



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Determinació de la presència d'ions biològicament rellevants en mostres aquoses

Francesca Julià i Florit

**Grau de Química**

Any acadèmic 2017-18

Treball tutelat per Dra. María del Carmen Rotger Pons  
Departament de Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Reconeixement molecular, enllaç d'hidrogen, anions, receptors, esquaramides, espectroscòpia UV-Vis.



# Índex

---

<b>1. Introducció</b> .....	<b>4</b>
1.1. Reconeixement molecular d'anions .....	4
1.2. Molècules d'estudi: esquaramides .....	8
1.2.1. <i>Esquaramides secundàries: formació d'enllaços d'hidrogen</i> .....	8
1.3. Estudis de reconeixement molecular. Determinació de les constants d'associació receptor-substrat .....	9
1.3.1. <i>Espectroscòpia UV-Vis aplicada al reconeixement molecular</i> .....	10
1.4. Assajos per desplaçament d'indicador (IDA) .....	10
1.5. Antecedents .....	12
1.5.1. <i>Receptors esquaramídics</i> .....	12
1.5.2. <i>Reconeixement d'anions en cloroform i aigua mitjançant valoracions per espectroscòpia UV-Vis</i> .....	14
<b>2. Objectius</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Resultats i discussió</b> .....	<b>15</b>
3.1. Estudi de l'associació dels receptors E-167 i E-177 per espectroscòpia UV-Vis amb oxoanions de rellevància biològica .....	15
3.1.1. <i>Condicions de treball</i> .....	15
3.1.2. <i>Anions estudiats</i> .....	16
3.1.3. <i>Valoracions per espectroscòpia UV-Vis amb el receptor E-167</i> .....	17
3.1.4. <i>Valoracions per espectroscòpia UV-Vis amb el receptor E-177</i> .....	23
3.1.5. <i>Comparació del dos receptors a partir dels resultats obtinguts</i> .....	27
3.2. Assajos per desplaçament d'indicador (IDA) .....	27
<b>4. Procediment experimental</b> .....	<b>30</b>
4.1. Metodologia utilitzada en les valoracions per espectroscòpia UV-Vis .....	30
4.2. Metodologia utilitzada en els assajos per desplaçament d'indicador (IDA) .....	31
<b>5. Conclusions</b> .....	<b>32</b>

# 1. Introducció

## 1.1. Reconeixement molecular d'anions

El reconeixement molecular d'anions és una de les principals branques d'estudi de la Química Supramolecular a causa del paper fonamental que aquests presenten a la naturalesa ja que més del 70% dels cofactors i els substrats implicats en processos biològics són anions<sup>1</sup>, així com en medicina, catàlisi, ciències ambientals, biologia i química. Per aquest motiu, el disseny i síntesi de receptors que són capaços d'acomplexar-se amb anions és una de les àrees més estudiades a l'actualitat, i al llarg dels darrers anys, ha estat un pilar fonamental en el desenvolupament de multitud d'aplicacions com és la fabricació de sensors òptics basats en el reconeixement receptor-anió, el disseny de nous sistemes per mesurar el transport d'anions a través de les membranes cel·lulars, el desenvolupament de processos organocatalítics en els quals s'involucra la complexació d'anions, etc.<sup>2</sup>

Per dur a terme un reconeixement eficient, és desitjable que el receptor estableixi interaccions intermoleculares no covalents amb l'anió, és a dir, que sigui capaç d'unir-se a l'anió mitjançant interaccions per enllaç d'hidrogen, electrostàtiques i de Van der Waals.<sup>3</sup>

Les interaccions electrostàtiques, generalment dominen sobre qualsevol altre tipus de interacció i són particularment molt importants per estabilitzar els anions en solució.<sup>4</sup> No obstant això, les interaccions per enllaç d'hidrogen són de les més estudiades en Química Supramolecular a causa de la direccionalitat que ofereixen.<sup>5</sup> Ofereixen l'oportunitat de sintetitzar receptors neutres que adequadament dissenyats es poden unir a anions amb diferents geometries en dissolvents polars pròtics. Per exemple, les urees (Figura 1.1.1.) i les amides són grups funcionals molt utilitzats per establir enllaços d'hidrogen mentre que receptors que presenten grups pirrois, com és el cas dels calixpirrois (Figura 1.1.2.), generen una cavitat a on es poden establir interaccions anió- $\pi$ <sup>6</sup> o d'enllaç d'hidrogen amb anions<sup>7</sup>. Combinant les interaccions electrostàtiques i les d'enllaç d'hidrogen es poden sintetitzar receptors molt eficaços, com per exemple receptors que contenen grups imidazol i guanidinis (Figura 1.1.3.) que treballen en dissolvents aquosos.<sup>3</sup> Els grups guanidinis, que es troben a les cadenes laterals de les arginines, tenen un paper molt important ja que estabilitzen estructures terciàries de proteïnes formant ponts salins entre carboxilats i participen als centres de reconeixement de substrats aniònics a enzims i anticossos.<sup>8</sup> Presenten carga positiva permanent a pH fisiològic ( $pK_a \sim 13.5$ ).

El receptor ureic que s'indica a la Figura 1.1.1. presenta una elevada afinitat d'unió amb l'anió benzoat ( $K_a=2,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ). També pot interaccionar amb altres anions com són el sulfat, el fosfat i el carboxilat en dissolvents poc polars i en diclorometà formant un complex 1:1 estabilitzat pels enllaços d'hidrogen que es formen.<sup>9</sup>

<sup>1</sup> A. Bianchi, K. B.-James, and E. G.-España, *Anion Coordination Chemistry*, First edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., **2012**.

<sup>2</sup> N. Busschaert, C. Caltagirone, W. Van Rossom, and P. A. Gale, *Chem. Rev.* **2015**, *115* (15), 8038-8155.

<sup>3</sup> N. H. Evans, P.D. Beer, *Angew. Chem. Int.* **2014**, *53*, 11716-11754.

<sup>4</sup> J. L. Sessler, P. A. Gale, W.S. Cho, *Anion Receptor Chemistry*, RSC Publishing, **2006**.

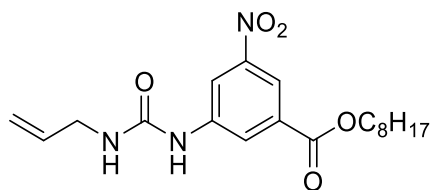
<sup>5</sup> G. R. Desiraju, T. Steiner, *The Weak Hydrogen Bond In Structural Chemistry and Biology*, Oxford University Press, **1999**

<sup>6</sup> P. Ballester, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (4), 874-884.

<sup>7</sup> P. A. Gale, J. L. Sessler, V. Král, and V. Lynch, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (21), 5140-5141.

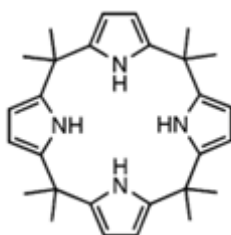
<sup>8</sup> P. Blondeau, M. Segura, R. Pérez-Fernández, and J. de Mendoza, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 198-210.

<sup>9</sup> Zhan-Ting Li, Li-Zhu Wu, *Hydrogen Bonded Supramolecular Structures*, Lecture Notes in Chemistry **87**, **2016**.



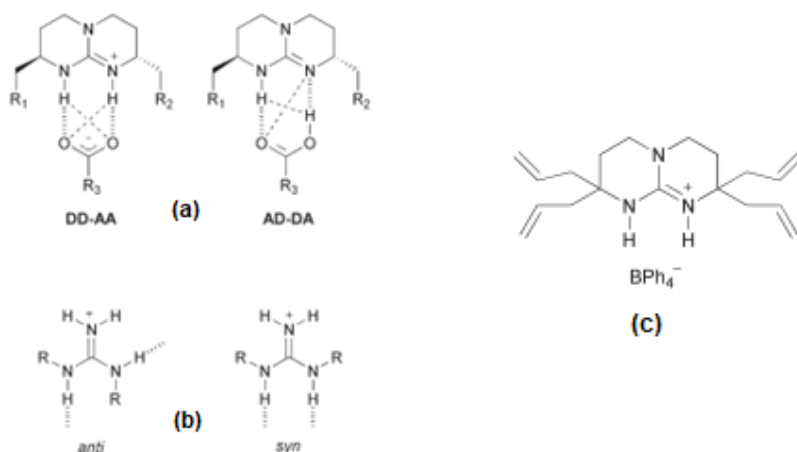
**Figura 1.1.1.** Receptor ureic dissenyat per reconèixer anions.<sup>9</sup>

La interacció del receptor Calix [4]pirrol (Figura 1.1.2.) amb varies sals de clorur, com és el clorur de tetrabutilamoni, ha estat estudiada mitjançant valoracions per espectroscòpia <sup>1</sup>H-RMN en diferents medis orgànics. S'ha observat que els valors de les constants d'associació obtingudes ( $K_a$ ) són fortament dependents del dissolvent orgànic utilitzat, variant en un rang de  $10^2$ - $10^5$   $M^{-1}$ : acetonitril ( $K_a=2,5 \cdot 10^5$   $M^{-1}$ ), DMSO ( $K_a= 2,2 \cdot 10^3$   $M^{-1}$ ), nitrometà ( $K_a= 2,4 \cdot 10^4$   $M^{-1}$ ), diclorometà ( $K_a= 4,3 \cdot 10^2$   $M^{-1}$ ).<sup>10</sup>



**Figura 1.1.2.** Estructura del meso-octametilcalix[4]pirrol.<sup>10</sup>

Els receptors que presenten grups guanidinis a la seva estructura, són molt útils pel reconeixement d'oxoanions. Un possible receptor és aquell que incorpora el grup guanidini en un bicicle decalina (Figura 1.1.3.(a)) per millorar la seva solubilitat en dissolvents apolars, on els enllaços d'hidrogen són més forts, i evitar la conformació anti, la qual no és adequada per establir els enllaços d'hidrogen amb els oxoanions (Figura 1.1.3.(b)). Es va estudiar la interacció del receptor que apareix a la Figura 1.1.3.(c) amb el p-nitrobenzoat tetrabutilamoni a través de valoracions seguides per espectroscòpia UV-Vis ( $K_a= 7 \cdot 10^6$   $M^{-1}$ ). L'estructura obtinguda per cristal·lografia de raigs X va confirmar la formació de dos enllaços d'hidrogen entre el receptor i l'oxoanió.<sup>8</sup>



**Figura 1.1.3.** a) Estructura general d'un receptor guanidini bicíclic quiral. b) Conformacions anti i syn del grup guanidini. c) Estructura d'un receptor guanidini bicíclic quiral.<sup>8</sup>

Els receptors que actuen en el reconeixement d'anions se poden classificar en neutres o carregats positivament.

<sup>10</sup> J.L. Sessler, D.E. Gross, W.-S. Cho, V.-M. Lynch, F. P. Schmidtchen, G. W. Bates, M. E. Light, and P. A. Gale, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (37), 12281-12288.

Entre els receptors carregats positivament, destaquen els que contenen grups amonis. Un exemple seria el receptor que s'indica a la Figura 1.1.4., el qual presenta un espaiador unit a dos anells de 9 membres. En solució aquosa, els dos anells es protonen i poden interaccionar amb l'anió mitjançant enllaços d'hidrogen i interaccions electrostàtiques. Concretament, és capaç de reconèixer de forma selectiva un anió difosfat en un ampli interval de pH.<sup>11</sup>

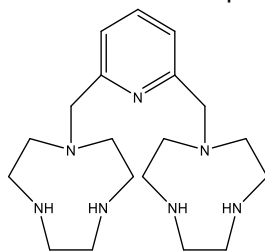


Figura 1.1.4. Receptor d'anions que es carrega positivament en medi aquós.<sup>11</sup>

Entre els receptors neutres destaquen els que presenten grups amides, urees i tiourees degut a la seva gran capacitat per establir enllaços d'hidrogen amb els anions, en particular amb oxoanions.<sup>12,13</sup> Existeixen estudis en els quals s'han sintetitzat una gran varietat de receptors ureics i tioureics (Figura 1.1.5.) i s'ha avaluat la seva capacitat per reconèixer diversos anions. Es va determinar que els 10 receptors són capaços de formar complexes amb anions com: sulfat, dihidrogenfosfat, clorur, nitrat i bicarbonat en DMSO/H<sub>2</sub>O. A més, es va demostrar que pels receptors amb grups tioureics, els quals presenten N-H més àcids, es van obtenir les constants d'associació més baixes, comparades amb les dels receptors ureics.<sup>9</sup>

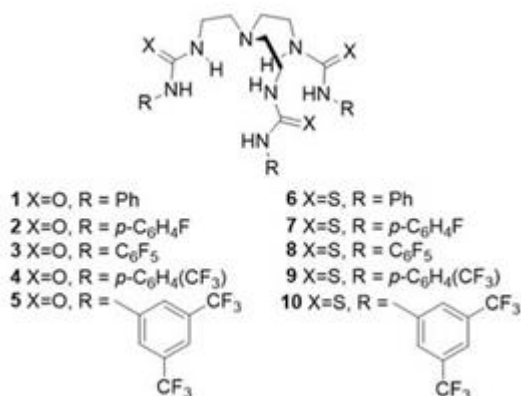


Figura 1.1.5. Estructura dels receptors ureics (1-5) i tioureics (6-10).<sup>9</sup>

A partir d'un estudi per cristal·lografia de raigs X del receptor 7, es va observar que els dos àtoms de sofre estableixen interaccions intermoleculares per pont d'hidrogen amb els N-H tioureics (Figura 1.1.6.(a)) i que a més, quan forma el complex amb el clorur de tetrabutilamoni amb estequiometria 1:1, s'estableixen 6 interaccions per enllaç d'hidrogen, una per cada grup N-H, establint el complex (Figura 1.1.6.(b)).<sup>9</sup>

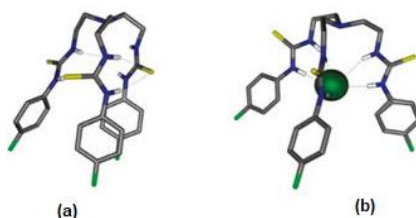


Figura 1.1.6.. Estructures obtingudes per cristal·lografia de Raigs X del receptor 7. A la figura (a) s'indica l'estructura del receptor. A la figura (b) s'indica l'estructura del complex que forma el receptor amb el clorur de tetrabutilamoni.<sup>9</sup>

<sup>11</sup> P. A. Gale, N. Busschaert, C. J. E. Haynes, L. E. Karagiannidis and I. L. Kirby, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 205-241.

<sup>12</sup> J. L. Atwood, J.W. Steed, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Vol. 1, Marcel Dekker, Inc., **2004**.

<sup>13</sup> D. E. Gómez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli and E. Monzani, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1495-1500.

Els receptors de base esquaramida són un altre tipus de receptors molt eficaços per reconèixer una gran varietat d'anions, degut a la seva capacitat per establir enllaços d'hidrogen. A més, la seva efectivitat es creu que és deguda al augment del caràcter aromàtic de l'anell esquaramídica a l'hora de formar el complex.<sup>3</sup> Es poden considerar isòsters dels receptors que contenen grups urees o tiourees.<sup>14</sup> Són molts els estudis que s'han realitzat per tal d'establir diferències entre aquestes tres famílies de receptors neutres. Un d'ells, per exemple, va confirmar que l'anió oxalat estableix interaccions més estables amb els receptors de base esquaramida i no amb els que contenen grup urees perquè en el primer cas es forma un cicle de 9 membres, mentre que en el segon solament de 8.<sup>15</sup>

Hi ha receptors de base esquaramida neutres i d'altres carregats. Aquests darrers combinen la càrrega del grup tetra-alquilamoni que presenten a la seva estructura amb la capacitat de la fracció esquaramídica per establir enllaços d'hidrogen amb l'anió. S'ha demostrat que són receptors potencials pel reconeixement selectiu d'anions sulfat, ja sigui en dissolvents no polars, en alcohols o en mesclures alcohol-aigua.<sup>16</sup>

La naturalesa del dissolvent en el qual es produeix el reconeixement també juga un paper crucial en el control de l'afinitat i la selectivitat de la unió entre el receptor i l'anió. El receptor ha de compatir eficaçment amb l'entorn del dissolvent en el qual es produeix el reconeixement d'anions. Per exemple, un receptor neutre que s'uneix als anions únicament mitjançant interaccions d'hidrogen, és poc probable que pugui competir amb l'esfera de solvatació que envolta l'anió en un dissolvent polar pròtic i per tant, només pot funcionar en dissolvents orgànics apròtics (on l'anió interactua de forma més feble amb el dissolvent). Per altra banda, un receptor carregat, pot beneficiar-se dels efectes electrostàtics i per tant pot competir més eficaçment en dissolvents polars. A més, el receptor no solament ha de competir amb el dissolvent sinó també amb el catió que acompanya a l'anió. La importància de la parella que formen el catió-anió és molt significativa, sobretot en dissolvents no polars, ja que l'anió es troba poc solvatat i la seva unió amb el catió cobra més importància. Mentre que en dissolvents més polars, els dos es troben solvatats i es redueix la força de la parella anió-catió en solució.<sup>4</sup>

La hidrofília o capacitat de solvatació de l'anió també és un factor a tenir en compte ja que pot influir en la selectivitat del receptor i les característiques d'unió. La sèrie de Hofmeister ordena els anions en ordre creixent de solvatació.<sup>4</sup>

Anions orgànics < ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> < SCN<sup>-</sup> < I<sup>-</sup> < silicat < NO<sub>3</sub><sup>-</sup> < Br<sup>-</sup> < Cl<sup>-</sup> < HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> < H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> < F<sup>-</sup> < SO<sub>4</sub><sup>-</sup> < HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

El comportament observat dels anions respecte a la seva afinitat pels substrats orgànics s'ha d'interpretar com el balanç de la suma d'interaccions de molècula orgànica-anió així com la interacció amb les molècules d'aigua de les seves primeres capes de solvatació.

Un altre factor a considerar és que els anions són sensibles al pH i en medis molt àcids és poden protonar perdent la seva càrrega negativa, necessària per establir la interacció amb el receptor. Per tant, els receptors han de poder funcionar en el rang de pH de l'anió d'estudi; el que suposa un repte quan es dissenyen receptors protonats, llevat dels que tenen centres catiónics que no depenen del pH (com els grups tetra-alquilamoni). Afortunadament, aquest problema és menor en receptors neutres.<sup>4</sup>

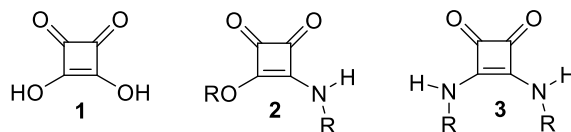
<sup>14</sup> F. E. Held, S. B. Tsogoeva, *Royal Society of Chemistry*, **2016**, 6, 645-667.

<sup>15</sup> V. Amendola, G. Bergamaschi, M. Boiocchi, L. Fabbri, M. Milani, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 4368-4380.

<sup>16</sup> E. Delgado-Pinar, C. Rotger, A. Costa, M. N. Piña, H. R. Jiménez, J. Alarcón and E. García-España, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 2609-2611.

## 1.2. Molècules d'estudi: esquamides

Les esquamides són un tipus de composts orgànics derivats de l'àcid esquàric<sup>17</sup> (Figura 1.2.1.) que presenten un ciclobutè dicarbonílic amb un o dos substituents amínics variables.<sup>9</sup>



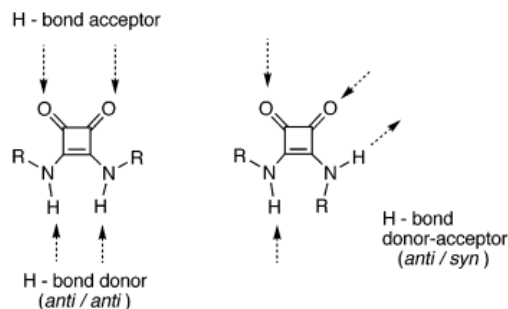
**Figura 1.2.1.** Estructura de l'àcid esquàric **1** i els seus derivats amídics, els esquamido èster de fórmula general **2** i les bis-esquamides secundàries de fórmula general **3**.

Són una classe de composts de gran rellevància que han estat estudiats des de la dècada dels anys 60 degut a les propietats físiques i químiques particulars que presenten.<sup>18</sup>

Són estructures rígides i planes que presenten una gran capacitat per formar enllaços d'hidrogen,<sup>19</sup> ja que tenen dos grups donadors i dos grups acceptors a la seva estructura. Aquest fet, els hi permet participar en el reconeixement d'ions,<sup>20</sup> Poden interaccionar de forma selectiva amb certs anions com són el clorur<sup>21</sup>, el fosfat<sup>22</sup>, el carboxilat<sup>23</sup> i el sulfat<sup>16,22,24</sup>, el que els hi confereix, a més, l'habilitat de ser uns bons transportadors d'ions.<sup>25</sup> S'han utilitzat per crear hidrogels supramoleculars<sup>26</sup> i com a catalitzadors<sup>27</sup>, entre moltes altres aplicacions. Són uns grans candidats per usar en multitud d'àmbits com la química mèdica, la biologia o el medi ambient.

### 1.2.1. Esquamides secundàries: formació d'enllaços d'hidrogen

Les esquamides secundàries (Figura 1.2.2.), es poden usar per crear interaccions per enllaç d'hidrogen amb altres molècules. Presenten grups carbonils que poden actuar com a acceptors d'hidrogen i dos enllaços N-H que poden actuar com a donadors d'hidrogen efectius, habilitat que els hi permet interaccionar amb altres molècules i així canviar o inclús millorar certes característiques pròpies i formar complexos supramoleculars estabilitzats.<sup>18,23</sup> Per exemple, alguns estudis computacionals i experimentals han confirmat que l'aromaticitat de les esquamides millora si interactua amb un catió amoni.<sup>28</sup>



**Figura 1.2.2.** Representació general dels dos confòrmers (anti/anti i anti/syn) d'esquamides secundàries. Se representen les opcions d'enllaç d'hidrogen dels confòrmers.<sup>19</sup>

<sup>17</sup> Se refereix al compost 3,4-dihidroxi-3-ciclobutè-1,2-diona.

<sup>18</sup> R. I. Storer, C. Aciro, L. H. Jones, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2330-2346.

<sup>19</sup> M. C. Rotger, M. N. Piña, A. Frontera, G. Martorell, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2302-2308.

<sup>20</sup> S. Tomàs, R. Prohens, M. Vega, M. C. Rotger, P. M. Deyà, P. Ballester, A. Costa, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9394-9401.

<sup>21</sup> S. J. Edwards, H. Valkenier, N. Busschaert, P. A. Gale, and A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1-6.

<sup>22</sup> M. N. Piña, B. Soberats, C. Rotger, P. Ballester, P. M. Deyà and A. Costa, *New J. Chem.* **2008**, *32*, 1919-1923.

<sup>23</sup> R. Prohens, S. Tomàs, J. Morey, P.M. Deyà, P. Ballester, A. Costa, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*,1063-1066.

<sup>24</sup> C. Jin, M. Zhang, L. Wu, Y. Guan, Y. Pan, J. Jiang, C. Lin and L. Wang., *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2025-2027.

<sup>25</sup> R. Prohens, G. Martorell, P. Ballester, A. Costa, *Chem. Commun.* **2001**, *16*, 1456-1457.

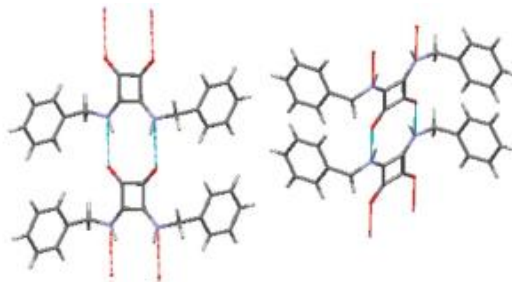
<sup>26</sup> D. Wu, R. Jiang, L. Luo, Z. He, J. You, *Inorg. Chem. Front.* **2016**, *3*, 1597-1603.

<sup>27</sup> R. S. Muthyala, G. Subramaniam and L. Todaro, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4663-4665.

<sup>28</sup> J. Seto, A. B. Comeau, and C. T. Seto, *Organic Lett.* **2004**, *6*, 83-86.



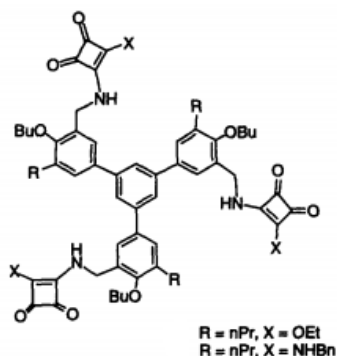
Per entendre aquesta capacitat per establir enllaços d'hidrogen, el que les converteix en unitats molt interessants a l'àmbit de la química supramolecular, s'han realitzat estudis conformationals<sup>29</sup> per RMN i de formació d'enllaços intra i intermoleculars mitjançant la tècnica d'espectroscòpia de raigs X<sup>30</sup>.



**Figura 1.2.3.** Estructura d'una dibencil esquaramida obtinguda per cristal·lografia de raigs X que adopta una conformació anti/anti. En blau i vermell s'indiquen els enllaços d'hidrogen que s'estableixen amb altres molècules formant agregats tipus cap-coa.<sup>18</sup>

Aquesta gran capacitat de formació d'enllaços d'hidrogen amb altres molècules permet utilitzar les esquaramides com a catalitzadors. Si les esquaramides són quirals, poden utilitzar-se en síntesi enantioselectiva.<sup>31</sup>

Les esquaramides secundàries es poden aplicar al reconeixement d'anions aprofitant la seva capacitat per formar interaccions per enllaç d'hidrogen. Per exemple, la presència de grups carboxilats en molècules biològicament rellevants, ha provocat un considerable interès en desenvolupar receptors artificials (Figura 1.2.4.) que puguin detectar aquest anió en medis aquosos, el dissolvent natural per a la majoria de carboxilats.<sup>23</sup> Cal recordar també l'existència de receptors esquaramídics pel reconeixement d'anions com el fosfat<sup>22</sup>, el sulfat<sup>16,22,24</sup> i el clorur<sup>21</sup>.



**Figura 1.2.4.** Estructura d'un receptor dissenyat i sintetitzat per reconèixer l'anió carboxilat.<sup>23</sup>

### 1.3. Estudis de reconeixement molecular. Determinació de les constants d'associació receptor-substrat

L'enfocament més comú en Química Supramolecular per a quantificar les interaccions és realitzar valoracions en les quals el substrat s'incorpora de forma gradual al sistema que conté el receptor, observant així canvis en alguna propietat física, la qual es troba monitoritzada, que es poden detectar mitjançant espectroscòpia RMN, UV-Vis, fluorescència, entre altres tècniques. S'han de tenir en compte certs factors per tal de garantir que els resultats finals són fiables. S'elegeix el model d'unió estequiomètric, la concentració del receptor i el mètode de detecció, s'apliquen mètodes avançats d'anàlisi de dades i de regressió, generalment no lineals, per tal de

<sup>29</sup> L. Martínez, G. Martorell, A. Sampedro, P. Ballester, A. Costa, and C. Rotger, *Org. Lett.* **2015**, 17 (12), 2980-2983.

<sup>30</sup> C. Rotger, B. Soberats, D. Quiñonero, A. Frontera, P. Ballester, J. Benet-Buchholz, P. M. Deyà, A. Costa, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1864-1868.

<sup>31</sup> T. J. Auvil, A. G. Schafer, A. E. Mattson, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2633-2646.

calcular les constants d'associació ( $K_a$ ), obtenir informació energètica ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ) i estequiomètrica (formació del complex 1:1 vs 1:2) i finalment es calculen els intervals de confiança dels resultats obtinguts.<sup>32</sup>

### 1.3.1. Espectroscòpia UV-Vis aplicada al reconeixement molecular

Una de les tècniques més habituals per realitzar les valoracions de reconeixement molecular és l'espectroscòpia UV-Vis. La concentració de receptor (cromòfor) escollida ha de situar-se dins la regió on el pic d'absorció d'interès, el del receptor i el del complex format, es troben dins els límits de la llei de Lambert-Beer, és a dir, que presentin un valor d'absorbància menor de 1. A més, també és desitjable que el substrat afegit no absorbeixi a la regió d'interès per tal de simplificar el sistema i que a mesura que es formi el complex es vagi notant un canvi notable a l'espectre UV-Vis.<sup>32</sup>

Les valoracions per espectroscòpia UV-Vis son especialment vulnerables als efectes de dilució i temperatura així com a la presència d'impureses que pugui presentar el receptor o la solució que conté l'anió.<sup>32</sup>

La concentració de receptor es manté constant durant tot el transcurs de la valoració i es van fent addicions seqüencials d'anió per tal d'observar els canvis que tenen lloc a l'espectre UV-Vis. Quan l'anió interacciona amb el receptor esquaramídic, es produeix una modificació de l'estat electrònic de la molècula i s'observa que el complex receptor-anió format presenta un pic diferent a l'obtingut inicialment. Arriba un punt en què tot i augmentar la concentració d'anió l'espectre no canvia i per tant la valoració es dona per acabada.

En funció del receptor esquaramídic usat, els màxims d'absorbància s'observen a longituds d'ones diferents però en tots els casos es troben dins el rang típic d'esquaramides, de 290-300 nm.

## 1.4. Assajos per desplaçament d'indicador (IDA)

La detecció d'anions juga un paper fonamental en molts processos biològics com és el transport d'hormones i proteïnes, la regulació de l'ADN i l'activitat enzimàtica, etc. És per això que han inspirat al disseny de sensors químics per a la seva detecció tant qualitativa com quantitativa. A més, a l'àmbit mediambiental, la presència d'espècies aniòniques en aigües naturals ha desencadenat esforços de recerca en el desenvolupament de metodologies analítiques verdes. Per tant, s'han dissenyat sistemes de detecció a partir de receptors sintètics que puguin ser selectius, efectius i que permetin una fàcil detecció de la presència d'anions al medi. Per aquest motiu, s'han desenvolupat els assajos per desplaçament d'indicador (IDA, sigles en anglès).<sup>33</sup>

La tècnica IDA permet convertir un receptor sintètic en un sensor òptic.<sup>34</sup>

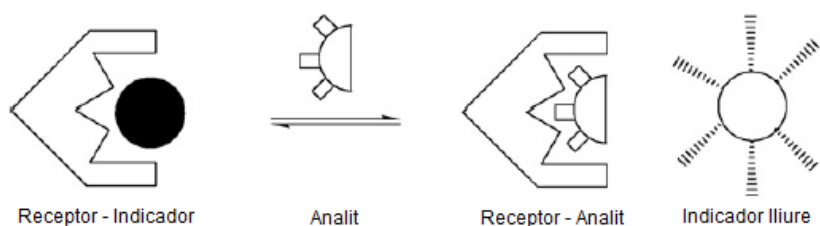
Inicialment, un indicador s'uneix de forma reversible a un receptor i través de la introducció al sistema d'un analít competitiu, es produeix el desplaçament de l'indicador (Figura 1.4.1.), el que es tradueix en una senyal òptica.<sup>35</sup>

<sup>32</sup> P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305-1323.

<sup>33</sup> M. N. Piña, B. Soberats, C. Rotger, P. Ballester, P. M. Deyà and A. Costa, *New J. Chem.* **2008**, *32*, 1919-1923.

<sup>34</sup> M. Sayed, K. Shinde, R. Shah, and H. Pal, *ChemistrySelect*, **2016**, *5*, 989-999.

<sup>35</sup> B. T. Nguyen, E. V. Anslyn, *Coordination Chemistry Reviews* **250**, **2006**, 3118-3127.



**Figura 1.4.1.** Esquema general del procés d'un assaig IDA.<sup>35</sup>

Idealment, un receptor que presenta una gran afinitat cap a l'analit i l'indicador és la clau del desenvolupament d'un sistema de detecció eficient. A més, l'afinitat entre el receptor i l'analit ha de ser superior a la que presenti amb l'indicador per tal que es pugui produir el desplaçament i s'indueixi a un canvi espectroscòpic apreciable.<sup>33</sup>

En funció de certs factors com la geometria, la càrrega i el caràcter hidrofòbic de l'analit així com de la naturalesa del dissolvent, el tipus d'interacció amb el receptor pot variar, essent la més comú la de tipus enllaç d'hidrogen juntament amb les interaccions electrostàtiques i les que es donen per complexació amb centres metàl·lics.<sup>35</sup>

És una tècnica que ofereix algunes avantatges en front a altres mètodes tradicionals ja que no requereix que l'indicador es trobi unit covalentment al receptor, permetent així usar diferents indicadors per a un mateix receptor, es pot aplicar tant en medis orgànics com aquosos i a més s'adapta fàcilment a diferents receptors per a dur a terme una anàlisi ràpida.<sup>35</sup>

Existeixen diferents mecanismes a partir dels quals té lloc la modulació de la senyal com són la transferència fotoinduïda d'electrons (PET), la fluorescència per energia de ressonància transferida (FRET), l'energia de transferència electrònica (EET) o a través de simples canvis en la força iònica o el pH.<sup>35,36</sup>

En funció de l'indicador elegit, es pot classificar la tècnica en: IDA colorimètrica (C-IDA) que empra indicadors colorimètrics, IDA fluorescent (F-IDA) que usa indicadors fluorescents i IDA de complexació metàl·lica que usa un centre metàl·lic amb un indicador colorimètric o fluorescent, essent per tant un subconjunt d'un C-IDA i un F-IDA.<sup>35</sup>

L'aplicació del mètode Colorimetric Indicator-Displacement Assays (C-IDA) és una de les opcions més usades ja que permet detectar anions de forma ràpida. Es basa en un canvi de color de l'indicador en funció de si es troba lliure o unit al receptor. Per tant, aquest canvi de coloració modula la senyal òptica i permet la detecció de l'analit d'interès.<sup>35</sup>

A la bibliografia<sup>33,37</sup> podem trobar exemples d'assajos IDA que s'han desenvolupat per detectar analits ambientals com són l'anió fosfat i sulfat, els quals es troben presents en moltes aigües naturals en concentracions apreciables i presenten efectes nocius pel medi ambient si es troben en excés, utilitzant un receptor esquaramídric i els indicadors àcid-base vermell de cresol (Figura 1.4.2.) i bromocresol. Els complexos receptor-indicador es caracteritzen en una mescla etanol-aigua mitjançant espectroscòpia UV-Vis.

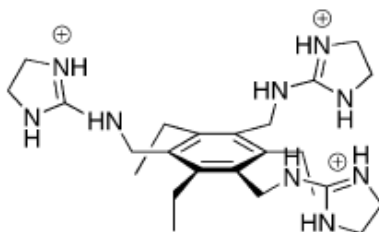
<sup>36</sup> T. Gunnlaugsson, M. Glynn, G. M. Tocci, P. E. Kruger, F. M. Pfeffer, *Coordination Chemistry Reviews* 250, **2006**, 3094-3117.

<sup>37</sup> M. N. Piña, M. C. Rotger, A. Costa, P. Ballester, P. M. Deyà, *Tetrahedron Letters* 45, **2004**, 3749-3752.



**Figura 1.4.2.** Esquema representatiu de l'equilibri competitiu entre el vermell de cresol i el sulfat pel receptor esquaramídic.<sup>37</sup>

Una altra de les aplicacions destacades d'aquesta tècnica és la detecció de composts biològics com per exemple el citrat, un component important del cicle de Krebs que produeix importants intermedis de nombrosos processos biosintètics. El receptor (Figura 1.4.3.) dissenyat conté 3 grups guanidinis que permeten la seva unió al citrat, un tricarboxilat a pH neutre. L'indicador que intervé és el 5-carboxifluoresceïna.<sup>35</sup>

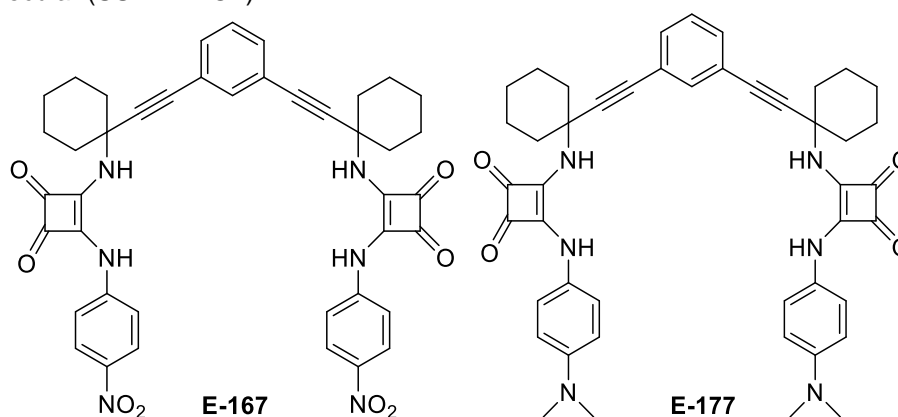


**Figura 1.4.3.** Estructura del receptor dissenyat per detectar el citrat.<sup>35</sup>

## 1.5. Antecedents

### 1.5.1. Receptors esquaramídics

Els receptors de base esquaramida seleccionats (Figura 1.5.1.) per dur a terme la part experimental d'aquest treball foren sintetitzats i proporcionats pel grup de Química Supramolecular (SUPRAMOL).



**Figura 1.5.1.** Estructura dels receptors de base esquaramida. A l'esquerra s'indica l'estructura del receptor E-167 i a la dreta l'estructura del receptor E-177.

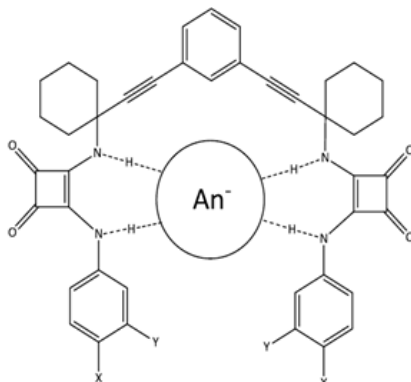
Els dos receptors pertanyen a la mateixa família i estan formats per un espaiador rígid, una bis-amina arilpropargílica,<sup>38</sup> que a més d'evitar que l'estructura col·lapsi o es plegui en medi

<sup>38</sup> B. Soberats, L. Martínez, M. Vega, C. Rotger, A. Costa, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1727-1731.

aquós, preorganitza dues di-esquaramides secundàries a una distància adequada que quan estan enfrontades entres elles construeixen una cavitat en forma de mitja lluna que pot acollir anions de diferent mida. Es tracta per tant de receptors ditòpics ja que hi ha dos punts on es poden establir enllaços d'hidrogen entre les esquaramides i els anions. La diferència entre els dos receptors resideix en què el receptor E-167 presenta un grup  $\text{NO}_2$  en posició para respecte al nitrogen de la unitat esquaramídica, a diferència del receptor E-177, que en aquesta mateixa posició presenta un grup dimetilamino.

També existeix una relació entre els substituents de l'anell aromàtic dels receptors i la capacitat d'establir l'enllaç d'hidrogen amb l'anió. El receptor E-167 presenta un grup  $\text{NO}_2$  en posició para respecte al nitrogen esquaramídica. Aquest, és un grup atractor d'electrons i molt desactivador tant per efecte inductiu (-I) com per efecte ressonant (-R), per tant, capta densitat electrònica de l'anell aromàtic i de la unitat esquaramídica que intervé en la formació de l'enllaç d'hidrogen. L'enllaç N-H es polaritza més i l'enllaç d'hidrogen es veu afavorit. Per altra banda, el receptor E-177 presenta un grup dimetilamino a la mateixa posició. Aquest, és un grup donador d'electrons, activador per efecte ressonant (+R) i desactivador per efecte inductiu (-I). És una situació diferent respecte al receptor E-167, ja que en aquest cas, l'anell aromàtic i la unitat esquaramídica que intervé en la formació de l'enllaç d'hidrogen presenten una major densitat electrònica i per tant s'espera que l'efecte electrodonador del grup dimetilamino redueixi la capacitat dels N-H esquaramídics de formar els enllaços d'hidrogen.

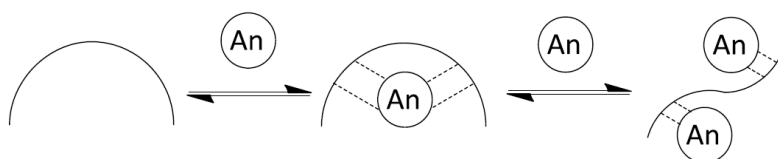
Aquests receptors són candidats molt adequats per dur a terme estudis de reconeixement d'anions ja que presenten una estructura que permet que l'anió interaccioni amb la part esquaramídica (Figura 1.5.2.) sense que es donin interaccions amb altres molècules.



**Figura 1.5.2.** Esquema que simbolitza la interacció de tipus enllaç d'hidrogen entre el receptor esquaramídica i l'anió, on X i Y són els substituents en posició meta i para que poden anar variant.

A més, que el receptor tingui dues unitats esquaramídiques implica que també és possible que un sol receptor pugui interaccionar amb dos anions (Figura 1.5.3.) ja que la rotació d'un enllaç esquaramida respecte a l'espaiador allunyaria les dues esquaramides una de l'altre i es convertirien en dos centres de reconeixement independent.

La barrera de rotació per un enllaç esquaramídica N-C és aproximadament de  $63 \text{ kJ/mol}^{19}$ . A temperatura ambient podem trobar un equilibri conformacional com el que es descriu a la Figura 1.5.3., sobretot en absència d'anions que fixin la conformació del receptor.



**Figura 1.5.3.** Esquema que simbolitza la interacció d'un receptor amb dos anions. S'observa com el receptor canvia la seva estructura, rotant, perquè cada anió formi un enllaç d'hidrogen amb cada unitat esquaramídica del receptor.

### 1.5.2. Reconeixement d'anions en cloroform i aigua mitjançant valoracions per espectroscòpia UV-Vis

Les valoracions per espectroscòpia UV-Vis s'han de dur a terme en un medi en el qual el receptor sigui soluble. Els composts amb esquaramides di-secundàries tendeixen a formar agregats cap-cua per mitjà d'enllaços d'hidrogen<sup>39</sup>, el que els converteix en composts poc solubles en dissolvents orgànics. Per altra banda, sense la presència de centres carregats, les esquaramides di-secundàries no són generalment solubles en aigua.

Ambdós receptors (E-167 i E-177) són solubles en dissolvents orgànics com el cloroform i el DMSO. Per altra banda, presenten una baixa solubilitat en aigua, ja que són receptors neutres. S'espera que el grup dimetilamino del receptor E-177 es pugui protonar en medi aquós i faciliti la solubilitat en aigua.

Simone Siccardi, en el seu Treball de Fi de Màster, va realitzar estudis de reconeixement d'anions mitjançant valoracions per espectroscòpia UV-Vis usant els mateixos receptors descrits a l'apartat anterior i 3 anions diferents com són el clorur, el pirofosfat i el fosfonoacetat. Va realitzar els experiments en cloroform-DMSO, en proporció 99-1% respectivament. Va determinar que en tots els casos es donava la formació del complex 1:1 (interacció entre un receptor i un anió), però també, tot i que en menor proporció, s'observava la formació del complex 1:2 (interacció entre un receptor i dos anions). Va calcular mitjançant el software HypSpec<sup>40</sup> les constants d'associació que es mostren a la Taula 1.5.1. i va observar que per a tots els anions la  $K_1$ , la que implica la formació del complex 1:1, era elevada, observant-se una lleugera preferència per a l'anió pirofosfat. Aquest efecte fou més acusat per el receptor E-177. Per altra banda, la  $K_2$  era entre un o tres ordres de magnitud inferior que la  $K_1$ , el que indica que el complex 1:2 és menys favorable. Aquest fet és similar als dos receptors i és més acusat en el cas del clorur. Analitzant aquestes dades es va determinar que les possibles diferències de densitat electrònica existents entre els receptors esquaramídics no foren determinants per explicar els valors de les constants d'associació obtinguts.<sup>41</sup>

**Taula 1.5.1.** Constants d'associació ( $K_1$  i  $K_2$ ) entre els receptors E-167 i E-177 i els diferents anions.

Anió	Receptor E-167		Receptor E-177	
	$K_1$ (M <sup>-1</sup> )	$K_2$ (M <sup>-1</sup> )	$K_1$ (M <sup>-1</sup> )	$K_2$ (M <sup>-1</sup> )
Pirofosfat	$6,73 \cdot 10^5$	$5,69 \cdot 10^4$	$7,82 \cdot 10^5$	$4,94 \cdot 10^2$
Clorur	$2,07 \cdot 10^5$	$9,71 \cdot 10^2$	$3,48 \cdot 10^5$	$4,93 \cdot 10^3$
Fosfonoacetat	$2,66 \cdot 10^5$	$6,40 \cdot 10^4$	$2,72 \cdot 10^5$	$1,18 \cdot 10^4$

En aquest treball es pretén realitzar el mateix estudi en aigua ja que els anions són parcialment solubles en medis aquosos. A més, es podrà comprovar si els efectes hidrofòbics afecten a la selectivitat del receptor o es produeixen canvis en els valors de les constants d'associació.

El medi en el qual es du a terme l'estudi també té un paper important en quant a la selectivitat del receptor. Per exemple, en dissolvents pròtics i/o en aigua, el dissolvent natural per a la majoria d'anions, només alguns receptors seran selectius per detectar anions degut a que la majoria d'ells es troben fortament solvatats. Per tal d'aproximar-se al problema del reconeixement selectiu d'anions en aigua i descobrir els factors que el controlen, existeixen estudis on s'han realitzat experiments per estudiar l'efecte sobre la selectivitat de l'enllaç si s'introdueixen certes variacions estructurals, incloent un nombre variable d'interaccions per enllaç d'hidrogen.<sup>37</sup>

<sup>39</sup> R. Prohens, A. Portell, C. Puigjaner, R. Barbas, X. Alcobé, M. Font-Bardia and S. Tomàs, *CrystEngComm*, **2012**, *14*, 5745-5748.

<sup>40</sup> P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, **1996**, *43*, 1739-1753.

<sup>41</sup> S. Siccardi, *Molecular recognition studies of biorelevant anions with squaramides-based receptors*, Treball de Fi de Màster (TFM), **2017**, Universitat de Turín.

## 2. Objectius

Els objectius marcats en aquest treball són els següents:

- Aplicar tècniques d'espectroscòpia ultraviolada per a l'estudi de complexació via enllaç d'hidrogen de receptors de base esquaramida amb anions biològicament rellevants en dissolució aquosa.
- Determinar les constants d'associació i comparar els resultats per analitzar l'afinitat i selectivitat dels receptors estudiats en front dels anions utilitzats.
- Dissenyar un sistema IDA per a aquests receptors i avaluar la seva viabilitat per determinar la presència d'anions en un medi aquós.

## 3. Resultats i discussió

### 3.1. Estudi de l'associació dels receptors E-167 i E-177 per espectroscòpia UV-Vis amb oxoanions de rellevància biològica

#### 3.1.1. Condicions de treball

Abans dels estudis de complexació, s'han realitzat estudis de solubilitat en aigua dels receptors E-167 i E-177, mencionats a l'apartat d'Introducció, per trobar les condicions de treball adequades.

Els composts que tenen esquaramides di-secundàries, tenen tendència a formar agregats a través d'una sèrie d'interaccions per enllaç d'hidrogen, sobretot en dissolvents orgànics que afavoreixen aquest tipus d'interaccions. L'agregació es veu desfavorida en dissolvents competitiu amb l'enllaç d'hidrogen com són el DMSO o alcohols i els complexos esquaramídics tornen més solubles. A pesar de que l'aigua és un dissolvent que pot establir enllaços d'hidrogen amb les esquaramides i de la polaritat de l'anell esquaramida, en molts de casos, la tendència a formar agregats per enllaç d'hidrogen entre esquaramides i, les repulsions entre les parts més hidrofòbiques de la molècula i l'aigua dificulten que una molècula no carregada i per tant, més fàcil de solvatar, com és el cas dels receptors estudiats, no sigui fàcilment soluble en aigua, inclús en concentracions de l'ordre  $10^{-5}$  M necessàries per fer els estudis d'UV.

En algunes ocasions, una petita proporció de DMSO d'un 1-5% en un altre solvent és suficient per solubilitzar el compost esquaramídic, però, en aquest cas, els dos receptors esquaramídics utilitzats presenten molt poca solubilitat en aigua, per això és necessari un augment de la concentració de DMSO. S'han investigat diferents proporcions d'aigua/DMSO per arribar a trobar la més adequada sempre intentant usar la menor proporció de DMSO possible. A més a més, l'aigua es troba tamponada per evitar reaccions àcid-base paral·leles que poguessin interferir amb els estudis de complexació.

Es va observar que els receptors E-167 i E-177 eren solubles en una dissolució d'aigua i un 10 % de DMSO (la mínima quantitat necessària per dissoldre el receptor, encara que després precipiti el complex), però es va observar també que al fer l'estudi d'associació amb el primer anió estudiat, el pirofosfat, apareixia un precipitat durant les valoracions. Per aquest motiu, es va dur a terme un altre estudi per trobar una proporció de DMSO que permetés finalitzar la valoració amb aquest anió. Es realitzaren diferents valoracions utilitzant proporcions de 10-30 % de DMSO amb el receptor E-167 a una concentració ( $2 \cdot 10^{-5}$  M) i l'anió pirofosfat fins obtenir unes condicions que permetessin completar la valoració sense la formació de cap precipitat.



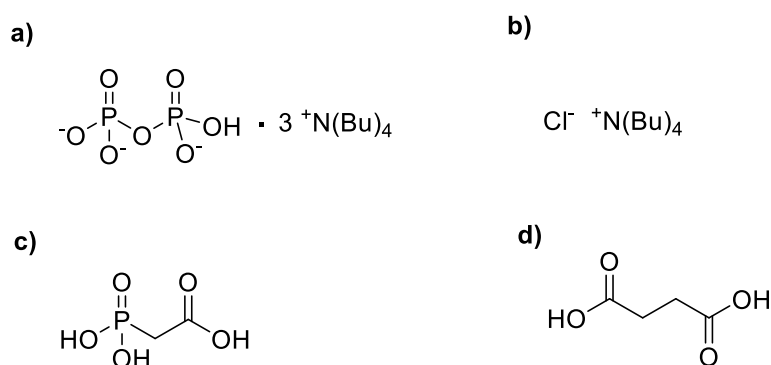
La part de l'espectre estudiat correspon a l'interval 280-480 nm que permet visualitzar la banda del cromòfor esquamida i la de l'anell aromàtic.

Durant el transcurs de la valoració amb un 30% de DMSO no es va observar l'aparició de cap precipitat i una vegada enregistrades totes les dades es va poder fer el corresponent ajust de forma òptima. Per tant, es conclou que les condicions adequades per treballar són 70% aigua tamponada i 30% DMSO per aconseguir la solubilitat adequada del receptor.

El tampó utilitzat fou el de Tris (hidroximetil)aminometà a pH 10, el pH necessari per assegurar-se que l'anió pirofosfat es troba completament desprotonat i per tant en la seva forma bàsica.

### 3.1.2. Anions estudiats

Les valoracions es van dur a terme amb 4 anions biològicament rellevants (Figura 3.1.1.), com són el pirofosfat, el clorur, el fosfonoacetat i el succinat, tots ells solubles en medi aquós. Dos dels anions estudiats es van utilitzar a partir de les seves corresponents sals de tetrabutilamoni (hidrogen pirofosfat de tris-tetrabutilamoni i clorur de tetrabutilamoni) i els altres dos (fosfonoacetat i succinat) a partir de la seva corresponent forma àcida.



**Figura 3.1.1.** Estructura dels anions estudiats en forma de sal o en forma àcida. A la figura a) s'indica l'estructura de l'hidrogen pirofosfat de tris-tetrabutilamoni, a la figura b) la del clorur de tetrabutilamoni, a la figura c) la de l'àcid fosfonoacètic i a la figura d) la de l'àcid succínic.

El pirofosfat és la base conjugada de l'àcid pirofosfòric ( $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ). Té 4 protons que pot perdre a través de 4 equilibris àcid-base presentant uns valors de  $\text{pK}_a^{42}$  de 0,85, 1,96, 6,60, 9,41. En solució hi podria haver diferents formes del pirofosfat però la presència del tampó a pH 10 elimina aquesta possibilitat i només la forma bàsica  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  és la que es troba a la solució.

En la sal de clorur de tetrabutilamoni, l'anió clorur solament presenta una càrrega negativa i és simètric amb una estructura esfèrica.

L'àcid fosfonoacètic presenta 3 protons que pot perdre a través de 3 equilibris àcid-base. Els seus valors de  $\text{pK}_a$  corresponents són 2,6, 5 i 8,2.<sup>43</sup> Totes les valoracions es duen a terme a un pH aparent de 10, per tant, no hi ha forma àcida en el medi de valoració, només la seva forma bàsica,  $\text{PO}_5^{3-}$ , es troba en solució. Aquest anió pot interaccionar i crear un enllaç d'hidrogen amb el receptor a través del grup fosfat i del grup carboxilat.

L'àcid succínic presenta 2 protons que pot perdre a través de 2 equilibris àcid-base. Els seus valors de  $\text{pK}_a$  corresponents són 4,21 i 5,72.<sup>44</sup> Al treballar a pH 10 en totes les valoracions, es troba en forma bàsica en dissolució. És un àcid dicarboxílic, per tant, al desprotonar-se pot interaccionar mitjançant enllaç d'hidrogen amb el receptor a través dels grups carboxilat.

<sup>42</sup> D. L. Purich, R. D. Allison, *Handbook of Biochemical Kinetics*, Academic Press, **2000**.

<sup>43</sup> J.C.-H. Mao, E. R. Otis, A. M. Von Esch, T.R. Herrin, J. S. Fairgrieve, N. L. Shipkowitz and R. G. Duff, *Structure-Activity studies on phosphonoacetate*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.27, Num. 2, **1985**, 197-202.

<sup>44</sup> Recurs online de l'empresa Sigma Aldrich: Product Information Succinic Acid

[[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product\\_Information\\_Sheet/398055pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/398055pis.pdf)]



### 3.1.3. Valoracions per espectroscòpia UV-Vis amb el receptor E-167

El receptor E-167 (Figura 3.1.2.) presenta un grup NO<sub>2</sub> en posició para respecte al grup -NH de la unitat esquaramídica.

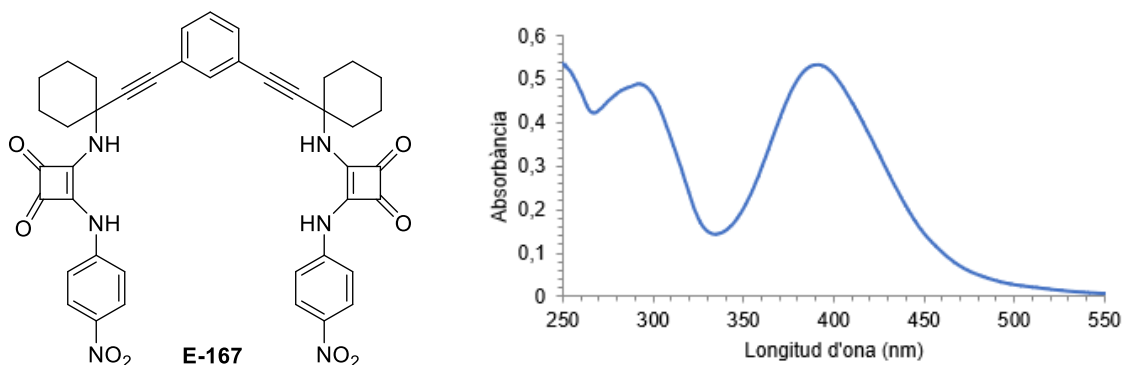


Figura 3.1.2. Estructura del receptor E-167 i el seu espectre UV-Vis a  $2 \cdot 10^{-5}$  M.

Abans de realitzar la valoració mitjançant espectroscòpia UV-Vis, s'ha d'eleger la concentració adequada de receptor. En un espectre UV-Vis, l'absorbància i la concentració del compost són directament proporcionals segons la llei de Lambert-Beer.<sup>45</sup> La concentració de receptor ha de deixar un interval útil d'absorbància per si les bandes creixen o decreixen en intensitat en el transcurs de la valoració. Per això, s'ha optat per eleger la concentració  $2 \cdot 10^{-5}$  M que ens assegura treballar al voltant de la part mitjana de l'escala 0-1 d'absorbància, tal com s'observa a la Figura 3.1.2.

S'observen dos màxims: un a 390 nm i l'altre a 295 nm. La primera banda (295 nm) correspon al cromòfor de l'anell esquaramida, mentre que la segona banda (390 nm) correspon al sistema nitroaromàtic.

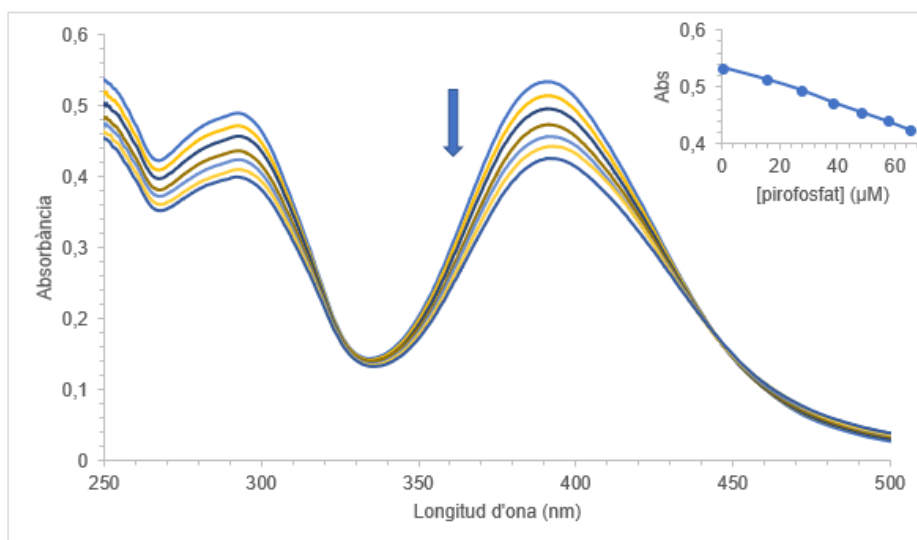
Totes les valoracions es duen a terme a concentració constant de receptor ja que la solució d'anió conté la mateixa concentració de receptor que la solució de receptor que es troba dins la cubeta. D'aquesta forma, les diferències d'intensitat d'absorbància no poden ser atribuïdes a diferències de concentració de receptor.

#### 3.1.3.1. Valoracions entre el receptor E-167 i els anions

##### • Pirofosfat

La valoració es du a terme a concentració constant de receptor,  $2 \cdot 10^{-5}$  M, i es realitzen successives addicions de 50  $\mu$ L de la dissolució que conté l'anió de concentració  $2,17 \cdot 10^{-4}$  M fins a obtenir un total de 19 punts. A la Figura 3.1.3. es representa l'espectre UV-Vis obtingut un cop realitzada la valoració entre el receptor E-167 i l'anió pirofosfat on solament s'han representat 7 punts a l'interval de concentracions d'anió de 0 M a  $6,51 \cdot 10^{-5}$  M.

<sup>45</sup> D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principios de Análisis Instrumental*, Cengage Learning Ed, 2007.



**Figura 3.1.3.** Col·lecció d'espectres UV-Vis de la valoració entre el receptor E-167 ( $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ) i l'anió pirofosfat a concentracions (0, 1,45, 2,71, 3,83, 4,82, 5,71 i  $6,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ) a l'interval 250-500 nm. A la inserció del gràfic es representa la variació del màxim d'absorbància a 390 nm en funció de la concentració de pirofosfat en el medi.

A mesura que avança la valoració, es produeix una disminució de l'absorbància del receptor al augmentar la concentració d'anió. L'absorbància és proporcional a la concentració, si la primera disminueix, també ho fa la concentració de receptor lliure. Per tant, és un indicador que aquest es va acomplantant amb l'anió i que es va formant una nova espècie.

A més, s'observa un lleuger desplaçament del pic màxim cap a longituds d'ones majors a mesura que avança la valoració, el que es coneix com a efecte batocròmic<sup>46</sup>. Aquest fet pot ser atribuït a la interacció que es produeix entre l'anió pirofosfat i el N-H esquaramídic del receptor.

Les dades obtingudes en forma de col·lecció d'espectres de UV-Vis s'introdueixen al programa HypSpec, el qual incorpora una sèrie d'eines que permeten calcular a través de l'ajust, el valor de  $\log \beta$  i així poder calcular la constant d'afinitat entre el receptor i l'anió i la magnitud termodinàmica  $\Delta G$ .

Els dos receptors tenen dues unitats esquaramídiques, per tant, és possible que dos anions interaccionin amb un sol receptor. Seguint els antecedents que es tenen del comportament del receptor E-167 i l'anió pirofosfat en medi orgànic (cloroform), en els quals es va determinar que era necessari establir un segon equilibri referent a la formació del complex 1:2, és lògic pensar que en medi aquós ocorre de forma similar. Aquest equilibri alternatiu és afegit al programa, de tal forma que s'obtenen dos valors de  $\log \beta$ :  $\log \beta_1$  i  $\log \beta_2$ .

El valor de  $\log \beta_1$  expressa l'afinitat d'interacció entre un anió i un receptor mentre que  $\log \beta_2$  expressa la interacció entre dos anions i un receptor. Coneixent aquests valors es calcula els valors de  $\beta_1$  i  $\beta_2$  realitzant l'operació inversa del logaritme.

$$Rec + An \leftrightarrow Rec(An) \quad \beta_1 = \frac{[Rec(An)]}{[Rec] \cdot [An]} \quad \log \beta_1 = \log[Rec(An)] - \log[Rec] - \log[An]$$

$$Rec + 2An \leftrightarrow Rec(An)_2 \quad \beta_2 = \frac{[Rec(An)_2]}{[Rec] \cdot [An]^2} \quad \log \beta_2 = \log[Rec(An)_2] - \log[Rec] - 2 \log[An]$$

El valor de la constant d'afinitat  $K_1$  expressa la interacció entre un anió i un receptor per a la corresponent formació del complex en proporció 1:1, presentant aquesta el mateix valor que  $\log \beta_1$ . El valor de la constant d'afinitat  $K_2$  expressa la interacció entre el complex 1:1 i el segon anió, tal com s'indica a les següents expressions.

<sup>46</sup> L. D. S. Yadav, *Organic Spectroscopy*, Kluwer Academic Publishers, 2005.

$$Rec + An \leftrightarrow Rec(An) \quad K_1 = \frac{[Rec(An)]}{[Rec] \cdot [An]} \quad \log K_1 = \log[Rec(An)] - \log[Rec] - \log[An]$$

$$Rec(An) + An \leftrightarrow Rec(An)_2 \quad K_2 = \frac{[Rec(An)_2]}{[Rec(An)] \cdot [An]} \quad \log K_2 = \log[Rec(An)_2] - \log[Rec(An)] - \log[An]$$

La diferència entre  $\log \beta_2$  i  $\log \beta_1$  proporciona el valor de  $\log K_2$  :

$$\log \beta_2 - \log \beta_1 = \log[Rec(An)_2] - \log[Rec(An)] - \log[An] = \log K_2$$

A partir d'aquest valor, realitzant la inversa del logaritme, es pot conèixer el valor de  $K_2$ .

Una vegada s'han realitzat tots els càlculs adients, es podrien donar 3 situacions diferents:

- Que el valor de  $\log K_1$  sigui major que el de  $\log K_2$ , el que indicaria que el primer anió no facilita la unió d'un segon anió.
- Que el valor de  $\log K_1$  sigui menor que el de  $\log K_2$ , el que indicaria que es forma el complex 1:2 i que la primera interacció, la corresponent a la formació del complex 1:1 és solament un procés que afavoreix la formació de la segona interacció.
- Que el valor de  $\log K_1$  sigui igual que el de  $\log K_2$ , el que indicaria que la unió del primer anió no influencia la interacció del segon.

A més, com més grans siguin els valor de  $\log \beta_1$  i  $\log \beta_2$ , ens indicarà que major és l'afinitat entre l'anió i el receptor.

Una vegada obtingudes les constants d'afinitat és possible calcular la corresponent  $\Delta G$  tenint en compte que es treballa a una temperatura de 25 °C, mitjançant la següent expressió:<sup>47</sup>

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K$$

Efectivament, s'observa que la millor regressió s'obté quan es consideren els dos equilibris de formació dels complexos 1:1 i 1:2 (Figura 3.1.4.) perquè la senyal residual una vegada fet l'ajust és menor i es reparteix de forma aleatòria al llarg de totes les longitud d'ones.

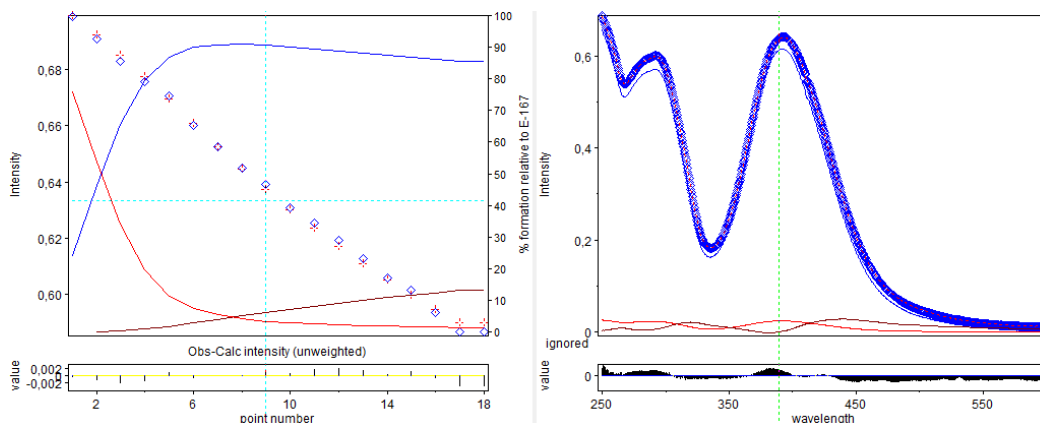


Figura 3.1.4. Ajust obtingut amb el programa HypSpec.<sup>48</sup>

<sup>47</sup> P. Atkins, J. de Paula, *Química Física 8a edició*, Ed. Medica Panamericana, 2006.

<sup>48</sup> A l'esquerra es representen amb quadres blaus els valors experimentals d'absorbància a 390 nm i amb creus vermelles els punts teòrics. Les espècies presents en cada moment de la valoració es representen en: línia blava (complex 1:1), línia vermella (receptor lliure), línia marró (complex 1:2). A la dreta s'indica l'ajust de l'espectre UV-Vis complet. La línia blava gruixada representa els valors experimentals i la línia blava més fina els valors teòrics.

A concentracions baixes d'anió en el medi, la formació del complex 1:1 és la predominant, mentre que a concentracions altes, superiors a  $3,83 \cdot 10^{-5}$  M, l'espècie majoritària al medi es el complex 1:2. Al punt mig de la valoració coexisteixen els dos complexos.

Els resultats obtinguts s'adjunten a les següents taules:

**Taula 3.1.1.** Afinitats d'interacció ( $\log \beta_1$  i  $\log \beta_2$ ) i constants d'associació en unitats logarítmiques ( $\log K_1$  i  $\log K_2$ ) entre el receptor E-167 i l'anió pirofosfat.

Valoració	$\log \beta_1$	$\log \beta_2$	$\log K_1$	$\log K_2$
1	6,3	9,93	6,3	3,63
2	6,14	9,70	6,14	3,56
3	6,18	9,76	6,18	3,58

**Taula 3.1.2.** Afinitats d'interacció ( $\beta_1$  i  $\beta_2$ ), constants d'associació ( $K_1$  i  $K_2$ ), energies lliures de Gibbs ( $\Delta G_1$  i  $\Delta G_2$ ) entre el receptor E-167 i l'anió pirofosfat.

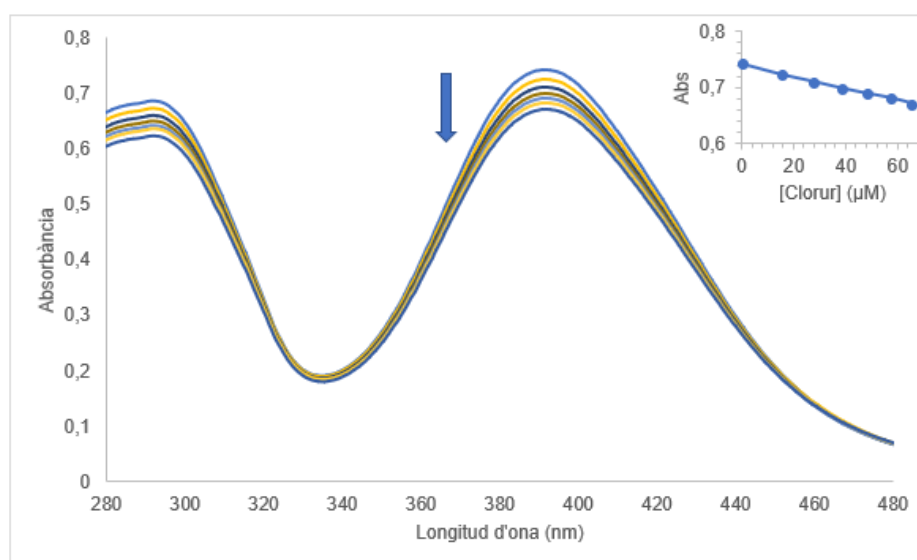
Valoració	$\beta_1$ ( $M^{-1}$ )	$\beta_2$ ( $M^{-1}$ )	$K_1$ ( $M^{-1}$ )	$K_2$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G_1$ (Kcal/mol)	$\Delta G_2$ (Kcal/mol)
1	$1,995 \cdot 10^6$	$8,511 \cdot 10^9$	$1,995 \cdot 10^6$	$4,266 \cdot 10^3$	-8,594	-4,952
2	$1,380 \cdot 10^6$	$5,012 \cdot 10^9$	$1,380 \cdot 10^6$	$3,631 \cdot 10^3$	-8,376	-4,856
3	$1,514 \cdot 10^6$	$5,754 \cdot 10^9$	$1,514 \cdot 10^6$	$3,802 \cdot 10^3$	-8,431	-4,884

**Taula 3.1.3.** Mitjana i desviació estàndard de les constants d'associació ( $K_1$  i  $K_2$ ) i energies lliures de Gibbs ( $\Delta G_1$  i  $\Delta G_2$ ) entre el receptor E-167 i l'anió pirofosfat de les 3 rèpliques.

$K_1$ ( $M^{-1}$ )	$K_2$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G_1$ (Kcal/mol)	$\Delta G_2$ (Kcal/mol)
$1,63 \cdot 10^6 \pm 3,23 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^3 \pm 3,3 \cdot 10^2$	$-8,5 \pm 0,1$	$-4,90 \pm 0,05$

S'observa que el valor de  $\log K_1$  és pràcticament el doble que el de  $\log K_2$  en les tres rèpliques. Això indica que el primer anió que s'uneix al receptor no facilita la unió del segon i per tant es forma el complex 1:1 majoritàriament. No obstant, al final de la valoració també es dona, en menor proporció, la formació del complex 1:2.

#### • Clorur



**Figura 3.1.5.** Col·lecció d'espectres UV-Vis de la valoració entre el receptor E-167 ( $2 \cdot 10^{-5}$  M) i l'anió clorur a concentracions (0, 1,45, 2,71, 3,83, 4,82, 5,71 i  $6,5 \cdot 10^{-5}$  M) a l'interval 280-480 nm. A la inserció del gràfic es representa la variació del màxim d'absorbància a 390 nm en funció de la concentració de clorur en el medi.

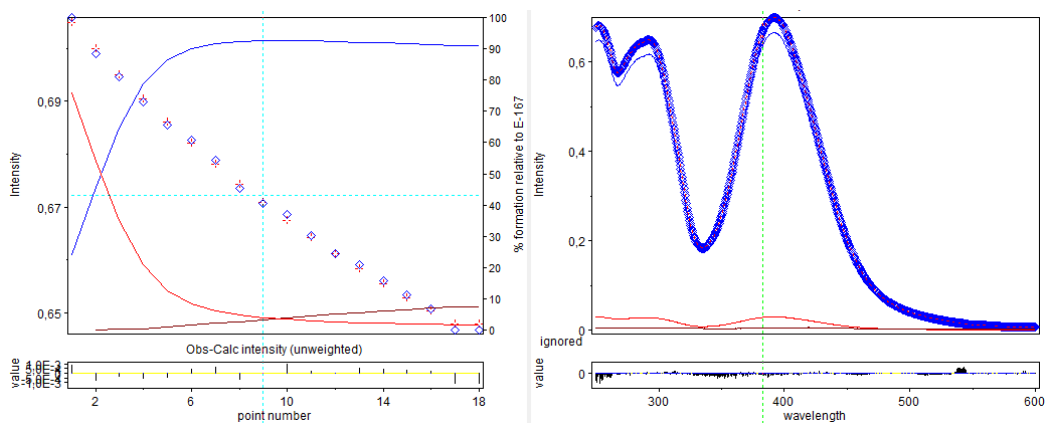


Figura 3.1.6. Ajust obtingut amb el programa HypSpec.<sup>48</sup>

Taula 3.1.4. Mitjana i desviació estàndard de les constants d'associació ( $K_1$  i  $K_2$ ) i energies lliures de Gibbs ( $\Delta G_1$  i  $\Delta G_2$ ) entre el receptor E-167 i l'anió clorur de les 3 rèpliques.

$K_1$ ( $M^{-1}$ )	$K_2$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G_1$ (Kcal/mol)	$\Delta G_2$ (Kcal/mol)
$1,2 \cdot 10^6 \pm 8,3 \cdot 10^4$	$1,97 \cdot 10^3 \pm 2,06 \cdot 10^2$	$-8,29 \pm 0,04$	$-4,49 \pm 0,06$

En aquest cas, es forma el complex 1:1 de forma majoritària, com es pot veure al gràfic d'especiació, donat que el valor de  $K_1$  és tres ordres de magnitud major que el de  $K_2$ .

● Fosfonoacetat

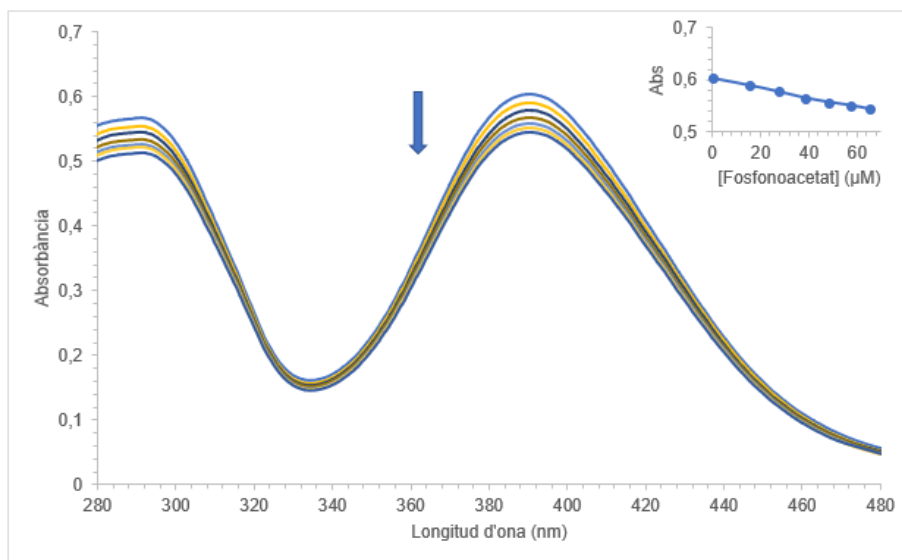


Figura 3.1.7. Col·lecció d'espectres UV-Vis de la valoració entre el receptor E-167 ( $2 \cdot 10^{-5} M$ ) i l'anió fosfonoacetat a concentracions (0, 1,45, 2,71, 3,83, 4,82, 5,71 i  $6,5 \cdot 10^{-5} M$ ) a l'interval 280-480 nm. A la inserció del gràfic es representa la variació del màxim d'absorbància a 390 nm en funció de la concentració de fosfonoacetat en el medi.

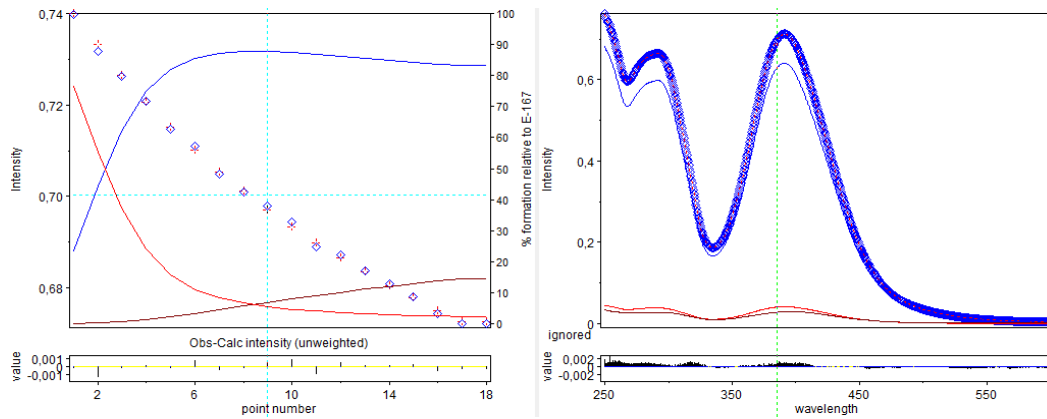


Figura 3.1.8. Ajust obtingut amb el programa HypSpec.<sup>48</sup>

Taula 3.1.5. Mitjana i desviació estàndard de les constants d'associació ( $K_1$  i  $K_2$ ) i energies lliures de Gibbs ( $\Delta G_1$  i  $\Delta G_2$ ) entre el receptor E-167 i l'anió fosfonoacetat de les 3 rèpliques.

$K_1$ ( $M^{-1}$ )	$K_2$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G_1$ (Kcal/mol)	$\Delta G_2$ (Kcal/mol)
$8,5 \cdot 10^5 \pm 1,4 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^3 \pm 7,6 \cdot 10^2$	$-8,08 \pm 0,1$	$-4,92 \pm 0,12$

La constant d'associació del complex 1:1 és inferior a la que s'ha obtingut en el cas del pirofosfat, mentre que la constant d'associació del complex 1:2 és similar. El que indica és que la unió amb el fosfonoacetat resulta menys favorable que amb el pirofosfat ja que quan es forma el complex 1:1, en el cas del pirofosfat es donen dues interaccions fosfat, el que resulta més favorable que una fosfat i l'altra carboxilat. En el cas del complex 1:2, possiblement el fosfonoacetat s'uneix pels grups fosfats deixant el carboxilat lliure essent més favorable que el complex 1:1.

### • Succinat

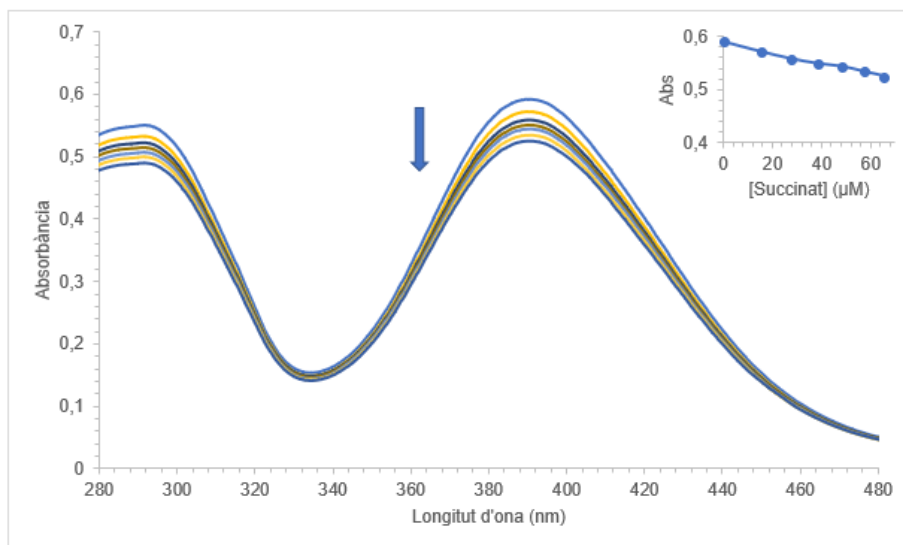


Figura 3.1.9. Col·lecció d'espectres UV-Vis de la valoració entre el receptor E-167 ( $2 \cdot 10^{-5} M$ ) i l'anió succinat a concentracions (0, 1,45, 2,71, 3,83, 4,82, 5,71 i  $6,5 \cdot 10^{-5} M$ ) a l'interval 280-480 nm. A la inserció del gràfic es representa la variació del màxim d'absorbància a 390 nm en funció de la concentració de succinat en el medi.

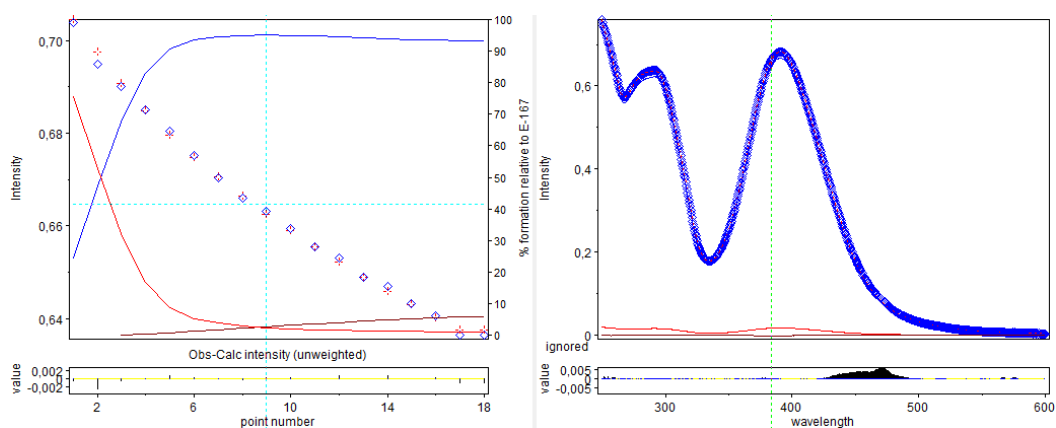


Figura 3.1.11. Regressió obtinguda amb el programa HypSpec.<sup>48</sup>

Taula 3.1.6. Mitjana i desviació estàndard de les constants d'associació ( $K_1$  i  $K_2$ ) i energies lliures de Gibbs ( $\Delta G_1$  i  $\Delta G_2$ ) entre el receptor E-167 i l'aníó succinat de les 3 rèpliques.

$K_1$ ( $M^{-1}$ )	$K_2$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G_1$ (Kcal/mol)	$\Delta G_2$ (Kcal/mol)
$2,22 \cdot 10^6 \pm 3,04 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^3 \pm 8,4 \cdot 10^1$	$-8,65 \pm 0,08$	$-4,36 \pm 0,03$

La constant d'associació del complex 1:1 és basant similar a la que s'obté amb l'aníó pirofosfat. En principi, el grup fosfat es complexa millor que el grup carboxilat però tal vegada en el cas del succinat, la distància és més adequada i s'afavoreix la formació del complex on els dos grups carboxilats s'uneixen al receptor, essent d'aquesta forma millor aníó que el fosfonoacetat.

Taula 3.1.7. Constants d'associació ( $K_1$  i  $K_2$ ) entre el receptor E-167 i els diferents anions.

Anió	Receptor E-167	
	$K_1$ ( $M^{-1}$ )	$K_2$ ( $M^{-1}$ )
Pirofosfat	$1,63 \cdot 10^6$	$3,90 \cdot 10^3$
Clorur	$1,20 \cdot 10^6$	$1,97 \cdot 10^3$
Fosfonoacetat	$8,50 \cdot 10^5$	$4,10 \cdot 10^3$
Succinat	$2,22 \cdot 10^6$	$1,60 \cdot 10^3$

### 3.1.4. Valoracions per espectroscòpia UV-Vis amb el receptor E-177

El receptor E-177 (Figura 3.1.12.) presenta un grup dimetilamino en posició para respecte al grup -NH de la unitat esquamídica.

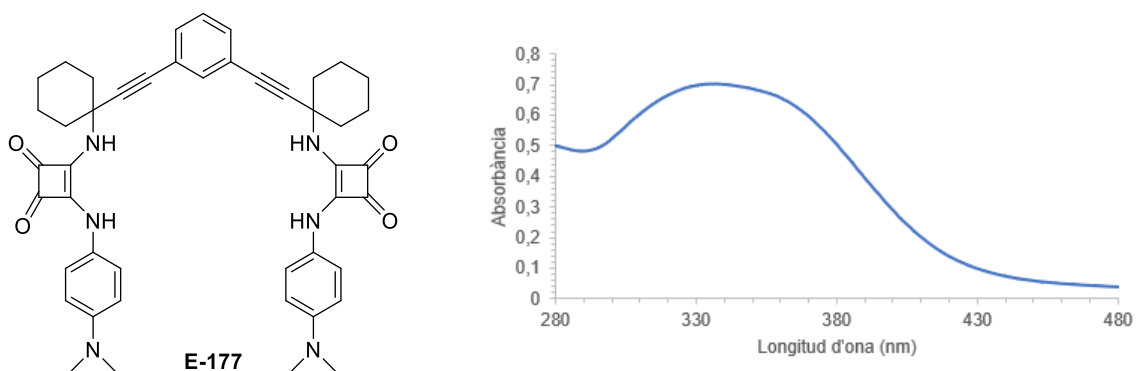


Figura 3.1.12. Estructura del receptor E-177 i el seu espectre UV-Vis a  $2 \cdot 10^{-5}$  M

De la mateixa manera que en el cas anterior, s'ha optat per treballar a una concentració constant de receptor  $2 \cdot 10^{-5}$  M, la qual permet deixar un interval útil d'absorbància per si les bandes creixen o decreixen en intensitat en el transcurs de la valoració tal com s'observa a la Figura 3.1.12.

La dissolució d'aquest receptor és incolora a diferència de la del receptor E-167 que és groga. A més, es pot observar que l'espectre és diferent. Hi ha una banda ampla de màxim d'absorbància a 335 nm que correspon tant a l'anell esquaramídic com a l'anell aromàtic.

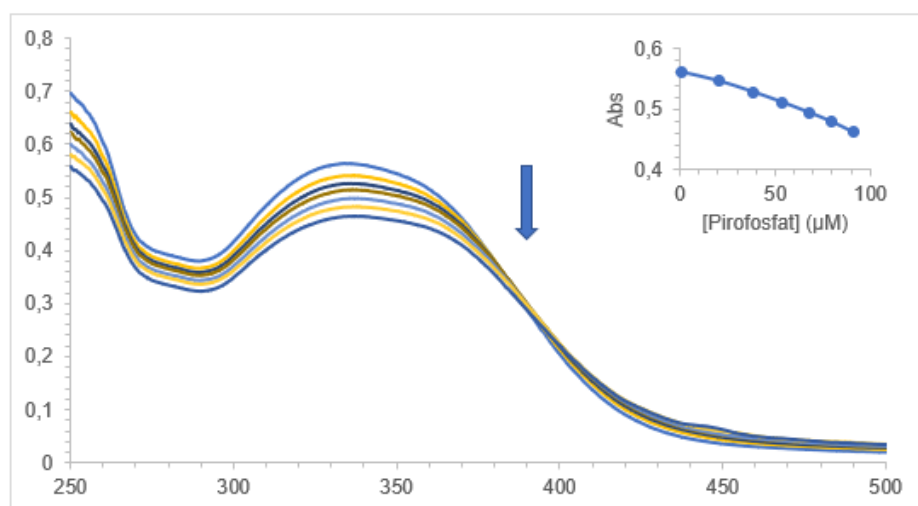
En aquest cas, s'espera que l'efecte electrodonador del grup dimetilamino redueixi la capacitat dels N-H esquaramídics de formar els enllaços d'hidrogen.

Les valoracions, es duen a terme seguint el mateix procediment que en el cas del receptor E-167 a diferència de la dissolució que conté l'anió a partir de la qual es fan les successives addicions de 50 µL, que en aquest cas la seva concentració és  $3 \cdot 10^{-4}$  M.

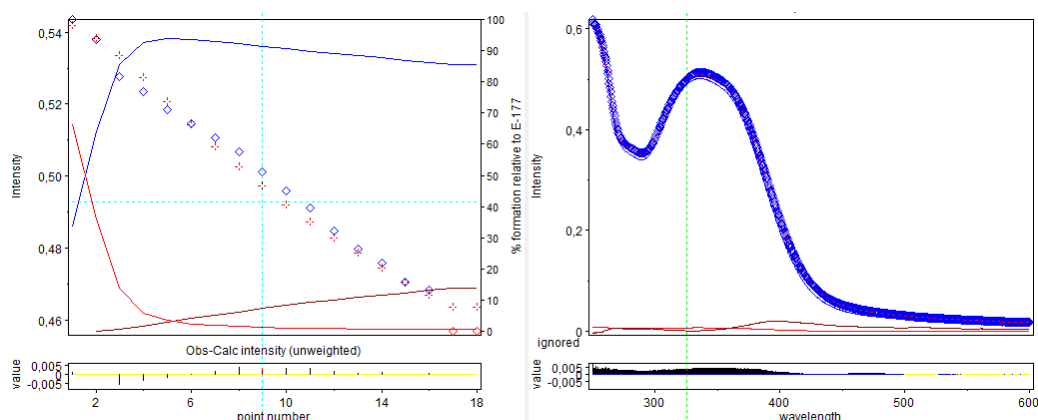
Es van realitzar les valoracions amb els mateixos anions, menys amb el succinat, que no es varen poder dur a terme per falta de receptor.

### 3.1.4.1. Valoracions entre el receptor E-177 i els anions

#### • Pirofosfat



**Figura 3.1.13.** Col·lecció d'espectres UV-Vis de la valoració entre el receptor E-177 ( $2 \cdot 10^{-5}$  M) i l'anió pirofosfat a concentracions (0, 2,00, 3,75, 5,29, 6,67, 7,89 i  $9,00 \cdot 10^{-5}$  M) a l'interval 250-500 nm. A la inserció del gràfic es representa la variació del màxim d'absorbància a 335 nm en funció de la concentració de pirofosfat en el medi.



**Figura 3.1.14.** Regressió obtinguda amb el programa HypSpec.<sup>49</sup>

<sup>49</sup> A l'esquerra es representen amb quadres blaus els valors experimentals d'absorbància a 335 nm i amb creus vermelles els punts teòrics. Les espècies presents en cada moment de la valoració es representen en: línia blava (complex 1:1), línia vermella (receptor lliure), línia marró (complex 1:2). A la dreta s'indica l'ajust de l'espectre UV-Vis complet. La línia blava gruixada representa els valors experimentals i la línia blava més fina els valors teòrics.

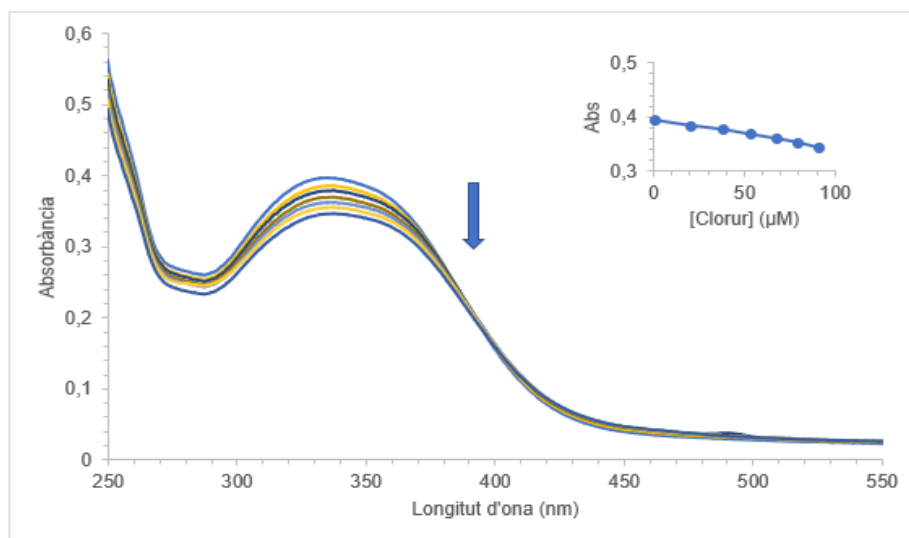


**Taula 3.1.8.** Mitjana i desviació estàndard de les constants d'associació ( $K_1$  i  $K_2$ ) i energies lliures de Gibbs ( $\Delta G_1$  i  $\Delta G_2$ ) entre el receptor E-177 i l'anió pirofosfat de les 3 rèpliques.

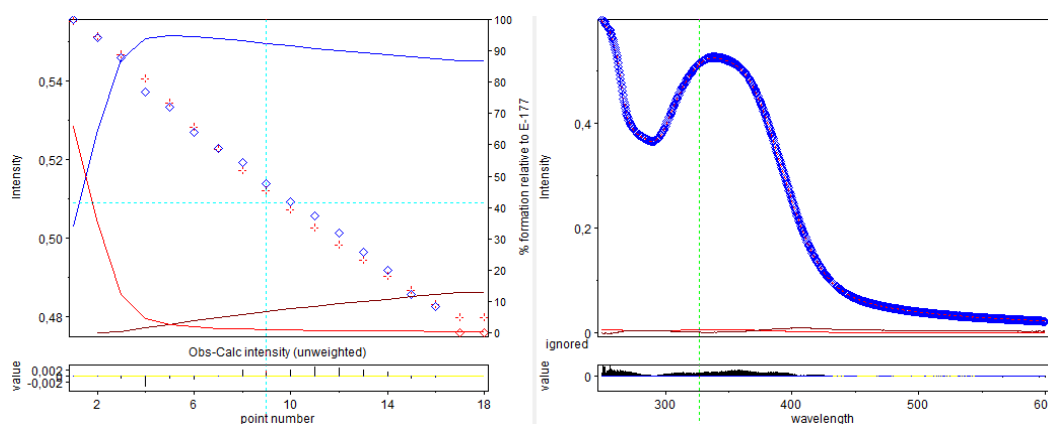
$K_1$ ( $M^{-1}$ )	$K_2$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G_1$ (Kcal/mol)	$\Delta G_2$ (Kcal/mol)
$2,07 \cdot 10^6 \pm 2,15 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^3 \pm 5,6 \cdot 10^2$	$-8,61 \pm 0,06$	$-4,75 \pm 0,11$

Es forma el complex 1:1 de forma majoritària ja que el valor de  $K_1$  és tres ordres de magnitud major que el de  $K_2$ . Les constants són similars a les obtingudes amb el receptor E-167 i el mateix anió.

• **Clorur**



**Figura 3.1.15.** Col·lecció d'espectres UV-Vis de la valoració entre el receptor E-177 ( $2 \cdot 10^{-5} M$ ) i l'anió clorur a concentracions (0, 2,00, 3,75, 5,29, 6,67, 7,89 i  $9,00 \cdot 10^{-5} M$ ) a l'interval 250-500 nm. A la inserció del gràfic es representa la variació del màxim d'absorbància a 335 nm en funció de la concentració de clorur en el medi.



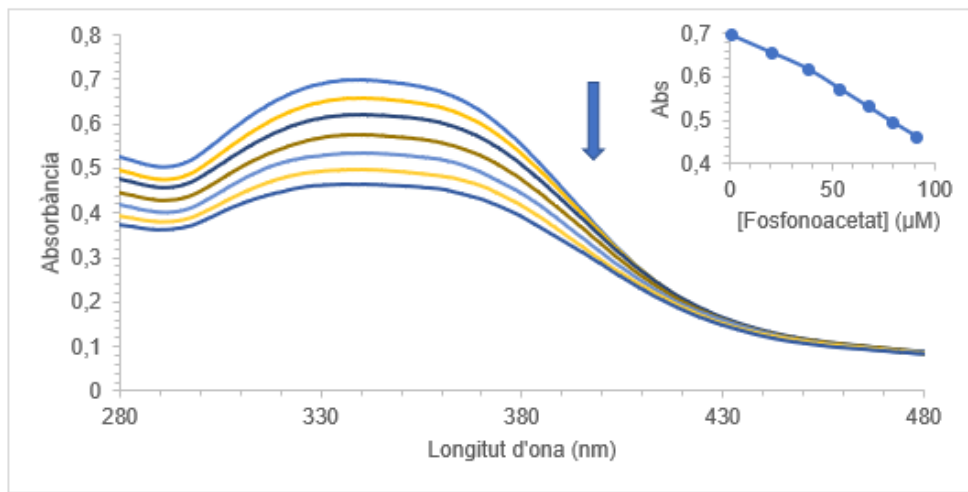
**Figura 3.1.16.** Regressió obtinguda amb el programa HypSpec.<sup>49</sup>

**Taula 3.1.9.** Mitjana i desviació estàndard de les constants d'associació ( $K_1$  i  $K_2$ ) i energies lliures de Gibbs ( $\Delta G_1$  i  $\Delta G_2$ ) entre el receptor E-177 i l'anió clorur de les 3 rèpliques.

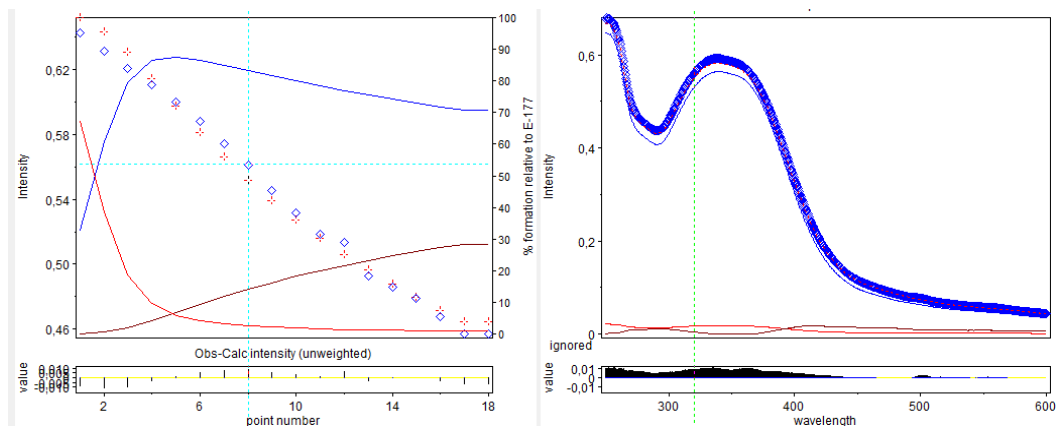
$K_1$ ( $M^{-1}$ )	$K_2$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G_1$ (Kcal/mol)	$\Delta G_2$ (Kcal/mol)
$2,9 \cdot 10^6 \pm 1,6 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^3 \pm 4,3 \cdot 10^2$	$-8,80 \pm 0,03$	$-4,44 \pm 0,14$

Es forma el complex 1:1 de forma majoritària ja que el valor de  $K_1$  és tres ordres de magnitud major que el de  $K_2$ . Els resultats són del mateix ordre de magnitud que els obtinguts amb el receptor E-167, encara que la  $K_1$  sigui lleugerament més elevada.

• **Fosfonoacetat**



**Figura 3.1.17.** Col·lecció d'espectres UV-Vis de la valoració entre el receptor E-177 ( $2 \cdot 10^{-6} M$ ) i l'anió fosfonoacetat a concentracions (0, 2,00, 3,75, 5,29, 6,67, 7,89 i  $9,00 \cdot 10^{-5} M$ ) a l'interval 280-480 nm. A la inserció del gràfic es representa la variació del màxim d'absorbància a 335 nm en funció de la concentració de fosfonoacetat en el medi.



**Figura 3.1.18.** Regressió obtinguda amb el programa HypSpec.<sup>49</sup>

**Taula 3.1.10.** Mitjana i desviació estàndard de les constants d'associació ( $K_1$  i  $K_2$ ) i energies lliures de Gibbs ( $\Delta G_1$  i  $\Delta G_2$ ) entre el receptor E-177 i l'anió fosfonoacetat de les 3 rèpliques.

$K_1 (M^{-1})$	$K_2 (M^{-1})$	$\Delta G_1 (Kcal/mol)$	$\Delta G_2 (Kcal/mol)$
$1,5 \cdot 10^6 \pm 1,9 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^3 \pm 5,8 \cdot 10^2$	$-8,41 \pm 0,08$	$-5,15 \pm 0,06$

La constant d'associació del complex 1:1 és inferior a la que s'ha obtingut en el cas del pirofosfat, mentre que la constant d'associació del complex 1:2 és major. El que indica és que quan es forma el complex 1:1, en el cas del pirofosfat, es donen dues interaccions fosfat, el que resulta més favorable que una fosfat i l'altra carboxilat. En el cas del complex 1:2, possiblement el fosfonoacetat s'uneix pels grups fosfats deixant el carboxilat lliure essent més favorable que el complex 1:1.

### 3.1.5. Comparació del dos receptors a partir dels resultats obtinguts

Taula 3.1.11. Constants d'associació ( $K_1$  i  $K_2$ ), dels dos receptors amb els diferents anions.

Anió	Receptor E-167		Receptor E-177 <sup>50</sup>	
	$K_1$ ( $M^{-1}$ )	$K_2$ ( $M^{-1}$ )	$K_1$ ( $M^{-1}$ )	$K_2$ ( $M^{-1}$ )
Pirofosfat	$1,63 \cdot 10^6$	$3,90 \cdot 10^3$	$2,07 \cdot 10^6$	$3,10 \cdot 10^3$
Clorur	$1,20 \cdot 10^6$	$1,97 \cdot 10^3$	$2,90 \cdot 10^6$	$1,80 \cdot 10^3$
Fosfonoacetat	$8,50 \cdot 10^5$	$4,10 \cdot 10^3$	$1,50 \cdot 10^6$	$6,00 \cdot 10^3$
Succinat	$2,22 \cdot 10^6$	$1,60 \cdot 10^3$	-----	-----

Taula 3.1.12.. Energies lliures de Gibbs ( $\Delta G_1$  i  $\Delta G_2$ ) dels dos receptors amb els diferents anions.

Anió	Receptor E-167		Receptor E-177 <sup>50</sup>	
	$\Delta G_1$ (kcal/mol)	$\Delta G_2$ (kcal/mol)	$\Delta G_1$ (kcal/mol)	$\Delta G_2$ (kcal/mol)
Pirofosfat	-8,50	-4,90	-8,61	-4,75
Clorur	-8,29	-4,49	-8,80	-4,44
Fosfonoacetat	-8,08	-4,92	-8,41	-5,15
Succinat	-8,65	-4,36	-----	-----

Com es pot comprovar a les Taules 3.1.22. i 3.1.23. , les constants d'associació en unitats  $M^{-1}$  i els valors d'energies lliures de Gibbs, en Kcal/mol, dels dos receptors són similars i es troben a la majoria dels casos dins el mateix ordre de magnitud.

En tots els casos hi ha formació del complex 1:1 i 1:2, però en tots els experiments, el valor de  $\Delta G_1$  és major que  $\Delta G_2$ . Per tant, l'equilibri més important és el de formació del complex 1:1.

A més, per tots els anions, tant les constants d'associació com els valors de  $\Delta G$  són elevats. Els millors resultats les presenten el succinat i el pirofosfat en el cas del receptor E-167 i el clorur i el pirofosfat en el cas del receptor E-177, tenint en compte que no hi ha valors per el succinat.

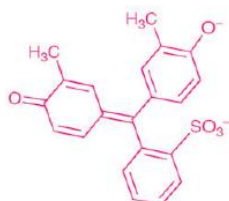
La diferència de densitat electrònica entre els dos receptors no pareix ser molt rellevant en quant als valors de les constants d'associació obtingudes ja que si es comparen les dues constants d'associació de cada anió entre els dos receptors s'observa que presenten el mateix ordre de magnitud. Això es tradueix en què les dues molècules són bons receptors i el fet de que presentin un grup diferent en posició para respecte al nitrogen esquaramídic no és determinant a l'hora d'explicar la interacció. La presència de DMSO en el medi, que en aquest estudi és del 30%, pot influir en modificar el comportament esperat dels receptors i facilitant la formació de complexos. Com s'ha indicat a la Introducció, les esquaramides formen complexos estables amb oxoanions en DMSO. Es podria pensar que el fet de treballar en aigua podria influir en els valors de les constants d'associació i que fossin menors ja que els receptors i anions es troben solvatats i el sistema necessita una major energia per superar aquesta energia de solvatació. No obstant això, els elevats valors de les constants sembla indicar que aquest aspecte és menyspreable, però com s'ha dit anteriorment, l'elevada proporció de DMSO en el medi influeix sobre el comportament del sistema.

## 3.2. Assajos per desplaçament d'indicador (IDA)

Per dissenyar un sistema IDA i dur a terme el reconeixement d'anions, es va utilitzar el vermell de cresol, un indicador àcid-base sensible a la radiació UV-Vis i que permetia obtenir una senyal en les condicions de treball fixades.

<sup>50</sup> Les valoracions amb el succinat no s'han obtingut degut a la falta de receptor suficient per poder realitzar els estudis.

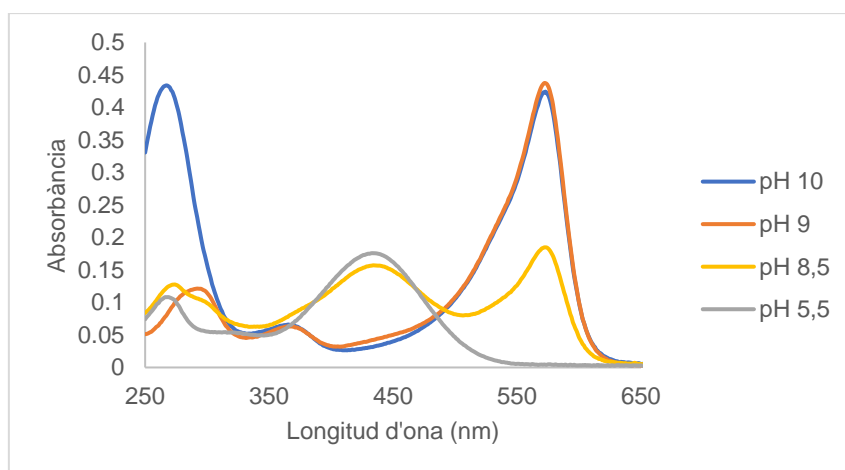
En solució, el color d'aquest indicador canvia de groc (forma àcida) a lila (forma bàsica) per desprotonació d'un monoanió fenòlic per donar una semiquinona dianiònica (Figura 3.2.1.) amb conjugació estesa que és reconeguda pels receptors esquaramídics.<sup>22</sup>



**Figura 3.2.1.** Estructura de la forma bàsica del vermell de cresol.<sup>22</sup>

El vermell de cresol presenta un grup fenol i un àcid sulfònic. Quan l'acidesa de la solució es trobi al voltant del  $pK_a$  del vermell de cresol ( $pK_a=8,25$ ), aquests dos grups es trobaran en la seva forma aniònica, moment en el qual podran interaccionar amb el receptor esquaramídic. A mesura que es va formant la complexació de la forma bàsica amb una esquaramida, es desplaça l'equilibri àcid-base de l'anió, disminuint la forma àcida del medi. Per tant, visualment el color que predomina és el color de la forma bàsica encara que el pH de la dissolució sigui més àcid que el que correspon al color observat. Una vegada és alliberat l'anió del complex per desplaçament amb un altre anió, es restableix l'equilibri àcid-base i s'observa un augment en la coloració de la forma àcida al medi.

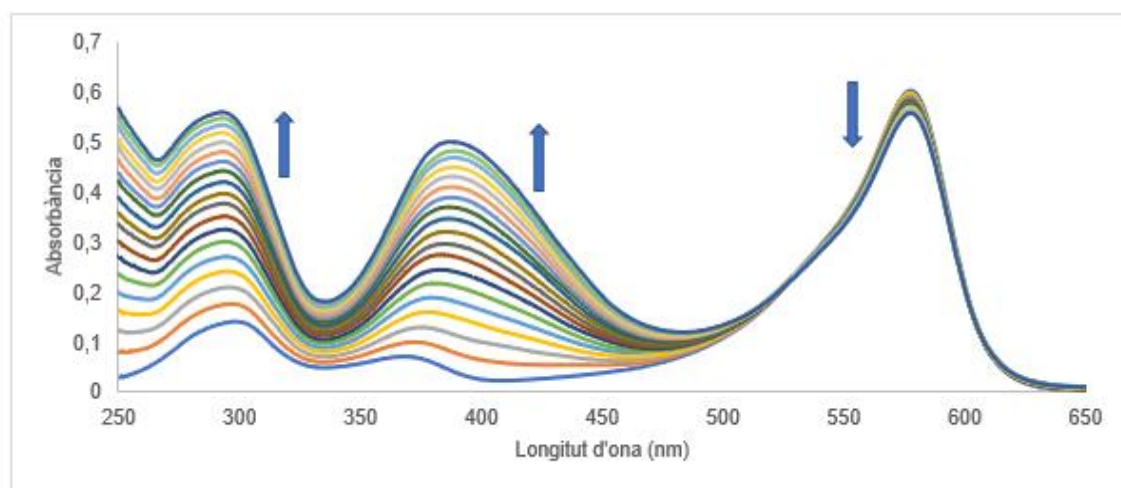
S'ha realitzat l'espectre UV-Vis (Figura 3.2.2.) de l'indicador a diferents valors de pH a una concentració de  $10^{-5}$  M.



**Figura 3.2.2.** Espectre UV-Vis del vermell de cresol a diferents valors de pH a l'interval 250-650 nm.

A partir dels 5 espectres es poden assignar les bandes característiques del vermell de cresol. Les bandes que apareixen al voltant dels 575 i 270 nm són les pròpies de la forma bàsica de l'indicador ja que a mesura que augmenta el pH aquestes també incrementen la seva intensitat. Per altra banda, la banda que apareix sobre els 430 nm correspon a la forma àcida de l'indicador ja que sols s'aprecia amb intensitat a un valor de pH menor o igual de 8,5.

La valoració entre el vermell de cresol i el receptor E-167 es du a terme a pH 10 per tal de mantenir les mateixes condicions que en els experiments anteriors. En aquest cas, es fa una valoració inversa, ja que es van adicionant alíquotes de la dissolució que conté el receptor sobre una dissolució d'indicador. La concentració d'indicador és  $10^{-5}$  M, la qual es manté contant mentre es van fent addicions de receptor de 50  $\mu$ L de forma successiva, partint d'una dissolució de receptor de concentració  $2,17 \cdot 10^{-4}$  M, la mateixa que en totes les valoracions dutes a terme amb aquest receptor i els diferents anions. S'ha realitzat l'espectre UV-Vis (Figura 3.2.3.) de 19 punts a l'interval de concentracions de receptor de 0 M a  $6,51 \cdot 10^{-5}$  M. S'ha elegit l'interval 250-650 nm.



**Figura 3.2.3.** Espectre UV-Vis de la valoració entre l'indicador vermell de cresol i el receptor E-167 a l'interval 250-650 nm.

La banda que es troba al voltant de 570 nm, corresponent a l'indicador, disminueix en intensitat a mesura que transcorre la valoració i augmenta la concentració de receptor. Aquest fet indica que disminueix la concentració d'indicador lliure i que es va acomplexant amb el receptor.

Les bandes que es troben al voltant de 390 i 300 nm augmenten en intensitat a mesura que augmenta la concentració de receptor. Això indica que la banda que correspon a l'indicador en la seva forma àcida, en el cas de que l'equilibri àcid-base de l'indicador lliure permetés que es formi, no seria útil donat que queda solapada per la del receptor. Per tant aquest indicador no és útil per plantejar un sistema IDA amb aquest receptor.

A més, hi ha un problema afegit. S'ha dut a terme la valoració a pH 10 per tal de recrear les mateixes condicions que totes les valoracions anteriors i per assegurar que quan es realitza el desplaçament de l'indicador per part de l'anió pirofosfat, aquest es troba en la seva forma bàsica. El més adequat hauria estat treballar a un pH de 8,5 i així poder tenir el vermell de cresol tant en la seva forma àcida com bàsica (Figura 3.2.2.). D'aquesta forma, s'hagués pogut observar el canvi de color de groc a lila degut a l'equilibri àcid-base induït a causa de la preferència de complexació a partir de la seva forma dianiònica.

S'enregistren les dades obtingudes al programa HypSpec i s'obtenen els valors que s'indiquen a les taules (3.2.1 i 3.2.2.).

**Taula 3.2.1.** Afinitats d'interacció ( $\log \beta_1$  i  $\log \beta_2$ ) i constants d'associació ( $\log K_1$  i  $\log K_2$ ) en unitats logarítmiques i afinitats d'interacció ( $\beta_1$  i  $\beta_2$ ) i constants d'associació ( $K_1$  i  $K_2$ ) entre l'indicador vermell de cresol i el receptor E-167.

$\log \beta_1$	$\log \beta_2$	$\beta_1 (M^{-1})$	$\beta_2 (M^{-1})$	$\log K_1$	$\log K_2$	$K_1 (M^{-1})$	$K_2 (M^{-1})$
6,29	9,69	$1,95 \cdot 10^6$	$4,90 \cdot 10^9$	6,29	3,40	$1,95 \cdot 10^6$	$2,51 \cdot 10^3$

Si es comparen aquests valors amb els obtinguts amb el receptor E-167 i l'anió pirofosfat, s'observa que l'afinitat entre el receptor i l'indicador és major i per tant es podria esperar que l'anió no fos capaç de desplaçar a l'indicador i que per tant la valoració IDA no es pugui dur a terme satisfactòriament. Per confirmar aquest fet, es va preparar una mescla de receptor E-167 i indicador de concentracions  $5,13 \cdot 10^{-5} M$  i  $10^{-5} M$  respectivament, per tal d'assegurar la formació del complex receptor-indicador. Després es varen fer successives addicions d'una dissolució que contenia l'anió pirofosfat de concentració  $2,17 \cdot 10^{-4} M$  i no es va observar cap canvi de coloració en la dissolució, tal com s'observa a la Figura 3.2.4.



**Figura 3.2.4.** Confirma que la valoració IDA no es va realitzar satisfactòriament ja que la solució va presentar una coloració lila al llarg de tota la valoració.

En resum, en aquest Treball de Fi de Grau:

- S'ha dissenyat una metodologia que permet determinar l'afinitat d'interacció de composts de base esquaramida amb anions de rellevància biològica mitjançant espectroscòpia UV-Vis.
- S'han realitzat estudis de reconeixement molecular mitjançant UV que han requerit l'aprenentatge i l'ús d'un software d'anàlisi de dades experimentals (HypSpec).
- S'han utilitzat tècniques instrumentals que permeten ampliar els coneixements adquirits durant el Grau.

## 4. Procediment experimental

En aquest apartat es descriurà el procediment que s'ha dut a terme en la part experimental del treball. Per això, es parlarà sobre els passos que s'han seguit per tal de realitzar les valoracions mitjançant espectroscòpia UV-Vis entre els dos receptors estudiats i els diferents anions, així com també de la seva aplicació concreta a les valoracions IDA.

### 4.1. Metodologia utilitzada en les valoracions per espectroscòpia UV-Vis

Es va utilitzar la mateixa metodologia per realitzar les valoracions per espectroscòpia UV-Vis dels receptors E-167 i E-177 amb els quatre anions avaluats que es troben en forma de sal o d'àcid: pirofosfat, clorur, fosfonoacetat i succinat. Es van realitzar tres rèpliques de cada valoració i a partir de la mitjana s'han calculat les constants d'associació ( $K_a$ ) i els valors de l'energia lliure de Gibbs ( $\Delta G$ ).

El tampó elegit ha de permetre treballar a uns valors de pH entre 8 i 10 per evitar que l'anió pirofosfat es trobi en la seva forma àcida. Per aquesta raó, s'usa el tampó Tris (hidroximetil)aminometà. Es comprova el pH abans de començar la valoració i al final de la mateixa. El pH mesurat és aparent degut a la presència d'un 30 % de DMSO en el medi.

Es preparen 1000  $\mu\text{L}$  de dissolució de receptor a una concentració de l'ordre  $10^{-3}$  M en DMSO. A partir d'aquesta, es preparen 4000  $\mu\text{L}$  d'una dissolució de receptor de concentració  $2 \cdot 10^{-5}$  M en un 30% de DMSO i un 70% d'aigua tamponada a pH 10. S'introdueixen 2100  $\mu\text{L}$  d'aquesta dissolució dins la cubeta, per a posteriorment enregistrar la seva absorbància. Aquest serà el primer punt de la valoració, i que correspon a l'espectre del receptor lliure. Per a realitzar la dissolució del blanc de 2100  $\mu\text{L}$  s'introdueixen 630  $\mu\text{L}$  de DMSO i 1470  $\mu\text{L}$  d'aigua tamponada dins una cubeta per tal que la seva proporció sigui 30% DMSO i 70% aigua tamponada.

Per preparar la dissolució del substrat valorat (anió) es pesa una quantitat coneguda de la sal o l'àcid corresponent i es dissol en 500  $\mu\text{L}$  de la dissolució de receptor, posteriorment es dilueix per obtenir una dissolució de 1000  $\mu\text{L}$  de concentració  $2,17 \cdot 10^{-4}$  M d'anió si es treballa amb el receptor E-167 i  $3 \cdot 10^{-4}$  M si es treballa amb el receptor E-177.

Un cop s'han preparat totes les dissolucions es pot dur a terme la valoració per espectroscòpia UV-Vis. S'introdueix la cubeta que conté la dissolució del blanc dins l'espectrofotòmetre i es defineixen les condicions espectrals: l'interval de longitud d'ona i la velocitat a la qual es vol enregistrar l'espectre. Es realitza el blanc entre 250 i 600 nm. S'introdueix la cubeta que conté la dissolució de receptor lliure, i s'enregistra l'espectre al mateix interval de longitud d'ona. Es van afegint alíquotes de 50  $\mu\text{L}$  de la dissolució d'anió de forma successiva fins a afegir un total de 900  $\mu\text{L}$  i en cada una de les addicions s'enregistra l'espectre.

## 4.2. Metodologia utilitzada en els assajos per desplaçament d'indicador (IDA)

---

Inicialment, s'enregistra l'absorbància de l'indicador àcid-base vermell de cresol a diferents concentracions per a determinar quina és la més adequada per treballar.

Per estudiar quines són les bandes característiques de l'indicador en funció de les condicions de pH es preparen 4 dissolucions d'indicador de 2100  $\mu\text{L}$  de concentració  $10^{-5}$  M a pH 5,5, 8,5, 9 i 10 directament dins les cubetes, a partir d'una dissolució concentrada d'indicador. Es mantenen les cubetes en agitació contínua i es fan les mesures de pH amb un pH-metre, ajustant amb NaOH o HCl fins a aconseguir el pH desitjat.

Seguidament, es realitzen totes les dissolucions necessàries per dur a terme la valoració entre l'indicador vermell de cresol i el receptor E-167 seguint el mateix procediment que s'ha descrit en el cas de treballar amb els diferents anions. En aquest cas, l'interval d'estudi en el qual es du a terme la valoració per espectroscòpia UV-Vis és 250-800 nm. Es van afegint alíquotes de 50  $\mu\text{L}$  de la dissolució de receptor ( $2,17 \cdot 10^{-4}$  M) dins la cubeta que conté la dissolució d'indicador ( $10^{-5}$  M) de forma successiva fins a afegir un total de 900  $\mu\text{L}$  i en cada una de les addicions s'enregistra l'espectre.

Les dades obtingudes són tractades amb el programa HypSpec per tal d'obtenir el valor de  $\log \beta$  i així poder calcular la constant d'afinitat entre l'indicador i el receptor.

## 5. Conclusions

En quant als resultats obtinguts, les conclusions que s'han extret són les següents:

- Les constants d'associació ( $K$ ) en unitats  $M^{-1}$  i els valors d'energies lliures de Gibbs ( $\Delta G$ ), en Kcal/mol, obtinguts entre els dos receptors i els diferents anions de rellevància biològica presenten el mateix ordre de magnitud en la majoria de casos i són valors elevats.
- En tots els estudis realitzats el model de complexació s'ajusta millor si es tenen en compte els dos equilibris (1:1 i 1:2) de formació del complex, però en tots els experiments, l'equilibri més important és el de formació del complex 1:1.
- En el cas del receptor E-167, les constants d'associació, en unitats  $M^{-1}$ , més elevades s'obtenen amb l'anió succinat ( $K= 2,22 \cdot 10^6$ ) i el pirofosfat ( $K= 1,63 \cdot 10^6$ ).
- En el cas del receptor E-177, les constants d'associació, en unitats  $M^{-1}$ , més elevades s'obtenen amb l'anió clorur ( $K= 2,90 \cdot 10^6$ ) i el pirofosfat ( $K= 2,07 \cdot 10^6$ ).
- El fet que els dos receptors presentin un grup diferent en posició para respecte al nitrogen esquaramídic i que per tant la seva densitat electrònica no sigui la mateixa, no pareix ser rellevant a l'hora d'explicar els valors de les constants d'associació obtinguts ja que en tots els casos presenten el mateix ordre de magnitud.
- La valoració per desplaçament d'indicador no s'ha pogut dur a terme de forma satisfactòria ja que a les condicions de treball que s'han optimitzat ( $pH=10$ ), la constant d'associació de l'indicador és molt elevada per poder ser desplaçat per l'anió i el vermell de cresol es troba en la seva forma bàsica però no àcida i per tant el canvi de color de groc a lila degut a l'equilibri àcid-base que té lloc no es pot observar.