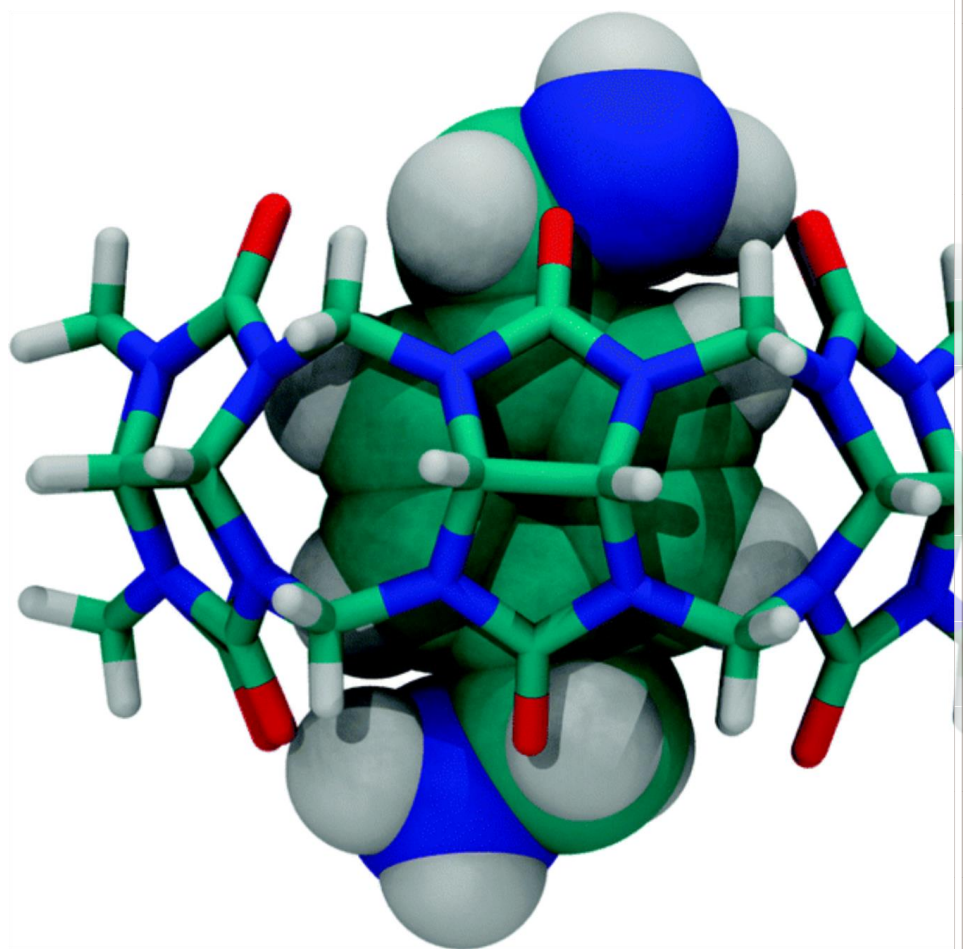


# Complejos de tipo huésped-anfitrión entre cucurbiturilo y derivados de azobenceno



Trabajo Fin de Grado (TFG)

GRADO EN QUÍMICA

Grupo Cristales Líquidos y  
Polímeros

Departamento de Química  
Orgánica

Universidad de Zaragoza

Curso 2017/2018

Carlota Auría Soro

Director: Dr. Jesús del Barrio  
Lasheras

Ponente: Dr. Luis Oriol Langa

Imagen adaptada a de la referencia <sup>1</sup>

## **RESUMEN: “COMPLEJOS DE TIPO HUÉSPED-ANFITRIÓN ENTRE CUCURBITURILO Y DERIVADOS DE AZOBENCENO”**

El presente Trabajo Fin de Grado (TFG) se enmarca dentro del área de la Química Supramolecular y, específicamente, de la formación de complejos huésped-anfitrión o de inclusión. Se ha estudiado el reconocimiento molecular en medio acuoso que ocurre entre derivados de azobenceno (huésped) y macrociclos de cucurbit[*n*]urilo (anfitrión).

El trabajo realizado incluye (a) la síntesis, purificación y caracterización estructural de dos derivados de azobenceno y (b) el estudio del fenómeno de reconocimiento molecular entre los compuestos sintetizados y los macrociclos cucurbit[7]urilo y cucurbit[8]urilo. Por una parte, se ha estudiado el efecto que tienen los sustituyentes de los azobenceno sobre determinadas propiedades como las ácido-base y las ópticas, para lo que se recurrió a técnicas como la espectroscopia de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) y la de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón. Las interacciones azobenceno-cucurbit[*n*]urilo se caracterizaron mediante la espectroscopia de absorción UV-Vis y de RMN y la calorimetría de titulación isotérmica.

Los azobencenos son unos compuestos fotocromáticos ampliamente estudiados en múltiples áreas, algunas implicadas en el desarrollo de nuevos sistemas para la encapsulación y liberación controlada de sustancias mediante estímulos lumínicos (luz UV, típicamente). En este sentido, y con aplicaciones en medios biológicos como objetivo último, resulta beneficioso identificar azobencenos solubles en medio acuoso y que puedan ser estimulados con luz visible. Precisamente, los azobencenos de este trabajo presentan una alta solubilidad en agua y además exhiben una banda de absorción intensa centrada en 400-500 nm, lo que permite su fotoestimulación mediante luz visible. Además, se ha demostrado que estos azobencenos forman complejos de inclusión estables con cucurbit[*n*]urilos en medio acuoso. Así, con este trabajo, se sientan las bases para el estudio de conceptos como la encapsulación molecular en medio acuoso y su control mediante luz visible o infrarroja.

## **ABSTRACT: “HOST-GUEST COMPLEXES BETWEEN CUCURBITURIL AND AZOBENZENE DERIVATES”**

This report is focused on Supramolecular Chemistry and, specifically on host-guest complexation. We have studied the molecular recognition in aqueous medium that takes place between azobenzene derivatives (guest molecules) and cucurbit[*n*]urils macrocycles (host molecule).

This project includes (a) the synthesis, purification and structural characterization of two azobenzene derivatives and (b) the study of the molecular recognition of these compounds by cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril. On one hand, the effect of the type of substituents of the azobenzenes on their properties including acid-base and optical properties has been studied by ultraviolet-visible absorption spectroscopy (UV-Vis) and proton nuclear magnetic resonance (NMR). The azobenzene-cucurbit[*n*]uril interactions were characterised by UV-Vis and NMR absorption spectroscopy and isothermal titration calorimetry.

Azobenzenes are photochromic compounds studied of interest in a wide variety of areas, including the development of new systems for the encapsulation and controlled release of substances by light stimulation (typically, UV light). In this sense, and applications in biological media in mind, the identification of water-soluble azobenzenes that can be isomerised with visible light is highly beneficial. In fact, our azobenzenes exhibit excellent water-solubility and an intense absorption band centered at 400-500 nm, which allows its photostimulation by visible light. In addition, it has been shown that these azobenzenes form stable inclusion complexes with cucurbi[*n*]urils in aqueous medium. Thus, the foundations are laid for the study of concepts such as molecular encapsulation in aqueous medium and its control by visible or infrared light.

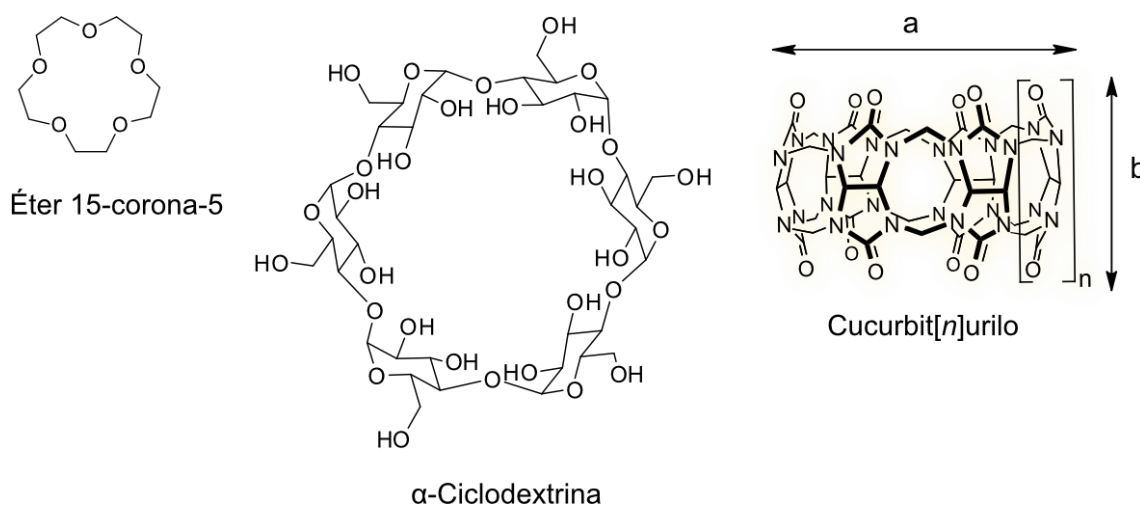
# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
1.1. Química Supramolecular y sistemas de tipo huésped-anfitrión basados en cucurbiturilos .....	1
1.2. Azobencenos .....	3
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>6</b>
3.1. Síntesis y caracterización de los derivados de azobenceno.....	6
3.2. Formación de complejos huésped-anfitrión .....	12
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>18</b>
4.1. Instrumentos empleados .....	18
4.2. Síntesis y purificación del compuesto <i>Azo 1</i> .....	19
4.3. Síntesis y purificación del compuesto <i>Azo 2</i> .....	29
4.4. Caracterización de los azobencenos y de las interacciones huésped-anfitrión.....	20
4.4.1. Pruebas preliminares mediante UV-VIS .....	20
4.4.2. Determinación del pKa del <i>Azo 1</i> .....	20
<b>5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>23</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>25</b>

# 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

## 1.1. Química Supramolecular y sistemas de tipo huésped-anfitrión basados en cucurbiturilos

La Química Supramolecular, también denominada “la química más allá de la molécula”, versa sobre el estudio de las interacciones intermoleculares así como los procesos de ensamblaje a través de interacciones no covalentes. Otro aspecto de la Química Supramolecular está relacionado con el reconocimiento molecular, que puede describirse como la unión de una molécula específica a un receptor de tipo molecular. Aquellas moléculas con capacidad para reconocer a otras de forma eficiente y selectiva se les conoce como moléculas de tipo anfitrión y las que son reconocidas se les denomina moléculas de tipo huésped. Una molécula anfitrión puede tener forma de caja o de pinza (podando). También existen anfitriones con una estructura cíclica, que posee una cavidad y que puede acoger una molécula más pequeña en su interior. En general, este tipo de moléculas reciben por nombre macrociclos (Figura 1.1).<sup>2</sup> Este trabajo se centra en la química huésped-anfitrión de los macrociclos de Cucurbit[*n*]urilo.



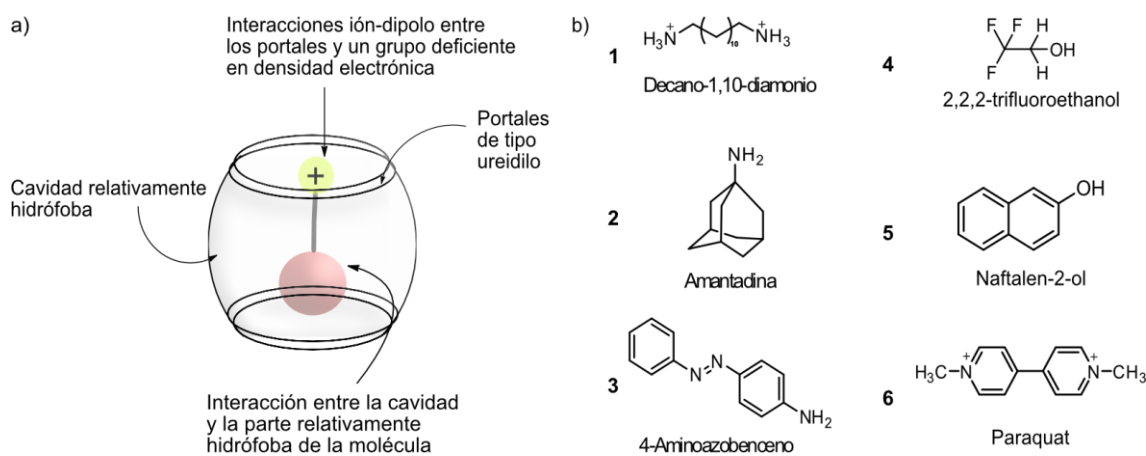
**Figura 1.1.** Estructuras químicas de tres familias de macrociclos. Las letras “a” y “b” en la estructura de CB[*n*] representan las distancias del diámetro del portal y la de portal-portal respectivamente.

Los Cucurbit[*n*]urilos, abreviados a partir de este punto como CB[*n*], son una familia de macrociclos formados por *n* unidades repetitivas de glicolurilo enlazadas por puentes demetileno (-CH<sub>2</sub>-). Estos macrociclos resultan de la reacción de polimerización y ciclación de glicolurilo en presencia de paraformaldéhid y ácido a alta temperatura. Se han descrito miembros de la familia con *n* = 5-8 y 10. Los CB[*n*]s presentan una cavidad central relativamente hidrófoba accesible a través de sus dos portales polares con grupos de tipo ureidilo. Estos grupos, que poseen una alta densidad electrónica, están orientados hacia el centro del portal del macrociclo (Figura 1.2) lo que influye en su capacidad para actuar como huésped. En relación a su estructura y tamaño, la distancia de portal a portal (“b” en Figura

1.1.) es de aproximadamente 9 Å, siendo constante para todos los miembros de la familia. El diámetro del portal ("a" en Figura 1.1) varía entre 2,4 Å para n = 5 y 6,9 Å para n = 8. Asimismo, el volumen de la cavidad varía entre 82 Å<sup>3</sup> para n = 5 y 479 Å<sup>3</sup> para n = 8.<sup>2</sup>

Un aspecto a recalcar es la capacidad de reconocimiento de los CB[n] en medio acuoso, que está relacionada con el potencial electrostático de los portales y de la cavidad<sup>3</sup>. Como se aprecia en la Figura 1.2, los portales ureidilo son capaces de enlazar a través de interacciones ión-dipolo con moléculas o grupos funcionales deficientes en densidad electrónica como, por ejemplo, aminas cuaternarias. Así mismo, los CB[n] también son capaces de encapsular especies relativamente hidrófobas en su cavidad.<sup>4</sup>

En relación a lo anteriormente citado, destaca el papel de la desolvatación tanto de la cavidad del anfitrión como de la molécula huésped como factor, en ocasiones principal, para justificar la elevada estabilidad de algunos complejos de CB[n]. Las moléculas de agua situadas en el interior de los CB[n], a diferencia de las del resto de disolvente, se encuentran unidas entre sí formando una estructura menos estable y de mayor energía que las del disolvente. A este tipo de moléculas de agua presentes en la cavidad de los CB[n], se las ha denominado como de "alta energía".<sup>5</sup> Cuando se forma el complejo huésped-anfitrión se produce, a su vez, el proceso de desolvatación de la cavidad; siendo, en ciertas ocasiones, un proceso que favorece la formación de complejos.



**Figura 1.2.** Representación de las diferentes regiones de enlace en CB[n] (a) y estructuras químicas de moléculas huésped para CB[n] (b).

Las diferencias de tamaño del macrociclo, en cuanto número de unidades repetitivas de glicolurilo (n) se refiere, definen la selectividad por uno u otro tipo de moléculas anfitrión así como la estabilidad del complejo final.

- **CB[5]** es el macrociclo de la familia de los cucurbiturilos más pequeño que ha sido aislado. Como resultado de su reducida cavidad la encapsulación de moléculas anfitrión está limitada a especies moleculares relativamente pequeñas. como He, Ne, H<sub>2</sub>, etc., así como la de especies catiónicas como Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, etc.<sup>2</sup>
- **CB[6]** es el CB[*n*] más abundante que resulta de la reacción de polimerización de glicolurilo. Su tamaño, ligeramente superior al de CB[5], permite el enlace, por ejemplo, con aminas alifáticas como **1** (Figura 1.2).<sup>3</sup>
- **CB[7]** posee un tamaño lo suficientemente grande (ligeramente superior al de la β-ciclodextrina<sup>6</sup>) para enlazar con aminas alifáticas, y también aromáticas. Además de aminas, se han descrito una gran variedad de moléculas huésped para CB[7] y que resultan en la formación de complejos estables ( $10^3 < K_a < 10^6 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>7</sup> Se han detallado casos singulares donde las constantes de afinidad son excepcionalmente altas (en torno a  $10^{17} \text{ M}^{-1}$ ) como, por ejemplo, la encapsulación del ferroceno o la de la amantadina (**2** de la Figura 1.2).<sup>8</sup>
- **CB[8]** presenta una unidad repetitiva más respecto a CB7. Su cavidad, en términos de volumen, es similar a la de una γ-ciclodextrina.<sup>8</sup> En contraste con otros CB[*n*]s, la cavidad de CB[8] es lo suficientemente amplia como para acomodar en su interior simultáneamente dos moléculas huésped; ya sean dos moléculas del mismo tipo, en cuyo caso el complejo es 1:2, o diferentes, dando lugar a la formación de un complejo ternario 1:1:1. Un ejemplo típico es la formación de complejos hetero-ternarios entre una molécula huésped electrodeficiente y otra rica en densidad electrónica (molécula de naftaleno **5** y viológeno **6** en la Figura 1.2).<sup>2</sup> También se ha descrito la encapsulación de compuestos fotocromicos, como los azobencenos, en donde la isomerización entre las formas *E* y *Z* permite controlar al estequiometría del complejo final de CB[8].

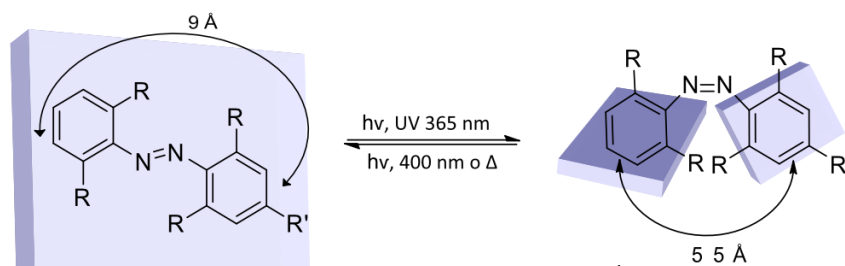
Todas las propiedades anteriormente nombradas, entre las que la posibilidad de formar complejos con una alta estabilidad en medio acuoso, hacen de los CB[*n*]s unos macrociclos versátiles. En la literatura reciente se han apuntado aplicaciones que van desde su uso para síntesis de nanopartículas, ensamblaje o catálisis hasta el desarrollo de sensores.<sup>9</sup>

## 1.2. Azobencenos

El fotocromismo está definido como la interconversión química reversible de un compuesto entre dos estados con espectros de absorción y propiedades físicas diferentes, inducida mediante fotoexcitación. A este respecto, cabe destacar a los azobencenos.<sup>10</sup>

De modo general, los azobencenos son de interesante y amplio estudio gracias a su isomerización fotoreversible inducida, su alta estabilidad química y térmica así como a su relativa sencilla síntesis, en comparación con otros sistemas. Asimismo, han sido relevantes en este estudio por su utilización como moléculas huésped.





**Figura 1.3.** Fotoisomerización E/Z del azobenceno.

Los azobencenos son una familia de compuestos orgánicos que poseen dos anillos aromáticos unidos a través de un enlace diazoico (-N=N-). Típicamente, presentan dos isómeros geométricos (E/Z) (Figura 1.3) generados en torno al enlace azo, siendo el isómero E más estable que el isómero Z. De modo general, la isomerización desde la forma E a la forma Z está inducida por la luz mientras que la isomerización reversa puede ser inducida tanto por la luz como térmicamente. Cuando se incita a la fotoisomerización se produce un cambio implícito en la conformación geométrica de dicha molécula, momento dipolar o en el espectro de absorción.

Por un lado, el isómero E presenta una geometría lineal y plana ( $\mu \sim 0$ ) mientras que, por otro lado, el isómero Z adopta una geometría angular donde uno de los anillos aromáticos gira con el fin de evitar repulsiones estéricas, quedando enfrentadas las nubes electrónicas  $\pi$  de los anillos aromáticos, dando como resultado un momento dipolar de 3 D. Consecuentemente la distancia entre las posiciones más alejadas de los anillos pasa de 9 Å, para el isómero E, a ser de 5,5 Å para el Z.<sup>11</sup>

De manera característica, los azobencenos presentan un orbital  $\pi$  que se encuentra deslocalizado a lo largo de toda la molécula, así como un orbital  $n$  correspondiente a los pares de electrones no enlazantes de los átomos de nitrógeno, del grupo azo. La isomerización E/Z tiene lugar cuando se produce la absorción de un fotón de una longitud de onda pertinente a las transiciones electrónicas  $\pi-\pi^*$  ó  $n-\pi^*$ . Por un lado, el isómero E de dicha molécula presenta generalmente dos bandas de absorción; una localizada en la región del ultravioleta y que corresponde a la transición  $\pi-\pi^*$  y otra de menor intensidad, en la región del visible, relacionada con la transición  $n-\pi^*$ . Por otro lado, en los espectros particulares del isómero *cis* aparece una banda vinculada a la transición  $\pi-\pi^*$  a menores longitudes de onda y con una menor intensidad que la banda correspondiente al isómero E. Además, también se muestra otra banda situada a longitudes de onda similares a las del isómero E y con una mayor intensidad.<sup>10</sup>

La sustitución de la molécula de azobenceno con grupos dadores o aceptores de electrones afecta a las energías de los orbitales  $\pi$  y  $\pi^*$  produciendo una modificación en la posición de las bandas de absorción de los isómeros. La sustitución con grupos voluminosos y dadores de densidad electrónica (como por ejemplo grupos -O-CH<sub>3</sub>) en las posiciones *orto* de la molécula de azobenceno, respecto al grupo azo, genera un impedimento estérico significativo. En la conformación E estos grupos quedan enfrentados de tal manera que la molécula adopta una

conformación de menor energía mediante la rotación de los planos de los anillos aromáticos, uno respecto del otro.<sup>12-14</sup> Como consecuencia, la fotoisomerización de azobencenos con patrones de sustitución como los mencionados anteriormente puede llegar a ser inducida por luz roja o incluso de la región del infrarrojo cercano.<sup>13</sup> Esto es particularmente interesante en aplicaciones biológicas. La posibilidad de isomerizar azobencenos con luz visible o de la región del infrarrojo cercano permite una mayor penetración en los tejidos de los seres vivos y causen un menor daño biológico.<sup>15</sup>

En el grupo de Cristales Líquidos y Polímeros se exploran materiales y polímeros que puedan encapsular y liberar moléculas de manera controlada mediante el uso de diversos estímulos lumínicos<sup>16</sup>. Este trabajo, que se plantea en buena sintonía con las actividades de nuestro grupo, sentará las bases para el estudio de conceptos como la encapsulación molecular en medio acuoso y su control mediante luz visible o infrarroja.

## 2. OBJETIVOS

Como **objetivo científico** se plantea en este proyecto la síntesis y caracterización de dos compuestos de tipo azobenceno y el estudio de sus interacciones con los macrociclos CB[7] y CB[8] en medio acuoso.

Más específicamente, como **primer objetivo**, se propone sintetizar y caracterizar los compuestos *Azo 1* y *Azo 2* (Figura 2.1). Estos dos compuestos presentan semejanzas como el grupo azo y los sustituyentes -O-CH<sub>3</sub> en las posiciones *orto* de los anillos aromáticos respecto al grupo azo. Si bien es cierto que difieren entre sí en el grupo de la posición *para* con respecto al grupo azo. *Azo 1* consta de un grupo amina terminal (-NH<sub>2</sub>) mientras que *Azo 2* posee un grupo alcohol (-OH). La síntesis de *Azo 1* y *Azo 2* se ha descrito recientemente en la literatura<sup>17, 18</sup> y también se ha evaluado por el grupo de Cristales Líquidos y Polímeros de la Universidad de Zaragoza.

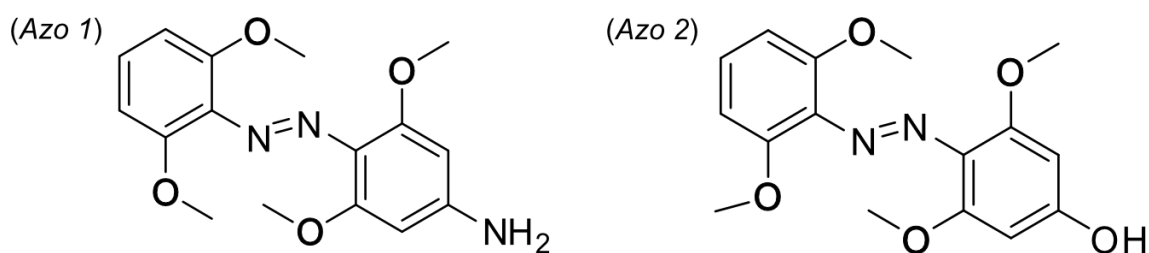


Figura 2.1. Estructuras de Azo 1 y Azo 2.

Los azobencenos sintetizados se caracterizarán mediante: espectroscopia de absorción UV-Vis, <sup>1</sup>H-RMN, espectrometría MS y espectroscopia IR.

El **segundo objetivo**, se basa en estudiar las interacciones entre los azobencenos descritos con anterioridad y dos tipos de CB[*n*], *n* = 7 y 8, en medio acuoso. En vista a los antecedentes y la literatura cabe esperar que el tamaño de la cavidad de CB[7] y CB[8] sea lo

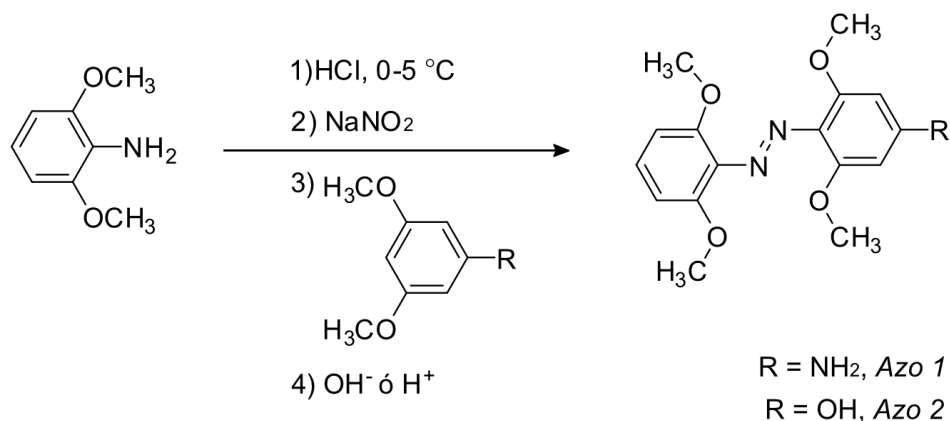
suficientemente grande como para alojar al menos una molécula de azobenceno. Para llevar a cabo este estudio se hace uso de técnicas de caracterización tales como RMN y espectroscopia UV- VIS, para un análisis cualitativo, y la calorimetría de titulación isotérmica (ITC), para cuantificar algunos de los parámetros termodinámicos relacionados con las interacciones azobenceno-CB[n].

De manera análoga a los objetivos experimentales del trabajo también se ha remarcar los **objetivos académicos**. El TFG ayuda a reforzar y ejecutar el aprendizaje acumulado y asimilado en el grado. Al mismo tiempo es una importante oportunidad para demostrar que se es capaz de desarrollar distintas capacidades y de mejorar día a día como futuros químicos. Finalmente, este trabajo debe reflejar la idoneidad y disposición para un futuro en alguna de las muchas ramas y disciplinas profesionales pertinentes a la Química.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Síntesis y caracterización de los derivados de azobenceno

Uno de los objetivos del trabajo consiste en sintetizar dos derivados de azobenceno, *Azo 1* y *Azo 2* (Figura 2.1.). Existen diversos procedimientos para la síntesis de derivados de azobenceno como la reacción de Mills o la reacción de Wallach.<sup>19</sup> Para este proyecto se seleccionó el acoplamiento azoico como método de síntesis en base a la literatura.<sup>17, 18</sup> La reacción mostrada en la Figura 3.1 se basa en la diazotización de una amina aromática primaria a temperaturas próximas a 0 °C la cual, más tarde, reacciona con un nucleófilo aromático rico en electrones (Anexos A).



**Figura 3.1.** Esquema sintético de *Azo 1* y *Azo 2* mediante acoplamiento azoico.

De manera general, este método permite la síntesis tanto de *Azo 1* como de *Azo 2* por reacción entre una sal de diazonio a 0-5 °C, generada a partir de la 2,6-dimetoxianilina y NaNO<sub>2</sub> en medio ácido, y su posterior reacción con un nucleófilo. En el caso de *Azo 1* se emplea 3,5-dimetoxianilina como nucleófilo mientras que para *Azo 2* se hace uso de 3,5-dimetoxifenol. La utilización de diferentes nucleófilos tiene asociadas pequeñas particularidades en los métodos

de síntesis. En la síntesis de *Azo 1* se usa un derivado de anilina que lo suficientemente buen nucleófilo como para llevar a cabo la reacción en un medio ácido débil. Para la preparación de *Azo 2* se emplea un derivado de fenol en un medio básico suave con el fin de incrementar la nucleofilia del propio fenol mediante la formación de su forma ionizada. La purificación se llevó a cabo en ambos casos por cromatografía en columna a media presión. Cabe destacar que para *Azo 1* fue necesario un segundo proceso de purificación por recristalización.

Tras la obtención de los productos finales se observó que los rendimientos obtenidos para ambas moléculas fueron dispares (39% y 6% para *Azo 2* y *Azo 1* respectivamente) si bien el método de síntesis es similar. Estos resultados podrían asociarse a los problemas experimentados en la purificación de *Azo 1*, para el que fue necesaria una purificación adicional por recristalización. Cabría también destacar que los rendimientos obtenidos son significativamente menores a los descritos en la literatura. Por ejemplo, se han descrito rendimientos del 97% para la síntesis de *Azo 2*.<sup>18</sup> Se puede proponer un trabajo futuro que consista en la optimización de la síntesis de estos compuestos.

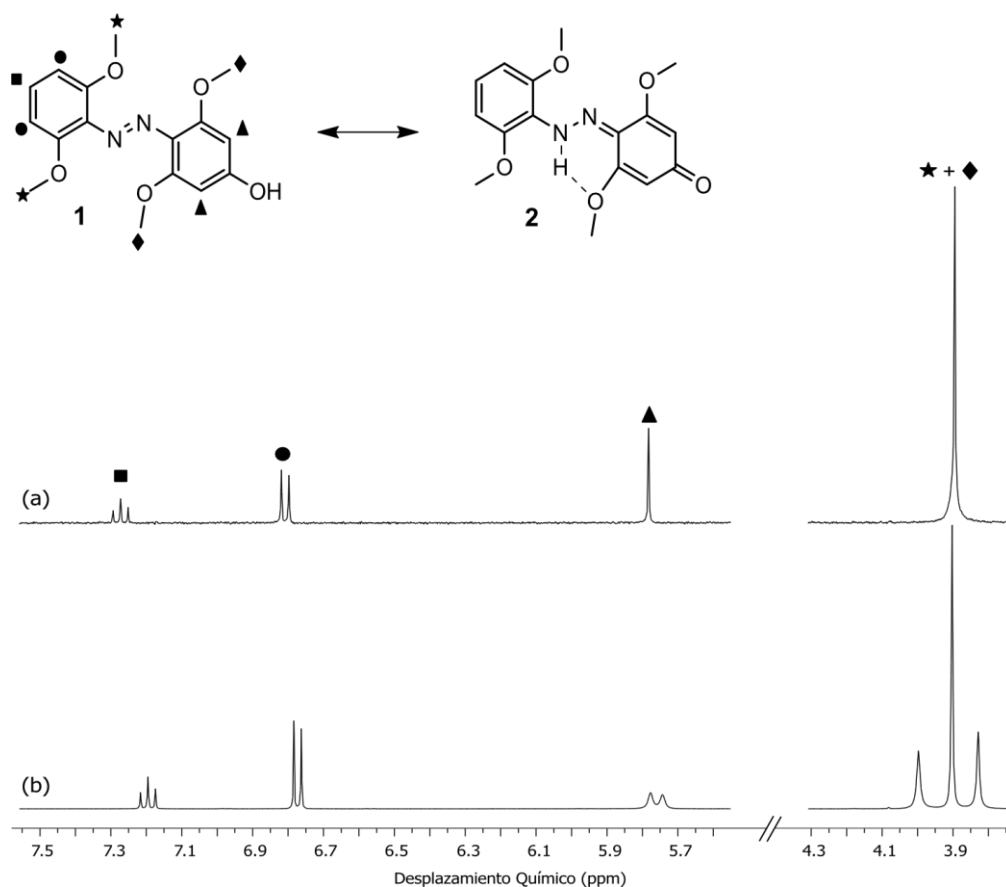
La comprobación de que los productos finales eran los esperados, y la determinación de su pureza, se realizó mediante espectroscopia UV-Vis, RMN, MS y espectroscopia de infrarrojo (IR).

- Mediante **espectrometría MS** se confirmó la presencia del azobenceno 1 y 2 sintetizados y purificados.

Para *Azo 1* se encontró una señal a una relación  $m/z = 318,2$  (Anexos D) y que encaja con lo esperado para la forma ionizada de *Azo 1*. Para *Azo 2* se observaron dos señales intensas, una de ellas correspondiente a lo concebido y la otra con una relación  $m/z$  de 341,2 asociada al acoplamiento entre el ión esperado y un ión sodio.

- La siguiente técnica que permite la constatación de la estructura esperada es **<sup>1</sup>H-RMN**.

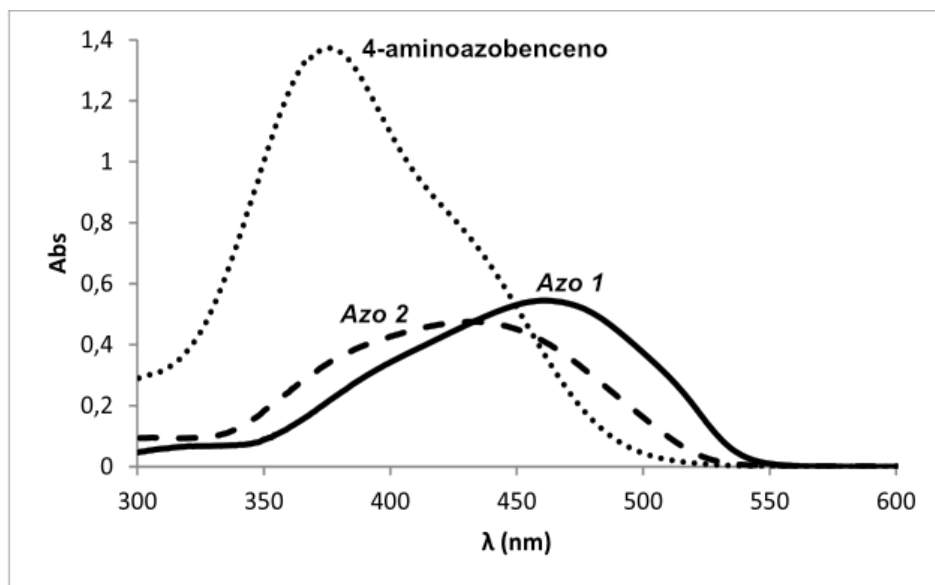
Para las estructuras de *Azo 1* y *Azo 2* propuestas en la Figura 2.1 cabría esperar un grupo de señales en la región aromática compuesto por un triplete, un doblete y un singlete; así como dos singletes en la región alifática (grupos  $-O-CH_3$ ). Todo ello queda confirmado en el espectro de la Figura 3.2 (a) para la molécula *Azo 2*, registrado en condiciones de concentración constante y pD de 4.4. Se obtuvieron resultados análogos para *Azo 1* (espectro representado en los anexos B). En este punto, es de hacer notar que en determinadas ocasiones, en función de la concentración de azobenceno y del disolvente utilizado se observó un desdoblamiento de alguna de las señales; que podría relacionarse con la presencia de especies con un grado de simetría menor que el de las representadas en la Figura 2.1. Como ejemplo se incluye el espectro para *Azo 2* registrado en  $CD_3OD$  (Figura 3.2). Las mismas observaciones fueron hechas para *Azo 1* (anexos B).



**Figura 3.2.** Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz) para Azo 2 en D<sub>2</sub>O a un pD de 4.4 (a) y en CD<sub>3</sub>OD (b) a concentración constante de azobenceno en el rango de μM.

En base a la literatura, se propone que los espectros con un número de señales mayor están relacionados con una forma tautomerica (Figura 3.2)<sup>20</sup> que podría estar estabilizada mediante un enlace de hidrógeno intramolecular.<sup>21</sup>

- Como parte de la caracterización básica se registró mediante **espectroscopia de absorción UV-Vis** los espectros de Azo 1 y Azo 2 en medio acuoso (disolución tampón de acetato de sodio, 50 mM) y pH 4.6. Estos espectros se comparan con el de 4-aminoazobenceno, como azobenceno modelo, que se registra en las mismas condiciones.

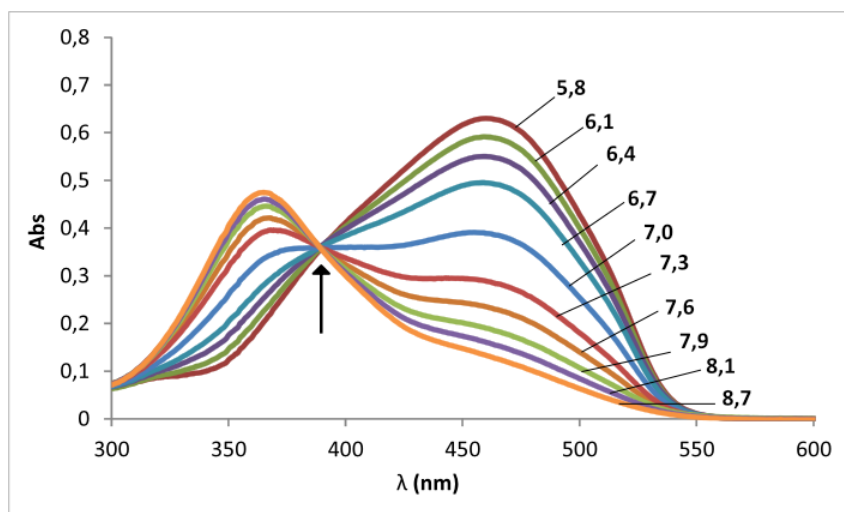


**Figura 3.3.** Superposición de los espectros de UV-Vis del 4-aminoazobenceno, Azo 1 y del Azo 2 (con concentraciones en el rango  $\mu\text{M}$ ) a un pH tamponado (acetato) de 4.6

Para las experiencias basadas en la espectroscopia de absorción UV-Vis, se disolvió Azo 1 y Azo 2 en una disolución tampón de acetato a pH 4.6. El compuesto 4-aminoazobenceno, al ser relativamente hidrófobo, se disolvió inicialmente en dimetilsulfóxido a una concentración aproximada de 1 mM que, seguidamente se diluyó con la disolución tampón de acetato hasta una concentración en el rango de  $\mu\text{M}$  (apropiado para estudios de espectroscopia de absorción UV-Vis con este tipo de azobencenos). Así, el disolvente de la disolución final de trabajo de 4-aminoazobenceno consistió en una mezcla de dimetilsulfóxido (1% en volumen) y disolución tampón de acetato (99% en volumen).

Azo 1 y Azo 2 muestran una banda principal en la región del visible con un máximo a 464 nm para Azo 1 y 431 nm para Azo 2. La banda principal de ambos azobencenos presenta un hombro de menor intensidad y desplazado, en el caso de Azo 1, hacia longitudes de onda mayores. En el caso de Azo 2 el hombro aparece a longitudes de onda menores. Como comparación se incluye en la Figura 3.3 el espectro del 4-aminoazobenceno, en las mismas condiciones.<sup>21</sup> En este compuesto se aprecia que la banda principal está centrada en valores de longitud de onda menores que las de Azo 1 y Azo 2. Considerando las estructuras de Azo 1 y 4-aminoazobenceno, el desplazamiento de la banda principal a longitudes de onda mayores para Azo 1 en medio acuoso pH = 4.6 puede relacionarse con la presencia de los sustituyentes  $-\text{O}-\text{CH}_3$ . Para estudiar un poco más en detalle estas diferencias se decidió determinar el  $\text{pK}_a$  aparente de Azo 1.

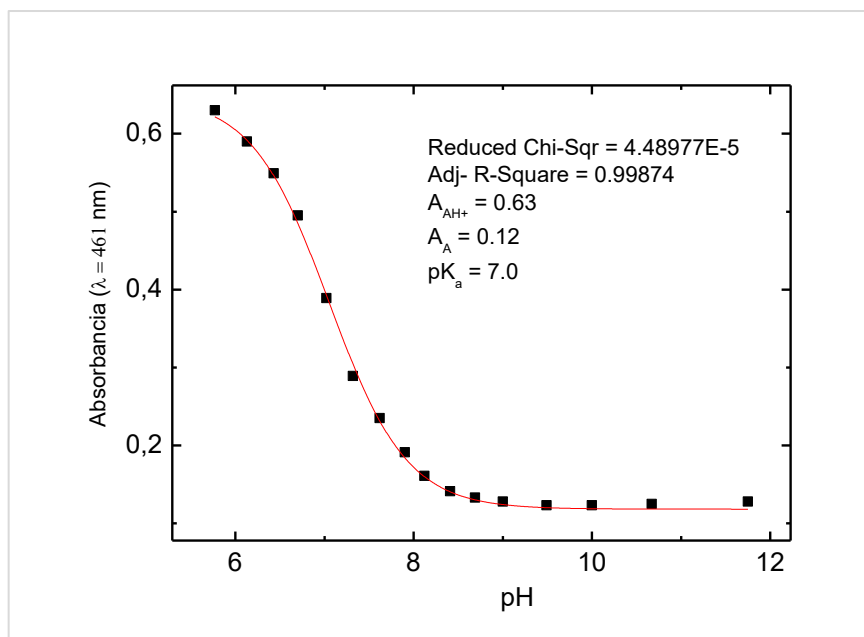
La caracterización de las propiedades ácido-base de Azo 1 se llevó a cabo mediante titulación ácido-base usando la técnica de espectroscopia de absorción UV-Vis.<sup>19</sup>



**Figura 3.4.** Espectro UV-Vis de Azo 1 a concentración constante y pH variable.

Para ello se registró el espectro de absorción de Azo 1, a concentración constante, variando gradualmente el pH entre 3.1 y 8.7 (Figura 3.4). Como queda reflejado en la figura, Azo 1 puede existir en disolución bien en forma ionizada, que presenta una banda de absorción con máximo a  $\lambda = 460$  nm, o bien en forma neutra, que presenta una banda de absorción con máximo a  $\lambda = 365$  nm. Nótese que en la Figura 3.4 hay un punto, aproximadamente a  $\lambda = 387$  nm, en el cual el valor de la absorbancia coincide para cualquier valor de pH. Este es el llamado punto isobéptico que, por definición, es un valor de la longitud de onda para el cual la absorbancia de la muestra se mantiene constante. Además denota la existencia de un equilibrio químico entre dos especies, en este caso entre la forma ionizada y la neutra de Azo 1.

Para la determinación del  $pK_a$  aparente se representaron los valores de densidad óptica a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción de la forma ionizada de Azo 1 (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Valores de densidad óptica correspondientes a los espectros de la titulación ácido-base de Azo 1.

Estos valores se ajustaron directamente a la ecuación 3.1 dejando  $pK_a$  como única variable. El  $pK_a$  aparente obtenido fue de 7.0.

$$A_{obs} = \frac{A_{AH+}^{\infty}}{(1 + 10^{(pH-pK_a)})} + \frac{A_A^{\infty}}{(1 + 10^{(pH-pK_a)})}$$

**Ecuación 3.1.**<sup>22</sup>

Donde  $A_{obs}$  corresponde al valor de la densidad óptica de los espectros de la Figura 3.4 a 461 nm;  $A_{AH+}^{\infty}$  es el valor de la densidad óptica de la forma ionizada a una longitud de onda fija de 461 nm;  $A_A^{\infty}$  es igual al valor de la densidad óptica de la forma neutra a 461 nm.

La determinación del  $pK_a$  aparente con el que se genera la forma ionizada de Azo 1 también se llevó a cabo en base a la ecuación de Henderson-Hasselbalch<sup>23</sup> (apartado experimental 4.4.2) y se obtuvo el mismo valor que con el ajuste no lineal.

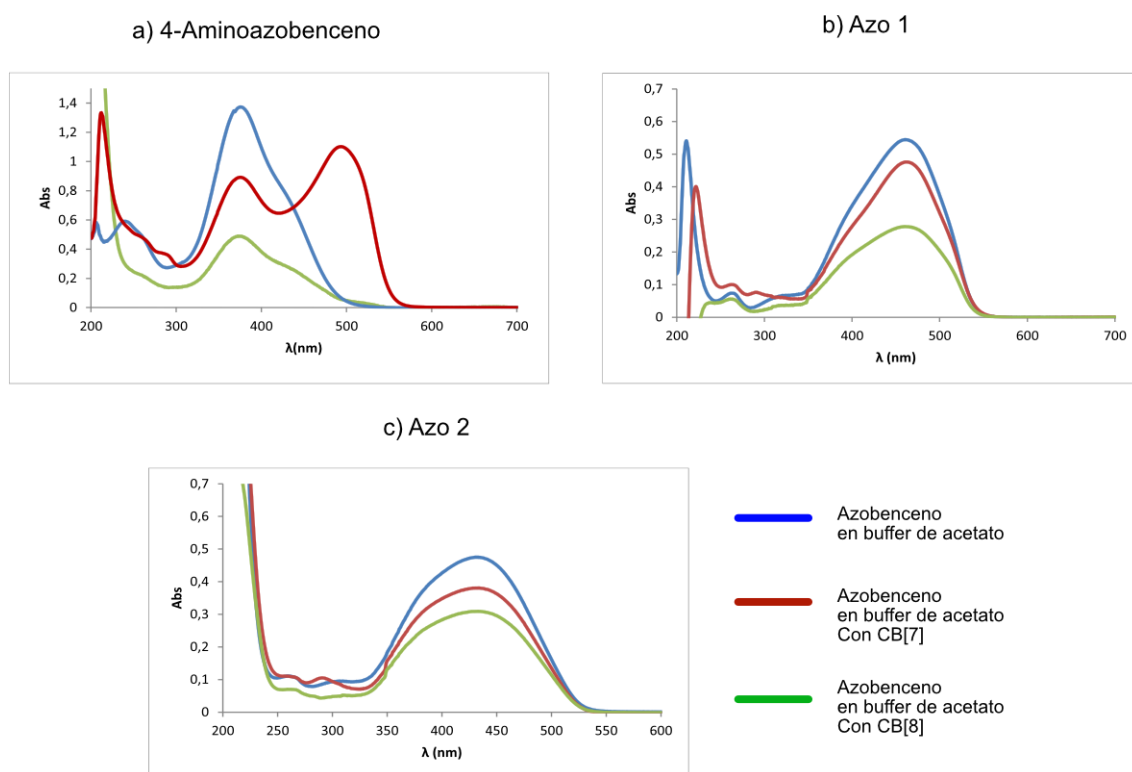
Si se compara este valor con el descrito para 4-aminoazobenceno de  $pK_a = 2,8$  (valor consultado en SciFinder), es razonable concluir que los grupos -O-CH<sub>3</sub> de Azo 1 estabilizan su forma ionizada y esta se genera con un  $pK_a$  mayor que la correspondiente a 4-aminoazobenceno. Esto también explica las diferencias apreciadas en los espectros de absorción de Azo 1 y 4-aminoazobenceno a pH = 4.6.



### 3.2. Formación de complejos huésped-anfitrión

En esta sección se incluye una serie de estudios preliminares relacionados con la formación de complejos de tipo huésped-anfitrión de los azobencenos Azo 1 y Azo 2 con CB[7] y CB[8] en medio acuoso. Como referencia, también se ha estudiado la formación de complejos con 4-aminoazobenceno. Los macrociclos CB[7] y CB[8] se sintetizaron previamente en el grupo de Cristales Líquidos y Polímeros mediante procedimientos descritos en la literatura.<sup>2</sup>

En la figura 3.6 se comparan los espectros de absorción de los compuestos 4-aminoazobenceno, Azo 1 y Azo 2 a una concentración constante (en el rango de micromolar) y un pH = 4.6 (disolución tampón de acetato, 50 mM) en ausencia y presencia de un exceso de CB[7] y CB[8] (espectros en rojo y verde de la figura 3.6). En los sistemas con CB[7], la concentración de CB[7] es unas 30 veces superior respecto a la de azobenceno. Estas condiciones, en caso de que ocurra el reconocimiento azobenceno-CB[7], favorecen la formación del complejo.

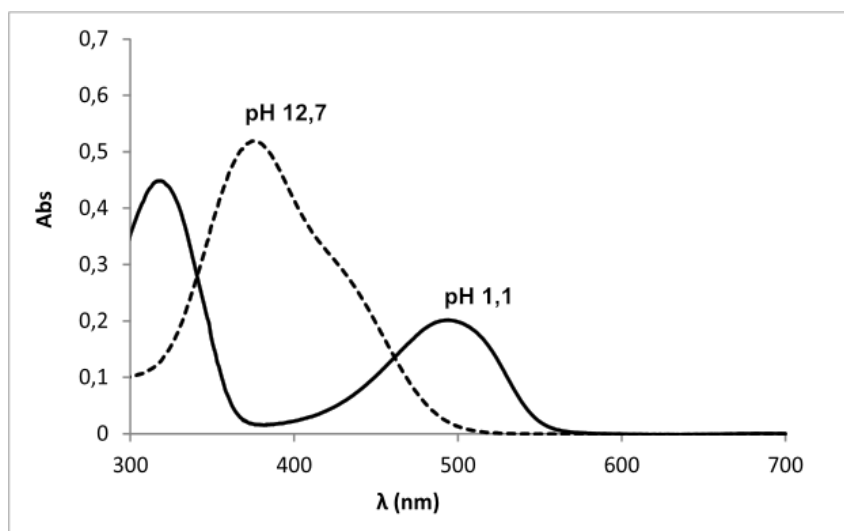


**Figura 3.6.** Espectros de absorción UV-Vis para 4-aminoazobenceno (a), Azo 1 (b) y Azo 2 (c) en ausencia (azul) y presencia de CB[7] (rojo) o CB[8] (verde) a concentración constante de azobenceno y pH tamponado de 4.6.

En el caso de Azo 1 y Azo 2, la banda principal del espectro UV-Vis disminuye de intensidad en presencia de CB[7] respecto a muestras de azobenceno a la misma concentración en ausencia de CB[7]. Estos mismos cambios se observan si se comparan

muestras de Azo 1, Azo 2 y 4-aminoazobenceno en ausencia y presencia CB[8] y son indicativos de la presencia de especies asociadas de tipo azobenceno-CB[n].

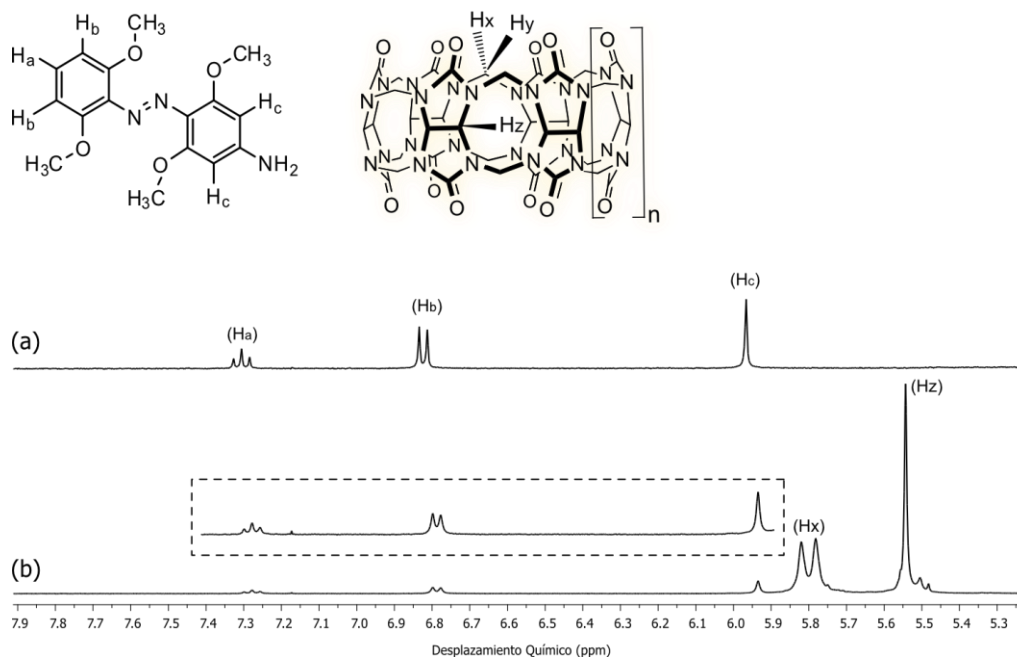
En el caso del 4-aminoazobenceno en presencia de CB[7], además de la disminución de la intensidad de la banda principal se observa la aparición de una nueva banda a mayores longitudes de onda. Estos cambios se relacionan, como en los casos anteriores, a la formación de un complejo entre el azobenceno y CB[7]. La aparición de una banda a mayores longitudes de onda puede estar relacionada con el hecho de que la adición de CB[7] a 4-aminoazobenceno estabilice parcialmente la forma ionizada del azobenceno unido a CB[7] a un pH = 4.6. De hecho, el máximo de la banda a mayores longitudes de onda en dicho espectro (Figura 3.6) coincide con el de la banda de absorción de la forma ionizada del 4-aminoazobenceno en ausencia de CB[7] (Figura 3.7). Parece probable que la forma ionizada del complejo 4-aminoazobenceno-CB[7] se genere con un  $pK_a$  aparente mayor que el del 4-aminoazobenceno en ausencia de CB[7]. Este es un fenómeno que se ha observado previamente para ciertos complejos huésped-anfitrión entre aminas y CB[7].



**Figura 3.7.** Espectros de absorción UV-Vis para el 4-aminoazobenceno a pH = 12.7 y pH = 1.11 y concentraciones constantes de 4-aminoazobenceno (30  $\mu$ M).

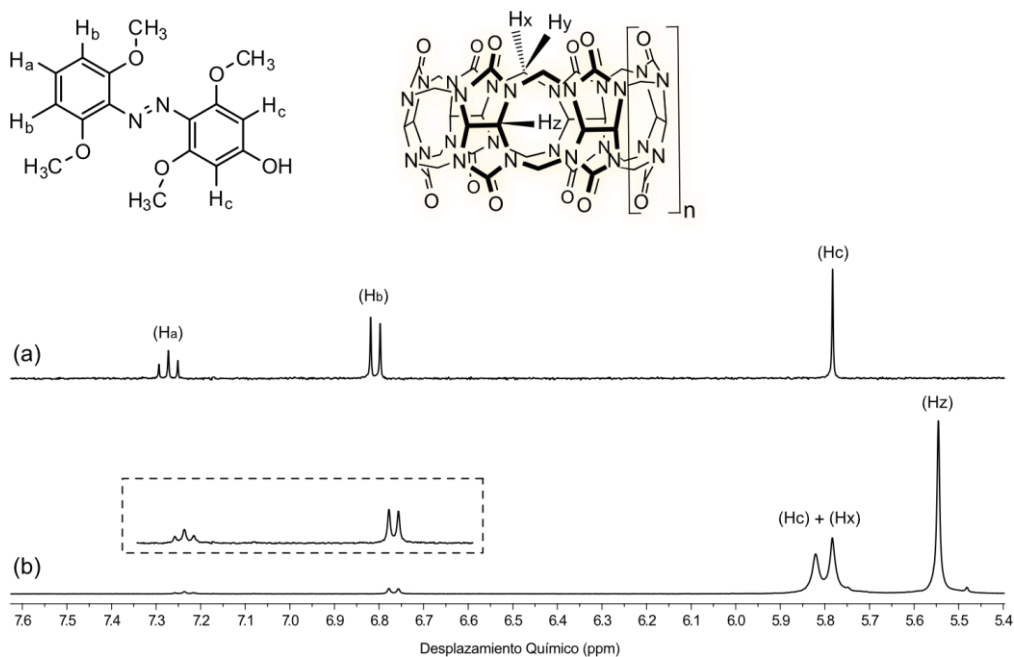
- Asimismo, como técnica de caracterización suplementaria se hizo uso de la espectroscopia  $^1\text{H-RMN}$ . El RMN nos aporta una información estructural, no suministrada por la espectroscopia UV-Vis, en relación a las interacciones entre los diferentes grupos de las moléculas de azobenceno y el cucurbiturilo. Todas las medidas fueron realizadas en el mismo disolvente, agua deuterada, a un pH controlado.

Los estudios de RMN se limitaron a mezclas de Azo 1, Azo 2 y CB7 debido a la limitada solubilidad de 4-aminoazobenceno y CB[8] en el rango de concentraciones milimolares.



**Figura 3.8.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 Hz) de la molécula Azo 1 en ausencia (a) y en presencia de CB[7] (b) a una concentración constante de azobenceno, un pD controlado de 3.53 (a) y 3.62 (b).

En la Figura 3.8 (a) se comparan los espectros de Azo 1 en ausencia y presencia de CB[7], los experimentos se realizaron en  $\text{D}_2\text{O}$  a un pD en torno a 3.53 y 7.4. Se aprecia como todas las señales aromáticas de Azo 1 se desplazan ligeramente a campos mayores. Esto está asociado a un apantallamiento, por parte de la nube electrónica del macrociclo, a los protones del azobenceno así como a la rígida estructura característica de los CB[n] y evidencia la formación de un complejo huésped-anfitrión.<sup>24</sup>



**Figura 3.9.** Espectros de  $^1\text{H-RMN } ^1\text{H-RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 Hz) de la molécula Azo 2 en ausencia (a) y en presencia de CB[7] (b) a una concentración constante de azobenceno y un pD controlado de 4.4 (a) y 3.87 (b).

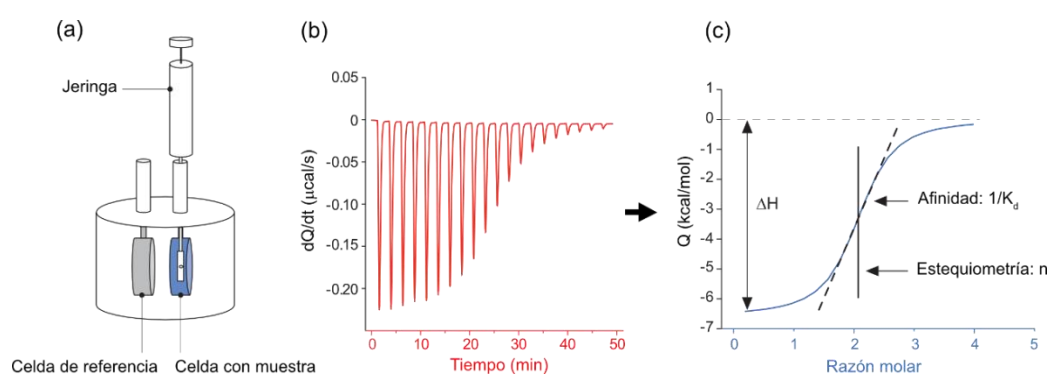
En la figura 3.9 la comparativa realizada trata los espectros realizados a concentraciones constantes Azo 2 en  $\text{D}_2\text{O}$  a un pD controlado de 4.4 en ausencia de CB[7] (a) y de 3.87 en presencia de un leve exceso de CB[7] (b). Al igual que para Azo 1, las señales de dicho azobenceno aparecen a desplazamientos levemente menores que se correlacionan a interacciones Azo 2-CB[7]. Cabe resaltar el hecho de que la señal asociada a los protones Hc de Azo 2 está solapada con una de las señales de los protones de los puentes metileno de CB[7]. Los experimentos de RMN confirman, de la misma manera que las pruebas basadas en la espectroscopia de absorción UV-Vis, que los azobencenos Azo 1 y Azo 2 interaccionan para formar complejos huésped-anfitrión con CB[7]. Además, en vista a los cambios en los espectros de RMN, puede que los anillos aromáticos de los azobencenos, asociados a las señales, queden parcialmente incluidos en la cavidad de CB[7].

- En vista de los resultados anteriores, se llevaron a cabo una serie de estudios basados en la técnica de **calorimetría de titulación isotérmica (ITC)** con la idea de cuantificar la estabilidad de al menos uno de los complejos de azobenceno-CB[n]. Se ha estimado oportuno incluir aquí una breve introducción a la técnica de ITC antes de presentar los resultados experimentales.

La calorimetría de titulación isotérmica, como técnica calorimétrica, mide directamente el flujo de calor asociado a un proceso que, a presión constante, es igual al cambio de entalpía. Los calorímetros utilizados para la caracterización de procesos de asociación se encuentran

principalmente dentro de la categoría de *titulación por compensación dinámica de energía* y operan a una temperatura constante.

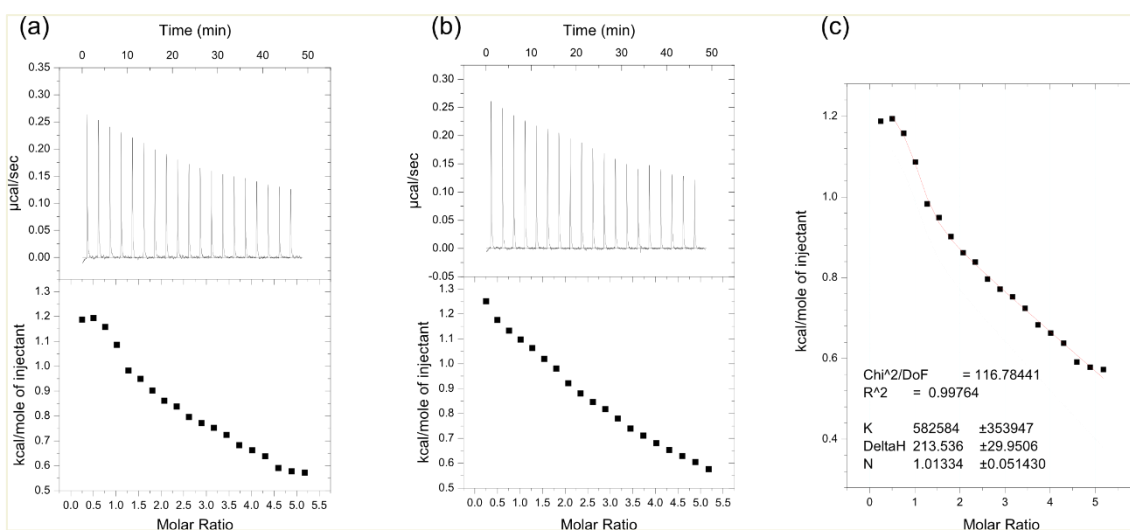
Se debe hacer notar tres aspectos prácticos de la técnica de ITC que justifican su empleo: (1) cualquier interacción receptor-sustrato (o huésped-anfitrión) libera o absorbe calor, (2) permite la determinación simultánea de los cambios de energía en cuanto entalpía ( $\Delta H$ ), entropía ( $\Delta S$ ), energía libre ( $\Delta G$ ), constante de asociación ( $K_a$ ) y la estequiometría ( $n$ ) del complejo receptor-sustrato a una temperatura constante. La afinidad de la unión entre el receptor y el sustrato “desplaza” el equilibrio entre las diferentes especies (asociadas y libres). (3) Se ha de tener en consideración el calor liberado o absorbido en la dilución de la molécula de sustrato.



**Figura 3.10.** Diagrama esquemático de un calorímetro de titulación isotérmica (a), datos brutos asociados a una reacción exotérmica (b), e integración de los datos brutos (c). Si el efecto térmico y la magnitud de la unión son los suficientemente grandes, se pueden determinar parámetros tales como la constante de equilibrio de asociación, el cambio de entalpía de unión y la estequiometría de la reacción. Imagen adaptada del folleto informativo del calorímetro Auto-Itc200 (MicroCal, GE Healthcare) que se puede encontrar en: <https://www.malvernpanalytical.com>

La Figura 3.10 muestra la representación esquemática de un calorímetro de ITC el cual consta de dos celdas idénticas. Una de ellas es la celda de referencia (llena con un disolvente, típicamente agua) y la otra, la celda de reacción, rellena con una disolución del receptor. El calorímetro también posee una jeringa exterior que se conecta a la celda de reacción, la cual va inyectando pequeñas cantidades de la disolución del sustrato. Cuando se realiza una inyección, el calorímetro detecta el calor liberado o absorbido como resultado de la interacción receptor-sustrato. Este proceso lleva asociada la detección de la potencia necesaria para mantener la temperatura constante de las celdas de referencia y de medida. Los cambios de temperatura asociados a la interacción entre receptor y sustrato son compensados por el equipo (a través de unos termopares), y la cantidad de energía que se proporciona (a una u otra celda), para recobrar la temperatura original, es equivalente a la que se ha liberado o absorbido en una inyección. La energía que hay que proporcionar en cada inyección queda representada como el área de un pico en el termograma (diagrama b de la Figura 3.10). En inyecciones subsiguientes, la cantidad de energía debida al reconocimiento entre el sustrato y

el receptor disminuye (b de la Figura 3.10), pues la cantidad de receptor libre en la celda de reacción es cada vez menor. En un experimento bien diseñado, las últimas titulaciones muestran una energía relativamente pequeña y constante, asociada únicamente al fenómeno de dilución del sustrato, pues prácticamente todas las moléculas de receptor se encuentran unidas a una molécula de sustrato. Integrando el área de cada pico, se obtiene la representación gráfica de la cantidad de energía proporcionada en cada inyección, normalizada por la concentración de sustrato, con respecto a la razón molar (diagrama c de la Figura 3.10). Tras ajustar estos valores a un modelo de enlace apropiado, se puede obtener la correspondiente isoterma de enlace que contiene los parámetros termodinámicos asociados a la interacción receptor-sustrato nombrados anteriormente.



**Figura 3.11.** Experimento de titulación de Azo1 con CB[8] mediante ITC en acetato de sodio 50 mM, pH 4.6 a 25 °C que incluye el termograma de titulación formado por los calores por unidad de tiempo (panel superior) y calores de titulación (panel inferior) generados tras la inyección del Azo 1 sobre CB[8] (a) y calor de dilución asociado a Azo1 (b) en las mismas condiciones que el experimento de titulación. La isoterma de unión (c) corresponde al mejor ajuste para el modelo de reconocimiento en el que la molécula anfitrión se une a un único sitio de unión de la molécula huésped y que incluye también los calores de dilución.

Para realizar el experimento de titulación, mediante ITC, se seleccionó el sistema de reconocimiento Azo1-CB[8] en una disolución tampón de acetato a pH 4.6. Se cargó, por un lado, la jeringa con una disolución de Azo 1 (especie titulante) a una concentración aproximada de 0,97 mM y, por otro lado, la celda con una disolución de CB[8] aproximadamente 0,04 mM (especie titulada). El termograma correspondiente y los calores asociados a la titulación se muestran en la Figura 3.11 (a). Además, también se llevó a cabo la misma experiencia con la diferencia de que la disolución de CB[8] en la celda se reemplazó por la disolución tampón (Figura 3.11 b). Esto permitió determinar los calores de dilución asociados a Azo 1. Se observa que la dilución de Azo 1 es un proceso endotérmico que depende de la concentración. Teniendo en cuenta los calores de dilución, los valores de calor

transferido por mol de ligando se representan frente al cociente de concentraciones [anfitrión]/[huesped] (o razón molar) de la titulación (Figura 3.11 a) y se pueden ajustar mediante regresión no lineal para obtener los parámetros  $n$ ,  $K_a$  y  $\Delta H$  (dejándolos como parámetros variables en dicho ajuste). El resto de parámetros termodinámicos que caracterizan la interacción se obtienen haciendo uso de las ecuaciones fundamentales.

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

### **Ecuación 3.1. Ecuaciones fundamentales termodinámicas**

Del ajuste de los datos se obtuvieron los siguientes parámetros termodinámicos que caracterizan la interacción Azo1-CB[8].

$$K_a = 5,8 \times 10^6 \text{ L/mol}$$

$$\Delta H = 0,21 \text{ kcal/mol}$$

$$-T \cdot \Delta S = -8,1 \text{ kcal/mol}$$

Asimismo, se determinó que la estequiometría de la reacción es aproximadamente igual a la unidad. Así, se puede afirmar que CB[8] es capaz de reconocer a una molécula de Azo 1, formando un complejo relativamente estable, y que dicha interacción está dominada por factores entrópicos. Estos resultados deben ser confirmados mediante titulaciones complementarias basadas en técnicas alternativas como por ejemplo la espectroscopia de absorción UV-Vis.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1. Instrumentamos empleados**

- **Resonancia magnética nuclear (RMN)** de  $^1\text{H}$ . Los espectros fueron registrados utilizando un equipo Bruker AV-400 (400 MHz) empleando la señal del disolvente como referencia. Se utilizó como disolvente  $\text{D}_2\text{O}$  a un pD controlado y  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Los desplazamientos químicos  $\delta$  están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento  $J$  tienen unidades de (Hz). La multiplicidad de las señales sigue la siguiente simbología: s, singlete; d, doblete; t, triplete; m, multiplete.
- **Espectroscopía Infrarroja (IR)**. Se ha empleado un espectrofotómetro FT/IR-4100 Jasco.
- **Espectrometría de masas (MS)**. Se ha realizado mediante un equipo Bruker MicroFlex.

- **Espectroscopia de absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis)**. Los espectros UV-Vis se utilizaron para caracterizar las moléculas azoicas sintetizadas y las interacciones huésped-anfitrión mediante los cucurbiturilos de 7 y 8 unidades. El equipo utilizado fue un Cary 50. Se emplearon cubetas de vidrio de 1 cm.
- **Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)**. Los ensayos de ITC se llevaron a cabo en un calorímetro Auto-Itc200 (MicroCal, GE Healthcare). En los dos ensayos la jeringa se rellenó con una disolución de Azo 1 (concentración final = 0.98 Mm, tampón de acetato de sodio 50 Mm, pH = 4.6). En uno de los ensayos Azo 1 se adicionó directamente sobre la disolución tampón contenida en la celda de medida. En el otro, la misma disolución de Azo 1 se adicionó sobre una disolución de CB[8] (concentración final de 0,04 mM). Cada ensayo consistió en una serie de 19 inyecciones con un volumen, cada una de 2  $\mu$ L. El espaciado entre cada inyección fue de 150 s.

#### 4.2. Síntesis y purificación del compuesto Azo 1

A un matraz de Erlenmeyer se añade 2,6-dimetoxianilina (1,51 g, 9,79 mmol) junto con agua (1,7 mL) y ácido clorhídrico al 37 % (2,7 mL), previamente enfriado a 0-5°C en un baño de hielo y agua. Sobre esta disolución se adiciona gota a gota una disolución de nitrito de sodio (0,744 g, 10,7 mmol) y agua (6,5 mL). La mezcla se mantiene agitando durante 20 min. Tras ese tiempo la sal de diazonio queda disuelta. A continuación dicha disolución se vierte sobre una mezcla de 3,5-dimetoxianilina (1,51 g, 9,86 mmol) y agua (60 mL) enfriada. La mezcla de reacción se mantiene agitando durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se añade una disolución saturada de hidrogenocarbonato sódico para neutralizar la mezcla de reacción. Por último, el sólido obtenido se filtra a vacío y se deja secando durante al menos 48 h.

El producto obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice a media presión utilizando como eluyente una mezcla 9:1 de diclorometano y metanol, y por recristalización empleando como disolvente tolueno en una pequeña cantidad de etanol. **Rto: 6%**.

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.13 (t, J = 8.3 Hz, 1H); 6,63 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 5,99 (s, 2H), 3,83 (s, 6H); 3,82 (s, 6H)

**MS:** 318,2; calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$  317,14

#### 4.3. Síntesis y purificación del compuesto Azo 2

En un Erlenmeyer, situado sobre un baño de hielo/agua a 0°C, se introducen 2,6-dimetoxianilina (1,50 g, 9,79 mmol), ácido clorhídrico al 35% (1,1 mL) y agua (2,7 mL). Al igual que en el apartado anterior, se adiciona gota a gota una disolución de nitrito sódico (0,700 g) y agua (10 mL) durante 20 min. Transcurrido este tiempo se adiciona dicha mezcla de manera lenta y progresiva, sobre una disolución de 3,5-dimetoxifenol (1,51 g, 9,79 mmol) e hidróxido de sodio (0,79 g, 11,45 mmol, 100 mL). Tras 5 días de reacción se acidifica la muestra mediante



ácido clorhídrico al 35 y al 11,2 % hasta la neutralidad. Finalmente el sólido sintetizado se filtra, se lava con agua destilada y se seca. La purificación del producto se realiza mediante cromatografía en columna de gel de sílice a media presión utilizando como eluyente una mezcla 98:2 de diclorometano y metanol. **Rto: 39 %.**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 7.27 (t, J = 8.5 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 8.5 Hz, 3H), 5.78 (s, 3H), 3.89 (s, 15H).

**MS:** 341,2; calculado para C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (M+Na<sup>+</sup>) 319,2

#### **4.4. Caracterización de los Azobencenos y de las interacciones huésped-anfitrión**

##### **4.4.1. Pruebas preliminares mediante espectroscopía UV-VIS**

Según la ley de Lambert Beer por la que se rige esta técnica, sólo se describe correctamente el comportamiento de las disoluciones inferiores a concentraciones de 10 mM. Igualmente, sólo son tolerables por la sensibilidad del método, aquellas medidas cuya absorbancia se encuentre en un rango entre 0,2 y 1,5 unidades. Teniendo en consideración estas ideas, se preparan 8 disoluciones de azobenceno en ausencia y en presencia de CB[7] y CB[8], en concentraciones constantes del compuesto azoico respectivo y a un pH tamponado (disolución tampón de acetato) de pH 4.6.

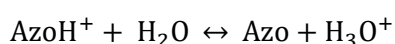
Para 4-aminoazobenceno, debido a su limitada solubilidad en medio acuoso, se prepara una disolución diluida de 30 µM a partir de otra más concentrada. De Azo 1 se hace uso de una disolución 27 µM. Para Azo 2 se prepara una disolución 28 µM. Las disoluciones en presencia de CB[n]s se realizan con un ligero exceso de CB[7] y con una cantidad equimolecular de CB[8].

##### **4.4.2. Determinación del pK<sub>a</sub> del Azo 1**

La determinación del pK<sub>a</sub> se realiza por espectroscopia de absorción UV-Vis mediante la medida continua de una disolución de ácido clorhídrico 10 mM con una concentración de Azo 1 constante (26,4 µM) sobre la cual se adicionan pequeñas y determinadas alícuotas de una disolución de hidróxido de sodio 10 mM con una concentración de Azo 1 constante (26,4 µM) a diferentes valores de pHs controlados.

La determinación matemática del pK<sub>a</sub> se realiza mediante la aplicación de la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

Para bases queda descrito generalmente el pK<sub>a</sub> del ácido conjugado



Siendo la constante de acidez:

$$K_a = \frac{[Azo] \cdot [H_3O^+]}{[AzoH^+]}$$

**Ecuación 4.1.** Definición matemática de la constante de asociación

La ecuación anterior se puede reorganizar para dar:

$$-\log K_a = -\log[H^+] - \log \frac{Azo}{AzoH^+}$$

**Ecuación 4.2.** Reorganización de la definición matemática de la constante de asociación

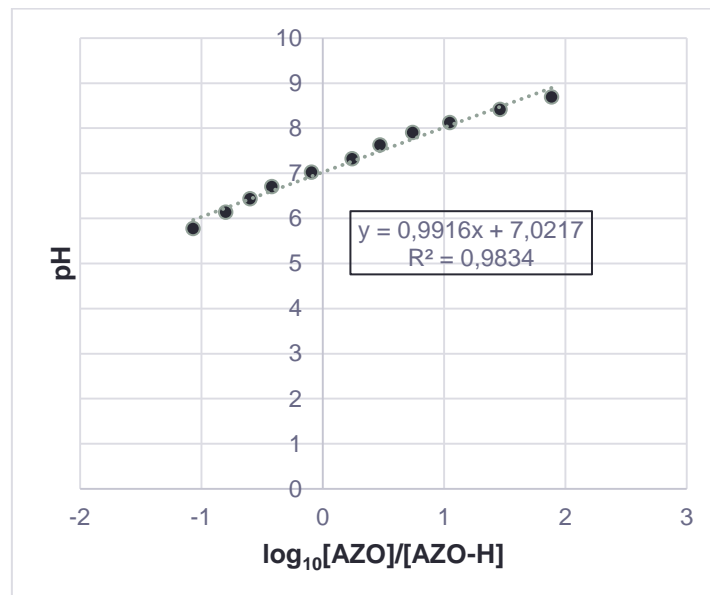
Mediante el registro de los cambios en el espectro de Azo1 a concentración constante y pH controlado se puede extraer el valor de  $K_a$ . Aplicando la ley de Lambert Beer se puede llegar a la siguiente ecuación que relaciona el cociente  $[Azo]/[AzoH^+]$  con los cambios en el espectro de absorción a pH variable.

$$\frac{[Azo]}{[AzoH^+]} = \frac{(Abs_{\lambda_2} - Abs_{\lambda_2min}) \cdot Abs_{\lambda_1m\acute{a}x}}{Abs_{\lambda_2m\acute{a}x} \cdot (Abs_{\lambda_1} - Abs_{\lambda_1min})}$$

**Ecuación 4.3.** Relación del cociente  $[Azo]/[AzoH^+]$  con la variación del espectro de absorción a diferentes pHs.

Para ( $\lambda_1$ ) la absorción de la forma ionizada es dominante mientras que en ( $\lambda_2$ ), la absorción dominante es la de la forma neutra

En base a la ecuación 4.3, al representar  $\log_{10}([Azo]/[AzoH^+])$  frente a pH se debe obtener una línea recta cuya intersección con el eje de ordenadas es el valor de  $pK_a$  (Figura 5.9).



**Figura 5.9.** Representación gráfica del pH a diferentes valores de concentración del cociente de  $\log_{10} [AZO]/[AZO-H]$

## 5. CONCLUSIÓN

En vista de los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- Se han sintetizado dos derivados de azobenceno, *Azo 1* y *Azo 2*, con grupos -O-CH<sub>3</sub> en las posiciones *orto* de los anillos aromáticos con respecto al grupo azo (-N=N-). Las propiedades ópticas se han caracterizado por espectroscopia de absorción UV-Vis y se ha observado que *Azo 1* y *Azo 2* presentan bandas de absorción en la región de 400 a 500 nm a un pH de 4.6. Estas bandas aparecen, en las mismas condiciones de medida, a mayores longitudes de onda que las correspondientes a 4-aminoazobenceno (compuesto análogo a *Azo 1* sin los grupos -O-CH<sub>3</sub>).
- Se ha determinado que el valor del pK<sub>a</sub> aparente de *Azo 1* es pK<sub>a</sub> = 7.0. Este estudio se ha llevado a cabo mediante una titulación ácido-base basada en la técnica de espectroscopia de absorción UV-Vis. Las diferencias en cuanto a las propiedades ácido-base de 4-aminoazobenceno y *Azo 1*, con valores de pK<sub>a</sub> aproximados de 3 y 7 respectivamente, se pueden atribuir a los sustituyentes -O-CH<sub>3</sub>. La presencia de estos grupos estabiliza la forma ionizada de *Azo 1* a valores de pH relativamente altos. Así, a pH = 4.6, la forma ionizada es dominante para *Azo 1* mientras que para 4-aminoazobenceno es minoritaria. Esto también explica las diferencias en las propiedades ópticas discutidas previamente.
- Se han llevado a cabo estudios para describir el reconocimiento en medio acuoso entre *Azo 1* y *Azo 2*, y CB[n]s, con n = 7 y 8 basados en las técnicas de espectroscopia de absorción UV-Vis, RMN e ITC. El análisis mediante espectroscopia de absorción UV-Vis corrobora la formación de complejos azobenceno-CB[7] y azobenceno-CB[8]. Considerando los espectros de RMN de protón de mezclas de azobenceno y CB[7], se puede apuntar que en las formas asociadas de *Azo 1* y *Azo 2* el azobenceno queda incluido en la cavidad del macrociclo. Por último, los ensayos de ITC del sistema CB[8]-*Azo 1* indican que la interacción de estas moléculas en disolución se puede describir adecuadamente con un modelo de unión 1:1. Los estudios indican que el complejo CB[8]-*Azo 1* se forma con una K<sub>a</sub> ~ 5.8 × 10<sup>6</sup> L/mol y que el fenómeno de reconocimiento está dominado por factores entrópicos. Conviene remarcar que es necesario contrastar estos resultados mediante técnicas complementarias para corroborar tanto la estequiometría como los parámetros termodinámicos extraídos.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Assaf, K. I.; Nau, W. M. Cucurbiturils: From Synthesis to High-Affinity Binding and Catalysis. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (2), 394–418.
- (2) Barrow, S. J.; Kasera, S.; Rowland, M. J.; del Barrio, J.; Scherman, O. A. Cucurbituril-Based Molecular Recognition. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (22), 12320–12406.
- (3) Lagona et Al. - 2005 - The Cucurbit[n]Uril Family.Pdf.
- (4) Zhao, J.; Zhang, Y.-M.; Sun, H.-L.; Chang, X.-Y.; Liu, Y. Multistimuli-Responsive Supramolecular Assembly of Cucurbituril/Cyclodextrin Pairs with an Azobenzene-Containing Bispyridinium Guest. *Chemistry - A European Journal* **2014**, *20* (46), 15108–15115.
- (5) Huang, Z.; Qin, K.; Deng, G.; Wu, G.; Bai, Y.; Xu, J.-F.; Wang, Z.; Yu, Z.; Scherman, O. A.; Zhang, X. Supramolecular Chemistry of Cucurbiturils: Tuning Cooperativity with Multiple Noncovalent Interactions from Positive to Negative. *Langmuir* **2016**, *32* (47), 12352–12360.
- (6) Mohanty, J.; Bhasikuttan, A. C.; Nau, W. M.; Pal, H. Host–Guest Complexation of Neutral Red with Macrocyclic Host Molecules: Contrasting  $pK_a$  Shifts and Binding Affinities for Cucurbit[7]Uril and  $\beta$ -Cyclodextrin. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (10), 5132–5138.
- (7) Liu, S.; Ruspic, C.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Zavalij, P. Y.; Isaacs, L. The Cucurbit[n]Uril Family: Prime Components for Self-Sorting Systems. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (45), 15959–15967.
- (8) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. The Cucurbit[n]Uril Family. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (31), 4844–4870.
- (9) Zhang, P.; Gao, X.; Liu, M.; Liang, L.; Wang, J.; Cui, L.; Zhang, M.; Li, H.; Wang, Y. A New Cucurbit[6]Uril Based Supramolecular Assembly for Sensing Small Organic Solvents and Rapid Adsorption of Reactive Blue 19 Dye. *Inorganic Chemistry Communications* **2018**, *90*, 78–81.
- (10) Lasheras, J. D. B. Azopolímeros quirales y nuevas arquitecturas en copolímeros bloque azoicos: síntesis, caracterización y propiedades ópticas. **2010**, 318.
- (11) Ribagorda, M.; Merino, E. Fotoisomerización de azobencenos: movimientos moleculares a la carta. *An. Quím.* **2009**, 10.
- (12) El Halabieh, R. H.; Mermut, O.; Barrett, C. J. Using Light to Control Physical Properties of Polymers and Surfaces with Azobenzene Chromophores. *Pure and Applied Chemistry* **2004**, *76* (7–8), 1445–1465.
- (13) Samanta, S.; Babalhavaeji, A.; Dong, M.; Woolley, G. A. Photoswitching of *Ortho*-Substituted Azonium Ions by Red Light in Whole Blood. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (52), 14127–14130.
- (14) Rullo, A.; Reiner, A.; Reiter, A.; Trauner, D.; Isacoff, E. Y.; Woolley, G. A. Long Wavelength Optical Control of Glutamate Receptor Ion Channels Using a Tetra-*Ortho*-Substituted Azobenzene Derivative. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (93), 14613–14615.
- (15) Dong, M.; Babalhavaeji, A.; Hansen, M. J.; Kálmán, L.; Woolley, G. A. Red, Far-Red, and near Infrared Photoswitches Based on Azonium Ions. *Chemical Communications* **2015**, *51* (65), 12981–12984.
- (16) Abad M. Block copolymers for stimuli responsive nanometric systems. *Final Master Project*, **2016**.
- (17) Wang, D.; Wagner, M.; Butt, H.-J.; Wu, S. Supramolecular Hydrogels Constructed by Red-Light-Responsive Host–Guest Interactions for Photo-Controlled Protein Release in Deep Tissue. *Soft Matter* **2015**, *11* (38), 7656–7662.

- (18) Weis, P.; Wang, D.; Wu, S. Visible-Light-Responsive Azopolymers with Inhibited  $\pi$ - $\pi$  Stacking Enable Fully Reversible Photopatterning. *Macromolecules* **2016**, *49* (17), 6368–6373.
- (19) Merino, E. Synthesis of Azobenzenes: The Coloured Pieces of Molecular Materials. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (7), 3835.
- (20) Klotz, I. M.; Fiess, H. A.; Chen Ho, J. Y.; Mellody, M. The Position of the Proton in Substituted Azobenzene Molecules. *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76* (20), 5136–5140.
- (21) Weston, C. E.; Richardson, R. D.; Fuchter, M. J. Photoswitchable Basicity through the Use of Azoheteroarenes. *Chemical Communications* **2016**, *52* (24), 4521–4524.
- (22) M. Shaikh, J. Mohanty, P. K. Singh, W. M. Nau, H. Pal, Photochem. Photobiol. Sci. 2008, 7, 408-414
- (23) Lamp, B. Spectrophotometric Determination Of The Pka Of Bromothymol Blue. 7.
- (24) Wu, J.; Isaacs, L. Cucurbit[7]Uril Complexation Drives Thermal *Trans* - *Cis* -Azobenzene Isomerization and Enables Colorimetric Amine Detection. *Chemistry - A European Journal* **2009**, *15* (43), 11675–11680.

## ANEXOS

### A. MECANISMO DE UN ACOPLAMIENTO AZOICO

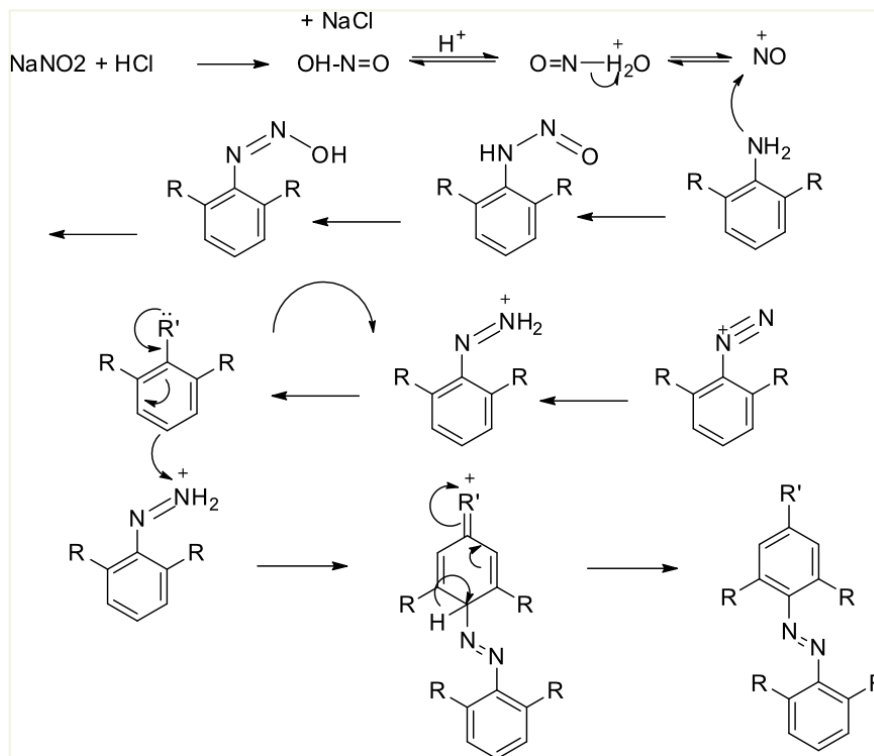


Figura 5.1. Esquema sintético de moléculas de tipo Azobenceno mediante acoplamiento azoico

### B. ESPECTROS (1H-RMN)

#### Azo 1

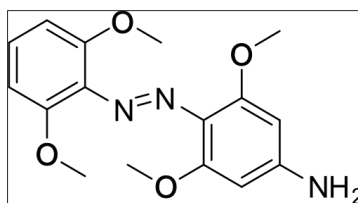
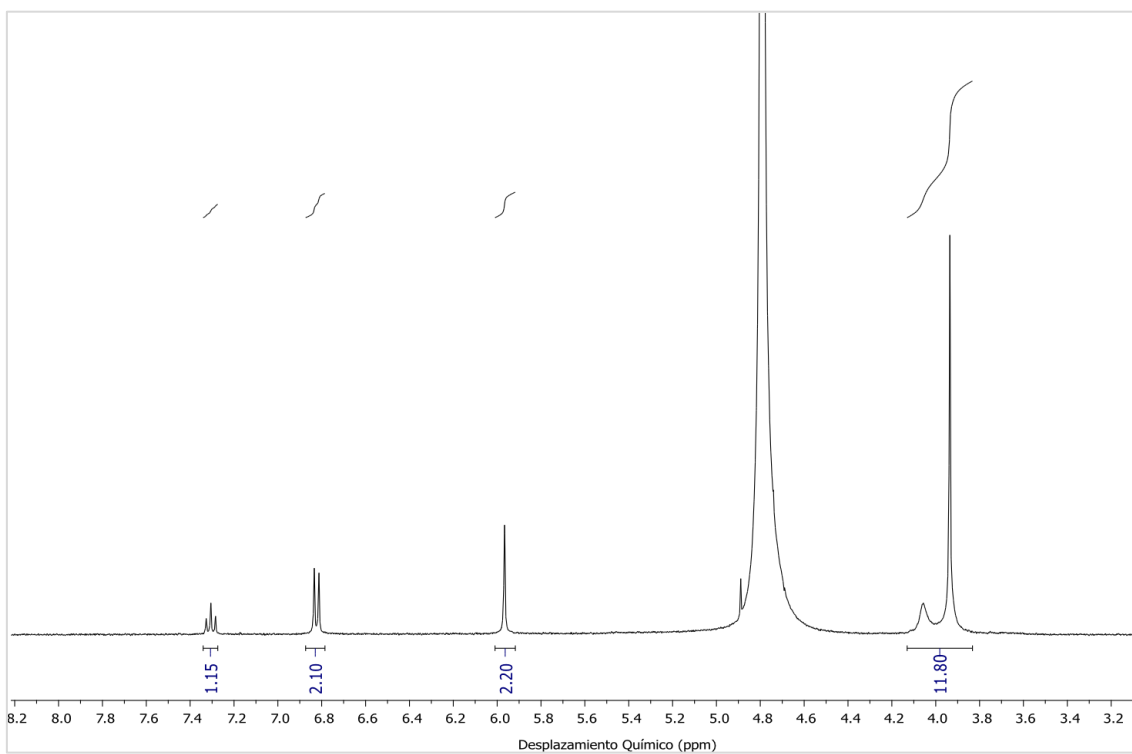
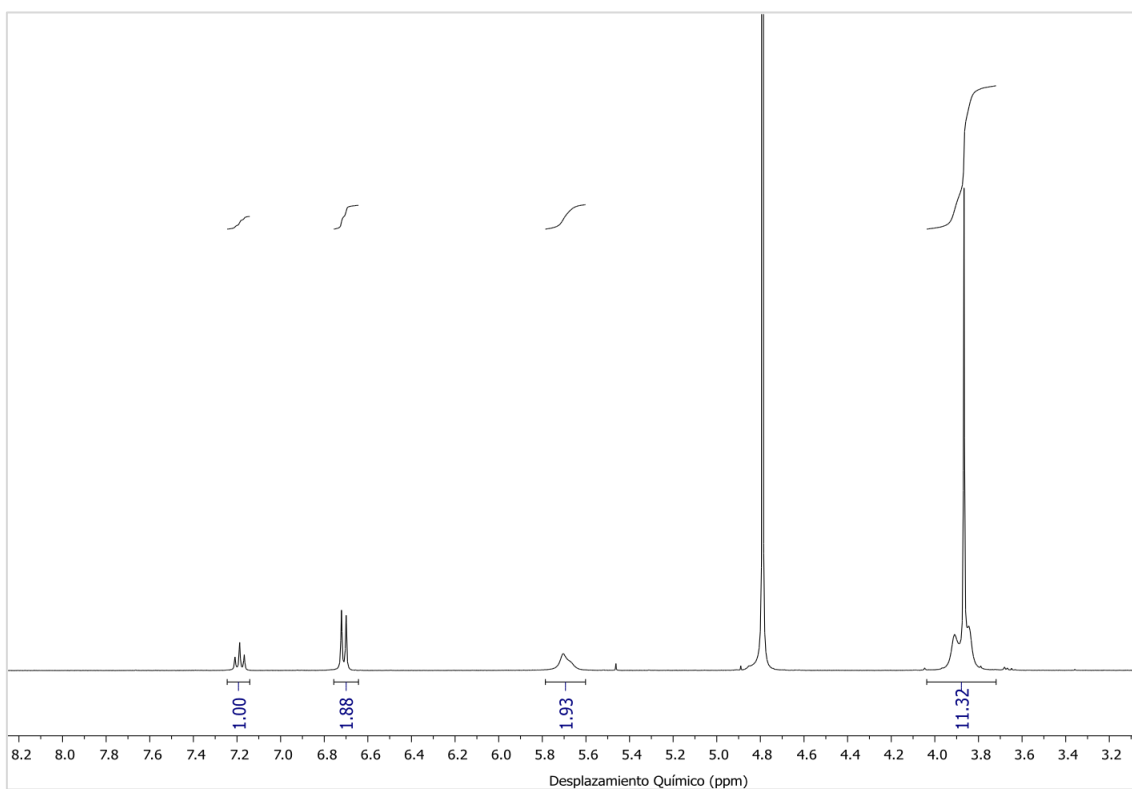


Figura 5.2. Estructura molecular de Azo 1



**Figura 5.3.** Espectro de  $1H$ -RMN ( $D_2O$ , 400 MHz) para Azo 1 simétrico a un pD de 3,53.



**Figura 5.4.** Espectro de  $1H$ -RMN ( $D_2O$ , 400 MHz) para Azo 1 a baja simetría a un pD aproximadamente de 7,4.

## Azo 2

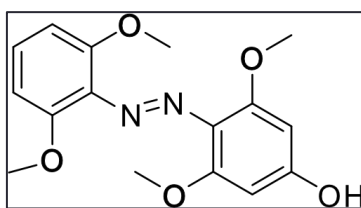


Figura 5.5. Estructura molecular de Azo 1

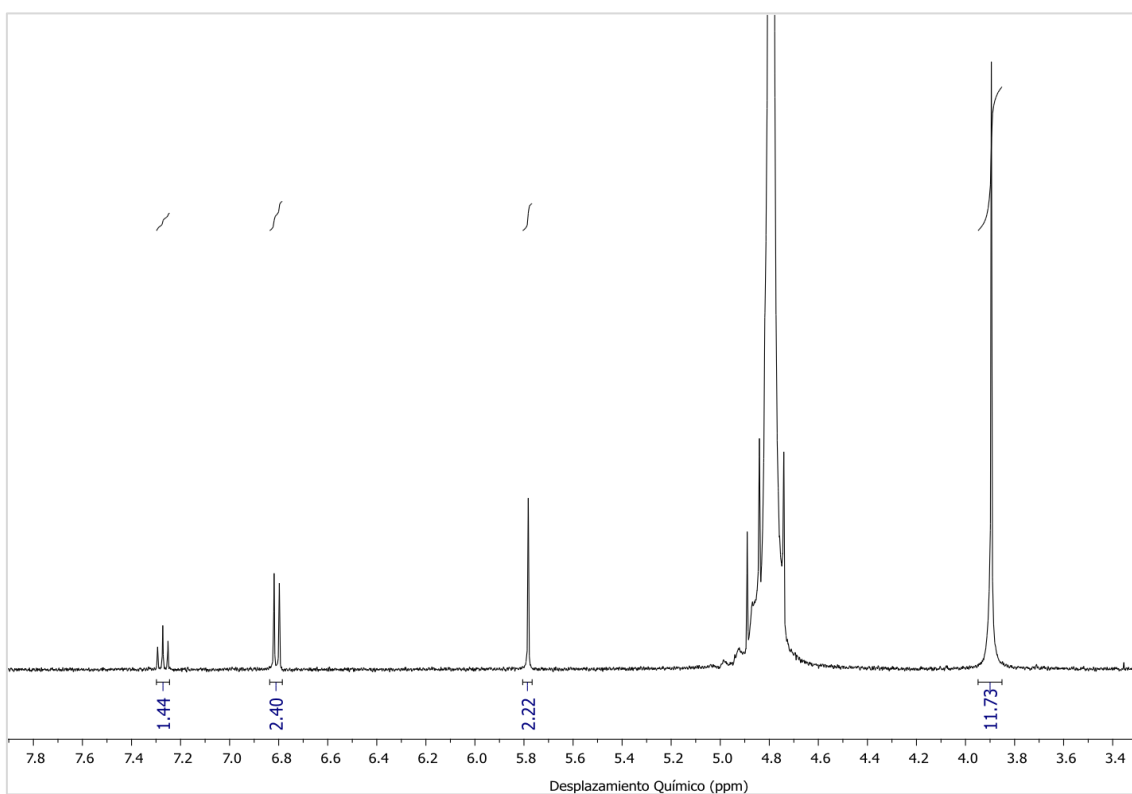
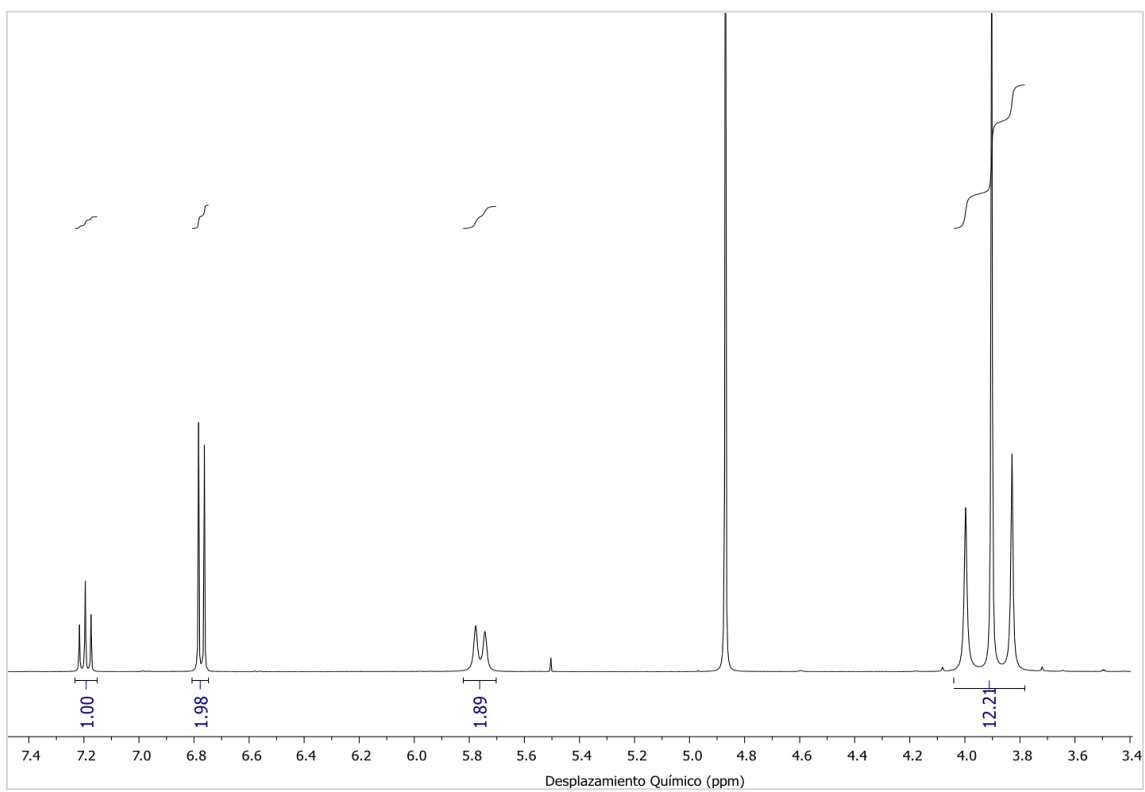


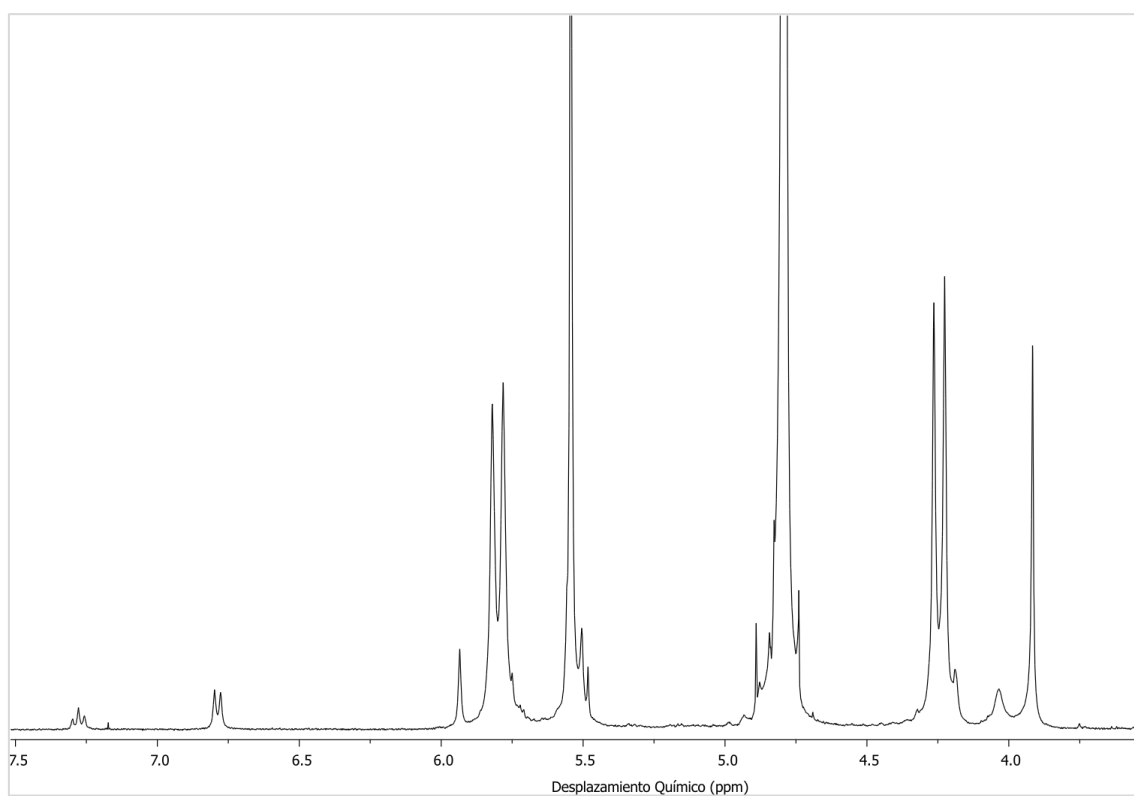
Figura 5.6. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) para Azo 2 simétrico a un pD de 4,4





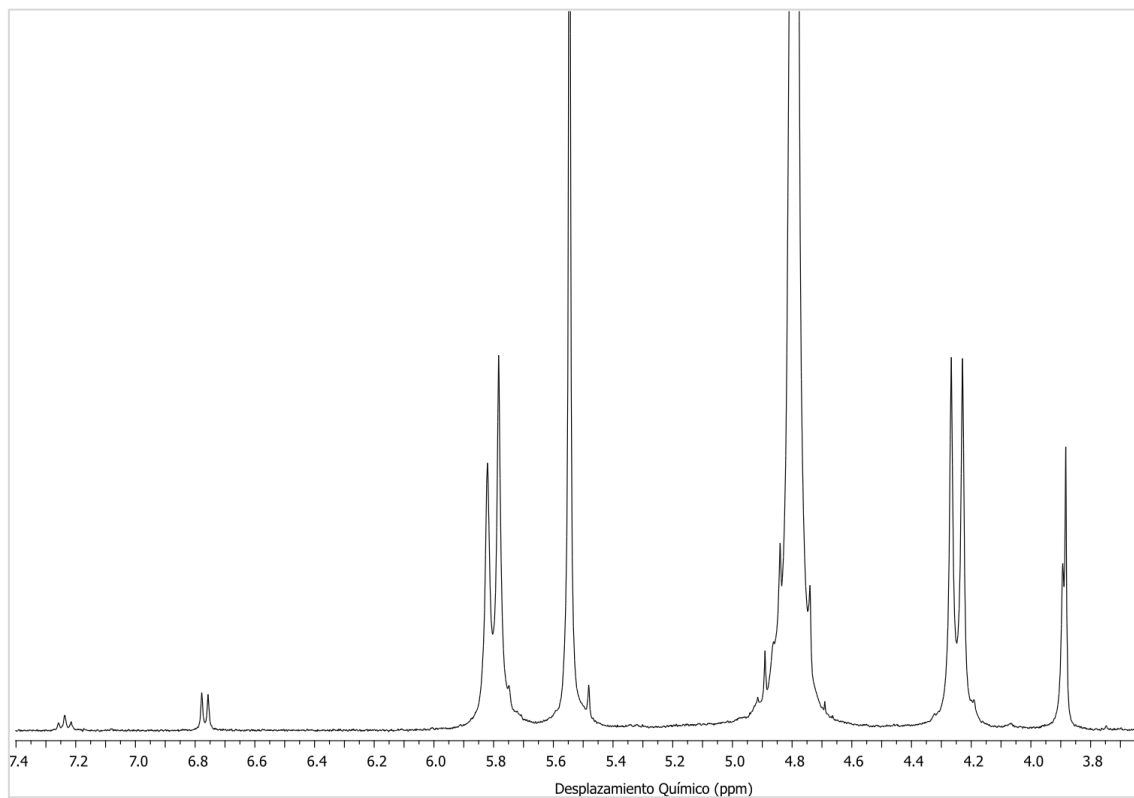
**Figura 5.7.** Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) para Azo 2 a baja simetría.

**.Complejo huésped-anfitrión con Azo 1**



**Figura 5.8.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN ( $D_2O$ , 400 MHz) para el sistema Azo1-CB[7] a un pD de 3,62 y una concentración constante de azobenceno 1 mM

## Complejo huésped-anfitrión con Azo 2



**Figura 5.9.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN ( $D_2O$ , 400 MHz) para el sistema Azo2-CB[7] a un pH de 3,87 y una concentración constante de azobenceno 1 mM.

### C. ESPECTROS (IR)

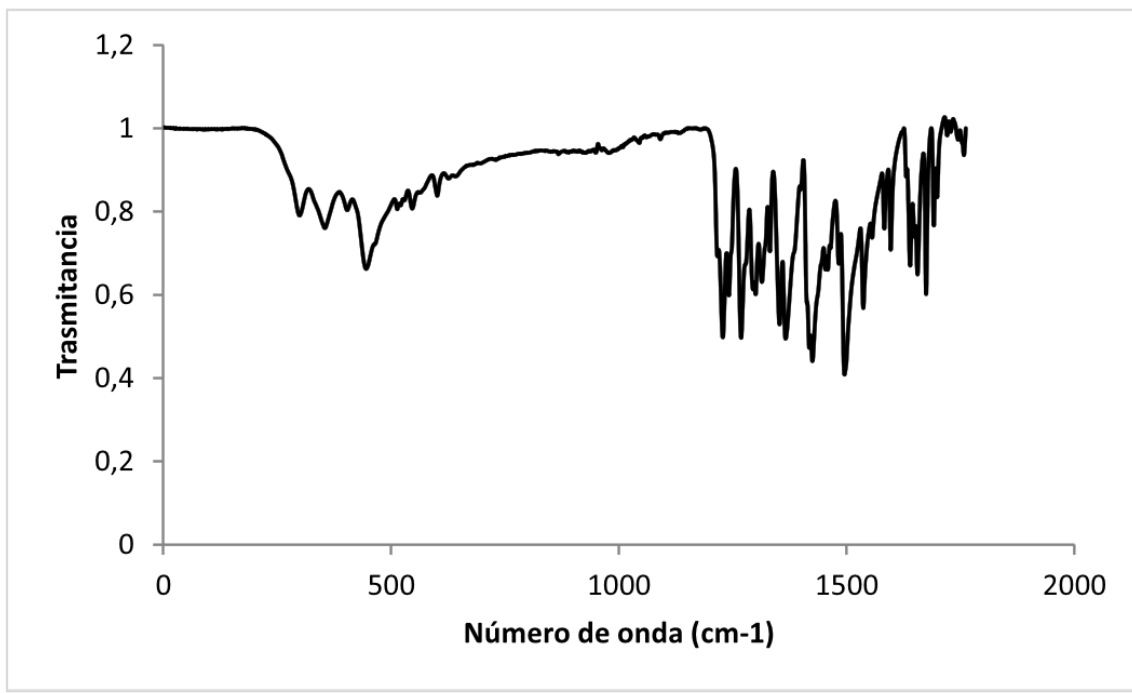


Figura 5.10. Espectro Infrarrojo Azo 1

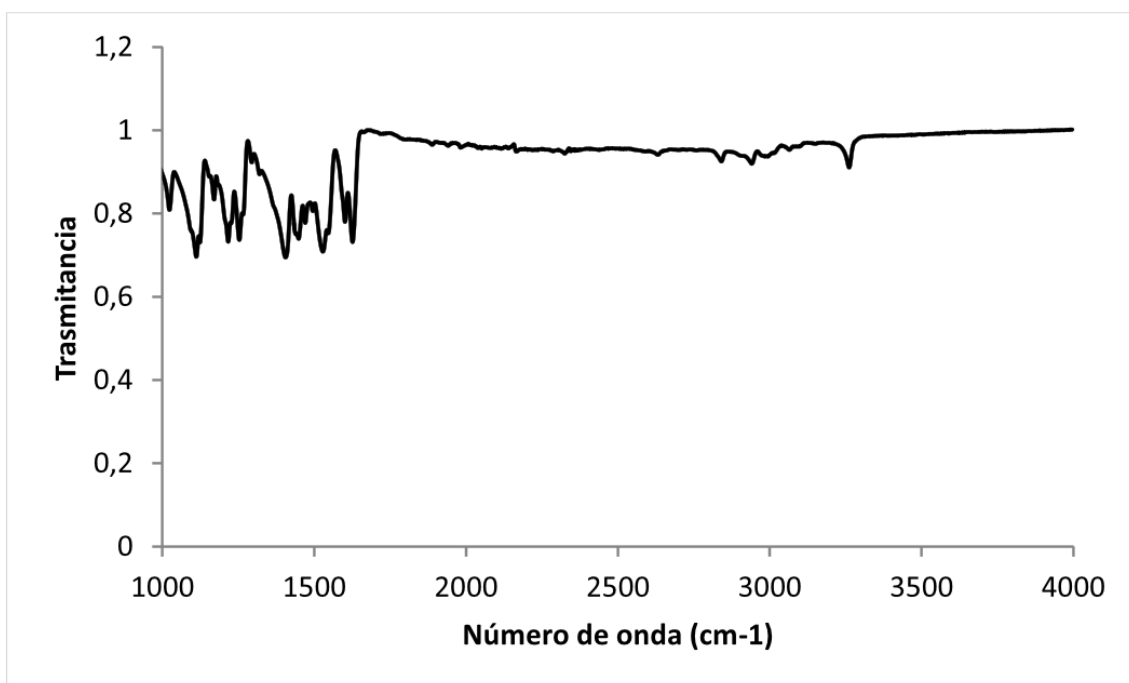


Figura 5.11. Espectro infrarrojo Azo 2

## D. ESPECTROS (MS)

Azo 1

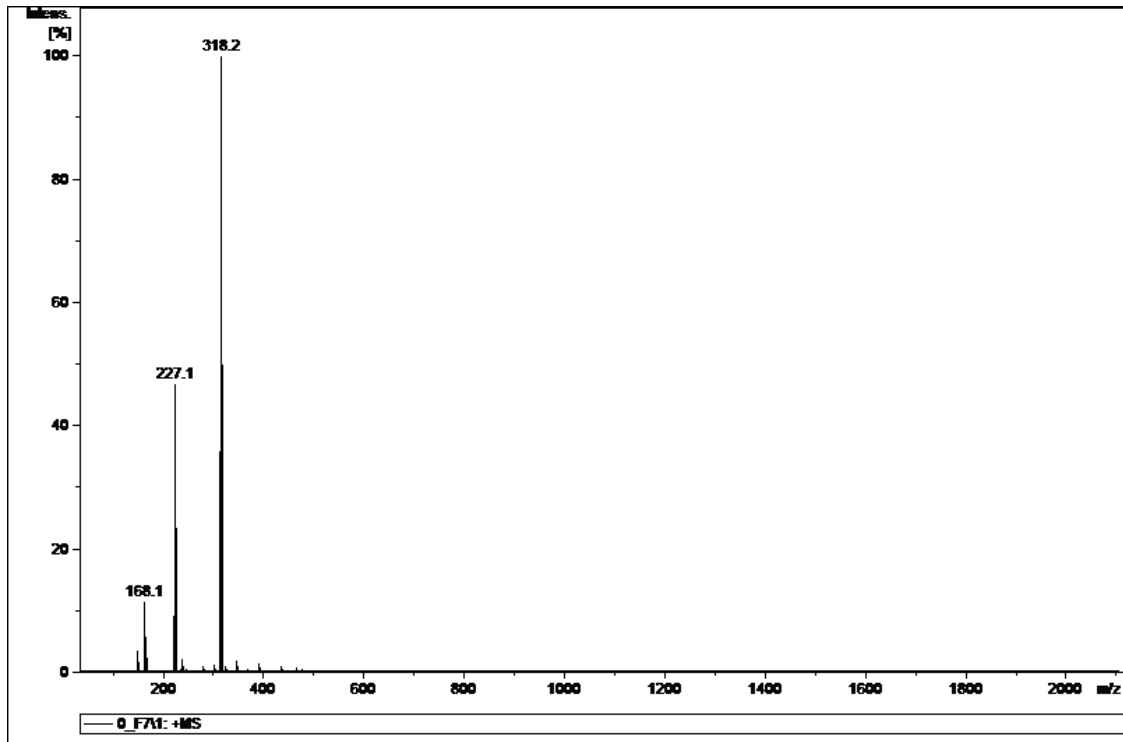


Figura 5.12. Espectro de masas de Azo 1 con una relación  $m/z=318,2$

## Azo 2

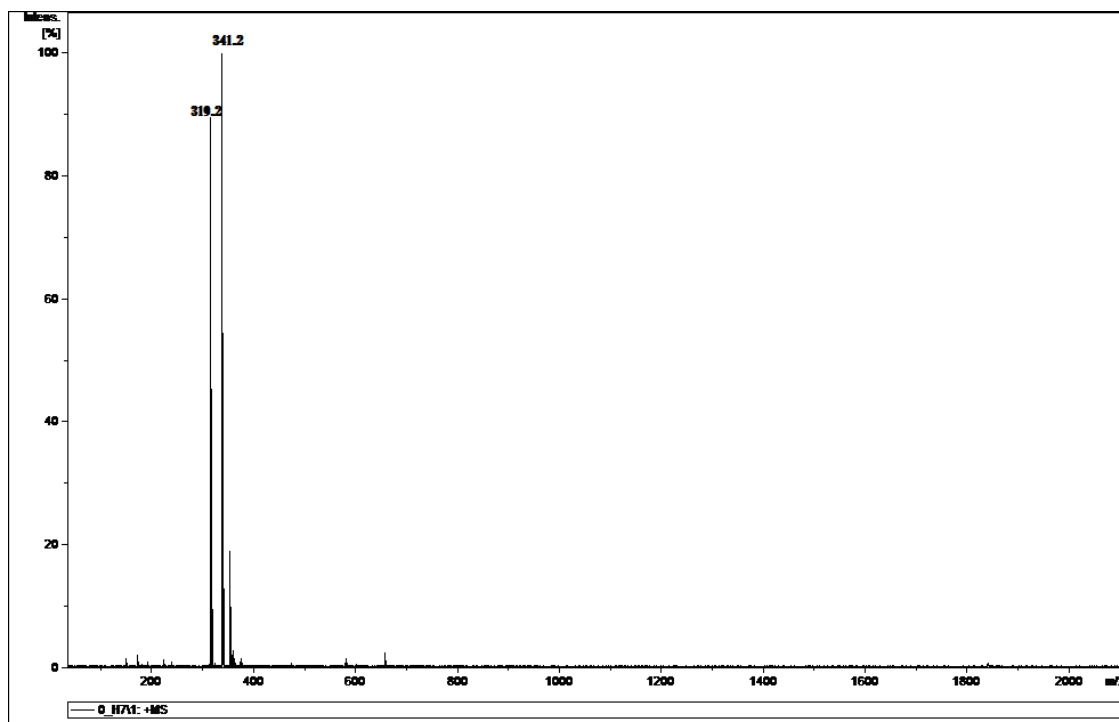


Figura 5.13. Espectro de masas de Azo 2 con una relación  $m/z=319,2$

## E. ESPECTROS (UV-Vis)

### Determinación del $pK_a$ .

pH	Abs: 365 nm	Abs: 460 nm
3,46	0,169	0,635
4	0,169	0,628
5,77	0,203	0,63
6,13	0,227	0,59
6,43	0,253	0,549
6,7	0,28	0,495
7,02	0,336	0,389
7,32	0,392	0,289
7,62	0,42	0,235
7,9	0,445	0,191
8,12	0,461	0,161
8,41	0,467	0,141
8,69	0,475	0,133
9	0,477	0,128
9,49	0,481	0,123
10	0,483	0,123
10,67	0,49	0,125
11,75	0,501	0,128

**Tabla 5.1.** Valores de absorbancia medidas a valores concretos de pH; en la prueba de determinación del  $pK_a$  de Azo 1.