una región magnéticamente apantallante debido a la preorganización de todos los grupos carbonilo que forman cada uno de los portales, lo cual resulta en la aditividad de la anisotropía magnética;<sup>25,27</sup> esto hace que las señales en el espectro RMN-<sup>1</sup>H debidas a especies encapsuladas en CB[n] sufran un desplazamiento a campo alto al compararlas con las correspondientes a dichos huéspedes libres.<sup>26,27,45,59,63,103,104</sup> Esta propiedad puede ser utilizada para determinar no sólo si un huésped ha sido encapsulado, sino también qué parte del mismo se introduce en la cavidad de los CB[n], de forma que cambios significativamente bajos de los desplazamientos químicos reflejan la proximidad de las moléculas a las paredes de la cavidad, mientras que valores de variación del desplazamiento químico suficientemente grandes indican un ajuste más próximo de los protones del huésped con los portales de la cavidad. Además, la pérdida del plano de simetría ecuatorial en el complejo cuando se adiciona el huésped hace que los hidrógenos de los grupos metilenos superiores e inferiores proporcionen señales diferentes.



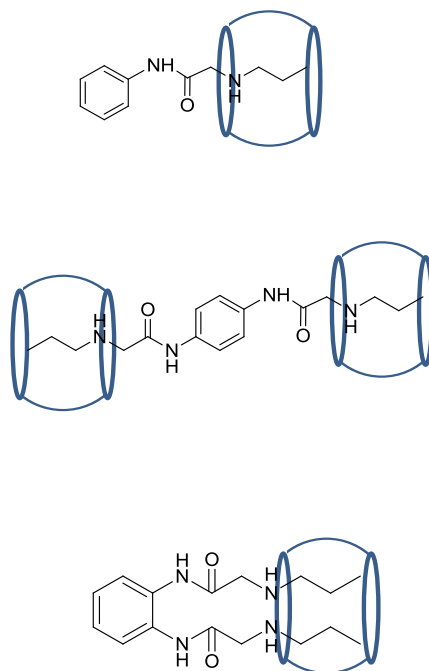
**Figura 1.12.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de CB[7] en D<sub>2</sub>O medido en un espectrómetro de 300 MHz. En la tabla se recogen los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) de cada CB[n].

En la presente tesis doctoral se van a estudiar una serie de complejos de asociación entre CBs y moléculas orgánicas con varios objetivos entre los que se incluye el desarrollo de adsorbentes sólidos selectivos, sensores con capacidad dual de detección de analitos y entidades poliméricas tipo liposomas conteniendo CBs asociados con unidades de la entidad liposómica. A continuación comentaremos los antecedentes de interés de estos estudios.

### **1.2.1. Formación de complejos entre CBs y acetanilidas sustituidas**

Entre los posibles complejos de moléculas huésped con CBs destacan aquellos que se forman con aminas alifáticas.<sup>37,39</sup> Un tipo de estructura que posee cierto interés es el que deriva de las acetanilidas poseyendo en posición  $\alpha$  un grupo propilamino. La existencia de un anillo aromático permite establecer la influencia de la sustitución en este anillo aromático en la formación de complejos de inclusión. En particular, es de interés establecer las similitudes y las diferencias entre las constantes de complejación de acetanilidas monosustituidas con grupos propilamino con las de los isómeros disustituídos posicionales orto- y para-. El Esquema 1.3 indica la estructura de los compuestos de interés y la razón por la que se espera diferencias entre ellos. Así, mientras que las acetanilidas monosustituidas deberían formar únicamente un complejo de inclusión con CBs 6, 7 y 8 con una estequiometría 1:1, el isómero para del derivado de la fenilendiamina, debido a su simetría podría llegar a formar complejos con la estequiometría huésped:CB[n] 1:2, si fuera posible que las dos cadenas laterales con grupos propilamina formasen el complejo de inclusión independientemente.

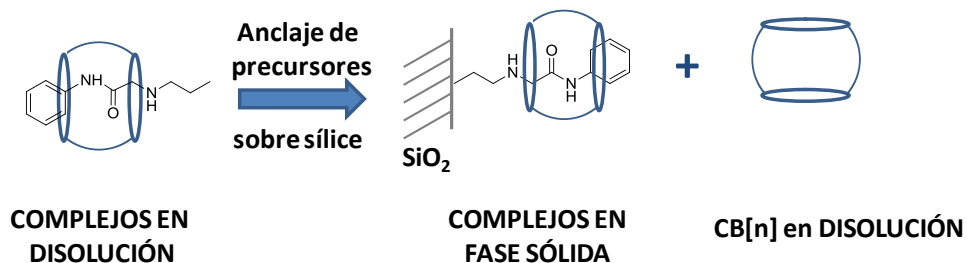
Un caso más complejo sería el del isómero orto- de la fenilendiamina donde la proximidad entre las dos cadenas laterales y el hecho de que el enlace amida presente una rigidez conformacional podría motivar que la complejación de una cadena influyese por efecto estérico en la otra o que incluso ambas cadenas se acomodasen en una única unidad de CB[n]



**Esquema 1.3.** Estructura de las acetanilidas de interés y posibles modos de interacción con cucurbit[n]uril.

Una de las posibilidades estructurales que ofrecen este tipo de moléculas es que podría fácilmente implementarse el anclaje covalente de análogas de las mismas en soportes sólidos insolubles. En particular existen comercialmente disponibles sílices nanoparticuladas cuya superficie posee grupos propilamino que serían análogos a los grupos propilamino presentes en las acetanilidas indicadas en el Esquema 1.3. De esta manera es posible imaginar una nanopartícula de sílice que tuviera en la superficie unidades análogas a las de las acetanilidas indicadas en el esquema. Si estas moléculas formasen complejos de inclusión fuertes y selectivos con los CBs en disolución, sería esperable que ese mismo tipo de complejos tuviera lugar si moléculas análogas se encontrasen inmovilizadas en la superficie por lo que este tipo de materiales podría servir para recuperar o atrapar CBs de la fase líquida a la fase sólida. El Esquema 1.4 ilustra el

proceso de cambio de fase mediante formación de complejos con unidades orgánicas ancladas en la superficie de la sílice.



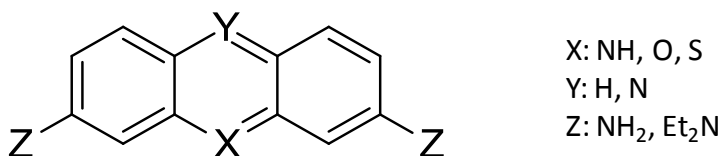
**Esquema 1.4.** Proceso de cambio de fase mediante formación de complejos con unidades orgánicas ancladas en la superficie de la sílice.

El interés de estos estudios deriva de la poca información acerca de la formación de complejos de CB[n] que no sea en disolución acuosa y puede servir para desarrollar sistemas de recuperación de este tipo de cápsulas orgánicas<sup>105,106</sup>.

### 1.2.2. *Formación de complejos huésped-hospedador entre CBs y colorantes tricíclicos básicos*

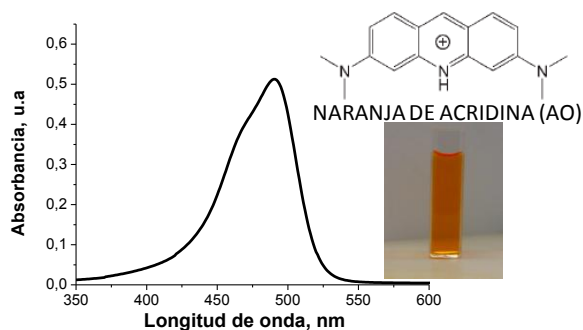
Estudios previos de nuestro grupo han establecido que colorantes tricíclicos básicos forman complejos de inclusión con CB[7] y CB[8].<sup>107</sup> Estos colorantes tricíclicos básicos tienen en común la existencia de tres anillos condensados aromáticos donde existe uno o más heteroátomos en su anillo central. Dependiendo de la naturaleza de estos heteroátomos, los colorantes pertenecen a diferentes familias tales como: tiazinas, diazinas y oxazinas, entre otros tipos. El Esquema 1.5 presenta la estructura general de este tipo de compuestos. La basicidad de estos colorantes deriva de la existencia de grupos amino o de alquilamino como sustituyentes generalmente en los anillos periféricos y que son responsables de que en disoluciones acuosas estos compuestos actúen como base, encontrándose protonados o soportando una carga positiva en un rango de pH amplio. El carácter catiónico de estos compuestos así como sus dimensiones moleculares los hace

especialmente adecuados para formar complejos de inclusión con CBs puesto que tal y como se ha visto anteriormente este tipo de cápsulas orgánicas forma complejos de inclusión preferentemente con cationes orgánicos de tamaño similar.



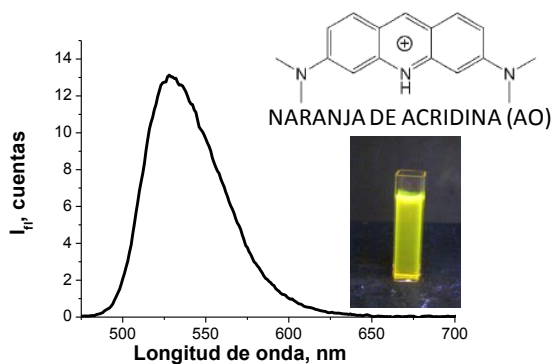
**Esquema 1.5.** Estructura general de los colorantes tricíclicos básicos y grupos más comunes que podemos encontrar en las posiciones X, Y, Z.

Una característica común de los colorantes tricíclicos catiónicos es, como su nombre indica, el que exhiban una intensa banda de absorción en la zona de visible que es la responsable de la apariencia visual de estos compuestos. Esta característica deriva del hecho de que se trata de compuestos aromáticos policíclicos los cuales pueden ser considerados como derivados del antraceno. La sustitución en el anillo aromático central de un carbono por un heteroátomo produce cambios menores en las bandas de absorción. Sin embargo Los grupos amino son responsables de un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción desplazándola claramente hasta la zona del visible. A la vez los grupos amino producen un aumento auxocrómico de la intensidad de la banda. A modo de ejemplo la Figura 1.13 presenta el espectro de absorción UV-VIS del colorante naranja de acridina (AO) así como una fotografía de una disolución acuosa de este colorante.



**Figura 1.13.** Espectro de absorción UV-VIS del colorante AO y fotografía de una disolución acuosa de este colorante.

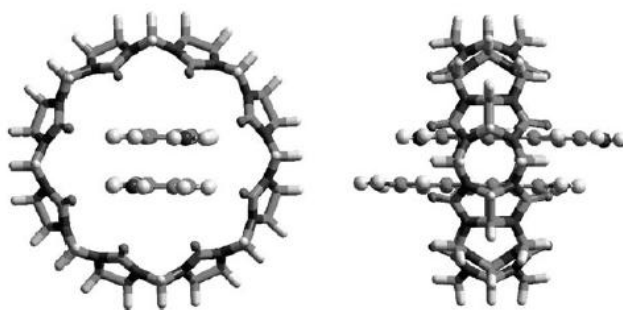
Otra propiedad común a los colorantes tricíclicos básicos es la de emitir fluorescencia cuando son excitados a la longitud de onda del máximo de absorción. En la mayoría de los casos esta emisión de fluorescencia se observa visualmente cuando las disoluciones de estos colorantes se iluminan con luz UV. Sin embargo para el caso del azul de metileno (MB) y tionina (TH) los rendimientos cuánticos de fluorescencia son relativamente bajos y pueden no ser detectables visualmente en condiciones de alta dilución. La Figura 1.14 muestra el espectro de fluorescencia del naranja de acridina (AO) así como una fotografía de un vial iluminado con luz UV donde se observa el color de la emisión de este colorante.



**Figura 1.14.** Espectro de fluorescencia del AO y fotografía de un vial iluminado con luz UV.



Como se acaba de comentar, resultados anteriores habían demostrado que estos colorantes tricíclicos básicos forman complejos de asociación con CB[7] y con CB[8] con estequiometrías 1:1 y 2:1.<sup>107</sup> La excepción a esta regla es la pironina Y (PYY) donde el complejo de inclusión para el CB[8] posee una estequiometría determinada de acuerdo con la curva Jobs de 3:1.<sup>107</sup> La diferencia en estequiometría dependiendo del CB[n] se puede racionalizar en base a modelos moleculares que muestran que mientras en el CB[7] las dimensiones de la cápsula solo permiten la inclusión en el interior de una única molécula de colorante, para el caso del CB[8] la mayor dimensión de la cavidad interior hace posible que se alojen en su interior dos unidades de estos colorantes. La Figura 1.15 muestra dos modelos para ilustrar la estructura de estos complejos de inclusión. Aunque en el caso de la PYY no es conocida la co-conformación del complejo, una posible explicación a la formación del complejo 3:1 en CB[8] podría ser que una molécula de PYY alojada en el interior del CB[8] se superpone a otras dos moléculas que penetran parcialmente en la cavidad por extremos diferentes.



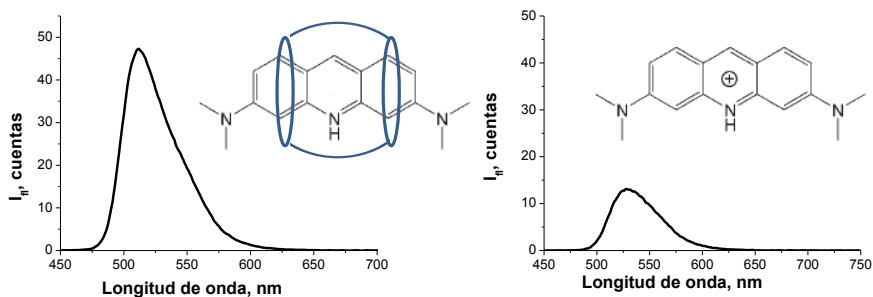
**Figura 1.15.** Modelos moleculares calculados para el colorante proflavina (PF) en presencia de CB[8] que representan la capacidad de inclusión de dos moléculas de colorante.

La formación de complejos de inclusión de los colorantes tricíclicos con CB[7] y CB[8] se refleja en cambios en las propiedades espectroscópicas de estos compuestos que son fácilmente visualizables. Así, los complejos de los colorantes con CB[7] aumentan significativamente la intensidad de su emisión cuando se encuentran formando el complejo

de inclusión. A la vez se producen pequeños cambios en las longitudes del máximo de emisión ( $\lambda_{\max}$ ). Estos corrimientos en  $\lambda_{\max}$  y el aumento en la intensidad de emisión son debidos al hecho de que al formarse el complejo la molécula de colorante se aloja en el interior de la cavidad hidrófoba de la cápsula orgánica que es manifiestamente apolar, resultando el fenómeno de inclusión en un cambio notable en las propiedades del medio que rodea al colorante que pasa de ser fuertemente polar y con interacciones por puente de hidrogeno con el colorante a fuertemente apolar y sin interacciones con el colorante<sup>107</sup>.

Se ha propuesto que el decaimiento preferente del estado excitado de los colorantes tricíclicos básicos en agua implica la transferencia de un protón del agua al colorante viniendo a resultar en la formación de un estado electrónico fundamental en forma protonada.<sup>108</sup> El fenómeno de la protonación de estados excitados es conocido en un gran número de moléculas ocurriendo incluso transferencia intramolecular de un protón.<sup>108</sup> Este proceso de desactivación del estado excitado por protonación del mismo compite en un medio acuoso con la desactivación por fluorescencia y hace que el rendimiento cuántico de fluorescencia de estas moléculas en agua sea inferior al del antraceno y otras moléculas aromáticas rígidas que son considerablemente fluorescentes.<sup>108</sup> El proceso de encapsulación de los colorantes tricíclicos en el interior de los CBs impide o dificulta este proceso de transferencia de protón y como consecuencia determina que el estado electrónico excitado no pueda sufrir desactivación mediante este mecanismo, viniendo a resultar un aumento del decaimiento mediante emisión de un fotón.

Por otra parte, el cambio de polaridad que experimenta la molécula al incluirse en el interior del CB[n] puede resultar en un cambio solvatocrómico como consecuencia de las diferencias en la estabilización relativa de los estados fundamental y excitados. Estos cambios de polaridad se reflejan en corrimientos en las bandas de fluorescencia.<sup>108</sup> El esquema muestra el cambio drástico en el rendimiento cuántico de fluorescencia que ocurre tras la formación del complejo de inclusión con CB[7].

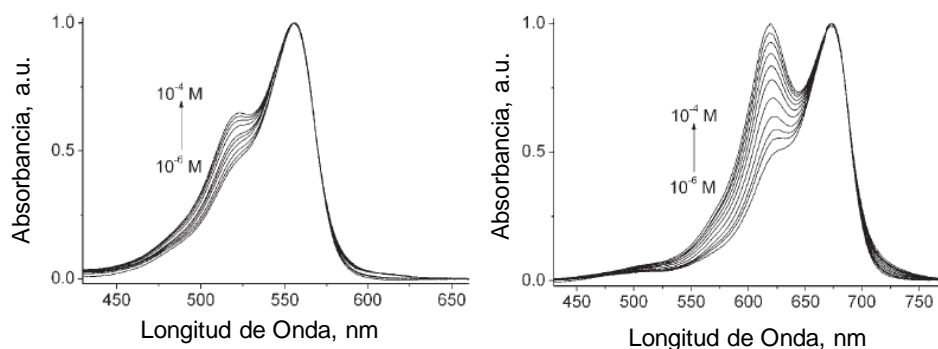


- Protección frente a protonación
  - Medio apolar
  - Aumento de  $I_{fi}$
  - Desplazamiento  $\lambda_{max}$
- Emisión inhibida por protonación
  - Medio altamente polar

**Esquema 1.6.** Cambios en el rendimiento cuántico de fluorescencia que ocurren durante la formación del complejo de inclusión de AO con CB[7] y origen del mismo.

En contraste con los efectos que se observan para la inclusión de los colorantes en CB[7], los complejos diméricos de los colorantes tricíclicos con CB[8] son no fluorescentes.<sup>107</sup> Es conocido que los colorantes tricíclicos en disoluciones acuosas tienden a agregarse formando dímeros que dependiendo de la orientación perpendicular o paralela de los mismos y de sus propiedades se conocen como dímeros J o H, respectivamente. Esta asociación es debida sin duda, a las fuerzas que origina el puente de hidrógeno que tiende a maximizar las interacciones favorables y minimizar las desfavorables.<sup>107,109,110</sup> Una de las consecuencias de la agregación y formación de dímeros es la disminución de la intensidad de emisión por fluorescencia, un fenómeno que es conocido en fotoquímica como auto-inhibición y que tiene su origen en que la energía de un estado electrónico excitado es transferida a otra molécula idéntica antes de que se produzca el fenómeno de desactivación por fluorescencia. Así, es un hecho bastante general en fotoquímica que la intensidad de la fluorescencia disminuya a medida que se aumenta la concentración del fluoróforo.<sup>109,110</sup>

En vista de los comentarios anteriores no es de extrañar que la asociación de los colorantes tricíclicos produzca como resultado la inhibición de la fluorescencia. Sin embargo, en contraste a la fluorescencia la asociación de los colorantes se refleja en cambios en el espectro de absorción visible donde aparece una nueva banda de absorción característica de la especie agregada a longitudes de onda menor (en torno a 40 nm) respecto al monómero sin asociar. Estos cambios en el espectro de absorción van emparejados con cambios visualmente observables de los colores de la disolución y de esta forma la colorimetría permitiría diferenciar de una forma simple entre el espectro de un monómero y el de un dímero.<sup>107</sup> A modo de ejemplo la Figura 1.16 muestra los cambios en el espectro de absorción en la zona del visible en función de la concentración del colorante para el azul de metileno y la pironina Y.



**Figura 1.16.** Variación de los espectros de absorción de disoluciones acuosas (pH 5.5, agua milli-Q) de pironina Y (PY) (izquierda) y azul de metileno (MB) (derecha) al aumentar la concentración en el rango  $10^{-6}$  M a  $10^{-4}$  M.

Puesto que como se acaba de indicar anteriormente la formación de complejos de los colorantes con CB[8] da lugar a la formación de dímeros, el resultado de la formación de complejos es la desaparición en el espectro de absorción de la banda correspondiente al colorante monomérico y la aparición de la banda desplazada hacia el azul característica del dímero incluso a concentraciones donde en ausencia de CB[8] solo sería observable el

espectro correspondiente a la especie monomérica. Obviamente, esta formación del dímero encapsulado y los cambios en los espectros de absorción en la zona del visible van acompañados por la desaparición de la fluorescencia. A la vista de estos resultados previos cabe concluir que es posible caracterizar la formación de complejos de colorantes con CB[7] por espectroscopia de fluorescencia mientras que la caracterización de los complejos de colorantes con CB[8] es seguida mas convenientemente por colorimetría. Conviene indicar que las constantes de asociación de los colorantes tricíclicos tanto con CB[7] como CB[8] son elevadas y superiores a  $10^5 \text{ M}^{-1}$  para el CB[7] y  $10^{13} \text{ M}^{-2}$  para el caso del CB[8].<sup>107,108</sup> La Tabla 1.2 resume los valores de las constantes de asociación que como puede verse son bastante similares como cabria esperar para compuestos con estructuras químicas parecidas.

**Tabla 1.2.** Constantes de asociación para los complejos entre los colorantes con CB[7] (KCB[7]) y CB[8] (KCB[8]) medidas en medio acuoso (pH 5.5).

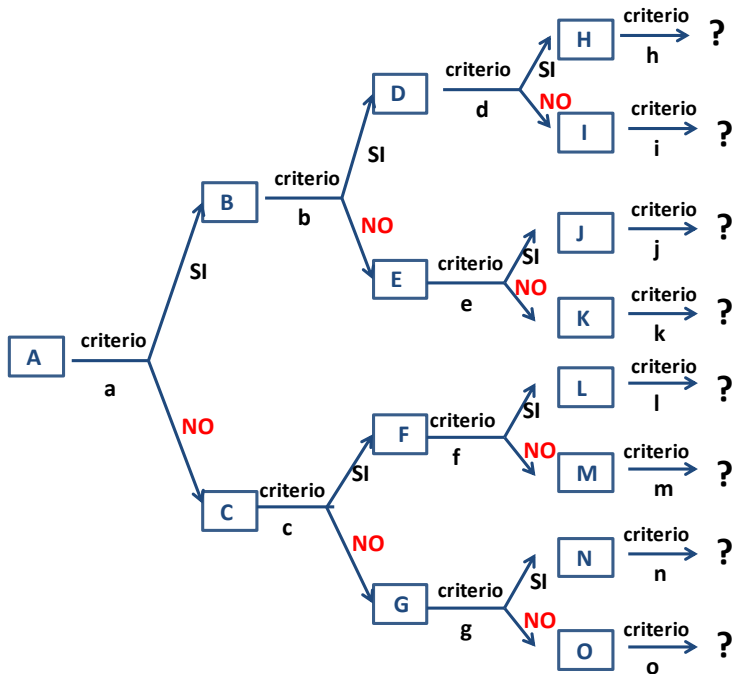
Colorante	$K_{\text{CB[7]}} \times 10^{-6} / \text{M}^{-1}$	$K_{\text{CB[8]}} \times 10^{-13} / \text{M}^{-2}$
PR	$17.0 \pm 2.5$	$212 \pm 59$
AN	$3.07 \pm 0.48$	$2270 \pm 730$
PI	$14.7 \pm 4.8$	$3.24 \pm 0.61$
PY	$4.56 \pm 0.10$	$3.00 \pm 0.50 \times 10^{23}$
OX	$12.1 \pm 1.6$	$73.2 \pm 16.3$
TI	$13.5 \pm 1.0$	$2500 \pm 1200$
AM	$12.6 \pm 2.8$	$1060 \pm 530$

### 1.2.3. Matriz de Sensores

Partiendo del conocimiento que se posee sobre estos complejos entre los colorantes tricíclicos y los CBs en la presente tesis doctoral se pretende explotar los cambios espectroscópicos que acompañan la formación de complejos en el desarrollo de sensores colorimétricos y fluorométricos para analitos. Mientras que una de las estrategias más comunes en química analítica para la detección de analitos es el desarrollo de sensores

selectivos y específicos existe otra aproximación opuesta y alternativa que se basa en el desarrollo de una matriz de sensores. En esta aproximación ninguna de las respuestas de cada uno de los elementos de la matriz sirve por si sola para identificar el analito pero es la combinación de gran numero de respuestas inespecíficas de la matriz lo que permite la identificación selectiva del analito. Este tipo de aproximación de matriz de sensores ha sido también descrito como “lenguas” o “narices” químicas según se apliquen a analitos en disolución (casos de las lenguas) o analitos en una corriente gaseosa (caso de las narices).<sup>111,112</sup> Esta terminología se basa en la similitud entre la forma de operación de una matriz de sensores con el sentido gustativo u olfativo de los animales superiores. En estos sentidos existen multitud de terminaciones nerviosas que transmiten la información al cerebro y es la respuesta combinada de todas ellas la que produce una determinada sensación de gusto u olor que puede llevar a identificar la sustancia que se está probando u oliendo.

La ventaja de las lenguas y narices químicas se basa en que no es necesario el diseño y síntesis de una molécula que actúe como sensor, ni tampoco es necesario demostrar que este sensor es específico y selectivo únicamente para el analito objeto de estudio. Sin embargo, al igual que en el caso de las lenguas y narices naturales el principal problema de la matriz de sensores es el análisis de los resultados y la elaboración de un algoritmo o criterio que permita la identificación del analito.<sup>113</sup> Entre ellos, el análisis del componente principal (*principal component análisis o PCA*) consiste en elaborar criterios que permitan ir clasificando sucesivamente los diferentes grupos de analitos tal como un árbol va dividiéndose sucesivamente en ramas las cuales al final tienen hojas que constituirían el analito finalmente identificado. El Esquema 1.7 ilustra el método PCA en el que se basa la operación de gran número de lenguas y narices químicas.



**Esquema 1.7.** Analisis de componente principal (“Principal Component Analysis”) basado en clasificación según criterios (“component”) que permiten ir diferenciando el analito hasta llegar a su identificación final. Por ejemplo, el analito “H” corresponde a una muestra que tenga los criterios a,b y d positivos.

Este tipo de algoritmo es de fácil implementación mediante programas de ordenador que permite, tras la introducción de los datos, determinar de una forma segura la naturaleza del analito. Así, sería posible desarrollar matrices de sensores basados en una serie de colorantes encapsulados en una serie de CBs ya que, en principio, la respuesta de cada uno de los colorantes y cada uno de los complejos de los colorantes podría ser diferente para cada analito. Capturando la imagen de esta matriz de sensores y aplicando algoritmos computacionales se podría desarrollar un método simple y fiable de análisis basado en los colorantes tricíclicos y sus complejos.

### 1.3. Auto-ensamblaje y organización molecular

El término auto-ensamblaje molecular puede ser definido como la asociación espontánea de dos o más moléculas bajo equilibrio termodinámico y resultando en la generación de un agregado bien definido, el sistema auto-ensamblado.<sup>114-125</sup>

La naturaleza usa frecuentemente subunidades simples e idénticas como constituyentes de ensamblajes supramoleculares altamente complejos. Tales ensamblados utilizan frecuentemente una variedad de interacciones supramoleculares débiles tales como puentes de hidrógeno, interacciones  $\pi$ - $\pi$  e interacciones de van der Waals para guiar la formación de los elementos de la estructura secundaria en el nivel jerárquico más bajo y mantener así juntas las subunidades que forman la estructura terciaria. El uso de enlaces no covalentes tiene la ventaja de que se forman espontánea y reversiblemente bajo control termodinámico, con la posibilidad de corrección de errores y sin productos secundarios indeseados. Así, los sistemas biológicos construyen y modifican estructuras funcionales nanoscópicas con eficiencia sorprendente, lo cual constituye una fuente de inspiración para la construcción de sistemas químicos capaces de crear complejidad y, junto con ella, funcionalidad.

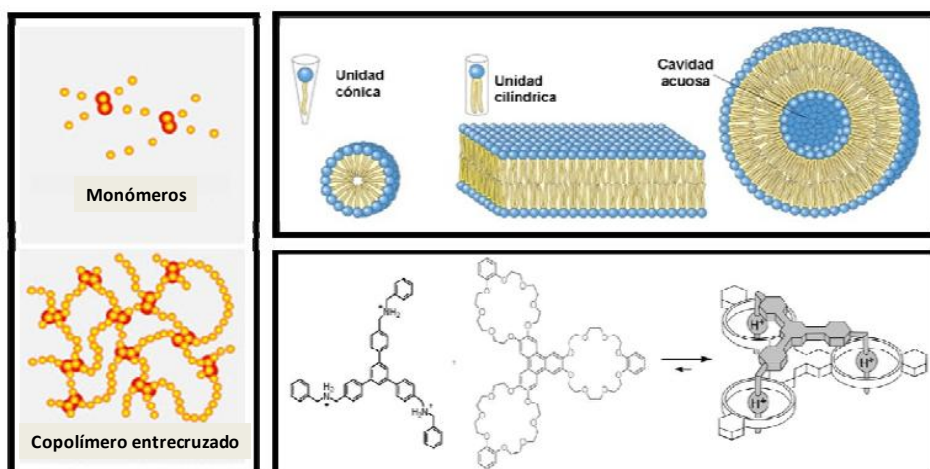
Así, para construir estructuras nanoscópicas, la síntesis química debe explorar nuevos conceptos y aproximaciones en la búsqueda de métodos eficientes para generar compuestos con un orden y dimensiones deseadas, para lo cual se pueden abordar tres aproximaciones tal como se recoge en la Figura 1.17:

*1.- Polimerización covalente.* La reacción repetitiva de una entidad química simple denominada monómero consigo mismo bajo condiciones apropiadas puede dar lugar a una molécula simple de alto peso molecular denominada polímero. Aunque este proceso proporciona estructuras de grandes dimensiones moleculares este proceso tiene una potencia limitada para la generación controlada de estructuras tridimensionales complejas.



2.- *Polimerización no covalente o auto-organización.* Se pueden formar estructuras altamente organizadas cuando varias moléculas idénticas se agregan como resultado de interacciones no covalentes. Podemos encontrar gran variedad de arquitecturas supramoleculares como cristales líquidos, micelas, monocapas y bicapas o películas. A pesar de que las moléculas se organizan solas, la estructura final representa un mínimo termodinámico. Así, aunque la auto-organización puede producir estructuras en la escala nanométrica, su aplicación está limitada por carecer de cualquier control preciso.

3.- *Auto-ensamblaje.* Los químicos deben desarrollar un régimen sintético que incorpore las lecciones aprendidas de la Naturaleza; en principio, la síntesis orgánica convencional tiene que ser utilizada para crear las subunidades que, mediante enlaces no covalentes, puedan agregarse consigo mismas o con otras subunidades sintéticas para proporcionar ensamblados supramoleculares estructuralmente definidos y estables. Así, en lugar de síntesis covalentes multietapa tediosas, los componentes sencillos están programados con los sitios de unión adecuadamente posicionados de forma que, al mezclar las subunidades correctas, se ensamblan espontáneamente sin ninguna contribución adicional por parte de los químicos.



**Figura 1.17.** Ejemplos del nivel de complejidad que se puede alcanzar en las estructuras nanoscópicas siguiendo las tres estrategias expuestas.

El diseño de sistemas auto-ensamblados artificiales depende, por tanto, de la preparación de componentes moleculares que puedan organizarse espontáneamente en arquitecturas supramoleculares deseadas. Así, el control sobre la disposición espacial de los átomos y moléculas es muy importante porque puede tener dramáticas consecuencias en los sistemas químicos: su disposición espacial se transfiere de un centro a otro de las moléculas que forman estos agregados macromoleculares y, en consecuencia, a las dimensiones nanoscópicas.

Para ello, los componentes tienen que llevar la información apropiada en su estructura geométrica y electrónica de manera que los sitios de unión se encuentren en posiciones correctas. Generalmente el agregado final está controlado por condiciones de equilibrio, no poseyendo limitaciones termodinámicas; este aspecto es importante porque los procesos cinéticamente controlados no tienen el potencial de corrección de errores y así normalmente llevan a mezclas. La reversibilidad de los procesos de auto-ensamblaje también proporciona agregados dinámicos susceptibles de participar en reacciones de intercambio con otros componentes.

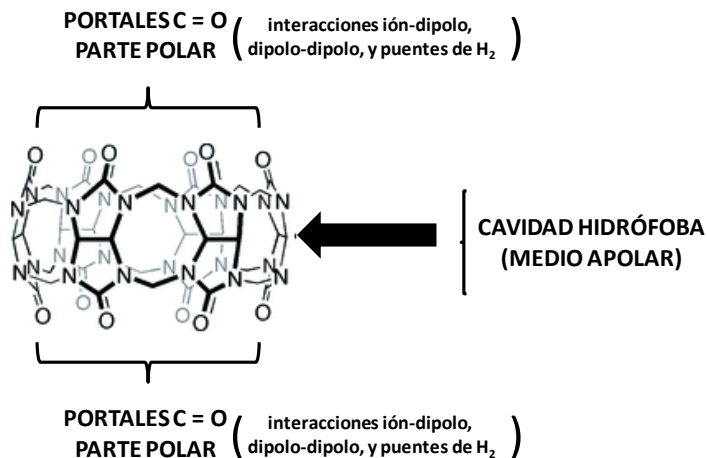
Siguiendo los pasos de la Naturaleza, los químicos sintéticos han hecho esfuerzos por formar ensamblados supramoleculares altamente complejos construidos a partir de unidades simples. Las estructuras y propiedades finales de estos ensamblajes son bastante diversas, con cavidades internas que varían desde unos pocos ángstroms cúbicos a varios nanómetros cúbicos. Usando estrategias diseñadas de forma similar a la Naturaleza, se han usado interacciones tales como enlaces covalentes, atracciones electrostáticas, uniones metal-ligando y puentes de hidrógeno como la fuerza que mantiene unidas las subunidades. Estos ensamblados sintéticos han sido utilizados para encapsular una variedad de moléculas huésped, estabilizar intermedios reactivos e incluso facilitar reacciones químicas. De esta manera, el auto-ensamblaje es la estrategia usada por los

químicos supramoleculares para reducir el esfuerzo sintético requerido en la generación de estructuras y arquitecturas complejas que mimeticen las funciones biológicas.<sup>126</sup>

### **1.3.1. Auto-ensamblaje de compuestos anfifílicos bipodales.**

Como se ha comentado anteriormente, el fenómeno de formación de complejos supramoleculares huésped-hospedador se basa en la operación de fuerzas intermoleculares tales como Van der Waals, dipolo-dipolo, puente de hidrógeno etc. En particular, en el caso que nos ocupa los complejos que van a ser estudiados tienen lugar en medios acuosos y en este caso el conjunto de interacciones que tienen lugar permite la clasificación de los solutos como hidrófilos o hidrófobos dependiendo de que muestren una alta o una baja afinidad por el agua, respectivamente. Más aun, dependiendo de la estructura de la especie a considerar pueden existir ciertas regiones o grupos que posean una interacción favorable con el agua frente a otras regiones o partes de la molécula que no posean el mismo tipo de interacciones. Esta clase de moléculas teniendo unidades disimilares u opuestas con respecto a su afinidad por el agua se suelen denotar como anfifílicas y poseen aplicaciones como surfactantes y detergentes, entre otras. Así en el caso particular de los CBs hemos comentado que mientras los grupos carbonilo que flanquean los portales de las aberturas de estos oligómeros cíclicos son polares y presentan una alta afinidad por el agua, el cuerpo interior de la cavidad y que carece de grupos polares puesto que solo posee unidades  $\text{CH}_2$  es manifiestamente apolar. Por ese motivo el agua no tiene afinidad por ocupar los espacios interiores del  $\text{CB}[n]$  y prefiere que sean otras moléculas (huésped) las que se acomoden en esta región. De una forma simple tal como se ha indicado anteriormente los portales o grupos carbonilo de los CBs prefieren asociarse con el agua o con partes cargadas positivamente de la molécula huésped mientras que el interior de la cavidad prefiere alojar partes apolares del huésped preferiblemente unidades hidrocarbonadas. En este sentido, la fuerza termodinámica que favorece la formación de complejos se puede describir como la que deriva de la interacción hidrofóbica de la parte apolar del huésped con el interior de la cavidad y de la interacción polar de los grupos

carbonilos de los portales con la parte polar de la molécula huésped o con moléculas de agua.

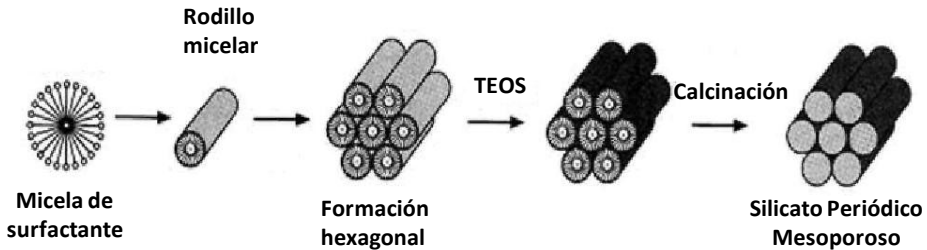


**Esquema 1.7.** Zonas de interacción de los complejos con CB[n].

Las fuerzas hidrofóbicas son responsables no solo de la formación de complejos de inclusión sino también del auto-ensamblaje y la formación de agregados moleculares en moléculas anfifílicas. Este fenómeno universal por el que moléculas anfifílicas tienden a agregarse en agua es la base de numerosas e importantes aplicaciones incluyendo el proceso de detergencia y la creación de entidades en el seno de disoluciones acuosas creando objetos y originando anisotropía en medios acuosos.

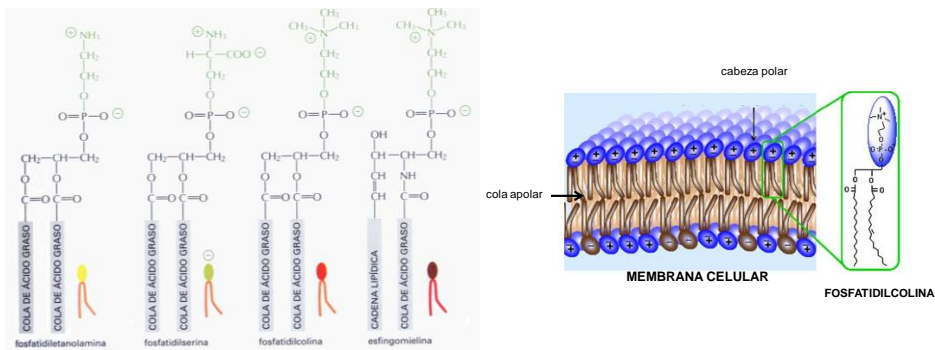
Un ejemplo paradigmático del auto-ensamblaje y los objetos o entidades supramoleculares a los que puede dar lugar es la aparición de micelas cuando moléculas de surfactante presentes en el agua superan el umbral de concentración mínimo (concentración micelar crítica) necesario para que se produzca el fenómeno. Una aplicación de las micelas y los objetos multimoleculares que derivan de ellos en ciencia de materiales ha sido la preparación de aluminosilicatos mesoporosos basados en el auto-ensamblaje de sales de amonio cuaternarias poseyendo una cadena alquílica de larga longitud tal como el catión CTABr. El Esquema 1.8 ilustra el proceso de formación de este aluminosilicato periódico

mesoporoso utilizando rodillos de surfactantes presentes en el medio acuoso como agente plantilla.



**Esquema 1.8.** Proceso de formación de silicatos periódicos mesoporosos utilizando rodillos de surfactantes como agente plantilla.

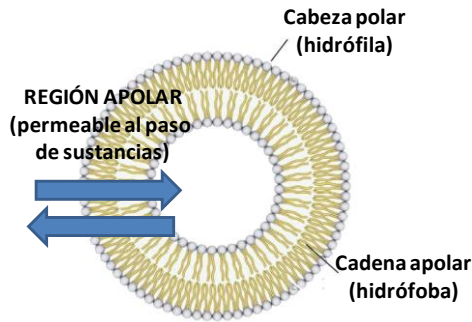
Más relacionado con la presente tesis doctoral es la formación de membranas bicapa que dan lugar a la formación de vesículas o liposomas. En células vivas las membranas celulares y de orgánulos intracelulares están constituidas por una bicapa lipídica que contiene entre otros componentes *fosfatidilcolina* y otros lípidos unidos a grupos fosfato. La Figura 1.18 presenta la estructura de algunos de los componentes naturales en membranas celulares.



**Figura 1.18.** Estructura de algunos componentes de las membranas celulares.

El punto clave para la auto-organización bicapa es la existencia en la estructura de dos cadenas lipídicas apolares unidas a un grupo fosfato polar. Mientras que un surfactante que da lugar a micelas posee una única cadena alquímica, la existencia de dos cadenas apolares

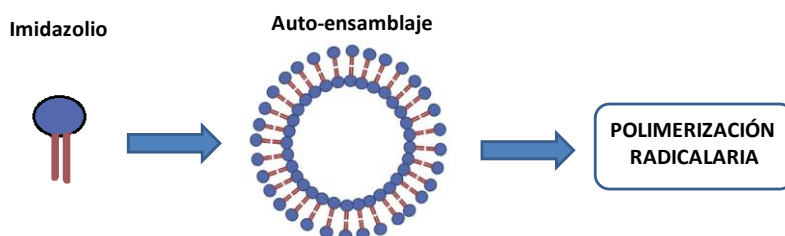
largas unidas a un grupo polar determina que la curvatura que permite una única cadena no pueda tener lugar cuando existen dos y como consecuencia del menor radio de curvatura que permiten moléculas con dos cadenas alquílicas, el auto-ensamblaje tiende a favorecer la formación de láminas bicapa donde las cadenas alquílicas de una capa superior pueden imbricarse con las cadenas lipídicas de la capa inferior, delimitando una superficie que puede ser plana o que en cualquier caso posee una menor curvatura que las micelas. Estas membranas originan un compartimento interior que está separado del medio exterior, pero que por el hecho de ser flexibles y no estar sujetas a enlaces rígidos puede eventualmente permitir el paso y la transferencia de materia desde el interior al exterior.



**Figura 1.19.** Representación de un liposoma cuya membrana origina un compartimento interior separado del medio exterior, y que por ser flexibles y no estar sujetas a enlaces rígidos puede permitir el paso y la transferencia de materia.

Relacionado con la presente tesis doctoral se halla el fenómeno de formación de liposomas o vesículas artificiales a partir de cadenas alquílicas de longitud larga enlazadas con una cabeza polar. En particular, derivado de los estudios de nuestro grupo en el campo lípidos iónicos,<sup>127-129</sup> se ha utilizado como unidad polar el anillo de imidazolio el cual puede ser sustituido en los nitrógenos con dos grupos alquílicos. El auto-ensamblaje de este tipo de moléculas podría dar lugar, de manera análoga a los di-lípidos fosfatados naturales a la formación de vesículas. Más aun, la capacidad de síntesis podría permitir la introducción en la cadena hidrocarbonada apolar de enlaces dobles C=C que tras el auto-ensamblaje

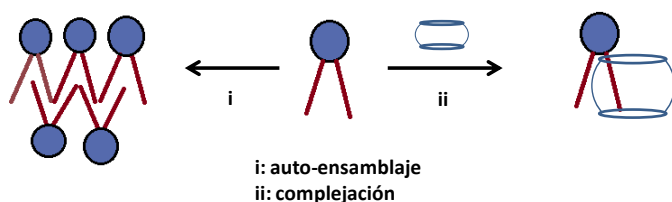
espontáneo en medio acuoso pudiera ser seguido de una polimerización posterior de los grupos vinilo para fijar el objeto supramolecular mediante enlaces covalentes. El Esquema 1.9 ilustra cual es la metodología que se pretende seguir para que la formación estructural de los imidazolios simétricamente sustituidos se traduzca en primer lugar en la formación de liposomas cuya forma pueda ser fijada posteriormente mediante entrecruzamiento de los dobles enlaces C=C.



**Esquema 1.9.** Metodología que se pretende seguir para la formación de liposomas cuya forma pueda ser fijada posteriormente mediante entrecruzamiento de los dobles enlaces C=C.

El empleo de iones positivos imidazolio como unidades polares de la estructura anfifílica poseyendo dos cadenas hidrofóbicas podría permitir la asociación iónica con aniones y en particular con el  $\text{AuCl}_4^-$ . Nuestro grupo tiene igualmente experiencia en la generación de nanopartículas de oro (AuNPs) por reducción de  $\text{AuCl}_4^-$ .<sup>130-132</sup> Si este anión precursor de AuNPs se encontrase asociado con las unidades de imidazolio sería posible que como consecuencia de su localización preferente, cuando en la etapa posterior al auto-ensamblaje y fijación de la estructura se procediese a la formación de AuNPs, éstas se encontrasen en posiciones espacialmente definidas respecto a la vesícula, bien interior o bien en la superficie de la membrana de la vesícula. Puesto que las AuNPs, incluso sin encontrarse en contacto con óxidos mixtos, poseen actividad catalítica para numerosas reacciones sería de interés evaluar la actividad catalítica de las estructuras que resultaran tras la formación de AuNPs y los liposomas.

Relacionando el auto-ensamblaje con la formación de complejos con CB[n], una cuestión de interés es establecer si el auto-ensamblaje produce cambios en la interacción de los monómeros con los CBs. La importancia de esta cuestión surge del hecho de considerar que ambos fenómenos tal y como se ha indicado se originan como consecuencia de la hidrofobicidad que hace que las cadenas alquílicas quieran apartarse del medio acuoso introduciéndose en las cavidades del CB[n] o bien imbricándose con otras cadenas alquílicas.<sup>133</sup> Por consiguiente la fuerza termodinámica común a ambos procesos puede originar que en presencia de CB[n] el auto-ensamblaje se vea impedido o al contrario que el auto-ensamblaje produzca la destrucción de los complejos huésped-hospedador entre los líquidos iónicos y los CBs. Una diferencia fundamental entre ambos procesos es su dependencia con la concentración de líquido iónico. Para que el auto-ensamblaje tenga lugar es necesario que la concentración de líquido iónico supere el umbral mínimo necesario, mientras que la formación del complejo supramolecular puede ocurrir a concentraciones de líquido iónico incluso inferiores a la concentración crítica de auto-ensamblaje. En vista de esto cabe esperar que el auto-ensamblaje se favorezca con la concentración de líquido iónico mientras que la formación de los complejos debería ser independiente de la concentración absoluta de líquido iónico.



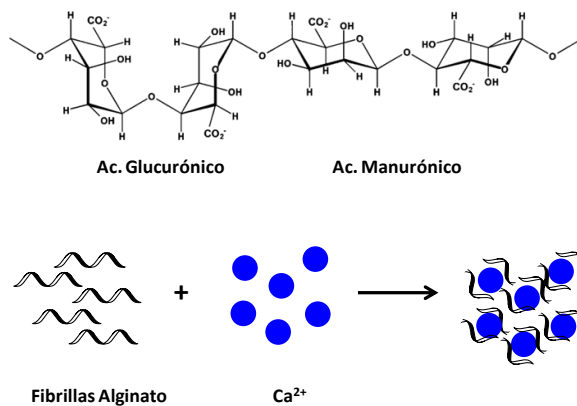
**Esquema 1.10.** Competencia entre auto-ensamblaje y complejación debido al origen común de ambos procesos motivados por la hidrofobicidad. (i) concentraciones elevadas del compuesto anfifílico; (ii) complejo de asociación con CB[n].



#### 1.4. Alginato natural como agente plantilla en la formación de nanopartículas de dióxido de titanio.

Relacionado con el fenómeno de asociación y formación de complejos es conocido que el alginato natural cuando se encuentra disuelto en agua se asocia formando nanopartículas donde la fibrillas del biopolímero sin ramificar se auto-ensamblan para maximizar las interacciones hidrófilas con el agua y minimizar las interacciones hidrófobas.

El alginato es un biopolímero natural presente en algas y que contiene unidades de ácido manurónico y glucurónico junto con unidades de glucosa para dar lugar a oligómeros y polímeros que no se encuentran ramificados<sup>134,135</sup>. El Esquema 1.11 muestra la estructura química del alginato y el proceso de auto-ensamblaje de sus fibrillas por coagulación en disolución acuosa cuando se halla presente un catión di- o trivalente.



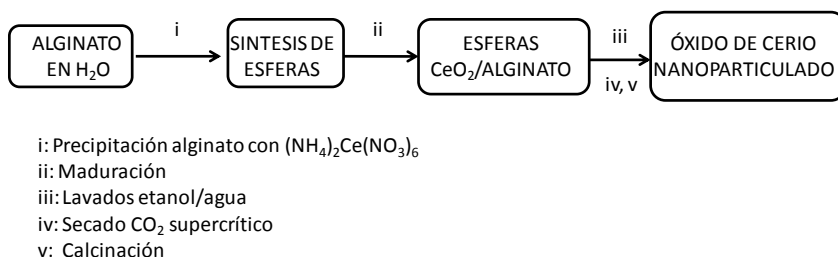
**Esquema 1.11.** Estructura química del alginato (arriba) y el proceso de auto-ensamblaje de sus fibrillas en disolución acuosa en presencia de cationes metálicos (abajo).

Las sales sódicas y de otros metales alcalinos del alginato son totalmente solubles en agua y presentan una fuerte interacción con cationes di- y trivalentes de metales de transición.<sup>136-</sup>

<sup>139</sup> En particular el alginato y otros biopolímeros naturales han sido usados para atrapar trazas de metales tóxicos en agua debido a su capacidad de complejar este tipo de cationes. La formación de complejos de alginato con metales de transición deriva de la presencia de

grupos carboxilato que cuando se encuentran en entorno no hidrófilo presentan una alta constante de complejación con cationes metálicos y que es el origen entre otros sólidos de los materiales reticulares metal-orgánicos (MOFs).<sup>140</sup>

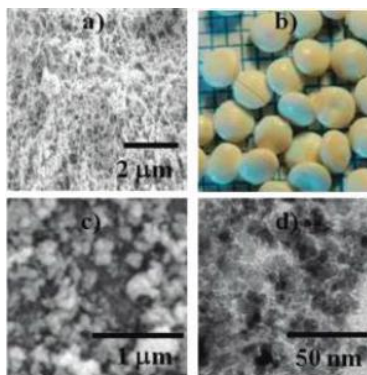
Recientemente nuestro grupo y otros han descrito un procedimiento innovador de formación de nanopartículas de óxidos metálicos que se basa en la preparación de alginatos metálicos con geometría y porosidad definida y posterior calcinación de estos precursores para dar lugar a nanopartículas de pequeño tamaño del óxido correspondiente.<sup>141</sup> A modo de ejemplo el Esquema 1.12 muestra las etapas seguidas en la preparación de un óxido de cerio nanoparticulado que presenta una alta actividad como fotocatalizador en la generación de oxígeno a partir del agua. La Figura 1.20 muestra fotografías e imágenes de microscopia electrónica de barrido del alginato conteniendo iones cerio precursor y del óxido de cerio resultante tras la etapa de calcinación. El punto clave de la síntesis consiste en la complejación que las fibrillas del alginato ejercen sobre la nanopartícula de óxido metálico que se originan en el interior de las fibrillas de alginato, produciendo la estabilización de las mismas y limitando su crecimiento.



**Esquema 1.12.** Etapas seguidas para la preparación de un óxido de cerio nanoparticulado.

Siguiendo un esquema similar sería de interés ampliar esta metodología a la preparación de otros óxidos metálicos que pudieran ser de interés y donde el tamaño de partícula del material resultante jugará un papel determinante en la actividad. En este contexto uno de los óxidos metálicos más empleados por su actividad como fotocatalizador es el  $\text{TiO}_2$ <sup>142-145</sup> y

en la presente tesis doctoral nos hemos planteado la preparación de un  $\text{TiO}_2$  empleando alginato natural como agente plantilla.



**Figura 1.20.** Fotografía SEM del alginato conteniendo  $\text{Ce}^{2+}$  sin calcinar (a); (b) imágenes de las esferas antes de calcinar; (c) Fotografía SEM del  $\text{CeO}_2$  calcinado; (d) Fotografía TEM del  $\text{CeO}_2$  calcinado conteniendo Au, 1 wt %.

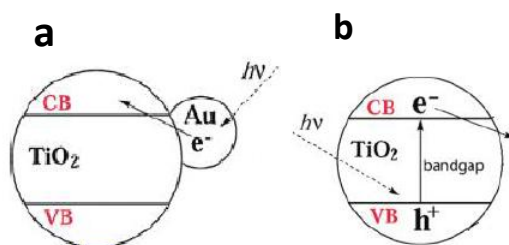
Un objetivo adicional consiste en la introducción de AuNPs sobre el óxido de titanio empleando el método del alginato. Recientemente ha aparecido una nueva línea de investigación en fotocatalisis encaminada a introducir actividad fotocatalítica en el  $\text{TiO}_2$  con luz visible<sup>146</sup>. Mientras que el  $\text{TiO}_2$  es un fotocatalizador extremadamente activo con luz UV, esta actividad fotocatalítica desaparece completamente cuando se ilumina con luz visible. La razón para este hecho consiste en que la energía necesaria para promover un electrón desde la banda de valencia a la banda de conducción en el  $\text{TiO}_2$  es de 3.2 eV (correspondiente a  $\lambda < 380$  nm) y por tanto hacen falta fotones con esta energía o superior para generar el estado de separación de cargas característico del comportamiento del  $\text{TiO}_2$  como fotocatalizador.

El interés de implementar respuesta fotocatalítica con luz visible en el  $\text{TiO}_2$  deriva del hecho de que la luz del Sol sólo posee en torno a un 4 % de radiación UV y alrededor del 50 % de luz visible. Por tanto una forma de aumentar la actividad fotocatalítica del  $\text{TiO}_2$  con luz solar

consiste en aumentar el rango de  $\lambda$  a las que este semiconductor responde y más concretamente, introducir respuesta del  $\text{TiO}_2$  en la zona del visible.

En este contexto se han desarrollado estrategias consistentes en el dopaje del  $\text{TiO}_2$  con elementos metálicos y no metálicos que permiten introducir actividad fotocatalítica en la zona del visible. El dopaje consiste en sustituir un pequeño porcentaje de átomos de Ti por otro metal de transición o, alternativamente, sustituir un pequeño porcentaje de oxígeno de la red por otro elemento no metálico. Teniendo en cuenta la robustez del  $\text{TiO}_2$  y la dificultad de producir modificaciones en la red del  $\text{TiO}_2$ , una de las principales limitaciones del dopaje es la falta de reproducibilidad que deriva de las condiciones drásticas requeridas para el proceso.<sup>144,147-149</sup> Además se ha descrito que los elementos dopantes tienen tendencia a migrar durante el proceso fotocatalítico como consecuencia de la generación de electrones y huecos que produce la reducción u oxidación de estos heteroátomos que finalmente son expulsados de la red. Este fenómeno conocido como fotocorrosión es particularmente notable si el proceso fotocatalítico se lleva a cabo en medio acuoso donde se puede producir el lixiviado de los heteroátomos y su migración a la fase acuosa.

Una alternativa al dopaje que ha sido recientemente empleada en nuestro grupo consiste en la deposición de AuNPs sobre la superficie del  $\text{TiO}_2$ .<sup>146</sup> De esta manera la excitación del material tiene lugar no en el semiconductor sino en la banda de plasmón superficial de la nanopartícula metálica de oro. El Esquema 1.13 ilustra la diferencia en el mecanismo de excitación del  $\text{TiO}_2$  conteniendo o no AuNPs, así como la diferencia de localización de los electrones y huecos. De esta manera la deposición de AuNPs durante el proceso de formación del  $\text{TiO}_2$  mediante la metodología del alginato debería proporcionar un material Au- $\text{TiO}_2$  que fuera fotocatalíticamente activo con luz visible. Esta fotoactividad se evaluaría en la ruptura fotocatalítica del agua para generar hidrógeno.



**Esquema 1.13.** Diferencia en el mecanismo de excitación del  $\text{TiO}_2$  conteniendo (a) o no (b) AuNPs.

## 1.5. Referencias

- (1) Henry, M. *ChemPhysChem* **2002**, 3, 561.
- (2) Henry, M. *ChemPhysChem* **2002**, 3, 607.
- (3) Mallamace, F.; Earnshaw, J. C.; Micali, N.; Trusso, S.; Vasi, C. *Physica A* **1996**, 231, 207.
- (4) Oshovsky, G. V.; Reinhoudt, D. N.; Verboom, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, 46, 2366.
- (5) Norgaard, K.; Bjornholm, T. *Chem. Commun.* **2005**, 1812.
- (6) Bhattacharyya, K. *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36, 95.
- (7) Jeffrey, G. A. *An Introduction to Hydrogen Bonding*; Oxford University Press: Oxford, 1997.
- (8) Hibbert, F.; Emsley, J. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1990**, 26, 255.
- (9) Mulliken, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 600.
- (10) Cram, D. J.; Cram, J. M. *Science* **1974**, 183, 803.
- (11) Cram, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 1009.
- (12) Kyba, E. P.; Helgeson, R. C.; Madan, K.; Gokel, G. W.; Tarnowski, T. L.; Moore, S. S.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 2564.
- (13) Rudkevich, D. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 3255.
- (14) Rudkevich, D. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 558.
- (15) Holman, K. T.; Atwood, J. L.; Steed, J. W. *Adv. Supramol. Chem.* **1997**, 4, 287.
- (16) Kirkovits, G. J.; Shriver, J. A.; Gale, P. A.; Sessler, J. L. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, 41, 69.
- (17) Wright, A. T.; Anslyn, E. V. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 14.
- (18) Lhotak, P. *Top. Curr. Chem.* **2005**, 255, 65.
- (19) Kovbasyuk, L.; Kraemer, R. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3161.

- (20) Lehn, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *100*, 91.
- (21) Kauffmann, E.; Dye, J. L.; Lehn, J. M.; Popov, A. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2274.
- (22) Amit, A. G.; Mariuzza, R. A.; Phillips, E. V.; Poljak, R. J. *Science* **1986**, *233*, 747.
- (23) Geysen, H. M.; Tainer, J. A.; Rodda, S. J.; Mason, T. J.; Alexander, H.; Getzoff, E. D.; Lerner, R. A. *Science* **1987**, *235*, 1184.
- (24) Maverick, E.; Cram, D. J. *Compr. Supramol. Chem.* **1996**, *1*, 213.
- (25) Freeman, W. A.; Mock, W. L.; Shih, N. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7367.
- (26) Mock, W. L.; Shih, N. Y. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3618.
- (27) Mock, W. L.; Shih, N. Y. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4440.
- (28) Mock, W. L.; Shih, N. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2697.
- (29) Buschmann, H. J.; Cleve, E.; Jansen, K.; Wego, A.; Schollmeyer, E. *J. Includ. Phen. Macroc. Chem.* **2001**, *40*, 117.
- (30) Buschmann, H. J.; Jansen, K.; Meschke, C.; Schollmeyer, E. *J. Solution Chem.* **1998**, *27*, 135.
- (31) Buschmann, H. J.; Jansen, K.; Schollmeyer, E. *Inorg. Chem. Commun.* **2003**, *6*, 531.
- (32) Samsonenko, D. G.; Lipkowski, J.; Gerasko, O. A.; Virovets, A. V.; Sokolov, M. N.; Fedin, V. P.; Platas, J. G.; Hernandez-Molina, R.; Mederos, A. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 2380.
- (33) Buschmann, H. J.; Jansen, K.; Schollmeyer, E. *Thermochimica Acta* **2000**, *346*, 33.
- (34) Rekharsky, M. V.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, K.; Inoue, Y. *Supramolecular Chemistry* **2007**, *19*, 39.
- (35) Buschmann, H. J.; Jansen, K.; Schollmeyer, E. *Acta Chim. Slov.* **1999**, *46*, 405.
- (36) Buschmann, H. J.; Jansen, K.; Schollmeyer, E. *J. Includ. Phen. Macroc. Chem.* **2000**, *37*, 231.
- (37) Buschmann, H. J.; Mutihac, L.; Jansen, K. *J. Includ. Phen. Macroc. Chem.* **2001**, *39*, 1.
- (38) Jansen, K.; Wego, A.; Buschmann, H. J.; Schollmeyer, E. *Vom Wasser* **2000**, *95*, 229.
- (39) Buschmann, H. J.; Mutihac, L.; Jansen, K.; Schollmeyer, E. *J. Includ. Phen. Macroc. Chem.* **2005**, *53*, 281.
- (40) Buschmann, H. J.; Jansen, K.; Schollmeyer, E. *Thermochim. Acta* **1998**, *317*, 95.
- (41) Buschmann, H. J.; Schollmeyer, E.; Mutihac, L. *Thermochimica Acta* **2003**, *399*, 203.
- (42) Buschmann, H. J.; Mutihac, L.; Mutihac, R.-C.; Schollmeyer, E. *Thermochimica Acta* **2005**, *430*, 79.
- (43) Cong, H.; Tao, L.-L.; Yu, Y.-H.; Yang, F.; Du, Y.; Tao, Z.; Xue, S.-F. *Asian J. Chem.* **2007**, *19*, 961.
- (44) Freeman, W. A. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **1984**, *B40*, 382.
- (45) Mock, W. L.; Shih, N. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4706.
- (46) Hoffmann, R.; Knoche, W.; Fenn, C.; Buschmann, H. J. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1994**, *90*, 1507.
- (47) Lee, C.; Sung, Y. W.; Park, J. W. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 893.
- (48) Tuncel, D.; Steinke, J. H. G. *Book of Abstracts, 218th ACS National Meeting New Orleans, Aug. 22-26, 1999.*

- (49) Tuncel, D.; Steinke, J. H. G. *Chem. Commun.* **1999**, 1509.
- (50) Hubin, T. J.; Kolchinski, A. G.; Vance, A. L.; Busch, D. H. *Adv. Supramol. Chem.* **1999**, 5, 237.
- (51) Meschke, C.; Buschmann, H. J.; Schollmeyer, E. *Polymer* **1998**, 40, 945.
- (52) Gladfelter, W. L. *Chemtracts* **1997**, 10, 363.
- (53) Whang, D.; Kim, K. J. *Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 451.
- (54) Kim, S.-Y.; Lee, J. W.; Han, S. C.; Kim, K. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2005**, 26, 1265.
- (55) Masson, E.; Ling, X.; Joseph, R.; Kyeremeh-Mensah, L.; Lu, X. *RSC Advances* **2012**, 2, 1213.
- (56) Day, A. I.; Blanch, R. J.; Coe, A.; Arnold, A. P. *J. Inclusion Phen. Macroc. Chem.* **2002**, 43, 247.
- (57) Choi, S.; Park, S. H.; Ziganshina, A. Y.; Ko, Y. H.; Lee, J. W.; Kim, K. *Chem. Commun.* **2003**, 2176.
- (58) Jeon Young, J.; Kim, H.; Jon, S.; Selvapalam, N.; Oh Dong, H.; Seo, I.; Park, C.-S.; Jung Seung, R.; Koh, D.-S.; Kim, K. J. *Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15944.
- (59) Marquez, C.; Huang, F.; Nau Werner, M. *IEEE Trans Nanobioscience* **2004**, 3, 39.
- (60) Cram, D. J. *J. Inclusion Phenom.* **1988**, 6, 397.
- (61) Cram, D. J. *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1041.
- (62) Meschke, C.; Buschmann, H. J.; Schollmeyer, E. *Thermochim. Acta* **1997**, 297, 43.
- (63) Buschmann, H. J.; Wego, A.; Jansen, K.; Schollmeyer, E.; Doepp, D. *J. Inclusion Phen. Macroc. Chem.* **2005**, 53, 183.
- (64) Gerasko, O. A.; Samsonenko, D. G.; Fedin, V. P. *Russian Chem. Rev.* **2002**, 71, 741.
- (65) Dalgarno, S. J.; Hardie, M. J.; Raston, C. L. *Chem. Commun.* **2004**, 2802.
- (66) Chung, T. D.; Kim, H. J. *Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1998**, 32, 179.
- (67) Whang, D.; Heo, J.; Park, J. H.; Kim, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, 37, 78.
- (68) Carmichael, I.; Helman, W. P.; Hug, G. L. *J. Phys. Chem. B* **1987**, 16, 239.
- (69) Kim, K.; Selvapalam, N.; Oh, D. H. *J. Incl. Phenomena Macrocycl. Chem.* **2004**, 50, 31.
- (70) Allonas, X.; Jacques, P.; Accary, A.; Kessler, M.; Heisel, F. *J. Fluoresc.* **2000**, 10, 237.
- (71) Alvaro, M.; Aprile, C.; Benitez, M.; Bourdelande, J. L.; Garcia, H.; Herance, J. R. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, 414, 66.
- (72) Zhang, X. X.; Krakowiak, K. E.; Xue, G.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2000**, 39, 3516.
- (73) Choi, J.-W.; Oh, B.-K.; Kim, Y.-K.; Min, J. J. *Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 17, 5.
- (74) Jeon, W. S.; Kim, H.-J.; Lee, C.; Kim, K. *Chem. Commun.* **2002**, 1828.
- (75) Kim, H.-J.; Jeon, W. S.; Ko, Y. H.; Kim, K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, 5007.
- (76) Anon *Anal. Chem.* **2002**, 239A, Anal. Chem.
- (77) (Herrmann, K., Germany; Knittel, Heinz). Application: DE, 2004, p. 14 pp.
- (78) Lorenzo, S.; Day, A.; Craig, D.; Blanch, R. J.; A. Arnold; Dance, I. *CrystEngComm* **2001**, Paper No 49.

- (79) Blanch, R. J.; Sleeman, A. J.; White, T. J.; Arnold, A. P.; Day, A. I. *Nano Letters* **2002**, *2*, 147.
- (80) Jeon, Y.-M.; Kim, J.; Whang, D.; Kim, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9790.
- (81) Sobransingh, D.; Kaifer, A. E. *Langmuir* **2006**, *22*, 10540.
- (82) Constabel, F.; Geckeler, K. E. *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures* **2004**, *12*, 811.
- (83) K. E. Geckeler; F. Constabel; (Kwangju Institute of Science and Technology, S. K.; Application: US, p. p. **2004**.
- (84) Constabel, F.; Geckeler, K. E. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 2071.
- (85) Jiang, G.; Li, G. *J. Photochem. Photobiol., B: Biology* **2006**, *85*, 223.
- (86) Constabel, F.; Geckeler, K. E. *Functional Nanomaterials* **2006**, 377.
- (87) Mori, T.; Ko, Y. H.; Kim, K.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3232.
- (88) Ziganshina, A. Y.; Ko, Y. H.; Jeon, W. S.; Kim, K. *Chem. Commun.* **2004**, 806.
- (89) Kim, H.-J.; Heo, J.; Jeon, W. S.; Lee, E.; Kim, J.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 1526.
- (90) Kim, S.-Y.; Jung, I.-S.; Lee, E.; Kim, J.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2119.
- (91) Karcher, S.; Kornmuller, A.; Jekel, M. *Water Sci. Technol.* **1999**, *40*, 425.
- (92) Karcher, S.; Kornmueller, A.; Jekel, M. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **1999**, *27*, 38.
- (93) Karcher, S.; Kornmueller, A.; Jekel, M. *Biol. Abwasserreinig.* **1997**, *9*, 131.
- (94) Karcher, S.; Kornmuller, A.; Jekel, M. *Water Research* **2001**, *35*, 3309.
- (95) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 4844.
- (96) Heaven, M. W.; Atwood, J. L.; Barbour, L. J.; Raston, C. L. *Abstracts of Papers, 223rd ACS National Meeting*, Orlando, FL, United States, April 7-11, 2002.
- (97) Germain, P.; Letoffe, J. M.; Merlin, M. P.; Buschmann, H. J. *Thermochim. Acta* **1998**, *315*, 87.
- (98) Houk, K. N.; Leach, A. G.; Kim, P.; Zhang, X. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 4872.
- (99) Dearden, D. V.; Zhang, H. *Abstracts of Papers, 229th ACS National Meeting* San Diego, CA, United States, March 13-17,, 2005.
- (100) Kamat, P. V.; Lichtin, N. N. *Isr. J. Chem.* **1982**, *22*, 113.
- (101) Ding, Y.; Zhang, X.; Liu, X.; Guo, R. *Colloids Surf., A* **2006**, *290*, 82.
- (102) Ban, T.; Yamaguchi, K.; Goto, Y. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 663.
- (103) El Haouaj, M.; Young, H. K.; Luhmer, M.; Kim, K.; Bartik, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 2104.
- (104) El Haouaj, M.; Luhmer, M.; Ko, Y. H.; Kim, K.; Bartik, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 804.
- (105) Jiao, D.; Zhao, N.; Scherman, O. A. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2007.
- (106) Nagarajan, E. R.; Oh Dong, H.; Narayanan, S.; Ko, Y. H.; Park, K. M.; Kim, K. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 2073.



- (107) Montes-Navajas, P.; Corma, A.; Garcia, H. *Chem.Phys.Chem* **2008**, *9*, 713.
- (108) Montes-Navajas, P.; Garcia, H. *J. Photochem. and Photob. A: Chemistry* **2009**, *204*, 97.
- (109) Antonov, L.; Gergov, G.; Petrov, V.; Kubista, M.; Nygren, J. *Talanta* **1999**, *49*, 99.
- (110) Blears, D. J.; Danyluk, S. S. *J. Am. Chem.Soc.* **1966**, *88*, 1084.
- (111) Turner, A. P.; Magan, N. *Microbiology* **2004**, *2*, 161.
- (112) Bastos, A. C.; Magan, N. *Sens.Actuators B* **2007**, *B125*, 556.
- (113) Baumes, L. A.; Buaki, M.; Montes-Navajas, P.; Corma, A.; Garcia, H. *Sensor Lett.* **2010**, *8*, 709.
- (114) Reinhoudt, D. N.; Crego-Calama, M. *Science* **2002**, *295*, 2403.
- (115) Langford, S. J.; Perez-Garcia, L.; Stoddart, J. F. *Supramol. Chem.* **1995**, *6*, 11.
- (116) Lehn, J.-M. *Science* **2002**, *295*, 2400.
- (117) Gillard, R. E.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F. *Chem.-Eur. J.* **1997**, *3*, 1933.
- (118) Percece, V.; Ungar, G.; Peterca, M. *Science* **2006**, *313*, 55.
- (119) Yagai, S.; Karatsu, T.; Kitamura, A. *Chem.-Eur. J.* **2005**, *11*, 4054.
- (120) Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 24.
- (121) De Mendoza, J. *Chem.--Eur. J.* **1998**, *4*, 1373.
- (122) Raymo, F. M.; Stoddart, J. F. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1998**, *3*, 150.
- (123) Stang, P. J.; Olenyuk, B. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 502.
- (124) Claessens, C. G.; Stoddart, J. F. *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, *10*, 254.
- (125) Jim, A. T. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 856.
- (126) Balzani, V.; Credi, A.; Venturi, M. *Chem.-Eur. J.* **2002**, *8*, 5524.
- (127) Juarez, R.; Martin, R.; Alvaro, M.; Garcia, H. *Appl.Cat. A* **2009**, *369*, 133.
- (128) Montes-Navajas, P.; Corma, A.; Garcia, H. *J.Molec.Cat. A* **2008**, *279*, 165.
- (129) Marquis, S.; Ferrer, B.; Alvaro, M.; Garcia, H. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 6034.
- (130) Alvaro, M.; Aprile, C.; Ferrer, B.; Sastre, F.; García, H. *Dalton Trans.* **2009**, 7437.
- (131) Navalon, S.; Martin, R.; Alvaro, M.; Garcia, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 8403.
- (132) Stratakis, M.; Garcia, H. **2012**, [dx.doi.org/10.1021/cr3000785](https://doi.org/10.1021/cr3000785).
- (133) Wintgens, V.; Biczok, L.; Miskolczy, Z. *Supramol. Chem.* **2010**, *22*, 612.
- (134) Stokke, B. T.; Smidsrod, O.; Bruheim, P.; Skjak-Braekt, G. *Macromolecules* **1991**, *24*, 4637.
- (135) Stokke, B. T.; Draget, K. I.; Smidsrod, O.; Yuguchi, Y.; Urakawa, H.; Kajiwara, K. *Macromolecules* **2000**, *33*, 1853.
- (136) Agulhon, P.; Constant, S.; Chiche, B.; Lartigue, L.; Larionova, J.; Di Renzoa, F.; Quignard, F. *Catal. Today* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2012.03.052>.
- (137) Chtchigrovsky, M.; Lin, Y.; Ouchauou, K.; Chaumontet, M.; Robitzer, M.; Quignard, F.; Taran, F. *Chem.Mater* **2012**, *24*, 1505.
- (138) Monakhova, Y.; Agulhon, P.; Quignard, F.; Tanchoux, N.; Tichit, D. *Catal. Today* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2012.03.072>.
- (139) Primo, A.; Liebel, M.; Quignard, F. *Chem. Mater* **2009**, *21*, 621.
- (140) James, S. L. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 276.

- (141) Primo, A.; Marino, T.; Corma, A.; Molinari, R.; García, H. *J. Am. Chem.Soc.* **2011**, *133*, 6930.
- (142) Xu, H.; Chen, X.; Ouyang, S.; Kako, T.; Ye, J. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 3833.
- (143) Justicia, I.; Garcia, G.; Battiston, G. A.; Gerbasi, R.; Ager, F.; Guerra, M.; Caixach, J.; Pardo, J. A.; Rivera, J.; Figueras, A. *Electrochim. Acta* **2005**, *50*, 4605.
- (144) Ma, T.; Akiyama, M.; Abe, E.; Imai, I. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2543.
- (145) Ren, M.; Ravikrishna, R.; Valsaraj, K. T. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 7029.
- (146) Gomes-Silva, C.; Juarez, R.; Marino, T.; Molinari, R.; Garcia, H. *J. Am. Chem.Soc.* **2011**, *133*, 595.
- (147) Xiong, Z.; Zhao, X. S. *J. Am. Chem.Soc.* **2012**, *134*, 5754.
- (148) Zhang, H.; Chen, G.; Bahnemann, D. W. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 5089.
- (149) Chen, Q.; Shi, H.; Shi, W.; Xu, Y.; Wua, D. *Catal. Sci. Technol* **2012**, *2*, 1213.

## **CAPÍTULO 2: OBJETIVOS**

---

La presente tesis doctoral va encaminada a profundizar y obtener información adicional sobre los procesos de asociación basados en interacciones no covalentes tanto de moléculas complementarias como de moléculas idénticas. De esta manera una serie de capítulos se basan en la posibilidad de formar complejos de inclusión entre colorantes fluorescentes tricíclicos y CB[n] de tamaños diferentes y la aplicación de estos complejos en matrices de sensores que sirvan para la detección y cuantificación de analitos en agua. En el desarrollo de este objetivo se estudiarán como analitos tanto sales de amonio como aminoácidos y el  $\gamma$ -hidroxibutirato. Además de su aplicación en sensores, la formación de complejos supramoleculares con CBs se ampliará a otros sustratos orgánicos con estructuras derivadas de anilinas e imidazol. Un punto de especial interés será determinar si las fuerzas hidrofóbicas responsables de la formación de complejos de CB[n] en agua se ven alteradas o no en el proceso de auto-ensamblaje utilizando como moléculas para el estudio líquidos iónicos con estructura de imidazol y cadenas  $\omega$ -alquénicas de longitud larga capaces de sufrir procesos de auto-asociación. Por último la agregación y la formación de complejos se aplicará para desarrollar un sistema innovador de formación de nanopartículas de óxido de titanio conteniendo oro, las cuales serán sintetizadas a partir de los complejos entre alginatos naturales y precursores catiónicos con un solo átomo de titanio.

En particular los objetivos específicos de la presente tesis doctoral y que se corresponden con cada uno de los capítulos de la sección de resultados son los siguientes:

1. Desarrollo de matrices de sensores basados en complejos supramoleculares huésped-hospedador entre colorantes fluorescentes tricíclicos y CBs o ciclodextrinas de diferentes tamaños para la detección y cuantificación de sales de amonio cuaternarias y aminoácidos.

2. Desarrollo de una matriz de sensores basados en colorantes fluorescentes tricíclicos y CBs para la detección y cuantificación del  $\gamma$ -hidroxibutirato en agua. El  $\gamma$ -hidroxibutirato es una droga ilegal para la que no existen métodos colorimétricos de análisis.
3. Determinar la formación de complejos huésped-hospedador y las correspondientes constantes de complejación entre  $\alpha$ -amino acetanilidas derivadas de la anilina y la orto- y para- fenilendiamina. Se pretende determinar la estequiometría de formación de los posibles complejos y sus constantes de asociación en disolución a fin de aplicar la información obtenida en el desarrollo de sílices que contengan covalentemente anclados a las partículas unidades análogas a estas acetanilidas.
4. Estudio del auto-ensamblaje de líquidos iónicos derivados de anillos de imidazolio sustituidas simétricamente con grupos  $\omega$ -alqueno de cadena larga. Se establecerá la posibilidad de incluir en el interior de la región hidrofóbica nanopartículas de oro y el estudio de la actividad catalítica de las mismas
5. Determinación de la constante de asociación en disoluciones diluidas de líquidos iónicos derivados del imidazolio sustituidos simétricamente con cadenas  $\omega$ -alqueno de cadena larga y como el proceso de auto-ensamblaje en concentraciones superiores a la concentración crítica de auto-ensamblaje influye en la formación de complejos de inclusión líquido iónico-CB[n].
6. Obtención y propiedades fotocatalíticas de un óxido de titanio nanoparticulado conteniendo o no nanopartículas de oro por combustión en condiciones controladas del complejo entre alginatos naturales y el catión titanilo.

La consecución de estos objetivos servirá para desarrollar nuevos sensores colorimétricos y fluorimétricos en agua para la detección de varios tipos de compuestos orgánicos no deseados, así como para conseguir información sobre los procesos de auto-ensamblaje de moléculas con estructura de líquido iónico y de cómo su complejación con CBs se ve influida por el auto-ensamblaje de estas

moléculas. Además se estudiará la asociación de CB con derivados de anilina tanto en disolución como en fase sólida. Por último, la formación de complejos de coordinación con un biopolímero natural servirá para la preparación de un material que debido a la morfología y tamaño de partícula pequeño podría presentar una actividad fotocatalítica elevada, superior a la que exhiben fotocatalizadores de  $\text{TiO}_2$  comerciales.



### ***CAPÍTULO 3: SENSORES COLORIMÉTRICOS BASADOS EN SERIES DE COLORANTES Y SUS COMPLEJOS Y ENCAPSULACIÓN CON CICLODEXTRINAS Y CUCURBIT[n]URILES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SALES DE AMONIO Y AMINOÁCIDOS.***

---

---

#### **3.1. Introducción**

Las sales de amonio cuaternarias (SACs) son de gran aplicación como surfactantes, particularmente en formulaciones de detergentes de uso doméstico y en productos de limpieza. Las sales de amonio cuaternarias también se usan como algicidas en piscinas, como agentes bactericidas y como desinfectantes. Estos compuestos son agentes de desinfección recomendados en la industria alimentaria para evitar la proliferación de levaduras y hongos así como otros microorganismos patógenos tales como *Listeria monocytogenes*.<sup>1</sup>

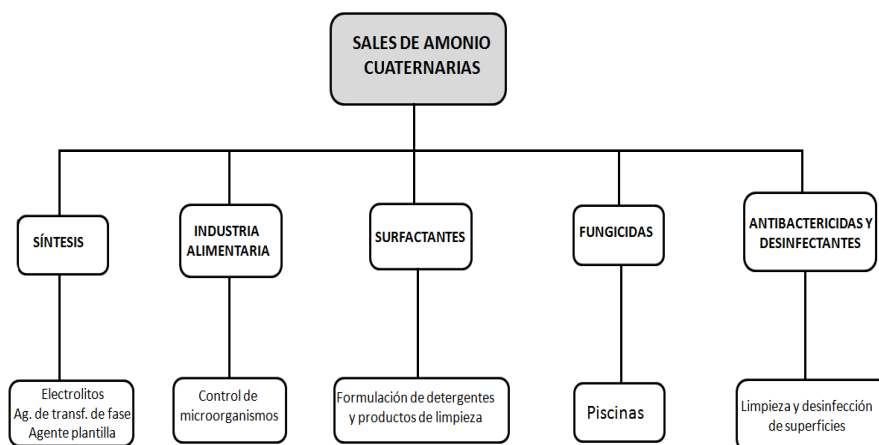
Hay un amplio rango de otros usos relativamente menores donde también se emplean sales de amonio cuaternarias y que van desde su uso como electrolitos, compuestos para electrólisis, agentes de transferencia de fase, líquidos iónicos e incluso como agentes plantilla en síntesis inorgánica.

La mayoría de las aplicaciones de esta clase de compuestos orgánicos nitrogenados implica su uso directo en disolución acuosa o, de forma indirecta, en operaciones de lavado y desecho, donde estos compuestos acaban apareciendo en aguas residuales, produciendo una contaminación indeseable.

Las SACs en concentraciones superiores a un cierto límite pueden jugar efectos adversos en humanos, por ello, su presencia en alimentos debe ser evitada. Considerando el amplio uso de las sales de amonio cuaternarias y los efectos negativos potenciales, existe un interés creciente por su detección como parte de la inspección y análisis de aguas, control de calidad en la industria alimentaria y determinación de parámetros de calidad

medioambiental. Por consiguiente, es de interés desarrollar sensores químicos simples que no solo sirvan para detectar esta clase de compuestos, sino que también puedan identificar su estructura y cuantificar su concentración.

El desarrollo de sensores que sean capaces de dar resultados de forma rápida y fiable tales como matrices de sensores químicos representa uno de los campos emergentes de crecimiento más rápido en el área de Química Analítica basada en técnicas no convencionales.<sup>2-5</sup> Los sensores químicos colorimétricos para la detección de compuestos orgánicos son un tipo de técnicas de bajo coste, rápidas y muy prácticas que no requieren de personal especializado o de equipamiento especial dedicado para este menester.



**Esquema 3.1.** Principales usos y aplicaciones de SACs

A pesar del impacto ambiental y del amplio uso de las SACs, el número de técnicas analíticas aplicables para su caracterización es muy limitado, particularmente comparado con aminas y otros compuestos nitrogenados de carácter básico. Cuando el contraión no presenta propiedades ácido-base, las SACs son neutras y a parte de la carga positiva no poseen factores estructurales generales tales como pares de electrones solitarios o enlaces de hidrógeno polares en los que se pueda basar el diseño de sensores específicos.



Se han propuesto en la literatura científica especializada algunos métodos de análisis para determinar la concentración de SACs en agua<sup>6,7</sup> o en medios más complejos tales como en alimentos<sup>1,7,8</sup> y surfactantes.<sup>9</sup> Generalmente, la detección y cuantificación de SACs puede llevarse a cabo por técnicas cromatográficas,<sup>1,9</sup> potenciométricas,<sup>10</sup> o espectroscópicas, pero estas técnicas analíticas instrumentales requieren el uso de equipos especiales además de consumir tiempo y necesitar de pre-tratamientos de las muestras. Así, la cromatografía líquida en fase reversa ha sido aplicada a la detección de SACs en leche.<sup>1</sup> Por otra parte, las SACs pueden ser valoradas indirectamente en algunos casos determinando la concentración del contraión correspondiente. Este método es particularmente útil cuando el anión de compensación es un haluro o posee propiedades ácidas ( $\text{HSO}_4^-$ ) o básicas ( $\text{OH}^-$ ).<sup>11,12</sup> Obviamente, esta aproximación puede ser de utilidad en algunos casos pero no es de aplicación general porque no se basa en la detección directa del componente de amonio cuaternario.

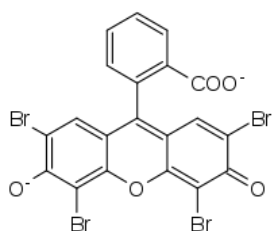
Existen precedentes en la literatura especializada describiendo la detección directa de SACs basados en métodos colorimétricos. Por ejemplo, la concentración de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTMA), bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TDTMA), y bromuro de octadeciltrimetilamonio (ODTMA) ha sido determinada por valoración con disoluciones de tetrafenilborato sódico con amarillo de metilo como indicador.<sup>6</sup>

Algunos de los métodos colorimétricos explotan la habilidad de estos compuestos para actuar como agentes de transferencia de fase. Así, la influencia de la presencia de SACs en el coeficiente de reparto de un colorante entre una fase acuosa y otra orgánica en contacto puede servir para la detección de este tipo de SACs. Sin embargo, esta metodología presenta el problema de interferencia de otros agentes de transferencia de fase, además del hecho de que las SACs con cadenas alquílicas cortas no actúan como catalizadores de transferencia de fase. Además la detección basada en el coeficiente de reparto de un colorante no permite identificar la estructura química de la SAC. Otros protocolos colorimétricos están basados en la precipitación de un colorante aniónico tal como la eosina debido a la formación de una sal insoluble por apareamiento iónico con los iones de

amonio cuaternario. Este procedimiento usando eosina como indicador (ver estructura en Figura 3.1) ha sido propuesto para la detección y cuantificación de SACs en leche con un límite de detección de 5 ppm.<sup>8,12,13</sup>

Tests colorimétricos basados en tiras de papel han sido comercializados para detectar SACs en soluciones de desinfección (ver Figura 3.1). Estos test colorimétricos se han descrito como especialmente útiles en la detección de alquildimetilbencilamonio (benzalconio)<sup>14,15</sup> y didecildimetilamonio en utensilios de cocina y en superficies en contacto con alimentos.<sup>16</sup> Sin embargo estos papeles para evaluación colorimétrica no proporciona una respuesta individual diferenciada para SACs diferentes. Por ejemplo, no permiten distinguir entre el bromuro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTMA), cloruro de hexadecilpiridinio, bromuro de dodeciltrimetilamonio (DDTMA) y cloruro de octadeciltrimetilamonio (ODTMA) los cuales todos ellos darían positivo en la evaluación produciendo un viraje en el color de la tira de papel del color inicial amarillo verdoso al color azul turquesa.<sup>15</sup> Por consiguiente, el estado del arte al inicio del presente trabajo se puede resumir como que no existían sensores químicos colorimétricos que fueran capaces de identificar la estructura química individual de varias SACs en disoluciones acuosas.

La ventaja de una matriz de sensores en términos de simplicidad y exactitud nos condujo a explorar la posibilidad de emplear una matriz de sensores basados en complejos supramoleculares huésped-hospedador para la detección e identificación de SACs en medios acuosos.



(a)



(b)

**Figura 3.1.** Estructura de la Eosina Y (a) e imagen del papel para test colorimétrico; ambos se utilizan en la detección de SACs.

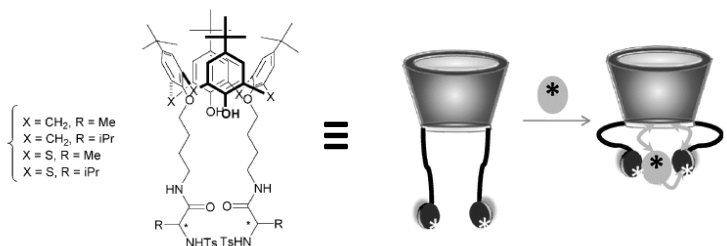
De manera similar a las SACs, los aminoácidos son unidades básicas de muchas biomoléculas que se encuentran ampliamente presentes en el medio ambiente. Aunque para este tipo de compuestos se conocen ya numerosos sistemas de detección<sup>17</sup> existe todavía la necesidad de desarrollar nuevos sensores que de forma simple permitan la discriminación visual de aminoácidos. La determinación de la presencia de aminoácidos tiene un gran interés en diferentes campos que van desde la industria alimentaria y análisis de aguas<sup>18-21</sup>, ensayos clínicos<sup>22,23</sup> y diagnóstico de enfermedades tales como el Alzheimer<sup>24</sup>, pancreatitis<sup>25</sup>, y en otros campos en biología.<sup>26</sup>

En todos estos casos, la habilidad para analizar los diferentes aminoácidos y sus derivados de una forma rápida y sencilla constituiría una herramienta de gran utilidad.

Igual que en el caso de las SACs que se acaba de comentar, la mayoría de los procedimientos analíticos para detectar y caracterizar aminoácidos más usados están basados en métodos espectroscópicos,<sup>24,27-29</sup> cromatográficos,<sup>18,19,30-32</sup> o electroquímicos.<sup>33-37</sup> Además de técnicas instrumentales se han descrito igualmente, sensores químicos colorimétricos y fluorimétricos para la detección de aminoácidos.<sup>26,38,39</sup> Los avances más recientes en este campo de detección de aminoácidos se han centrado en el uso de métodos colorimétricos para la discriminación enantioselectiva de aminoácidos.<sup>40-42</sup> Sin embargo, mientras que estas contribuciones encuentran aplicación en síntesis orgánica para determinar los valores de excesos enantioméricos de mezclas de aminoácidos D y L, su uso para establecer la identidad de aminoácidos naturales es limitado puesto que no permiten diferenciar entre cada uno de los aminoácidos individuales.

Los macrociclos juegan un papel destacado en el fenómeno de reconocimiento quiral<sup>43</sup> habiéndose descrito ejemplos donde se determina la fluorescencia para derivados de  $\alpha$ -aminoácidos basándose el reconocimiento quiral en un fenómeno de encapsulación.<sup>44-47</sup> De

manera análoga la funcionalización de polímeros conductores ha sido empleada como plataforma para la detección de aminoácidos.<sup>48,49</sup>



*New J. Chem.*, 2009, 33, 2128–2135

**Figura 3.2.** Macrociclos funcionalizados para reconocimiento quiral.

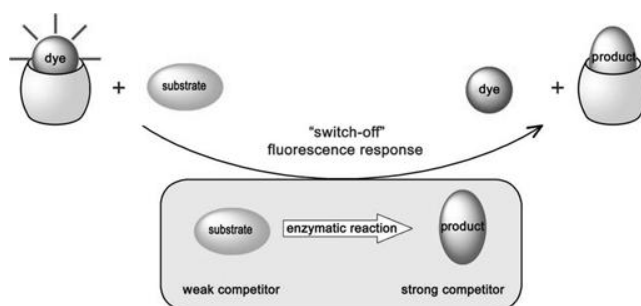
Aunque una lista exhaustiva de sensores químicos para aminoácidos no es necesaria para los propósitos del presente capítulo, parece claro que los procedimientos actualmente recomendados para el análisis de aminoácidos tienen unas limitaciones entre las que destacan la necesidad de equipamiento y de personal especializado, procedimientos de análisis complicados, elevado coste, técnicas que requieren tiempos de análisis largos, límites de detección elevados o incluso grandes cantidades de muestra.

Por ejemplo algunos métodos espectroscópicos requieren la derivatización previa de los aminoácidos y el análisis de inyección de flujo necesita la preparación de grandes cantidades de reactivo. Por otra parte los métodos amperométricos están limitados por la pasivación de la superficie de los electrodos y las medidas de absorbancia UV-VIS presentan problemas cuando se dispone de volúmenes muy pequeños o de bajas concentraciones.

En el presente capítulo vamos a describir tanto para el caso de SACs como para aminoácidos, matrices para detección colorimétrica y fluorimétrica basadas en complejos supramoleculares entre colorantes tricíclicos básicos y CBs.<sup>5,50-55</sup> Estos complejos supramoleculares de inclusión van a permitir la detección inmediata y la discriminación

tanto para SACs como para  $\alpha$ -aminoácidos mediante el análisis de las imágenes de la matriz de sensores en presencia de estos analitos.

Un precedente relacionado en el uso de CBs y la molécula fluorescente dapoxil en combinación con enzimas descarboxilasas específicas ha sido descrito para la identificación de ciertos aminoácidos.<sup>47,48</sup> El procedimiento de operación de este sistema enzimático se ilustra en la Figura 3.3. Sin embargo el hecho de que cada  $\alpha$ -aminoácido requiera de un enzima descarboxilasa diferente para su identificación constituye una limitación importante en este procedimiento puesto que en la mayoría de los casos estas enzimas no están disponibles comercialmente y por consiguiente no son de fácil disponibilidad. Por otra parte, la velocidad de las reacciones enzimáticas puede verse afectada por la presencia de inhibidores que pueden alterar el ensayo inhibiendo el enzima resultando en falsos negativos.



*Chem. Eur. J.* 2008, 14, 6069–6077

**Figura 3.3** Uso de reacciones enzimáticas y complejos hospedador-huésped en la detección de aminoácidos basado en la referencia 47.

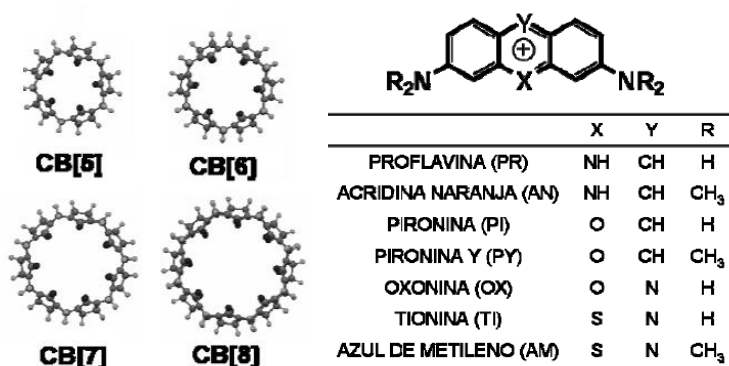
El desarrollo de sensores específicos para cada analito presenta como inconveniente la necesidad de síntesis orgánica, a veces complicada, e implicaría el uso de sensores específicos diferentes para cada analito. En contraste a esta aproximación, el uso de una matriz múltiple de sensores químicos<sup>4,56</sup> representa una alternativa atractiva frente a los métodos clásicos de detección a la vez que permite la discriminación de un gran número de analitos usando solo un número limitado de sensores.

### 3.2. Resultados y discusión

El Esquema 3.2 contiene la estructura general tanto de los CBs como de los colorantes tricíclicos usados en el presente capítulo. Cada elemento en la matriz del sensor químico es solo parcialmente selectivo y es la respuesta global de la matriz la que debe ser analizada y la que resulta ser específica para cada analito.

Esta estrategia de análisis basada en una matriz requiere sensores individuales menos sofisticados y selectivos, los cuales se encuentran frecuentemente disponibles comercialmente.

Se han descrito algunas matrices de sensores colorimétricos o fluorimétricos para determinación de aminoácidos,<sup>42,57,58</sup> pero el sistema que se presenta en este capítulo combina una mayor capacidad de discriminación, un criterio fiable de detección y el que los colorantes y las cápsulas se encuentran disponibles comercialmente.



**Esquema 3.2.** Estructura de los colorantes tricíclicos básicos y CBs usados en la preparación de las matrices de sensores.

En el presente caso se han utilizado las cápsulas orgánicas CB[5], CB[6], CB[7] y CB[8] las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrinas y 6 colorantes, la mayoría de ellos fluorescentes y de estructura simple

tales como la proflavina (PF), oxonina (OX), pironina Y (PYY), naranja de acridina (AO), azul de metileno (MB) y tionina (TH).

Esta combinación de cápsulas y colorantes fue ensayada como matriz de sensores colorimétrica para la discriminación de una serie de catorce SACs diferentes cuya estructura se muestra en la Tabla 3.1.

A pesar de que cada componente del sistema presenta individualmente una baja selectividad, la imagen global obtenida para la matriz de sensores demuestra una capacidad de discriminación sobresaliente.

Este comportamiento de la matriz de sensores se consigue debido a un conjunto de cápsulas orgánicas y colorantes no específicos pero cuya respuesta global es efectiva para la discriminación individual entre las SACs ensayadas. Esta eficiencia de la matriz de sensores sirve para conseguir la identificación fiable tanto de las catorce SACs como de los veinte  $\alpha$ -aminoácidos estudiados. En primer lugar presentaremos el comportamiento de la matriz de sensores para las SACs y posteriormente para los  $\alpha$ -aminoácidos.

### ***3.2.1. Matriz de sensores colorimétricos para detección de sales de amonio cuaternario (SAC)***

La matriz de sensores fue capaz de discriminar entre las catorce SACs, algunas de las cuales se diferencian únicamente en pequeñas variaciones estructurales. La capacidad de la matriz es debida principalmente a la diversidad de interacciones entre los analitos y los complejos huésped-hospedador.

La evaluación colorimétrica descrita en este capítulo se basa en la carga positiva que presenta la SAC y en el tamaño y polaridad de la molécula en su conjunto, siendo posible diferenciar todas las SACs que han sido ensayadas.

Específicamente nuestro sistema de sensores se basa en la influencia del ión amonio cuaternario en los complejos huésped-hospedador de CB[7] y CB[8] (cápsulas para las que

se obtuvo la respuesta colorimétrica) con los colorantes tricíclicos básicos mencionados.<sup>54,55,59-63</sup>

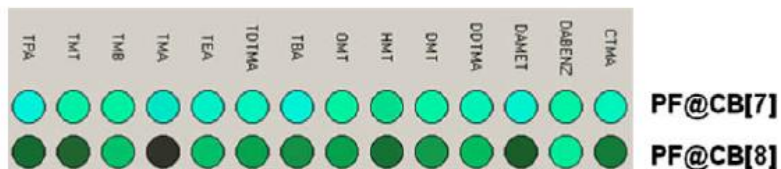
**Tabla 3.1.** Nombre, estructura y fórmula molecular para las catorce SAC utilizadas como analito en la matriz de sensores colorimétricos.

Abreviatura	Form. Molecular	Estructura	Nombre
DABMET	$C_8H_{18}N_2$		1,4-Dimetil-1,4diazoniobiciclo[2.2.2]octano
DABENZ	$C_{20}H_{26}N_2$		1,4-Dibencil-4-aza-1-azonia-biciclo[2.2.2]octano
DMT	$C_{16}H_{38}N_2$		Decametonio-N,N,N',N'-hexametil-decimetilendiamonio
OMT	$C_{14}H_{34}N_2$		Octametonio-N,N,N',N'-hexametil-octametilendiamonio
HMT	$C_{12}H_{30}N_2$		Decametonio-N,N,N',N'-hexametil-hexametilendiamonio
TMT	$C_{10}H_{26}N$		Tetraametonio-N,N,N',N'-hexametil-tetrametilendiamonio
CTMA	$C_{19}H_{42}N$		Cetiltrimetilamonio
TDTMA	$C_{17}H_{38}N$		Tetradeciltrimetilamonio
DDTMA	$C_{15}H_{34}N$		Dodeciltrimetilamonio
TMA	$C_4H_{12}N$		Tetrametilamonio
TEA	$C_8H_{20}N$		Tetraetilamonio
TPA	$C_{12}H_{28}N$		Tetrapropilamonio
TBA	$C_{16}H_{37}N$		Tetrabutilamonio
TMB	$C_{10}H_{16}N$		Benciltrimetilamonio

Debido a la afinidad de los grupos carbonilo presentes en los portales de los CBs con las especies cargadas positivamente, las SACs interaccionan con CBs e influyen en el complejo colorante-CB[n] produciendo cambios en el color y en la emisión de fluorescencia. La unión del analito al receptor afecta el complejo huésped-hospedador produciendo una respuesta la cual se traduce en cambios de color, en cambios en los espectros de absorción y en los



espectros de emisión. A modo de ejemplo la Figura 3.4 muestra la respuesta de las catorce SACs objeto de estudio para el complejo supramolecular formado por el colorante PF y las cápsulas CB[7] y CB[8].



**Figura 3.4.** Respuesta colorimétrica de las catorce SACs en disolución acuosa frente a los complejos supramoleculares PF@CB[7] y PF@CB[8]. Todas las SAC se encuentran a una concentración  $10^{-3}$  M y la imagen ha sido obtenida mediante iluminación con luz UV. Los códigos correspondientes a cada SAC son los que se indican en la Tabla 3.1.

Así procesando las variaciones en la imagen obtenida con luz visible (colorimetría) o mediante iluminación con luz UV (fluorimetría) y determinando la posición para cada color en el espacio euclidiano definido por los tres colores básicos, rojo, verde y azul (RGB) es posible la identificación y discriminación inequívoca de las SAC.

La matriz de sensores químicos en la que se basa el presente capítulo para identificar SACs y  $\alpha$ -aminoácidos ha sido previamente desarrollada en nuestro grupo para la detección de aminas.<sup>64</sup> En una placa rectangular para análisis por gotas cada fila es dosificada con uno de los seis colorantes, mientras las cápsulas orgánicas y agua son distribuidas en columnas. La columna donde no se hallan presente CB[n] proporciona una referencia que demuestra la función que la formación del complejo entre las capsulas orgánicas y los colorantes juega en el fenómeno de la discriminación. Las placas para ensayos por análisis de gotas se prepararon de manera idéntica con 200  $\mu$ l de agua o una disolución de CB[n] ( $1 \times 10^{-4}$  M) y 70  $\mu$ l de colorante ( $5 \times 10^{-4}$  M). Cada una de las placas se dosificó con una SAC, depositando en cada pozo 30  $\mu$ l de analito disuelto en agua. La adición de analito produce una alteración del color, el cual se examina colocando las placas en una cámara oscura donde se ilumina

con luz blanca (400-700 nm) o luz UV cuasi monocromática (330 nm). Cuando se ilumina con luz UV, la imagen es debida a la emisión de fluorescencia de los colorantes.

En ambos tipos de iluminación (luz blanca o UV) se tomó una fotografía con una cámara CCD a partir de la cual se extraen los valores RGB para cada combinación analito-colorante-CB[n].

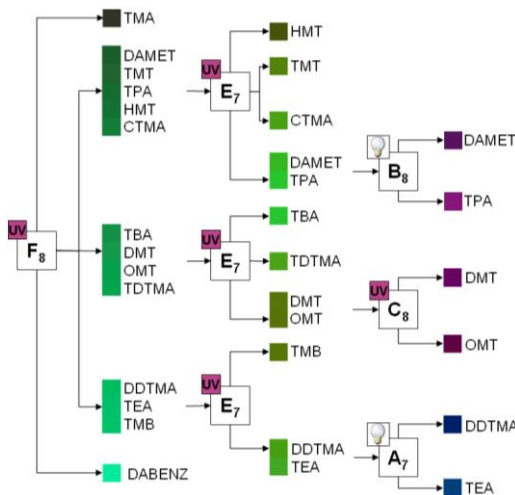
Cada elemento de la matriz del sensor es sólo parcialmente selectivo para cada analito y es la respuesta global de la matriz la que es específica para cada analito y concentración.

Esta estrategia permite usar sensores que individualmente son menos sofisticados que los que harían falta sintetizar para conseguir con un solo sensor una detección selectiva y específica para cada analito.

A continuación se llevaron a cabo análisis estadísticos para todos los componentes RGB determinados. Finalmente se emplearon diferentes algoritmos<sup>65-71</sup> tales como arboles de clasificación y análisis de componente principal (*Principal Component Analysis, PCA*) fueron empleados a fin de poner de manifiesto las características colorimétricas que hacen único cada analito. Otros algoritmos<sup>65-67,72-75</sup> tales como maquina de vector de soporte (*Support Vector Machine, SVM*) y redes neuronales (*Neural Networks, NN*) fueron igualmente empleadas pero el bajo número de celdas necesarias para discriminar las SAC hacen que no sean necesarias estas técnicas de clasificación avanzadas, mientras que el árbol de clasificación es preferible debido a su claridad y simplicidad. La respuesta específica de la matriz para cada componente se determinó a seis concentraciones de analito en el rango entre 0.1 y  $10^{-6}$  M y todas estas imágenes fueron digitalizadas y posteriormente los componentes RGB para cada una de las celdas obtenidos y almacenados mediante una aplicación informática.

Entre las varias posibles secuencias de celdas que permiten la discriminación adecuada entre las catorce SACs estudiadas, el árbol que se presenta en la Figura 3.5 fue el preferido puesto que discrimina CTMAB, DDTMA y TDTMA con una única celda. Es digno de

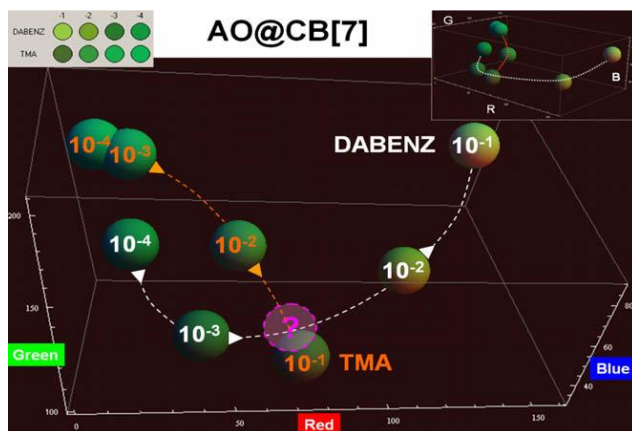
mencionar que el TMA, TBA, TPA y TEA son igualmente discriminados en la primera clasificación puesto que cada compuesto va a ramas diferentes del árbol. Por consiguiente, nuestro sensor es capaz de discriminar e identificar varias SACs incluso aunque difieran en cambios estructurales mínimos tales como un único grupo metileno en una de las cadenas.



**Figura 3.5.** Posible árbol de clasificación que permite la discriminación entre las diferentes SACs. Cada nodo corresponde a un complejo, que es indicado con una letra que se refiere al colorante (A: MB, B: TH, C: OX, E: AO, F: PF) mientras que el número en subíndice corresponde al CB[n] ( $n = 7$  u  $8$ ). En cada nodo se indica la luz empleada para la obtención de la imagen: bien UV o “bombilla” (visible). El color de los cuadrados se corresponde con el color digital de cada celda.

La respuesta de cada analito varía en un cierto rango en función de su concentración. La Figura 3.6 muestra los casos de TMA y DABENZ con AO@CB[7] para ilustrar las variaciones generales observadas en función de la concentración. Se puede observar que puede existir un solapamiento y cierto grado de coincidencia en las imágenes de diferentes analitos. La coincidencia tiende a ser mayor a medida que la concentración de analito disminuye, existiendo una concentración límite por debajo de la cual no es posible la identificación del analito. Esto es debido al hecho de que todas las imágenes, independientemente de la SAC

que contenga tienden a converger con la imagen de la matriz de sensores químicos en ausencia de cualquier analito. Para algunos casos donde hay cruce en las trayectorias dependiendo de la concentración tampoco es posible discriminar la identidad y concentración de la SAC tal como puede verse en el caso ilustrado en la Figura 3.6.



**Figura 3.6.** Variación de la concentración de DABENZ y TMA con el complejo AO@CB[7]. El recuadro de la izquierda muestra los colores digitalizados del complejo AO@CB[7] en presencia de TMA y DABENZ cuyas concentraciones varían entre  $10^{-1}$  y  $10^{-4}$  M.

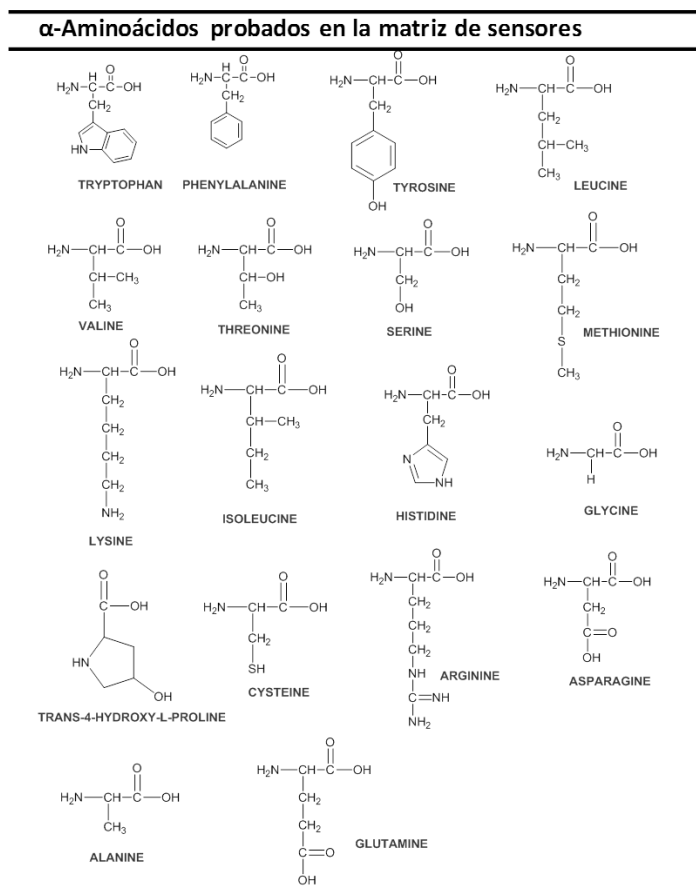
En nuestras condiciones de operación hemos sido capaces de distinguir la presencia de analitos para concentraciones por encima de  $10^{-5}$  M. Este límite de sensibilidad en la detección de SACs es ciertamente destacable y mejora los test colorimétricos descritos hasta el momento para la detección de SACs.

### 3.2.2. Matriz de sensores colorimétricos para la detección de $\alpha$ -aminoácidos.

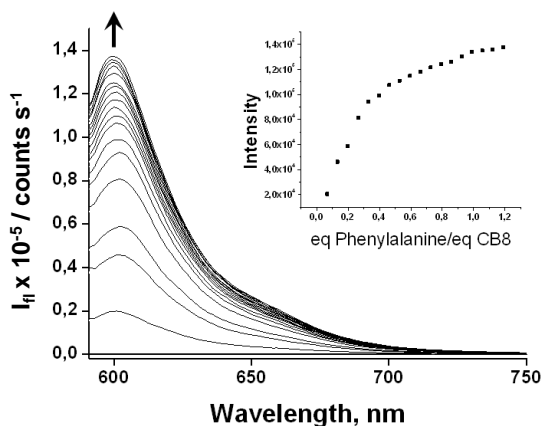
Como en el caso que se acaba de comentar de las SACs, también para el caso de  $\alpha$ -aminoácidos existen muy pocas matrices de sensores químicos de tipo colorimétrico o basados en fluorescencia.<sup>54,55,59-63,76</sup> En algún caso se ha descrito además el empleo de cápsulas orgánicas para reconocimiento de  $\alpha$ -aminoácidos, pero estas están limitadas hasta

la fecha por una baja capacidad para discriminar sólo algunos de ellos, siendo incapaces de conseguir la discriminación de toda la serie de  $\alpha$ -aminoácidos naturales. Además, no existen precedentes basados en complejos supramoleculares colorante@cápsula aplicados a la detección y discriminación de  $\alpha$ -aminoácidos bien por imagen colorimétrica o fluorescencia.

El conocimiento del comportamiento de agregación y emisión de los colorantes tricíclicos en presencia de cucurbit[n]uriles permite anticipar que estos sistemas podrían ser igualmente capaces de discriminar  $\alpha$ -aminoácidos debido a la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno fuertes con colorantes y las capsulas. Estos puentes de hidrógeno se establecerían debido a la presencia de grupos amonio o amina y ácido carboxílico o anión carboxilato dependiendo del pH de la disolución en la que se encuentre el  $\alpha$ -aminoácido. Las interacciones entre  $\alpha$ -aminoácidos y los complejos supramoleculares colorante-CB[n] pueden resultar en variaciones espectroscópicas las cuales podrían ser diferentes dependiendo de la combinación  $\alpha$ -aminoácido, colorante y cucurbit[n]uril. A modo de ejemplo la Figura 3.7 muestra los cambios en el comportamiento de la fluorescencia emitida por la oxonina en función de la concentración de  $\alpha$ -fenilalanina. La estructura de los  $\alpha$ -aminoácidos estudiados se indica en el Esquema 3.3.



**Esquema 3.3.**  $\alpha$ -Aminoácidos ensayados en el presente capítulo en una matriz de sensores colorimétricos y fluorimétricos.



**Figura 3.7.** Espectros de emisión del complejo OX@CB[8] ( $10^{-4}$  M) en agua cuando se adiciona un número creciente de alícuotas de 20  $\mu$ l de  $\alpha$ -fenilalanina a una concentración  $10^{-3}$  M.

Por consiguiente el principio de nuestro sensor para  $\alpha$ -aminoácidos es la formación de complejos supramoleculares solubles en agua entre colorantes y CBs, los cuales poseen constantes de asociación en el rango de  $10^5 - 10^7$   $M^{-1}$ .<sup>53,54,77</sup> Estos complejos son los que presentan diferencias en sus espectros de absorción y emisión así como variaciones en sus rendimientos cuánticos de emisión cuando se ven afectados por  $\alpha$ -aminoácidos.

Cabe indicar que una alta constante de asociación en la formación del complejo no es una garantía suficiente para una elevada sensibilidad del sistema frente a diferentes analitos los cuales de alguna manera deben ser capaces de producir una alteración en el complejo supramolecular que se traduzca en un cambio visual. Puesto que el mecanismo de formación del complejo entre colorantes tricíclicos y CB[7] ó CB[8] es debido principalmente a interacciones electrostáticas entre la carga positiva del colorante y los oxígenos presentes en los portales de CBs que poseen densidad electrónica elevada y puesto que los CBs tienen una preferencia marcada a interactuar con huéspedes catiónicos, es bastante probable que la carga del  $\alpha$ -aminoácido, los puentes de hidrógeno que se establezcan entre el aminoácido y el complejo huésped-hospedador y los momentos

dipolares sean los principales factores que afecten a este tipo de complejos. La gran riqueza de estas interacciones que contribuyen a alterar el complejo supramolecular constituye la principal ventaja y versatilidad de nuestro sistema basado en la matriz de sensores químicos.

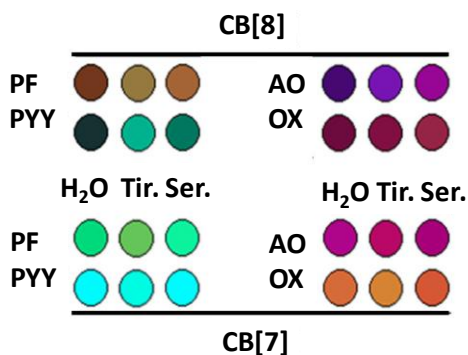
Con respecto a las condiciones experimentales de análisis que se han indicado para el caso de la detección de SACs, las principales diferencias para la aplicación de estas matrices en la detección de  $\alpha$ -aminoácidos es el uso de etanol como co-solvente (30  $\mu$ l frente a 300  $\mu$ l de volumen total de la celda) y el hecho de que las disoluciones de  $\alpha$ -aminoácidos fueron tamponadas a pH 2.4.

Es conocido que los complejos de inclusión en CB[8] para el caso de AO, OX y PF corresponden a especies diméricas mientras que para el caso de PYY las especies de agregación son trímeros.<sup>77</sup> En cuanto a la cápsula CB[7], el complejo de inclusión con CB[7] es en todos los casos de una estequiometría 1:1 debido a las reducidas dimensiones de este CB[n].

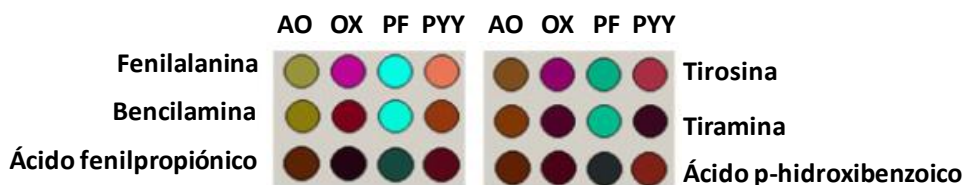
Teniendo en cuenta las estequiometrías de los complejos, la concentración de colorante de  $5 \times 10^{-4}$  M permite para todos ellos una clara observación visual del color.

Se obtuvieron las imágenes de la matriz de sensores químicos para dieciocho aminoácidos naturales tanto con iluminación con luz blanca como por iluminación con luz UV cuasi monocromática (330 nm). Las Figuras 3.8 y 3.9 muestran un resumen las imágenes que han sido registradas para los  $\alpha$ -aminoácidos y las aminas y ácidos carboxílicos relacionados con estos aminoácidos. El rango de concentraciones estudiados se varió entre 0.1 y 5 g/l.





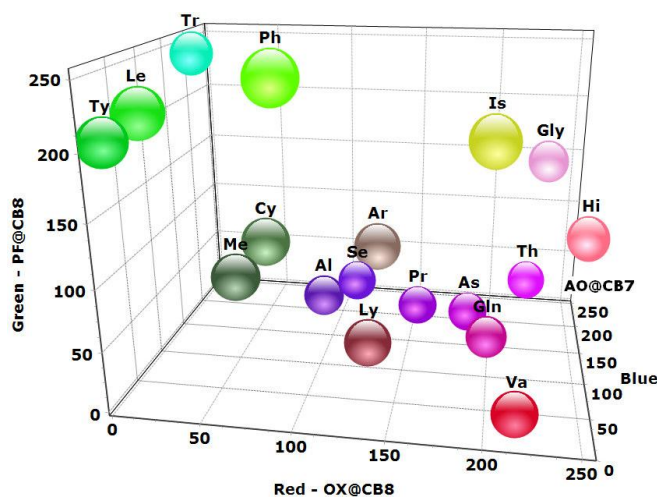
**Figura 3.8.** Imagen digitalizada obtenida mediante iluminación con luz UV de los complejos con CB[7] y CB[8] de los colorantes PF, AO, PYY y OX y los aminoácidos tirosina y serina.



**Figura 3.9.** Imagen digitalizada obtenida por iluminación con luz UV para los aminoácidos fenilalanina y tirosina y la amina y ácido carboxílico relacionados con los complejos de CB[8] y los colorantes AO, OX, PF y PYY. Esta figura muestra que es posible diferenciar los  $\alpha$ -aminoácidos de las aminas y de los ácidos carboxílicos estructuralmente relacionados.

Como en el caso ya comentado de las SACs, también para los  $\alpha$ -aminoácidos la imagen de la matriz de sensores químicos fue procesada automáticamente mediante una aplicación que extrae los valores RGB a partir de un cuadrado de 20x20 píxeles de la parte central de cada celda.<sup>78</sup> La reproducibilidad de las imágenes para el caso de  $\alpha$ -aminoácidos fue evaluada llevando a cabo cada medida cuatro veces, dos de ellas usando las mismas disoluciones madre y otras dos obtenidas para experimentos totalmente independientes. Esto permitió cuantificar el error experimental que afecta a los valores RGB.

La discriminación de estos compuestos se puede llevar a cabo empleando algoritmos de discriminación basados en árboles de clasificación y análisis de componente principal.<sup>64,65,67,74,79</sup> Aunque se podrían haber empleado igualmente otras alternativas como maquina de vector de soporte (SVM) o redes neuronales, el análisis de componente principal es un procedimiento más simple e intuitivo que permite la discriminación de los  $\alpha$ -aminoácidos estudiados. La Figura 3.10 muestra en el espacio RGB los puntos correspondientes a cada uno de los  $\alpha$ -aminoácidos teniendo en cuenta el error y la incertidumbre que afecta a cada valor. Para mayor claridad de la imagen, en lugar de dibujar cada experimento e indicar su reproducibilidad, es preferible representar cada  $\alpha$ -aminoácido como una esfera cuyo centro se localiza en el valor medio determinado para las cuatro medidas y cuyo diámetro es igual a seis veces la máxima varianza determinada para los componentes RGB (en nuestro caso varianza máxima =3.89).



**Figura 3.10.** Representación de los dieciocho aminoácidos naturales en el espacio RGB basándonos en los valores de estos componentes para el complejo AO@CB[7] (color azul), OX@CB[8] (color rojo) y PF@CB[8] (color verde) obtenidos a partir de la imagen con iluminación con luz UV. Cada aminoácido está representado por una esfera cuyo centro corresponde al color promedio de cuatro experimentos y cuyo radio es seis veces la varianza estadística determinada en base a la dispersión de los cuatro experimentos. La

figura da una idea visual de la capacidad de discriminación de todos los aminoácidos basándonos únicamente en la respuesta de tres combinaciones colorante-CB[n].

Con la Figura 3.10 es posible tener una idea visual de la distancia que separa las esferas entre sí, siendo la separación entre esferas una medida de la capacidad de discriminación de la matriz de sensores químicos para los dieciocho  $\alpha$ -aminoácidos estudiados.

Como se puede apreciar en la Figura 3.10 las esferas están distribuidas por todo el espacio RGB y la mayoría de ellas se encuentran suficientemente separadas como para permitir la identificación segura de cada  $\alpha$ -aminoácido puesto que no existe solapamiento apreciable entre las esferas a la concentración de  $10^{-3}$  M a la que corresponde esta figura.

El volumen en el que las esferas correspondientes a los 18 aminoácidos se encuentran distribuidas indica que existe una buena complementariedad entre los colorantes elegidos en el presente estudio. Al mismo tiempo el nivel de confianza en la identificación de  $\alpha$ -aminoácidos puede ser calculado sin dificultad y cuantificado mediante la distancia entre los centros de las esferas.

Nuestra mejor representación de la matriz se basa en la construcción de un diagrama en dos etapas.

En primer lugar seleccionamos la combinación de tres complejos colorante@CB[n] de nuestra matriz de sensores químicos que maximizan la distancia entre los diferentes analitos. En segundo lugar se dibujan las esferas correspondientes a cada  $\alpha$ -aminoácido en un espacio donde cada eje se refiere al valor del componente RGB para la combinación colorante@CB[n] elegida como la que mayor discriminación proporciona en este color.

Esta respuesta deriva de la habilidad de cada  $\alpha$ -aminoácido para influir en el color del colorante que se observa mediante iluminación con luz UV como consecuencia de la diferente emisión de estas moléculas cuando se encuentran en agua pura o totalmente incorporadas en el interior de CBs. Tales respuestas corresponden al primer componente del análisis de componente principal. Así a diferencia de un análisis convencional basado en

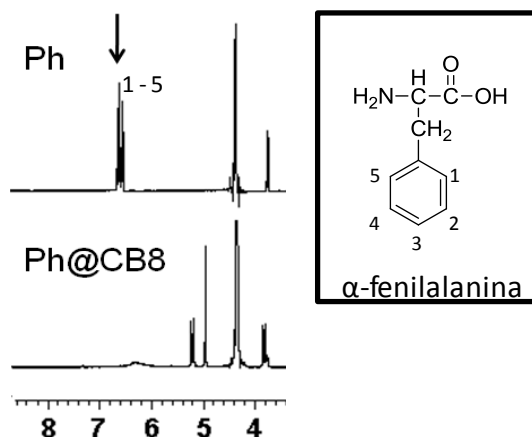
componente principal, donde cada componente es una combinación lineal de un número de variables, (9 considerando los tres ejes RGB para las tres combinaciones colorante-cápsula elegidas), en nuestro caso la representación está basada en determinar en primer lugar el mejor sensor para cada uno de los ejes. En concreto el sensor que mejor discrimina el color azul fue AO@CB[7] mientras que los mejores para los componentes del color correspondientes al rojo y al verde fueron los complejos OX@CB[8] y PF@CB[8], respectivamente.

Considerando Gly, Th, Va (Glicina, Timina y Valina, respectivamente) es posible visualmente observar que el complejo OX@CB[8] no es capaz de distinguir entre ellos. Por otra parte los complejos AO@CB[7] y PF@CB[8] discriminan timina y glicina de la valina, y glicina de valina y timina, respectivamente. La combinación de estas respuestas es la que permite la discriminación entre todos estos aminoácidos y demuestra la capacidad del sistema que aquí se describe. Puesto que la extrapolación se hace en un espacio tridimensional de tamaño entre 0 y 255 (valor que corresponde a la saturación completa del color), las coordenadas pueden ser transformadas en colores tal como se presenta en la Figura 3.10. Estos colores indicados en la Figura 3.10 no corresponden en realidad a ninguna combinación colorante@CB[n] sino que corresponden a un color virtual determinado a partir de la mejor combinación posible para cada uno de los componentes RGB obtenidos individualmente.

Más aun, como puede observarse en la Figura 3.9 nuestra matriz de sensores químicos no es solo capaz de discriminar entre los dieciocho  $\alpha$ -aminoácidos sino que además discrimina estos  $\alpha$ -aminoácidos de las aminas y ácidos carboxílicos estructuralmente relacionados.

A fin de racionalizar los resultados obtenidos llevamos a cabo un estudio por espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H. Los datos espectroscópicos indican que la parte hidrofóbica del  $\alpha$ -aminoácido es el residuo que se acomoda en el interior de la cápsula CB[n], este hecho está de acuerdo con la naturaleza hidrofóbica del interior de los CBs. Esta conclusión sobre el origen de la interacción se basa en los cambios espectroscópicos observados cuando se pone en

contacto un  $\alpha$ -aminoácido con CB[n]. A fin de ilustrar los espectros de RMN- $^1\text{H}$  que se obtienen, la Figura 3.11 presenta el espectro de la  $\alpha$ -fenilalanina en ausencia y en presencia de CB[8]. Como puede observarse en esta figura los cambios más sobresalientes tienen lugar en las señales correspondientes a los protones del grupo fenilo los cuales sufren un desplazamiento notable cuando se añade CB[8].



**Figura 3.11.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  registrados para la  $\alpha$ -fenilalanina en ausencia (espectro superior) o en presencia (espectro inferior) de un exceso de CB[8] a pH 2.4.

A pesar de la caracterización por RMN- $^1\text{H}$ , la Figura 3.9 donde se observan diferencias entre los  $\alpha$ -aminoácidos, las aminas y los ácidos carboxílicos indican que toda la molécula de analito, y no solo los grupos funcionales amino y carboxilato de la parte polar, deben ser responsable del comportamiento del sensor fluorimétrico.

El examen simultáneo de los colores para los conjuntos de  $\alpha$ -aminoácidos, aminas y ácidos no permite una asignación cuantitativa clara de la influencia de cada grupo funcional amino o ácido en la respuesta del  $\alpha$ -aminoácido. Es interesante hacer notar que la influencia de los grupos amina y carboxilato parecen ser diferentes para cada colorante. Así parece que la discriminación entre  $\alpha$ -aminoácidos y los correspondientes ácidos carboxílicos sea visualmente más clara para PF y AO, mientras que la discriminación entre  $\alpha$ -aminoácidos y las correspondientes aminas parece ser mejor cuando se utiliza OX como colorante. La

molécula PYY discrimina los tres tipos de compuestos,  $\alpha$ -aminoácidos, aminas y ácidos carboxílico a la vez, tal como parece deducirse de la Figura 3.9.

### 3.3 Conclusiones

Los resultados anteriores demuestran que una matriz constituida por colorantes y CB[n] permite la discriminación e identificación en agua de SACs y  $\alpha$ -aminoácidos naturales basándose en una librería constituida por los componentes RGB obtenidos a partir de las imágenes digitalizadas de disoluciones acuosas de estos complejos. En contraste con las técnicas analíticas convencionales basadas en el desarrollo de sensores específicos para cada analito, nuestra matriz de sensores consigue una discriminación basada en los cambios que ocurren en el conjunto de toda la matriz. Las imágenes pueden obtenerse tanto por iluminación por luz visible (sensor colorimétrico) como por iluminación con luz UV (sensor fluorimétrico) y pueden obtenerse con una simple cámara y una aplicación informática de tratamiento de colores.

A pesar de las ventajas indicadas en cuanto a capacidad de identificación e incluso la posibilidad de cuantificación en un cierto rango, queda por estudiar cual es el comportamiento de este tipo de sensores para mezclas de diferentes analitos. En cualquier caso la rapidez de nuestro sensor lo haría adecuado para su aplicación en ensayos de alta eficiencia en síntesis orgánica y en catálisis. Además el método aquí presentado podría ser ampliable a otros colorantes y a otras cápsulas orgánicas solubles en agua.

### 3.4 Referencias

- (1) Valladao, M.; Sandine, W. E. J. *Dairy Sci.* **1994**, *77*, 1509-1514.
- (2) Anslyn, E. V. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 687.
- (3) Wright, A. T.; Anslyn, E. V. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 14.
- (4) Albert, K. J.; Lewis, N. S.; Schauer, C. L.; Sotzing, G. A.; Stitzel, S. E.; Vaid, T. P.; Walt, D. R. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2595.
- (5) Ciosek, P.; Wroblewski, W. *Analyst* **2007**, *132*, 963.
- (6) Narasimham, K. C.; Vasundara, S.; Udupa, H. V. K. *Analyst* **1972**, *97*, 260-262.
- (7) Furlong, T. E.; Elliker, P. R. *J. Dairy Sci.* **1953**, *36*, 225.

- (8) Miller, D. D.; Elliker, P. R. *J. Dairy Sci.* **1951**, *34*, 273–278.
- (9) Boccacci Mariani, M.; Milana, M. R.; Giamberardini, S.; Cavalli, S. *Chromatographia* **1993**, *36*, 362–364. **1993**, *36*, 362–364.
- (10) In *See ASTM Standard Test Method for QAS in Fabric Softeners*. <http://www.astm.org/standards/D5070.htm>.
- (11) Flanagan, T. L., Jr; Drennen, T. J.; Goetchius, G. R. *Soap San. Chem.* **1948**, *24*, 163–165.
- (12) Wilson, J. B. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **1946**, *29*, 311–327.
- (13) Wilson, J. B. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **1948**, *31*, 480–484.
- (14) . In *MicroEssential Laboratory QUAT Test paper Cat# QT-10*. <https://www.microessentiallab.com>.
- (15) <http://www.galladechem.com>.
- (16) <http://allqa.com>.
- (17) Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Rabaioli, G.; Taglietti, A. *Coord.Chem. Rev.* **2000**, *205*, 85.
- (18) Freidman, M. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3457.
- (19) Sarkar, P.; Tothill, I. E.; Setford, S. J.; Turner, A. P. *F. Analyst* **1999**, *124*, 865.
- (20) Petty, R. L.; Michel, W. C.; Snow, J. P.; Johnson, K. S. *Anal. Chem.* **1982**, *142*, 299.
- (21) Lindroth, P.; Mopper, K. *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 1667.
- (22) Zhang, Z. J.; Gong, Z. L.; Ma, W. B. *Microchem. J.* **1995**, *52*, 131.
- (23) Li, B. X.; Zang, Z. *Sens. Actuators B* **2000**, *69*, 142.
- (24) Li, B.; Zhang, Z. *Sens. Actuators B.* **2000**, *69*, 70.
- (25) Ionescu, R. E.; Cosnier, S.; Marks, R. S. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6327.
- (26) Lou, X.; Zhang, L.; Qin, J.; Li, Z. *Langmuir.* **2010**, *26*, 1566.
- (27) Lee, C. S.; Teng, P. F.; Wong, W. L.; Kwong, H. L.; Chan, A. S. C. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7924.
- (28) Cheng, Y. F.; Dovichi, N. J. *Science* **1988**, *242*, 562.
- (29) Stone, M. M.; Franz, A. H.; Lebrilla, C. B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 964.
- (30) Wang, J.; Chtrathi, M.; Tian, B. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5774.
- (31) Baker, D. R. *Capillary Electrophoresis*; Wiley: New York, 1995.
- (32) Underberg, W. J. M.; Waterval, J. C. M. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3922.
- (33) Deo, R. P.; Lawrence, N. S.; Wang, J. *Analyst* **2004**, *129*, 1076.
- (34) Varadi, M.; Adanyi, N.; Szabo, E. E.; Trummer, N. *Biosensors & Bioelectronics* **1999**, *14*, 335.
- (35) Casella, I. G.; Cataldi, T. R. I.; Guerrieri, A.; Desimoni, E. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *335*, 217.
- (36) Luque, G. L.; Ferreyra, N. F.; Rivas, G. A. *Talanta* **2007**, *71*, 1282.
- (37) Vardanega, D.; Giradet, C. *Chem.Phys. Lett.* **2009**, *469*, 172.
- (38) Dean, K. E. S.; Klein, G.; Renaudet, O.; Reymond, J.-L. *Bioorganic and Medical Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1653.
- (39) Barnhill, D. K.; Sargent, A. L.; Allen, W. E. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8366.
- (40) Folmer-Andersen, J. F.; Lynch, V. M.; Anslyn, E. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7986-7987.
- (41) Leung, D.; Anslyn, E. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12328-12333.
- (42) Rochat, S.; Gao, J.; Qian, X. H.; Zaubitzer, F.; Severin, K. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 104-113.
- (43) Bois, J.; Bonnamour, I.; Duchamp, C.; Parrot-Lopez, H.; Darbost, U.; Felix, C. *New J. Chem.* **2009**, *33*, 2128–2135.
- (44) Cram, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 1007.

- (45) Zhang, X.-X.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3313.
- (46) Reetz, M. T.; Huff, J.; Rudolph, J.; Tollner, K.; Deege, A.; Goddard, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11588.
- (47) Bailey, D. M.; Hennig, A.; Uzunova, V. D.; Nau, W. M. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6069-6077.
- (48) Screenivasulu Reddy, P.; Kobayashi, T.; Abe, M.; Fujii, N. *Eur. Polymer J.* **2002**, *38*, 521.
- (49) Imisides, M. D.; Wallace, G. G.; Wilke, E. A. *Trends Anal. Chem.* **1988**, *7*, 1543.
- (50) Lavigne, J. J.; Anslyn, E. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3118.
- (51) Baumes, L. A.; Buaki Sogo, M.; Montes-Navajas, P.; Corma, A.; Garcia, H. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7001.
- (52) Baumes, L. A.; Buaki-Sogo, M.; Montes-Navajas, P.; Corma, A.; Garcia, H. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4489.
- (53) Lagona, J.; Wagner, B.; Isaacs, L. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1181.
- (54) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844.
- (55) Montes-Navajas, P.; Teruel, L.; Corma, A.; Garcia, H. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1762.
- (56) Feng, L.; Musto, C. J.; Kemling, J. W.; Lim, S. H.; Suslick, K. S. *ChemComm.* **2010**, *46*, 2037.
- (57) Folmer-Andersen, J. F.; Kitamura, M.; Anslyn, E. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5652.
- (58) Buryak, A.; Severin, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3700.
- (59) Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H. J.; Kim, K. *Acc.Chem. Res.* **2003**, *36*, 621.
- (60) Mock, W. L.; Springer Verlag: Berlin, 1995; Vol. 175 p 1.
- (61) Rudkevich, D. A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, *75*, 393.
- (62) Fathallah, M.; Fotiadu, F.; Jaime, C. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1288.
- (63) Koner, A. L.; Nau, W. M. *Supramol. Chem.* **2007**, *19*, 55.
- (64) Montes-Navajas, P.; Baumes, L. A.; Corma, A.; Garcia, H. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2301-2304.
- (65) Baumes, L. A.; Serra, J. M.; Serna, P.; Corma, A. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 583-596.
- (66) Serra, J. M.; Baumes, L. A.; Moliner, M.; Serna, P.; Corma, A. *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2007**, 13-24.
- (67) Corma, A.; Moliner, M.; Serra, J. M.; Serna, P.; Díaz-Cabañas, M. J.; Baumes, L. A. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 3287-3296.
- (68) Palacios, M. A.; Nishiyabu, R.; Marquez, M.; Anzenbacher, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7538-7544.
- (69) Meier, M. A. R.; Schubert, U. S. *Chem. Commun.* **2005**, *36*, 4610-4612.
- (70) Fernandez, Y. D.; Gramatges, A. P.; Amendola, V.; Foti, F.; Mangano, C.; Pallavicini, P.; Patroni, S. *Chem. Commun.* **2004**, 1650-1651.
- (71) Wang, Z.; Palacios, M. A.; Zyryanov, G. V.; Montes, V. A.; Anzenbacher, P. *J. Am.Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10307-10314.
- (72) Baumes, L. A.; Farruseng, D.; Lengliz, M.; Mirodatos, C. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *29*, 767-778.
- (73) Klanner, C.; Farrusseng, D.; Baumes, L. A.; Lengliz, M.; Mirodatos, C.; Schüth, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5347-5349.
- (74) Baumes, L. A.; Moliner, M.; Corma, A. *QSAR comb. Sci.* **2007**, *26*, 255-272.
- (75) Serna, P.; Baumes, L. A.; Moliner, M.; Corma, A. *J. Catal.* **2008**, *258*, 25-34.



- (76) Mohanty, J. *Int. J. Photoenergy* **2005**, 7, 133.
- (77) Montes-Navajas, P.; Corma, A.; Garcia, H. *ChemPhysChem* **2008**, 9, 713.
- (78) Baumes, L. A.; Jimenez, S.; Corma, A. *Catal. Today* **2011**, 159, 126-137.
- (79) Mohanty, J.; Pal, H.; Ray, A. K.; Kumar, S.; Nau, W. M. *ChemPhysChem* **2007**, 8, 54.

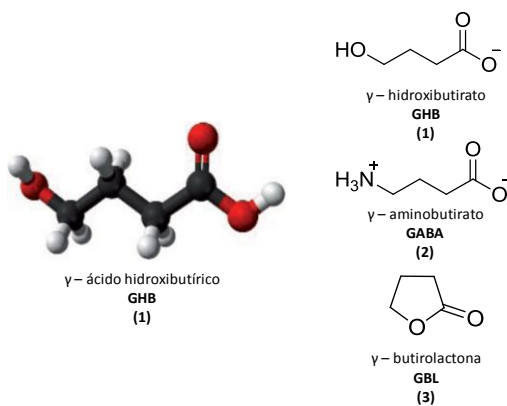


## CAPÍTULO 4: MATRIZ DE SENSORES COLORIMÉTRICOS PARA LA DETECCIÓN DEL ÁCIDO $\gamma$ -HIDROXIBUTÍRICO.

---

### 4.1 Introducción

El ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico (GHB) (1) (ver Figura 4.1) es un metabolito que se forma de manera natural por transformación del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (2).<sup>1,2</sup> El GHB (1) se encuentra en todos los tejidos corporales, pero presenta su más alta concentración en el cerebro de los mamíferos. Se ha propuesto que el GHB (1) puede jugar un papel como transmisor neuronal. El GHB (1) está implicado en los procesos de regulación del GABA (2), de la dopamina, de la 5-hidroxitriptamina y de la acetilcolina. En el cerebro la presencia de GHB (1) aumenta la acetilcolina y afecta a la velocidad del metabolismo de la serotonina. Sin embargo las funciones precisas y las rutas metabólicas en las que está implicado el GHB (1) son complejas y aún no están completamente elucidadas.<sup>3</sup>



**Figura 4.1** Estructura de  $\gamma$ -hidroxibutirato (GHB) (1), agente depresor del sistema nervioso central y utilizado actualmente como una droga de abuso sexual, de su precursor natural  $\gamma$ -aminobutirato (GABA) (2) y su precursor sintético  $\gamma$ -butirolactona (GBL) (3).

Derivados y precursores del GHB (1) son usados ampliamente en la industria como: 1) disolventes, 2) en la preparación de plastificantes y humectantes, 3) en la síntesis de compuestos farmacéuticos, 4) en la obtención de poliuretanos y polímeros tereftálicos, 5) en la manufactura de tetrahidrofurano y 6) recientemente como fármaco para el tratamiento de la narcolepsia y el alcoholismo.<sup>4-7</sup>

Independientemente del amplio uso comercial tanto de precursores como de derivados, el GHB (1) es una sustancia ilegal para su ingesta que, sin embargo ha experimentado recientemente un aumento notable en su consumo debido a la supuesta acción como agente euforizante y afrodisiaco.<sup>8-12</sup> El GHB (1) fue introducido primero en 1960 como un agente anestésico alternativo en cirugía debido a su habilidad para inducir sueño y coma reversible. Cuando se combina con alcohol y otros agentes depresores, el GHB (1) puede ser letal y se ha relacionado con serias enfermedades, episodios de coma y muertes.<sup>13-18</sup> Como el GHB (1) tiene una curva de dosis-respuesta muy abrupta, el riesgo de pasar de la euforia y pérdida de inhibiciones al coma, o incluso a la muerte es muy elevado tal como se muestra en la Tabla 4.1.<sup>19-24</sup> Los riesgos son considerados tan altos que el GHB (1) ha sido clasificado como una droga de tipo “1” de acuerdo con la *Ley de Sustancias Controladas* de la Agencia Norteamericana de Alimentos y Estupefacientes.<sup>25-27</sup> El GHB (1) se usa además como una de las drogas de diseño para “*cita-abuso sexual*” (“date-rape”), que es empleada para seducir e inducir a mujeres, las cuales ingieren sin su conocimiento esta droga en una bebida.

**Tabla 4.1.** Dosis oral de GHB (1) (g) para el tratamiento del síndrome de abstinencia en alcohólicos y sus correspondientes usos y efectos<sup>[a]</sup>.

Dosis tratamiento de síndrome de abstinencia	Dosis moderada	Dosis común <sup>[b]</sup>	Dosis alta	Dosis sueño profundo	Sobredosis	Envenenamiento (muerte)
0.15 (3 veces al día)	0.5 - 1.5	1 - 2.5	2 - 3.5	3 - 5	3 - 10	10 <

[a] Fuente: <http://www.projectghb.org> [b] inicio de los efectos: 10–20 min, duración 1–3 h, vuelta al estado normal: después de 2–4 h.

A pesar del rápido incremento en el número de casos en los cuales esta sustancia ha sido usada en casos de abuso, los métodos de análisis del GHB (1) disponibles son o de baja sensibilidad o complicados y de difícil realización. Considerando el corto tiempo de vida de este compuesto y los lugares públicos en los cuales se usa y abusa de esta sustancia, los métodos disponibles no son aun satisfactorios para determinar su presencia de una forma simple.<sup>28,29</sup> A pesar de los serios problemas que origina el uso del GHB (1), no ha sido hasta muy recientemente que se han descritos ensayos aplicables en el lugar de uso (“on site”) que puedan ser llevados a cabo bajo las circunstancias normales en las cuales se abusa de esta droga. Los métodos conocidos de detección del GHB (1) son laboriosos y su realización requiere de múltiples pasos o poseen una baja sensibilidad insuficiente para detectar el GHB (1) en las concentraciones que se emplean comúnmente.

Mientras que los protocolos existentes pueden ser usados para detectar GHB (1) en muestras forenses de presuntas víctimas o en líquidos sospechosos, estos no pueden ser aplicados de forma rutinaria para la determinación de múltiples muestras antes de la ingesta de las mismas. Así, la cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS) ha sido aplicada para la detección de GHB (1).<sup>30,31</sup> Los métodos de GC no pueden ser aplicados directamente para el GHB (1) puesto que el GHB (1) se convierte en la correspondiente  $\gamma$ -butirolactona (GBL) (3) en las temperaturas en las que se inyecta la muestra.

Por otra parte, los métodos de detección implican a menudo etapas de acidificación acopladas con la extracción y el análisis por cromatografía de gases. Esta etapa de

acidificación puede convertir el GHB (**1**) en GBL (**3**) lo cual es problemático puesto que la forma lactona no es ilegal y no produce los mismos efectos que el GHB (**1**). Un método basado en HPLC para detectar el GHB (**1**) que evita su transformación en GBL (**3**) ha sido descrito en una patente americana US 6156431. Otro método de HPLC para la detección del GHB (**1**) ha sido descrito por Mesner y Satzger.<sup>32</sup> Ambos métodos implican HPLC de fase reversa la cual está acoplada con un detector de UV de 215 nm en la patente americana, y con un equipo de espectrometría de masas por termospray en el segundo caso. Estos métodos han de ser llevados a cabo en el laboratorio y requieren de personal especializado y de equipos adecuados para el análisis. Además el primer método analítico solo puede ser aplicado para aquellas muestras que no contienen ninguna sustancia que absorba en el UV.

Mayor relación con el presente estudio tiene el test colorimétrico recientemente introducido por la compañía "Scott". El método consiste en mojar un bastoncillo de algodón con la disolución a analizar y seguidamente introducirlo en una disolución que cambia de color si se encuentra presente el GHB (**1**). Sin embargo, este método carece de la sensibilidad necesaria puesto que requiere concentraciones mayores de 0.3 M de GHB (**1**) para dar un resultado positivo, y este rango de concentraciones tan elevadas es inhabitual en la ingesta de GHB (**1**) puesto que puede causar la muerte de la persona que las ingiera. El GHB (**1**) se usa generalmente como droga a concentraciones inferiores a 0.3 M y por consiguiente muestras empleadas con fines ilegales darían un falso negativo con el kit comercializado por la casa "Scott".<sup>33</sup>

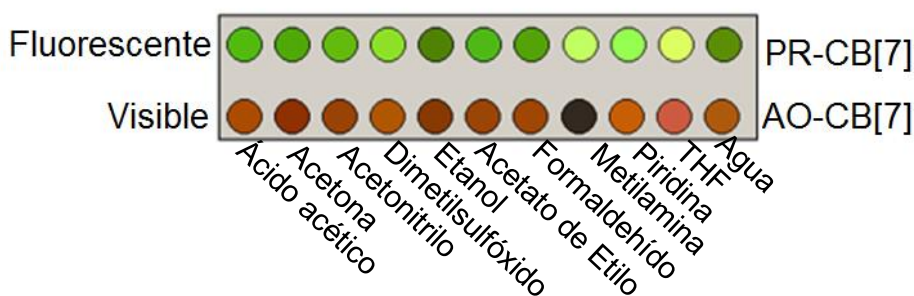
El desarrollo de sensores que puedan ser usados para la detección y determinación de compuestos orgánicos en medios acuosos constituye aun un reto en química analítica.<sup>34-38</sup>

En este capítulo se van a presentar los resultados de una matriz de sensores colorimétricos basados en complejos supramoleculares huésped-hospedador usando colorantes catiónicos fluorescentes disponibles comercialmente y cápsulas orgánicas de la familia de los cucurbituriles (CBs) que permiten la detección inmediata y con una alta sensibilidad del GHB (**1**) en agua.

## 4.2 Resultados y discusión

### 4.2.1 Metodología

La mayoría de las metodologías usadas para la detección de compuestos orgánicos en medios acuosos se basan principalmente en el diseño y empleo de sensores selectivos que son tras su diseño obtenidos mediante síntesis orgánica, a menudo compleja. Frecuentemente estos sensores selectivos presentan una baja solubilidad en agua lo que les hace inadecuados para la detección de analitos en este medio.<sup>39-41</sup> En contraste, tal y como hemos mostrado en el capítulo precedente las matrices sensoras basadas en una respuesta dual colorimétrica y de fluorescencia, son adecuadas para la identificación de aminas y sales de amonio cuaternarias.<sup>42-46</sup> Esos sensores están basados en las alteraciones que complejos supramoleculares con colorantes sufren cuando se encuentran presentes en el medio analitos para los cuales estos sistemas son sensibles.<sup>47,48</sup> Teniendo en cuenta el conocimiento del que se dispone sobre las propiedades de los complejos huésped-hospedador<sup>49-55</sup> y la previsible interacción de los analitos con estos complejos huésped-hospedador basados en colorantes, la cual puede ocasionar variaciones específicas en los espectros ópticos de absorción y emisión, se espera que esta metodología pueda ser aplicada con éxito a un gran número de compuestos orgánicos de familias diferentes.



**Figura 4.2.** Imagen obtenida por iluminación UV o visible de dos complejos supramoleculares basados en CB (Proflavina-CB[7] y Naranja de Acridina-CB[7], **PR-CB7** y

**AO-CB7**, respectivamente) en presencia de una serie de analitos orgánicos en agua. La estructura de los colorantes y las capsulas se muestra en la Figura 4.4.

El uso de una matriz de sensores (en lugar de una pareja de colorantes como muestra la Figura 4.2) haría posible la discriminación de un mayor número de analitos estructuralmente muy similares y cuya discriminación actualmente resultan un reto. Esta identificación derivaría del mayor número de variables en los cuales estaría basada la detección, esto es, en un mayor número de celdas donde se determinaría el color por iluminación con luz blanca y UV. Estos cambios de un analito a otro surgirían de la diferente intensidad con la cual el analito influye en las propiedades del complejo huésped-hospedador.

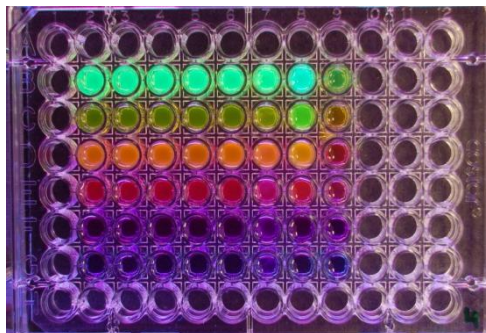
La principal ventaja de estas matrices de sensores es la combinación de un gran número de parámetros incluyendo hidrofiliicidad-hidrofobicidad, fuerzas coulómbicas, interacciones dipolares y puentes de hidrógeno.

A la vista de estas posibilidades se decidió ensayar la posible detección del GHB (**1**) en disoluciones acuosas empleando este tipo de matrices de sensores colorimétricos. Merece destacarse, que en contraste con los precedentes relacionados directamente<sup>56,57</sup> con el presente estudio, para los cuales una parte significativa de la capacidad de actuar como sensor se pierde cuando no ocurre cambios en los valores de pH, los cambios de pH juegan un papel no relevante en la respuesta de la matriz de sensores colorante-CBs descrita en este capítulo.<sup>47,48</sup>

#### **4.2.2. La matriz de sensores**

La matriz de sensores estudiada en el presente capítulo se prepara de la siguiente manera (ver Figura 4.3 y sección experimental para más detalles): cada una de las filas de la placa de celdas recibe uno de los seis colorantes básicos tricíclicos fluorescentes empleados, mientras que las cápsulas CBs y el agua se distribuyen en columnas.





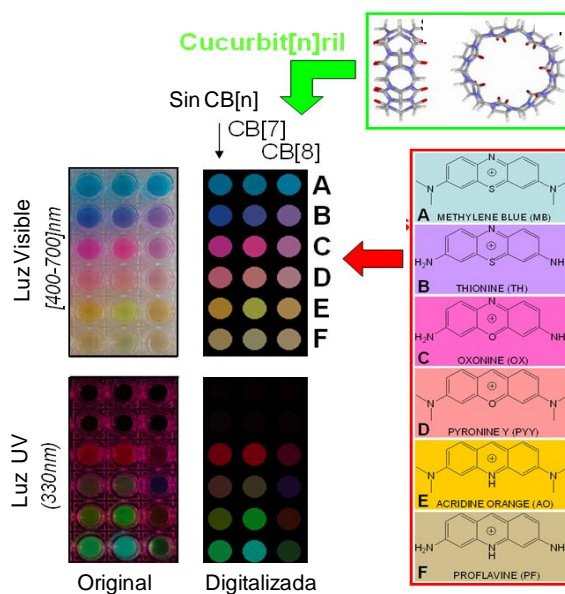
**Figura 4.3** Imagen de una de las matrices sensoras colorimétricas, bajo iluminación UV preparadas durante la realización de este estudio.

Todos los colorantes seleccionados emiten una fluorescencia intensa en la región espectral del visible cuando son iluminados con luz UV (ver Figuras 4.2 y 4.3 para dos ejemplos ilustrativos). Así, nuestra matriz de sensores presenta un modo de detección dual (absorción y emisión) dependiendo de la fuente de iluminación. Los sensores fluorescentes presentan típicamente ventajas sobre los colorimétricos debido a su mayor sensibilidad a concentraciones de analito más bajas que aquellos basados en absorción de luz visible. La columna libre de CBs en la placa multimuestra proporciona una referencia e indica la relevancia de la complejación entre cápsulas y colorantes en el proceso de detección. Las capsulas seleccionadas fueron CB[7] y CB[8] puesto que forman complejos de inclusión huésped-hospedador con una alta constante de formación con estequiometrias 1:1 y 2:1 entre el colorante tricíclico y el CB<sup>49-55</sup>[7] y [8], respectivamente. Estas constantes de asociación para los complejos 1:1 varían en el rango de  $10^6 \text{ M}^{-1}$  y  $10^{13} \text{ M}^{-2}$ .

Se prepararon placas multiceldas conteniendo disoluciones de las capsulas orgánicas a concentraciones  $10^{-4} \text{ M}$  y disoluciones de colorantes  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Cada celda se dosifica con 230  $\mu\text{L}$  de agua pura o la disolución de la cápsula orgánica más 70  $\mu\text{L}$  de la disolución de colorante, de manera que el volumen total de la celda fue de 300  $\mu\text{L}$ . La concentración de colorante seleccionada permite una observación visual clara del color, alejada de la saturación y se mantuvo idéntica para todos los colorantes a fin de simplificar la

preparación de las placas de matriz de sensores. Cada una de las celdas de los 4 colorantes x 3 columnas (2 CBs y agua) se llenó con 30  $\mu$ L de una disolución de GHB (**1**) en agua.

Diferentes placas multicelda fueron usadas a fin de determinar la respuesta frente a concentraciones diferentes de GHB (**1**). Los cambios de color ocurren en todos los casos de manera instantánea tras la adición de GHB (**1**) a los pozos. Las imágenes de las placas fueron tomadas en una cámara oscura lo que garantiza la reproducibilidad de las imágenes al mantener constantes las condiciones de iluminación y evitar la interferencia de la luz ambiente. Estas cámaras oscuras fueron iluminadas con luz blanca o con lámparas UV quasi-monocromáticas emitiendo a 355 nm a fin de conseguir dos imágenes diferentes. Aunque se observaron que los colores de las placas multimuestras fueron estables durante periodos de tiempo largos, las fotografías fueron tomadas como máximo 5 minutos después de la adición del GHB (**1**). Un estudio, más detallado sobre la reproducibilidad de los datos obtenidos para cada matriz de sensores, incluyendo análisis estadístico de los errores experimentales debidos a la dosificación y el procesado de las imágenes, se describe en la sección experimental. La distribución estadística de los datos demuestra que el método aquí descrito exhibe una alta reproducibilidad y una baja dispersión de los valores experimentales.



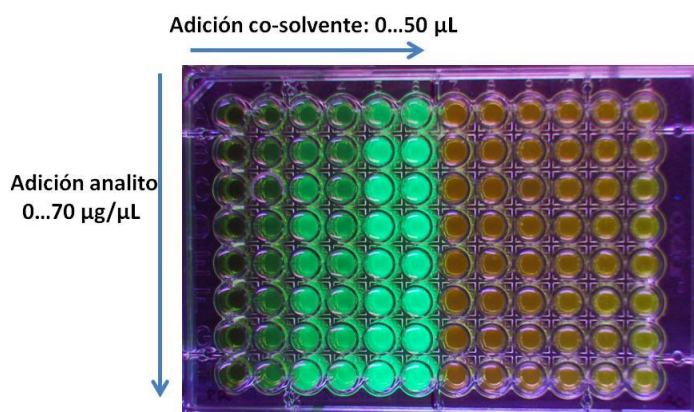
**Figura 4.4.** Imágenes de una placa multimuestra en ausencia de analito tomada bajo iluminación visible o UV (355 nm). La imagen original (izquierda) ha sido digitalizada en la parte derecha. Los números y letras mayúsculas indican el CB[n] empleado (dispuesto en columnas en las placas) y el colorante (dispuesto en filas y cuyas estructuras se indican mediante letras). La parte superior de la figura muestra dos vistas del CB[7].

Las imágenes fueron tomadas usando una cámara CCD NIKON D50 de 6.1 mega píxeles y las imágenes fueron exportadas a un ordenador el cual digitaliza la imagen, determinando los valores de los componentes rojo-verde-azul (RGB) para cada celda. Estos valores RGB son almacenados en un fichero. La Figura 4.4 muestra imágenes reales y digitales obtenidas para las matrices de sensores aquí empleadas en ausencia de GHB.

#### 4.2.3. Experimentos

Tanto mediante el examen visual como mediante análisis por ordenador de las imágenes digitales de las placas multimuestra tras añadir GHB (1) (0.1M) indican que no existen diferencias apreciables entre la respuesta de cada celda en presencia o en ausencia de GHB

(1). Sin embargo, fue importante observar que la adición de un co-solvente tal como etanol, acetona o acetonitrilo en una proporción 1:1 con respecto al agua sí que permite la detección visual de esta droga. Los experimentos que se describen a continuación fueron llevados a cabo empleando acetona como co-solvente.



**Figura 4.5.** Imagen de la placa multimuestra preparada para la detección de GHB (1), a diferentes concentraciones, a partir de los complejos con cucurbit[7]uril, (CB[7]) con proflavina (PR)-CB[7] y naranja de acridina (AO)-CB[7], bajo iluminación UV.

En una serie sistemática de experimentos, la concentración de GHB (1) se varió en el rango entre 0.1 y  $10^{-5}$  M. Como era de esperar, la respuesta del GHB varía en un cierto grado en función de su concentración. La Figura 4.5 ilustra las variaciones que se observan en función de la concentración de GHB para unas cuantas celdas seleccionadas.

El análisis de las imágenes digitales obtenidas en función de la concentración indica que la coincidencia en el color de algunas celdas puede ocurrir cuando la concentración de GHB está por debajo de un umbral. Esto es debido al hecho de que cuando la dilución es alta, el color converge al color de la imagen de la matriz de sensores en ausencia de GHB. En nuestras condiciones de operación, hemos sido capaces de detectar la presencia de GHB para concentraciones por encima de  $10^{-4}$  M. Más aún, mediante el uso del programa hIT<sub>e</sub>Q compilado a propósito con el fin de analizar este tipo de matrices de sensores, es posible

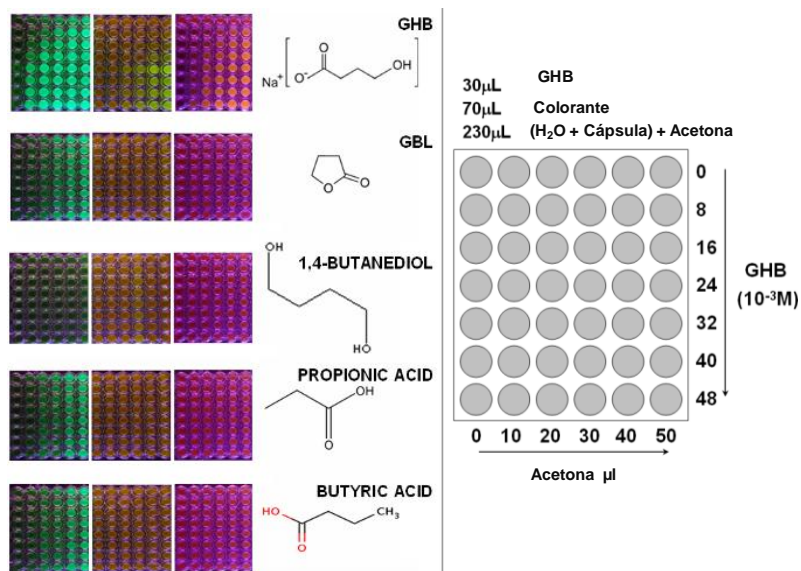
determinar la concentración de GHB en la muestra problema, determinando para una concentración desconocida los valores RGB de cada uno de los 4 (colorantes) x 2 pozos (CBs) e interpolar linealmente los datos en curvas de calibrado. La exactitud en la determinación cualitativa de la concentración de GHB está basada en las diferencias en las imágenes de las placas multimuestra para diferentes concentraciones.



**Esquema 4.1.** Metodología utilizada para la obtención de las imágenes de las placas sensoras multimuestra y el análisis de las mismas.

Este método permite distinguir con un nivel de confianza superior al 99% aquellas disoluciones en las cuales los puntos RGB están separados por una distancia mayor que tres veces el valor de la desviación estándar para una única celda. Puesto que en nuestro caso se combina la información de 12 celdas, casos de falso negativo deberían ocurrir menos que una vez cada millón, lo que resulta un valor notable. Es importante hacer notar que los datos del colorante proflavina (PF) son más útiles para distinguir concentraciones diluidas mientras que los datos de la pironina Y (PYY) son más adecuados para cuantificar soluciones más concentradas de GHB (1). La combinación de varios colorantes cubre un rango amplio de concentraciones que no podría ser cubierto por un único colorante. Este hecho está relacionado con que la saturación de cada color, y por tanto la posibilidad de que este color varíe en función de la presencia de analito, es diferente para cada colorante en función de su coeficiente de extinción molar.

Para comprobar la selectividad de nuestra matriz de sensores frente al GHB (**1**), se ensayaron igualmente una serie de compuestos relacionados con estructuras de alguna manera similares al GHB (**1**) y siguiendo el mismo procedimiento experimental. La Figura 4.6 muestra las placas correspondientes a los siguientes colorantes: **PYY**, **AO** y **PF** usando acetona como co-solvente, CB[8] como cápsula y GHB (**1**),  $\gamma$ -butirolactona (GBL) (**3**), 1,4-butanodiol y ácidos propiónico y butírico como analitos. Como puede observarse, nuestro sensor es capaz de discriminar el GHB (**1**) de los otros compuestos. Es digno de hacer notar que la discriminación entre GHB (**1**) y GBL (**3**) con nuestra matriz de sensores es particularmente simple y fiable. Tal como hemos comentado al principio del presente capítulo, la cromatografía de gases puede fácilmente conducir a error entre disoluciones de GHB (**1**) y GBL (**3**).



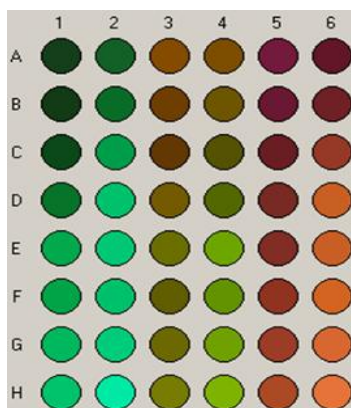
**Figura 4.6.** Fotografía de placas multimuestra a varias concentraciones de analito y acetona correspondiente a los siguientes colorantes (indicados de izquierda a derecha): PF, AO y PYY usando acetona como co-colvente, CB[8] como cápsula y GHB,  $\gamma$ -butirolactona (GBL), 1,4-butanodiol y ácidos propiónico y butírico como analitos. La parte derecha indica el sentido

creciente en el que se han ido incrementando las concentraciones de analito y acetona en cada fila y columna, respectivamente en cada una de las placas multicelda. También se indican los volúmenes de analito, disolución de colorante y disolución acetona-agua de los CB empleados.

Puesto que el GHB (**1**) en agua a valores de pH cerca de la neutralidad está ionizado, se determinó igualmente la discriminación de nuestra matriz de sensores para sales orgánicas e inorgánicas que pueden encontrarse habitualmente en agua. Como analitos de control se incluyó el NaCl, NaAcO así como el  $\text{Na}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-)$ . Considerando la similitud estructural entre el GHB (**1**) y otros carboxilatos orgánicos, se estudió la posibilidad de que la respuesta observada para el GHB (**1**) fuera también común a otros carboxilatos de sodio. Las imágenes registradas a las mismas concentraciones para NaAcO y  $\text{Na}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-)$  presentan de nuevo trayectorias de los puntos experimentales similares en el espacio RGB, pero los valores de los puntos fueron diferentes para estos carboxilatos comparados con el GHB (**1**). La discriminación visual entre el GHB (**1**) y estos carboxilatos fue posible por encima de concentraciones  $10^{-3}$  M. A modo de ejemplo la Figura 4.7 muestra dos imágenes en las cuales se observa la respuesta específica del GHB (**1**) comparada al NaAcO. De esta manera estos controles indican que las imágenes para los complejos supramoleculares colorante-CB permiten distinguir las disoluciones conteniendo GHB (**1**) del resto de carboxilatos.

La necesidad de co-solventes además de agua para detectar GHB (**1**) junto con la respuesta de NaCl sugiere que debería ser posible considerar la respuesta del GHB como una suma de las respuestas debidas al catión  $\text{Na}^+$  y al anión  $\text{GHB}^-$ . La observación de respuestas diferentes para NaCl y también para carboxilatos orgánicos proporciona indicios acerca del mecanismo del sensor y del emparejamiento iónico durante el fenómeno de detección. Además es digno de hacer notar que el hecho de que sea necesario un co-solvente y de que el etanol pueda inducir respuesta en la matriz de sensores puede ser de utilidad para la detección del GHB (**1**) directamente en bebidas alcohólicas en las cuales suele dosificarse esta droga. Sin embargo, algunos resultados preliminares indican que algunos componentes

de la Coca-Cola y del agua tónica deben interferir en la respuesta de la matriz de sensores y hacen que la detección del GHB en estos medios no sea posible.



**Figura 4.7.** Imagen digital de una placa multimuestra donde se coloca acetato sódico y  $\text{Na}^+$   $\text{GHB}^-$  en columnas alternativas ( $\text{NaAcO}$  columnas 1, 3, 5;  $\text{GHB}$  columnas 2, 4, 6). Las filas siguen las mismas condiciones experimentales indicadas en la Figura 4.5 donde el PF, AO y PYY se colocan respectivamente en las columnas (1,2), (3,4) y (5,6).

#### 4.2.4. Mecanismo de reconocimiento

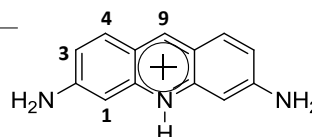
Uno de los hechos característicos de la presente matriz de sensores basados en complejos supramoleculares huésped-hospedador es que la respuesta del GHB (**1**) no se observa en agua pura, siendo la presencia de otro co-solvente un requisito. Considerando que nuestra matriz de sensores está constituida por colorantes básicos que están cargados positivamente y que el GHB (**1**) soporta una carga negativa a pH neutro debido a su grupo carboxilato se pensó en la posibilidad de que la falta de respuesta en agua pura estuviese relacionada con la solvatación de los iones en este medio donde la presencia de iones libres desfavorece la interacción entre el analito (anión) y el sensor (colorante positivo en el interior de un CB). Sería posible aumentar la asociación del par iónico disminuyendo la constante dieléctrica del medio siempre que se preserve la solubilidad del complejo supramolecular. Por consiguiente, la interacción entre los complejos con carga positiva y el



GHB (**1**) con carga negativa sería potenciada en medios con una menor constante dieléctrica y capacidad de solvatación.

A fin de proporcionar evidencia experimental que apoye esta racionalización del por qué la naturaleza del disolvente influye tan poderosamente en la interacción entre el GHB (**1**) y los complejos de colorantes, registramos una serie de espectros de RMN-<sup>1</sup>H de complejos de colorante con CB[n] en D<sub>2</sub>O con y sin co-solvente y en presencia o ausencia de GHB. A modo de ejemplo la Tabla 4.2 muestra los cambios de las señales correspondientes a los protones heterocíclicos en función de la composición del disolvente (D<sub>2</sub>O o mezclas de D<sub>2</sub>O/CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) en presencia de GHB (**1**) (10<sup>-3</sup>M).

δ	Desplazamiento químico			
	1	3	4	9
δ	5.983	6.606	7.268	7.965
Δδ sin GHB	---	0.117	0.243	-0.011
Δδ con GHB	---	0.11	0.179	-0.033



**Tabla 4.2.** Desplazamientos químicos de RMN-<sup>1</sup>H para los hidrógenos heterocíclicos de PF en D<sub>2</sub>O y su incremento en ausencia (Δδ<sub>sin GHB</sub>) y en presencia (Δδ<sub>conGHB</sub>) de GHB (**1**) 10<sup>-3</sup> M cuando este colorante se encuentra encapsulado en CB[8] (disolución saturada). Los espectros se registran en D<sub>2</sub>O (0.50 ml)/ CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> (0.15 ml).

Los datos de espectroscopia RMN-<sup>1</sup>H muestran que la adición de GHB (**1**) a una disolución de PF@CB[8] en D<sub>2</sub>O no produce cambios medibles en los valores δ de los átomos de hidrógeno aromáticos del PF dentro del CB[n]. En contraste estos mismos experimentos indican que la adición de acetona deuterada como co-solvente produce alguna variación en los valores δ de estas señales.

Esta influencia de la acetona deuterada no es totalmente inesperada considerando que está suficientemente descrito que la naturaleza del disolvente puede influir en los valores δ en espectroscopia RMN-<sup>1</sup>H.<sup>58</sup> Cuando el GHB (**1**) se añade a disoluciones de PF@CB[8] en

$D_2O/CD_3COCD_3$  como disolvente se observaron más cambios aun en los valores de  $\delta$ . Estas variaciones de  $\delta$  fueron más grandes a medida que el porcentaje de acetona deuterada aumenta. Los cambios en los valores de  $\delta$  debidos a la presencia de GHB (**1**) estuvieron en el rango de 0.1 ppm, que es muy superior al error instrumental de nuestra medida que se estima en  $\pm 0.002$  ppm.

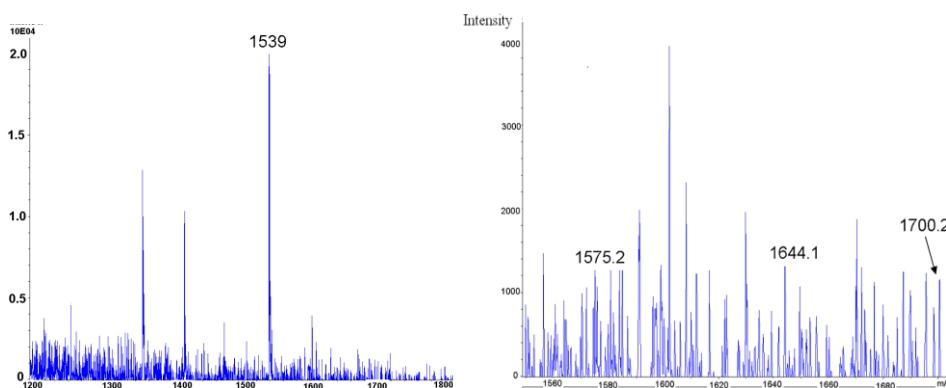
Cambios similares en los valores de  $\delta$ , pero menos importantes, se observaron igualmente cuando se emplearon otros disolventes deuterados tales como acetonitrilo, etanol y DMF. Este comportamiento de las señales en espectroscopia RMN- $^1H$  está en concordancia con el hecho de que la matriz de sensores únicamente detecte GHB (**1**) en presencia de estos co-solventes. Una posible interpretación a estas variaciones en los desplazamientos químicos de los protones aromáticos podría ser la interacción del GHB (**1**) con el colorante encapsulado debido al emparejamiento iónico.

Una de las evidencias más firmes a favor de la formación de complejos supramoleculares es la que se obtiene por espectrometría de masas en la cual además de los picos correspondientes a los componentes individuales se observa la presencia de un ión que corresponde a la masa total del complejo huésped-hospedador. En el presente caso era de interés determinar si también la espectrometría de masas es capaz de detectar la presencia de un complejo ternario en el cual el GHB (**1**) este asociado con el complejo colorante@CB[n]. Con este fin, se llevó a cabo un estudio por ESI-MS en modo positivo de la muestra PF@CB[8] en presencia de GHB usando como disolventes  $D_2O$  o una mezcla 5:1 de  $D_2O$  y  $CD_3COCD_3$ .

La Figura 4.8 proporciona datos correspondientes a las medidas de ESI-API-MS para ambas muestras. En los dos casos se observó la presencia de un pico intenso correspondiente al complejo PF@CB[8] (1539 Da). En contraste, no se observaron picos que correspondieran con la masa del complejo ternario cuando el disolvente era  $D_2O$ . Sin embargo, en el caso de emplear como disolvente la mezcla  $D_2O/CD_3COCD_3$ , además del pico intenso correspondiente al PF@CB[8] y PF@CB[8] asociado con NaCl (1572 Da), se registraron dos

picos pequeños adicionales a 1644 y 1700 Da que corresponden a la masa esperada para el complejo PF@CB[8] asociado a GHB y PF@CB[8] asociado con GHB y NaCl, respectivamente. Conviene comentar que los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  son introducidos en las disoluciones como contra iones que acompañan inicialmente al GHB y al colorante PF, respectivamente. Aunque hay más picos de intensidad similar en esta región de espectro de masas que no ha sido posible asignar.

La diferencia entre los espectros de ESI-API-MS usando exclusivamente agua como disolvente o una mezcla de agua y acetona es notable. Estos datos de espectroscopia de masas apoyan de nuevo que la asociación iónica motivada por la presencia de  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$  como co-solvente es la que promueve la formación de un complejo ternario GHB-PF@CB[8] y que es este complejo ternario el que es detectado en estas disoluciones mediante la matriz de sensores debido a los cambios en las imágenes de las mismas.



**Figura 4.8.** *Izquierda:* Picos principales de los espectros ESI-API-MS de una mezcla  $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COCD}_3$  5/1 conteniendo GHB ( $1 \times 10^{-4}$  M), CB[8] ( $1 \times 10^{-4}$  M) y proflavina (PF,  $5 \times 10^{-4}$  M). El pico marcado con la etiqueta 1539 Da corresponde al complejo hospedador-huésped  $[\text{PF}+\text{CB}[8]]^+$ . *Derecha:* Ampliación del mismo espectro ESI-API-MS que muestra picos adicionales. Los picos marcados con las etiquetas 1575.2, 1644.1 y 1700.2 corresponden a los complejos  $(\text{PF}+\text{Cl}+\text{CB}[8]+\text{D})^+$ ,  $(\text{PF}+\text{CB}[8]+\text{GHB})^+$  y  $(\text{PF}+\text{Cl}+\text{CB}[8]+\text{GHB}+\text{Na})^+$ , respectivamente. Destacar que la proflavina es introducida en su forma salina (cloruro) y el

GHB como su sal sódica. Estos picos no se encontraron en los espectros ESI-API-MS que se llevaron a cabo en D<sub>2</sub>O y en ausencia de CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>.

### 4.3. Conclusiones

Los resultados del presente capítulo muestran un sistema sensor original e innovador para la droga GHB (1) en agua, el cual está basado en una matriz construida combinando cuatro colorantes fluorescentes comunes como huéspedes y dos CBs como hospedadores. La respuesta basada en la formación de complejos supramoleculares resulta en cambios de color dependiendo de la asociación del colorante con el GHB (1) y cambios en los espectros de fluorescencia cuando se comparan estos en presencia y en ausencia de GHB (1).

La eficiencia del sensor aquí descrito permite la detección de GHB (1) en concentraciones superiores a 10<sup>-3</sup>M y cuantificar su concentración. Este valor del límite de detección es inferior al de algunos sensores comerciales actualmente en uso y permitiría la detección del GHB (1) en concentraciones que son habitualmente empleadas en el consumo de esta droga. Incluso para concentraciones sub-milimolares, un examen visual podría permitir la detección inmediata del GHB (1), aunque un análisis de la imagen permite la detección mucho más fiable y determinar la concentración de la droga en la disolución.

### 4.4 Referencias

- (1) Bessman, S.; Fishbein, W. *Nature* **1963**, *200*, 1207-1208.
- (2) Walkersteen, S.; Wiser R; Gudmunsen C; H., K. *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, *86*, 640-642.
- (3) Mamelak, M. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1989**, *13*, 187-198.
- (4) El uso comercial e industrial del GHB es muy amplio: La butirolactona se utiliza 1) obtención de butirato para fármacos y otras sustancias químicas, 2) obtención del aminoácido metionina, 3) fabricación de polivinilpirrolidona (utilizada en la obtención de pasta de dientes, film fotográfico, adhesivos, cosméticos y en la fabricación de cerveza y vino) 4) fabricación de poliestireno y polímeros acrílicos, 5) en la industria del metal y 6) en la industria textil.
- (5) Biggio, G. *Adv. Biochem. Psychopharmacol* **1992**, *47*, 281-288.
- (6) Gallimberti, L. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **1992**, *6*, 673-676.
- (7) Mamelak, M.; Scharf, M.; Woods, M. *Sleep* **1986**, *9*, 285-289.
- (8) Li, J.; Stokes, S.; Woekener, A. *Ann. Emerg. Med.* **1998**, *31*, 723-728.
- (9) Viera, A.; Yates, S. *South. Med. J.* **1999**, *92*, 402-405.

- (10) Suner, S.; Szlatenyi, C.; Wang, R. *Acad. Emerg. Med.* **1997**, *4*, 1041-1045.
- (11) Ross, T. *J. Emerg. Nurs.* **1995**, *21*, 374-376.
- (12) Boyd, S.; Baselt, R. *Journal of Analytical Toxicology* **1994**, *18*, 357-358.
- (13) Galloway, G.; Frederick, S.; Staggers, F.; Gonzales, M.; Stalcup, S.; Smith, D. *Addiction* **1997**, *92*, 89-96.
- (14) Vickers, M. *Int. Anesthesiol. Clin.* **1969**, *7*, 75-89.
- (15) Ropero-Miller, J.; Goldberger, B. *Clin. Lab. Med.* **1998**, *18*, 727-746.
- (16) U.S. Food and Drug Administration. Retrieved January 2009, from <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/mwgbghb.html>.
- (17) Li, J.; Stokes, S.; Woeckener, A. *Ann. Emerg. Med.* **1998**, *31*, 729-736.
- (18) Dyer, J. *American Journal of Emergency Medicine* **1991**, *9*, 321-324.
- (19) Tunnicliff, G. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **1997**, *35*, 581-590.
- (20) Louagie, H. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **1997**, *35*, 391-594.
- (21) Bruguerolle, B. *Therapie* **1977**, *32*, 375.
- (22) Scima, L. *Sleep* **1990**, *13*, 479.
- (23) Gallimberti, L. *Neuropsychopharmacology* **1993**, *9*, 77.
- (24) Ferrara, S.; Tedeschi, L.; Frison, G.; Rossi, A. *Journal of Forensic Science* **1995**, *40*, 501-504.
- (25) Breo, D. L. *J. Am. Med. Assoc.* **1991**, *265*, 447-448.
- (26) *The 200 International GHB & Chemical Drug Conference, Arlington, Texas, 2007*;
- (27) *The 2nd International GHB & Chemical Drug Conference, Las Vegas, 2004*.
- (28) Ferrara, S. D. *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 483-487.
- (29) Kintz, P.; Gouille, J.-P.; Cirimele, V.; Ludes, B. *Clin. Chem.* **2001**, *47*, 2033-2034.
- (30) McCusker J. *Anal. Toxicol.* **1999**, *5*, 301-305.
- (31) Gibson, K. M. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1990**, *19*, 89-93.
- (32) Mesmer, M.; Duane Satzger, R. *J. Forensic Sci* **1998**, *43*, 489-492.
- (33) Parsons, S. M.; Harris, D. O.; Bravo, D. T. *US Patent 6703216* **2004**.
- (34) Anslyn, E. V. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 687.
- (35) Suslick, K. S.; Rakow, N. A.; Sen, A. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11133.
- (36) Albert, K. J.; Lewis, N. S.; Schauer, C. L.; Sotzing, G. A.; Stitzel, S. E.; Vaid, T. P.; Walt, D. R. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2595.
- (37) Wright, A. T.; Anslyn, E. V. *Chem. Soc. Rev* **2006**, *35*, 14.
- (38) Ciosek, P.; Wroblewski, W. *Analyst* **2007**, *132*, 963.
- (39) Potyrailo, R. A. *Angew. Chem. Int. Ed* **2006**, *45*, 702.
- (40) Gale, P. A. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 465.
- (41) Kuswandi, B.; Nuriman, W.; Verboom, D.; Reinhoudt, N. *Sensors* **2006**, *6*, 978.
- (42) Palacios, M. A.; Nishiyabu, R.; Marquez, M.; Anzenbacher, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7538-7544.
- (43) Meier, M. A. R.; Schubert, U. S. *Chem. Commun* **2005**, 4610-4612.
- (44) Gardner, J. W.; Bartlett, P. N. *Electronic Noses: Principles and Applications, Oxford University Press* **1999**.
- (45) Diaz Fernandez, Y.; Gramatges, A. P.; Amendola, V.; Foti, F.; Mangano, C.; Pallavicini, P.; Patroni, S. *Chem. Commun.* **2004**, 1650-1165.
- (46) Palacios, M. A.; Wang, Z.; Montes, V. A.; Zyryanov, G. V.; Anzenbacher, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10307-10314.
- (47) Montes-Navajas, P.; Baumes, L. A.; Corma, A.; Garcia, H. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2301.

- (48) Montes-Navajas, P.; Baumes, L. A.; Buaki Sogo, M.; Corma, A.; Garcia, H. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7001.
- (49) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. *Angew.Chem.* **2005**, *117*, 4922.
- (50) Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H. J.; Kim, K. *Acc.Chem. Res.* **2003**, *36*, 621.
- (51) Rudkevich, D. A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, *75*, 393.
- (52) Fathallah, M.; Fotiadu, F.; Jaime, C. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1288.
- (53) Montes-Navajas, P.; Teruel, L.; Corma, A.; Garcia, H. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1762.
- (54) Koner, A. L.; Nau, W. M. *Supramol. Chem.* **2007**, *19*, 55.
- (55) Nau, W. M.; Mohanty, J. *Int. J. Photoenergy* **2005**, *7*, 133.
- (56) Mohanty, J.; Pal, H.; Ray, A. K.; Kumar, S.; Nau, W. M. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 54.
- (57) Montes-Navajas, P.; Corma, A.; Garcia, H. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 713.
- (58) Silverstein, R. M.; Morrill, T. C.; Bassler, G. C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th ed., Wiley, New York, **1999**.

## **CAPÍTULO 5: COMPLEJOS SUPRAMOLECULARES ENTRE CUCURBITURILES Y ACETANILIDAS DERIVADAS DE LA ANILINA Y DE LA ORTO Y PARA FENILENDIAMINA.**

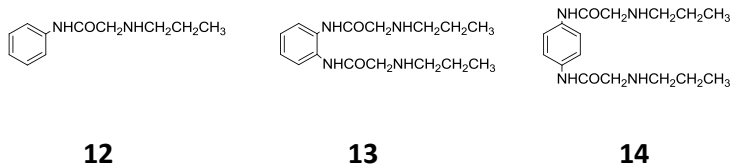
---

---

### **5.1 Introducción**

Tal como se ha indicado en la introducción el estudio de los complejos supramoleculares de cucurbituriles (CBs) con moléculas orgánicas en disolución acuosa es objeto de considerable atención debido a las notables propiedades de estos complejos y a sus posibles aplicaciones.<sup>1-11</sup> Ya se ha indicado que los CBs son oligómeros cíclicos de unidades de glicol uril conectadas con puentes metileno cuya cavidad interna es accesible para moléculas huésped.<sup>12-14</sup> Dependiendo del número de unidades de glicoluril el diámetro interno y las aberturas de la cápsula orgánica varían entre 3.9 y 5.8, y 6.9 y 8.8 Å para CB[6] y CB[8], respectivamente.<sup>13,14</sup>

En el presente capítulo se proporcionan datos que ponen en evidencia la formación de complejos huésped-hospedador entre los CBs con la 2-(propilamina) acetamida de la anilina así como la bis-2-(propilamino)acetamida de los isómeros orto- y para- de la fenilendiamina. El esquema 5.1 muestra la estructura de las amidas aromáticas que han sido objeto de estudio.



**Esquema 5.1.** Amidas aromáticas objeto de estudio en el presente capítulo

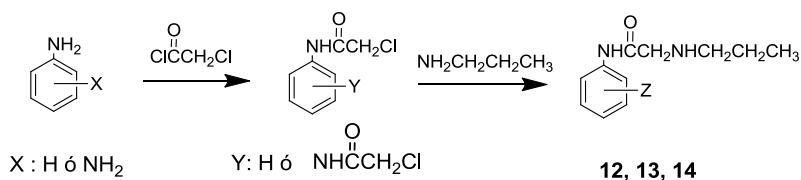
El objetivo es determinar como el número de cadenas de propilamina y su posición relativa influyen en la interacción de las amidas aromáticas **12**, **13** y **14** con CBs

dependiendo del tamaño de cavidad. Tras demostrar la formación de estos complejos de inclusión entre las amidas aromáticas **12**, **13** y **14** y los CBs describiremos el anclaje covalente de análogos de estas amidas aromáticas en sílice de elevada área superficial a fin de establecer la formación de complejos análogos en la fase sólida. Se pretende discriminar entre la adsorción selectiva debida a la formación de complejo huésped-hospedador y la adsorción inespecífica sobre la superficie debido a interacciones débiles de puentes de hidrógeno y bipolares. El interés del presente estudio deriva del aumento de complejidad en el sistema cuando se cambia de fase líquida a fase sólida y la posibilidad de secuestrar de forma reversible los CBs.

## 5.2 Resultados

La síntesis de las amidas aromáticas requeridas en el estudio **12**, **13** y **14** se llevo a cabo en dos etapas a partir de la anilina o de la orto- o para- fenilendiamina las cuales se hicieron reaccionar en primer lugar con el cloruro de 2-cloroacetilo para formar la cloroacetanilida intermedia la cual se hizo reaccionar a continuación con N-propilamina obteniéndose los compuestos indicados. El esquema 5.2 ilustra la ruta sintética seguida en la preparación de las acetanilidas aromáticas empleadas en el presente capítulo.

Los compuestos **12**, **13** y **14** se caracterizaron en base a sus propiedades analíticas y espectroscópicas las cuales estuvieron de acuerdo con los valores esperados para estas estructuras (ver sección experimental).

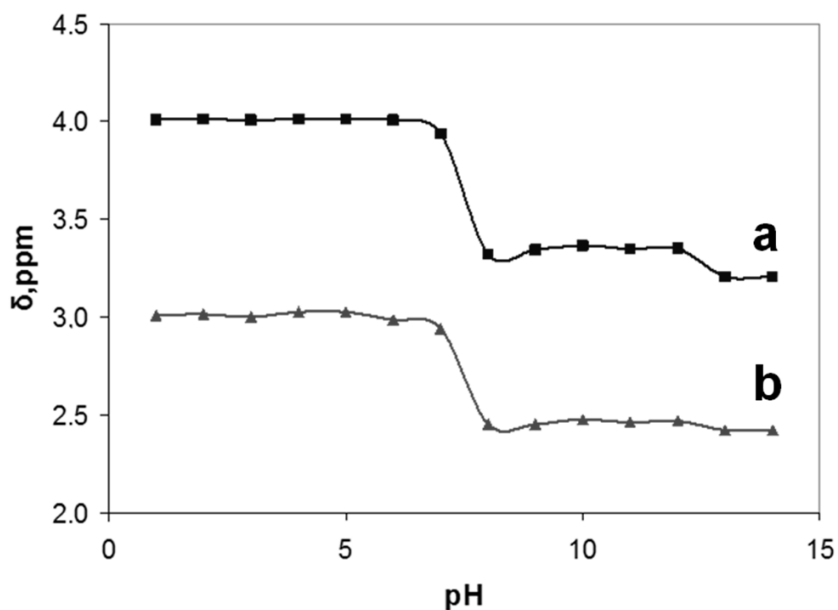


Compuesto	Z
<b>12</b>	H
<b>13</b>	o-NHCOCH <sub>2</sub> NHPr
<b>14</b>	p-NHCOCH <sub>2</sub> NHPr



**Esquema 5.2.** Ruta sintética seguida para la obtención de las amidas aromáticas objeto de estudio.

Las acetanilidas **12**, **13** y **14** fueron solubles en agua. Se llevo a cabo la valoración de estos compuestos en función del pH mediante espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H. Las variaciones observadas en los espectros indican que los compuestos **12**, **13** y **14** pueden estar presentes en agua como especies monoprotonadas (**12**: pH de 0 a 8 y **13** y **14**: pH entre 7.5 y 12) o especies diprotonadas **13** y **14**: pH entre 0 y 7.5) o como compuestos neutros (**12**: pH por encima de 8) y **13** y **14**: pH por encima de 12). A modo de ejemplo la Figura 5.1 muestra la dependencia de los desplazamientos químicos en espectroscopia RMN-<sup>1</sup>H correspondiente a las señales de los protones  $-\text{CO}-\underline{\text{CH}_2}\text{NH}-$  y  $-\text{NH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{C}_2\text{H}_5$  para el compuesto **13** en función del valor de pH de la disolución.

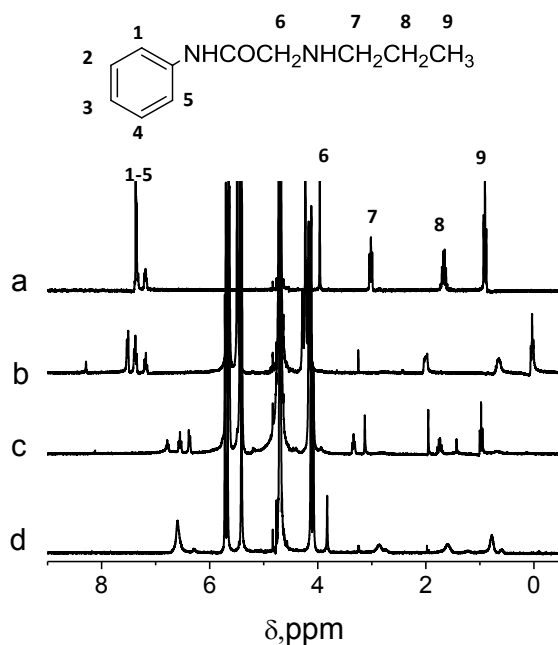


**Figura 5.1.** Desplazamiento químico de las señales correspondientes a los protones  $-\text{CO}-\underline{\text{CH}_2}\text{NH}-$  (a) y  $-\text{NH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$  (b) en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **13** en función del valor de pH de la disolución.

Estos dos grupos metileno indicados son los que sufren una variación en el desplazamiento químico mayor cuando varía el valor de pH de la disolución. Curvas similares han sido obtenidas para el compuesto **14**, mientras el compuesto **12** exhibe solo un único cambio brusco en los valores de  $\delta$  en lugar de dos en el rango de valores de pH entre 7 y 9. En el resto de este estudio los valores de pH de las disoluciones acuosas empleadas se encuentra alrededor de 5.5 que corresponde al valor de pH de la disolución que se obtiene cuando se disuelven los compuestos **12**, **13** y **14** en agua milliQ y por consiguiente los datos del presente estudio corresponden al comportamiento de la especie monobásica (**12**) o dibásica (**13** y **14**) de las anilidas objeto de estudio. La elección de este valor de pH que corresponde al de la disolución libre se basa en que de esta manera los datos obtenidos corresponden a disoluciones en ausencia de tampón cuya presencia pudiera influir de alguna manera en la asociación entre los compuestos **12**, **13** y **14** y los CBs.<sup>15,16</sup>

### **5.2.1. Estudio de los complejos de inclusión entre las acetanilidas 12, 13 y 14 y los CBs.**

La formación de los complejos de inclusión para **12**, **13** y **14** fue estudiada empleando CB[6], CB[7] y CB[8]. Mediante espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  se pudo obtener evidencia espectroscópica firme de la formación de los complejos de inclusión. La comparación de los espectros de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto **12** en ausencia y presencia de un exceso de CB[6] muestra cambios notables hacia campo alto en los valores de  $\delta$  de las señales correspondientes a los protones alifáticos, mientras que las señales correspondientes a los protones aromáticos pierden su degeneración, apareciendo diferenciadas y desplazadas a campo bajo las señales de los protones orto-, meta- y para-. Esto es compatible con la inclusión de las cadenas alifáticas en el interior de la cavidad hidrofóbica del CB[6], estando el anillo aromático localizado en las proximidades del portal de los grupos carbonilo. La Figura 5.2 muestra los espectros de RMN- $^1\text{H}$  correspondientes al compuesto **12** en una disolución de  $\text{D}_2\text{O}$  en ausencia o presencia de CB6.

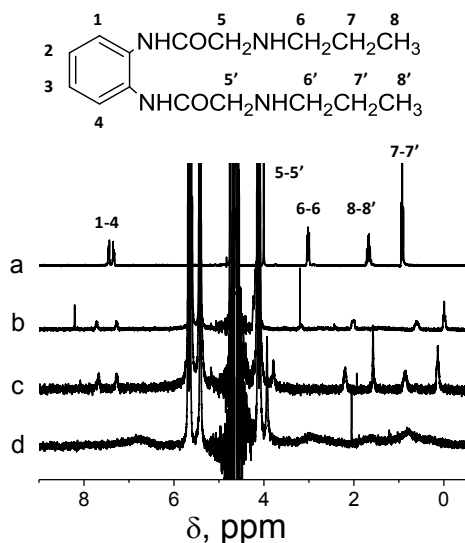


**Figura 5.2.** Espectros de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  de la amida aromática **12** (5.2 mM) en ausencia (a) o en presencia de una disolución saturada de CB[6] (b), CB[7] (c) y CB[8] (d).

La encapsulación de la acetanilida **12** en el interior de CB[7] y CB[8] tiene lugar igualmente como se pone de manifiesto de nuevo por los cambios observables en los espectros de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  del compuesto **12** en presencia de un exceso de CB[7] y CB[8]. Sin embargo, en estos dos casos los cambios en los desplazamientos químicos indicaron que la encapsulación ocurre por inclusión del anillo aromático dentro de la cavidad apolar del CB[7], lo que conduce a desplazamientos a campos altos de las señales aromáticas e incrementos a campo bajo para los protones en la cadena acetanilido. La diferencia más destacable entre el CB[7] y el CB[8] es que en este último caso las señales se vuelven mucho más anchas sugiriendo que los procesos de complejación y disociación están ocurriendo durante la escala de tiempo de los experimentos de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$ . La Figura 5.2 ilustra igualmente los cambios que ocurren en los espectros de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  del compuesto **12** en presencia de CB[7] (c) y CB[8] (d).

La estequiometría del complejo de inclusión **12**@CB[n] se dedujo de los datos de MALDI-MS y API-ESI-MS en los cuales pudo observarse el pico correspondiente al complejo de estequiometría 1:1 **12**@CB[n] ( $n = 6,7,8$ ) que aparece a 1189.4, 1355.4 y 1521.6 u.a.m

Los compuestos **13** y **14** se comportaron de forma análoga a la que se acaba de comentar para el compuesto **12**, es decir, para complejos con CB[6] es la cadena lateral la que resulta incluida en la cavidad de CB[n] y el desplazamiento químico de los protones  $-\text{CO}-\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}$  sufre un desplazamiento a valores de campo alto, mientras que los protones aromáticos se desplazan a campo bajo. Para CBs de mayor tamaño, CB[7] y CB[8], se observó la tendencia opuesta. Así a modo de ejemplo, la Figura 5.3 presenta los espectros de RMN- $^1\text{H}$  en ausencia y presencia de CBs registrados para el compuesto **13**. De esta forma el comportamiento observado en espectroscopia de RMN- $^1\text{H}$  es compatible con el hecho de que cavidades de mayor tamaño alojan el anillo aromático pero esta inclusión no puede tener lugar en el interior del CB[6] debido a las dimensiones mas pequeñas de este CBn. En este caso la única opción es la inclusión de la cadena lateral.<sup>17,18</sup>



**Figura 5.3.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  de **13** (3.3 mM) en ausencia (a) o en presencia de una disolución de  $\text{D}_2\text{O}$  saturada de CB[6] (b), CB[7](c) y CB[8](d).

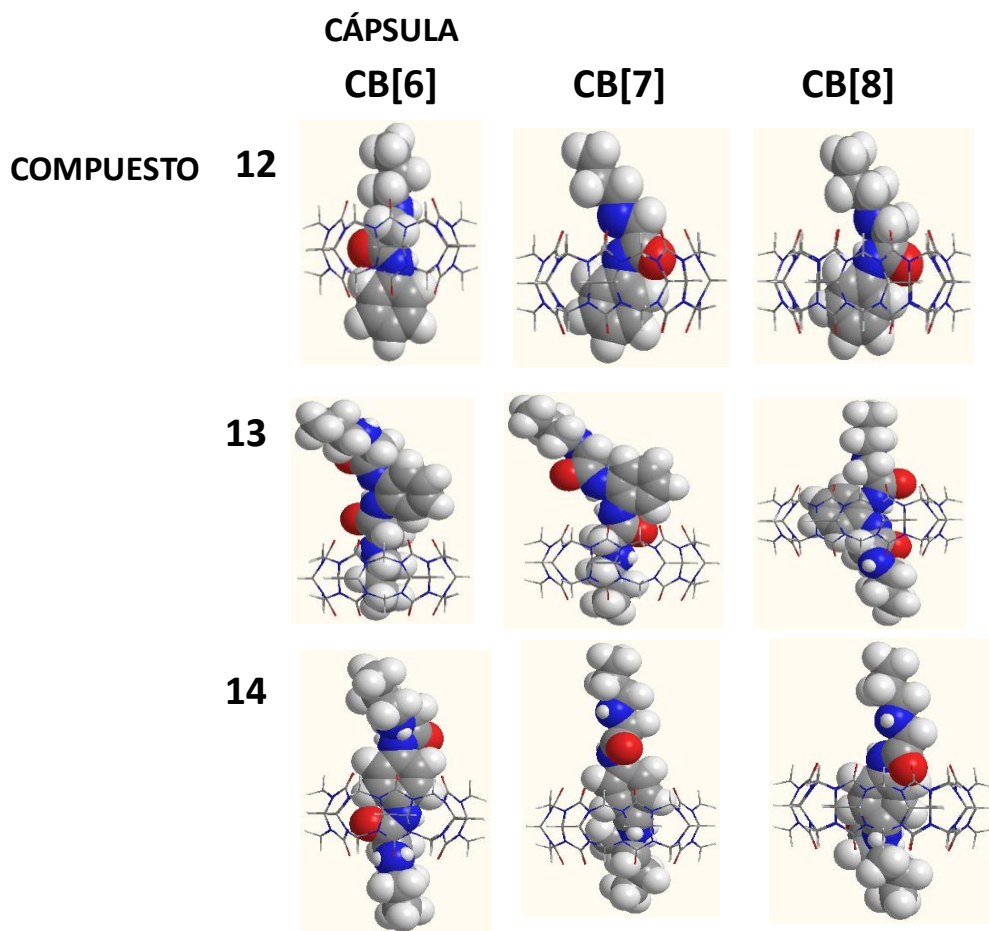
Con respecto a la estequiometría de los complejos de inclusión de las diamidas aromáticas **13** y **14** bajo las condiciones en las que existe un exceso de CB[n] conviene indicar que en los dos casos se han registrado picos que corresponden con la masa esperable para los complejos 1:1 en el caso del CB[7] y CB[8]. Es interesante indicar que para el compuesto **13** bajo un exceso de CB[n] ( $n = 6, 7, 8$ ), los espectros de MALDI-MS muestran la presencia de picos correspondientes a los complejos  $13@(\text{CB}[n])_2$  1:2 con una doble carga positiva que aparecen a 1151, 1317 y 1483 u.a.m. La Tabla 5.1 resume los picos registrados en los espectros de MALDI-MS en condiciones en las que se encuentra un exceso de CB los cuales podrían permitir determinar las posibles estequiometrías de los complejos huésped-hospedador. Conviene hacer notar, que también para el compuesto **14** los picos correspondientes a la estequiometría 1:2 fueron observados.

m/z	CB[6]	Int. relativa(%)	CB[7]	Int. relativa (%)	CB[8]	Int. relativa (%)
12@CB[n]	1189.4	100	1355.4	100	1521.6	100
13@CB[n]	1307	100	1473	100	1639	2.58
13@CB[n]/2	653	33.3	736	1.25	819	100
13@2CB[n]/2	1151	15.6	1318	40	1484	9.68
14@CB[n]	1304	100	1471	100	1637	100
14@CB[n]/2	652	2.37	735	1.67	818	2.08
14@2CB[n]	2299	3.3	2630	2.17	2966	3.8

**Tabla 5.1.** Picos registrados en MALDI-MS en condiciones de exceso de CB[n] ( $n = 6, 7, 8$ ) para las amidas aromáticas **12**, **13** y **14**.

Basándonos en la información sobre la estequiometría de los complejos obtenida por espectrometría de masas y la influencia del CB[n] en los desplazamientos químicos, se realizaron modelos de mecánica molecular compatibles con los datos obtenidos. La Figura 5.4 presenta una imagen de estos modelos. Comparado con **12** y **13**, los modelos para el

compuesto **14** presentan una mayor penetración de esta molécula en el interior del CB[7] medida por la distancia entre el centro geométrico de CB[7] y CB[8] y el centro de gravedad de la molécula huésped. Estos modelos indican que para el CB[7] y CB[8] la molécula derivada de la para-fenilendiamina alcanza prácticamente el mismo grado de penetración. Solo el modelo para **14**@CB[6] muestra que el huésped orgánico no puede entrar libremente al centro de esta cápsula orgánica.



**Figura 5.4.** Estructuras de mecánica molecular correspondientes al mínimo de energía para los complejos supramoleculares de inclusión **12**, **13** y **14** con CB[n].

Las constantes de asociación para los complejos de **12**, **13** y **14** con los CBs 6, 7 y 8 fueron determinadas por conductimetría. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 5.2. Como puede verse en esa Tabla, la fuerza de asociación es similar para todos los complejos huésped-hospedador variando en torno al valor  $10^5 \text{ M}^{-1}$ . Estos valores de asociación similares sugieren que el tipo de interacción entre las cadenas laterales acetamido de la molécula huésped y los CBs son similares para las tres amidas aromáticas **12**, **13** y **14** independientemente del hecho de que haya una cadena lateral única o doble y de la posición relativa de la misma.

Estos resultados contrastan con un precedente relacionado que utilizó como molécula huésped el dinitrato de N,N'-dialil-para-xilileno diamonio donde parece ocurrir que el tamaño de la cavidad del CB[n] controla la inclusión de una o dos de las cadenas laterales.<sup>19</sup> Merece ser destacado, sin embargo, que nuestras moléculas difieren en la presencia de dos unidades de diamida aromática que introducen una gran rigidez conformacional y planaridad con el anillo, por lo que en nuestro caso podrían ser decisivos factores estéricos para impedir la inclusión en una sola unidad de CB[n] de las dos cadenas laterales.

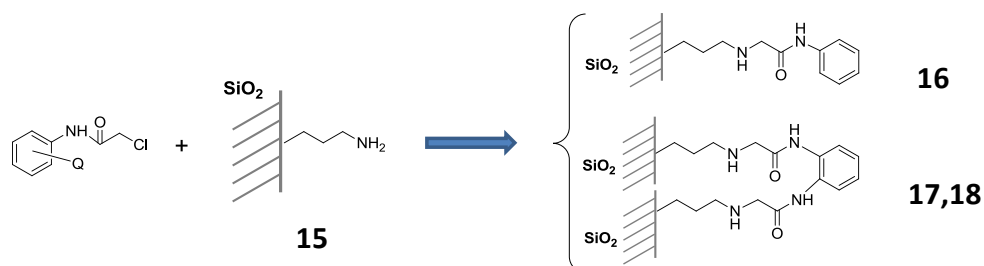
Anfitrión	$K_B \times 10^{-5}, \text{M}^{-1}$		
	12	13	14
CB[6]	$5.34 \pm 0.02$	$5.44 \pm 0.03$	$5.57 \pm 0.15$
CB[7]	$5.78 \pm 0.03$	$1.87 \pm 0.004$	$5.65 \pm 0.03$
CB[8]	$5.54 \pm 0.03$	$5.54 \pm 0.06$	$5.42 \pm 0.02$

**Tabla 5.2.** Constantes de asociación para los complejos supramoleculares entre las amidas aromáticas **12**, **13** y **14** y los CBs determinadas mediante conductimetría.

### 5.2.2. Formación de complejos de inclusión con CB[n] en fase sólida.

Una vez hemos demostrado que las amidas aromáticas **12**, **13** y **14** forman complejos huésped-hospedador fuertes con CB[n] ( $n = 6-8$ ) en disolución acuosa, la siguiente etapa de nuestro estudio ha sido preparar compuestos análogos a **12**, **13** y **14** anclados covalentemente a partículas de sílice a fin de determinar la formación de complejos de inclusión entre estas unidades acetamido soportadas en fase sólida y los CBs en disolución.

Con el fin de cumplir el objetivo propuesto, se seleccionó una sílice coloidal de elevada área superficial disponible comercialmente y que se encuentra convenientemente funcionalizada con grupos amino. Esta sílice coloidal aminada fue tratada con derivados mono- o bis-cloroacetamido de las aminas aromáticas. El Esquema 5.2 presenta el procedimiento de preparación de estos materiales así como una estructura ideal que muestra la similitud entre los compuestos **12**, **13** y **14** con las unidades presentes en la sílice **15**.



Material	Q
<b>16</b>	H
<b>17</b>	o-NH <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub> Cl
<b>18</b>	p-NH <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub> Cl

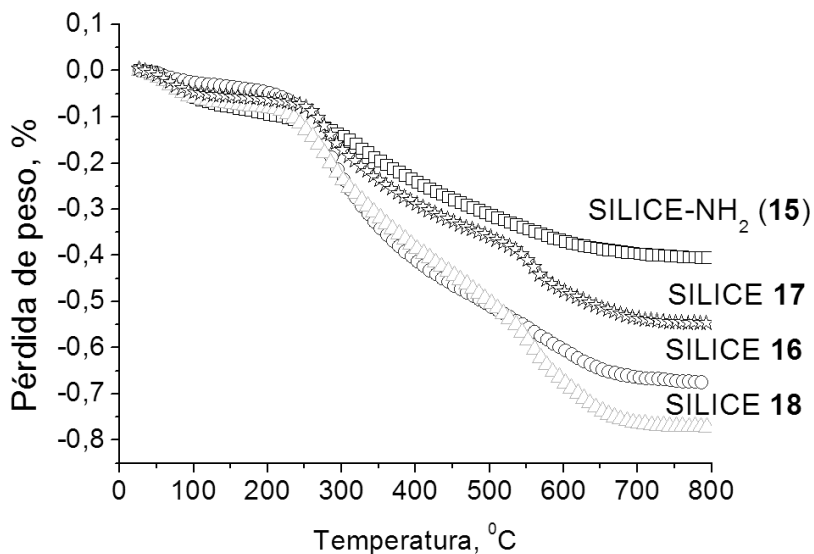
**Esquema 5.2.** Procedimiento de preparación y estructuras de las unidades ancladas covalentemente en la sílice **15**.

Los sólidos funcionalizados con amidas aromáticas resultantes de este proceso fueron analizados tras su modificación mediante análisis elemental de combustión. La sílice con grupos aminopropil inicial (**15**) contiene 2.3 mmol g<sup>-1</sup> de grupos amino. Una fracción de



estos grupos amino iniciales actuará como unión con las unidades de cloroacetanilidas. Esta funcionalización se refleja en un incremento en el contenido de carbón y nitrógeno del sólido tras su modificación. De acuerdo con el análisis químico alrededor del 16 % de los grupos amino iniciales resultan transformados en unidades acetanilido, en el caso del sólido **16**. El caso de los sólidos **17** y **18** es más complejo debido a la posibilidad de funcionalización a través de una o dos cadenas laterales. En ninguno de los casos se consiguió la funcionalización completa y basándonos en el incremento en el porcentaje de nitrógeno la mínima población de unidades acetanilido fue de 14 – 19 % para los sólidos **17** y **18** respectivamente asumiendo que los dos átomos de cloro han sido reemplazados completamente.

Estos valores de contenido de grupos orgánicos obtenidos por análisis químico son compatibles con los datos de termogravimetría para estos mismos materiales. La Figura 5.5 muestra el perfil termogravimétrico para la sílice aminopropil (**15**) comercial y los sólidos funcionalizados **16**, **17** y **18** registrado en corriente de aire. Se observó que la sílice aminopropil **15** experimenta una pérdida inicial de peso entre temperatura ambiente y 200 °C del 3.6 % que es atribuible a la desorción de agua de hidratación presente en el material. La pérdida de masa entre 200 y 700 °C fué del 13.4 % que correspondería a la combustión de los grupos aminopropil. De acuerdo con esta pérdida de peso la densidad de grupos orgánicos en la sílice sería de 2.3 mmolg<sup>-1</sup> lo que está de acuerdo con el valor determinado por combustión. El perfil termogravimétrico de los sólidos funcionalizados fue similar, exhibiendo una pérdida de peso inicial hasta 200 °C atribuible a la desorción de agua y una pérdida de peso entre 200 y 600 °C que sería atribuible a la combustión de la materia orgánica presente en estos sólidos. La introducción de grupos acetanilido y el mayor porcentaje de carbono de la muestra se refleja en la mayor pérdida de peso de acuerdo con su grado de funcionalización, siendo estos valores compatibles con los que se han determinado por análisis elemental.

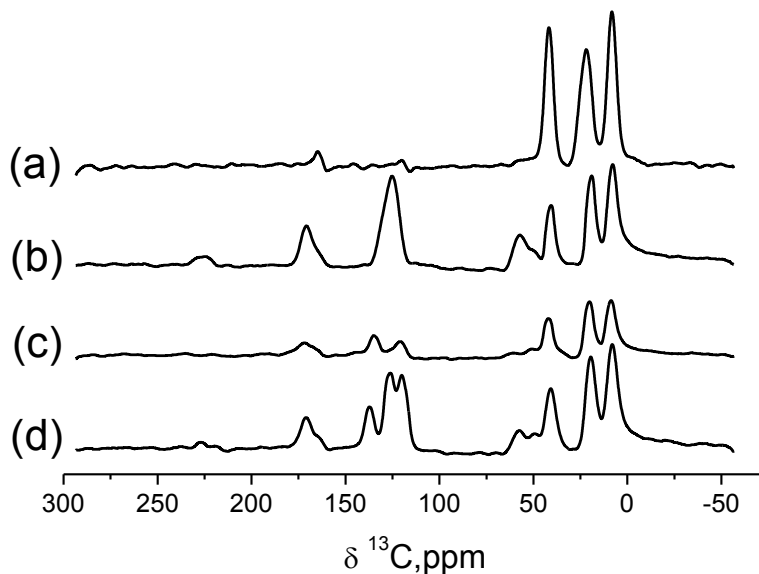


**Figura 5.5.** Perfiles termogravimétricos de la sílice de partida (**15**) y de los materiales **16**, **17** y **18** obtenidos tras su funcionalización con los precursores cloroacetanilida.

La adsorción de isoterma de nitrógeno permitió medir el área superficial de estos materiales. Se observó que la sílice de partida con grupos aminopropil **15** presenta un área superficial de  $325 \text{ m}^2/\text{g}$ . La funcionalización de este material de partida produce en todos los casos una reducción en el área superficial que resultó ser de 273, 282 y  $224 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  para los sólidos **16**, **17** y **18**.

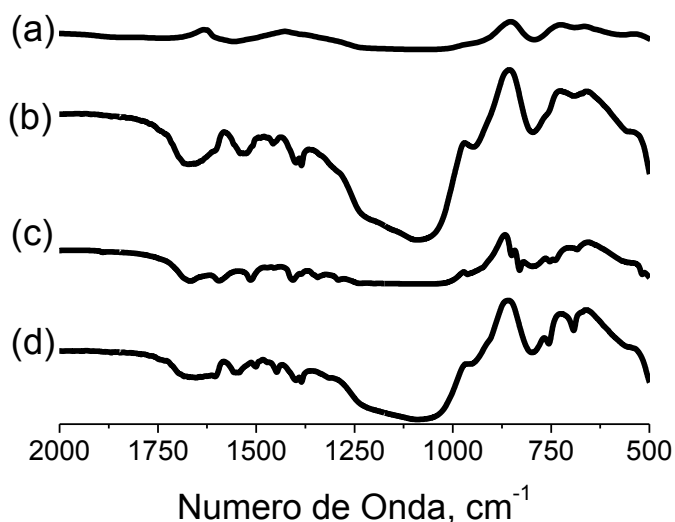
La Figura 5.6 muestra los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  en estado sólido registrados por ángulo mágico de la sílice con grupos aminopropil inicial **15** y los sólidos **16**, **17** y **18** resultantes de la funcionalización. Como puede verse allí la sílice de partida con grupos aminopropil presenta los tres picos esperados correspondientes a los grupos metileno. Tras funcionalización, todos los sólidos exhibieron estos mismos tres picos más señales correspondientes al grupo  $\text{CH}_2$  puente de la unidad de acetamido. Además se observaron señales correspondientes a los carbonos aromáticos e incluso al carbono  $\text{C}=\text{O}$  de la

acetamida. La posición de los picos en el espectro es compatible con la presencia de las unidades acetamido indicadas en el Esquema 5.2.



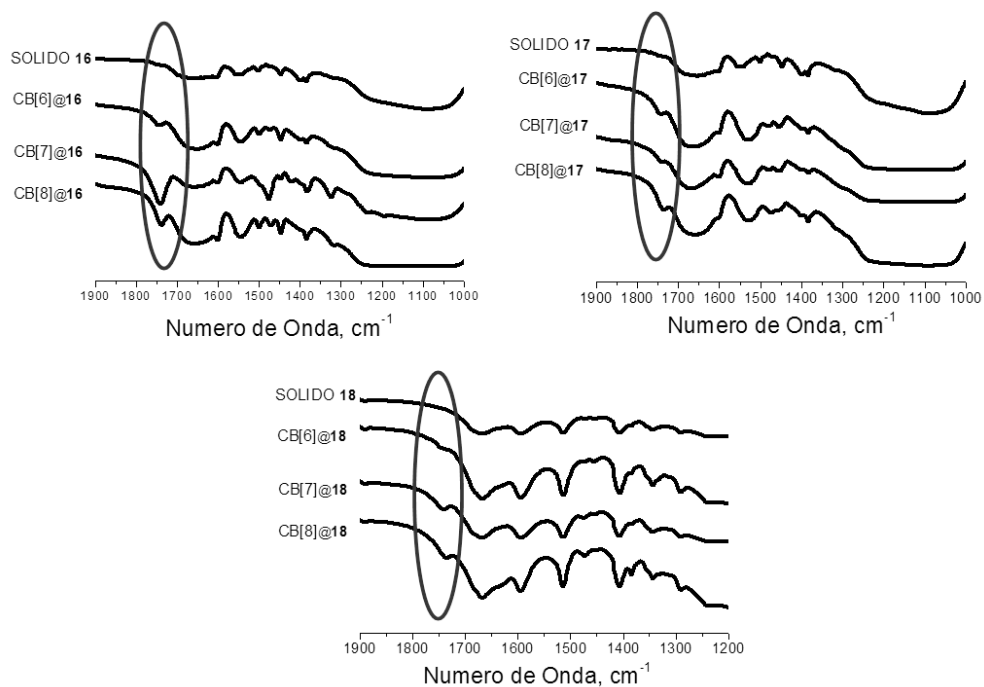
**Figura 5.6.** Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  en estado sólido registrados por ángulo mágico de la sílice con grupos aminopropil de partida **15** (a) y los sólidos **17** (b), **18** (c) y **16** (d).

La presencia de unidades acetanilido también puede inferirse considerando los cambios que se observan en los espectros de FT-IR de los sólidos **16**, **17** y **18** comparados con los de la sílice con unidades aminopropil comercial (Figura 5.7). En particular en todos los casos se observó la presencia de una banda intensa alrededor de  $1700\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo C=O. Además en los sólidos **16**, **17** y **18** se observaron picos que pueden ser atribuidos a la vibración de los anillos aromáticos.



**Figura 5.7.** Espectros FT-IR de la sílice comercial con grupos aminopropil **15** (a) y de los sólidos **17** (b), **18** (c) y **16** (d).

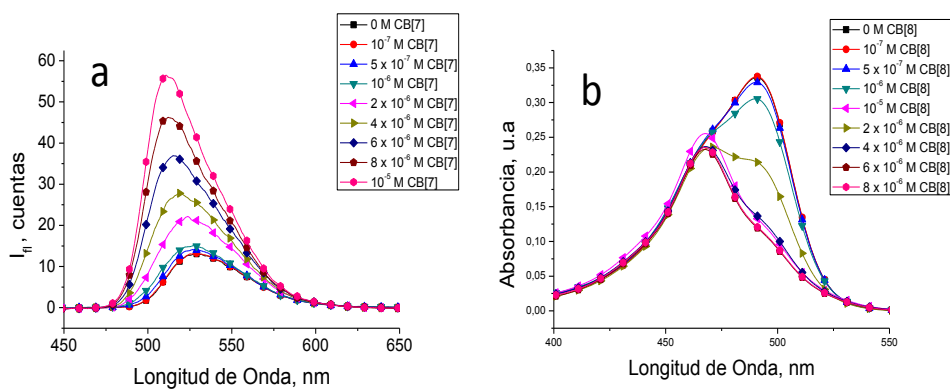
Los sólidos **16**, **17** y **18** se suspendieron en disoluciones acuosas  $10^{-4}$  M de CBs y las suspensiones resultantes se agitaron durante 8 horas. En este momento los sólidos se separaron y ambas fases sólidas y líquidas fueron caracterizadas a fin de determinar su contenido en CBs. En particular los sólidos **16**, **17** y **18** después de estar en contacto con disoluciones de CB[n] fueron estudiados por espectroscopia FT-IR donde la presencia de CBs se puso de manifiesto por la observación de la banda de vibración intensa característica a  $1744\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los grupos C=O de los CBs.<sup>20,21</sup> La Figura 5.8 presenta los espectros de IR registrados para estas muestras donde se indica la banda debida al CB[n]. La determinación cuantitativa del porcentaje de CB[n] inicial que permanece en la disolución para cada combinación posible de CB[7] y CB[8] con los sólidos **16**, **17** y **18** se determinó mediante valoración con AO (naranja de acridina), como molécula sonda. Como se ha indicado en la introducción, el AO forma complejos huésped-hospedador con estequiometría 1:1 para el CB[7] ( $K_b=3.07 \cdot 10^6\text{ M}^{-1}$ ) y estequiometría 1:2 para el CB[8] ( $K_b=2.27 \cdot 10^{16}\text{ M}^{-2}$ ).<sup>22</sup>



**Figura 5.8.** Espectros FT-IR de los sólidos **16**, **17** y **18** después del contacto con disoluciones  $10^{-4}$  M de CB[7] y CB[8] y  $10^{-5}$  M CB[6]. La vibración característica de CB[n] presente en el material tras su adsorción a  $1744\text{ cm}^{-1}$  se encuentra resaltada en todos los espectros.

La formación de estos complejos huésped-hospedador se refleja en un aumento de la fluorescencia del AO (para el CB[7]) y cambios en los espectros ópticos de absorción (CB[8]). Así para una concentración dada de AO ( $10^{-5}$  M) la intensidad de fluorescencia tras excitación a  $427\text{ nm}$  depende de la concentración de CB[7] en el rango entre  $0$  y  $10^{-5}$  M. Por consiguiente, la determinación de la intensidad de fluorescencia del AO tras la adición de una alícuota del sobrenadante resultante tras contactar la disolución de CB[7] con una cantidad conocida de los sólidos **16**, **17** y **18** puede servir de una forma simple para cuantificar la concentración de CB[7] que permanece en la fase acuosa tras la formación de complejos con los sólidos **16**, **17** y **18**.

Una estrategia similar, es decir el uso de AO como molécula sonda para cuantificar la cantidad de CB[n], se puede desarrollar para el caso del CB[8]. En este caso el complejo de inclusión que sirve para valorar el CB[8]  $2(\text{AO})@CB[8]$ , no es fluorescente y son los cambios en los espectros de absorción visible la propiedad que debe ser registrada a fin de cuantificar la concentración de CB[8]. Debe ser mencionado que a la concentración de AO empleada en los experimentos ( $10^{-5}$  M) este colorante está presente en disolución como monómero.<sup>22</sup> Sin embargo, debido a la estequiometría del complejo de inclusión huésped-hospedador en CB[8] (AO:CB[8]=2:1) se forma un dímero de tipo H y esto conduce a un cambio en la posición del máximo de absorción desde 485 nm correspondiente al monómero a 465 nm correspondiente al dímero.<sup>22</sup> Por consiguiente, también para el CB[8] una calibración en la cual se registre el espectro de absorción para una concentración  $10^{-5}$  M de AO en presencia de varias concentraciones de CB[8] en el rango entre 0 y  $10^{-5}$  M puede servir para cuantificar la concentración de CB[8]. La Figura 5.9 muestra los espectros de emisión y absorción del AO en presencia de concentraciones crecientes de CB[7] (emisión) o CB[8] (absorción).



**Figura 5.9.** Espectros de emisión (a) y de absorción (b) para el colorante AO en presencia de concentraciones crecientes de CB[7] (a) y CB[8] (b). Estos espectros sirven como calibrado que permite determinar la concentración de CB[7] y CB[8] en disoluciones problema.

De esta manera usando AO para valorar las concentraciones de CB[7] y CB[8] que permanecen en disolución ha sido posible determinar la capacidad de absorción de los sólidos **16**, **17** y **18** para CB[7] y CB[8]. Un resumen de los resultados obtenidos se presenta en la Tabla 5.3.

SÓLIDO	mmol CB[n ]/g sílice				CAPACIDAD DE ADSORCIÓN (%)	
	CB[7] <sub>inicial</sub>	CB[7] <sub>final</sub>	CB[8] <sub>inicial</sub>	CB[8] <sub>final</sub>	CB[7]	CB[8]
<b>15</b>	<b>0.02</b>	<b>0.0028</b>	<b>0.02</b>	<b>0.0003</b>	<b>14.2</b>	<b>1.5</b>
<b>16</b>	<b>0.02</b>	<b>0.0197</b>	<b>0.0167</b>	<b>0.0156</b>	<b>98.4</b>	<b>93.8</b>
<b>17</b>	<b>0.01</b>	<b>0.00536</b>	<b>0.0167</b>	<b>0.0133</b>	<b>53.7</b>	<b>79.5</b>
<b>18</b>	<b>0.067</b>	<b>0.049</b>	<b>0.0167</b>	<b>0.0122</b>	<b>73.9</b>	<b>73.2</b>

**Tabla 5.3.** Capacidad de adsorción de CB[7] y CB[8] en los sólidos **16**, **17** y **18**. La cantidad inicial de CB[n] por gramo de sílice en la muestra es denominada como CB[n] máxima.

A efectos de comparación nuestro estudio incluye igualmente la muestra de aminopropil sílice comercial **15** empleada en la preparación de los sólidos **16**, **17** y **18**. Los datos obtenidos muestran que la sílice con grupos aminopropil es notablemente ineficiente para adsorber CB[7] y CB[8] y que la capacidad de adsorción aumenta significativamente tras la modificación con unidades acetanilido. Los datos de la Tabla 5.3 indican que el sólido **16** es el material que exhibe la capacidad de adsorción más elevada tanto para CB[7] como para CB[8]. Los sólidos **17** y **18** exhiben una capacidad de adsorción similar para CB[8] y difieren en la adsorción de CB[7] que es más baja para el sólido **17**. Este estudio sugiere que la formación del complejo huésped-hospedador entre las unidades acetanilido y los CBs juega un papel importante en el fenómeno de adsorción como se evidencia por el comportamiento de la sílice aminopropil **15** considerada como control, no habiendo ventajas por el hecho de que el anillo aromático presente dos cadenas acetamino. Sin embargo, esta adsorción no podría ser posible que fuera exclusivamente debida a la

formación de complejos huésped-hospedador entre los CBs y las unidades acetanilido de los sólidos **16**, **17** y **18**. Otras interacciones no específicas tales como puentes de hidrógeno y fuerzas dipolo-dipolo pueden ser también responsables de la adsorción.

En el caso del CB[6], su menor diámetro impide la inclusión de anillos aromáticos sustituidos pero las cadenas alifáticas pueden ser incorporadas dentro de la cápsula orgánica.<sup>18</sup> La adsorción de este hospedador en la sílice aminopropil de partida **15** indica que se puede efectuar la adsorción no selectiva del CB[6] en un porcentaje elevado. Puesto que la cuantificación del CB[6] no puede llevarse a cabo por valoración con AO como en los casos del CB[7] y CB[8], para este cucurbituril se siguió una estrategia diferente basada en cuantificación por MS usando CB[5] como patrón interno y determinando la intensidad relativa de los picos de CB[6] frente a CB[5] para una alícuota de la disolución con concentraciones de CB[n] conocidas. De esta manera con el propósito de determinar la cantidad de CB[6] se procedió a un calibrado previo en el cual disoluciones conteniendo cantidades conocidas de CB[6] y CB[5] fueron analizadas por MALDI-MS y la intensidad relativa de los picos a 1014 u.a.m (correspondientes a CB[6] + H<sub>2</sub>O) frente al pico a 831 u.a.m (correspondiente a CB[5]) fue determinada para varias concentraciones en el rango en el que se iban a llevar a cabo los ensayos de adsorción.

Con la curva de calibración de MALDI-MS se llevó a cabo la adsorción de una disolución 10<sup>-5</sup> M de CB[6] con aminopropil sílice comercial **15** o con sólidos conteniendo unidades acetanilido **16**, **17** y **18**. Tras la adsorción de CB[6] se añadió a las alícuotas de esta disolución un peso conocido de CB[5] y la disolución resultante se analizó por MALDI-MS. La intensidad relativa del pico CB[6] + H<sub>2</sub>O frente al pico correspondiente a CB[5] junto con el dato conocido de la cantidad de CB[5] añadida permitió determinar la concentración de CB[6] que permanece en la disolución que no es adsorbida por el sólido. Los resultados de adsorción de CB[6] en los sólidos ensayados se presenta en la Tabla 5.4 donde puede verse que un elevado porcentaje de CB[6] resulta ser adsorbido en los sólidos, siendo el material **16** conteniendo unidades acetanilido el que exhibe la capacidad de adsorción más alta.



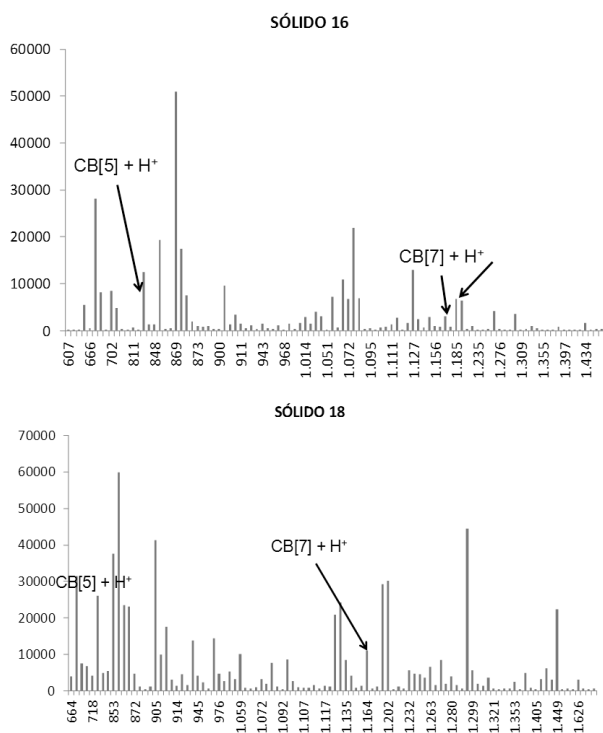
Debe ser destacado el que los sólidos **17** y **18** muestran una capacidad de adsorción similar a la de la sílice aminopropil **15**.

SÓLIDO	CAPACIDAD DE ADSORCIÓN (%)	mmol CB[6]/g sílica
<b>15</b>	<b>83.9</b>	<b>0.0084</b>
<b>16</b>	<b>92.9</b>	<b>0.0093</b>
<b>17</b>	<b>85.8</b>	<b>0.0086</b>
<b>18</b>	<b>84.3</b>	<b>0.0085</b>

**Tabla 5.4.** Resumen de la capacidad de adsorción de los sólidos **16**, **17** y **18** y de la sílice aminopropil **15** para el CB[6]. La cantidad inicial de CB[6] fue de 0.01 mmol de CB[6] por gramo de sílice.

En este contexto estábamos interesados en determinar la contribución relativa de la formación de complejos huésped-hospedador frente a interacciones inespecíficas entre la superficie de la sílice y el CB[n]. Para clarificar este punto se llevaron a cabo experimentos adicionales en los cuales concentraciones equimolares de CB[5] y CB[7] se pusieron en contacto con los sólidos **16** y **18**. Se esperaba que el CB[5] no formara complejos de inclusión y la selectividad hacia el CB[7] pudiera ser tomada como una medida de la contribución de la adsorción debida a la formación de complejos huésped-hospedador. En este caso puesto que la concentración de CB[5] no puede ser determinada por valoración con AO, se usaron medidas cuantitativas de MALDI-MS para determinar la proporción relativa de CB[5] y CB[7] mediante la medida de la intensidad de los picos correspondientes a los iones moleculares. La Figura 5.10 muestra una serie de espectros MALDI-MS medidos en estos experimentos. Los resultados obtenidos indican que para ambos sólidos el CB[7] es adsorbido preferentemente con respecto al CB[5] pero que la selectividad de la adsorción es más alta para el sólido **16** ( $CB[5]/CB[7] = 4$ , en disolución) que para el sólido **18** ( $CB[5]/CB[7] = 2$ , en disolución). Sin embargo, conviene mencionar que en cualquier caso el CB[5] es también adsorbido en cantidades apreciables por el sólido. Proponemos que el

CB[5] puede interactuar con los grupos aminopropilo residuales que están presentes en las superficies de ambos sólidos. De hecho el porcentaje de estos grupos amino que ha resultado funcionalizado por las unidades acetanilido es considerablemente bajo, en torno al 10 %.



**Figura 5.10.** Espectros MALDI-MS de los sólidos **16** (arriba) y **18** (abajo) después de su agitación en contacto con una disolución de CB[5] y CB[7]  $10^{-4}$  M.

### 5.3. Conclusiones

La espectroscopia de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  y MALDI-MS proporcionan datos que apoyan la formación de complejos huésped-hospedador entre las acetamidas **12**, **13** y **14** y los CB[n] ( $n=6, 7, 8$ ). Las constantes de asociación son similares y están en el rango de  $10^5 \text{ M}^{-1}$ . Modelos moleculares sugieren que la acetanilida **14** penetra más profundamente en las cavidades de las cápsulas

CB[n] que el isómero orto- **13**. Estos complejos huésped-hospedador se forman también en fase sólida cuando las unidades acetanilido se encuentran covalentemente unidas con grupos amino de una sílice aminopropil. Sin embargo, probablemente debido a la elevada población de grupos amino residuales, la interacción supramolecular huésped-hospedador juega un papel limitado, contribuyendo en un porcentaje menor a la adsorción total tal y como demuestra el hecho de que el CB[5] se pueda adsorber en estos sólidos en un porcentaje elevado.

#### 5.4 Referencias

- (1) Walker, S.; Oun, R.; McInnes, F. J.; Wheate, N. J. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 616-624.
- (2) Tian, F.; Cziferszky, M.; Jiao, D.; Wahlström, K.; Geng, J.; Scherman, O. A. *Langmuir* **2011**, *27*, 1387-1390.
- (3) Montes-Navajas, P.; Teruel, L.; Corma, A.; Garcia, H. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1762 – 1768.
- (4) Porel, M.; Jockusch, S.; Ottaviani, M. F.; Turro, N. J.; Ramamurthy, V. *Langmuir* **2011**, *27*, 10548-10555.
- (5) Suzuki, Y.; Taira, T.; Osakada, K. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 930-938.
- (6) Wyman, I. W.; Macartney, D. H. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 253-260.
- (7) Macartney, D. H. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 600-615.
- (8) Montes-Navajas, P.; Gonzalez-Bejar, M.; Scaiano, J. C.; Garcia, H. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 1743-1747.
- (9) Buaki-Sogo, M.; Alvaro, M.; Garcia, H. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4296e4301.
- (10) Liu, L.; Nouvel, N.; Scherman, O. A. *Chem. Commun.* **2009**, 3243–3245.
- (11) Miskolczy, Z.; Biczok, L.; Megyesi, M.; Jablonkai, I. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 1645–1651.
- (12) Freeman, W. A.; Mock, W. L.; Shih, N.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7367-7368.
- (13) Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H.-J.; Kim, K. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 612-630.
- (14) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844-4870.

- (15) Tang, H.; Fuentealba, D.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, K.; Bohne, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20623–20633.
- (16) Jeon, Y.-M.; Kim, J.; Whang, D.; Kim, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9790-9791.
- (17) Kolman, V.; Marek, R.; Strelcova, Z.; Kulhanek, P.; Necas, M.; Svec, J.; Sindelar, V. *Chem.Eur.J* **2009**, *15*, 6926-6931.
- (18) Zhou, Q.; Wang, H.; Gao, T.; Yu, Y.; Ling, B.; Mao, L.; Zhang, H.; Meng, X.; Zhou, X. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11315–11317.
- (19) Kim, S.-Y.; Lee, J. W.; Han, S. C.; Kim, K. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2005**, *26*, 1265.
- (20) Gobre, V. V.; Pinjari, R. V.; Gejji, S. P. *J.Phys.Chem.A* **2010**, *114*, 4464-4470.
- (21) Nagarajan, E. R.; Oh, D. H.; Selvapalam, N.; Ko, Y. H.; Park, K. M.; Kim, K. *Tetrahedron Letters* **2006**, *46*, 2073-2075.
- (22) Montes-Navajas, P.; Corma, A.; Garcia, H. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 713-720.

## ***CAPITULO 6: FORMACIÓN DE LIPOSOMAS POR POLIMERIZACIÓN DE LIQUIDOS IONICOS CON ESTRUCTURA DE IMIDAZOLIO Y SU USO COMO MICROREACTORES EN LA OXIDACIÓN DE ALCOHOLES CATALIZADA POR NANOPARTICULAS DE ORO***

---

---

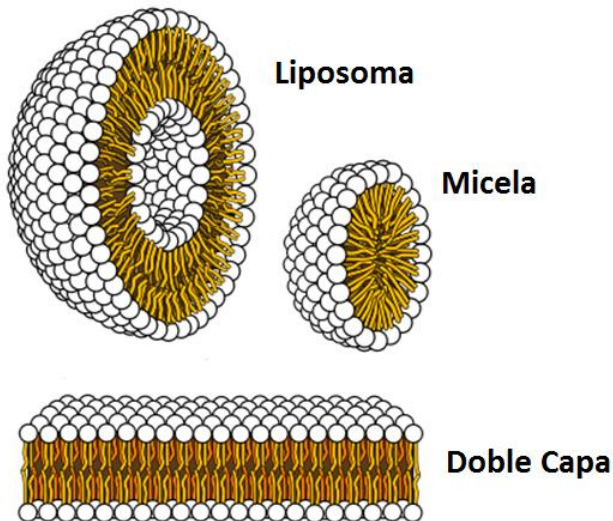
### **6.1 Introducción**

El auto-ensamblaje espontáneo y la formación de nanoestructuras a partir de líquidos iónicos y cristales líquidos constituye la base de muchos fenómenos fundamentales que han dado lugar a numerosas aplicaciones en nanotecnología.<sup>1-4</sup> Las características especiales y las propiedades anfóteras de las moléculas conteniendo partes polares y apolares tienden a reflejarse a nivel supramolecular en la formación de agregados intermoleculares que maximizan las interacciones favorables y minimizan las desfavorables.<sup>5</sup> Este auto-ensamblaje se expresa generalmente mejor en medios que tienen una afinidad marcada por uno de los dos tipos de polaridad, siendo el agua el disolvente que ha sido más ampliamente estudiado. Los fuertes enlaces de hidrógeno presentes en el agua pura se alteran cuando cadenas y sustituyentes apolares se introducen en este líquido y los fenómenos observados bajo estas condiciones, particularmente agregación, se describen comúnmente como derivados de la naturaleza hidrofóbica de estos grupos en un medio hidrofílico.<sup>6,7</sup> La interacción entre hidrofilidad e hidrofobicidad es considerada como una herramienta general de gran utilidad para la creación de inhomogeneidades en una fase homogénea y para la organización espacial de agregados supramoleculares. Las fuerzas derivadas de la interacción entre el disolvente y el soluto han sido aplicadas por ejemplo, en la síntesis de silicatos micro o mesoporosos estructurados usando agentes directores de estructura.<sup>8-11</sup>

Como un ejemplo particular del uso de moléculas anfóteras en la preparación de entidades estructuradas espacialmente, en este capítulo se describe la síntesis y polimerización de un líquido iónico con estructura de imidazolio que posee dos cadenas alquílicas largas idénticas con un enlace doble C=C terminal. Los líquidos iónicos con anillos de imidazolio y cadenas

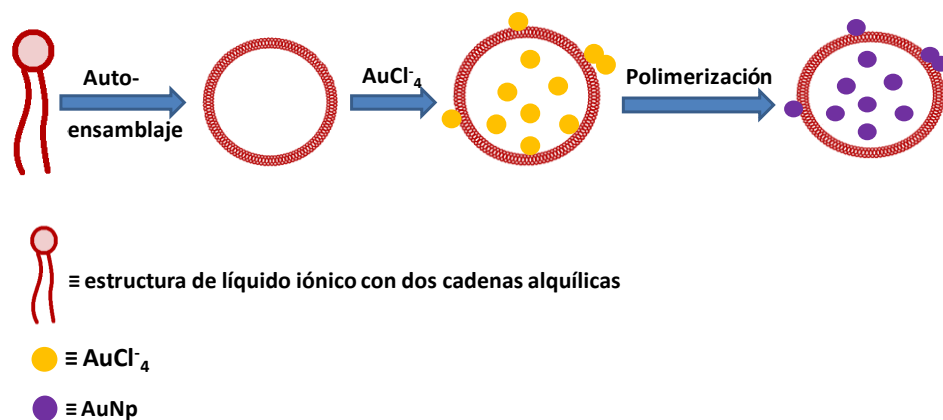
hidrocarbonadas largas has sido usados como agentes plantilla en la preparación de sílices mesoporosas debido a su capacidad de auto-ensamblaje en medios acuosos.<sup>12,13</sup> En el presente capítulo el enlace C=C doble terminal va a permitir el entrecruzamiento de las cadenas, lo que determina que la forma de las entidades de auto-ensamblaje de las unidades moleculares se mantenga mediante uniones covalentes. La longitud y libertad conformacional de las cadenas hidrocarbonadas largas debería permitir, no obstante, tras la polimerización una flexibilidad considerable e incluso un cambio de forma de la partícula polimérica.

La presencia de dos cadenas hidrocarbonadas debería favorecer la formación preferente de vesículas y liposomas con forma de membrana celular conteniendo un espacio interno vacío y una forma esférica del objeto.<sup>14,15</sup> Se ha observado frecuentemente que los surfactantes con una única cadena hidrocarbonada forman micelas mientras que aquellos surfactantes que poseen dos cadenas hidrocarbonadas largas tienden a auto-ensamblarse formando liposomas.<sup>16-19</sup> Liposomas con paredes porosas deberían permitir la transferencia de masa desde el exterior al interior de la membrana y viceversa para aquellos sustratos cuyas dimensiones moleculares fuesen más pequeñas que el diámetro de poro.



**Figura 6.1.** Modos de auto-ensamblaje de surfactantes.

La organización como liposomas porosos permitiría igualmente la inmovilización en el interior de los liposomas de huéspedes de mayor tamaño que los poros y que tuvieran alguna propiedad o actividad. En el caso presente se va a describir como la carga positiva del heterociclo imidazolio puede ser usada de forma ventajosa para absorber iones  $\text{AuCl}_4^-$ . Mediante la formación de pares iónicos estos complejos con  $\text{AuCl}_4^-$ , conteniendo un solo átomo de oro, pueden actuar posteriormente como precursores de nanopartículas de oro. Como consecuencia de la localización preferente de los iones  $\text{AuCl}_4^-$  en el interior de las vesículas, las nanopartículas de oro resultantes se encuentran en la mayoría de los casos localizadas en el interior de las vesículas poliméricas. Estas nanopartículas de oro pueden exhibir actividad catalítica promoviendo oxidaciones aeróbicas así como otro tipo de reacciones orgánicas.<sup>20-23</sup> De esta manera, el sistema definido por nanopartículas de oro encapsuladas en el interior de liposomas poliméricos porosos de dimensiones micrométricas recuerda de alguna manera a los microreactores formados por las cavidades de zeolita conteniendo centros catalíticos.<sup>24-26</sup>

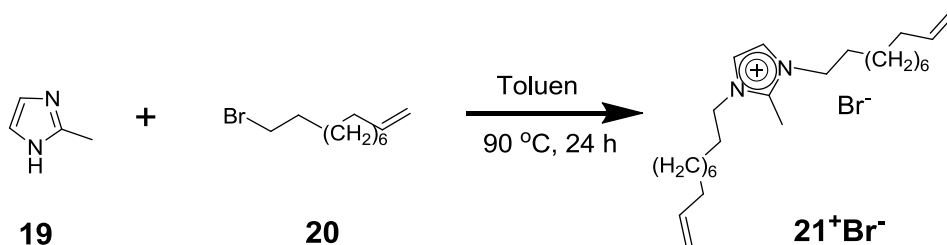


**Esquema 6.1.** Proceso de auto-ensamblaje y formación de nanopartículas de oro (AuNp) en el interior de liposomas.

## 6.2 Resultados y Discusión

### 6.2.1 Síntesis y caracterización de liposomas poliméricos

En la primera etapa del trabajo llevado a cabo en el presente capítulo se sintetizó bromuro de *N,N*'-bis(10-undecenil)-2-metilimidazolio (**21<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>**), una molécula anfotérica con un heterociclo polar y dos cadenas hidrofóbicas de longitud suficiente para promover el auto-ensamblaje formando estructuras vesiculares. La síntesis de este líquido iónico se llevó a cabo de manera simple tratando el 2-metilimidazol (**19**) con 11 bromo-1-undeceno (**20**) en tolueno a temperatura de reflujo (esquema 6.2).

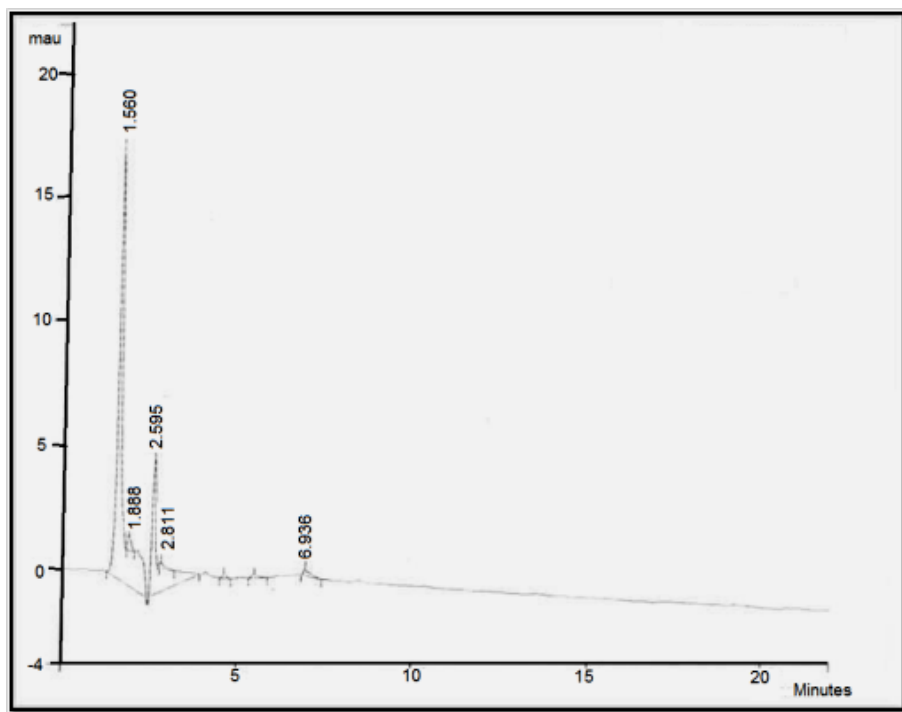


**Esquema 6.2.** Procedimiento llevado a cabo para la obtención de bromuro de *N,N*'-bis(10-undecenil)-2-metilimidazolio(**21<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>**).

La pureza del monómero se estableció mediante HPLC de fase reversa en la cual se observa el pico correspondiente a **21<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>** con un 77 % del área total y que fue acompañado de otros tres picos (ver figura 6.1). Un segundo pico (5 %) próximo a **21<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>** ha sido atribuido al catión imidazolio **19<sup>+</sup>** asociado a un contraión diferente del **Br<sup>-</sup>** y que probablemente podría ser **OH<sup>-</sup>**. Esta asignación se basa en la similitud entre los tiempos de retención y entre los espectros ópticos de absorción de ambos picos. Sobre la base de la ruta sintética seguida para la preparación de **21<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>** los otros dos picos (15 % y 3 %) se asignan a iones imidazolio monopodales asociados con **Br<sup>-</sup>** o otro contraión. La integración de las señales de espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H indica una deficiencia en torno al 10 % de la señal correspondiente a los protones vinílicos de las cadenas ω-undecenil con respecto al área de los protones imidazolio (Figura 6.3). Esta deficiencia del área de los protones de la cadena

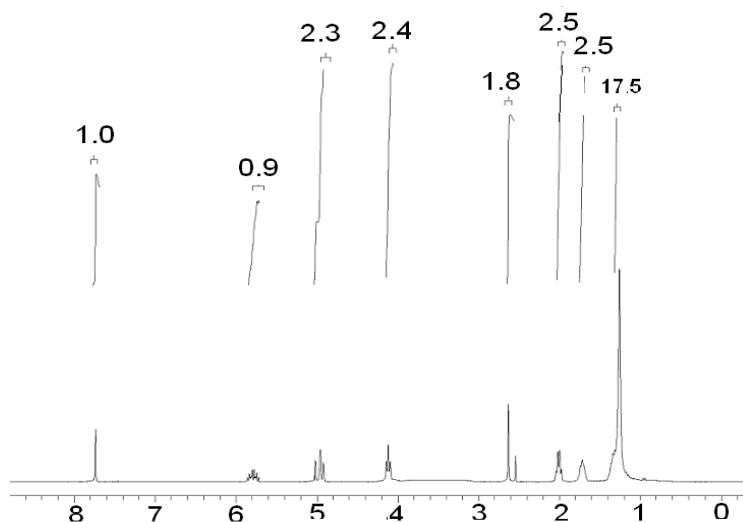


con respecto al anillo de heterociclo apoya la asignación del segundo pico mas grande en HPLC a un imidazolio protonado monosustituído. Es posible anticipar que la habilidad de los compuestos  $21^+$  para sufrir auto-ensamblaje no sería alterada de forma sustancial por la presencia en una proporción baja de derivados con una cadena  $\omega$ -undecenil.



**Figura 6.2.** Cromatograma de HPLC de fase reversa del bromuro de *N,N*-bis(10-undecenil)-2-metilimidazolio ( $21^+ Br^-$ ) donde se observa la presencia de impurezas en la muestra empleada.

La idea tras la síntesis del imidazolio  $21^+$  era la de obtener un compuesto anfotérico con cadenas  $\omega$ -undecenil que tenga la posibilidad, tras un auto-ensamblaje espontáneo en un medio acuoso, de polimerizar a través de los enlaces dobles C=C terminales y así formar liposomas micrométricos con cadenas entrecruzadas y morfología definida que puedan ser recuperados de la disolución por filtración o centrifugación.



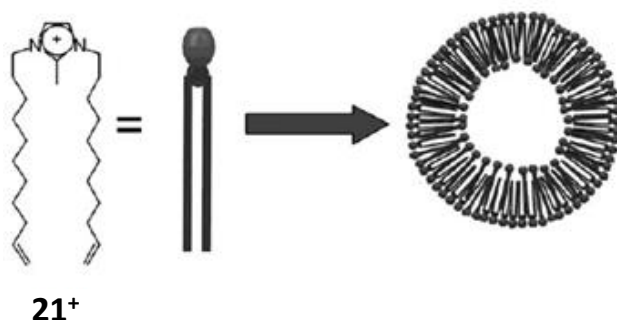
**Figura 6.3.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de *N,N'*-bis(10-undecenil)-2-metilimidazolio bromuro (**21<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>**).

Para obtener los liposomas el líquido iónico **21<sup>+</sup>** tal como fue obtenido se disolvió en agua y se agitó durante una hora a fin de permitir el auto-ensamblaje del precursor antes de la adición de persulfato potásico como iniciador de la polimerización vía radicales. El persulfato potásico es un iniciador de radicales típico y ha sido ampliamente usado para promover la polimerización térmica del estireno y de otros alquenos en medio acuoso.<sup>27</sup>

A fin de estudiar la influencia de la temperatura de polimerización en la forma, dimensiones y homogeneidad de los liposomas, la polimerización se llevó a cabo a temperaturas de 40, 80 y 100 °C. En estas condiciones, en todos los casos las señales típicas de los átomos de hidrógeno del doble enlace vinílico a 5.8 ppm desaparecieron y fueron reemplazadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H por otras a 5.0 ppm, lo cual indica claramente que la polimerización ha ocurrido en un porcentaje significativo incluso a la temperatura más baja de las estudiadas. Para la reacción de entrecruzamiento llevada a cabo a 80 °C, el área de las señales vinílicas residuales fue en torno al 12 % del área inicial de las señales.

Imágenes por microscopía electrónica de transmisión (TEM) obtenidas para el material polimérico tras centrifugación de la suspensión mostraron que todas las partículas tenían la

misma morfología en forma de membrana celular con un espacio vacío interior y una pared polimérica de entre 20 y 30 nm de espesor. Esta morfología característica podría derivar del auto-ensamblaje espontáneo de los monómeros iónicos bipodales, cuya estructura presenta ciertas analogías con la de los fosfolípidos naturales (Esquema 6.3).

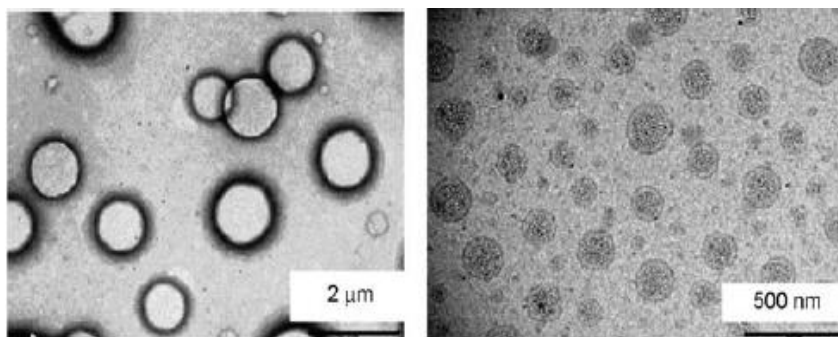


**Esquema 6.3.** Estructura de las vesículas que se forman por auto-ensamblaje y polimerización del *N,N'*-dialquenilimidazolio (**21<sup>+</sup>**).

El análisis estadístico de la distribución de tamaños de partícula medida por TEM permite llegar a la conclusión de que las vesículas más homogéneas desde el punto de vista del tamaño son las que se forman a 40 °C y a esa temperatura los diámetros varían entre 400 y 600 nm (ver Figura 6.4 izquierda). A temperaturas más altas se obtienen vesículas con dimensiones que varían desde los 400 nm a 1 μm con una distribución de tamaño de los liposomas significativamente más amplia. El rendimiento de liposomas obtenido teniendo en cuenta el porcentaje del monómero inicial que se recupera en forma de liposomas cuando la reacción se lleva a cabo a 40 °C fue del 65 %, lo cual indica que el doble enlace C=C sufre entrecruzamiento promovido por el persulfato potásico y que este entrecruzamiento no es completo a esta temperatura.

En el caso de la polimerización llevada a cabo a 100 °C se observó también que la fase líquida contenía esferas de menor tamaño con diámetros entre 20 y 40 nm y con una estructura interna polimérica. Sin embargo debido a sus pequeñas dimensiones, estas nanopartículas no sedimentan en nuestras condiciones de centrifugación permaneciendo

en disolución y formando parte del 28 % del monómero  $21^+\text{Br}^-$  que no se recupera en forma de vesícula en estas condiciones.

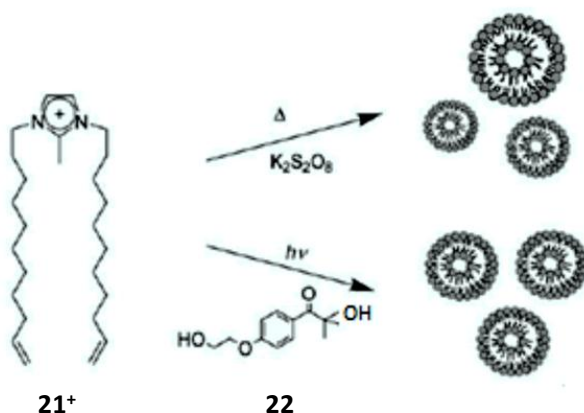


**Figura 6.4.** Imágenes de TEM de las vesículas preparadas por calentamiento de una mezcla de reacción conteniendo  $21^+\text{Br}^-$  a 40 °C (izquierda) y nanopartículas presentes en la fase acuosa tras sedimentación de las partículas más grandes formadas en la polimerización a 100 °C (derecha).

El monómero  $21^+\text{Br}^-$  polimeriza a través del mecanismo radicalario general iniciado por ruptura homolítica del enlace O-O del persulfato para formar radicales oxilo. Estos radicales centrados en el oxígeno atacan al doble enlace C=C para generar radicales centrados en el carbono que propagarían la cadena de polimerización.<sup>28</sup> Bajo condiciones similares se obtienen esferas de látex de tamaño de partícula notablemente homogéneo.<sup>29</sup> La forma esférica del látex de poliestireno se cree que deriva de interacciones hidrofóbicas que conducen al cuerpo geométrico que ofrece la menor superficie de contacto entre el agua y el estireno hidrofóbico.<sup>30</sup> La principal característica que deriva del uso del monómero  $21^+\text{Br}^-$  es su auto-ensamblaje en agua en forma de esferas huecas en lugar de esferas macizas (micelas).<sup>31</sup> Existen precedentes en la bibliografía donde se describe que mediante silanos se pueden formar esferas huecas de sílice en lugar de esferas macizas.<sup>32</sup> El origen del espacio interior es la imbricación de cadenas hidrocarbonadas con la formación de un ordenamiento en bicapa tal como se indica en el Esquema 6.3. Las vesículas y liposomas son

muy comunes en los sistemas biológicos y el componente individual con estructura de fosfolípido puede considerarse estructuralmente semejante al compuesto **21<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>**.

Con respecto a la influencia de la temperatura de polimerización en la morfología y estructura de los liposomas, los resultados obtenidos se interpretaron considerando que a 100 °C las fuerzas que causan el auto-ensamblaje del monómero se hallan disminuidas en gran medida y que, por otra parte la polimerización radicalaria es considerablemente más rápida. Estos factores tienen una influencia negativa en la homogeneidad de tamaño de las vesículas. Por otra parte, el uso de persulfato potásico como iniciador requiere una temperatura mínima para que se empiece a observar un grado elevado de polimerización del doble enlace C=C.

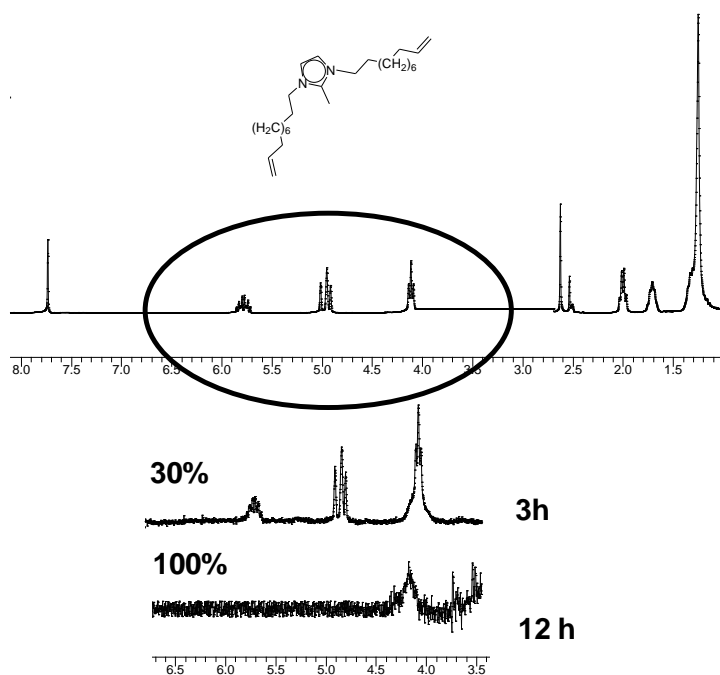


**Esquema 6.3.** Procedimientos alternativos para llevar a cabo la formación de liposomas poliméricos a partir del líquido iónico **21<sup>+</sup>**.

A fin de evitar los problemas asociados con el uso de la activación térmica para promover la polimerización usando persulfato, se consideró la posibilidad de sintetizar las esferas a temperatura ambiente usando un agente iniciador empleado en el fotocurado y que es soluble en agua, *2-hidroxi-4'-(2-hidroetoxi)-2-metilpropiofenona* (**22**) como fuente de radicales. El compuesto **22** descompone en radicales por radiación con luz UV. Así,

manteniendo la misma concentración de precursor orgánico que el que se emplea en la polimerización térmica, se llevó a cabo la polimerización del líquido iónico  $21^+Br^-$  añadiendo el fotoiniciador **22** a la disolución acuosa e irradiando las muestras a través de tubos de cuarzo (Esquema 6.3).

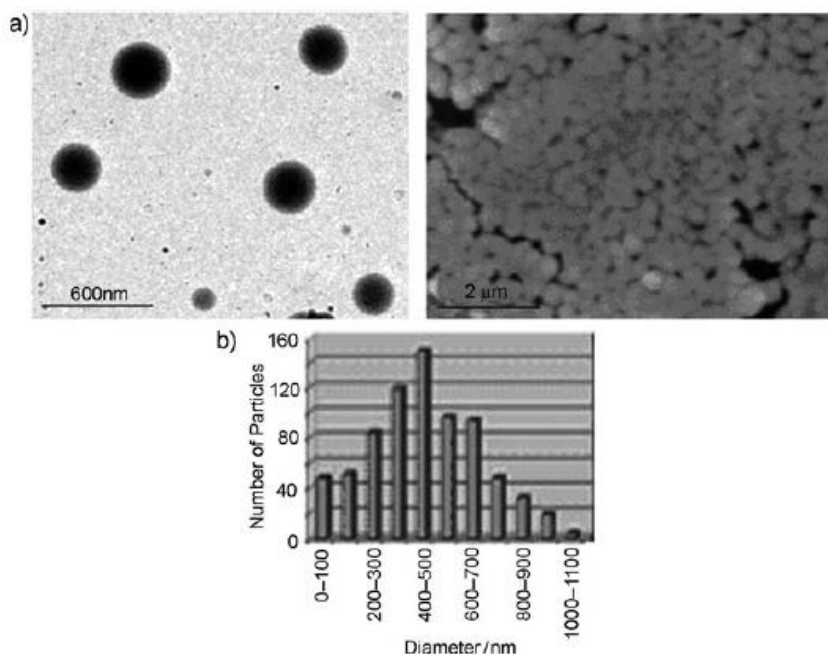
En el presente caso, el curso de la polimerización se pudo seguir convenientemente por espectroscopia RMN- $^1H$  analizando pequeñas alícuotas extraídas periódicamente de la fase acuosa. Se observó que la polimerización fue casi completa a las 12 h. Las trazas de compuesto  $21^+$  sin reaccionar así como la de los subproductos de recombinación radicalaria se eliminaron por extracción con diclorometano hasta conseguir la desaparición completa de compuestos orgánicos de la fase acuosa determinado por GC-MS.



**Figura 6.5.** Espectros de RMN- $^1H$  de las alícuotas extraídas de la fase acuosa transcurridas 3 h (cuando ha polimerizado el 30 % del monómero presente) y 12 h (cuando ha polimerizado el 100 % del monómero presente).

Imágenes TEM de la suspensión acuosa sometida a extracción revelaron algunas diferencias morfológicas en los liposomas poliméricos obtenidos a temperatura ambiente mediante el fotoiniciador los cuales aparecen como esferas macizas en lugar de como vesículas (Figura 6.6a). Se atribuyó este cambio en la morfología del polímero a las condiciones de temperatura moderada características del procedimiento de polimerización fotoquímica llevado a cabo a temperatura ambiente. Parece que las esferas macizas son entidades metaestables en la formación de las vesículas finales.

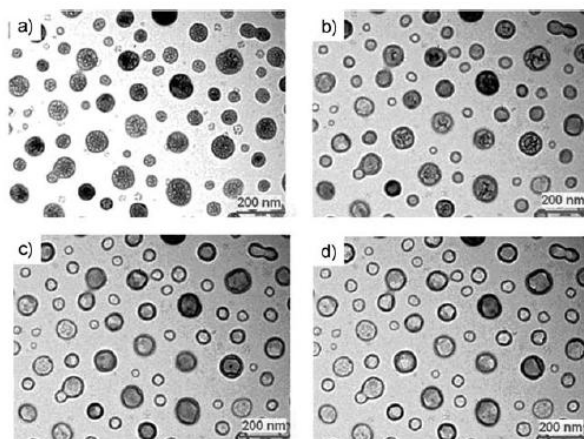
La distribución del tamaño de partícula de los liposomas poliméricos esféricos varía entre 100 y 900 nm con una media en torno a 400 nm (Figura 6.6b). Parece que el procedimiento de fotocurado conduce a una distribución de tamaños algo más ancha que la polimerización con persulfato potásico.



**Figura 6.6.** (a) Imágenes TEM (izquierda) y SEM (derecha) de las partículas esféricas obtenidas en la fotopolimerización a temperatura ambiente del compuesto  $21^+$  por irradiación con un agente de fotocurado soluble en agua. (b) distribución de tamaño de las

esferas obtenidas en la polimerización a temperatura ambiente del compuesto **21**<sup>+</sup> promovido fotoquímicamente por el compuesto **22**.

Un estudio detallado de las imágenes de TEM a varios intervalos de tiempo revelan el mecanismo a través del cual se forman las vesículas y permite racionalizar las morfologías diferentes (liposomas o esferas macizas) obtenidas en la polimerización térmica o fotoquímica. Así las imágenes de TEM revelaron que a tiempos de reacción cortos las partículas todavía contienen cadenas poliméricas en su interior. Estas cadenas internas presentan alguna estructuración y no son completamente densas. En este punto la membrana externa se ha desarrollado completamente. Una imagen representativa de esta situación se muestra en la Figura 6.7a. Si en este momento en el cual la presencia de cadenas poliméricas internas en las esferas macizas es todavía visible, se toman imágenes de TEM tras tiempos de exposición crecientes con un haz de electrones suficientemente energético, se pueden observar cambios en la morfología de las partículas, el material polimérico interno desplazándose hacia la pared y originando un espacio interno vacío y paredes externas de mayor espesor. Los resultados de este experimento in situ se muestran en la Figura 6.7.



**Figura 6.7.** Imágenes de TEM seleccionadas a fin de mostrar los cambios en la morfología de las partículas poliméricas hacia la formación de liposomas bajo el efecto de un haz de



electrones tomadas: (a) inmediatamente y después de (b) 2 (c) 4 y (d) 8 minutos de exposición. El voltaje del instrumento fue de 100 kV.

De los resultados de este experimento se pudo deducir que el haz de electrones del microscopio origina la migración de cadenas poliméricas internas hacia la pared periférica, un efecto que proponemos ocurre igualmente de manera espontánea debido a fuerzas capilares durante el envejecimiento y calentamiento de las partículas. Esta migración de las cadenas de polímero internas promovida bien por electrones focalizados en unos pocos minutos o bien de manera espontánea durante el curado térmico del sistema conduce a la formación de las paredes externas de las vesículas y de un vacío interior.

Las diferentes etapas que atraviesan las vesículas durante su formación también explican por qué imágenes de muestras curadas durante un tiempo suficientemente largo tal como se han presentado en la Figura 6.4 muestran vesículas con un vacío interior claramente definido mientras para muestras curadas insuficientemente tales como las que se muestran en la Figura 6.7 (a) y (b) o incluso en la Figura 6.4 panel derecho, las partículas de polímero todavía contienen cadenas de polímero en su interior.

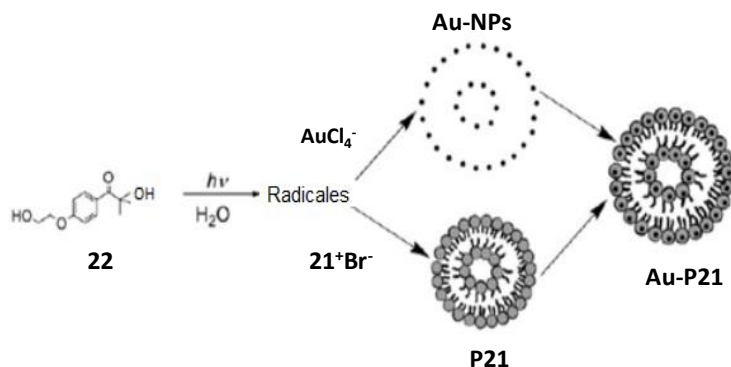
### **6.2.2. Formación de nanopartículas de oro en el interior de vesículas poliméricas**

Uno de los objetivos del presente capítulo es demostrar que las vesículas obtenidas por auto-ensamblaje del catión imidazolio  $\mathbf{21}^+$  pueden ser usadas para organizar espacialmente objetos de tamaño nanométrico. Con este objetivo en mente y después de haber estudiado la polimerización del monómero  $\mathbf{21}^+$ , el siguiente paso era mostrar que es posible obtener nanopartículas de oro en el interior de partículas poliméricas derivadas de  $\mathbf{21}^+$  (**P21**) e incluso mostrar la aplicación en catálisis de estos sistemas.

La idea que se pretende demostrar es que el heterociclo catiónico del líquido iónico imidazolio precursor puede interactuar con el anión  $\text{AuCl}_4^-$  a través de fuerzas coulombicas durante todas las etapas de formación del polímero y que por tanto la localización de las nanopartículas de oro en las vesículas poliméricas finales depende en gran medida de la

posición de los heterociclos catiónicos. Por consiguiente, debido al apareamiento iónico entre las unidades de imidazolio y  $\text{AuCl}_4^-$ , estos aniones deberían ocupar las mismas posiciones que las unidades de imidazolio. Si posteriormente se procede a efectuar la reducción del anión  $\text{AuCl}_4^-$  y a la formación de partículas metálicas, éstas podrían estar asociadas con las vesículas poliméricas y podrían estar tanto en la pared interior como en la exterior de estas vesículas.

Sin embargo cuando la polimerización del monómero imidazolio **21**<sup>+</sup> con persulfato se intentó llevar a cabo en presencia de  $\text{AuCl}_4^-$  se observó que el complejo de oro interfiere con el mecanismo de polimerización radicalaria y no fue posible obtener muestras de vesículas poliméricas como las que se obtenían en ausencia de  $\text{AuCl}_4^-$  debido posiblemente a la existencia de procesos redox de atrapamiento de radicales por parte de especies de oro.



**Esquema 6.4.** Procesos que ocurren simultáneamente y que conducen a la formación de nanopartículas de oro en el interior de vesículas cuando se somete a irradiación disoluciones acuosas conteniendo  $21^+\text{Br}^- / \text{Na}^+\text{AuCl}_4^-/22$ .

El problema de la interferencia del anión  $\text{AuCl}_4^-$  en la polimerización se evitó llevando a cabo este proceso en disoluciones conteniendo el monómero **21**<sup>+</sup> y el anión  $\text{AuCl}_4^-$  de forma fotoquímica en lugar de térmica. Ha sido descrito previamente en la literatura química que la formación de nanopartículas de oro hasta un tamaño de 10 nm se puede llevar a cabo

eficientemente por irradiación con luz UV empleando los mismos agentes de fotocurado que se emplean habitualmente para promover la polimerización radicalaria de alquenos.<sup>33-</sup>

<sup>35</sup> Por consiguiente podría ocurrir que ese mismo proceso fotoquímico efectuara simultáneamente la formación de nanopartículas de oro y la polimerización de los dobles enlaces del monómero **21**<sup>+</sup>.

Estas expectativas fueron confirmadas experimentalmente y hemos sido capaces de obtener una muestra de vesículas con nanopartículas de oro (Au-NPs) en las cuales las Au-NPs están incorporadas en las vesículas poliméricas de tamaño submicrométrico. El Esquema 6.4 resume los procesos que se propone que ocurren simultáneamente durante la irradiación de mezclas de **21**<sup>+</sup>/AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>/**22** en agua.

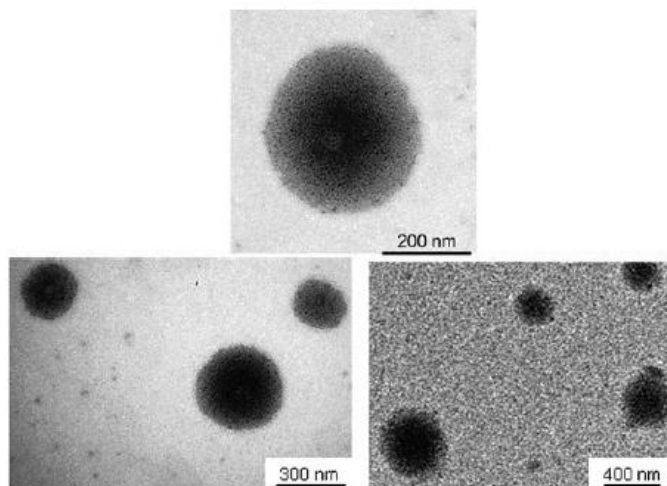
Para llevar a cabo la polimerización, adaptamos el procedimiento previamente comentado en la preparación de vesículas poliméricas añadiendo a una disolución de Na<sup>+</sup>AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> en agitación el agente de fotocurado **22** para dar una mezcla de **21**<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>/ Na<sup>+</sup>AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>/**22** en una proporción molar 0.16/0.064/0.32. La mezcla fue irradiada con luz UV ( $\lambda > 300$  nm) a temperatura ambiente. También en este caso el proceso de polimerización se puede seguir convenientemente por espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H registrando la desaparición de las señales correspondientes a los protones vinílicos. Durante la reacción se observa la aparición gradual del color violeta característico de las nanopartículas de oro. La Figura 6.8 muestra fotografías de las disoluciones del líquido iónico imidazolio **21**<sup>+</sup>Br<sup>-</sup> en presencia del agente de fotocurado **22** con y sin contener Na<sup>+</sup>AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> antes y después de su irradiación.



**Figura 6.8.** Fotografías que muestran el aspecto de las disoluciones de líquido iónico imidazolio  $21^+Br^-$  en presencia de agente de fotocurado **22** antes y después de irradiación en disoluciones donde está presente o ausente la sal  $Na^+AuCl_4^-$ . El tubo de ensayo izquierdo y derecho corresponden a imágenes de las disoluciones con y sin  $Na^+AuCl_4^-$ , respectivamente.

De acuerdo con la formación de vesículas en la fotopolimerización de  $21^+Br^-$  inducida por el agente **22**, las muestras **Au-P21** también consisten en entidades poliméricas submicrométricas. Imágenes de TEM de las muestras **Au-P21** obtenidas por curado fotoquímico tomadas tras extracción con diclorometano muestran la formación de vesículas poliméricas esféricas tal como hubiera sido de esperar de diámetros inferiores a  $1 \mu m$  y conteniendo en su interior un número considerable de Au-NPs de pequeño tamaño. La imagen de TEM muestra que la solución no contiene Au-NPs que no estén asociadas a vesículas poliméricas.

La Figura 6.9 muestra algunas imágenes seleccionadas a fin de ilustrar el tipo de Au-NPs encapsuladas en el interior de la vesícula polimérica. Como puede verse en esa figura, la densidad de las Au-NPs aumenta significativamente a medida que nos aproximamos al centro de la vesícula polimérica. Es digno de mencionar que las Au-NPs en la muestra **Au-P21** se forman casi exclusivamente dentro de las vesículas poliméricas y no en su superficie externa. El tamaño promedio de las partículas oro es de alrededor de  $10 \pm 5 \text{ nm}$ , lo cual está en el rango de valores previamente descritos para la formación de Au-NPs usando el compuesto **22** como agente de fotocurado.<sup>33-35</sup>



**Figura 6.9.** Imágenes de TEM seleccionadas a fin de mostrar la estructura de la muestra **Au-P21** antes (arriba y abajo a la izquierda) y después (abajo a la derecha) de su uso como catalizador en la oxidación aeróbica del 2-hidroxi-bencil alcohol (ver más abajo).

Las razones para esta localización interna de las Au-NPs son probablemente la morfología de las vesículas poliméricas y el mecanismo de auto-ensamblaje y formación de las mismas a partir del monómero  $21^+Br^-$ . Así proponemos que las cadenas poliméricas internas que se observan en algunas imágenes de TEM de las vesículas en formación sugieren que la mayoría de grupos imidazolio están durante ciertas etapas ocupando posiciones interiores en las vesículas. Como resultado del emparejamiento iónico debería ocurrir que la mayoría de átomos de oro en forma de  $AuCl_4^-$  pudieran estar también ocupando posiciones internas en las vesículas poliméricas en formación. Así cuando las Au-NPs aparecen, su formación debería ocurrir preferentemente en el interior de la vesícula polimérica que es donde se encontraría la especie  $AuCl_4^-$  que es el precursor de las mismas.

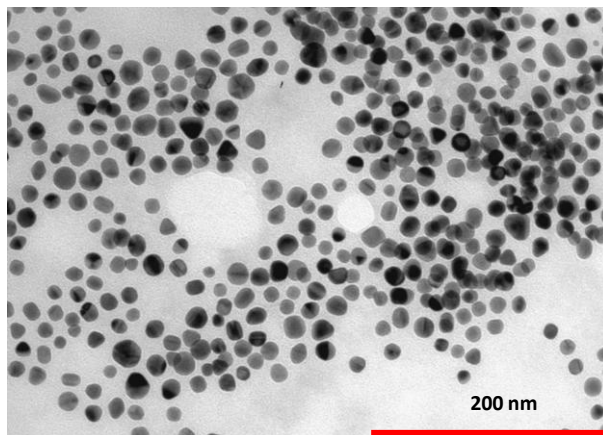
De esta manera la incorporación de las Au-NPs en las vesículas poliméricas podría ocurrir tras una etapa de pre-asociación entre el anión  $AuCl_4^-$  y el catión imidazolio. La metodología aquí observada parece ser un procedimiento simple y altamente eficiente para formar en

una sola etapa entidades donde Au-NPs se encuentran encapsuladas en el interior de una cavidad de reacción limitada por una membrana de morfología esférica.

A fin de conocer los efectos de la estructura del monómero y del proceso de entrecruzamiento en la morfología de las vesículas **Au-P21** resultantes llevamos a cabo un experimento análogo usando bromuro de cetiltrimetilamonio (CTABr) en lugar del líquido iónico  $21^+\text{Br}^-$ . El compuesto CTABr es un surfactante ampliamente usado como agente director de estructura y cuya habilidad para formar micelas está firmemente establecida. El emparejamiento iónico debería operar similarmente para el  $21^+\text{Br}^-$  como para el CTABr y este proceso de metátesis iónica debería controlar la localización de las Au-NPs. Las diferencias entre las entidades derivadas del imidazolio precursor  $21^+\text{Br}^-$  (vesículas con hueco interno) o partir del CTABr (micelas con estructura de cristal líquido) podrían dar lugar a diferencias que surgirían del auto-ensamblaje y de la polimerización y entrecruzamiento entre cadenas que ocurra para el caso del  $21^+\text{Br}^-$  pero no para el CTABr.

Cuando una disolución micelar de CTABr conteniendo  $\text{Na}^+\text{AuCl}_4^-$  se somete a un proceso de fotocurado usando el compuesto **22** a fin de generar Au-NPs bajo condiciones análogas a las que hemos comentado para la formación de la muestra **Au-P21**, las imágenes de TEM muestran que Au-NPs de un tamaño de entre 10 y 15 nm se encuentran presentes en toda la disolución y sin asociación aparente con las micelas de CTABr. La Figura 6.10 muestra una imagen de la muestra Au-CTABr obtenida en el presente estudio.

Es razonable asumir que la membrana rígida de los liposomas y la localización interna de  $\text{AuCl}_4^-$  son las responsables de causar la encapsulación de Au-NPs tras su formación en el interior de los liposomas. Sin embargo, en las micelas derivadas del CTABr las Au-NPs son libres de difundir en la disolución acuosa donde son observadas preferentemente. Además la parte hidrofóbica interna de las micelas no posee posiciones de intercambio para acomodar el anión  $\text{AuCl}_4^-$  en su interior por lo que el  $\text{AuCl}_4^-$  debe estar localizado exclusivamente en la interfase entre la micela y al disolución acuosa.



**Figura 6.10.** Imagen de TEM obtenida tras el fotocurado de una disolución micelar de ctab conteniendo  $\text{AuCl}_4^-$ . La imagen muestra Au-NPs de entre 10 y 15 nm que presentan un alto contraste y micelas de CTABr de forma quasi-esférica y de una gran polidispersidad (tamaño entre 5 y 150 nm) que presentan un contraste bajo. La barra de escala corresponde a 200 nm.

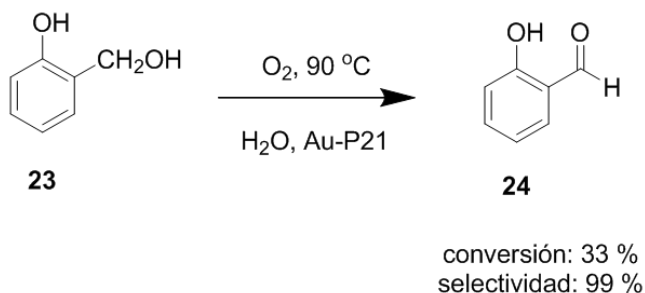
### **6.2.3. Actividad catalítica de las muestras Au-P21 en la oxidación aeróbica del 2-hidroxibencil alcohol**

Numerosos estudios han demostrado que las nanopartículas metálicas pueden ser dispersadas en líquidos iónicos con estructura de imidazolio y que estas disoluciones son eficientes para promover reacciones de hidrogenación.<sup>36-38</sup> En cierta manera, la muestra **Au-P21** es un análogo polimérico de estos sistemas donde las nanopartículas metálicas están suspendidas en un líquido iónico puesto que las nanopartículas de oro **Au-P21** también estarían rodeadas de anillos de imazolio. Por consiguiente, las propiedades catalíticas de la muestra **Au-P21** tienen interés en el contexto de extender el uso de líquidos iónicos en catálisis y desarrollar sistemas sólidos análogos.

A fin de explorar la actividad catalítica de nuestra muestra **Au-P21** como un catalizador heterogéneo para reacciones de oxidación selectiva, se seleccionó la oxidación aeróbica del alcohol primario 2-hidroxibencilico (**23**). El interés creciente en procesos

medioambientalmente tolerables exige el desarrollo de métodos de oxidación que empleen oxidantes limpios y medios de reacción que no sean contaminantes. Además la reacción debe generar los mínimos subproductos posibles.<sup>39-41</sup> El alcohol **23** fue oxidado a pH neutro usando oxígeno molecular en agua a la temperatura de 90 °C. En estas condiciones, se emplearon como catalizador las Au-NPs presentes en **Au-P21** que se forman en el proceso fotoquímico de curado, sin ningún proceso adicional de reducción de las mismas que es generalmente aplicado en otros catalizadores sólidos.

Como era de esperar se observó la formación del aldehído salicílico (**24**) con un rendimiento tras 24 h de reacción del 33 % y con una selectividad del 99 % (Esquema 6.5)



**Esquema 6.5.** Oxidación del alcohol 2-hidroxibencílico promovido por el catalizador **Au-P21**.

El balance de masas considerando la fase acuosa fue solo de 64%, lo cual indica que existe material residual adsorbido en las vesículas poliméricas y que no es analizado en la disolución. Cantidades adicionales del alcohol **23** pudieron ser extraídas mediante el empleo de disolventes orgánicos llegando a un balance de masas casi completo. Además no se observó la formación del ácido salicílico correspondiente por lo que el proceso de oxidación al aldehído fue altamente selectivo. Imágenes de TEM del catalizador antes y después de la reacción muestran que la estructura y morfología de las vesículas de **Au-P21** han permanecido inalteradas durante la reacción (ver Figura 6.9). La muestra **Au-P21** puede ser fácilmente separada del medio de reacción por centrifugación y reutilizada en dos reacciones consecutivas sin observar una disminución de su actividad. Aunque el proceso catalítico descrito conduce al aldehído aromático sólo con un rendimiento moderado, los



resultados obtenidos demuestran que nuestro sistema de vesículas poliméricas conteniendo nanopartículas metálicas puede actuar como un catalizador heterogéneo en la oxidación aeróbica de alcoholes primarios.

### 6.3 Conclusiones

En el presente capítulo hemos descrito la síntesis de un líquido iónico con estructura de imidazolio y que posee dos cadenas hidrocarbonadas con grupos C=C terminales. Este compuesto es un monómero que sufre un auto-ensamblaje espontáneo en agua y que por polimerización bien térmica o bien fotoquímica da lugar a liposomas esféricos con un vacío en su interior. El mecanismo de formación de estos liposomas parece implicar una reorganización de las cadenas poliméricas internas debidas a fuerzas de tensión superficial. Hemos demostrado que es posible sacar ventaja de la localización interna de la mayoría de las unidades de imidazolio para la formación de Au-NPs en el interior de estos liposomas. El fenómeno fundamental que origina la localización interna de estas Au-NPs son las fuerzas coulombicas y el emparejamiento entre aniones y cationes. El material resultante consiste en Au-NPs de tamaño promedio de 10 nm embebidas en una estructura vesicular polimérica. Esta muestra posee actividad catalítica en la oxidación selectiva por oxígeno del alcohol 2-hidrocibencílico a salicilaldehído.

### 6.4 Referencias

- (1) Gomez-Lopez, M.; Preece, J. A.; Stoddart, J. F. *Nanotechnology* **1996**, *7*, 183–192.
- (2) Davis, M. E.; Chen, C.-Y.; Burkett, S. L.; Lobo, R. F. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1994**, *346*, 831-842.
- (3) Sauvage, J.-P.; Hosseini, M. W. "Templating, Self-Assembly, and Self-Organization": *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Pergamon: New York, 1996; Vol. 9.
- (4) Lindoy, L. F.; Atkinson, I. M. *Self-Assembly in Supramolecular Systems*; RSC: London, 2000.
- (5) Behrens, P.; Stucky, G. D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* **1993**, *32*, 696-699.
- (6) Widom, B.; Bhimalapuram, P.; Koga, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 3085-3093.
- (7) Meyer, E. E.; Rosenberg, K. J.; Israelachvili, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15739-15746.

- (8) Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. T.; Schmitt, K. D.; Chu, C. T.-W.; Olson, D. H.; Sheppard, E. W.; B.McCullen, S.; Higgins, J. B.; Schlenker, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834-10843.
- (9) Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S. *Nature* **1992**, *359*, 710-712.
- (10) Behrens, P.; Haak, M. *Angew.Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 696-699.
- (11) Behrens, P. *Adv. Mater* **1993**, *5*, 127-132.
- (12) Wang, T. W.; Kaper, H.; Antonietti, M.; Smarsly, B. *Langmuir* **2007**, *23*, 1489-1495.
- (13) Zhou, Y.; Schattka, J. H.; Antonietti, M. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 477-481.
- (14) Discher, D. E.; Eisenberg, A. *Science* **2002**, *297*, 967-973.
- (15) Noguchi, H.; Takasu, M. *Phys.Rev.E* **2001**, *64*, 419-413.
- (16) Jeon, Y. J.; Bharadwaj, P. K.; Choi, S. W.; Lee, J. W.; Kim, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4474-4476.
- (17) Kukula, H.; Schlaad, H.; Antonietti, M.; Foerster, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1658-1663.
- (18) Carmona-Ribeiro, A. M. *Chem. Soc. Rev* **1992**, *21*, 209-214.
- (19) Nagarajan, R.; Ruckenstein, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1979**, *71*, 580-604.
- (20) Corma, A.; Garcia, H. *Chem. Soc. Rev* **2008**, *37*, 2096-2126.
- (21) Grirrane, A.; Corma, A.; Garcia, H. *Science* **2008**, *322*, 1661-1664.
- (22) Hashmi, A. S. K. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3180-3211.
- (23) Hashmi, A. S. K.; Hutchings, G. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7896-7936.
- (24) Koblenz, T. S.; Wassenaar, J.; Reek, J. N. H. *Chem. Soc. Rev* **2008**, *37*, 247-262.
- (25) Guisnet, M. *Methods Reagents Green Chem.* **2007**, 231-249.
- (26) Ozin, G. A.; Ozkar, S.; Pastore, H. O.; Poe, A. J.; Vichi, E. J. *ACS Symp. Ser.* **1992**, *499*, 314-332.
- (27) Choi, Y. S.; Ham, H. T.; Chung, I. J. *Polymer* **2003**, *44*, 8147-8154.
- (28) Mundargi, R. C.; Agnihotri, S. A.; Patil, S. A.; Aminabhavi, T. M. *J.Appl. Polym. Sci.* **2006**, *101*, 618-623.
- (29) Song, L.; Ge, X.; Wang, M.; Zhang, Z.; Li, S. *J. Polymer Sci. A: Polym.Chem.* **2006**, *44*, 2533-2541.
- (30) Zhang, R.; Seki, A.; Ishizone, T.; Yokoyama, H. *Langmuir* **2008**, *24*, 5527-5533.
- (31) Wu, S.; Ding, Y.; Zhang, X.; Tang, H. *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 3301-3304.
- (32) Chang-Chien, C.-Y.; Hsu, C.-H.; Lee, T.-Y.; Liu, C.-W.; Wu, S.-H.; H.-P.Lin; Tang, C.-Y.; C.-Y. Lin *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 3798-3804.
- (33) Scaiano, J. C.; Billone, P.; Gonzalez, C. M.; Maretti, L.; M. L. Marin; McGilvray, K. L.; Yuan, N. *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81*, 635-647.
- (34) Marin, M. L.; McGilvray, K. L.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16572-16584.
- (35) McGilvray, K. L.; Decan, M. R.; Wang, D.; J. C. Scaiano *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15980-15981.
- (36) Bradley, D.; Dyson, P.; Welton, T. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 18-21.
- (37) Wasserscheid, P.; Welton, T. *Ionic Liquids in Synthesis*; Wiley-VCH: Weinheim, 2003.
- (38) Dupont, J.; Souza, R. F. d.; P. A. Z. Suarez *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3667-3691.
- (39) Sheldon, R. A. *Catal. Oxid* **1995**, 239-265.
- (40) R. A. Sheldon; Santen, R. A. v. *Catalytic Oxidation: Principles and Applications*; World Scientific: Singapore, 1995.

(41) Sheldon, R. A.; Arends, I. W. C. E.; Brink, G.-J. t.; Dijkstra, A. *Acc. Chem. Res* **2002**, *35*, 774-781.



## ***CAPÍTULO 7: INFLUENCIA DEL AUTO-ENSAMBLAJE DE LÍQUIDOS IÓNICOS ANFIFÍLICOS CON ESTRUCTURA DE IMIDAZOLIO EN LOS COMPLEJOS SUPRAMOLECULARES DE ESTOS COMPUESTOS CON CUCURBIT[n]URILES.***

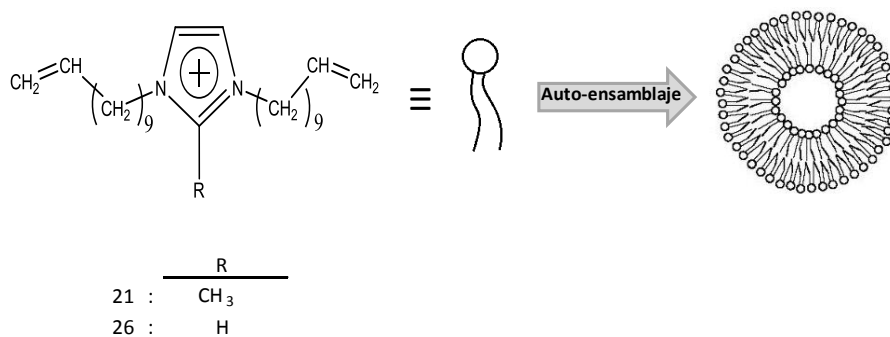
---

### **7.1 Introducción**

Los líquidos iónicos anfifílicos con unidades de imidazolio sustituidas por cadenas largas  $\omega$ -alquénil sufren en disoluciones acuosas un auto-ensamblaje a concentraciones superiores a  $10^{-3}$  M, para dar lugar a liposomas esféricos de diámetros entre 400 y 500 nm. El esquema 7.1 presenta la estructura de dos líquidos iónicos anfifílicos basados en imidazolios simétricamente sustituidos (compuestos **21** y **26**) y el fenómeno de ensamblaje espontáneo para formar aglomerados esféricos.<sup>1</sup> La presencia de un sustituyente metilo en la posición 2 del anillo de imidazolio podría servir para determinar la influencia de la sustitución en estas posiciones las constantes de asociación de los complejos huésped-hospedador. Más aún, se ha descrito que los líquidos iónicos con estructura de imidazolio poseyendo grupos alquilo de cadena corta tales como 1-butil-3-metilimidazolio forman complejos supramoleculares de inclusión con los cucurbituriles (CBs).<sup>2-9</sup>

Como se ha venido comentando en la introducción, los CBs son moléculas orgánicas con forma de calabaza constituidas por unidades de glicoluril enlazadas por grupos metileno, definiendo una cavidad interior accesible a través de los portales.<sup>10-14</sup> Se ha descrito igualmente que los para los líquidos iónicos imidazolio la fuerza de la interacción con CBs se puede determinar mediante calorimetría y ésta depende del tamaño de la cavidad de CB[n] y de la longitud de la cadena alquílica del líquido iónico. Se alcanza la máxima entalpia debida a la interacción imidazolio-CB cuando la longitud del grupo alquilo permite que estas cadenas hidrofóbicas se incluyan completamente en el interior de la cavidad de CB[n].<sup>9</sup> Las conclusiones de este estudio previo fueron que el CB[6] puede acomodar grupos alquilo de hasta 4 átomos de carbono en huéspedes de alquil amonio con una carga positiva y hasta 6

átomos de carbono para huéspedes alquil amonio con 2 cargas positivas.<sup>9</sup> Además la fuerza de la asociación liquido ionico-CB disminuye a medida que el numero de átomos de carbono aumenta o disminuye de este valor óptimo.<sup>9</sup>



**Esquema 7.1** Estructura de dos líquidos iónicos anfífilos basados en anillos imidazolio simétricos y liposomas que resultan del auto-ensamblaje espontáneo de los mismos.

La formación de complejos entre los 1-alkil-3-metilimidazolios con CB[6] ha sido igualmente descrita y los cambios observados en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H correspondientes interpretados asumiendo la polarización del anillo aromático de imidazolio tras la formación del complejo.<sup>6</sup>

A la vista de estos precedentes, en el presente capítulo se muestran los resultados que indican que CB[7] y CB[8] forman complejos de inclusión con los imidazolios anfífilos **21** y **26**, que son moléculas de mayor longitud que otras previamente descritas en la bibliografía. Además cuando se alcanza la concentración crítica de auto-ensamblaje de estos compuestos en agua, se forman espontáneamente liposomas los cuales pueden mantener su forma mediante polimerización radicalaria y entrecruzamiento de las cadenas a través de los enlaces C=C terminales. Los datos experimentales indican que los complejos supramoleculares huésped-hospedador se destruyen en gran medida en el caso del CB[7] o sufren una disociación parcial en el caso del CB[8] cuando se produce la formación de los liposomas. De esta manera el CB[7] y en parte el CB[8] sufren disociación de los líquidos

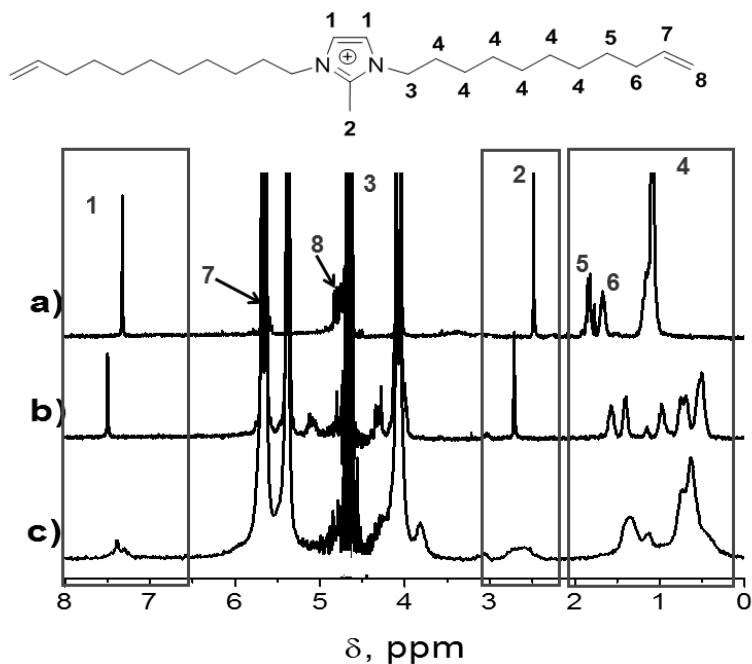
iónicos imidazolios **21** y **26** cuando se forman los liposomas, pasando estas cápsulas a encontrarse libres en la fase acuosa.

Los resultados aquí presentados son de interés en la comprensión de cómo el auto-ensamblaje de compuestos anfifílicos con grupos alquilo de cadena larga influencia el equilibrio de complejos huésped-hospedador como resultado de las variaciones en la hidrofobicidad del medio cuando las moléculas de imidazolio individuales se asocian formando los correspondientes liposomas. Nuestro estudio basado en CBs completa otros precedentes relacionados que describen la formación de micelas y liposomas en presencia de ciclodextrinas<sup>15-18</sup> y CBs<sup>19,20</sup> y proporciona evidencias adicionales mostrando que el auto-ensamblaje de huéspedes incorporados en cápsulas orgánicas altera la interacción con estas cápsulas orgánicas debido a la operación del mismo tipo de fuerzas intermoleculares.

## **7.2 Resultados y Discusión**

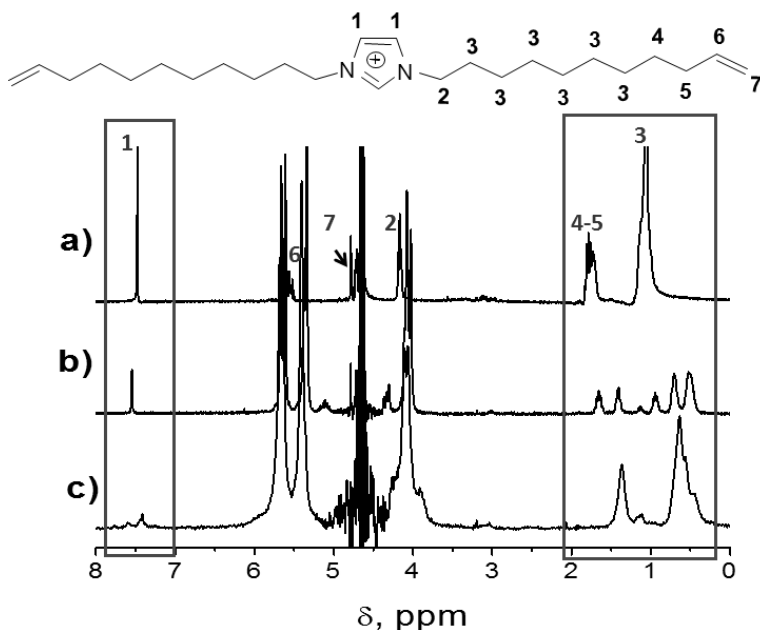
### ***7.2.1 Formación de complejos huésped-hospedador de líquidos iónicos con CB[7] y CB[8]***

En la primera parte del presente capítulo se va a proceder a demostrar la formación de complejos huésped-hospedador individuales sin auto-ensamblaje entre las cápsulas CB[7] y CB[8] y los líquidos iónicos **21** y **26**. Las evidencias experimentales a favor de la formación de estos complejos están basadas en espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H y MALDI-MS. Las Figuras 7.1 y 7.2 muestran los espectros de RMN-<sup>1</sup>H registrados para disoluciones acuosas diluidas de los imidazolios **21** y **26** en presencia de un exceso de CB[7] y CB[8], respectivamente. El motivo por el cual se usó un exceso de CB[n] al registrar estos espectros es asegurar la complejación completa de los imidazolios **21** y **26** por CBs. Esta serie de espectros de RMN-<sup>1</sup>H fue registrada añadiendo 20 mg del CB[n] correspondiente a 1 ml de la disolución del imidazolio correspondiente (1 mg) y tras sonicación de la suspensión durante 5 min. En estas condiciones no tiene lugar la disolución completa de CB[n], pero la presencia de un exceso de CB[n] como sólido no afectó a la calidad de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H.



**Figura 7.1** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  registrados a temperatura ambiente después de 5 minutos de sonicación de una disolución en agua deuterada de imidazolio **21** (a), ( $2.5 \cdot 10^{-3}$  M) en presencia de 20 mg de CB[7] (b) y CB[8] (c). En la parte superior se muestra la estructura del imidazolio **21** con la numeración que corresponde a las señales del espectro de RMN- $^1\text{H}$ .





**Figura 7.2** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  registrados inmediatamente tras la mezcla a temperatura ambiente en agua deuterada de imidazolio **26** (a), ( $2.7 \cdot 10^{-3}$  M) en presencia de 20 mg de CB[7] (b) y CB[8] (c). En la parte superior se muestra la estructura del imidazolio **26** con la numeración que corresponde a las señales del espectro de RMN- $^1\text{H}$ .

Para las cuatro posibles combinaciones (imidazolios **21** y **26** con CB[7] y CB[8]) los espectros de RMN- $^1\text{H}$  correspondientes mostraron cambios compatibles con la formación de los correspondientes complejos huésped-hospedador (ver los recuadros indicados en las Figuras 1 y 2). Más aún, en los cuatro casos las señales de los grupos alquilo (protones en los carbonos 4, 5 y 6 para el imidazolio **21** y carbonos 3, 4 y 5 para el imidazolio **26**) sufrieron desplazamientos a campos altos indicando la incorporación de la cadena alquílica en el interior de la cápsula orgánica (región hidrofóbica y que produce apantallamiento en CBs). Además, para los espectros conteniendo CB[7] (Figuras 7.1b y 7.2b) las señales de las cadenas alquílicas se desdoblaron en dos grupos indicando la inclusión de una única cadena

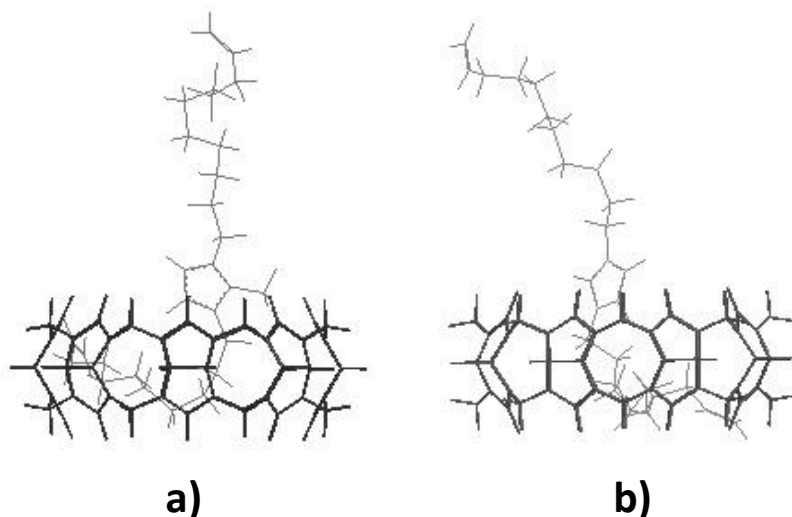
alquílica dentro de la cavidad de CB[7] y una cinética lenta de asociación/liberación en la escala de tiempos de RMN.

En el caso del CB[8], ambos líquidos iónicos imidazolio sufren ensanchamiento de la señales para todos los protones debido a la rápida asociación/liberación en la escala de tiempos de RMN para este CB[n]. Las señales de las cadenas alquílicas también se desplazan ligeramente a campos más altos indicando su inclusión dentro del CB[8]. En contraste, los protones del grupo metilo del anillo de imidazolio en el líquido iónico **21** se desplazan a campo bajo (hasta 0.24 ppm) siendo este hecho compatible con la proximidad del sustituyente metilo con los grupos carbonilo de los portales (ver Figuras 7.1c y 7.2c). Como se ha comentado anteriormente un precedente recientemente aparecido en la bibliografía estudia la influencia de la longitud de las cadenas alquílicas en la constante de complejación y propone que las cadenas alquílicas hidrofóbicas enlazadas al heterociclo polar imidazolio “se esconden” en el interior de los CB[n] a fin de minimizar la interacción hidrofóbica desfavorable con agua.

Además de los cambios en los valores  $\delta$  de las cadenas  $\omega$ -alquénil, el anillo de imidazolio también sufre desplazamiento para los complejos de líquidos iónicos **21** (0.19 ppm) y **26** (menos de 0.1 ppm) con CB[7], lo cual indica que este heterociclo polar está localizado en las proximidades de los portales del CB[n] flanqueados por grupos carbonilo. En el caso del CB[8], debido a su velocidad de intercambio entre alta y moderada, las dos señales aromáticas aparecen como una única banda ancha; en uno de los casos (Figura 7.1c) esta banda se observa ligeramente desplazada a campos bajos, lo cual es compatible con un modo de interacción diferente de los protones del imidazolio con la región de desapantallamiento del CB[8].

Para una mejor comprensión de los cambios observados en espectroscopia RMN- $^1\text{H}$ , se realizaron modelos moleculares de los complejos de inclusión de los líquidos iónicos **21** y **26** con CB[8] (Figura 7.3 a y b). En los modelos moleculares puede verse que los dos protones del líquido iónico **21** pierden su simetría debido a que uno de ellos se encuentra más

próximo a los portales con grupos carbonilo que el otro y este hecho explica la presencia de dos señales en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  para los protones del anillo heterocíclico (mirar el recuadro en las figuras 7.1c y 7.2c).



**Figura 7.3.** Modelos moleculares de los complejos de los líquidos iónicos **21**@CB8(a) y **26**@CB8 (b) obtenidos mediante dinámica molecular MM2. Hay que notar que de acuerdo con los modelos la simetría de los líquidos iónicos se pierde en la formación del complejo con estequiometría 1:1.

La asociación de los iones imidazolio con CB[n] para dar lugar a complejos de inclusión se apoya también en los espectros de MALDI-MS, donde un pico intenso correspondiente a la masa del compuesto **21** o **26** más la cápsula orgánica CB[7] o CB[8] fue detectado para cada una de las cuatro posibles combinaciones. Además, la falta de detección de los picos correspondientes a masa  $n \times \text{CB}[n]$  o de los aductos correspondientes con el líquido iónico permitió descartar con seguridad la posibilidad de formación de agregados, descritos recientemente<sup>21</sup> particularmente en el caso del CB[8] con o sin líquidos iónicos. La Tabla 7.1 resume los picos que han sido registrados para estas muestras y sus intensidades relativas.

Además de los picos correspondientes a la estequiometría 1:1, los espectros MALDI-MS muestran también picos de mucha menor intensidad cuyo valor corresponde al valor de la masa de los iones imidazolio **21** y **26** asociados con dos CB[7] o dos CB[8] (ver tabla 7.1). Aunque la detección de estos complejos imidazolio@2CB[n] teniendo una estequiometría 1:2 es interesante, el hecho de que la intensidad de estos sea menor con respecto a la intensidad del complejo 1:1 imidazolio@CB[n] (intensidad relativa 100%), indica que la concentración del complejo con estequiometría 1:2 es muy baja comparada con la del 1:1. Esta observación es compatible con los resultados comentados anteriormente de que los espectros de RMN-<sup>1</sup>H corresponden a la formación de un complejo imidazolio@CB[n] de estequiometría 1:1.

m/z	masa	CB[7] intensidad relativa (%)	masa	CB[8] intensidad relativa (%)
21@CB[n]	1549	100	1715	100
21@2CB[n]	2711	7.5	3043	1.8
26@CB[n]	1536	100	1702	100
26@2CB[n]	2698	2	3030	2

**Tabla 7.1** Picos más relevantes en el espectro MALDI-MS y su intensidad relativa medidos para cada una de las muestras correspondientes a la combinación líquido iónico y CB[n].

Las constantes de asociación para los complejos huésped-hospedador 1:1 **21**@CBn y **26**@CBn (n: 7 y 8) a una concentración de líquido iónico **21** y **26** inferior a la concentración crítica de auto-ensamblaje se determinó mediante conductimetría tal como se describe en la sección experimental. Los resultados obtenidos dieron unos valores para las constantes de asociación de  $(5.18 \pm 0.03) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  y  $(4.59 \pm 0.04) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  para los complejos de líquido iónico **21** con CB[7] y CB[8], respectivamente. Para el líquido iónico **26** los valores de las constantes de asociación correspondientes fueron  $(5.05 \pm 0.02) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  y  $(4.81 \pm 0.04)$

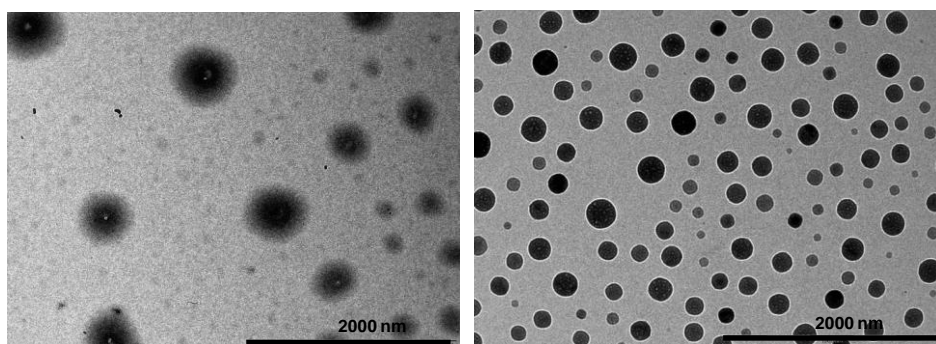
$\times 10^5 \text{ M}^{-1}$  para CB[7] y CB[8], respectivamente. Las constantes de asociación para el líquido iónico **26**@CB[n] presentaron, como se deduce de los datos indicados valores más elevados. Este hecho puede ser debido a la ausencia del grupo metilo en la posición 2 del anillo de imidazolio que parece desfavorecer la formación de los complejos de inclusión debido a efectos estéricos.

### **7.2.2 Auto-ensamblaje de los complejos huésped-hospedador imidazolio@CB[n].**

Después de haber demostrado la formación de complejos de inclusión para moléculas individuales entre los líquidos iónicos **21** y **26** y las cápsulas CB[7] y CB[8] usando disoluciones diluídas, estábamos interesados en determinar cuál es la influencia de la formación de liposomas en estos complejos huésped-hospedador. Teniendo en cuenta que las interacciones hidrofóbicas entre el interior de los CBs y la cadena alquenílica de longitud es la fuerza principal que impulsa la formación del complejo de inclusión<sup>9</sup>, la hipótesis que se pretende determinar es que esta fuerza termodinámica es necesariamente alterada durante el auto-ensamblaje del líquido iónico. Este auto-ensamblaje conduce a liposomas cuya estructura puede fijarse mediante polimerización de los enlaces C=C terminales.

A fin de demostrar esta hipótesis, se llevó a cabo la polimerización de los huéspedes de inclusión entre líquidos iónicos **21** y **26** y las cápsulas CB[7] y CB[8] a concentraciones superiores a la concentración crítica de auto-ensamblaje ( $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) usando persulfato potásico (30 mg, 0.11 mmol) como iniciador de radicales a  $80^\circ\text{C}$ . Bajo las condiciones en las cuales se lleva a cabo la polimerización, los líquidos iónicos **21** y **26** se encuentran en exceso con respecto a las concentraciones de las cápsulas CB[7] y CB[8] y, por consiguiente, sólo una fracción de los líquidos iónicos (en torno a 0.25) se encontrará formando parte de los complejos de inclusión. Estas condiciones experimentales son diferentes de aquellas usadas para registrar los espectros de RMN-<sup>1</sup>H. Además, la presencia de un pequeño porcentaje de CB[8] no cambia la concentración crítica de auto-ensamblaje con respecto a la necesaria en el caso de los líquidos iónicos puros puesto que la formación de liposomas se observa en ambas circunstancias.

De hecho el éxito de la polimerización de los liposomas usando complejos de CB[n] con los líquidos iónicos anfílicos se comprueba mediante las imágenes de microscopía electrónica. A modo de ejemplo de las muestras preparadas, la Figura 7.4 muestra micrografías de TEM representativas de los liposomas que se han obtenido en la presente tesis doctoral. Estos liposomas son de diámetro algo mayor que los que se obtienen en ausencia de CB[n], particularmente para el caso del CB[8].<sup>1</sup> El punto importante es que para las cuatro combinaciones de los 2 líquidos iónicos **21** y **26** con CB[7] y CB[8], se obtienen liposomas de morfología casi esférica y tamaño promedio entre 400 y 1000 nm. Este aumento en el tamaño promedio de los liposomas cuando se encuentran presentes en el medio CBs podría reflejar un aumento en el volumen molecular de los monómeros que sufren auto-ensamblaje y posterior polimerización debido a la encapsulación de estos monómeros en el interior del CB[n].



**Figura 7.4** Imágenes de TEM obtenidas para los liposomas preparados por polimerización de disoluciones de líquido iónico **26** conteniendo CBs a concentraciones superiores a la crítica de auto-ensamblaje. La imagen izquierda corresponde al complejo **26@CB[7]** y la derecha al complejo **26@CB[8]**.

Un punto importante en el presente estudio ha sido determinar si el complejo huésped-hospedador entre líquido iónico y CB[n] característico de los líquidos iónicos antes de su polimerización, se retiene cuando se forma el liposoma y se procede al entrecruzamiento de las cadenas por polimerización.

Para discutir este punto se procedió a valorar con un colorante tricíclico básico tal como el naranja de acridina (AO), con cada una de las cuatro muestras de liposomas. Aquellos liposomas que contengan CB[7] libre deberían producir un aumento en la fluorescencia del AO. Por otra parte las muestras que contengan CB[8] libre al ser valoradas con AO deberían mostrar cambios en los espectros de absorción del colorante AO.

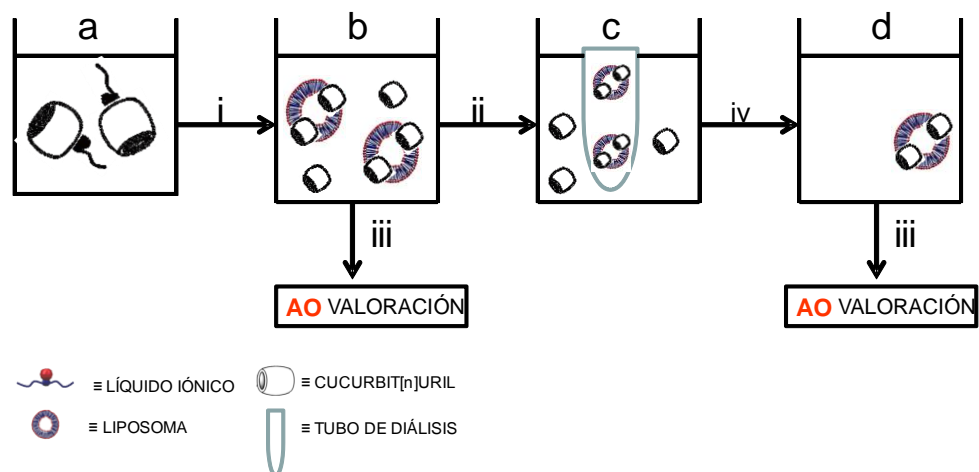
En una publicación reciente se ha seguido una estrategia similar usando AO para determinar el porcentaje de CB[n] libre que no forma complejo con la adamantil amina unida covalentemente a una microesfera no porosa.<sup>22</sup>

En nuestro caso, para determinar la presencia de CB[n] libre, se comparó el comportamiento de la valoración con el colorante AO antes y después de someter a diálisis las disoluciones coloidales de los liposomas. La diálisis debe eliminar de las disoluciones de liposoma la mayoría de los CBs libres o que están débilmente asociados a los líquidos iónicos. Nuestra hipótesis ha sido que la no detección de CB[n] en las muestras que no han sido sometidas a diálisis es una indicación de que estos CBs están formando el complejo huésped-hospedador en el liposoma y que la diferencia en la valoración de AO antes y después de la diálisis es debida al CB[n] libre o no fuertemente asociado y que es eliminado en el proceso de diálisis.

Las condiciones experimentales para las medidas de fluorescencia han sido similares a las que han sido previamente descritas para demostrar la formación de complejos AO@CB7.<sup>23,24</sup> Debido a la alta sensibilidad en estas medidas de fluorescencia, el estudio se lleva a cabo a concentraciones suficientemente diluidas en las cuales el AO no forma dímeros ( $10^{-6}$  M). El Esquema 7.2 ilustra el procedimiento usado para determinar la presencia de CB[7] y CB[8] en los liposomas tras la polimerización.

En un primer paso se forman ((a) en Esquema 7.2), los complejos huésped-hospedador de los líquidos iónicos de imidazolio con CBs los cuales actúan como monómeros en la polimerización. Después de la polimerización (i) del enlace doble C=C ((b) en Esquema 7.2) se emplea una alícuota de las disoluciones coloidales de liposomas para valorar una

disolución  $10^{-6}$  M de AO (iii); una segunda alícuota se reserva y es sometida a diálisis (ii) (paso (c) en Esquema 7.2) a fin de eliminar los CBs libres. Tras eliminar la membrana (paso iv en esquema 7.2) las disoluciones dializadas (paso (d) en Esquema 7.2) se valoran también con una disolución  $10^{-6}$  M de AO (iii) a fin de comparar los cambios en los espectros de fluorescencia y absorción antes y después de la diálisis. Al objeto de establecer comparaciones válidas, se llevaron a cabo controles donde se siguió el mismo procedimiento con dos muestras análogas de liposomas de los líquidos iónicos **21** y **26** en ausencia de CBs.

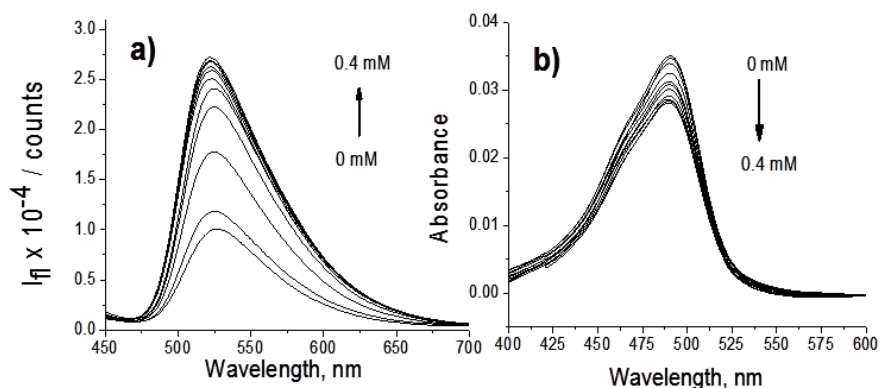


**Esquema 7.2** Procedimiento empleado en la determinación de la presencia de CBs libres en los liposomas en las disoluciones que resulta tras la agregación y polimerización de los complejos de los líquidos iónicos **21** y **26** con CBs.

Con el fin de ilustrar los cambios observados en la fluorescencia para las valoraciones de las muestras conteniendo CB[7] o los cambios en los espectros de absorción para aquellas muestras conteniendo CB[8], la Figura 7.5 presenta una serie de espectros registrados para AO valorado con la disolución de liposomas obtenida por polimerización de líquido iónico **21** con CBs. Por otra parte, la Tabla 7.2 resume los incrementos relativos de fluorescencia e



intensidad de absorción para la valoración de AO condisoluciones provenientes de liposomas obtenidos por polimerización de los líquidos iónico **21** y **26** en presencia de CBs.

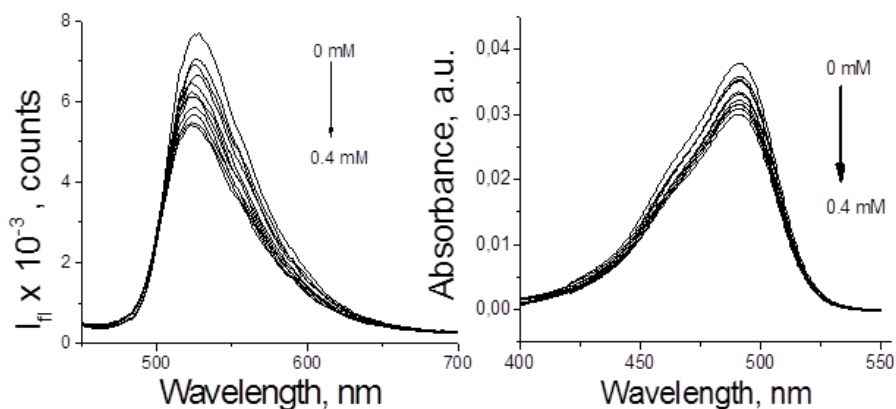


**Figura 7.5** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 427 \text{ nm}$ ) (a) y de absorción (b) registrados para una disolución de AO valorada con liposomas resultantes de la polimerización del líquido iónico P(**21**@CB[7]) (a) y líquido iónico P(**21**@CB[8]) (b). Los rangos de concentración de líquido iónico se indican en la figura y la flecha muestra el aumento o disminución de la intensidad de los espectros.

Se pensó que si el complejo líquido iónico con CB[n] es destruido tras polimerización y formación de los liposomas, la purificación por diálisis de las disoluciones coloidales de liposoma darían una muestra que presentaría un comportamiento diferente al de la misma disolución que no ha sido sometida a diálisis. Más aún si el complejo es destruido tras polimerización y diálisis el comportamiento del liposoma debería ser idéntico al del liposoma preparado sin CB[n].

Como se puede ver en la Tabla 7.2, los valores experimentales siempre indican que la diálisis reduce significativamente la intensidad de la fluorescencia de la molécula sonda AO para los complejos de líquidos iónicos con CB[7], indicando que parte del CB[7] está libre tras el auto-ensamblaje y polimerización y por tanto puede ser eliminado en el proceso de

diálisis. De acuerdo con esta observación, el comportamiento de los liposomas conteniendo CB[7] sometidos a diálisis es muy similar al de los liposomas preparados a partir de líquidos iónicos que nunca han sido complejados con CB[7], observándose en ambos casos una disminución en la intensidad de fluorescencia. En contraste, las valoraciones llevadas a cabo antes de la diálisis revelaron la presencia de CB[7] que se pone de manifiesto por el aumento de la intensidad de fluorescencia correspondiente al AO.



**Figura 7.6.** Espectro de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 427 \text{ nm}$ ) (a) y de absorción (b) registrados para una disolución de AO valorada con liposomas resultantes de la diálisis del P(21@CB[7]) (a) y líquido iónico P(21@CB[8]) (b). Los rangos de concentración de disolución de P(21@CB[7]) y P(21@CB[8]) se indican en la figura y la flecha muestra el aumento o disminución de la intensidad de los espectros.

La Tabla 7.2 presenta igualmente los datos correspondientes a la formación y polimerización de los liposomas conteniendo CB[8]. En este caso la valoración se lleva a cabo determinando los cambios en la banda de absorción correspondiente al monómero AO.<sup>23</sup> Se observaron diferencias no significativas entre los liposomas polimerizados antes y después de la diálisis lo que indica la ausencia de CB[8] libre. Además estos P(21@CB[8]) y P(26@CB[8]) se comportan de manera diferente con respecto a la muestra en la cual el CB[8] no estaba presente, es decir, las muestras **P21** y **P26** cuyos datos se incluyen

igualmente en la Tabla 7.2. Por consiguiente, se puede concluir que la asociación de los líquidos iónicos **21** y **26** con CB[8] permanece tras el auto-ensamblaje y la polimerización. Es más, AO forma dímeros en el interior de CB[8] que exhiben un espectro de absorción en el visible característico<sup>25</sup> y que no ha sido observado en el presente caso. Es destacable que los complejos supramoleculares para los líquidos iónicos **21** y **26**, aún siendo los más fuertes para el CB[7] y sus cinéticas de asociación/liberación lentas en agua, son aquellos que han sido destruidos durante el auto-ensamblaje en vesículas y la polimerización a 80 °C.

Muestra	$\Delta I_f/I_f$ (%) <sup>a</sup>	$\Delta Abs/Abs$ (%) <sup>b</sup>
<i>Antes de la diálisis<sup>c</sup></i>		
P(21@CB[7])	162.0 ± 8.1	-
P(26@CB[7])	64.9 ± 3.24	-
P(21@CB[8])	-	-17.8 ± 0.9
P(26@CB[8])	-	-33.4 ± 1.7
<i>Después de la diálisis<sup>d</sup></i>		
P(21@CB[7])	-26.9 ± 1.4	-
P(26@CB[7])	-36.9 ± 1.9	-
P(21@CB[8])	-	-20.6 ± 1.0
P(26@CB[8])	-	-32.1 ± 1.6
<i>Valoraciones sin CB[n]<sup>e</sup></i>		
P21	-20.4 ± 1.0	-47.2 ± 2.4
P26	-31.9 ± 1.6	-19.4 ± 1.0

**Tabla 7.2** incrementos relativos en la intensidad de fluorescencia (CB[7]) y absorbancia (CB[8]) registrados para AO cuando disoluciones micromolares de este colorante son valoradas por disoluciones de liposomas (5 mM) en concentración de **20** y **25** ) obtenidos por polimerización de los complejos de **20** o **25** con CBs antes y después de ser dializados. Se incluyen también los datos de control obtenidos para liposomas que no han sido

expuestos a CBs. La letra “P” como prefijo en la columna de muestras indica que estas han sido sometidas a polimerización.

a: incremento relativo de la intensidad de fluorescencia (%) medido a 540 nm

b: disminución relativa de la intensidad de absorbancia (%) de AO medido a 490 nm

c: valoración usando liposomas inmediatamente después de polimerización

d: valoración usando liposomas que han sido sometidos a diálisis tras polimerización

e: valoración usando liposomas preparados como se indica en la nota c pero sin contener CBs

### 7.3 Conclusiones

Los datos presentados en este capítulo establecen que los líquidos iónicos caracterizados por un heterociclo imidazolio polar y cadenas hidrofóbicas  $\omega$ -undecenil largas forman en agua complejos de inclusión huésped-hospedador con CB[7] y CB[8]. La constante de asociación de estos complejos es moderada. En el caso del CB[7] los complejos huésped-hospedador con los líquidos iónicos monoméricos son aparentemente destruidos en el proceso de auto-ensamblaje del líquido iónico a valores de concentración superiores a la concentración crítica de auto-ensamblaje y la polimerización de los dobles enlaces C=C en los liposomas. Esta desasociación originada por el auto-ensamblaje se demuestra comparando el comportamiento de disoluciones de los liposomas que han sido sometidos o no a diálisis con el comportamiento de los liposomas que nunca han sido expuestos a CB[7]. En contraste debido a su mayor cavidad, los complejos huésped-hospedador de los líquidos iónicos **21** y **26** con CB[8] sobreviven las etapas de auto-ensamblaje y polimerización puesto que no se observan cambios en el comportamiento de los liposomas antes y después de diálisis con respecto a la valoración con AO y estas muestras se comportan de manera diferente a las muestras control sin contener CB[8]. Los resultados del presente capítulo han sido racionalizados considerando que la fuerza impulsora en la complejación huésped-

hospedador es la interacción hidrofóbica entre las cadenas largas alquénicas y el interior de los CBs. El auto-ensamblaje y la formación de liposomas es igualmente un fenómeno que deriva de fuerzas hidrofóbicas y de esta manera compite y puede llegar a alterar la formación de complejos de inclusión supramoleculares causando la desestabilización de estos en el caso de CB[7]. Para el CB[8] el mayor tamaño de cavidad permite el auto-ensamblaje sin la destrucción de los complejos huésped-hospedador.

#### 7.4 Referencias

- (1) Buaki, M.; Aprile, C.; Dhakshinamoorthy, A.; Alvaro, M.; Garcia, H. *Chem-Eur. J.* **2009**, *15*, 13082-13089.
- (2) Montes-Navajas, P.; Corma, A.; Garcia, H. *J. Mol. Catal. A-Chemical* **2008**, *279*, 165-169.
- (3) Jiao, D. Z.; Biedermann, F.; Scherman, O. A. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3044-3047.
- (4) Noujeim, N.; Leclercq, L.; Schmitzer, A. R. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3784-3790.
- (5) Wang, R. B.; Yuan, L. N.; Macartney, D. H. *Chem. Comm.* **2006**, 2908-2910.
- (6) Zhao, N.; Liu, L.; Biedermann, F.; Scherman, O. A. *Chem-Asian J.* **2011**, *5*, 530-537.
- (7) Liu, L.; Zhao, N.; Scherman, O. A. *Chem. Commun.* **2008**, 1070-1072.
- (8) Biczok L.; Wintgens V.; Miskolczy Z.; M., M. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 625-633.
- (9) Wintgens, V.; Biczok, L.; Miskolczy, Z. *Supramol. Chem.* **2010**, *22*, 612-618.
- (10) Cintas, P. J. *Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1994**, *17*, 205-220.
- (11) Das, D.; Scherman, O. A. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 537-550.
- (12) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844-4870.
- (13) Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H. J.; Kim, K. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 621-630.
- (14) Mock, W. L., 1995; Vol. 175.
- (15) Kolman, V.; Marek, R.; Strelcova, Z.; Kulhanek, P.; Necas, M.; Svec, J.; Sindelar, V. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6926-6931.
- (16) Leclercq, L.; Lacour, M.; Sanon, S. H.; Schmitzer, A. R. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6327-6331.
- (17) Topchieva, I.; Karezin, K. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *213*, 29-35.
- (18) Ondo, D.; Tkadlecov, M.; Dohnal, V.; Rak, J.; Cala, J.; Lehmann, L. K.; Heintz, A. A.; Ignatiev, N. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 10285-10297.
- (19) Pessego, M.; Basilio, N.; Moreira, J. A.; Garcia-Rio, L. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 1342 - 1350.
- (20) Zhou, Q.; Wang, H.; Gao, T.; Yu, Y.; Ling, B.; Mao, L.; Zhang, H.; Meng, X.; Zhou, X. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11315-11317.

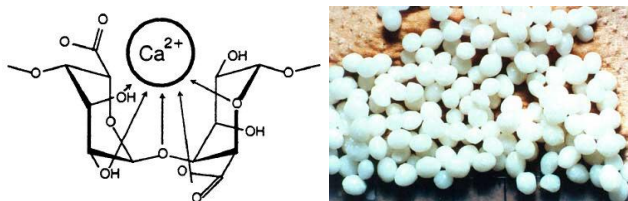
- (21) Da Silva, J. P.; Jayaraj, N.; Jockusch, S.; Turro, N. J.; V., R. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2410-2413.
- (22) Hennig, A.; Hoffmann, S.; Borchering, H.; Thiele, T.; Schedlerb, U.; Resch-Gengerahem, U. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7842-7844.
- (23) Montes-Navajas, P.; Garcia, H. *J. Photochem. Photobiol., A* **2009**, *204*, 97-101.
- (24) Montes-Navajas, P.; Gonzalez-Bejar, M.; Scaiano, J. C.; Garcia, H. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 1743-1747.
- (25) Montes-Navajas, P.; Corma, A.; Garcia, H. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 713-720.

## CAPÍTULO 8: ÁCIDO ALGÍNICO COMO AGENTE PLANTILLA EN LA PREPARACIÓN DE ÓXIDOS DE TITANIO CON ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA.

---

### 8.1 Introducción

Han aparecido en la literatura reciente varios artículos describiendo el uso de biopolímeros como agentes plantilla en la preparación de nanopartículas de óxidos metálicos.<sup>1-6</sup> Entre estos biopolímeros, el alginato (**27**) aparece como una plantilla particularmente adecuada para precursores catiónicos en disoluciones acuosas debido a que las cargas negativas de este polisacárido en disoluciones acuosas a pH superior a 5 deben ser compensadas por cationes. El alginato (**27**) es un oligosacárido derivado de la glucosa y ácidos glucurónico y malurónico<sup>7,8</sup> que está constituido por fibrillas fundamentalmente lineales. El Esquema 8.1 representa la estructura de este biopolímero. La presencia de grupos carboxílicos en su estructura determina que la disociación de los mismos produzca grupos carboxilato distribuidos uniformemente a lo largo de la fibra. El alginato (**27**) se obtiene de forma abundante a partir de extractos de algas y se emplea en aplicaciones que van desde aditivo en alimentación hasta en formulación de medicamentos para la liberación controlada de fármacos.<sup>9-12</sup>



**Esquema 8.1.** Interacciones de la cadena de alginato (**27**) con el catión  $\text{Ca}^{2+}$  (izquierda) y esferas de alginato de calcio obtenidas por precipitación de disoluciones acuosas de alginato con iones  $\text{Ca}^{2+}$  (derecha).

Cuando el alginato (**27**) posee como catión de compensación cationes de metales de transición, la calcinación al aire de estos biopolímeros produce la combustión del material orgánico y la formación del correspondiente óxido metálico.<sup>13-16</sup>

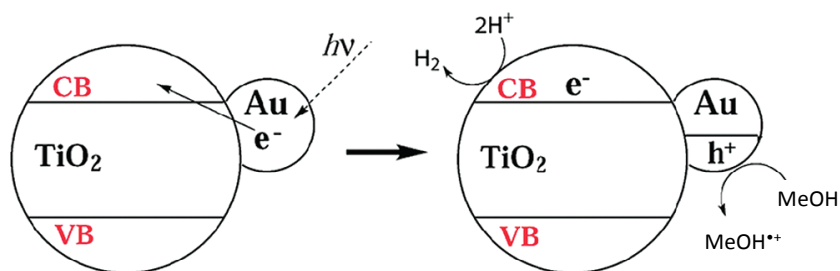
Se ha propuesto que las fibrillas de este polisacárido definen una cavidad de reacción flexible en la cual las nanopartículas de óxido metálico que se van formando se encuentran confinadas y estabilizadas frente a su crecimiento debido a la coordinación con los grupos del polisacárido que está descomponiendo.<sup>17-19</sup> El Esquema 8.1 muestra la interacción entre las cadenas de biopolímero **27** y el catión metálico que eventualmente conduce al control del tamaño de las nanopartículas metálicas cuando estas se forman empleando alginato (**27**) como agente plantilla.

La principal ventaja del uso de alginato (**27**) como agente director en la preparación de nanopartículas de óxidos metálicos es el reducido tamaño de las nanopartículas que se obtienen por este procedimiento y su elevada área superficial.<sup>15,18</sup> Este área superficial grande deriva del hecho de que el alginato (**27**) conteniendo metales de transición, cuando es secado con CO<sub>2</sub> supercrítico puede alcanzar áreas superficiales BET entre 500 y 700 m<sup>2</sup>/g un valor que se encuentra entre los materiales porosos de mayor área.<sup>20-22</sup> El secado supercrítico evita la agregación de las fibrillas del alginato (**27**) al no estar presentes fuerzas de menisco ni puentes de hidrógeno que aparecen cuando se seca el alginato (**27**) en agua u otros disolventes. La agregación de las fibrillas de alginato durante el secado del biopolímero determina la formación de materiales compactos de muy baja área superficial y donde no existen poros en el interior del biopolímeros.

Siguiendo la estrategia basada en el secado supercrítico de alginatos conteniendo metales de transición y su posterior combustión, nuestro grupo ha preparado recientemente un dióxido de cerio nanoparticulado conteniendo o no nanopartículas de oro que ha mostrado una excelente actividad fotocatalítica para la generación de oxígeno a partir del agua mediante irradiación con luz visible.<sup>6</sup>



También relacionado con el proceso de ruptura fotocatalítica del agua, hemos descrito recientemente que nanopartículas de oro en un porcentaje pequeño puede actuar como fotosensibilizador del dióxido de titanio convirtiendo el material resultante en un fotocatalizador que opera con luz visible para la generación de hidrogeno.<sup>23</sup> El fenómeno de fotosensibilización de semiconductores con nanopartículas de oro ha dado lugar a una línea de investigación en fotocatalisis que se conoce como fotocatalisis de plasmón superficial (“*Surface Plasmon Photocatalysis*”)(Esquema 8.2)

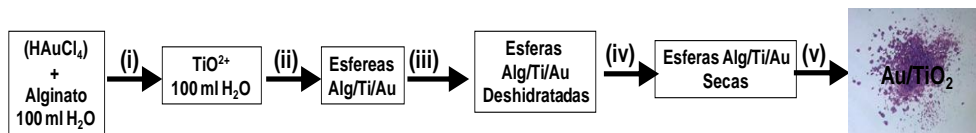


**Esquema 8.2.** Mecanismo propuesto para el fenómeno de fotosensibilización de semiconductores con nanopartículas de oro por irradiación con luz visible en la banda del plasmon superficial de las nanopartículas de oro.

Continuando con el desarrollo del alginato (**27**) como agente director en la formación de materiales inorgánicos y considerando que el  $\text{TiO}_2$  es un fotocatalizador más ampliamente utilizado, en el presente capítulo se ha procedido a estudiar la preparación de una serie de dióxidos de titanio soportando o no nanopartículas de oro y cuya síntesis se basa en el empleo de alginato (**27**) como agente director, procediendo a comparar la actividad fotocatalítica con luz visible de este dióxido de titanio con respecto a la actividad que exhibe la muestra comercial P25 que es el  $\text{TiO}_2$  estándar en fotocatalisis. La reacción elegida para la comparación fue la generación de hidrógeno a partir del agua en presencia de metanol como agente sacrificial. Los resultados obtenidos indican que la eficiencia fotocatalítica inherente a las muestras  $\text{Au}/\text{TiO}_2$  aumenta siguiendo la metodología descrita en el presente capítulo.

## 8.2 Resultados y discusión

El procedimiento seguido en la preparación de las muestras  $\text{TiO}_2$  y  $\text{Au/TiO}_2$  usando alginato (27) como agente plantilla se resume en el Esquema 8.3. Como puede verse en el esquema, una disolución de alginato (27) a pH neutro conteniendo o no  $\text{HAuCl}_4$  se precipita mediante adición de una disolución acuosa de  $\text{TiO}^{2+}$ .

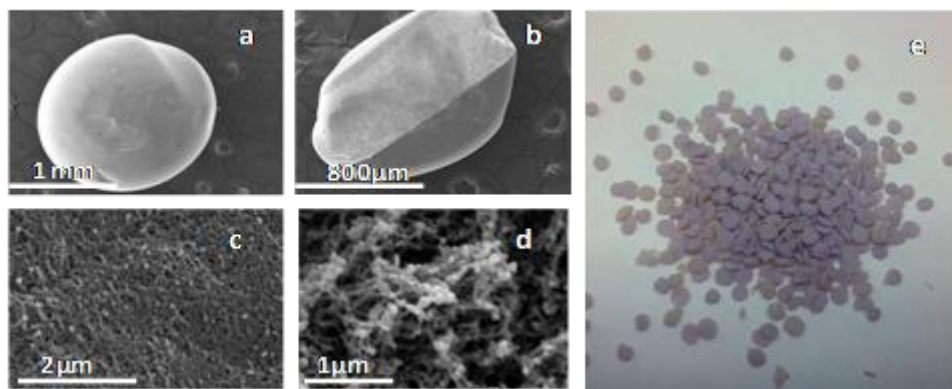


**Esquema 8.3.** Procedimiento empleado en la preparación de los fotocatalizadores de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{Au/TiO}_2$  usando alginato (27) como agente plantilla: (i) precipitación de la disolución de alginato (1 g / 100 ml agua) conteniendo o no  $\text{HAuCl}_4$  (desde 0.5 a 21.5  $\mu\text{moles}$ ) al mezclarlo con 100 ml de una disolución acuosa 0.32 M  $\text{TiO}^{2+}$ ; (ii) agitación magnética a temperatura ambiente durante 2 h; (iii) deshidratación mediante una serie de lavados consecutivos con mezclas agua/etanol en proporciones 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 10/90 y 0/100; (iv) secado en condiciones de  $\text{CO}_2$  supercrítico; (v) calcinación al aire a 450  $^\circ\text{C}$ .

El proceso descrito en el Esquema 8.3 da lugar a esferas de tamaño milimétrico donde el alginato (27) contiene  $\text{TiO}^{2+}$  en presencia o ausencia de  $\text{AuCl}_4^-$ . Posteriormente estas esferas se deshidratan mediante lavados consecutivos con disoluciones de agua/etanol que poseen una proporción creciente de etanol. La muestra final tras los lavados es conocida como *alcogel* ya que contiene alcohol y presenta una apariencia esponjosa. Este *alcogel* es finalmente secado en condiciones de  $\text{CO}_2$  supercrítico para dar lugar a aerogeles secos de Ti-Alginato (28) o Au/Ti-Alginato (29) dependiendo de la presencia o no de oro. Los pasos clave en el procedimiento seguido consisten en la precipitación del alginato por neutralización de sus cargas negativas por coordinación con el catión titanilo cargado positivamente y el secado supercrítico que produce un material de gran porosidad

(*aerogel*). Cuando el  $\text{AuCl}_4^-$  está presente en el medio se produce además la formación espontánea de nanopartículas de oro por reducción de la sal de Au (III) por el polisacárido.

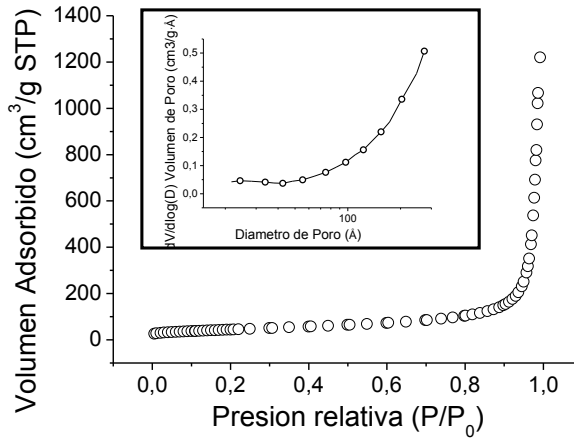
Se ha descrito que el proceso de secado supercrítico tiene un papel crucial en la obtención de muestras con una elevada área superficial.<sup>22</sup> Puesto que el  $\text{CO}_2$  supercrítico no es miscible con agua, pero si en etanol es necesario proceder al reemplazo gradual del agua por etanol antes de proceder a la obtención del *aerogel*. Las esferas de Au/Ti-Alginato (**29**) se caracterizaron por microscopía electrónica. La Figura 8.1 muestra una fotografía de las esferas Au/Ti-Alginato (**29**) así como imágenes de SEM seleccionadas de las esferas Ti-Alginato (**28**) a tres diferentes aumentos donde se observa la morfología de la superficie externa y de una sección transversal de una de estas esferas. Como puede verse en estas imágenes de microscopía, el material es altamente poroso, particularmente en el interior de la esfera. De hecho medidas por adsorción isoterma de nitrógeno para el material Ti-Alginato (**28**) dieron un área superficial de  $485 \text{ m}^2/\text{g}$  con una amplia distribución de tamaño de poro. Medidas similares para la muestra Au/Ti-Alginato (**29**) dan lugar a un área superficial específica BET de  $275 \text{ m}^2/\text{g}$  y un tamaño de poro promedio de 16 nm.



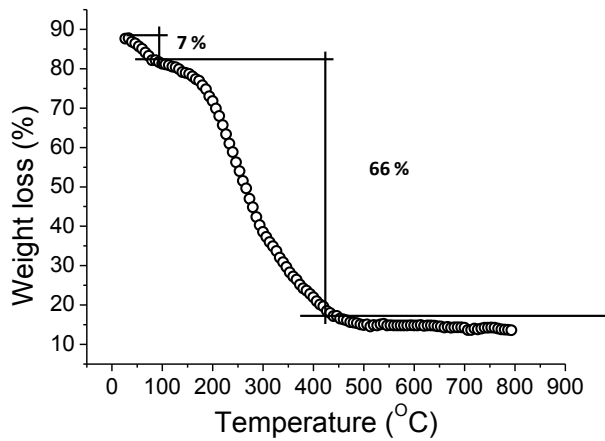
**Figura 8.1.** Imágenes de SEM (a-d) de SEM seleccionadas de las esferas Ti-Alginato (**28**) y fotografía de las esferas Au/Ti-Alginato (**29**) (e). Las imágenes (a) y (b) muestran una vista frontal y una sección transversal de las esferas y las imágenes (c) y (d) corresponden a la

imagen de SEM de la superficie (c) y del interior (d) de las esferas a mayor aumento. La fotografía (e) muestra el aspecto visual de las esferas que contienen oro antes de su calcinación donde puede observarse el color morado de las nanopartículas metálicas.

Las medidas de termogravimetría para las muestras de Ti-Alginato (**28**) y Au/Ti-Alginato (**29**) dieron valores similares, observándose una pérdida inicial de peso a temperaturas alrededor de 140 °C en torno al 7% y que fueron atribuidas a la desorción de agua adsorbida en las muestras. A partir de 150 y hasta 500 °C se registraron pérdidas significativas de peso de alrededor del 66 % y que han sido atribuidas a la combustión del alginato. La masa final resultante tras las medidas de termogravimetría en atmósfera de aire fue del 27% y debe corresponder al óxido de titanio conteniendo o no oro que se forma durante el proceso de calcinación en atmósfera oxidante. Considerando que el material de partida era el catión titanilo  $\text{TiO}^{2+}$  que contenía un único átomo metálico, es de suponer que este precursor evoluciona durante el tratamiento térmico hacia el óxido correspondiente. El objetivo es conseguir un material altamente cristalino en fase anatasa. Por tanto, se seleccionó como temperatura adecuada para la calcinación la de 450 °C, que de acuerdo con el perfil de termogravimetría debería ser suficiente para producir la combustión completa de alginato (**27**) y la cristalización del  $\text{TiO}_2$ , pero no sería lo suficientemente elevada como para convertir la fase cristalina anatasa en rutilo. La presencia de rutilo, al menos en elevadas proporciones se considera indeseable desde el punto de vista de la actividad fotocatalítica.<sup>24</sup>

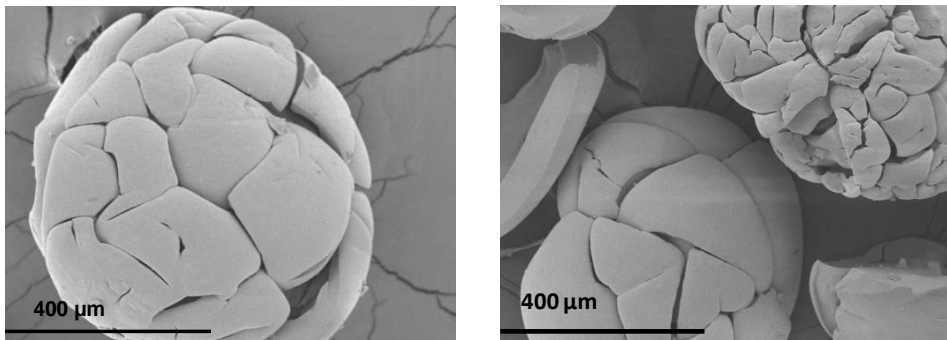


**Figura 8.2** Curva de adsorción isoterma de nitrógeno medida para la muestra Au/Ti-Alginato. El recuadro de la figura muestra la distribución de tamaño de poro para esta muestra, determinado a partir de la rama de desorción aplicando el algoritmo BJH.



**Figura 8.3** Perfil de termogravimetría obtenido en atmósfera de aire donde se indica la pérdida de peso para la muestra Au/Ti-Alginato (**29**) en función de la temperatura. Los números en la curva indican la pérdida de peso entre los puntos indicados.

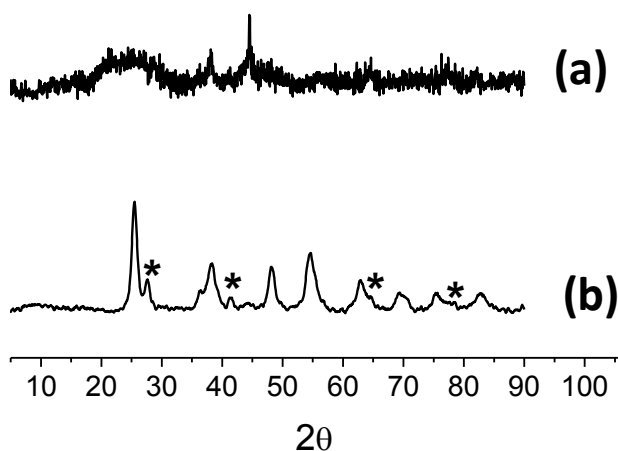
Cuando las muestras de *aerogel* de alginato (**27**) conteniendo titanio se sometieron a calcinación se observaron cambios notables en la morfología de las partículas. La Figura 8.4 muestra imágenes de SEM seleccionadas para la muestra Ti-Alginato (**28**) calcinada a 450 °C. En ella pueden verse regiones de varios cientos de micras de tamaño con superficie lisa que se han originado como consecuencia de la ruptura de la esfera inicial durante el proceso de calcinación. Estas regiones independientes unas de otras todavía mantienen una cierta asociación con forma esférica pero con un diámetro inferior a la esfera de alginato precursora.



**Figura 8.4.** Imágenes de SEM seleccionadas para la muestra Ti-Alginato (**28**) calcinada a 450 °C.

Los difractogramas de rayos X de las muestras resultantes tras la calcinación a la temperatura de 450 °C muestran que el sólido está constituido por  $\text{TiO}_2$  en fase anatasa (ver Figura 8.5). La presencia de nanopartículas de oro no pudo ser determinada mediante difracción de rayos X para las muestras con un bajo contenido en este metal. Sin embargo para las muestras donde el contenido de oro fue próximo al 1.3% el difractograma de rayos X mostró junto a los picos correspondientes al  $\text{TiO}_2$  en su forma anatasa otros picos de

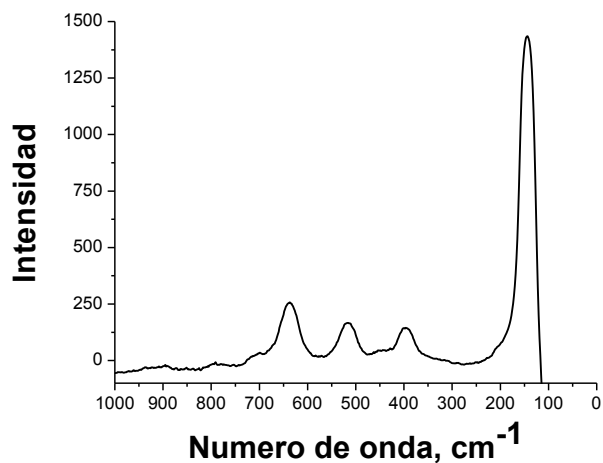
menor intensidad que coinciden con los descritos para la fase FCC del oro. La figura muestra una comparación del difractograma de rayos X para una muestra Au/Ti-Alginato (contenido de oro en peso: 1.3%) antes y después de calcinación donde se han indicado los picos correspondientes a las nanopartículas de oro. Como puede observarse en esa figura el material antes de su calcinación no contiene ninguna fase cristalina.



**Figura 8.5.** Difractogramas de rayos X para una muestra Au/Ti-Alginato (contenido de oro en peso: 1.3%) antes (a) y después (b) de calcinación donde se han indicado (\*) los picos correspondientes a las nanopartículas de oro.

Idénticas conclusiones sobre la fase cristalina del  $\text{TiO}_2$  formado en la calcinación de la muestra de alginato (27) se alcanzaron mediante el estudio de los espectros Raman de estas muestras. La espectroscopia Raman además de diferenciar entre las fases cristalinas, permite determinar la presencia de  $\text{TiO}_2$  amorfo que difícilmente puede observarse en las técnicas de difracción. En el presente caso los espectros Raman de las muestras de  $\text{TiO}_2$  conteniendo o no oro obtenidas por calcinación de las muestras de alginato (27) permitieron registrar los tres picos de vibración a  $650$ ,  $520$  y  $400 \text{ cm}^{-1}$  característicos de la anatasa sin que se registraran picos adicionales. Estos espectros Raman sugieren la

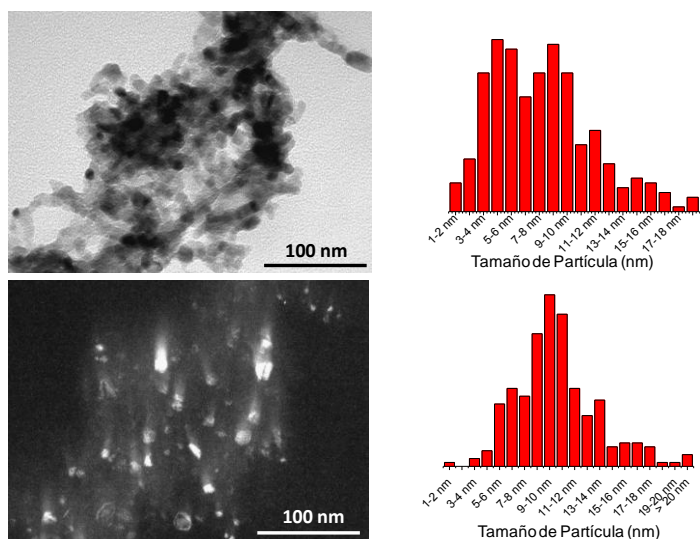
ausencia de  $\text{TiO}_2$  amorfo en las muestras. Además las muestras conteniendo oro tampoco presentaron ninguna banda asociada a este metal noble.



**Figura 8.6.** Espectro Raman de las muestras de  $\text{TiO}_2$  conteniendo o no oro obtenidas por calcinación de la muestra de alginato (27) a  $450^\circ\text{C}$ .

Aquellas muestras de titanio conteniendo oro fueron estudiadas mediante TEM a fin de establecer la presencia en ellas de nanopartículas del metal noble. La Figura 8.7 muestra una imagen TEM representativa de las muestras  $\text{Au}$  (1.3%)/ $\text{TiO}_2$  donde se observa la presencia de nanopartículas de oro. La imagen en campo oscuro pone igualmente de manifiesto la presencia del oro como metal pesado con una amplia distribución de tamaño que se origina probablemente debido a las altas temperaturas necesarias para la calcinación. A modo de ejemplo la Figura 8.7 presenta igualmente los histogramas correspondientes al tamaño de partícula de dos muestras  $\text{Au}/\text{TiO}_2$ . La Tabla 8.1 resume los datos analíticos de contenido de oro en las muestras  $\text{Au}/\text{TiO}_2$  resultantes tras la calcinación así como el área superficial de las mismas y el rango de tamaño de partícula.





**Figura 8.7.** Imagen TEM representativa de la muestra Au (1.3%)/TiO<sub>2</sub> donde se observa la presencia de nanopartículas de oro (imagen superior izquierda). La imagen en campo oscuro (imagen inferior izquierda) pone igualmente de manifiesto la presencia del oro como metal pesado. Histogramas correspondientes al tamaño de partícula de dos muestras Au/TiO<sub>2</sub> conteniendo 0.556 % Au (histograma arriba a la derecha) y 1.3 % Au (histograma abajo a la derecha).

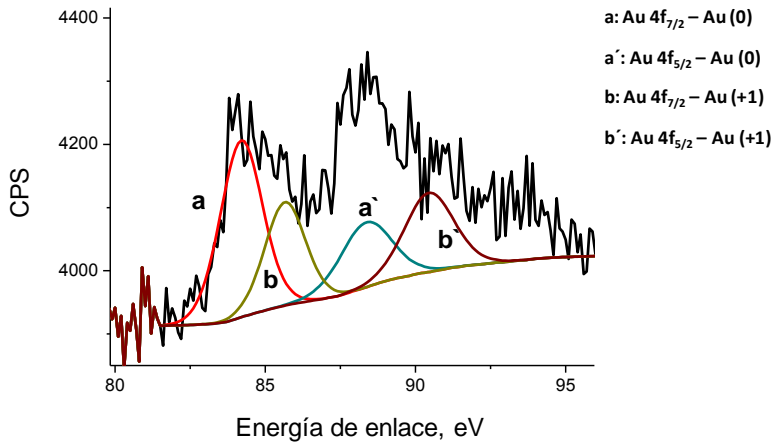
**Tabla 8.1.** Área BET, contenido en oro y rango de tamaños de partícula mayoritarios de las muestras preparadas empleando alginato (27) como agente plantilla.

Muestra	Area (m <sup>2</sup> /g)	(% Au) <sup>a</sup>	Tamaño de Partícula (nm)
Au/TiO <sub>2</sub> - 1	158	1.284	8 - 11
Au/TiO <sub>2</sub> - 2	169	0.789	5 - 6
Au/TiO <sub>2</sub> - 3	136	0.68	3 - 10
Au/TiO <sub>2</sub> - 4	160	0.556	3 - 10
Au/TiO <sub>2</sub> - 5	163	0.045	4 - 10

*a: % Au obtenido por Fluorescencia de Rayos X*

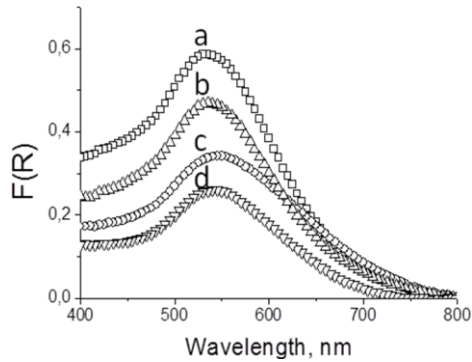
De los datos presentados en esta tabla cabe concluir que el área superficial de las muestras Au/TiO<sub>2</sub> preparadas usando alginato **(27)** como plantilla varía entre 136 y 160 m<sup>2</sup>/g, mientras que la muestra de TiO<sub>2</sub> preparada de la misma forma pero en ausencia de oro presentó un área superficial de 187 m<sup>2</sup>/g, siendo estos valores de área elevados para muestras de TiO<sub>2</sub>. En este sentido cabe indicar que la muestra comercial de TiO<sub>2</sub>-P25 obtenida por pirólisis presenta un área BET en torno a 30 m<sup>2</sup>/g que es significativamente menor que el área de los materiales aquí preparados.<sup>25</sup> Por otra parte el porcentaje de oro de las muestras se encuentra en el rango de valores que se considera como óptimo para conseguir la máxima actividad catalítica y fotocatalítica en este tipo de materiales. Por lo que respecta al tamaño de nanopartícula de oro las muestras presentan en general una distribución amplia, siendo el tamaño de la mayoría de las nanopartículas inferior a los 10 nm. Se observa no obstante, que el tamaño de las nanopartículas de oro tiende a crecer con la carga de oro. Este hecho es habitual en este tipo de materiales a base de nanopartículas de oro soportadas en óxidos metálicos y es consecuencia de que la dispersión de oro sobre el soporte se reduce a medida que se aumenta el número de átomos de oro depositados en el área superficial.<sup>26-31</sup>

La presencia de oro y la distribución de estados de oxidación de este metal noble se determinó igualmente mediante espectroscopia XP. Esta técnica permitió detectar la banda 4f<sub>7/2</sub> en torno a 90 eV característica del oro. La deconvolución del pico de oro experimental determina que aproximadamente un 64 % de los átomos de oro se encuentran en su estado de oxidación 0 existiendo no obstante una población significativa en torno al 36 % de Au<sup>+</sup> y que se caracteriza por una energía de enlace mayor.



**Figura 8.8** Espectro de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X para la muestra Au/TiO<sub>2</sub> que contiene un 1.3 % en peso de oro.

Las nanopartículas de oro se caracterizan por poseer una banda intensa de absorción en la zona del visible que se conoce como la banda de plasmón superficial (“**Surface Plasmon Band**”). Esta banda característica de las nanopartículas de oro corresponde a la vibración colectiva de los electrones de la capa externa del oro confinados en un espacio de dimensiones nanométricas y origina el color púrpura característico de estas nanopartículas. La posición exacta del máximo de la banda de plasmón superficial depende de la constante dieléctrica del soporte y de la presencia de cargas en las nanopartículas.<sup>32-34</sup> En el caso del Au/TiO<sub>2</sub> la posición del máximo de la banda de plasmón se encuentra en torno a 540 nm, pero la banda se extiende entre 400 y 700 nm. La intensidad de esta banda crece con el contenido de oro. La Figura 8.9 muestra los espectros ópticos de absorción para alguna de las muestras Au/TiO<sub>2</sub> preparadas empleando alginato como agente plantilla.



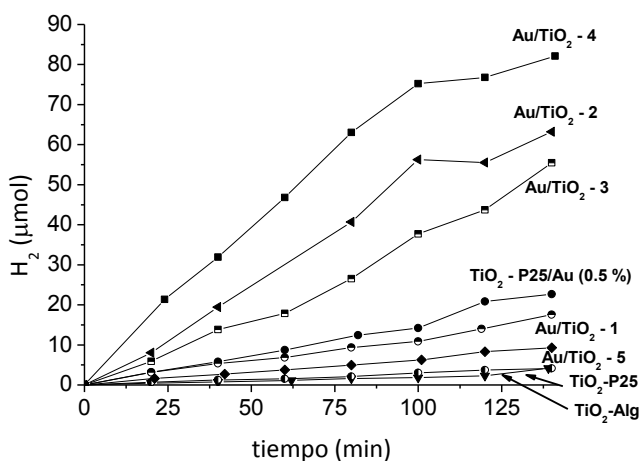
**Figura 8.9.** Espectro de reflectancia difusa de la muestra Au/TiO<sub>2</sub>-1 (% Au en peso: 1.3) antes (c) y después (a) de su calcinación a 450 °C y de la muestra Au/TiO<sub>2</sub>-4 (% Au en peso: 0.56) antes (d) y después (b) de su calcinación a 450 °C.

### **8.2.1. Estudio de la actividad fotocatalítica de las muestras Au/TiO<sub>2</sub> para la generación de hidrogeno a partir del agua**

Como se ha indicado anteriormente el objetivo del capítulo es desarrollar una metodología nueva de preparación de dióxido de titanio basada en el empleo de alginato (27) como agente plantilla que permita disponer de materiales con actividad fotocatalítica mejorada con respecto al P25 tomado como fotocatalizador de referencia. A tal fin se eligió como reacción modelo la generación fotocatalítica de hidrogeno a partir del agua empleando metanol como agente sacrificial dador de electrones. Se llevaron a cabo ensayos empleando como fuente de irradiación un simulador solar con un filtro AM15 que reproduce adecuadamente el espectro solar en la superficie terrestre. Esta fuente de excitación contiene un pequeño porcentaje de luz UV (en torno al 4 %) y un porcentaje elevado en torno al 50 % de luz visible. Es conocido en el estado del arte que el dióxido de titanio es manifiestamente ineficaz cuando se emplea con longitud de onda superior a 380 nm<sup>25,35-37</sup> por lo que la obtención de respuesta fotocatalítica con luz visible requiere

desarrollo de metodologías tales como dopaje o en el caso presente la deposición de nanopartículas metálicas coloreadas.<sup>36,38-40</sup>

Los resultados experimentales de evolución de hidrogeno en función del tiempo de irradiación se presentan en la Figura 8.10. Como puede verse en ella el  $\text{TiO}_2$  no generó cantidades significativas de hidrogeno mientras que todas las muestras conteniendo oro exhibieron alguna actividad. Los resultados obtenidos demuestran que existe una cantidad óptima de oro para conseguir la máxima eficiencia en la evolución de hidrógeno. Este hecho es debido a la distribución del tamaño de partícula y su influencia en los tiempos de vida y la energía de los estados transitorios implicados. Esta distribución en el tamaño de partícula varía según la carga de oro tal y como se ha indicado en la Tabla 8.1 y en la Figura 8.8. Es importante hacer notar que la muestra P25 conteniendo oro en el mismo porcentaje que la muestra más activa preparada por el método del alginato presenta una eficiencia significativamente inferior, poniendo de manifiesto la ventaja de nuestro método de preparación del  $\text{TiO}_2$  basado en el empleo de alginato como agente plantilla.



**Figura 8.10.** Evolución de hidrógeno en función del tiempo de irradiación para una serie de fotocatalizadores  $\text{Au/TiO}_2$  preparados utilizando alginato como plantilla. También se

muestra el hidrógeno obtenido cuando se utilizó una muestra de TiO<sub>2</sub>-P25 en presencia y en ausencia de Au NP.

El mecanismo propuesto para racionalizar la actividad fotocatalítica de las muestras Au/TiO<sub>2</sub> en el visible se muestra en el Esquema 8.2. Como puede verse en ese esquema la absorción de luz ocurriría en las Au NPs produciendo la excitación del plasmón que conduciría a la inyección de un electrón desde el oro a la banda de conducción del TiO<sub>2</sub> produciéndose el estado de separación de cargas. La diferencia con respecto al mecanismo clásico se encuentra en que el hueco electrónico se halla localizado en las Au NPs y que han sido estas nanopartículas las que han sufrido la excitación fotoquímica. La existencia de una superficie de separación entre la nanopartícula de oro y el semiconductor crea una barrera de *Schottky* que hace lento el fenómeno de recombinación, estabilizando el estado de separación de cargas por motivos cinéticos. El electrón en la banda de conducción del TiO<sub>2</sub> tendría la misma energía que si se hubiera producido la excitación directa de este semiconductor y por tanto es capaz de generar hidrogeno por reducción del agua en condiciones en las que el oxígeno se encuentre ausente. Por otro lado el hueco positivo se encontraría localizado en la Au NPs y tendría mucha menos capacidad de oxidación que un hueco en la banda de valencia del TiO<sub>2</sub>. Sin embargo este hueco sobre el oro sería eficientemente inhibido por el agente sacrificial dador de electrones (metanol) con lo cual se cerraría el ciclo fotocatalítico donde la absorción de un fotón produciría el movimiento de electrones desde el metanol a través del fotocatalizador hacia el agua, viniendo a resultar el catión radical del metanol (especie oxidada) y el hidrógeno (especie reducida).

### 8.3 Conclusiones

En el presente capítulo hemos presentado un procedimiento de preparación de muestras de TiO<sub>2</sub> y Au/TiO<sub>2</sub> basado en el empleo de alginato como agente plantilla que proporciona un ambiente favorable para la formación de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> de pequeño tamaño. Estas nanopartículas de dióxido de titanio conteniendo oro son de 3 a 8 veces más activas que una muestra análoga donde el oro se encuentra soportado sobre P25 que es el fotocatalizador de referencia en este campo.

### 8.4. Referencias

- (1) Schnepf, Z.; Hall, S. R.; Hollamby, M. J.; Mann, S. *Green Chem.* **2011**, *13*, 272.
- (2) Kim, Y.; Neudeck, C.; Walsh, D. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 272-275.
- (3) Kimling, M. C.; Caruso, R. A. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 4073.
- (4) Kim, Y.; Walsh, D. *Nanoscale* **2010**, *2*, 240-247.
- (5) Schnepf, Z.; Wimbush, S. C.; Manna, S.; Hall, S. R. *CrystEngComm* **2010**, *12*, 1410-1415.
- (6) Primo, A.; Marino, T.; Corma, A.; Molinari, R.; García, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6930-6933.
- (7) Stokke, B. T.; Draget, K. I.; Smidsrød, O.; Yuguchi, Y.; Urakawa, H.; Kajiwara, K. *Macromolecules* **2000**, *33*, 1853-1863.
- (8) Stokke, B. T.; Smidsrod, O.; Bruheim, P.; Skjak-Braekt, G. *Macromolecules* **1991**, *24*, 4637-4645.
- (9) Oh, S. T.; Kwon, O. J.; Chun, B. C.; Cho, J. W.; Park, J. S. *Fibers and Polymers* **2009**, *10*, 21-26.
- (10) Mu, B.; Zhong, W.; Dong, Y.; Du, P.; Liu, P. *J. Biomed. Mater. Res. B* **2012**, *100B*, 825-831.
- (11) Park, H.; Kim, P.-H.; Hwang, T.; Kwon, O.-J.; Park, T.-J.; Choi, S.-W.; Yun, C.-O.; Kim, J. H. *Int.J.Pharm.* **2012**, *427*, 417-425.
- (12) Jeon, O.; Powell, C.; Solorio, L. D.; Krebs, M. D.; Alsborg, E. *J.Controlled Release* **2011**, *154*, 258-266.
- (13) Agulhon, P.; Constant, S.; Chiche, B.; Lartigue, L.; Larionova, J.; Di Renzoa, F.; Quignard, F. *Catal. Today* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2012.03.052>.
- (14) Monakhova, Y.; Agulhon, P.; Quignard, F.; Tanchoux, N.; Tichit, D. *Catal. Today* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2012.03.072>.

- (15) Primo, A.; Liebel, M.; Quignard, F. *Chem. Mater* **2009**, *21*, 621-627.
- (16) Chtchigrovsky, M.; Lin, Y.; Ouchaou, K.; Chaumontet, M.; Robitzer, M.; Quignard, F.; Taran, F. *Chem. Mater* **2012**, *24*, 1505-1510.
- (17) Agulhon, P.; Markova, V.; Robitzer, M.; Quignard, F.; Mineva, T. *Biomacromolecules* **2012**, DOI: 10.1021/bm300420z.
- (18) Pal, A.; Esumi, K.; Pal, T. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *288*, 396-401.
- (19) Guo, R.; Li, R.; Li, X.; Zhang, L.; Jiang, X.; Liu, B. *Small* **2009**, *5*, 709-717.
- (20) Valentin, R.; Horga, R.; Bonelli, B.; Garrone, E.; Di Renzo, F.; Quignard, F. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 877-882.
- (21) Valentin, R.; Molvinger, K.; Quignard, F.; Di Renzo, F. *Macromol. Symp.* **2005**, *222*, 93-101.
- (22) Robitzer, M.; David, L.; Rochas, C.; Di Renzo, F.; Quignard, F. *Macromol. Symp.* **2008**, *273*, 80-84.
- (23) Gomes-Silva, C.; Juarez, R.; Marino, T.; Molinari, R.; Garcia, H. *J. Am. Chem. Soc* **2011**, *133*, 595-602.
- (24) Gomes-Silva, C.; Faria, J. L. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 705-711.
- (25) Xu, H.; Chen, X.; Ouyang, S.; Kako, T.; Ye, J. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 3833-3839.
- (26) Sa, J.; Taylor, S. F. R.; Daly, H.; Goguet, A.; Tiruvalam, R.; He, Q.; Kiely, C. J.; Hutchings, G. J.; Hardacre, C. *ACS Catal.* **2012**, *2*, 552-560.
- (27) Fu, P.; Zhang, P. *Appl. Catal., B* **2010**, *96*, 176-184.
- (28) Dawson, A.; Kamat, P. V. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 960-966.
- (29) Haruta, M. *Catal. Today* **1997**, *36*, 153-166.
- (30) Zheng, N.; Fan, J.; Stucky, G. D. *J. Am. Chem. Soc* **2006**, *128*, 6550-6551.
- (31) Comotti, M.; Li, W.-C.; Spliethoff, B.; Schüth, F. *J. Am. Chem. Soc* **2006**, *128*, 917-924.
- (32) Medda, S. K.; De, S.; De, G. *J. Mater. Chem* **2005**, *15*, 3278-3284.
- (33) Thomas, K. G.; Zajicek, J.; Kamat, P. V. *Langmuir* **2002**, *18*, 3722-3727.
- (34) Miller, M. M.; Lazarides, A. A. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 21556-21565.
- (35) Justicia, I.; Garcia, G.; Battiston, G. A.; Gerbasi, R.; Ager, F.; Guerra, M.; Caixach, J.; Pardo, J. A.; Rivera, J.; Figueras, A. *Electrochim. Acta* **2005**, *50*, 4605-4608.
- (36) Ma, T.; Akiyama, M.; Abe, E.; Imai, I. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2543-2547.
- (37) Ren, M.; Ravikrishna, R.; Valsaraj, K. T. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 7029-7033.
- (38) Chen, Q.; Shi, H.; Shi, W.; Xu, Y.; Wua, D. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1213-1220.
- (39) Xiong, Z.; Zhao, X. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5754-5757.
- (40) Zhang, H.; Chen, G.; Bahnemann, D. W. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 5089-5121.



## **CAPÍTULO 9: TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

---

### **9.1. Técnicas de Caracterización**

#### **9.1.1 Análisis químicos.**

Los análisis elementales cuantitativos de combustión de C, H y N se llevaron a cabo en un analizador elemental Fisons EA 1108 CHNS-O.

#### **9.1.2 Difracción de Rayos-X (DRX).**

Los espectros de Rayos X se registraron utilizando un difractómetro PHILIPS X'PERT PW 3719 equipado con un polarizador de grafito, rendijas automáticas, una superficie total de barrido constante de 14 mm, porta muestras giratorio y un detector proporcional. Para registrar los difractogramas se utilizó la radiación  $K\alpha$  del Cu ( $\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$ ) y una potencia de excitación de 2 KW. La velocidad angular del goniómetro fue de  $0.02^\circ \cdot s^{-1}$ , siendo el intervalo usual de barrido de  $2\theta = 2 - 40^\circ$ .

#### **9.1.3 Espectroscopía ultravioleta-visible-infrarrojo cercano de reflectancia difusa.**

Las medidas de espectroscopía por reflectancia difusa UV-Vis-NIR de las muestras sólidas se realizaron en un espectrofotómetro JASCO V-650. El estudio por reflectancia difusa de los sólidos opacos se realizó utilizando una esfera integradora, obteniéndose espectros cuya intensidad viene expresada en unidades de reflectancia (R) en tanto por cien, tomando como 100% la reflectancia del  $BaSO_4$  en todo el rango de longitudes de onda. El espectro de absorción se obtiene representando  $1/R$ , o bien la función Kubelka-Munk ( $F(R) = (1-R)^2/2R$ ), frente a la longitud de onda.

Las medidas de espectroscopía UV-Vis de las muestras orgánicas en disolución se realizaron en un espectrofotómetro JASCO V-650 utilizando cubetas de cuarzo y ajustando el cero de absorción con el disolvente puro.

#### **9.1.4 Espectroscopía IR**

La absorción en el IR se produce por interacción de la radiación incidente con los niveles vibracionales de las moléculas. La intensidad de la absorción depende de las variaciones que produce la oscilación en el momento dipolar. Los espectros FT-IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro JASCO FT-IR 460plus usando pastillas de KBr comprimidas a 2 Ton  $\text{cm}^{-2}$  durante 2 minutos.

#### **9.1.5 Espectroscopía Raman**

La Espectroscopía FT-Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos de los materiales analizados e independientes de la frecuencia de la luz incidente.

Se trata de una técnica de análisis que se realiza directamente sobre el material a analizar sin necesitar éste ningún tipo de preparación especial y que en general no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no-destructiva. Los espectros de Raman se registraron en un espectrofotómetro Renishaw Invia Raman Microscope midiendo la emisión a  $180^\circ$ . Para la excitación de las muestras se utilizó la línea 514.5 nm de un láser de diodo refrigerado por aire Renishaw (HPNIR) con un detector CCD refrigerado por Peltier. La potencia del láser sobre las muestras fue de 15 o 30 mW. La resolución espectral fue de  $4 \text{ cm}^{-1}$  y el número de acumulaciones osciló entre 800 y 4000, con tiempos de registro variando entre 30 minutos y 2 horas.

### **9.1.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, dando información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de imágenes que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar la morfología de zonas microscópicas de los distintos materiales, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas. Las principales características del SEM son la alta resolución ( $\sim 100 \text{ \AA}$ ), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras. Las muestras fueron caracterizadas por un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5410 a 20 KV.

Para la preparación de las muestras, éstas se adhirieron sobre un soporte porta muestras que se recubre con una cinta adhesiva conductora de doble cara y se metalizaron con una fina capa de oro mediante pulverización catódica con el objeto de hacer la superficie conductora.

### **9.1.7 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).**

El microscopio electrónico de transmisión emite un haz de electrones dirigido hacia el objeto. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra. Los análisis de las muestras se realizaron trabajando en campo claro empleando un microscopio Philips-CM10 a 100 kV. Para la preparación de las muestras se depositó una gota de una suspensión del material en agua sobre una rejilla de cobre (300 mesh) recubierta con una película de grafito.

### **9.1.8 Espectroscopía de RMN- $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ .**

La resonancia magnética nuclear es un método espectroscópico basado en las propiedades magnéticas de los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , ambos con número cuántico de spin  $1/2$ . Los espectros de RMN en estado sólido por ángulo mágico se registraron en un

espectrofotómetro Bruker 400 a 5.5 kHz. Los espectros de RMN de muestras en disolución se registraron en un espectrofotómetro Bruker AV-300 de 300 MHz, utilizando disolventes deuterados y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Los valores de desplazamiento químico  $\delta$  se indican en la escala de ppm y los valores de acoplamiento en Hz.

#### **9.1.10 Medidas de fluorescencia.**

La fluorescencia es una técnica espectroscópica muy sensible (límites de detección del orden de partes por billón) capaz de detectar especies transitorias de moléculas que pueden absorber radiación electromagnética. Es una técnica muy útil para elucidar el mecanismo de fotodegradación de fármacos. Ofrece la posibilidad de medir espectros de fluorescencia en estado estacionario y resuelto en el tiempo, dando información sobre la evolución del estado excitado de la molécula bajo estudio. Las especies transitorias que permite detectar son los estados excitados singlete.

Un espectrómetro de fluorescencia consta de una lámpara de excitación, que puede ser de Xenón o Mercurio, la cual genera un haz que atraviesa la muestra. Se puede seleccionar la longitud de onda de excitación gracias a la existencia de un monocromador. La muestra, tras ser excitada, emite luz en todas las direcciones, pero se registra la emisión perpendicular al haz de excitación, para evitar la monitorización de posibles interferencias derivadas de este haz. Finalmente, la señal llega a un fotomultiplicador, y de ahí se monitoriza a la pantalla del ordenador. Si se desea registrar espectros de excitación, también puede fijarse la longitud de onda de emisión, gracias a la existencia de un segundo monocromador de emisión.

Los espectros de fluorescencia de estado estacionario fueron registrados en un espectrofluorímetro JASCO FP-8500 cubetas Suprasil de cuarzo.

### **9.1.11. Fluorescencia de rayos X**

La fluorescencia de RAYOS X (FRX) es una técnica espectroscópica que utiliza la emisión secundaria o fluorescente de radiación X generada al excitar una muestra con una fuente de radiación X. La radiación X incidente expulsa electrones de capas interiores del átomo. Los electrones de capas más externas ocupan los lugares vacantes, y el exceso energético resultante de esta transición se disipa en forma de fotones, radiación X fluorescente, con una longitud de onda característica que depende del gradiente energético entre los orbitales electrónicos implicados, y una intensidad directamente relacionada con la concentración del elemento en la muestra.

La determinación del contenido de oro en las muestras del capítulo 8 se registró en un espectrómetro de rayos X Phillips MiniPal 25 fm.

### **9.1.12. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).**

Los espectros XPS fueron registrados con un espectrómetro SPECS equipado con un detector Phoibos 150 9MCD usando una fuente de rayos-X no monocromática (Al y Mg) trabajando a 200 W. Las muestras fueron comprimidas en un pequeño disco y evacuadas en el pre-compartimento del espectrómetro a  $10^{-9}$  mbar. Las relaciones de intensidad de los componentes fueron obtenidos del área de la señal correspondiente tras la substracción del fondo mediante un ajuste no lineal tipo Shirley y corregidos por la función de transmisión del espectrómetro. El software Casa fue utilizado en la cuantificación y tratamiento de los espectros.

### **9.1.13. Analisis termogravimétrico e isothermas de adsorción de N<sub>2</sub>.**

Los análisis termogravimétricos se llevaron a cabo en una termobalanza Netzsch – STA 409 EP y las isothermas de adsorción de N<sub>2</sub> se registraron a 77 K, en un analizador ASAP 2420 PTO6 Micrometrics.

#### **9.1.14. Conductimetría**

Los compuestos iónicos son sólidos de alto punto de fusión, que se disuelven en disolventes polares como el agua y que fundidos o disueltos conducen la corriente eléctrica. En los compuestos covalentes existe una gran dispersión en cuanto a estado físico, desde sólidos con alto punto de fusión como el diamante, hasta gases como el amoníaco o el metano; generalmente son solubles en disolventes apolares y ni en estado fundido, ni disuelto conducen la corriente eléctrica.

Las sustancias iónicas cuando se encuentran en disolución se disocian en iones (aniones y cationes), en cualquier caso, partículas cargadas y como tales susceptibles de conducir la corriente eléctrica. Las sustancias covalentes por el contrario cuando se disuelven no dan lugar a separación de cargas, por lo que no conducen la electricidad.

La conductimetría es una técnica instrumental que tiene como objeto determinar la *conductividad* de las disoluciones de las sustancias llamadas *electrolitos*, las cuales se caracterizan por ser conductoras de la electricidad y por presentarse en las mismas el fenómeno de la ionización.

Las medidas de conductividad se llevaron a cabo utilizando un conductímetro Crison 524 previamente calibrado mediante disoluciones acuosas de KCl.

#### **9.1.15. MALDI-MS y ESI-MS**

La Espectrometría de Masas es una técnica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas (algunos pmoles) de muestra y obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. En todos los casos, alguna forma de energía es transferida a las moléculas a analizar para producir la ionización.

El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ).

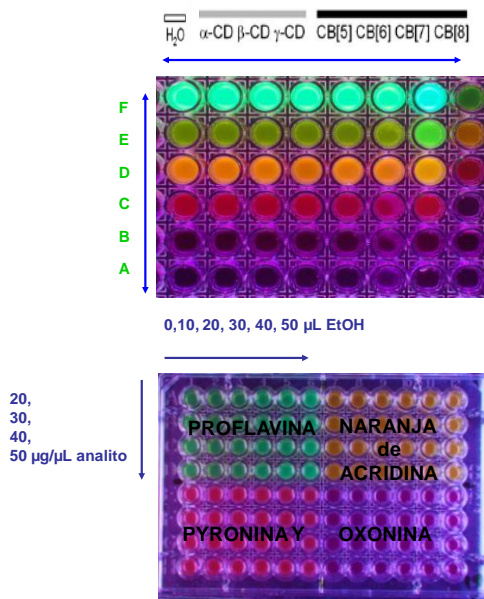
Los espectros de MALDI-TOF se registraron en un espectrómetro de masas RÈFLEX IV (Bruker Daltonics). Por otro lado, los espectros ESI-MS y MS-MS se registraron en un espectrómetro de masas Bruker Esquire 3000 plus LC-MS (Bruker Daltonik, Germany). Las intensidades relativas de los picos de interés fueron determinadas por el aparato.

## **9.2. Procedimientos experimentales generales**

### ***9.2.1. Preparación de las matrices de sensores***

Para desarrollar las matrices de sensores colorimétricos y fluorimétricos se utilizaron placas multipozo “Corning® 384 96 well plates” transparentes a la luz ultravioleta.

Para el caso de las SACs, por filas (A-F) se distribuyeron los colorantes (PF, AO, PYY, OX, TH, MB) y por columnas (1-12) se distribuyeron las cápsulas orgánicas (CBs y ciclodextrinas); la primera columna se relleno únicamente con agua para determinar el efecto que produce la ausencia de la cápsula orgánica. Cada uno de los pozos se relleno con 200  $\mu\text{L}$  de disolución de la capsula orgánica correspondiente  $10^{-4}$  M; a continuación se añadieron 70  $\mu\text{L}$  de una disolución del colorante correspondiente  $5 \cdot 10^{-4}$  M y 30  $\mu\text{L}$  de disolución de analito; en cada una de las placas se utilizaron diferentes concentraciones del analito objeto de estudio, en el rango  $10^{-6}$  a  $10^{-3}$  M.



**Esquema 9.1.** Esquema de preparación de las matrices de sensores para SACs y AAs.

Las matrices de sensores para la identificación de AAs, se prepararon de la siguiente forma: se utilizaron únicamente dos cápsulas orgánicas, CB[7] y CB[8], para cada una de las cuales se utilizó una placa; en esa misma placa se distribuyeron 4 colorantes fluorescentes: PF, AO, PYY y OX. Las cantidades y concentraciones tanto de las cápsulas como de los colorantes fueron las mismas que se emplearon en el caso de las SACs. En cada placa se distribuyó un analito, pero en esta ocasión se varió la concentración del mismo por filas (20, 30, 40 y 50 μg/μL), mientras que por columnas se varió la cantidad de co-solvente (0, 10, 20, 30, 40 y 50 μL) añadido para una mejor observación de los cambios en la emisión de los colorantes. Para una mejor comprensión en el Esquema 9.1 se muestra la composición de las matrices de sensores.

En el caso de las matrices de sensores para el GHB, sus precursores y compuestos con estructura similar la composición de las placas, en cuanto a cápsulas y colorantes utilizados, así como la concentración de los mismos fue análoga a la que se utilizó para los



aminoácidos, pero en este caso solo se utilizaron 2 colorantes por placa ya que el rango de concentraciones de analito fue más amplio (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) como puede observarse en la Figura 4.5.

Una vez preparada la matriz de sensores, se trasladó a una cámara oscura donde se tomaron fotos bajo iluminación con luz UV (330 nm) y con luz blanca (lámpara de vapor de mercurio de baja presión) antes y después de la adición de analito para observar sus diferencias.

### **9.2.2. Ensayos RMN-<sup>1</sup>H**

Los ensayos de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de la formación de complejos con CB[n] se llevaron a cabo preparando una disolución de la molécula huésped en D<sub>2</sub>O (1 mg/1 ml) a la que se adicionó un exceso (20 mg) del CB[n] correspondiente para asegurar la encapsulación completa del huésped. Tras sonicar 5 minutos se registraron los espectros de RMN-<sup>1</sup>H.

### **9.2.3. Conductimetría**

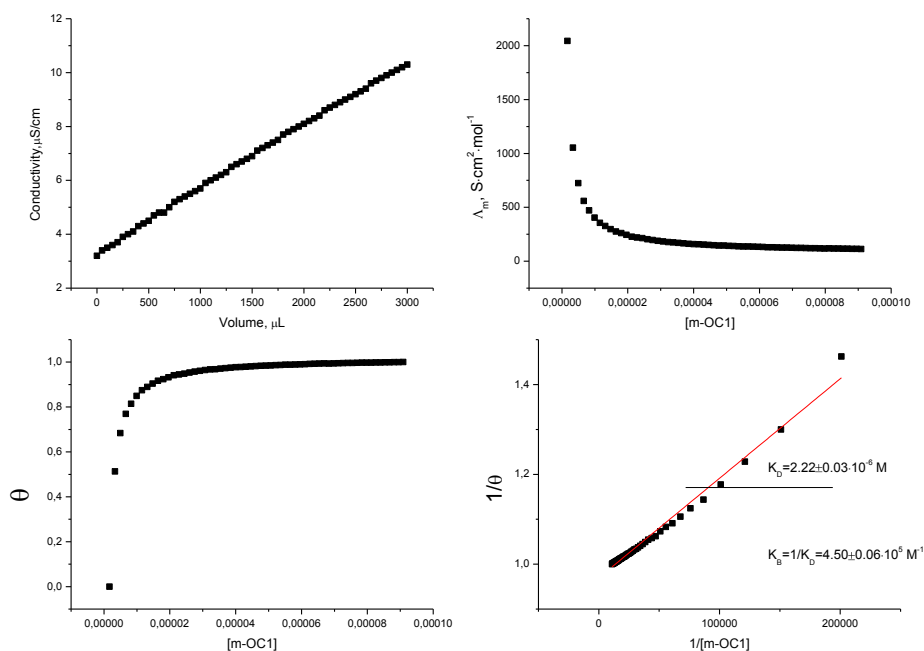
Las valoraciones por conductimetría para el cálculo de las constantes de asociación se llevaron a cabo mediante la adición de alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de compuesto huésped (100 veces más concentrada) a una disolución de hospedador, de manera que al terminar la valoración la concentración de huésped es 10 veces superior a la de hospedador. Después de la adición de cada una de las alícuotas, se estabilizó el sistema y se anotó la medida de conductividad. Para el cálculo de las constantes de asociación se tomaron las medidas de conductividad ( $\Lambda$ ) obtenidas en la valoración y se transformaron en conductividad molar ( $\Lambda\text{m}$ ) utilizando la ecuación (1). Con esta curva se obtuvieron los valores de conductividad molar a dilución infinita ( $\Lambda\text{m}_\infty$ ) y conductividad molar inicial ( $\Lambda\text{m}_0$ ), y aplicando la ecuación (2) se calculó el grado de saturación del sistema. De la pendiente de

la recta obtenida al representar  $1/\theta$  vs  $1/[\text{huésped}]$  se obtuvo la constante de disociación, cuya inversa corresponde con la constante de asociación.

$$\Lambda_m = \frac{\Lambda \cdot 1000}{[IL]} \quad \text{Equation (1)}$$

$$\theta = \frac{\Lambda m - \Lambda m_0}{\Lambda m_\infty - \Lambda m_0} \quad \text{Equation (2)}$$

Para una mejor comprensión en la figura se muestran las gráficas correspondientes al cálculo de la constante de asociación para uno de los compuestos huésped utilizados en la presente tesis con CB[n].



**Figura 9.1.** Gráficas asociados al cálculo de la constante de asociación con CB[n] por conductimetría.

#### 9.2.4. Diálisis

La etapa de diálisis se llevó a cabo introduciendo la disolución que contenía los liposomas obtenidos por polimerización del complejo líquido iónico@CB[n] (5 ml de disolución  $10^{-4}$  M en CB[n]) en una membrana tubular de diálisis (“Sigma-Aldrich benzoylated dialysis tubing”, con un tamaño de poro de 32 mm). La membrana de diálisis se lavó antes de su uso agitándola en agua milliQ durante 24 horas. La membrana tubular con la disolución que contenía los liposomas polimerizados se introdujo en 500 ml de agua milliQ. El sistema se mantuvo en agitación magnética 96 horas, cambiando el agua milliQ cada 24 horas.

#### 9.2.5. Valoraciones UV-Vis

Las valoraciones por espectroscopia UV-Vis se llevaron a cabo para la determinación de la presencia de CB[8] así como su cuantificación en disoluciones problema.

La valoración de CB[8] en las disoluciones de liposomas del capítulo 7, antes y después de la diálisis, se realizó según el siguiente procedimiento: se tomaron 3 ml de una disolución del colorante AO  $10^{-6}$  M. Esta disolución se valoró mediante la adición de alícuotas de 30  $\mu$ L de disoluciones de liposomas conteniendo CB[8], en una concentración que como máximo podría ser  $10^{-4}$  M (concentración de CB[8] utilizada en la preparación de los liposomas). Para cada una de las alícuotas adicionadas se registró el espectro de absorción del colorante.

Las valoraciones por espectroscopia UV-visible correspondientes al capítulo 5 para la determinación de CB[8] se llevaron a cabo de manera similar pero en esta ocasión, para la cuantificación del CB[8] se realizó una curva de calibrado previa. Para ello se prepararon disoluciones de CB[8] de diferentes concentraciones cubriendo el rango entre 0 y  $10^{-5}$  M; a 3 ml de cada una de estas disoluciones se añadieron 300  $\mu$ L de una disolución de AO  $10^{-4}$  M.

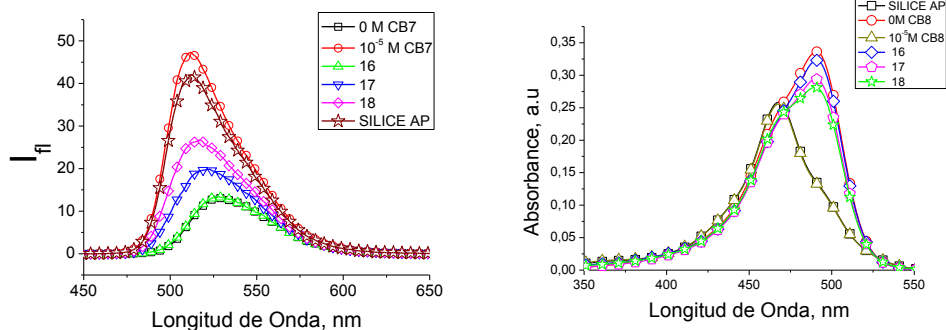
Seguidamente se registró el espectro absorción. Una vez obtenida la curva de calibrado, se procedió de manera similar con las disoluciones problema: se tomaron 3 ml de las mismas y sobre estas se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de la disolución de AO y a continuación se registró el espectro de absorción de la disolución con el colorante.

### **9.2.6. Valoraciones por fluorescencia**

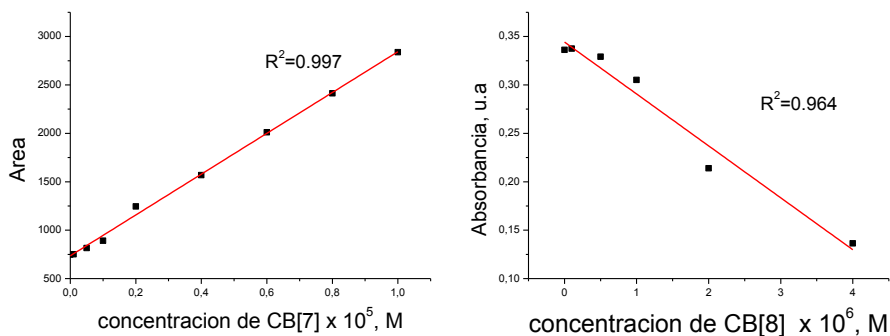
Las valoraciones por espectroscopia de fluorescencia se llevaron a cabo de manera análoga a las valoraciones por espectroscopia UV-visible, pero en esta ocasión, la capsula orgánica a analizar fue el CB[7].

La determinación de la presencia de CB[7] en las disoluciones de liposomas del capítulo 7, antes y después de la etapa de diálisis, se llevó a cabo valorando 3 ml de una disolución de AO  $10^{-6}$  M mediante la adición de alícuotas de 30  $\mu\text{L}$  de disoluciones de liposomas conteniendo CB[7], en una concentración que como máximo podría ser  $10^{-4}$  M (concentración de CB[7] utilizada en la preparación de los liposomas). Para cada una de las alícuotas adicionadas se registró el espectro de emisión de fluorescencia del colorante.

En las valoraciones del capítulo 5 se procedió exactamente igual que en el caso de las valoraciones mediante espectroscopia UV-visible: previamente se realizó una curva de calibrado para lo cual se prepararon disoluciones de CB[7] de diferentes concentraciones cubriendo el rango entre 0 y  $10^{-5}$  M; seguidamente se tomaron 3 ml de cada una de estas disoluciones, se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de una disolución de AO  $10^{-4}$  M y se registró el espectro de emisión de fluorescencia. Una vez obtenida la curva de calibrado, se procedió de manera similar con las disoluciones problema: se tomaron 3 ml de las mismas y sobre estas se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de la disolución de AO y a continuación se registró el espectro de emisión de fluorescencia de la disolución con el colorante.



**Figura 9.2.** Espectros de emisión,  $\lambda = 427$  nm (izquierda) y absorción (derecha) de los sobrenadantes de los sólidos **16-18** después del contacto con disoluciones de CB[7] y CB[8] y la adición del colorante AO. También se muestran los espectros correspondientes a disoluciones sin CB[n] o conteniendo CB[n]  $10^{-5}$  M.



**Figura 9.3.** Curvas de calibrado obtenidas de la valoración por fluorescencia (izquierda) y de la valoración por UV-visible (derecha).

### 9.2.7. Adsorción de CB[n] sobre sílice

Los ensayos de adsorción de CB[n] se llevaron a cabo poniendo en contacto una disolución del CB[n] correspondiente con los sólidos 16, 17 y 18 así como con la sílice comercial sin

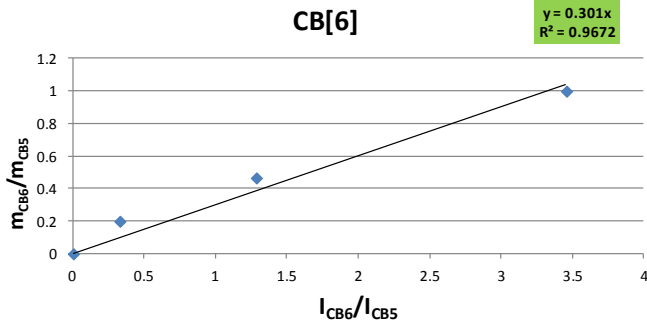
funcionalizar. Las concentraciones de las disoluciones de CB[n] fueron  $10^{-5}$  M para CB[6] y  $10^{-4}$  M para CB[7] y CB[8]. Las suspensiones se mantuvieron bajo agitación magnética durante 12 horas. El sólido fue recuperado mediante centrifugación de la suspensión a 9000 rpm durante 15 minutos.

### 9.2.8. Ensayos MALDI-MS

Los análisis por MALDI-MS se utilizaron en la cuantificación de CB[6]. En primer lugar se prepararon 3 patrones que posteriormente se emplearon en la determinación del factor de respuesta de este CB[n]. Cada uno de los patrones contenían una cantidad fija de CB[5], utilizado como patrón interno (3 mg) y cantidades variables de CB[6] (3, 1.5 y 0.6 mg). Se registró el espectro de los mismos por MALDI-TOF; representando la relación entre la intensidad de los picos correspondientes a la masa de CB[5] (831 u.a.m) y a la masa de CB[6] + H<sub>2</sub>O (1014 u.a.m), para cada uno de los patrones frente a la relación entre la masa de CB[5] y CB[6] en los patrones se obtuvo una recta cuya pendiente corresponde al factor de respuesta.

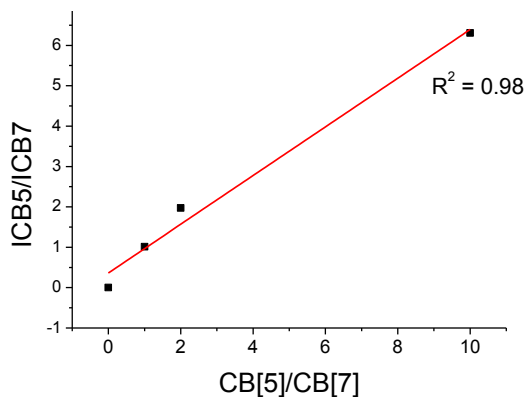
$$\frac{I_{CB[5]}}{I_{CB[n]}} = f_R \cdot \frac{m_{CB[5]}}{m_{CB[n]}} \quad (3)$$

A continuación se tomaron los sobrenadantes correspondientes a los ensayos de adsorción de CB[6], se les añadió una cantidad conocida de patrón CB[5] (3 mg) y se registraron los espectros MALDI-TOF. Aplicando la ecuación (3) se obtuvo la cantidad de CB[6] residual en disolución.



**Figura 9.4.** Representación lineal de la que se obtuvo el factor de respuesta,  $f_R$ .

Los ensayos llevados a cabo para determinar la contribución relativa de la formación de complejos huésped-hospedador frente a interacciones inespecíficas entre la superficie de la sílice y el CB[n] se realizaron de manera similar. Los patrones se prepararon variando la relación molar entre CB[5] y CB[7] de la siguiente manera: 1:1, 1:0.5, 1:0.1 para CB[5]:CB[7]. A continuación se registró el espectro de MALDI-TOF para los mismos y mediante el uso la relación molar y de la relación entre las intensidades de los picos correspondientes a las masas de CB[5] y CB[7] (1162 u.a.m) se construyó una recta de calibrado que posteriormente se utilizó para determinar la relación molar entre CB[5] y CB[7] en las muestras problema.



**Figura 9.5.** Representación lineal de la que se obtiene la razón molar entre CB[5] y CB[7].

Las muestras problema fueron los sobrenadantes de los ensayos de adsorción correspondientes a los sólidos **16** y **18** puestos en contacto con una disolución equimolar de CB[5] y CB[7]. Después de separar el sólido por centrifugación, se registraron los espectros MALDI-TOF de los sobrenadantes. Utilizando la relación entre las intensidades de los picos correspondientes a la masa de CB[7] y CB[5] en la recta de calibrado se obtuvo la relación molar de los mismos.

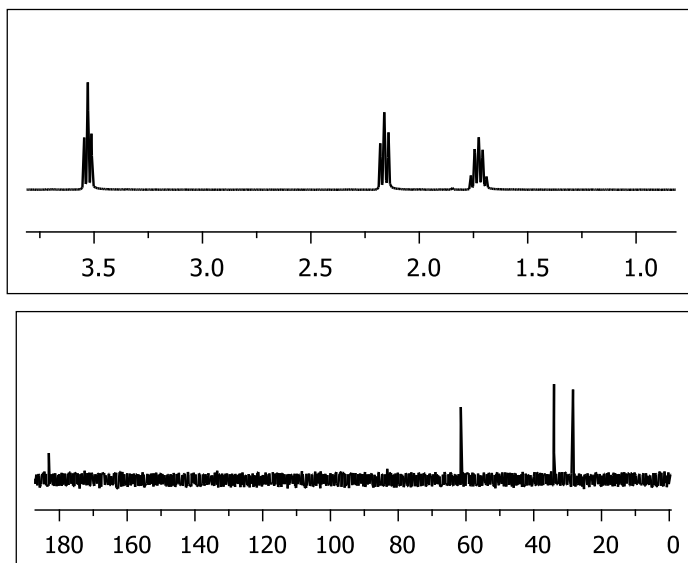
### 9.3. Síntesis y procedimientos para la preparación de materiales funcionales

#### 9.3.1. Síntesis del GHB (1).

A una disolución de NaOH (4.64 g) en etanol absoluto (14 ml) se le añaden lentamente 8.68 ml de  $\gamma$ -butirolactona, GBL (**3**). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y a 40 °C durante 30 minutos más. A continuación se enfrió la disolución a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó a vacío. El compuesto (**1**) se obtuvo como un polvo blanco y se secó a vacío durante 3h.

**RMN-<sup>1</sup>H**: (400 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$ (ppm): 3.53 (t,  $J_1 = 6.72$ ,  $J_2 = 6.71$ , 2H), 2.16 (t,  $J_1 = 7.929$ ,  $J_2 = 7.457$ , 2H), 1.73 (m, 2H)

**RMN-<sup>13</sup>C**: (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$ (ppm): 182.79, 61.53, 34.01, 28.36





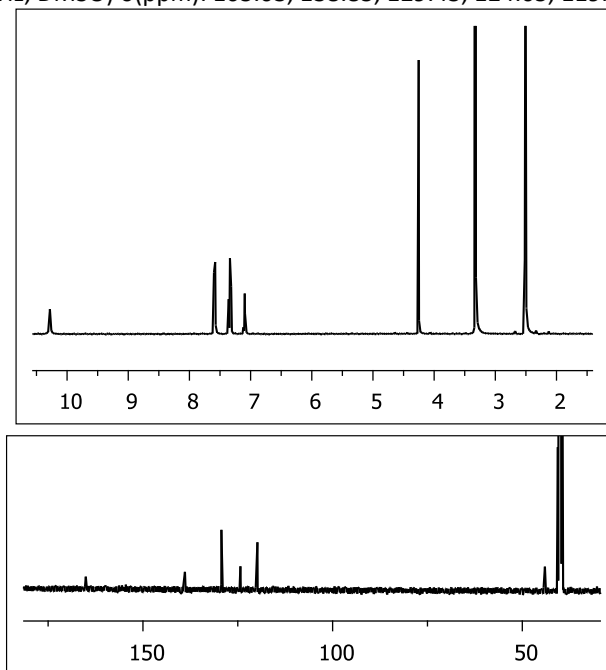
**Figura 9.6.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (arriba) y espectro de RMN-<sup>13</sup>C (abajo) del  $\gamma$ -hidroxibutirato sódico, GHB (1).

### 9.3.2. Síntesis de la cloroacetamida de la anilina (8)

223  $\mu$ L (0.23 g, 2.5 mmol) de anilina (4) se agitaron en acetonitrilo, bajo atmosfera de nitrógeno y 214  $\mu$ L (0.3 g, 2.7 mmol) de cloruro de cloroacetilo (7) se añadieron a la disolución que se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se re-disolvió en diclorometano. El residuo se lavo una vez con agua ácida (pH = 2-3). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y el diclorometano se eliminó a vacío. El compuesto 8 se obtuvo como un polvo blanco (0.3 g, 55 %).

**RMN-<sup>1</sup>H:** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$ (ppm): 10.28 (s, 1H), 7.58 (d,  $J_1 = 8.222$ , 2H), 7.32 (t,  $J_1 = 7.37$  Hz y  $J_2 = 14.71$  Hz 2H), 7.08 (t,  $J_1 = 7.185$  Hz y  $J_2 = 7.986$  Hz 2H), 4.25 (s, 2H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (101 MHz, DMSO)  $\delta$ (ppm): 165.03, 138.85, 129.43, 124.05, 119.97, 43.95.



**Figura 9.7.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (arriba) y espectro de RMN-<sup>13</sup>C (abajo) del compuesto (8).

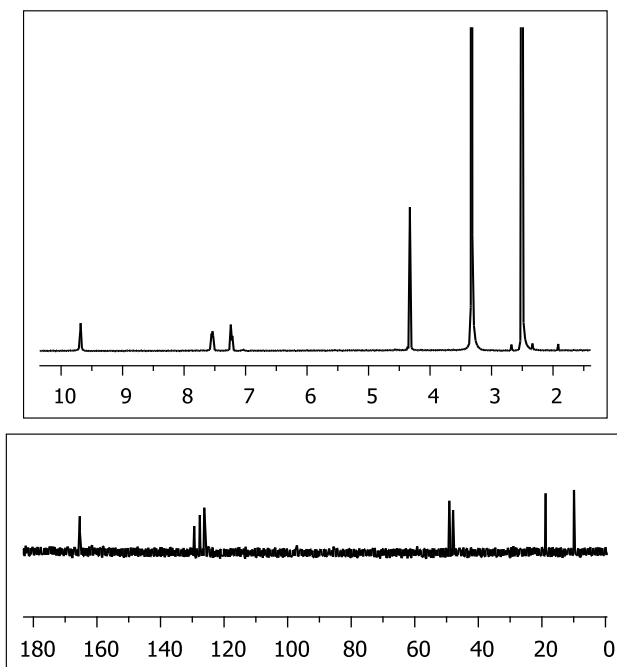
**9.3.3. Síntesis de las bis(2-cloroacetamidas) de la orto- y para-fenilendiamina (9) y (10)**

2.09 g de cloruro de cloracetilo (**7**) (18.5 mmol) se añadieron gota a gota a una disolución de la correspondiente orto- o para-fenilendiamina (**5**) y (**6**) (1 g, 9.25 mmol) en acetonitrilo (50 ml). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 24 h, bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación se enfrió la mezcla y se recuperó el sólido precipitado (compuestos **9** y **10**) mediante filtración y posterior secado al aire.

Compuesto **9**

**RMN-<sup>1</sup>H**: (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ(ppm): 9.68 (s, 2H), 7.554-7.530 (m, 2H), 7.242-7.218 (m, 2H), 4.33 (s, 4H).

**RMN-<sup>13</sup>C**: (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ(ppm): 165.09, 130.19, 125.49, 124.87, 30.10.

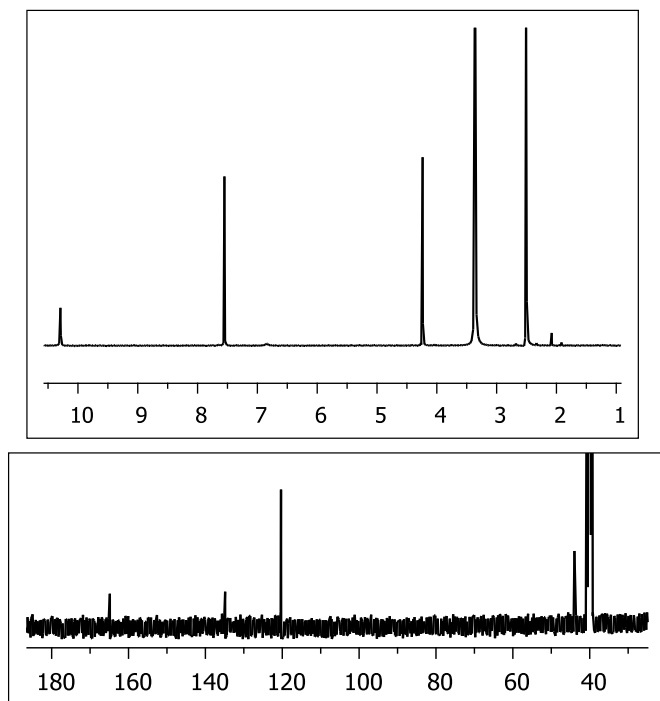


**Figura 9.8.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (arriba) y espectro de RMN-<sup>13</sup>C (abajo) del compuesto (**9**).

Compuesto **10**

**RMN-<sup>1</sup>H**: (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ(ppm): 10.46 (s, 2H), 7.55 (s, 4H), 4.24 (s, 4H)

**RMN-<sup>13</sup>C**: (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ(ppm): 146.73, 134.79, 120, 43.92



**Figura 9.9.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (arriba) y espectro de RMN-<sup>13</sup>C (abajo) del compuesto (10).

#### 9.3.4. Síntesis de *N*-fenil-2-(propilamino)acetamida (12)

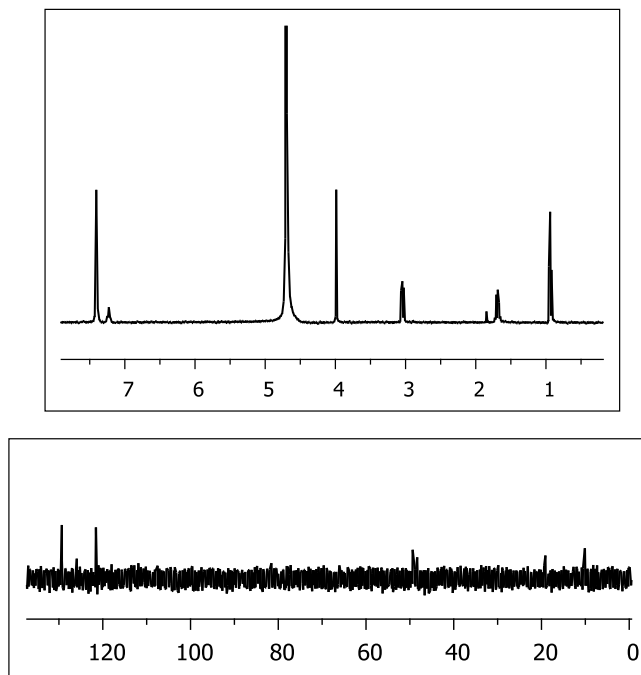
0.1 g de la cloroacetamida de la anilina (8) se pusieron en contacto con 1 ml de propilamina (11) durante 4 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez transcurridas las 4 h, se añadieron 10 ml de diclorometano, se disolvió la mezcla y a continuación se evaporó el disolvente. El residuo se lavó con agua ácida y se secó a vacío. El sólido residual (12) se suspendió en diclorometano y a continuación se filtró y se secó al aire.

**RMN-<sup>1</sup>H:** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 7.45 – 7.29 (m, 4H), 7.29 – 6.96 (m, 1H), 3.99 (s, 2H), 3.10 – 2.99 (m, 2H), 1.70 (dq, *J* = 15.2, 7.5 Hz, 2H), 0.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 129.41, 125.63, 120.90, 48.96, 47.76, 18.71, 10.21.

**Análisis Elemental (%):** teórico: C 57.76 %, H 7.49 %, N 12.25 %; calculado: C 56.99 %, H 7.78 %, N 12.09 %.

**MS-ESI (m/z):** 193.1 ( $[M+H]^+$ ).



**Figura 9.10.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (arriba) y espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (abajo) del compuesto (12).

### 9.3.5. Síntesis de bis-2-(propilamino)acetamida de la orto-fenilendiamina (13)

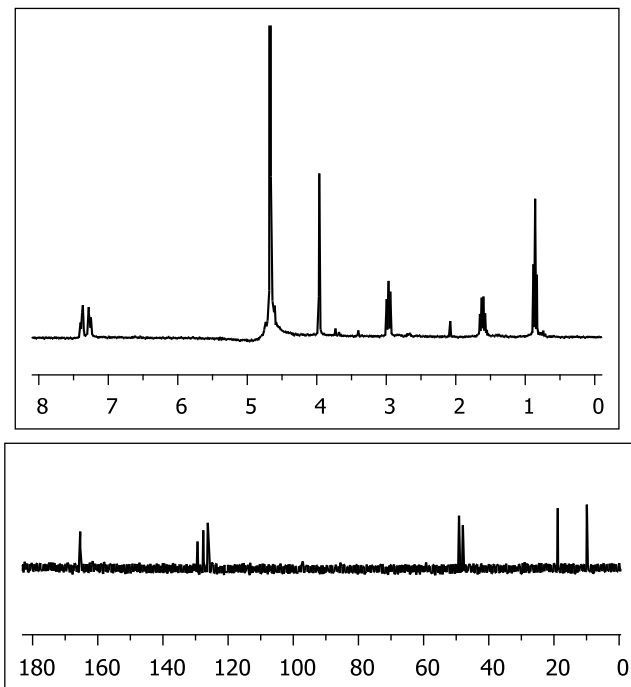
0.118 g de propilamina (11) (2 mmol) se añadieron a una disolución de N,N'-bis(chloroacetil) o-fenilendiamina (9) (0.25 g, 1 mmol) en acetonitrilo y la mezcla se agitó a 80 °C durante 24 h, bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se recuperó mediante filtración y secado al aire un sólido blanco correspondiente al compuesto 13 (0.174 g, 57 %).

**RMN- $^1\text{H}$ :** ( $\delta$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 7.41-7.394 (m, 2H), 7.295-7.262 (m, 2H), 3.966 (s, 4H), 2.973 (t,  $J_1=7.5$  Hz y  $J_2=15,3$  Hz, 4H), 1.702-1.585 (m, 4H), 0.871 (t,  $J_1=6.9$  Hz and  $J_2=14.7$  Hz, 6H).

**RMN- $^{13}\text{C}$ :** ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 165.397, 129.398, 127.63, 126.242, 49.138, 47.954, 18.83, 9.899

**Análisis Elemental (%):** teórico: C 50.67 %, H 7.45 %, N 14.80 %; calculado: C 51.8 %, H 8.0 %, N 15.1 %.

MS-ESI (m/z): 307.1 ( $[M+H]^+$ ).



**Figura 9.11.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (arriba) y espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (abajo) del compuesto (**13**).

### 9.3.6. Síntesis de bis-2-(propilamino)acetamida de la para-fenilendiamina (**14**)

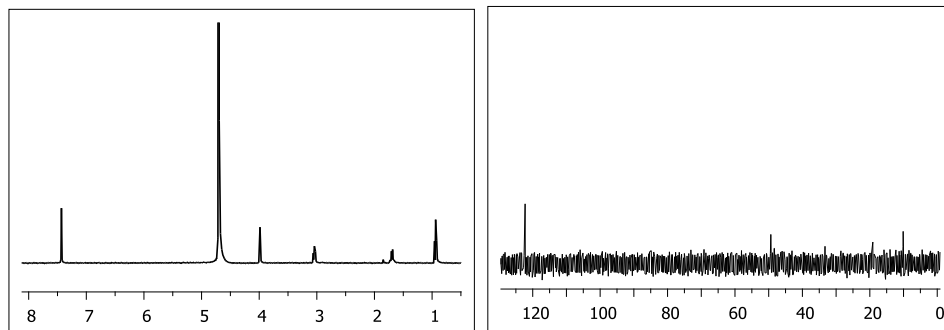
N,N'-bis(chloroacetyl) p-phenyldiamine (**10**) (0.1 g, 0.4 mmol) se puso en contacto con propilamina (**11**) (1.39 g, 0.024 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 4 h bajo atmosfera de nitrógeno. A continuación se añadió a la mezcla de reacción 15 ml de diclorometano, se disolvió el crudo de reacción y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se lavó con agua ácida (pH 2 – 3) y se secó a vacío. El sólido residual se decantó en una mezcla metanol/diclorometano (25:75), se filtró y se secó al aire para dar lugar al producto deseado (**14**).

**RMN- $^1\text{H}$ :** (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ (ppm): 7.43 (s, 4H), 3.99 (s, 4H), 3.04 (t,  $J = 7.6$  Hz, 4H), 1.69 (dd,  $J = 15.0, 7.2$  Hz, 4H), 0.94 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (101 MHz, D<sub>2</sub>O), δ(ppm):122.26, 49.28, 33.29, 19.10, 9.76.

**Análisis Elemental (%):** teórico: C 50.66 %, H 7.4 5%, N 14.77 %; calculado: C 50.26 %, H 7.62 %, N 14.67 %.

**MS-ESI (m/z):** 307.1 ([M+H]<sup>+</sup>).



**Figura 9.12.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (izquierda) y espectro de RMN-<sup>13</sup>C (derecha) del compuesto (**14**).

### 9.3.7. Funcionalización de la aminopropil sílice comercial (sólidos **16**, **17** y **18**)

La sílice aminopropil comercial se secó a 100 °C en la estufa durante 1 noche antes de proceder a su funcionalización. A continuación se suspendió en acetonitrilo (30 ml) y se calentó a 80 °C. La cloroacetamida correspondiente se disolvió en 50 ml de acetonitrilo (en los casos de la orto- y para-cloroacetamida se necesitó calentar a 80 °C para su disolución) y se añadió a la suspensión de la sílice comercial. La mezcla se mantuvo a reflujo durante 48 h. Inmediatamente se filtró la suspensión y se secó el sólido al aire.

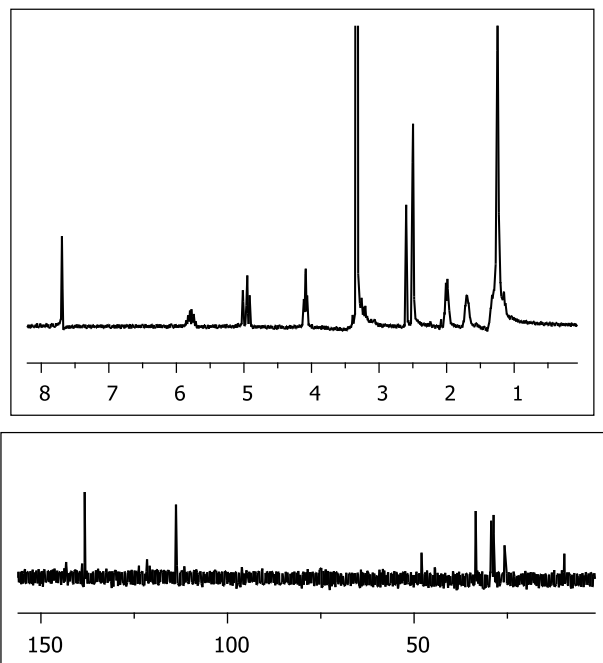
### 9.3.8. Síntesis de *N,N*-bis(10-undecenil)-2-metilimidazolio (**21**)

Trietilamina (1.2 equivalentes, 7.3 mmol, 0.738 g, 1.017 ml) y 11-bromo-1-undeceno (**20**) (2 equivalentes, 12.2 mmol, 2.84 g, 2.66 ml) se añadieron a una disolución de 2-metilimidazol (**19**) (6.1 mmol, 0.5 g) en tolueno (50 ml). La mezcla se agitó a 90 °C durante 48 h y transcurrido este tiempo se enfrió y se filtró para eliminar la sal de amonio formada durante la reacción. A continuación el disolvente se eliminó a vacío y el aceite resultante se lavó varias veces con hexano hasta que se obtuvo el líquido iónico **21** como un polvo amarillento (0.282 g, 56.5 %).

**RMN-<sup>1</sup>H:** (300 MHz, DMSO):  $\delta$ =7.733 (s, 2H), 5.877–5.716 (m, 2H), 5.024–4.878 (dd,  $J_1$ =5.017,  $J_2$ =4.952, 4H), 4.156–4.039 (t,  $J_1$ =4.138,  $J_2$ = 4.114,  $J_3$ =4.090 Hz, 4 H), 2.624 (s, 3 H), 2.069–1.952 (m, 4H), 1.775–1.658 (m, 4H), 1.363–1.128 ppm (m, 24H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$ =138.284, 121.575, 113.82, 48.007, 33.498, 29.34, 28.968, 28.695, 25.758, 9.732 ppm.

**Análisis Elemental (%):** teórico C 64.0, H 10.40, N 6.15; experimental: C 63.1, H 10.35, N 6.29.



**Figura 9.13.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (arriba) y espectro de RMN-<sup>13</sup>C (abajo) del compuesto (21).

### 9.3.9. Síntesis de *N,N*'-bis(10-undecenil)-imidazolío (26)

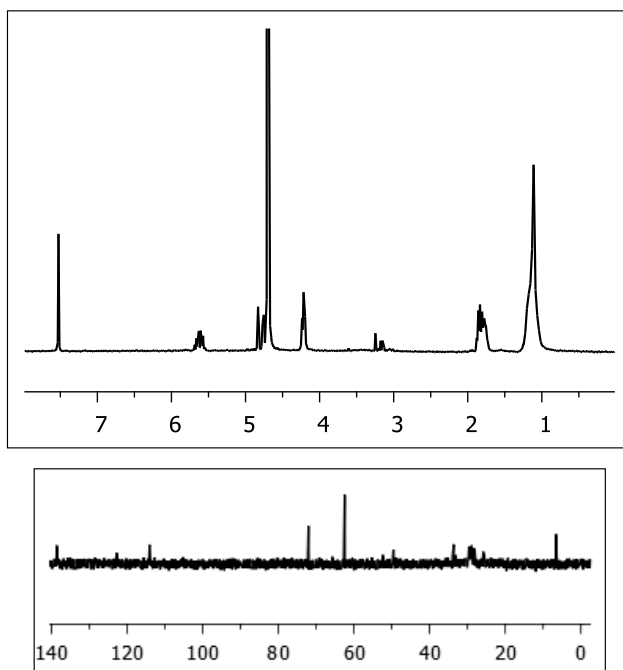
El líquido iónico *N,N*'-bis(10-undecenil)-imidazolío (26) se sintetizó de manera análoga al líquido iónico 21 pero en lugar del 2-metilimidazol (19) se partió del metilimidazol (25) llevando a cabo la reacción en tolueno, a reflujo durante 48 h y utilizando trietilamina como

base. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se enfrió y se filtró para eliminar la sal de amonio formada durante el transcurso de la misma. Después de eliminar el disolvente a vacío, el residuo se lavó con hexanos y se obtuvo el compuesto **26** como un líquido viscoso (63 %).

**RMN-<sup>1</sup>H:** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 7.54 (s, 3H), 5.71–5.57 (m, 2H), 4.84–4.79 (dd,  $J_1=6$ ,  $J_2=6.3$ , Hz, 4H), 4.23–4.03 (t,  $J_1=10.2$ ,  $J_2=10.5$ , Hz, 4 H), 1.88–1.77 (m, 8H), 1.13 (m, 24H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 138.58, 122.69, 114.37, 72.05, 62.48, 49.25, 33.76, 29.71, 29.69, 29.67, 29.65, 29.62, 29.61, 29.01, 6.37 ppm.

**Análisis Elemental (%):** teórico C 66.2, H 10.0, N 6.18; experimental: C 61.7, H 12.97, N 5.75.



**Figura 9.14.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (arriba) y espectro de RMN-<sup>13</sup>C (abajo) del compuesto (**26**).

### 9.3.10. Procedimiento general para la polimerización térmica de liposomas

La polimerización térmica en ausencia de oro de los liposomas a partir del líquido iónico N,N'-bis(10-undecenil)-2-metilimidazolio (**21**) se llevó a cabo disolviendo 77.5 mg (0.2



mmol) del mismo en 50 ml de agua milliQ. La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 1 h bajo atmósfera de nitrógeno para permitir la auto-organización del monómero. A continuación se añadió una cantidad catalítica de persulfato potásico (30 mg) y se agitó la disolución durante 24 h a tres temperaturas diferentes: 40 °C, 60 °C y 100 °C. Bajo estas condiciones, la polimerización se siguió por RMN-<sup>1</sup>H, ya que las señales correspondientes al doble enlace van desapareciendo a medida que transcurre la polimerización. Una vez pasadas las 24 horas, se enfrió la disolución a temperatura ambiente y se centrifugó a 9000 rpm durante 30 minutos. Después de eliminar el sobrenadante y una etapa de liofilización, se obtuvo un sólido blanco (65, 68 y 72 % de rendimiento para la polimerización a 40 °C, 60 °C y 100 °C respectivamente).

La polimerización que incorporaba AuNPs dentro de las esferas poliméricas se llevó a cabo disolviendo 77.5 mg (0.2 mmol) del líquido iónico N,N'-bis(10-undecenil)-2-metilimidazolio (**21**) en 40 ml de agua y agitando durante 1 h bajo atmósfera de nitrógeno esta disolución para facilitar la auto-organización del monómero. Por otra parte, 0.016 g (0.04 mmol) de HAuCl<sub>4</sub> se disolvieron en agua milliQ y se añadieron a la disolución y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos más. A continuación se añadió una cantidad catalítica de persulfato potásico (30 mg) y 70 mg de ácido ascórbico como agente reductor para la formación de las AuNPs. La mezcla se agitó a 40 °C durante 24 h. A continuación, la disolución se centrifugó y tras eliminar el sobrenadante se liofilizó para dar lugar a las esferas poliméricas (0.0332 g, 53.5 %).

### **9.3.11. Procedimiento general para la polimerización fotoquímica de liposomas**

La polimerización fotoquímica se llevó a cabo irradiando las muestras con luz UV a través de un tubo transparente de cuarzo bajo atmósfera de nitrógeno. El líquido iónico N,N'-bis(10-undecenil)-2-metilimidazolio (**21**) (0.16 mmol, 0.062 g) se disolvió en 15 ml de agua y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente para favorecer la auto-organización de este monómero en agua. A continuación se añadió a la disolución HAuCl<sub>4</sub> (0.016 mmol, 0.008 g) disuelto en agua (5 ml) y se agitó la mezcla durante 30 minutos más. Una vez transcurrido este tiempo se adicionó 2-hidroxi-4'-(2-hidroetoxi)-2-metilpropiofenona (**22**) (0.32 mmol,

0.066 g) disuelto en 20 ml de agua. La disolución se irradió durante 12 h y el proceso de polimerización se monitorizó mediante RMN-<sup>1</sup>H hasta que las señales correspondientes al doble enlace C = C desaparecieron. Una vez se terminó de irradiar la disolución se lavo con diclorometano (3 x 40 ml) y la fase acuosa se redujo mediante evaporación a vacío hasta 10 ml aproximadamente. La disolución residual se liofilizó y se obtuvo un polvo que presentaba el color característico de las nanopartículas de oro (0.035 g, 45.2 %). Siguiendo el mismo procedimiento se prepararon dos muestras análogas en las que la concentración de líquido iónico (**21**) y de 2-hidroxi-4'-(2-hidroetoxi)-2-metilpropiofenona (**22**) se mantuvieron constantes mientras que la proporción entre líquido iónico **21**<sup>+</sup> y AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> se varió como se indica a continuación: 0.016:0.032, 0.016:0.064.

En el caso de la síntesis de liposomas sin AuNPs, se procedió de manera análoga pero sin la etapa de incorporación de HAuCl<sub>4</sub>.

### **9.3.12. Polimerización de los complejos entre los líquidos iónicos 21 y 26 y CB[7] y CB[8].**

Antes de llevar a cabo la polimerización de los complejos entre los líquidos iónicos **21** y **26** con CB[7] y CB[8], se prepararon los sistemas hospedador-huésped, mediante la disolución en 50 ml de agua milliQ de 77.5 mg (0.2 mmol) y 74.8 mg (0.2 mmol) de los líquidos iónicos **21** y **26** respectivamente. A continuación se añadieron 0.025 mmol de CB[7] y CB[8] y cada disolución se agitó a 40 °C durante 92 h bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez transcurrido este tiempo se añadió una cantidad catalítica de persulfato potásico (30 mg) y se agitó la disolución a 40 °C 24 h más.

### **9.3.13. Síntesis del fotocatalizador de TiO<sub>2</sub> (28) Au/TiO<sub>2</sub> (29) usando alginato como agente plantilla**

Para la síntesis de los fotocatalizadores usando alginato como agente plantilla se disolvió 1 g de alginato (**27**) en 100 ml de agua milliQ. En el caso de los materiales que incorporaban oro, este se incorporó como HAuCl<sub>4</sub> (8 mg, 4 mg, 2 mg, 1 mg y 0.5 mg) al agua milliQ antes de añadir el alginato (**27**). A continuación, la disolución de alginato (**27**) conteniendo o no oro, se precipitó gota a gota, sobre 100 ml de una disolución 0.32 M de TiO(SO<sub>4</sub>). Las esferas de hidrogel obtenidas se agitaron magnéticamente durante 2 h. A continuación se

procedió a la deshidratación de las mismas mediante lavados de 30 minutos con mezclas etanol/agua en las que se disminuía el contenido en agua a medida que se aumentaba el contenido en etanol. La composición de estas mezclas H<sub>2</sub>O/EtOH fue la siguiente: 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 10/90 y 0/100. Las esferas de alcogel se secaron con CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas antes de la última etapa de calcinación a 450 °C.



## CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos propuestos y a la vista de los resultados obtenidos se pueden llegar a las siguientes conclusiones:

1. La formación de complejos entre colorantes tricíclicos fluorescentes y CBs sirve para desarrollar una matriz de sensores donde el análisis de la respuesta conjunta de toda la matriz sirve para identificar y determinar la concentración en un rango  $\mu\text{M}$  de sales de amonio cuaternario y aminoácidos disueltos en agua. Además es posible diferenciar los aminoácidos de los ácidos carboxílicos y aminas estructuralmente relacionadas.
2. Se ha desarrollado una matriz de sensores que permite la detección y cuantificación del  $\gamma$ -hidroxibutirato en disoluciones acuosas siendo la característica principal de este sensor la presencia de un co-solvente. Se ha racionalizado este hecho considerando que la asociación entre el GHB aniónico y el colorante tricíclico positivo asociado al CB[n] se ve desfavorecida en agua debido a su alta capacidad de solvatación, haciendo posible la presencia de un co-solvente, la asociación entre analito y sensor que eventualmente conducen al fenómeno de detección.
3. Se han establecido las constantes de asociación de CBs con anilidas con estructura de  $\alpha$ -amino acetanilida. El anclaje sobre un sólido silíceo insoluble de análogos con estructura de acetanilida similar permite la transferencia de CBs de la disolución acuosa al sólido, siendo más eficiente el proceso cuando la constante de formación del complejo es más elevada.
4. Los líquidos iónicos con estructura de imidazolio simétricamente sustituidos por grupos  $\omega$ -alquenilo sufren un proceso de auto-ensamblaje para dar lugar a liposomas y vesículas donde una membrana encierra un vacío en su interior. La polimerización de los grupos vinilo terminales hace posible mantener la morfología de estos liposomas. El uso de  $\text{AuCl}_4^-$  ha hecho posible la preparación de AuNPs en

el interior de estas vesículas, siendo este sistema moderadamente activo como catalizador para promover la oxidación aeróbica de alcohol bencílico.

5. Los líquidos iónicos con estructura de imidazolio simétricamente sustituidos por grupos  $\omega$ -alquenílicos forman complejos con CB[7] y CB[8] siendo la fuerza termodinámica impulsora de los mismos la hidrofobicidad de las cadenas alquenílicas que tienden a acomodarse en el interior de las cápsulas de CB[n]. Esta interacción hidrofóbica se ve modificada en el proceso de auto-ensamblaje que es responsable de la destrucción del complejo de los líquidos iónicos con el CB[7]. En el caso del CB[8] estos complejos de inclusión no se ven totalmente destruidos durante la formación de los liposomas.
6. Se ha preparado un óxido de titanio nanoparticulado que muestra actividad fotocatalítica para la generación de hidrógeno a partir del agua mediante iluminación con luz solar. Este óxido de titanio se obtiene por calcinación de un material precursor en el que se produce la complejación del catión titanilo con los restos aniónicos de los ácidos manurónico y glucurónico presentes en el alginato.

## RESUMEN

El auto-ensamblaje donde debido a la interacción con el disolvente moléculas de un compuesto anfifílico se asocian espontáneamente es un proceso general que puede servir para la preparación de entidades supramoleculares de gran tamaño con aplicación en la preparación de materiales tanto dispersos en fase líquida como sólidos insolubles. Por otra parte la asociación supramolecular puede ocurrir también entre moléculas diferentes y cuando una de ellas es una cápsula molecular esta puede albergar en su interior una molécula de tamaño inferior al de su abertura.

Los CB[n] son oligómeros cíclicos de unidades de glicol uril unidas por puentes metileno que definen una cavidad en forma de calabaza hueca que permite alojar en su interior moléculas de colorantes fluorescentes (Capítulos 3 y 4). En la presente tesis doctoral se ha desarrollado una matriz de sensores para sales de amonio cuaternarias (Capítulo 3),  $\alpha$ -aminoácidos (Capítulo 3) y ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico (Capítulo 4) que es capaz de identificar el compuesto orgánico, determinar su estructura y cuantificar su cantidad en un rango de concentraciones basándose en los cambios en la imagen de estas matrices de sensores cuando son iluminadas con luz visible o ultravioleta.

De la misma manera los CBs pueden también formar complejos con acetanilidas conteniendo grupos aminopropil (Capítulo 5) y uno de los objetivos de la presente tesis doctoral será el anclaje de unidades con estructura de acetanilido en la superficie de sílice de gran área superficial por derivatización de grupos  $\text{NH}_2$  en la sílice aminopropil. Se pretende determinar si estos sólidos pueden adsorber cantidades significativas de CB[n] y si esta adsorción es específica y derivada de la formación de complejos huésped-hospedador o si por el contrario la contribución más relevante a la adsorción deriva de interacciones no específicas tales como puentes de hidrógeno o fuerzas dipolares.

En la presente tesis doctoral se va a sacar ventaja del auto-ensamblaje de líquidos iónicos con estructura de imidazolio simétrico sustituido con dos grupos  $\omega$ -alqueno para formar liposomas que posteriormente se someterán a polimerización radicalaria a fin de mantener

la morfología de las vesículas (Capítulo 6). Estos liposomas podrán contener o no nanopartículas de oro y en este último caso interés por determinar las propiedades catalíticas de las mismas para la oxidación aeróbica de alcoholes.

Otro tema de interés será establecer como el proceso de auto-ensamblaje, originado por la interacción entre moléculas idénticas que tiene lugar por encima de la concentración crítica de auto-ensamblaje influye en la asociación supramolecular entre líquidos iónicos con estructura de imidazolio y cucurbituriles (Capítulo 7) ya que tanto en el proceso de auto-ensamblaje como en el deformación del complejo de inclusión operan fuerzas de naturaleza hidrofóbica que pueden competir entre sí.

Por último el ensamblaje entre iones inorgánicos y biopolímeros naturales se empleará para pre-organizar los precursores inorgánicos de manera que cuando estos sufran polimerización el biopolímero actúe como agente plantilla controlando el tamaño de las partículas inorgánicas formadas (Capítulo 8).

El objetivo general de la presente tesis doctoral es estudiar procesos de agregación que ocurren de manera espontánea en el seno de disoluciones acuosas y que dan lugar a la formación de complejos supramoleculares huésped-hospedador o a la formación de entidades supramoleculares de tipo liposomas. Estos estudios sirven para el desarrollo de sensores colorimétricos o fluorimétricos para la preparación de sólidos adsorbentes selectivos, para la formación de liposomas con potencial actividad catalítica o para la preparación de materiales inorgánicos nanoparticulados que posean propiedades mejoradas frente materiales análogos preparados sin el empleo de agentes plantilla.



## ABSTRACT

The self-assembly phenomena where, due to the interaction with the solvent, molecules of an amphiphilic compound are associated spontaneously, is a general process that can be used for the preparation of supramolecular entities of great size with application in the preparation of materials either dispersed in liquid phase or either as not soluble solids. On the other hand the supramolecular association can also take place between different molecules and when one of them is an organic capsule it can hosts in its interior a molecule of lower size than its opening.

The CB[n] are cyclic oligomers of glycoluril units bridged by methylene groups that define a cavity like a hollow pumpkin that allows to locate in its interior molecules of fluorescent dyes (Chapters 3 and 4). In the present thesis it has been developed a sensor array for quaternary ammonium salts (Chapter 3),  $\alpha$ -amino acids (Chapter 3) and  $\gamma$ -hydroxybutiric acid (Chapter 4) that is able to identify the organic compound, to determine its structure and to quantify its amount in a range of concentrations based on the changes in the image of these arrays when they are illuminated with visible or ultraviolet light.

In the same way, CBs can also form complexes with acetanilides containing aminopropyl groups (Chapter 5) and one of the objectives of the present thesis will be the anchorage of units with acetanilido structure on the surface of silica with high superficial area by means of the derivatization of  $\text{NH}_2$  groups in the commercial silica. The aim is try to determine if these solids could adsorb significant amounts of CB[n] and if this specific adsorption is derived from the formation of host-guest complexes or if the highest contribution to the adsorption is due to nonspecific interactions such as dipole forces or hydrogen bridges.

In this thesis we will take profit from the self-assembly of symmetrical imidazolium ionic liquids substituted with two groups  $\omega$ -alkenyl to form liposomes that will be later submitted to radical polymerization in order to maintain this morphology (Chapter 6). These liposomes will be able to contain or not gold nanoparticles and in the first case we will determine the catalytic properties of these nanoparticles for aerobic alcohol oxidation.

Another subject of interest will be to establish how the self-assembly, originated by the interaction between identical molecules that takes place above the critical self-assembly concentration influences the supramolecular association between imidazolium ionic liquids and cucurbiturils (Chapter 7) since as it occurs in the self-assembly process in the formation of the inclusion complex the operating forces also have an hydrophobic nature.

Finally the assembly between inorganic ions and natural biopolymers will be used to pre-organize inorganic precursors so that when the biopolymer is polymerized acts like a templating agent controlling the size of the inorganic particles formed (Chapter 8).

The main goal of the present thesis is to study aggregation processes that occur in a spontaneous way in water solutions and that give rise to the formation of supramolecular host-guest complexes or to the formation of supramolecular entities as liposomes. These studies are used to develop colorimetric or fluorometric sensors, to prepare selective adsorbent solids, for liposome formation with potential catalytic activity or for the preparation of inorganic materials containing metallic nanoparticles that have improved properties than similar materials prepared without the use of templating agents.

## RESUM

L'auto-ensamblatge on la interacció amb el dissolvent de molècules d'un compost anfífil s'associen espontàniament és un procés general que pot servir per la preparació d'entitats supramoleculares amb aplicació en la preparació de materials dispersos tant en fase líquida com a sòlids insolubles. D'altra banda l'associació supramolecular també pot ocórrer entre diferents molècules i quan una d'elles és una càpsula orgànica pot allotjar al seu interior una molècula de dimensions menors a la seua obertura.

Els CBs són oligòmers cíclics d'unitats glicoluril connectades per ponts metilè que defineixen una cavitat en forma de carabassa amb capacitat per a contenir molècules fluorescents (Capítols 3 i 4). En aquesta tesi s'ha desenvolupat una matriu de sensors per a sals d'amoni quaternari (Capítol 3),  $\alpha$ -aminoàcids (Capítol 3) i àcid  $\gamma$ -hidroxibutíric (Capítol 4) que és capaç d'identificar el compost orgànic, determinar la seua estructura i quantificar la seua concentració en una gamma de concentracions sobre la base dels canvis en la imatge d'aquestes matrius de sensors quan que s'il·luminen amb llum ultravioleta o visible.

De la mateixa manera els CBs també poden formar complexos amb acetanilides que contenen grups a aminopropil (Capítol 5) i un dels objectius de la present tesi serà l'ancoratge d'unitats amb l'estructura de acetanilido a la superfície d'una sílice d'elevada àrea superficial per derivatització dels grups  $\text{NH}_2$  de la sílice aminopropil. L'objectiu és determinar si aquests sòlids poden conservar quantitats significatives de  $\text{CB}[n]$  i si aquesta adsorció és específica i deriva de la formació del complex amfitrió - hoste o si per contra la contribució més rellevant de l'adsorció es deriva d'interaccions no específiques com ponts d'hidrogen i forces dipolars.

En aquesta tesi s'aprofita l'auto-ensamblatge de líquids iònics amb estructura d'imidazolio amb dos grups cadenes  $\omega$ -alquenil per formar liposomes, que posteriorment seran polimeritzats via radicals per tal de mantenir la morfologia de vesícules (Capítol 6). Aquests liposomes podrien contenir o no nanopartícules d'or i en el primer cas es determinarien les propietats catalítiques de les nanopartícules per a l'oxidació aeròbica d'alcohol.

Un altre tema d'interès establirà com el procés de l'auto-ensamblatge, causat per la interacció entre molècules idèntiques que es produeix per damunt de la concentració crítica d'auto-ensamblatge influència l'associació supramolecular entre líquids iònics amb l'estructura de imidazolio i cucurbiturils (Capítol 7) ja que tant en el procés d'auto-ensamblatge com en la formació de complexos de inclusió operen forces de natura hidrofòbica de manera que tant el fenomen de auto-ensamblatge com la formació de complexos competeixen l'un amb l'altre.

Finalment s'utilitzarà l'associació entre ions inorgànics i bio-polímers naturals serà d'utilitat per pre-organitzar precursors inorgànics de manera que quan es polimeritza el bio-polímer aquest actua com agent plantilla i així es controla la mida de les partícules inorgànics formades (Capítol 8).

L'objectiu general d'aquesta tesi és estudiar processos d'agregació produïts espontàniament en el si de les solucions aquoses i que donen lloc a la formació de complexos supramoleculars hoste-amfitrió o la formació d'entitats supramoleculars com liposomes. Aquests estudis serveixen com per al desenvolupament de sensors colorimètrics o fluorimètrics, per a la preparació de sòlids adsorbents selectius, per a la formació de liposomes amb potencial activitat catalítica o per a la preparació de materials inorgànics nanoparticulats posseint propietats millorades front a un material similar preparat sense l'ús d'agents plantilla.

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

@	incluido en
Å	angstrom
A	absorbancia
AAs	aminoácidos
AO	naranja de acridina
AuNPs	nanopartículas de oro
BJH	Barret, Joyner y Halenda
CB	banda de conducción
CB[n]	cucurbituril
CBs	cucurbituriles
CD	ciclodextrinas
D <sub>2</sub> O	agua deuterada
DMSO	dimetilsulfóxido
DRX	difracción de rayos X
e <sup>-</sup>	electrón
eV	electrón voltios
ESI	ionización electrospray
FCC	cúbica centrada en las caras
FT-IR	infrarrojo
GABA	ácido γ-aminobutírico
GBL	γ-butirolactona
GC-MS	cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas
GHB	γ-hidroxibutirato
h <sup>+</sup>	hueco positivo
H <sub>a</sub>	hidrógeno axial de CB[n]
H <sub>e</sub>	hidrógeno equatorial de CB[n]
H <sub>m</sub>	hidrógeno metilénico de CB[n]
HPLC	cromatografía de líquidos de alta presión
hν	energía de los fotones de frecuencia ν
I	Intensidad
I <sub>fl</sub>	Intensidad de fluorescencia
K <sub>B</sub>	constante de asociación

<b>J</b>	constante de acoplamiento
<b>MALDI</b>	ionización por laser asistida por matriz
<b>MB</b>	azul de metileno
<b>MM</b>	mecánica molecular
<b>MS</b>	espectrometría de masas
<b>m/z</b>	relación masa/carga
<b>OX</b>	oxonina
<b>PF</b>	proflavina
<b>PYY</b>	pironina Y
<b>RGB</b>	coordenadas RGB (red, green and blue)
<b>RMN</b>	resonancia magnética nuclear
<b>SACs</b>	sales de amonio cuaternarias
<b>SEM</b>	microscopía electrónica de barrido
<b>T</b>	temperatura
<b>TEM</b>	microscopía electrónica de transmisión
<b>TG</b>	termogravimetría
<b>TH</b>	tionina
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>UV-vis</b>	ultravioleta-visible
<b>VB</b>	banda de valencia
<b>XPS</b>	espectroscopía fotoelectrónica de rayos X
$\delta$	desplazamiento químico
$\theta$	grado de saturación
$\Lambda$	conductividad
$\Lambda_m$	conductividad molar
$\Lambda_{m\infty}$	conductividad molar a dilución infinita
$\Lambda_{m0}$	conductividad molar inicial
$\lambda$	longitud de onda
$\lambda_{max}$	longitud de onda de máxima absorción
$\lambda_{exc}$	longitud de onda de excitación
$\Delta$	incremento
$\sigma$	desviación estándar

## PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

*Liposomes by Polymerization of an Imidazolium Ionic Liquid: Use as Microreactors for Gold-Catalyzed Alcohol Oxidation*

Mireia Buaki, Carmela Aprile, Amarajothi Dhakshinamoorthy, Mercedes Alvaro, and Hermenegildo Garcia. Chem. Eur. J. 2009, 15, 13082 – 13089

*First colorimetric sensor array for the identification of quaternary ammonium salts*

Laurent A. Baumes, Mireia Buaki Sogo, Pedro Montes-Navajas, Avelino Corma, Hermenegildo Garcia. Tetrahedron Letters 50 (2009) 7001–7004

*A Colorimetric Sensor Array for the Detection of the Date-Rape Drug  $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid (GHB): A Supramolecular Approach*

Laurent A. Baumes, Mireia Buaki Sogo, Pedro Montes-Navajas, Avelino Corma, and Hermenegildo Garcia. Chem. Eur. J. 2010, 16, 4489 – 4495

*Fluorimetric detection and discrimination of  $\alpha$ -amino acids based on tricyclic basic dyes and cucurbiturils supramolecular assembly*

Laurent A. Baumes, Mireia Buaki, Julien Jolly, Avelino Corma, Hermenegildo Garcia. Tetrahedron Letters 52 (2011) 1418–1421

*A General Purpose Sensor Array for the Identification of Organic Compounds in Aqueous Media*

Laurent A. Baumes\*, Mireia Buaki, Pedro Montes-Navajas, Avelino Corma, and Hermenegildo Garcia. SENSOR LETTERS Vol.8, 1–10, 2010

*Influence of self-assembly of amphiphilic imidazolium ionic liquids on their host-guest complexes with cucurbit[n]urils*

Mireia Buaki-Sogó, Mercedes Álvaro, Hermenegildo García. *Tetrahedron* Vol. 68, Issue 22, 3 June 2012, Pages 4296–4301

*Formation and electrochemical properties of a hybrid organosilica having a p-phenylene-vinylene (PPV) polymer partially grafted to the walls*

Mireia Buaki-Sogo, Maykel de Miguel, Pedro Atienzar, Mercedes Alvaro and Hermenegildo Garcia. (Enviado)

*Alginate as ligand of Ti precursors in the preparation of active photocatalyst*

Mireia Buaki-Sogó, Marco Serra, Ana Primo, Mercedes Álvaro, Hermenegildo García (Enviado)

*Graphene in combination with cucurbit[n]urils as electrode modifiers for electroanalytical biomolecules sensing*

Mireia Buaki-Sogó, Maria del Pozo, Hermenegildo García, Carmen Quintana. *Talanta* (Aceptado)

*Host-guest complexes between cucurbit[n]urils and acetanilides having aminopropyl units*

Mireia Buaki-Sogó, Pedro Montes-Navajas, Mercedes Alvaro, Hermenegildo Garcia (Enviado)