



#### PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

## "CAMBIOS ESPECTRALES Y REACTIVIDAD DE HOMÓLOGOS DE AZACUMARINA EN SISTEMAS SUPRAMOLECULARES BASADOS EN CICLODEXTRINAS Y CUCURBITURILOS"

Tesis presentada por:

## JACKSON JOSÉ ALCÁZAR JIMÉNEZ

Para optar al Grado Académico de Doctor en Química.

APROBADA POR:

Dr. ANGEL KAIFER Prof. Examinador

\_\_\_\_\_

Dr. MARCOS CAROLI Prof. Examinador

Dra. FLAVIA ZACCONI Prof. Examinador

Dra. DENIS FUENTEALBA Prof. Examinador

Dr. MARGARITA ALIAGA Prof. Director de Tesis

Dr. JOSÉ SANTOS Prof. Director de Tesis

AGOSTO - 2021

A mis abuelos, Iris y Orlando.

## Agradecimientos

Existe una gran verdad, y es que nadie puede llegar lejos, o durar mucho tiempo de pie, sólo. Por más listo o fuertes que nos creamos, siempre necesitaremos de un abrazo, una dirección, un ¡tú puedes!, para poder avanzar. A veces un ¡hola!, o una sonrisa, es lo único que necesitamos para seguir adelante. En este sentido, quiero manifestar mi más sincero sentimiento de gratitud a todas las personas que han sido parte de este bonito trayecto, y que de una u otra forma han sido los responsables de mi crecimiento como persona en el ámbito personal, emocional y profesional.

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por mostrarme que se puede ser feliz con poco, y a mi amigo y tutor del pregrado Edgar Márquez por siempre insistirme en seguir creciendo. También es importante para mí agradecer a Claudia Valdivia por haber creído en mí y por haberme facilitado los recursos para poder llegar a Chile desde mi país. Sin su grandioso gesto, esta aventura hubiese llegado a su término antes de comenzar. Recibir el correo con el boleto de avión, que en ese momento tenía un costo equivalente a 25 salarios mínimos, fue posiblemente el momento más feliz de mi vida adulta, y por eso estaré eternamente agradecido.

Desde que pisé suelo chileno la dicha se hizo cada vez más común, por eso me complace agradecer a la Prof. Margarita Aliaga y al Prof. José Santos por su recibimiento, por la confianza, por su calidad humana y por siempre brindarme su apoyo, realmente son un 7. También quiero agradecer a todos con los que hice vida en el laboratorio: Profe. Paulina Pávez, Profe. Rodrigo Montecinos, Javiera Oryazun, Mabel Rojas, Roberto Figueroa, Guillermo Oliva, Daniel Cespedes, Daniela Millán, Paloma Castro, Niklas Geue, Guillermo Quintero, Kevin Droguett, Catalina Espinoza, Javier Pérez, Ángel Acuña, Alba Pereira, Beatriz Fariña y Roberto Colunga. Un agradecimiento también a mis compañeros de estudio: Mauricio Varas, Alexander Córdoba, Andrés Lancheros, Angie Forero, Nory Mariño, Diego Rodríguez, Luciano Dibona, Daniela Huaiguimilla y Rafael Viteri. A mis amigos fuera de la Universidad: Elio Padrón, Del valle Velásquez, David Conde, Andrés Velázquez, Daniela Gómez, Dalila Gómez, René Romero, Angelys Padrón y Eliécer Pérez. Gracias por regalarme esa desconexión que a veces necesitaba. A la familia Misad Saide, gracias por la cálida y hermosa compañía en estos últimos años. Alessandra, gracias por el constante e inmenso apoyo, you are the best.

Formalmente, quiero agradecer a Chile, a su gente, a la Pontificia Universidad Católica, a Lucia Estrada, a la beca ANID 21170793 y a los fondos FONDECYT 1170753 y 1160271. También quiero agradecer al Centro de Investigación Singular en Química Biológica y Materiales Moleculares de Santiago de Compostela (España) y al profesor Luis García-Río por su recibimiento en la pasantía; sin dudas fue una experiencia muy bonita. Finalmente, agradecer a la comisión evaluadora que me ha acompañado en todo este proceso.

## Acrónimos y Abreviaciones

а.	3-(dialquilamino)fenol
Abs	Absorbancia
A <sub>0</sub> .	Absorbancia del reactante a tiempo cero
A <sub>t</sub> .	Absorbancia del reactante a tiempo t
b.	5-(dialquilamino)-2-nitrosofenol
<b>C</b> .	2-amino-5-(dialquilamino)fenol
CBs.	Cucurbiturilos
CB7.	Cucurbit[7]urilo
CB8.	Cucurbit[8]urilo
CDCl₃.	Cloroformo deuterado
CDs.	Ciclodextrinas
α-CD.	α-Ciclodextrina
β-CD.	β-Ciclodextrina
γ-CD.	γ-Ciclodextrina
d.	Piruvato de metilo
DAAS.	7-(dialquilamino)aza-cumarina 3-sustituidas
DCM.	Diclorometano
DEST.	(E)-7-(dietilamino)-3-estiril-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona
DMST.	( <i>E</i> )-7-(dimetilamino)-3-estiril-2 <i>H</i> -benzo[ <i>b</i> ][1,4]oxazin-2- ona
DMSTOH.	( <i>E</i> )-3-(2,4-dihidroxiestiril)-7-(dimetilamino)-2 <i>H</i> - benzo[ <i>b</i> ][1,4] oxazin-2-ona
DMSB.	7-(dimetilamino)-3-((fenilimino)metil)-2 <i>H</i> - benzo[ <i>b</i> ][1,4]oxazin-2-ona
DMSBOH.	3-(((2,4-dihidroxifenil)imino)metil)-7-(dimetilamino)-2H- benzo[b][1,4]oxazin-2-ona
DMSO.	Dimetilsulfóxido
DMSO-d <sub>6</sub> .	Dimetilsulfóxido deuterado
DM-β-CD.	Dimetil-β-ciclodextrina
DS <sub>MS</sub> .	Desplazamientos de Stokes del complejo 1:1
DS <sub>s</sub> .	Desplazamientos de Stokes del sustrato
е.	7-(dialquilamino)-3-metil-2 <i>H</i> -benzo[ <i>b</i> ][1,4]oxazin-2-ona

ES <sup>abs</sup> .	Efecto solvatocrómico
ESI-HRMS.	Espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electrospray
f.	7-(dimetilamino)-3-formil-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona
HMBC	Correlación de enlaces múltiples heteronucleares
HRMS.	Espectrometría de masa de alta resolución
HSQC	Correlación cuántica única heteronuclear
∞.	Intensidad de emisión del producto a tiempo infinito
ICDA.	( <i>E</i> )-7-(dietilamino)-3-((4-(dietilamino)-2- hidroxibenciliden)amino)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona
ICDOH.	( <i>E</i> )-7-(dietilamino)-3-((2,5-dihidroxibenciliden)amino)-2 <i>H</i> - cromen-2-ona
ICT.	Transferencia de Carga Intramolecular
IR.	Espectroscopía de Infrarrojo
lt.	Intensidad de emisión del producto a tiempo t
Kobs.	Constante de velocidad observada
<i>k</i> <sub>0</sub> .	Constante de hidrólisis del sustrato libre o no protonado
<i>k</i> <sub>1</sub> .	Constante de hidrólisis del sustrato libre mono-protonado
<i>k</i> <sub>2</sub> .	Constante de hidrólisis del sustrato libre di-protonado
<i>k</i> 3.	Constante de hidrólisis del sustrato libre tri-protonado
<i>k</i> ms.	Constante de hidrólisis del complejo de estequiometría 1:1
<i>k</i> M2S.	Constante de hidrólisis del complejo de estequiometría 2:1
<i>K</i> <sub>1:1</sub> .	Constante de asociación del complejo 1:1
<i>K</i> <sub>2:1</sub> .	Constante de asociación del complejo 2:1
Ka.	Constante de acidez
K <sub>as</sub> .	Constante de asociación
<i>K</i> b.	Constante de basicidad
M.	Macrociclo
MS.	Complejo macrociclo/sustrato
MeOH.	Metanol
ND	No determinado
PITC.	Transferencia de carga intramolecular plano
R <sup>2</sup> .	Coeficiente de determinación

RMN.	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear								
<sup>1</sup> H-RMN.	Espectroscopía protones	de	Resonancia	Magnética	Nuclear	de			
<sup>13</sup> C-RMN.	Espectroscopía carbono-13	de	Resonancia	Magnética	Nuclear	de			
S.	Sustrato								
TICT.	Transferencia de	e cai	rga intramoleo	cular por tor	sión				
TLC.	Cromatografía e	n ca	pa fina						
U <sub>max</sub> .	Número de onda	a má	xima						
ΔDS.	Diferencia entre y el complejo	el de	esplazamiento	os de Stokes	s del sustr	ato			
$\Delta\lambda_{max}.$	Diferencias entre	e lor	igitudes máxii	mas de abso	orción				
$\epsilon_{M_2S}$ .	Absortividad mo	Absortividad molar del complejo de inclusión 2:1							
EMS.	Absortividad molar del complejo de inclusión 1:1								
ES.	Absortividad molar del sustrato								
€S+H+.	Absortividad molar del sustrato mono-protonado								
λ.	Longitud de onda								
$\lambda_{abs}.$	Longitud de onda máxima de absorbancia								
$\lambda_{em}$ .	Longitud de onda máxima de emisión								
$\lambda_{ex}.$	Longitud de onda máxima de excitación								
$\Phi_F$ .	Rendimiento cua	ántic	o de emisión						
@.	Complejo de inc	lusić	'n						
[M] <sub>0</sub> .	Concentración inicial de macrociclo								
[S]0.	Concentración inicial de sustrato								

# Índice General

Dedica	toria		ii
Agrade	cimi	entos	iii
Acrónii	nos	y Abreviaciones	iv
Índice	de Ta	ablas	x
Índice	de Fi	guras	xi
Índice	de E	squemas	xiv
Resum	en		xvi
Abstra	ct		xvii
Capítu	lo I. I	ntroducción	1
1.1.	Hip	ótesis de Trabajo:	11
1.2.	Ob	jetivos:	11
1.2	2.1.	Objetivo general	11
1.2	2.2.	Objetivos específicos	12
Capítu	lo II.	Parte Experimental	13
2.1.	Ма	teriales	13
2.2.	Sín	tesis y caracterización de las Series 1 y 2	13
2.3.	Det	terminación de la concentración de CB7 comercial	18
2.4. come	Est ercia	imación del grado de hidratación de las ciclodextrinas les	18
2.5.	Op	timización de las condiciones experimentales de la Serie	1 19
2.6.	Det	terminación del p <i>K</i> a de los sustratos de la Serie 1	19
2.6	5.1.	Método de valoración ácido-base	19
2.6	5.2.	Método de ajuste cinético	20
2.7.	Ме	dición espectrométrica de los complejos de inclusión	23
2.8. form	Est ados	imación de las constantes de asociación de los complejo y su estequiometria	s 23
2.8	8.1.	Modelo 1:1	24
2.8	3.2.	Modelo 2:1	25

2.9. Caracterización de las propiedades de emisión y absorción 26
2.10. Estudio cinético de la reacción de hidrólisis de Bases de Schiff
(aza-cumarinas y cumarinas)27
2.11. Equipos:
Capítulo III. Resultados y Discusión 33
3.1. Caracterización estructural de los compuestos sintetizados 33
<ul> <li>3.2. Determinación de valores de pKas de la serie de 7-</li> <li>(dialquilamino)aza-cumarinas (Serie 1) en ausencia de macrociclo 39</li> </ul>
3.2.1. Determinación de los valores de pKas del DMST
3.2.2. Determinación de los valores de pKas del DEST 41
3.2.3. Determinación de los valores de pKas del DMSTOH 43
3.3. Estudio del comportamiento espectroscópico (UV-vis y emisión) de las DAAS (Serie 1) en ausencia y presencia de diferentes
macrociclos
3.3.1. Efecto del cucurbit[7]urilo (CB7)45
3.3.2. Efecto de la $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ -CD)
3.3.3. Efecto de la Dimetil-β-ciclodextrina (DM-β-CD):
3.3.4. Efecto de la γ-Ciclodextrina (γ-CD):
3.3.4. Efecto de la $\gamma$ -Ciclodextrina ( $\gamma$ -CD):
3.3.4. Efecto de la $\gamma$ -Ciclodextrina ( $\gamma$ -CD):
3.3.4. Efecto de la $\gamma$ -Ciclodextrina ( $\gamma$ -CD):

Capítul	o IV. Conclusiones	77
5. Bib	liografía	79
6. An	exos	91
6.1.	Anexo A (Grado de hidratación de las ciclodextrinas)	91
6.2.	Anexo B (Determinación de p <i>K</i> a)	93
6.3. estec	Anexo C (Determinación de las constantes de asociación y quiometria)	99
6.4. cuma	Anexo D (Espectros de RMN, IR y ESI-HRMS de las aza- arinas)	106
6.5.	Anexo E (Rendimiento cuántico de emisión)	141
6.6. base	Anexo F (Datos cinéticos sobre la reacción de hidrólisis par s de Schiff: DMSB, ICDA e ICDOH)	a las 143

## Índice de Tablas

Tabla 1. Parámetros físico-químicos relevantes de las CDs	y los CBs 4
---	-------------

- Tabla 2. Información comercial de compuestos utilizados en este trabajo de<br/>tesis.13
- Tabla 3. Características fotofísicas: sustratos libres y sus complejos..... 63
- Tabla 4. Constantes de asociación, estequiometria y efecto del macrociclo sobre las propiedades fotofísicas.

   65

## Índice de Figuras

- Figura 5. Valoración ácido-base para el compuesto DMSTOH (1,5 μM en 30 % MeOH a 25 °C) a distintos valores de pHs (0,7 - 4): a) espectros UV-vis y b) variaciones de la absorbancia a 487 nm a distintos pH en ausencia de macrociclos.

- Figura 8. Valoración con CB7 para el compuesto DMST (1,5 μM en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros UV-vis, b) variaciones de la absorbancia a 611 nm, c) espectro de emisión normalizado (λ<sub>exc</sub> = 530 nm), d) variaciones de la intensidad de emisión a 601 nm..... 47

- Figura 11. Espectros UV-vis (1,5 μM en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C) a 0 y 1,5 mM de β-CD para: a) DMST, b) DEST y c) DMSTOH......53
- Figura 12. Valoración con  $\beta$ -CD para el compuesto DMST (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$ = 535 nm), b) variaciones de la intensidad de emisión normalizada a 590 nm a distintas concentraciones de  $\beta$ -CD (0 – 1,5 mM).......54
- Figura 13. Valoración con  $\beta$ -CD para el compuesto DEST (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$ = 530 nm), b) variaciones de la intensidad de emisión normalizada a 590 nm a distintas concentraciones de  $\beta$ -CD (0 – 1,5 mM).......54
- Figura 14. Valoración con  $\beta$ -CD para el compuesto DMSTOH (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc} = 530$  nm), b) variaciones de la intensidad de emisión normalizada a 610 nm a distintas concentraciones de  $\beta$ -CD (0 1,5 mM).
- Figura 15. Espectros UV-vis (1,5 μM en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C) a 0 y 3,0 mM de DM-β-CD para: a) DMST, b) DEST y c) DESTOH..... 56
- Figura 16. Valoración con DM-β-CD para el compuesto DMST (1,5 μM en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado (λ<sub>exc</sub> = 530 nm), b) variaciones de la intensidad de emisión normalizada a 590 nm a distintas concentraciones de DM-β-CD (0 4,5 mM).

- Figura 19. Espectros UV-vis (1,5 μM en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C) a 0 y 10 mM de γ-CD para: a) DMST, b) DEST y c) DESTOH......60

- Figura 20. Valoración con  $\gamma$ -CD para el compuesto DMST (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$ = 530 nm), b) variación de la intensidad de emisión normalizada a 601 nm a distintas concentraciones de  $\gamma$ -CD (0 – 10 mM)......61

# Índice de Esquemas

Esquema I. Estructura general propuesta para homólogos de aza- cumarina
Esquema II. Rutas sintéticas para la obtención de la Serie 1 y 2 13
Esquema III. Equilibrio ácido-base para una protonación 20
Esquema IV. Representación general para la reacción de hidrolisis en n protonaciones del sustrato
Esquema V. Mecanismo de asociación general de estequiometría 1:124
Esquema VI. Mecanismo de asociación general de estequiometría 2:125
Esquema VII. Mecanismo de hidrólisis en presencia del macrociclo para una estequiometria 1:1 macrociclo/sustrato
Esquema VIII. Mecanismo de hidrólisis en presencia del macrociclo para una estequiometria 2:1 (macrociclo/sustrato)
Esquema IX. Estructura general de una serie de bases de Schiff derivadas de 7-(dietilamino)cumarinas (Serie 3)
Esquema X. Representación del mecanismo propuesto para la formación del complejo de inclusión entre la CB7 y el DMST a pH 2,5 48
Esquema XI. Representación del mecanismo propuesto para la formación del complejo de inclusión entre el CB7 y la Serie 1 a pH 2,5 52
Esquema XII. Representación del mecanismo propuesto para la formación del complejo de inclusión entre la β-CD y sustratos de la Serie 1 a pH 2,5
Esquema XIII. Representación del mecanismo propuesto para la formación del complejo de inclusión entre la DM-β-CD y la Serie 1 a pH 2,5. 59
Esquema XIV. Representación del mecanismo propuesto para la formación del complejo de inclusión entre la γ-CD y la Serie 1 a pH 2,5 62
Esquema XV. Mecanismo propuesto para la reacción de hidrólisis de DMSB en presencia de β-CD o γ-CD a pH 5,369
Esquema XVI. Mecanismo propuesto para la reacción de hidrólisis de DMSB en presencia de DM-β-CD a pH 5,370
Esquema XVII. Mecanismo propuesto para la reacción de hidrólisis de DMSB en presencia de CB7 a pH 5,371

Esquema	XVIII.	Mecanismo	propuesto	para la	reacción	de	hidrólisis	de
ICD	A en p	resencia de (	CB7 a pH 2	2,5				74

Esquema XIX. Mecanismo propuesto para la reacción de hidrólisis de ICDOH en presencia de CB7 a pH 4,0......75

#### Resumen

Las ciclodextrinas (CDs) y cucurbiturilos (CBs) son moléculas anfitrionas, relativamente solubles en agua con cavidades descritas como hidrofóbicas. Aunque la polaridad en la cavidad de las CDs y CBs es similar, sus diferencias estructurales y dimensionales han producido variaciones en su funcionalidad en términos de reactividad y selectividad. En este contexto, este trabajo de investigación tiene como objetivo general, evaluar los comportamientos espectrales y la reactividad frente a la reacción de hidrólisis para una serie de aza-cumarinas sustituidas en presencia y ausencia de CDs y CBs. Para ello, cinco homólogos de 7-(dialquilamino)aza-cumarina 3-sustituidas (DAAS) fueron sintetizados y caracterizados satisfactoriamente por RMN, ESI-HRMS e IR. Luego tales sustratos fueron estudiados espectroscópicamente en solución acuosa en ausencia y presencia de  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD y CB7. Los resultados mostraron, que las propiedades espectrales de las DAAS sintetizadas y sus reactividades frente a la reacción de hidrólisis pueden ser afectadas según la naturaleza del macrociclo empleado, siendo el CB7 y la DM-β-CD los macrociclos más influyentes en los resultados cinéticos de este trabajo.

Entre los resultados destacan: grandes efectos batocrómicos (~4500cm<sup>-1</sup>) y desactivación total de la emisión de las DAAS, atribuido a la protonación del nitrógeno heterocíclico del sustrato tras su inclusión en CB7. También destaca un aumento de hasta 5,5 veces en el rendimiento cuántico de las DAAS en presencia de DM-β-CD. En términos de reactividad, el DM-β-CD y el CB7 produjeron efectos de inhibición significativos frente a la reacción de hidrólisis en medio ácido para el DAAS de tipo base de Schiff (DMSB), diferentes de asociación 3x10<sup>3</sup> 2x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>, con constantes V respectivamente. Finalmente, para dilucidar el efecto de inhibición, un estudio cinético en imino-cumarinas (IC) fue llevado a cabo, de tal manera que, un modelo cinético general para la hidrólisis ácida de iminas, en presencia de CB7, fue propuesto.

#### Abstract

Cyclodextrins (CDs) and cucurbiturils (CBs) are host molecules, relatively soluble in water with cavities described as hydrophobic. Although the polarity in the cavity of CDs and CBs is similar, their structural and dimensional differences have produced variations in their functionality in terms of reactivity and selectivity. In this context, this research work has the general objective of evaluating the spectral behaviors and reactivity against the hydrolysis reaction for a series of substituted azacoumarins in the presence and absence of CDs and CBs. For this purpose, five homologues of 3-substituted 7-(dialkylamino)aza-coumarin (DAAS) were synthesized and characterized satisfactorily by NMR, ESI-HRMS and IR. Such substrates were then studied spectroscopically in aqueous solution in the absence and presence of  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD and CB7. The results showed that the spectral properties of the synthesized DAAS and their reactivities against the hydrolysis reaction can be affected according to the nature of the macrocycle used, with CB7 and DM- $\beta$ -CD being the most influential macrocycles in the kinetic results of this work.

Notable among the results are: large bathochromic effects ( $\approx$ 4500cm-1) and total quenching of the emission of DAAS, attributed to the protonation of the heterocyclic nitrogen of the substrate after its inclusion in CB7. A third finding that stands out is the increase of up to 5.5 times in the quantum yield of DAAS in the presence of DM- $\beta$ -CD. In terms of reactivity, DM- $\beta$ -CD and CB7 produced significant inhibition effects against the hydrolysis reaction in an acid medium for the Schiff base-type DAAS (DMSB), with different association constants  $3x10^3$  and  $2x10^5$  M<sup>-1</sup>, respectively. Finally, to elucidate the inhibition effect, a kinetic study on imino-coumarins (IC) was carried out, in such a way that, a general kinetic model for the acid hydrolysis of imines, in the presence of CB7, was proposed.

#### 1. Capítulo I. Introducción

Desde la síntesis de urea por Wöhler en 1828,[1] la formación y ruptura de enlaces covalentes han sido la base de la química molecular. Sin embargo, la naturaleza, rutinariamente, utiliza interacciones no covalentes para organizar moléculas y formar agregados que realizan funciones específicas. En la actualidad se reconocen las ventajas del paradigma de síntesis en los sistemas biológicos en la construcción de moléculas complejas, que no pueden obtenerse mediante la química molecular.[2] Un primer acercamiento hacia este paradigma fue el modelo de "llave-cerradura", propuesto por Emil Fischer,[3] en 1894, para explicar la alta especificidad de la interacción sustrato-enzima.

En 1967, Pedersen[4] observó que, similar al modelo sustrato-enzima, los éteres de corona presentaban una alta especificidad hacia iones metálicos específicos, siendo esta familia de compuestos macrocíclicos, las primeras moléculas artificiales en presentar reconocimiento molecular. Posteriormente, Cram[5] desarrolló este concepto para cubrir una amplia gama de sistemas moleculares y estableció un nuevo campo de la química: la química anfitrión-huésped, donde la molécula anfitriona puede interactuar en relaciones estructurales únicas con otra molécula, llamada molécula huésped. Estas interacciones anfitrión-huésped incluyen enlaces de hidrógeno, fuerzas atractivas de Van der Waals e interacciones  $\pi$ - $\pi$ , electrostáticas, hidrofóbicas. Estas interacciones a menudo trabajan cooperativamente en el complejo formado confiriendo propiedades físicoquímicas que van más allá de la suma de las propiedades de cada componente individual.[6]

En 1978 Lehn organizó esta química novedosa y propuso el término "química supramolecular", definiéndola como "la química de los ensambles moleculares y del enlace intermolecular".[7] El reconocimiento molecular asociado a estos tipos de sistemas es la propiedad que permite que la química supramolecular sea diferente a la química orgánica clásica. Sus trabajos sobre el reconocimiento molecular, le valieron a Pedersen, Cram y Lehn el Premio Nobel de Química en 1987.[8]

En el transcurso del desarrollo químico, la química supramolecular ha progresado hasta dividirse en nuevas disciplinas. Hoy existen la química de pequeños agregados, que abarca la química anfitrión-huésped (o inclusión), la química de los agregados superiores, que actualmente carece de un nombre propio (química agregada), y la ingeniería de cristales.[9] En la actualidad, novedosos ensamblajes supramoleculares han sido desarrollados. En efecto, los premios Nobel de Química 2016 (Sauvage, Stoddart y Feringa) han demostrado la importancia de diseñar y sintetizar máquinas moleculares que pueden ser utilizadas para obtener trabajo a nivel supramolecular y son consideradas una verdadera revolución tecnológica.[10]

La química anfitrión-huésped ha tenido un gran desarrollo, especialmente, debido a la estabilidad, selectividad y reversibilidad implicadas en la inclusión supramolecular.[11] En consecuencia, un gran número de anfitriones han sido sintetizados y sus aplicaciones van desde la catálisis[12] hasta la administración de medicamentos[13] y desde sensores químicos[14] hasta el almacenamiento de energía.[15] Entre los macrociclos utilizados para ese fin, se encuentran: éteres corona,[16] criptandos,[17] calixarenos,[18] pilararenos,[19] resorcinarenos,[20] hemicriptofanos,[21] ciclodextrinas,[22,23] cucurbiturilos.[24]

En particular, el confinamiento supramolecular ha demostrado ser una herramienta útil en la modulación de las propiedades de emisión y/o absorción de sondas colorimétricas[25–28] e influye en los centros reactivos de un determinado sustrato, catalizando o inhibiendo a éste frente a una determinada reacción.[29] En algunos casos, la actividad catalítica de los macrociclos ha presentado eficiencias y selectividades comparables a aquellas de las enzimas.[12,30] En este contexto, las ciclodextrinas (CDs) y cucurbiturilos (CBs) han tenido una participación muy importante como receptores y catalizadores supramoleculares. [22,23,31–33]

Las CDs son compuestos naturales, constituidos por unidades de glucopiranosa y producidos por la acción de las enzimas sobre el almidón.[23] Mientras que los CBs son compuestos sintéticos preparados, por la condensación de glicolurilo con formaldehído en medio ácido.[34,35]

Además de ser moléculas sintetizables y accesibles comercialmente, las CDs y los CBs son moléculas pre-organizadas, relativamente solubles en agua, que contienen una cavidad suficientemente rígida e hidrofóbica. Los CBs exhiben una geometría simétrica bien definida en el plano ecuatorial, con dos portales idénticos alineados por grupos carbonilos. Mientras tanto, las CDs no sustituidas poseen una geometría quiral con dos portales de tamaño y naturaleza química diferentes, con hidroxilos primarios alineados en los portales de la cavidad más estrecha e hidroxilos secundarios alrededor del portal más ancho. De esta manera, la cavidad de las CDs posee la forma de un cono truncado, alcanzando su diámetro máximo en la abertura más ancha, mientras que la cavidad de los CBs tiene la forma de un barril y su diámetro máximo se encuentra en el ecuador molecular (**Figura 1**).[36]



**Figura 1.** Representación gráfica de los macrociclos: (A) Ciclodextrinas y (B) Cucurbiturilos.

Dentro de la familia de las CDs y los CBs, los macrociclos:  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ -CD), Dimetil- $\beta$ -Ciclodextrina (DM- $\beta$ -CD),  $\gamma$ -Ciclodextrina ( $\gamma$ -CD), Cucurbit[7]urilo (CB7) y Cucurbit[8]urilo (CB8), poseen una cavidad de un tamaño suficiente como para albergar una gran variedad de moléculas

orgánicas. La  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD y el CB7 están formadas por 7 unidades de D-glucopiranosa, 2,6-Di-O-metil-D-glucopiranosa, y glicolurilo, respectivamente. En contraste, la  $\gamma$ -CD y el CB8 están constituidos por 8 monómeros.

					505.
	β-CD	DM-β-CD	CB7	γ <b>-CD</b>	CB8
N° monómeros	7	7	7	8	8
Diámetro de la cavidad (Å)	6,0-6,5	5,8-6,5	5,4-7,3	7,5-8,3	6,9-8,8
Volumen de la cavidad (ų)	262	314	279	427	479
Diámetro externo (Å)	15,4	18,4	16,0	17,5	17,5
Altura (Å)	7,9	11,9	9,1	7,9	9,1
Solubilidad en agua (mM)	16	428	20	178	<0,01

Tabla 1. Parámetros físico-químicos relevantes de las CDs y los CBs.ª

<sup>a</sup> Datos obtenidos de la referencias [36-38].

Dada la similitud en tamaño y volumen de las cavidades de los pares β-CD/CB7 y  $\gamma$ -CD/CB8, (**Tabla 1**), dichas parejas de macrociclos han sido objeto de comparación. No obstante, debido a las diferencias estructurales entre las unidades de glucopiranosa y glicolurilo que constituyen a las CDs y a los CBs, se ha encontrado, en general, una gran diferencia en término de afinidad y funcionalidad hacia diferentes huéspedes. Por ejemplo, las constantes de asociación ( $K_{as}$ ) encontradas para la  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD están en el intervalo 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>, y normalmente están impulsadas por interacciones hidrofóbicas.[39,40] En contraste, la formación de complejos de inclusión de CB7 y CB8 altamente estables es conducida por una combinación de fuerzas hidrofóbicas e interacciones de tipo ion-dipolo entre las cargas positivas ubicadas en el huésped y el dipolo negativo de los átomos de oxígeno del grupo carbonilo, ubicados en la parte externa de la cavidad.[41] Como resultado, los complejos de inclusión de CBs en disolución acuosa pueden alcanzar constantes de asociación alrededor de 10<sup>17</sup> M<sup>-1</sup> (superando a las del par anfitrión-huésped de avidina-biotina).[42,43]

Tales interacciones que caracterizan a las CDs y a los CBs fueron también evidenciadas en diferentes estudios de adición simultánea, al añadir conjuntamente ambos macrociclos en presencia de compuestos organometálicos, rotaxanos y sales de diimidazolio.[44–47] Los CBs presentaron una mayor afinidad a los sitios catiónicos en comparación con

las CDs, las cuales mostraron preferencia hacia los sitios hidrofóbicos.

Por otro lado, si bien la funcionalidad de las CDs y CBs está ligada con la afinidad, depende principalmente de las condiciones del sistema y de la naturaleza del huésped. Por ejemplo, Nau *et al.*,[48] demostraron que el CB7 puede incrementar hasta 285 veces la rapidez con que las benzaldoximas se hidrolizan en medio ácido, atribuido al aumento del p*K*a del sustrato complejado. Recientemente, García-Río *et al.*,[49] reportaron que el CB7 puede acelerar la hidrólisis de dioxolanos hasta 461 veces. Por su parte, el efecto catalítico de la  $\beta$ -CD ha sido investigado exhaustivamente sobre compuestos carbonílicos en disolución.[50–55] Para la hidrólisis básica de fenilacetatos sustituidos, por ejemplo, un factor de aceleración de 250 fue reportado.[55]

En términos comparativos, García-Río *et al.*,[56] reportaron grandes diferencias en la actividad catalítica sobre la solvólisis de cloruros de benzoilo sustituidos, donde DM- $\beta$ -CD y CB7 exhiben efectos opuestos (catálisis o inhibición) para una misma reacción dependiendo de la naturaleza del sustituyente empleado. En este respecto, Aliaga *et al.*,[57] demostraron que la diferencia entre  $\beta$ -CD y CB7 en el reconocimiento molecular, ha sido útil para inferir de forma selectiva en la tautomería de un derivado de cumarina que contiene un grupo  $\beta$ -cetoditioéster, favoreciéndose una especie tautomérica (ceto o enol) de acuerdo al macrociclo empleado.

Otro interesante estudio de inclusión reportado por Kim *et al.*,[58] establece que dos equivalentes de (*E*)-diaminostilbeno dihidrocloruro podrían ser encapsulados por CB8. La irradiación a 300 nm durante 30 minutos desencadenó una cicloadición [2 + 2] mucho más rápida y estereoselectiva (syn/anti) que la reportada por Wenz[59] utilizando  $\gamma$ -CD. Sin embargo, en ausencia de estos dos macrociclos, la isomerización a (*Z*)-diaminostilbeno fue la reacción principal. Posteriormente, Kim e Inoue[60] reportaron, para ambos macrociclos, una alta y marcada diferencia en la estereoselectividad frente a la fotodimerización de antraceno soportado en  $\alpha$ -CD. La fotodimerización "head to tail" y "head to head" fueron observadas con  $\gamma$ -CD y CB8, respectivamente.

Por otra parte, marcadas diferencias dentro de la misma familia de macrociclos también han sido reportadas. Kaifer[61] demostró, que el CB7 y CB8 pueden poseer diferente regioselectividad para un mismo huésped. Es así como el CB7 interactúa con el (4-amido-TEMPO) cobaltoceno mediante la inclusión de la unidad de cobaltoceno organometálico, mientras que CB8 encapsula solo el residuo de TEMPO. Asimismo, Inoue *et al.*,[62] reportaron que, tanto  $\beta$  como  $\gamma$ -CD son capaces de poseer preferencias opuestas en la enantioselectividad ( $D \circ L$ ) en N-(1-naftil-enesulfonil-D/L-fenilalanina). Por último, Huskens y Katsonis[63] han estudiado la capacidad de  $\beta$ -CD y el CB8, los cuales no son comparables en tamaño, para intercambiar un azobenceno desde un macrociclo a otro mediante la fotoisomerización.

Las notables diferencias entre las CDs y los CBs, en la mayoría de los casos hasta ahora expuestos, han evidenciado efectos opuestos sobre la reactividad y selectividad, afectando así la rapidez y la isomería de los productos de reacción. Por lo tanto, el estudio del control supramolecular utilizando diferentes parejas de macrociclos para efectos comparativos parece prometedor.

Por otro lado, el estudio de compuestos fluorescentes o sondas colorimétricas capaces de desarrollar una respuesta óptica ha tenido un gran auge.[64] Esto debido a su utilidad para la determinación de parámetros microambientales, en cavidades macrocíclicas y en sistemas microheterogéneos como membranas y medios celulares. De esta manera, las sondas colorimétricas han tenido aplicaciones potenciales en ciencias biológicas y ambientales en las áreas de detección y señalización.[65–68] Normalmente, muchas de éstas sondas están constituidas por grupos tales como: hidroxilos, alquilaminos, alquenos (-HC=CH-), carbonilos (-C=O) e

iminos (-HC=N-), conformando un sistema  $\pi$ -conjugado y electrones no compartidos que dan origen a absorciones características en el rango UVvisible. Estos grupos funcionales mencionados han jugado un papel característico en la química de inclusión, desde su uso en compuestos de estructura simples, tales como el 4-(dimetilamino)benzonitrilo[69] y el bisfenol A [70] hasta en moléculas más complejas como los xantenos,[71– 74] acridinas,[75] quinonas-iminas,[72,73,76,77] y cumarinas.[27,57,78]

En particular, el grupo dialquilamino, por su carácter donador de electrones, confiere características de transferencia de carga intramolecular (ICT) a ciertos sistemas  $\pi$ -conjugados, aumentando el momento dipolar en el estado excitado. La eventual relajación de este estado excitado, en general, podría estar asociado a fenómenos radiativos a longitudes de onda más larga. Por ejemplo, la sustitución de un grupo dialquilamino en la posición 7 de la cumarina es suficiente para inducir procesos radiativos como la fluorescencia. Normalmente, estas ICT inducidas por grupos dialquilaminos conducen a un estado plano de carga parcial en el estado fundamental. En el estado excitado, la ICT es altamente susceptible a transformarse, a través de una rotación (90°) del grupo *N*,*N'*-dialquil, en un estado de transferencia de carga intramolecular torsionado (TICT) no fluorescente en disolventes polares. [78–81]

Para que la ICT tenga lugar desde un grupo donador de electrones, el sistema molecular debe disponer de un grupo capaz de aceptar o atraer los electrones. A este sistema donor-aceptor se le conoce como sistema "*push-pull*". La posición de las bandas de absorción y/o emisión de estos sistemas dependen de varios parámetros tales como: disolvente, viscosidad, presión y temperatura. Además, estas bandas también pueden ser influenciadas cuando el cromóforo o el fluoróforo se encuentran bajo sistemas supramoleculares.[14]

De manera similar ocurre con el p*K*a, éste depende de la temperatura, el disolvente, la fuerza iónica y, en algunas ocasiones, del sistema

supramolecular al cual se encuentra sometido el sustrato. Éste último, a su vez, dependerá de la ubicación del grupo donador o aceptor de protones del sustrato en el complejo supramolecular anfitrión-huésped. Por ejemplo, en un estudio comparativo en derivados de chalconas dietil y dimetilamino sustituidas, el grupo dimetilamino presentó una menor protección a la protonación debido a su mayor afinidad hacia los bordes del portal del CB7, observándose solo un aumento del p*K*a para el ácido conjugado de dicho grupo.[82]

El hecho que los grupos alquilamino puedan conferir diferentes propiedades a una estructura base, y que éstas puedan eventualmente, ser moduladas por interacciones supramoleculares, ha sido un punto de interés para nuestra investigación hacia una familia cumarinas y de aza-cumarinas (**Figura 2**). El motivo de este enfoque es que, a diferencia de otras familias de colorantes, las aza-cumarinas 7-dialquilamino sustituidas, presentan interesantes propiedades fluorescentes y, además, su comportamiento bajo sistemas supramoleculares no ha sido estudiado.



**Figura 2.** Estructura base de una cumarina (2*H*-chromen-2-one, X = CH) y una aza-cumarina (2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-one, X = N).

Tales aza-cumarinas, desde sus primeras síntesis,[83–86] han sido utilizadas como sensores fluorescentes para la determinación de diversos analitos, tales como: bacterias[87,88], biotioles,[89–91] hidrazinas[92] e iones.[93–97] Esta capacidad de detección está dada por la funcionalización de la posición 3 de la 7-(dialquilamino)aza-cumarina mediante grupos o segmentos moleculares estratégicamente seleccionados que interactúan o reaccionan con un determinado analito. Uno de esos segmentos es el estiril funcionalizado. En general, las 7-(dialquilamino)aza-cumarinas 3-estiril sustituidas (DAAS) son ópticamente sensibles a la polaridad del medio, esto se debe a que las DAAS presentan

un sistema  $\pi$  conjugado a lo largo de su estructura molecular que comprende un modelo "*push-pull*" en el cual el grupo dador de electrones (*diaquilamino*) induce la formación del estado ICT, observándose grandes desplazamientos de Stokes en disolventes polares.[84,86] En particular, el sustituyente estiril y sus derivados confieren a las aza-cumarinas dos enlaces rotables, aumentando sus grados de libertad rotacional intramolecular. Por lo tanto, el confinamiento supramolecular podría restringir las desactivaciones no radiactivas asociadas a estos movimientos intramoleculares; tal como se reportó para los derivados de estireno: chalconas,[98] cinamatos[99] y estirilpiridinio.[100] Es importante resaltar que la adición de  $\beta$ -CD o CB7 en estos derivados, resultó en un significativo aumento en la intensidad de fluorescencia.

Por otra parte, las estructuras basadas en iminas como centros quelantes han demostrado tener la capacidad para formar complejos con casi todos los metales.[101] En general, estas iminas son denominadas bases de Schiff y han sido incorporadas como unidad de detección en diversos sensores colorimétricos de iones metálicos.[102] La selectividad hacia un ion metálico específico depende del tamaño y la carga del ion, del tamaño del centro quelante de la base de Schiff y de las configuraciones electrónicas de ambos, así como también depende de la naturaleza ácidobase duros y blandos de los átomos que interactúan para la formación del complejo metálico.[103]

En relación con el centro quelante de las bases de Schiff, éstos además de poseer un grupo imino, presentan conjunción con grupos vecinos tales como: carbonilos, hidroxilos, sulfidrilos, aminas entre otros, formando una especie de pinza que estabiliza o forma parte del centro de coordinación.[67,101,102] Sin embargo, en medio acuoso las bases de Schiff pueden hidrolizarse dependiendo de los bloques moleculares que las conforman.[104–109] Estudios en derivados de cumarinas que contienen bases de Schiff presentaron una alta velocidad de hidrólisis por debajo del 1% (v/v) de agua en DMSO.[109] Recientemente, se reportó otro estudio

9

en el cual salicil-glicina también presenta su hidrólisis en trazas de agua, observándose que la hidrólisis del grupo imino pueden ser acelerada por Fe<sup>3+</sup> o Cu<sup>2+</sup>, los cuales actúan como ácidos de Lewis.[110] De este modo, el uso de bases de Schiff para la detección de metales o formación de complejos de coordinación en solución acuosa podría estar limitada por reacciones de hidrólisis o catalizada por los mismos analitos.

Por otra parte, el uso de macrociclos puede modular la selectividad de los centros quelante. Pang *et al.*,[111] reportaron una sonda (no base de Schiff) altamente selectiva dada su combinación con CB8. Poco más tarde, Liu *et al.*,[112] demostraron que CB7 puede influir en la estabilidad de determinadas bases de Schiff. Por lo tanto, lo anterior es un promisorio reporte que sugiere que los complejos supramoleculares anfitrión-huésped podrían influir en las propiedades selectivas de sondas colorimétricas basadas en iminas y en su estabilidad frente a la reacción de hidrólisis en disoluciones acuosas.



**Esquema I**. Estructura general propuesta para homólogos de azacumarina.

Considerando todo lo anteriormente mencionado, en el presente proyecto se propone que homólogos de aza-cumarina (DAAS, **Esquema I**) deberían exhibir rotaciones a lo largo de sus tres enlaces simples r<sub>a</sub>, r<sub>b</sub> y r<sub>c</sub>,[113] las cuales serán afectadas por el confinamiento supramolecular; influyendo en las propiedades ópticas de emisión y/o absorción de dichos homólogos. Adicionalmente, se espera que dicho confinamiento esté favorecido por la

formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares y por la protonación de los grupos dialquilamino.

Además, para las bases de Schiff (Serie 2), se propone que éstos pudiesen hidrolizarse en medios ácidos y/o básicos formando los derivados correspondientes (aldehído y amina primaria). En este sentido, y por todo lo expuesto, es de vital importancia evaluar el comportamiento y los posibles cambios espectrales y de reactividad que experimentarían los compuestos propuestos, en medios confinados, incluyendo una probable reacción de hidrólisis para las bases de Schiff correspondientes.

## 1.1. Hipótesis de Trabajo:

Teniendo presente la alta sensibilidad a la polaridad del medio que poseen las propiedades ópticas de las DAAS, y considerando las notables diferencias existentes entre las ciclodextrinas y los cucurbiturilos en términos de selectividad.

Se plantea que estos macrociclos inducen un control supramolecular sobre las propiedades espectrales de la Serie 1 propuesta.

En particular, para la Serie 2 (bases de Schiff) la inclusión permitirá la modulación de sus reactividades frente a reacciones de hidrólisis de acuerdo con la naturaleza de los macrociclos indicados.

### 1.2. Objetivos:

## 1.2.1. Objetivo general

Evaluar los comportamientos espectrales y la reactividad frente a la reacción de hidrólisis de una serie homóloga de DAAS en sistemas supramoleculares basados en ciclodextrinas y cucurbiturilos.

## 1.2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar las DAAS (Serie 1 y 2, Esquema I) para ser utilizados como huéspedes en ciclodextrinas (β-CD, DM-β-CD, γ-CD) y en cucurbiturilo (CB7).
- Caracterizar estructuralmente por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de infrarrojo (IR) y por espectrometría de masa de alta resolución (HRMS, por sus siglas en inglés) las DAAS sintetizadas.
- Caracterizar las propiedades espectrales de emisión y/o absorción (efectos solvatocrómicos, desplazamientos de Stokes y rendimientos cuánticos de emisión) de las DAAS sintetizadas, en ausencia y presencia de macrociclos.
- Estimar las estequiometrías y las constantes de asociación (K<sub>as</sub>) para cada uno de los complejos de inclusión formados.
- Evaluar cinéticamente la reacción de hidrólisis para algunos de los homólogos de la Serie 2, en ausencia y presencia de los macrociclos propuestos.

## 2. Capítulo II. Parte Experimental

#### 2.1. Materiales

**Tabla 2**. Información comercial de compuestos utilizados en este trabajo de tesis.

Compuestos	N° CAS	Proveedor	N° de producto	% pureza
<b>a</b> (R <sub>1</sub> =CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	91-68-9	MERCK	102091	97
<b>a</b> (R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> )	99-07-0	MERCK	D144002	97
Pd/C	7440-05-3	MERCK	520829	-
d	600-22-6	MERCK	371173	90
Benzaldehído	100-52-7	MERCK	B1334	99
2,4-dihidroxi- benzaldehído	95-01-2	MERCK	168637	98
Anilina	62-53-3	MERCK	132934	99
Clorhidrato de 2-aminoresorcinol	634-60-6	MERCK	163171	96
CB7	259886-50-5	MERCK	545201	-
β-CD	68168-23-0	MERCK	856088	99
γ-CD	17465-86-0	Cyclolab R&D	CY-3001	95
DM-β-CD	51166-71-3	Cyclolab R&D	CY-2004.3	95

 $\mathbf{a} = 3$ -(dialquilamino)fenol,  $\mathbf{d} = piruvato de metilo.$ 

#### 2.2. Síntesis y caracterización de las Series 1 y 2

Con el fin de llevar a término los objetivos específicos 1 y 2, la síntesis de las DAAS (Serie 1 y 2) fue realizada de acuerdo con la ruta sintética mostrada en el **Esquema II**, donde sus estructuras químicas fueron confirmadas por RMN, IR y ESI-HRMS.



Esquema II. Rutas sintéticas para la obtención de la Serie 1 y 2.

A continuación, se presenta en detalle la metodología utilizada:

<u>Síntesis de 5-(dimetilamino)-2-nitrosofenol (b, R1=CH3) y 5-(dietilamino)-2-nitrosofenol (b, R1=CH2CH3)</u>: 3 g de 3-(dimetilamino)fenol o 3-(dietilamino)fenol (a) fueron disueltos en 13 ml de ácido clorhídrico al 22,8 % (v/v) y nitrosado, gota a gota, con una disolución saturada de nitrito de sodio (1,2 eq) manteniendo una temperatura entre 0 - 5 °C. Una vez añadido todo el nitrito, la reacción se dejó agitando por 1 h, tras lo cual se filtró y se lavó tres veces con 5 ml de éter etílico. El sólido amarrillo fue tratado con 35 ml de una disolución saturada de acetato de sodio, se filtró y se recristalizó con acetona para obtener un sólido rojo.[89] 3,15 g de 5-(dimetilamino)-2-nitrosofenol fue obtenido (rendimiento: 86 %) y para el 5-(dietilamino)-2-nitrosofenol se obtuvo 3,44 g que corresponde a un rendimiento de 83 %.

Síntesis de 7-(dimetilamino)-3-metil-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (e, <u> $R_1$ =CH\_3)</u>: La síntesis fue llevada a cabo a partir de la modificación de la metodología previamente reportadas en la literatura.[86,89] En este caso, 1,2 g del compuesto previamente sintetizado (b) y 0,1 eg de Pd-C fueron añadidos en 100 ml de etanol. Seguidamente, la disolución fue tratada con H<sub>2</sub>, con previo vacío, durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego, a la mezcla de reacción, se le extrajo el H2 en exceso y se remplazó con N2 y, de manera *in situ*, se hizo reaccionar con piruvato de metilo (**d**) (1,6 eq) a reflujo durante 3 h. Después se filtró y se removió el etanol a presión reducida. El residuo fue purificado por cromatografía flash de columna utilizando sílica como fase estacionaria y éter de petróleo / acetato de etilo (3:1) como eluyente, obteniéndose un sólido amarrillo (0,95 g, rendimiento: 66 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7,46 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 6,63 (dd, J = 9,1; 2,8 Hz, 1H), 6,38 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 3,05 (s, 6H), 2,46 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,36; 151,72; 148,62; 147,37; 128,98; 122,65; 109,54; 97,28; 40,26; 20,70 ppm.

<u>Síntesis</u> de 7-(dietilamino)-3-metil-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (e, R<sub>1</sub>=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>): Se realizó la misma metodología descrita previamente, obteniéndose 0,95 g de un sólido amarrillo (rendimiento: 66 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,45 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,61 (dd, *J* = 9,0; 2,5 Hz, 1H), 6,38 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 3,40 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 2,45 (s, 3H), 1,20 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H) ppm. <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,54; 149,54; 149,09; 146,70; 129,24; 122,31; 109,23; 96,73; 44,85; 20,65; 12,45 ppm.

Síntesis del (E)-7-(dimetilamino)-3-estiril-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DMST): Cabe señalar que dicho compuesto ha sido sintetizado previamente por Bris[86] usando anhidrido acético (Ac<sub>2</sub>O) como medio de reacción. Sin embargo, considerando la necesidad de sintetizar el compuesto análogo hidroxilado DMSTOH, las condiciones de síntesis fueron cambiadas reemplazando el Ac2O por 1,4-dioxano, de esta manera evitar la acetilación de los grupos hidroxilos en la síntesis de DMSTOH. El uso de 1,4-dioxano como medio de reacción fue inspirado por el trabajo reportado por Xu, et al.[114] En este sentido, 200 mg de e (R1=CH3), 0,2 ml de benzaldehído (2 eq) y 4 ml de 1,4-dioxano fueron añadidos en un tubo de reacción. La mezcla se llevó a 160 °C y al cabo de 39 h el TLC indicó el término de la reacción. Posteriormente, el 1,4-dioxano fue removido a presión reducida y el residuo purificado por cromatografías de columna en sílica, la primera usando DCM y una segunda cromatografía con éter de petróleo / acetato de etilo (5:1) para obtener un sólido rojo (174 mg, rendimiento: 61 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7,94 (d, J = 16,3 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 7,3 Hz, 2H), 7,55 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 16,3 Hz, 1H), 7,40 - 7,35 (m, 2H), 7,34 - 7,29 (m, 1H), 6,68 (dd, J = 9,0; 2,7 Hz, 1H), 6,42(d, J = 2,7 Hz, 1H), 3,08 (s, 6H) ppm. <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  154,09; 151,96; 148,36; 142,48; 136,63; 136,40; 129,67; 128,93; 128,78; 127,59; 123,78; 122,31; 110,12; 97,21; 40,32 ppm. IR vmax: 2904 (NC-H), 1715 (C=O), 1618 (HC=CH, trans) cm<sup>-1</sup>. ESI-HRMS: m/z calculada para  $C_{18}H_{16}N_2O_2^{-}$ , [M] = 292,1217; encontrada 292,1219.

del (E)-7-(dietilamino)-3-estiril-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona Síntesis (**DEST**): 100 mg de e (R<sub>1</sub>=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,1 ml de benzaldehido (2 eq) y 4 ml de 1,4-dioxano fueron añadidos en un tubo de reacción. La mezcla se llevó a 140 °C y al cabo de 39 h el TLC indicó el término de la reacción. Posteriormente, el 1,4-dioxano fue removido a presión reducida y el residuo purificado de la misma manera a la descrita anteriormente para el DMST, obteniéndose 59 mg de un sólido rojo (rendimiento: 43 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7,94 (d, J = 16,3 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 7,3 Hz, 2H), 7,53 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 7,40 – 7,35 (m, 2H), 7,35 – 7,27 (m, 1H), 6,66 (dd, J = 9,1; 2,7 Hz, 1H), 6,42 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 3,44 (q, J = 7,1 Hz, 4H), 1,23 (t, J = 7,1 Hz, 6H) ppm. <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ 154,18; 149,86; 148,80; 141,85; 136,72; 136,06; 129,94; 128,83; 128,76; 127,54; 123,49; 122,47; 109,86; 96,68; 45,01; 12,54 ppm. IR vmax: 2963 (NC-H), 1718 (C=O), 1620 (HC=CH, *trans*) cm<sup>-1</sup>. ESI-HRMS: m/z calculada para  $C_{20}H_{20}N_2O_2^{-1}$ , [M]<sup>--</sup> = 320,1530; encontrada 320,1531.

Síntesis del (E)-3-(2,4-dihidroxiestiril)-7-(dimetilamino)-2H-benzo[b][1,4] oxazin-2-ona (DMSTOH): 200 mg de e (R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>), 271 mg de 2,4dihidroxibenzaldehido (2 eq) y 4 ml de 1,4-dioxano fueron añadidos en un tubo de reacción. La mezcla se llevó a 150 °C durante 80 h (monitoreada por TLC). Luego, el 1,4-dioxano fue removido a presión reducida y el residuo purificado por cromatografías de columna en sílica, la primera usando acetona/hexano (1:1) y una segunda cromatografía con DCM/ acetato de etilo (2:1) para obtener un sólido color rojo vino (96 mg, rendimiento: 30 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9,97 (s, 1H), 9,72 (s, 1H), 7,99 (d, J = 16,3 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 16,3 Hz, 1H), 6,73 (dd, J = 9,1; 2,7 Hz, 1H), 6,51 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,40 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 6,31 (dd, J = 8,5, 2,4 Hz, 1H), 3,01 (s, 6H) ppm. <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 160,27; 158,25; 154,17; 151,72; 148,11; 143,37; 131,87; 129,43; 129,24; 123,60; 117,94; 115,38; 110,52; 108,33; 103,12; 97,50; 40,39 ppm. IR vmax: 3060-3302 (OH, bonded), 2903 (NC-H), 1700 (C=O), 1599 (HC=CH, *trans*) cm<sup>-1</sup>. ESI-HRMS: m/z calculada para C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, [M-H] = 323,1037; encontrada 323,1037.

<u>Síntesis del 7-(dimetilamino)-3-formil-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**f**): 250 mg de **e** (R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>) y 204 mg de SeO<sub>2</sub> (1,5 eq) fueron disueltos en 4 ml de 1,4-dioxano. La reacción se llevó a cabo durante 4 h a 80 °C. Luego, el 1,4-dioxano fue removido a presión reducida y el residuo purificado por cromatografía flash de columna en sílica; usando acetato de etilo/hexano (2:1) como eluyente. Un sólido de color burdeos fue obtenido (112 mg, rendimiento: 42 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  10,09 (s, 1H), 7,70 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 6,78 (dd, *J* = 9,3; 2,7 Hz, 1H), 6,42 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 3,00 (s, 6H) ppm.</u>

<u>Síntesis del 7-(dimetilamino)-3-((fenilimino)metil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-</u> <u>2-ona (DMSB):</u> 100 mg (1 eq) de **f** se hizo reaccionar con 42 μl (1 eq) de anilina en 20 ml de tolueno a 90 °C por 4 h. Luego, la mezcla de reacción se filtró en caliente y la disolución fue tratada a presión reducida para remover el disolvente. Finalmente, el residuo fue recristalizado en etanol y lavado tres veces con 2 ml éter etílico, obteniéndose 81 mg de un sólido rojo (rendimiento: 60 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,86 (s, 1H), 7,77 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,42 – 7,37 (m, 2H), 7,37 – 7,32 (m, 2H), 7,29 – 7,23 (m, 1H), 6,72 (dd, *J* = 9,2; 2,7 Hz, 1H), 6,42 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 3,12 (s, 6H). <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,37; 154,32; 153,66; 151,61; 149,85; 138,11; 132,20; 129,08; 127,07; 124,27; 121,60; 110,82; 96,87; 40,41. IR  $ν_{max}$ : 2922 (NC-H), 1718 (C=O), 1614 (HC=N) cm<sup>-1</sup>. ESI-HRMS: m/z calculada para C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>+, [M+H]<sup>+</sup> = 294,1237; encontrada 294,1435.

<u>Síntesis</u> del <u>3-(((2,4-dihidroxifenil)imino)metil)-7-(dimetilamino)-2*H*-<u>benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**DMSBOH**):</u> 70 mg (1 eq) de **f** se hizo reaccionar con 5 ml de una disolución etanólica previamente preparada con 52 mg (1 eq) de clorohidrato de amino resorcinol y 44,5 µl de trietilamina (1 eq). Luego de 2 h de reflujo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se lavó tres veces con 5 ml de cloroformo. 56 mg de un sólido de color rojo vino fue obtenido (rendimiento: 54 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9,66 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 8,86 (s, 1H), 7,62 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,22 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 6,86 (dd, *J* = 9,2; 2,7 Hz, 1H), 6,62 (d, *J* =</u> 2,7 Hz, 1H), 6,38 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 6,30 (dd, J = 8,6; 2,6 Hz, 1H), 3,11 (s, 6H) ppm. <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  159,27; 154,14; 153,67; 153,49; 149,49; 149,49; 139,66; 131,06; 129,49; 123,88; 122,24; 111,18; 107,88; 103,08; 97,23; 40,48 ppm. IR  $\nu_{max}$ : 3265 (O-H), 2915 (NC-H), 1744 (C=O), 1618 (HC=N) cm<sup>-1</sup>. ESI-HRMS: m/z calculada para C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup> = 326,1135; encontrada 326,1299.

#### 2.3. Determinación de la concentración de CB7 comercial

Usando como referencia el trabajo reportado por Kaifer *et al.*[115] Se preparó una disolución estimada de 1200  $\mu$ M de CB7 comercial, a partir del cual se tomó una alícuota para preparar 1 ml de CB7 a 180  $\mu$ M. Luego, en una cubeta de cuarzo se prepararon, por dilución, 2,5 ml de 14,9  $\mu$ M de hexafluorofosfato de cobaltoceno. Por espectrofotometría a 261 nm, se procedió a medir el cambio de absorbancia, añadiendo sucesivamente 25  $\mu$ L de CB7 de 180  $\mu$ M. Las absorbancias fueron corregidas teniendo en cuenta el factor de dilución correspondiente. Posteriormente, el punto de equivalencia fue hallado en el cambio de pendiente del gráfico de absorbancia con respecto al volumen añadido. La determinación de la concentración de CB7 en la disolución concentrada ([CB7]<sup>t</sup><sub>c</sub>), fue dada por la siguiente ecuación:

$$[CB7]_{c}^{t} = [CB7]_{d}^{e} V_{i} FD / V_{e}$$
Ec. 1

donde V<sub>i</sub> es el volumen inicial, V<sub>e</sub> el volumen de equivalencia, FD el factor de disolución entre las dos disoluciones de CB7 (1200/180) y [CB7]<sup>e</sup><sub>d</sub> la concentración de CB7 equivalente en la disolución diluida; considerada igual a la concentración de cobaltoceno empleada, [CB7]<sup>e</sup><sub>d</sub> =[Co<sup>2+</sup>].

## 2.4. Estimación del grado de hidratación de las ciclodextrinas comerciales

El grado de hidratación de las ciclodextrinas fue estimado mediante la relación de los valores de las integrales obtenidas a partir de las señales del espectro de <sup>1</sup>H- RMN en D<sub>2</sub>O a 400 MHz. En este sentido, se usó como referencia la integral correspondiente al protón del carbono anomérico, la
cual es igual al número de monómeros de glucopiranosa que compone a la ciclodextrina en cuestión. Por otro lado, al valor de la integral de la señal del HOD original se le restó la contribución de los protones provenientes de los grupos hidroxilos de las ciclodextrinas. El cociente entre el valor de la integral de la señal HOD corregida y el valor de la integral del protón del carbono anomérico sería la cantidad de protones asociados al agua presente por unidad de ciclodextrina; ver Anexo A.

2.5. Optimización de las condiciones experimentales de la Serie 1 Los homólogos de aza-cumarinas DEST, DMST y DMSTOH presentaron alta insolubilidad en agua, por lo que se procedió a evaluar sus solubilidades en disoluciones metanólica. Para cada sustrato se buscó una concentración óptima con la menor cantidad de cosolvente posible. Se encontró que, en metanol, 1,5 µM fue la concentración mínima suficiente para que sus bandas de absorción fuesen medibles. De este modo, se prepararon 5 disoluciones a diferentes concentraciones de metanol (50, 40, 30, 20 y 10 % v/v), cada una con 1,5 µM de sustrato. Inmediatamente, se monitorearon sus espectros de absorbancias a lo largo del tiempo y se encontró que solo las señales de absorbancia para las disoluciones  $\geq$  30 % lograron permanecer estables. De manera que, 30 % metanol (v/v) fue la concentración de cosolvente considerada para realizar los ensayos supramoleculares de la Serie 1.

#### 2.6. Determinación del pKa de los sustratos de la Serie 1.

#### 2.6.1. Método de valoración ácido-base

A partir de una disolución metanólica al 29,6% (v/v) y 0,5 M de HCl, se prepararon en celdas fotométricas, al menos 30 disoluciones a diferentes pH (0,5 – 3,8) enrasándolos hasta 2490 µL. Luego se añadieron 10 µL de **DEST** o **DMST** a 375 µM, previamente preparado en metanol. Posteriormente, se realizó un barrido de absorbancia de 800 a 200 nm para cada muestra. Los cambios de absorbancia con respecto al pH fueron evaluados tomando en cuenta la longitud máxima de las bandas de absorción observadas. Finalmente, el p*K*a fue obtenido mediante el ajuste

de la curva (absorbancia vs pH) usando la ecuación Ec. 2, correspondiente al equilibrio ácido/base mostrado en el **Esquema III**.

$$S + H_3O^+$$
  $\overleftarrow{Kb}$   $SH^+ + H_2O$ 

Esquema III. Equilibrio ácido-base para una protonación.

Abs = 
$$\frac{(\epsilon_{S+H^+} - \epsilon_S)}{2} \left\{ -b - \sqrt{b^2 - 4c} \right\} + \epsilon_S[S]_0$$
 Ec. 2

Con

$$b = -([S]_{0} + 10^{-pH} + 10^{-pKa});$$
  

$$c = [S]_{0}10^{-pH};$$
  

$$pKa = \log Kb;$$
  

$$pH = -\log [H_{3}O^{+}],$$

donde [S]<sub>0</sub> es la concentración inicial de sustrato,  $\epsilon_{S}$  y  $\epsilon_{S+H^{+}}$  son las absortividades molares del sustrato y del sustrato protonado, respectivamente. La deducción de la ecuación Ec. 2 se encuentra en el Anexo B.

#### 2.6.2. Método de ajuste cinético

La preparación de las disoluciones se realizó de forma similar al método de valoraciones. En este caso, las disoluciones se prepararon en el intervalo comprendido entre -0,5 y 3,2 unidades de pH. Luego por espectrofotometría se procedió a medir la velocidad de la reacción hidrólisis del sustrato (**DEST** o **DMST**) en las diferentes disoluciones. Las constantes de velocidad de pseudo primer orden ( $k_{obs}$ ) correspondientes a la hidrólisis se obtuvieron mediante el ajuste de las curvas absorbancia vs tiempo con las siguientes ecuaciones cinéticas asociadas a la desaparición del reactante:

$$A_{t} = A_{0} e^{-(k_{obs})t}$$
 Ec. 3

donde At y Ao son las absorbancias del reactante a tiempo t y tiempo cero, respectivamente.

Para la determinación del p*K*a del sustrato (S) por método cinético se hizo uso del modelo presentado en el **Esquema IV**, donde el sustrato y sus formas protonadas estarían asociados a una constante de hidrolisis ( $k_i$ , *i=0*n). En este sentido, la  $k_{obs}$  para la reacción de hidrólisis del sustrato puede expresarse como la suma de las constantes de hidrolisis individuales de cada especie, ponderada por su fracción molar, tal como se muestra en la Ec. 4.



**Esquema IV**. Representación general para la reacción de hidrolisis en n protonaciones del sustrato.

$$k_{obs} = k_0 X_{S} + k_1 X_{S+H^+} + k_2 X_{S+2H^+} + k_3 X_{S+3H^+} + \dots + k_4 X_{S+nH^+}$$
 Ec. 4

Tomando en cuenta la relación de las fracciones molares con las constantes de equilibrio, *K*b, se obtienen las ecuaciones 5-9, según sea el número de protonaciones consideradas para un mismo sustrato (deducción en el Anexo B).

Para una protonación:

$$k_{\rm obs} = \frac{(k_1 - k_0)}{2[S]_0} \left\{ -b - \sqrt{b^2 - 4c} \right\} + k_0$$
 Ec. 5

donde

$$b = -([S]_0 + 10^{-pH} + 10^{-pKa});$$
  
$$c = 10^{-pH}[S]_0$$

Para dos protonaciones:

$$k_{\rm obs} = \frac{k_0 + k_1 [H_3 O^+] 10^{pKa1} + k_2 [H_3 O^+]^2 10^{(pKa1 + pKa2)}}{10^{(pKa1 + pKa2)} [H_3 O^+]^2 + 10^{pKa1} [H_3 O^+] + 1}$$
Ec. 6

donde  $[H_30^+]$  está determinada por:

22

Ec. 9

En cuanto a las ecuaciones de tercer y cuarto grado (Ec. 7 y 9), éstas  
fueron resueltas usando el método iterativo de Newton-Raphson[116]:  
$$x_{n+1} = x_n + \frac{f(x_n)}{f'(x_n)}$$
Ec. 10

donde  $f(x_n)$  es la función,  $f'(x_n)$  es su derivada y  $x_n$  es el valor de x en la

enésima iteración, partiendo n = 0. Se tomó como valor inicial,  $x_n$ , la

concentración inicial de iones hidronio,  $[H_3O^+]_0$ , y se iteró hasta que

mejor se ajustó a los datos experimentales.

El pKa del sustrato se determinó a partir del modelo de protonación que

 $a = 10^{(pKa1+pKa2+pKa3)};$  $b = 10^{(pKa1+pKa2+pKa3)} (10^{-pKa3} + 3[S]_0 - 10^{-pH});$  $c = 10^{(pKa1+pKa2)} (10^{-pKa2} + 2[S]_0 - 10^{-pH});$  $d = 10^{pKa1} ([S]_0 - 10^{-pH}) + 1$ 

donde 
$$[H_3O^+]$$
 está determinada por:

$$k_{\rm obs} = \frac{k_0 + k_1 [H_3 O^+] 10^{pKa1} + k_2 [H_3 O^+]^2 10^{(pKa1 + pKa2)} + k_3 [H_3 O^+]^3 10^{(pKa1 + pKa2 + pKa3)}}{10^{(pKa1 + pKa2 + pKa3)} [H_3 O^+]^3 + 10^{(pKa1 + pKa2)} [H_3 O^+]^2 + 10^{pKa1} [H_3 O^+] + 1}$$
Ec. 8

 $a[H_3O^+]^4 + b[H_3O^+]^3 + c[H_3O^+]^2 + d[H_3O^+] - 10^{-pH} = 0$ 

Para tres protonaciones: •

 $f(x_n)/f'(x_n) \le 1 \times 10^{-15}$ .

con  

$$a = 10^{(pKa1 + pKa2)};$$

$$b = 10^{(pKa1 + pKa2)} (10^{-pKa2} + 2[S]_0 - 10^{-pH});$$

$$c = 10^{pKa1} ([S]_0 - 10^{-pH}) + 1$$

С

con

$$a[H_3O^+]^3 + b[H_3O^+]^2 + c[H_3O^+] - 10^{-pH} = 0$$
 Ec. 7

# 2.7. Medición espectrométrica de los complejos de inclusión

Se preparó 0,5 M de HCI en una disolución metanólica al 29,6 % (v/v) a partir de HCI 37 % m/m. Luego, esta disolución se volvió a diluir para obtener otra de concentración 3,16 mM de HCI (pH 2,5), manteniendo la misma concentración de metanol. Seguidamente, y mediante el uso de un pH-metro, se confirmó el pH de 2,5 de la disolución preparada.

Cabe destacar que esta disolución (29,6 % metanol, pH 2,5) fue la disolución madre a partir de la cual se prepararon todas las diferentes disoluciones de macrociclos usadas para la Serie 1. En este sentido, se prepararon diferentes concentraciones de CB7 (0 - 1,2 mM) en celdas fluorométricas. Éstas inicialmente fueron llevadas hasta un volumen de 2490 µL, y luego a cada disolución se le adicionó 10 µL de **DMST** a 375 µM (previamente preparado en metanol puro). Cada una de las disoluciones preparadas fueron evaluadas por espectrofotometría (200 - 800 nm) seguido de un análisis fluorométrico. Para este último, la longitud de onda de excitación elegida fue el punto isosbéstico.

Este mismo procedimiento fue llevado a cabo para los sustratos **DEST** y **DMSTOH**.

Por otra parte, para los macrociclos  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD, la metodología empleada fue similar, en estos casos se pudo abarcar un mayor rango de concentraciones en las mediciones espectrométricas. Para la  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD y la  $\gamma$ -CD el rango fue entre 0 - 1,5 mM, 0 - 4,5 mM y 0 - 10mM, respectivamente. La longitud de onda de excitación elegida para el espectro de emisión en presencia de estas ciclodextrinas fue la longitud de onda de absorción de menor cambio observado en su espectro de absorbancia.

# 2.8. Estimación de las constantes de asociación de los complejos formados y su estequiometria

Las constantes de asociación de los complejos de inclusión fueron estimadas a partir de los datos fluorométricos y/o fotométricos obtenidos en

el ítem anterior. Estos datos, en respuesta a la variación de la concentración de macrociclo presente, fueron ajustados a las ecuaciones 11, 13 y 14, las cuales están deducidas en el Anexo C. Estas ecuaciones describen un modelo teórico asociado a una estequiometria en particular. Los modelos teóricos estudiados para los complejos de inclusión son los siguientes:

#### 2.8.1. Modelo 1:1

Para este modelo la estequiometria macrociclo (M)/sustrato (S) es 1:1, y su constante de equilibrio o asociación está denotado por  $K_{1:1}$ , tal como se muestra en el **Esquema V**.

$$\begin{array}{c} K_{1:1} \\ M + S \Longrightarrow MS \end{array}$$

Esquema V. Mecanismo de asociación general de estequiometría 1:1.

Para este modelo, la dependencia de la absorbancia o la intensidad de emisión (Y) con respecto a la concentración inicial del macrociclo [M]<sub>0</sub> está dada por la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{(\alpha_{MS} - \alpha_{S})}{2} \left( -b - \sqrt{b^{2} - 4c} \right) + \alpha_{S}[S]_{0}$$
 Ec. 11

con

$$b = -\left([S]_{0} + [M]_{0} + \frac{1}{K_{1:1}}\right);$$
  
$$c = [M]_{0}[S]_{0}$$

En absorbancia  $\alpha_S$  y  $\alpha_{MS}$  son las absortividades molares de sustrato y complejo de inclusión 1:1 ( $\epsilon_S$  y  $\epsilon_{MS}$ ), respectivamente. En fluorescencia,  $\alpha_S$  y  $\alpha_{MS}$  son las constantes de proporcionalidad.

Una vez conocida la constante de asociación, el porcentaje del complejo de inclusión 1:1 formado *in situ* fue estimado mediante la siguiente ecuación:

% complejo formado = 
$$\frac{100\%}{2[S]_0} \left(-b - \sqrt{b^2 - 4c}\right)$$
 Ec. 12

#### 2.8.2. <u>Modelo 2:1</u>

Este modelo consta de un mecanismo de asociación consecutivo de dos pasos con estequiometria general 2:1, tal como se muestra en el **Esquema** VI.

$$M + S \stackrel{K_{1:1}}{\longleftarrow} MS + M \stackrel{K_{2:1}}{\longleftarrow} M_2S$$

Esquema VI. Mecanismo de asociación general de estequiometría 2:1.

Donde M<sub>2</sub>S es el complejo 2:1, correspondiente a dos unidades de macrociclo por cada unidad de sustrato.

En este modelo la relación Y vs [M]<sub>0</sub> depende de la resolución de la ecuación de 3<sup>er</sup> grado (Ec. 13) en conjunto con la Ec. 14, las cuales fueron resueltas usando nuevamente el método iterativo de Newton-Rapson (Ec. 10).

$$a[M]^3 + b[M]^2 + c[M] - [M]_0 = 0$$
 Ec. 13

con

$$a = K_{1:1}K_{2:1};$$
  

$$b = K_{1:1}K_{2:1} \left(\frac{1}{K_{2:1}} + 2[S]_0 - [M]_0\right);$$
  

$$c = K_{1:1} \left(\frac{1}{K_{1:1}} + [S]_0 - [M]_0\right);$$
  

$$Y = \frac{\alpha_S[S]_0 + \alpha_{MS}[M] K_{1:1}[S]_0 + \alpha_{M_2S}K_{1:1}K_{2:1}[M]^2[S]_0}{K_{1:1}K_{2:1}[M]^2 + K_{1:1}[M] + 1}$$
  
Ec. 14

Aquí, [M] es la concentración de macrociclo en equilibrio,  $\alpha_{M_2S}$  es la absortividad molar ( $\epsilon_{M_2S}$ ) o la constante de proporcionalidad de emisión del complejo 2:1 formado y  $K_{2:1}$  es la constante de asociación dada por un segundo macrociclo al primer complejo formado.

Aunque los modelos planteados están asociados a una determinada estequiometria, en algunos casos se determinó mediante espectrometría de masa.

#### 2.9. Caracterización de las propiedades de emisión y absorción

#### 2.9.1. Efecto solvatocrómico

Se prepararon 5 disoluciones para cada sustrato de la Serie 1 a una concentración de 1,5  $\mu$ M, en 30 % metanol (v/v) a pH 2,5. La primera disolución en ausencia de macrociclo y en las otras 3 disoluciones en presencia de 1,2 mM CB7, 1,5 mM  $\beta$ -CD, 4,5 mM de DM- $\beta$ -CD y 10 mM de  $\gamma$ -CD, respectivamente. Luego, por espectroscopia UV-Vis, se obtuvieron los espectros de absorción para cada una de las disoluciones preparadas. La cuantificación del efecto solvatocrómico dado por los macrociclos se determinaron haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$ES^{abs}$$
 (cm<sup>-1</sup>) = 10<sup>7</sup>(1/ $\lambda_{MS}^{A}$  - 1/ $\lambda_{S}^{A}$ ) Ec. 15

donde ES<sup>abs</sup> es el efecto solvatocrómico en cm<sup>-1</sup>;  $\lambda_S^A$  y  $\lambda_{MS}^A$  son las longitudes de máxima absorción del sustrato y el complejo de inclusión expresadas en nanómetro, respectivamente.

#### 2.9.2. Desplazamiento de Stokes

Para cada una de las disoluciones anteriores se evaluaron sus espectros de emisión usando sus respectivas longitudes máximas de absorción como longitudes de excitación. La longitud máxima de emisión tanto del sustrato,  $\lambda_{S}^{E}$ , como del complejo de inclusión,  $\lambda_{MS}^{E}$ , expresada en nanómetros, fueron usadas en las siguientes ecuaciones:

$$DS_{s}(cm^{-1}) = 10^{7}(1/\lambda_{S}^{A} - 1/\lambda_{S}^{E})$$
 Ec. 16

$$DS_{MS}(cm^{-1}) = 10^{7}(1/\lambda_{MS}^{A} - 1/\lambda_{MS}^{E})$$
 Ec. 17

donde DS<sub>s</sub> y DS<sub>MS</sub> son los desplazamientos de Stokes en cm<sup>-1</sup>. Por tanto, para evaluar la influencia de los macrociclos sobre los desplazamientos de Stokes de la Serie 1, se restaron tales desplazamientos:

$$\Delta DS = DS_{MS} - DS_s$$
 Ec. 18

#### 2.9.3. Rendimiento cuántico de emisión

Se preparó una serie de disoluciones en cubetas fluorométricas de 10 mm de paso óptico, cada una a diferentes concentraciones de sustrato (Serie 1) de tal modo que la absorbancia máxima de cada muestra se encuentre distribuida entre 0 y 0,1 unidades de absorbancia. Luego de anotar las absorbancias máximas, se procedió a medir los espectros de emisión usando la longitud de máxima de absorción como longitud de onda de excitación. Posteriormente, para cada espectro de emisión se calculó el área bajo la curva, es decir, la intensidad de emisión integrada. Todo esto a partir de los espectros de emisión corregidos.

El mismo procedimiento se realizó para la Serie 1 en presencia de 1,2 mM CB7, 1,5 mM β-CD ó 4,5 mM de DM-β-CD, y para el compuesto utilizado como estándar de rendimiento cuántico conocido (fluoresceína en 0,1M de hidróxido de sodio).[117]

Finalmente, el rendimiento cuántico de las muestras ( $\Phi_{F,x}$ ) se determinaron mediante la ecuación de Demas y Crosby[118]:

$$\Phi_{\rm F,x} = \Phi_{\rm F,e} \left(\frac{m_{\rm x}}{m_{\rm e}}\right) \left(\frac{\eta_{\rm x}^2}{\eta_{\rm e}^2}\right)$$
Ec. 19

donde  $\Phi_F$  es el rendimiento cuántico, m el gradiente de la recta (intensidad de emisión integrada vs absorbancia),  $\eta$  el índice de refracción del disolvente y los subíndices e y x denotan compuesto estándar y la muestra, respectivamente.

# 2.10. Estudio cinético de la reacción de hidrólisis de Bases de Schiff (aza-cumarinas y cumarinas)

# 2.10.1. <u>Hidrólisis de aza-cumarinas (Serie 2) en presencia y ausencia</u> <u>del macrociclo.</u>

Se prepararon al menos diez disoluciones acuosas a pH 5,3 (pH del agua) y a diferentes concentraciones de CB7 (0 – 480  $\mu$ M) en celdas fotométricas.

Inicialmente, éstas fueron llevadas hasta un volumen de 2490  $\mu$ L, y luego a cada disolución se le adicionó 10  $\mu$ L de **DMSB** a 875  $\mu$ M (previamente preparado en dimetilsulfóxido puro). Una vez añadido el sustrato, se agitó e inmediatamente se medió su cinética por espectrometría UV-vis a 25 °C. Las constantes observadas,  $k_{obs}$ , fueron obtenidas mediante el ajuste de los valores de absorbancia a 570 nm en función del tiempo, usando la ecuación de pseudo primer orden (Ec. 3). Para la determinación de las constantes cinéticas de hidrólisis tanto del sustrato libre como del sustrato complejado, se hizo uso de los siguientes dos modelos cinéticos que dan cuenta, intrínsecamente, la estequiometria del sistema y las constantes de asociación de los complejos involucrados:

#### • Modelo de estequiometría 1:1

Este modelo consta de un mecanismo de asociación de estequiometria 1:1 macrociclo/sustrato tal como se muestra en el **Esquema VII**. En este modelo se establece *a priori* que tanto el sustrato libre como el sustrato acomplejado (MS) contribuyen a la constante observada, *k*<sub>obs</sub>, de acuerdo con la Ec. 20.



**Esquema VII.** Mecanismo de hidrólisis en presencia del macrociclo para una estequiometria 1:1 macrociclo/sustrato.

$$k_{\rm obs} = k_{\rm S} X_{\rm S} + k_{\rm MS} X_{\rm MS}$$
 Ec. 20

donde  $k_{\rm S}$  y  $k_{\rm MS}$  son las constantes cinéticas de hidrólisis del sustrato libre (S) y del complejo 1:1 (MS), las cuales están ponderadas por sus fracciones molares  $X_{\rm S}$  y  $X_{\rm MS}$ . Dada la íntima relación entre estas fracciones molares con  $K_{1:1}$ , el  $k_{\rm obs}$  puede expresarse como:

$$k_{\rm obs} = \frac{(k_{MS} - k_{\rm S})}{2[{\rm S}]_0} \left\{ -{\rm b} - \sqrt{{\rm b}^2 - 4{\rm c}} \right\} + k_{\rm S}$$
 Ec. 21

con

b = 
$$-([S]_0 + [M]_0 + \frac{1}{\kappa_{1:1}});$$
  
c =  $[M]_0[S]_0$ 

donde  $[S]_0$  y  $[M]_0$  son las concentraciones iniciales del sustrato y del macrociclo y  $K_{1:1}$  es la constante de asociación del complejo 1:1. La deducción de la Ec. 21 está demostrada en el Anexo C.

#### Modelo de estequiometría 2:1

El Modelo 2:1 consta de un mecanismo de asociación consecutivo de dos etapas con estequiometria general 2:1 (macrociclo/sustrato); representado en el **Esquema VIII**. En este modelo se establece *a priori* que tanto el sustrato libre, como el complejo 1:1 y el complejo 2:1 ( $M_2S$ ) contribuyen a la constante observada,  $k_{obs}$ , de acuerdo con la Ec. 22.



**Esquema VIII**. Mecanismo de hidrólisis en presencia del macrociclo para una estequiometria 2:1 (macrociclo/sustrato).

$$k_{\rm obs} = k_{\rm S} X_{\rm S} + k_{\rm MS} X_{\rm MS} + k_{\rm M_2S} X_{\rm M_2S}$$
 Ec. 22

aquí  $k_{M_2S}$  es la constante cinética de hidrólisis del complejo 2:1 y  $X_{M_2S}$  su fracción molar. Las fracciones molares  $X_{S^{\cdot}}$ ,  $X_{MS}$  y  $X_{M_2S}$  (en la Ec. 22) están íntimamente relacionadas con  $K_{1:1}$  y  $K_{2:1}$ . Esto implica que la  $k_{obs}$  puede expresarse como:

$$k_{\rm obs} = \frac{k_{\rm s} + k_{\rm MS}[{\rm M}]K_{1:1} + k_{M_2S}[{\rm M}]^2 K_{1:1} K_{2:1}}{K_{1:1} K_{2:1}[{\rm M}]^2 + K_{1:1}[{\rm M}] + 1}$$
 Ec. 23

donde [M] está determinada por:

$$a[M]^3 + b[M]^2 + c[M] - [M]_0 = 0$$
 Ec. 24

con

a = 
$$K_{1:1}K_{2:1}$$
;  
b =  $K_{1:1}K_{2:1}\left(\frac{1}{K_{2:1}} + 2[S]_0 - [M]_0\right)$ ;  
c =  $K_{1:1}([S]_0 - [M]_0) + 1$ ,

En estas ecuaciones [M], es la concentración de macrociclo libre en el equilibrio.  $k_{M_2S}$  y  $K_{2:1}$  son las constantes de velocidad y de asociación del complejo 2:1. La deducción de las Ec. 23 y 24 están deducidas en el Anexo C.

Tanto la Ec. 21 (modelo 1:1) como la Ec. 23 (modelo 2:1) fueron ajustadas a los datos experimentales. El modelo que presentó una mejor correlación con los datos experimentales fue el modelo considerado para estimar los parámetros cinéticos y termodinámicos.

Por otro lado, la hidrólisis del sustrato **DMSB** en presencia de ciclodextrinas ( $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD) fue seguida por luminiscencia a partir de la aparición de la banda del producto a 554 nm, usando 500 nm como longitud de excitación. La  $k_{obs}$  fue determinada por ajuste de los datos de emisión obtenidos en el tiempo y la ecuación de pseudo primer orden para la aparición del producto:

$$I_t = I_{\infty} (1 - e^{-(k_{obs})t})$$
 Ec. 25

en que,  $I_{\infty}y I_t$  son las intensidades de emisión del producto a tiempo infinito y tiempo t, respectivamente.

La estimación de las constantes cinéticas relacionada a las etapas individuales y las constantes de asociación de los complejos formados con ciclodextrinas, se realizaron de manera análoga a la metodología previamente descrita en presencia de CB7. 2.10.2. <u>Hidrólisis de Cumarinas (Serie 3) en presencia y ausencia de</u> <u>CB7</u>

Se llevó a cabo el estudio cinético de la reacción de hidrólisis para una serie homóloga de cumarinas (Serie 3, **Esquema IX**) disponibles en el laboratorio.[119]



**Esquema IX**. Estructura general de una serie de bases de Schiff derivadas de 7-(dietilamino)cumarinas (Serie 3).

La metodología seguida para esta serie fue similar a la descrita en el apartado anterior, utilizando espectrometría UV-vis en el intervalo de pH 2,5-4,0.

# 2.11. Equipos:

Para las diferentes técnicas de RMN se utilizó el equipo BRUKER AVANCE III HD 400 usando TMS como estándar interno. Los IR se obtuvieron mediante el espectrómetro Cary 630 FTIR. Las mediciones por espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electrospray (ESI-HRMS) se realizaron con el espectrómetro de masas Thermo Fisher Scientific Exactive Plus.

La balanza analítica y el pH-metro empleado fue la RADWAG ® AS220/C/2 y el AD1030, respectivamente.

Las mediciones UV-vis se realización en diferentes espectrofotómetros, tales como Hewlett-Packard modelo HP 8453, Cary modelos 40 ó 50. Las valoraciones y las cinéticas para la determinación de los p*K*as de los sustratos de la Serie 1, se realización solo con el espectrofotómetro UV-vis Cary 50. Los espectros de emisión se obtuvieron haciendo uso del

espectrofotómetro de fluorescencia Cary modelo Eclipse. Las cinéticas de las bases de Schiff se realizaron utilizando el espectrofotómetro UV-vis Hewlett-Packard modelo HP 8453 y el espectrofotómetro de fluorescencia Horiba FluoroMax 4. Para obtener los parámetros necesarios para la estimación de los rendimientos cuánticos, se utilizó sólo el Cary 50 UV-vis en conjunto con el espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse.

# 3. Capítulo III. Resultados y Discusión

Para dar cumplimiento a los objetivos específicos 2, 3, 4 y 5, este capítulo se divide en 5 secciones. La primera sección (Sección 3.1.) está enmarcada en la elucidación estructural de los compuestos sintetizados a partir de los espectros de RMN, IR y ESI-HRMS obtenidos. La Sección 3.2 se encuentra enfocada en la determinación y asignación de los valores de pKa de la Serie 1. En las secciones 3.3. y 3.4. se presentan los efectos de los macrociclos sobre las características espectrales y el rendimiento cuántico de emisión de la Serie 1, así como también la determinación de las constantes de asociación involucradas. Finalmente, la Sección 3.5. está centrada en el efecto de los macrociclos sobre la reacción de hidrolisis de la Serie 2, y en los mecanismos involucrados.

## 3.1. Caracterización estructural de los compuestos sintetizados

La elucidación estructural tiene el propósito de caracterizar y corroborar la estructura de los compuestos sintetizados, además de dar cumplimiento al objetivo específico 2. Cabe mencionar que, debido a la cantidad de espectros involucrados en esta sección, éstos fueron ubicados en la sección de Anexos, específicamente en el Anexo D. La asignación numérica de los protones al cual se hará alusión a continuación está sujeta a la numeración presentada en la Figura 2.

<u>Intermediario</u> 7-(dimetilamino)-3-metil-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (e, <u>R1=CH3</u>): El espectro de <sup>1</sup>H-RMN en CDCl<sub>3</sub> para el compuesto sintetizado (**Figura D1**), mostró dos singuletes a campo alto, uno que integra para tres protones a 2,46 ppm y una segunda señal a 3,05 ppm que integra para seis protones, dando razón a los átomos de hidrógenos del grupo metilo ubicado en la posición 3 y a los átomos de hidrógenos perteneciente al grupo dimetilamino en la posición 7 de la aza-cumarina, respectivamente. En la zona aromática, se puede observar una constante de acoplamiento (*J*) igual a 9 Hz, correspondiente al acoplamiento entre los protones 6 y 5 (acoplamiento orto). El protón 6, además, muestra un acoplamiento con el protón 8 con *J meta* igual a 2,8 Hz. En consecuencia, se observa un doble doblete a 6,63 ppm correspondiente al protón 6, mientras que los protones 8 y 5 muestran un doblete a 6,38 y 7,46 ppm, respectivamente.

Por otro lado, el espectro de <sup>13</sup>C-RMN (**Figura D2**) mostró diez señales de carbono, consistente a los diez átomos carbonos no equivalentes presentes en el compuesto **e** (R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>).

<u>(E)-7-(dimetilamino)-3-estiril-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona</u> (**DMST**): El espectro de <sup>1</sup>H<sup>-</sup>RMN en CDCl<sub>3</sub> para el compuesto sintetizado (**Figura D3**), mostró un singulete que integra para seis protones a campo alto, asignado al grupo dimetilamino. A 6,42, 6,68 y 7,55 ppm se puede apreciar las señales características de los protones 8, 6 y 5 con sus respectivas *J orto* y *meta* (9,1 y 2,7 Hz, respectivamente). Adicionalmente, se observa dos señales dobletes a 7,42 y 7,94 ppm con *J trans* de 16,3 Hz, asignado a los protones del grupo vinilo. Finalmente, se observó tres señales en la zona aromática, una que integra para dos protones (doblete a 7,62 ppm), otra que integra para un protón (multiplete entre 7,40 - 7,35 ppm), y una última que integra para un protón (multiplete 7,34 - 7,29 ppm), dando razón al par de protones *orto* y *meta*, y al protón en la posición *para* del grupo fenilo.

Por otro lado, el espectro de <sup>13</sup>C-RMN (**Figura D4**) mostró quince señales de carbono, consistente a los quince átomos carbonos no equivalentes presentes en el compuesto **DMST**. Todas las señales de carbono fueron debidamente asignadas mediante las correlaciones de los espectros bidimensionales, HSQC y HMBC (**Figuras D5** y **D6**). El espectro HSQC se utilizó para identificar los carbonos unidos directamente a los protones ya identificados, y el espectro HMBC para identificar los carbonos cuaternarios mediante su acoplamiento con protones ubicados a dos y tres enlaces de distancia. De esta manera la estructura del compuesto **DMST** quedó totalmente caracterizada por RMN.

La espectroscopia infrarroja (**Figura D7**) presentó señales a 2904, 1715, 1618 cm<sup>-1</sup>, característico de grupos: dialquilamino (enlace NC-H), carbonilo (C=O) y vinilo (HC=CH, *trans*), respectivamente

Adicionalmente, la espectrometría de masas en modo negativo (**Figura D8**) presentó pico base (m/z) a 292,1219, la cual está en total concordancia con la masa calculada del compuesto **DMST** ([**DMST**]<sup>--</sup> = 292,1217).

Intermediario 7-(dietilamino)-3-metil-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (e, <u>R1=CH2CH3</u>): El espectro de <sup>1</sup>H-RMN en CDCl<sub>3</sub> para el compuesto sintetizado (**Figura D9**), mostró un singulete que integra para tres protones a 2,45 ppm, asignado a los átomos de hidrógenos del grupo metilo ubicado en la posición 3. A 1,20 y 3,40 ppm se observó un triplete (que integra para 6 protones) y un cuadruplete (que integra para 4 protones), respectivamente, dando razón a los átomos de hidrógenos perteneciente al grupo dietilamino en la posición 7 de la aza-cumarina. En la zona aromática, se observó *J* igual a 9,02 Hz, correspondiente al acoplamiento entre los protones 6 y 5 (acoplamiento orto). El protón 6, además, muestra un acoplamiento con el protón 8 con *J meta* igual a 2,50 Hz. En consecuencia, se observa un doble doblete a 6,63 ppm correspondiente al protón 6, mientras que los protones 8 y 5 muestran un doblete a 6,38 y 7,46 ppm, respectivamente.

Por otro lado, el espectro de <sup>13</sup>C-RMN (**Figura B10**) mostró once señales de carbono, consistente a los diez átomos carbonos no equivalentes presentes en el compuesto **e** (R<sub>1</sub>=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<u>(*E*)-7-(dietilamino)-3-estiril-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**DEST**)</u>: El espectro de <sup>1</sup>H<sup>-</sup>RMN en CDCl<sub>3</sub> para el compuesto sintetizado (**Figura D11**), mostró un triplete (que integra para 6 protones) y un cuadruplete (que integra para 4 protones) a campo alto, asignado a los átomos de hidrógenos del grupo dietilamino. A 6,42, 6,66 y 7,53 ppm se puede apreciar las señales características de los protones 8, 6 y 5 con sus respectivas *J orto* y *meta* (9,1 y 2,7 Hz, respectivamente). Adicionalmente, se observa dos señales dobletes a 7,42 y 7,94 ppm con *J trans* de 16,3 Hz, asignado a los protones del grupo vinilo. Finalmente, se observó tres señales en la zona aromática, una que integra para dos protones (doblete a 7,62 ppm), otra que integra para un protón (multiplete entre 7,40 - 7,35 ppm), y una última que integra para un protón (multiplete 7,35 - 7,27 ppm), dando razón al par de protones orto y meta, y al protón en la posición para del grupo fenilo.

Por otro lado, el espectro de <sup>13</sup>C-RMN (**Figura D12**) mostró dieciséis señales de carbono, consistente a los dieciséis átomos carbonos no equivalentes presentes en el compuesto **DEST**. Todas las señales de carbono fueron debidamente asignadas mediante las correlaciones de los espectros bidimensionales, HSQC y HMBC (**Figuras D13** y **D14**).

La espectroscopia infrarroja (**Figura D15**) presentó señales a 2963, 1718, 1620 cm<sup>-1</sup>, característico de grupos: dialquilamino (enlace NC-H), carbonilo (C=O) y vinilo (HC=CH, *trans*), respectivamente

Adicionalmente, la espectrometría de masas en modo negativo (**Figura D16**) presentó un pico base (m/z) a 320,1531, la cual está en total concordancia con la masa calculada del compuesto **DEST** ([**DEST**]<sup>-</sup> = 320,1530).

(E)-3-(2,4-dihidroxi-estiril)-7-(dimetilamino)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (**DMSTOH**): El espectro de <sup>1</sup>H<sup>-</sup>RMN en DMSO- $d_6$  para el compuesto sintetizado (Figura D17), mostró once señales: un singulete que integra para seis protones a 3,01 ppm asociados a los átomos de hidrógenos del grupo dimetilamino, dos dobletes a 7,23 y 7, 99 ppm con J trans igual a 16,3 Hz correspondiente a los protones del grupo vinilo y dos singuletes a 9,72 y 9,92 ppm correspondientes a los protones de los grupos hidroxilos. Con respecto a las seis señales de protones restantes, estas están constituidas por dos conjuntos de tres protones que se acoplan entre sí con sus respectivos J orto y meta: un primer grupo dado por las señales a 6,31, 6,40 y 7,42 ppm (doble doblete, doblete y doblete, respectivamente) y un segundo grupo dado por las señales a 6,51, 6,73 y 7,48 ppm (doblete, doble doblete y doblete, respectivamente). Para identificar cuál de estos conjuntos de acoplamientos corresponden a los protones 5, 6 y 8, se hizo uso de la metodología bidimensional HMBC (Figura B20), la cual denotó una correlación entre los protones del grupo dimetilamino con el carbono 7,

el cual a su vez posee una correlación con el doblete a 7,48 ppm con J = 9Hz, indicando su acoplamiento con el protón 5. De esta forma se determinó que las señales 6,51, 6,73 y 7,48 ppm corresponden a los protones 8, 6 y 5, respectivamente; por lo que las señales a 6,31, 6,40 y 7,42 ppm estarían asociadas a los protones 16, 18 y 15, respectivamente.

Por otro lado, el espectro de <sup>13</sup>C-RMN (**Figura D18**) mostró diecisiete señales de carbono, consistente a los diecisiete átomos carbonos no equivalentes presentes en el compuesto **DMSTOH**. Todas las señales de carbono fueron debidamente asignadas mediante las correlaciones de los espectros bidimensionales, HSQC y HMBC (**Figuras D19** y **D20**).

La espectroscopia infrarroja (**Figura D21**) presentó señales a 3060-3302 (bonded), 2903, 1700, 1599 cm<sup>-1</sup>, característico de grupos: hidroxilos, dialquilamino (enlace NC-H), carbonilo (C=O) y vinilo (HC=CH, *trans*), respectivamente

Adicionalmente, la espectrometría de masas en modo negativo (**Figura D22**) presentó un pico base (m/z) a 323,1037, la cual está en total concordancia con la masa calculada del compuesto **DMSTOH** ([**DMSTOH**]<sup>--</sup> = 323,1037).

<u>7-(dimetilamino)-3-formil-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (f)</u>: El espectro de <sup>1</sup>H-RMN en CDCl<sub>3</sub> para el compuesto sintetizado (**Figura D23**), mostró un espectro similar al observado para el intermediario **e** con R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub> (**Figura D1**). En este caso, el espectro en lugar de mostrar el singulete a cercano a 3 ppm (característico del grupo metilo ubicado en la posición 3 de la azacumarina), mostró un singulete que integra para un protón a 10,09 ppm, dando razón a la oxidación del grupo metilo al grupo formilo.

# 7-(dimetilamino)-3-((fenilimino)metil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona

(DMSB): El espectro de <sup>1</sup>H<sup>-</sup>RMN en CDCl<sub>3</sub> para el compuesto sintetizado (Figura D24), mostró dos singuletes correspondientes a los protones del grupo dimetilamino y al protón imino a 3,12 y 8,86 ppm, respectivamente.

A 6,42, 6,72 y 7,77 ppm se presentaron las señales características de los protones 8, 6 y 5. Adicionalmente, el espectro mostró dos multipletes a 7,35 y 7,39 ppm, cada uno integrando para dos protones y un multiplete a 7,27 ppm integrando para un protón, dando razón al grupo fenilo.

Por otro lado, el espectro de <sup>13</sup>C-RMN (**Figura D25**) mostró catorce señales de carbono, consistente a los catorce átomos carbonos no equivalentes presentes en el compuesto **DMSB**. Todas las señales de carbono fueron debidamente asignadas mediante las correlaciones de los espectros bidimensionales, HSQC y HMBC (**Figuras D26** y **D27**).

La espectroscopia infrarroja (**Figura D28**) presentó señales a 2922, 1718, 1614 cm<sup>-1</sup>, característico de grupos: dialquilamino (enlace NC-H), carbonilo (C=O) y vinilo (HC=N), respectivamente

Adicionalmente, la espectrometría de masas en modo positivo (**Figura D29**) presentó un pico base (m/z) a 294,1435, la cual está en total concordancia con la masa calculada del compuesto **DMSB** ([**DMSB+H**]<sup>+</sup> = 294,1237).

<u>3-(((2,4-dihidroxifenil)imino)metil)-7-(dimetilamino)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin <u>-2-ona (**DMSBOH**</u>): El espectro de <sup>1</sup>H<sup>-</sup>RMN en DMSO-*d*<sub>6</sub> para el compuesto sintetizado (**Figura D30**), mostró tres singuletes a 8,86, 9,18 y 9,66 ppm con integrales igual a uno, dando razón a protón del grupo imino y a los dos protones de los grupos hidroxilos, respectivamente. A 3,11 ppm, el espectro mostró un singulete que integra para seis protones asignados al grupo dimetilamino. Las asignaciones de los seis protones restantes se realizaron de forma análoga al análisis aplicado para el compuesto **DMSTOH**. En este caso, la identificación de los protones 7 y 5 se realizó por HMBC como se indica en la **Figura 33**. Considerando los acoplamientos que posee el protón 5 con el protón 6 y éste a su vez con el protón 3, se tiene que las señales a 7,62, 6,86 y 6,62 ppm corresponden a dichos protones señalados. Por lo tanto, las señales restantes a 6,30, 6,38 y 7,22 ppm corresponden a los protones 19, 21 y 18, respectivamente.</u> Por otro lado, el espectro de <sup>13</sup>C-RMN (**Figura D31**) mostró dieciséis señales de carbono, consistente a los dieciséis átomos carbonos no equivalentes presentes en el compuesto **DMSBOH**. Todas las señales de carbono fueron debidamente asignadas mediante las correlaciones de los espectros bidimensionales, HSQC y HMBC (**Figuras D32** y **D33**).

La espectroscopia infrarroja (**Figura D34**) presentó señales a 3265, 2915, 1744, 1618 cm<sup>-1</sup>, característico de grupos: hidroxilos (O-H), dialquilamino (enlace NC-H), carbonilo (C=O) y vinilo (HC=N), respectivamente.

Adicionalmente, la espectrometría de masas en modo positivo (**Figura D35**) presentó un pico base (m/z) a 326,1299, la cual está en total concordancia con la masa calculada del compuesto **DMSBOH** ([**DMSBOH+H**]<sup>+</sup> = 326,1135).

# 3.2. Determinación de valores de p*K*as de la serie de 7-(dialquilamino)aza-cumarinas (Serie 1) en ausencia de macrociclo.

La determinación de los valores de p*K*a fue realizada de acuerdo con lo indicado en la sección de metodología; usando los métodos de valoraciones ácido-base y las mediciones cinéticas.

# 3.2.1. Determinación de los valores de pKas del DMST

Las valoraciones por UV-vis del compuesto **DMST** a diferentes pH (**Figura 1a**) mostró un  $\lambda_{max}$  a 483 nm a pH cercano a 3,6, mientras que a pH cercano a 0,5, el  $\lambda_{max}$  se presentó en los 380 nm, lo que correspondería a una de sus formas protonadas. Tal como se presenta en **Figura 1b**, el valor del p*K*a fue determinado a dos longitudes de onda usando la Ec. 2, dando lugar a un valor de 1,30 ± 0,01 para la primera especie protonada.



**Figura 1**. Valoración ácido-base para el compuesto **DMST** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a 25 °C): a) espectros UV-vis a distintos valores de pHs (0,5 - 3,6) y b) valoración de la absorbancia a 483 y 380 nm en función del pH en ausencia de macrociclos.

Adicionalmente, el p*K*a fue también estimado mediante el método cinético usando las ecuaciones 5-9. El modelo que mejor se ajustó con los datos experimentales (**Figura 2c**) involucra la presencia de tres protonaciones (p*K*a<sub>1</sub> = 1,39, p*K*a<sub>2</sub> = -0,74, p*K*a<sub>3</sub> = -8,02), donde además, el p*K*a<sub>1</sub> hallado fue similar al previamente obtenido por medio del método de valoraciones. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de más de un proceso de protonación en el sustrato.



**Figura 2**. Variación de la constante de velocidad observada ( $k_{obs}$ ) en función del pH para el compuesto DMST (1,5 µM en 30 % MeOH a 25 °C). a) ajuste de modelo cinético para una protonación del sustrato, b) ajuste de

modelo cinético para dos protonaciones y c) ajuste de modelo cinético para tres protonaciones.

# 3.2.2. Determinación de los valores de pKas del DEST

Las valoraciones por UV-vis del compuesto DEST a diferentes pH (**Figura 3a**) mostró un  $\lambda_{max}$  a 490 nm a pH cercano a 3,9, mientras que a pH cercano a 0,5, la  $\lambda_{max}$  se presentó en los 380 nm. Del ajuste de las curvas mostradas en la **Figura 3b** se deduce que el primer ácido conjugado del compuesto **DEST** posee un valor de p*K*a igual a 2,35. Un valor similar de p*K*a fue reportado y asociado al grupo dietilamino para una serie de cumarinas 7-dietilamino-sustituidas.[120,121] Esto sugiere que el primer p*K*a del **DEST** (p*K*a=2,35) estaría vinculado al grupo dietilamino. En este sentido, se puede deducir también que el primer p*K*a encontrado (p*K*a=1,30) del **DMST** estaría vinculado, análogamente, al grupo dimetilamino.

La diferencia obtenida, alrededor de una unidad, en los valores de p*K*as de los grupos dimetil- y dietil-amino, también fue observada en derivados de chalconas dialquiloamino sustituidas.[82] Lo anterior corrobora que la primera protonación, para el **DMST** y **DEST**, tiene lugar en el átomo de nitrógeno del grupo dialquiloamino, donde el aumento del p*K*a es consecuencia de una mayor estabilización por hiperconjugación del sustituyente *N*,*N*-dietilo en comparación al sustituyente *N*,*N*-dimetilo.



**Figura 3**. Valoración ácido-base para el compuesto **DEST** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a 25 °C): a) espectros UV-vis a distintos valores de pHs (0,5 - 3,9) y b) variaciones de la absorbancia a 490 y 380 nm a distintos valores de pH en ausencia de macrociclos.

El estudio cinético para el sustrato **DEST**, también mostró una mejor correlación con el modelo de tres protonaciones ( $pKa_1 = 2,40$ ,  $pKa_2 = 0,32$ ,  $pKa_3 = -7,21$ ), donde el  $pKa_1$  estimado es consistente con el obtenido por el método de valoraciones (**Figura 4c**). Esto sugiere que, al igual que el **DMST**, el **DEST** presenta una triple protonación a pH muy bajos.



**Figura 4**. Variación de la constante de velocidad observada ( $k_{obs}$ ) en función del pH para el compuesto **DEST** (1,5 µM en 30 % MeOH a 25 °C). a) ajuste de modelo cinético para una protonación, b) ajuste de modelo cinético para dos protonaciones y c) ajuste de modelo cinético para tres protonaciones.

En vista de que el primer p*K*a obtenido está razonablemente sujeto al grupo dialquilamino en **DMST** y **DEST**, se deduce que el p*K*a<sub>2</sub> y el p*K*a<sub>3</sub> para dichos sustratos estarían relacionados, respectivamente, con la protonación del nitrógeno heterocíclico (*N*-heterocíclico) y el oxígeno carbonílico de dichos sustratos. Esta última afirmación, está soportada por lo reportado por Fernández B. *et al.*, donde se atribuye un similar valor de p*K*a (en un rango de -0,94 a 0,82) al *N*-heterocíclico en lugar del oxígeno carbonílico en derivados de pirazinonas.[122]

# 3.2.3. Determinación de los valores de pKas del DMSTOH

Para el caso del sustrato **DMSTOH**, se puede apreciar que la variación en los espectros UV-vis exhibidos en la **Figura 5a**, presenta una conducta diferente a la obtenida para los sustratos **DMST** y **DEST** (**Figura 1a** y **3a**). A pH cercano a 4,0, el espectro del **DMSTOH** muestra un  $\lambda$ max a 487 nm, mientras que a pH cercano a 0,7 se presentan dos bandas centradas a 437 nm y a 625 nm.



**Figura 5**. Valoración ácido-base para el compuesto **DMSTOH** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a 25 °C) a distintos valores de pHs (0,7 - 4): a) espectros UVvis y b) variaciones de la absorbancia a 487 nm a distintos pH en ausencia de macrociclos.

Note que la banda a 380 nm observada en los sustratos **DMST** y **DEST** (correspondiente a la protonación del grupo dialquiloamino) se encuentra desplazada a 437 nm para el sustrato **DMSTOH**, por lo que la presencia de los grupos hidroxilos en el grupo fenilo serían responsables de dicho corrimiento.

Tal como se muestra en la **Figura 5b**, el p*K*a del ácido conjugado del **DMSTOH** se determinó por el método de valoraciones a 415, 487 y 625 nm, El p*K*a determinado a 415 nm fue de 1,75 ± 0,06 nm, este valor es mayor ( $\Delta$ p*K*a ≈ 0,4) que el obtenido para el **DMST**. Esto sugiere que los grupos hidroxilos no solo cambian las propiedades de absorción del **DMSTOH** protonado, sino que también aumentan la basicidad del grupo dimetilamino. Esto es posible considerando un sistema altamente conjugado. De hecho, el sustituyente *p*-hidroxilo posee una constante de resonancia electrofílica ( $R^+$ ) de -1,25.[123] Esto significa que la deslocalización electrónica por resonancia a partir del *p*-hidroxilo en el grupo fenilo tendría lugar; estabilizando la carga (+) del ácido conjugado del **DMSTOH** y, por ende, aumentando su p*K*a en relación al compuesto no sustituido (**DMST**).

En contraste con los sustratos DMST y DEST, el DMSTOH presenta una banda a 625 nm asociada a un pKa de 1,67 nm, similar al previamente descrito. El hecho que a 625 nm y a 415 nm los valores de pKa sean similares, sin pérdida del punto isobéstico, sugiere la presencia de protonaciones paralelas; entre el átomo de nitrógeno del grupo dimetilamino y el N-heterocíclico. El N-heterocíclico en el DMSTOH se encontraría habilitado para competir en la protonación con el nitrógeno del grupo dimetilamino. La habilitación vendría dada por el aumento del pKa del N-heterocíclico como consecuencia de la deslocalización electrónica de los hidroxilos en el grupo fenilo, donde dicho fenómeno ha sido discutido previamente. En este caso, el N-heterocíclico se encuentra en una posición mucho más cerca a los grupos hidroxilos en comparación al átomo de nitrógeno del grupo dimetilamino, por lo que efecto del sustituyente -OH sobre el aumento de la basicidad del N-heterocíclico sería mucho mayor. Por tanto, es razonable deducir que el N-heterocíclico aumentaría su pKa en el **DMSTOH** a tal punto de competir con el grupo dimetilamino. De esta manera, el **DMSTOH** presentaría dos protonaciones no consecutivas y con similares pKas, una correspondiente a la protonación del grupo dimetilamino (banda a 437 nm), y otra correspondiente a la protonación del N-heterocíclico (banda a 625 nm).

La determinación de los valores de p*K*a para los sustratos **DMST**, **DEST** y **DMSTOH** permiten establecer un panorama más claro a la hora de evaluar dichos sustratos en presencia de un macrociclo, en especial con CB7, ya que éste es bien conocido por ser muy afín a sustratos catiónicos.[124]

3.3. Estudio del comportamiento espectroscópico (UV-vis y emisión) de las DAAS (Serie 1) en ausencia y presencia de diferentes macrociclos.

# 3.3.1. Efecto del cucurbit[7]urilo (CB7)

Para evaluar el efecto del macrociclo CB7 sobre los desplazamientos UVvis se comparan los espectros asociados al compuesto **DMST**, a diferentes pHs, en ausencia y en presencia de CB7, ver **Figura 6a** y **6b**, respectivamente. En el gráfico de la **Figura 6b** podemos observar que, en presencia de CB7, ocurre una disminución de la absorbancia de la banda a 483 nm con el pH, mientras que, paralelamente, ocurre la aparición de una banda a longitudes de ondas más largas ( $\lambda_{max} = 611$  nm). Esto es indicativo de la formación de un complejo de inclusión. De hecho, el espectro de masa sugiere la formación de un complejo de estequiometria 1:1 (Anexo C, **Figura C1**). Considerando, además, que la intensidad de la banda a 611 nm aumenta conforme el pH disminuye, se infiere que dicho complejo estaría favorecido por la protonación del **DMST**.



**Figura 6**. Espectros UV-vis del DMST (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a 25 °C) a distintos pHs. a) En ausencia y b) en presencia de CB7 (1,2 mM). La línea segmentada en ambas figuras está fijada a 483 nm.

A pH=0 la especie mono-protonada, según la ecuación de Henderson-Hasselbalch, se encuentra en un 95% y está representada por el espectro de color gris en la **Figura 6a**. Las valoraciones con CB7 a pH=0 para el sustrato **DMST**, se muestra en la **Figura 7a**. En tal figura se puede observar la aparición de una nueva banda a 611nm, que incrementa a medida que la concentración de CB7 aumenta. Tales cambios a 611nm fueron ajustados a un modelo de estequiometría 1:1, obteniéndose una  $K_{1:1}$  de 951 ± 140 M<sup>-1</sup> (**Figura 7b**). El valor de la constante de asociación obtenida es mucho más bajo de lo esperado; considerando que a pH=0 la especie protonada es la predominante. Normalmente, se espera que los ácidos conjugado de bases dialquilamino-sustituidas formen complejos de inclusión >10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>.[124]



**Figura 7**. Valoración con CB7 para el compuesto **DMST** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 0 y 25 °C): a) espectros UV-vis y b) variaciones de la absorbancia a 611 nm a distintas concentraciones de CB7 (0 - 0,92 mM).

Por otro lado, no hemos encontrado en la literatura, efectos batocrómicos cercanos a 9949 cm<sup>-1</sup> (380 nm  $\rightarrow$  611nm, **Figura 7a**) atribuidas sólo a fenómenos de inclusión con CB7. Normalmente, los corrimientos hacia el rojo asociados a interacciones no covalentes entre el CB7 y el cromóforo, toman valores de energía en el intervalo de 400 a 2000 cm<sup>-1</sup>.[78,82,125]

Los corrimientos batocrómicos de mayor extensión (entre 2000-6800 cm<sup>-1</sup>) están sujetos a reacciones de transferencia protónica involucradas en la protonación del sustrato en cuestión y, en muchos casos, dicha protonación está inducida en presencia CB7.[78,126–128] Por tanto, es razonable replantearse que dicha banda a 611 nm podría estar asociada con la protonación del *N*-heterocíclico del **DMST**, inducida por CB7, a partir de la

especie neutra. De este modo, el corrimiento sería de 4447 cm<sup>-1</sup> (483nm  $\rightarrow$  611nm), tal como se observa en la **Figura 6**; siendo éste un corrimiento mucho más razonable. De hecho, para el **DMSTOH** libre, la protonación establecida para el *N*-heterocíclico fue discutida en la sección 3.2.3. y asignada a la banda a 625 nm (**Figura 5**), el cual es un  $\lambda_{max}$  muy cercano al observado (611 nm) para el sustrato **DMST** en presencia de CB7 (**Figura 7a**).



**Figura 8**. Valoración con CB7 para el compuesto **DMST** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros UV-vis, b) variaciones de la absorbancia a 611 nm, c) espectro de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$  = 530 nm), d) variaciones de la intensidad de emisión a 601 nm.

A pH=2,5 el **DMST** (especie neutra) se encuentra en un 94% para un p*K*a de 1,30. A este pH se observó un gran cambio a 611 nm en presencia de 1,2 mM de CB7 (**Figura 6b**). Las valoraciones con CB7 a pH=2,5 se realizaron tanto por absorbancia como por luminiscencia. Los resultados se muestran en la **Figura 8**. La constante de asociación obtenida para un modelo de estequiometria 1:1 fue de  $\approx$ 3000 M<sup>-1</sup>, para ambas metodologías.

Este valor, aunque es mucho mayor al obtenido a pH=0 (**Figura 7b**), sigue siendo un valor inferior a lo esperado (10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>)[124] para un complejo que aparenta estar favorecido por la protonación (ver **Figura 6**).

Esta subestimación de la constante de asociación puede ser debida a la presencia de otros complejos con propiedades ópticas similares al sustrato libre, las cuales compiten por la inclusión del sustrato y no son considerados en un modelo 1:1. De esta manera, y por todo el análisis que se ha llevado hasta ahora, se propone el siguiente mecanismo de inclusión para el **DMST** y el CB7:



**Esquema X**. Representación del mecanismo propuesto para la formación del complejo de inclusión entre la CB7 y el **DMST** a pH 2,5.

Según el mecanismo propuesto en el **Esquema X**, los complejos A y C estarían favorecidos ante el complejo B, debido a las interacciones de tipo ion-dipolo, las cuales suelen ser ≈1000 veces más estables que los complejos formados por sustratos neutros.[129] El complejo C se estaría formando debido a la protonación del *N*-heterocíclico a partir del complejo B, y sería el responsable de la banda de absorción observada a 611 nm

para un efecto batocrómico de 4447 cm<sup>-1</sup>. Esta protonación estaría desfavorecida a pH 5,3 y 10, tal como se mostró en la **Figura 6b**. Mientras que el complejo A mantendría las mismas propiedades ópticas del sustrato libre.



**Figura 9**. Valoración con CB7 para el compuesto **DEST** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a 25 °C): a) espectros UV-vis a pH 2,5. b) variaciones de absorbancia a 630 nm a distintas concentraciones de CB7 (0 – 1,2 mM, pH 2,5). c) espectros UV-vis a pH 0,5. b) variaciones de absorbancia a 630 nm a distintas concentraciones de CB7 (0 – 0,94 mM, pH 0,5).

Por otra parte, las valoraciones con CB7 a pH=2,5 para el sustrato **DEST**, se muestra en la **Figura 9a**. En tal figura se puede observar la aparición de una nueva banda a 630 nm, que incrementa a medida que la concentración de CB7 presente aumenta; similar a lo observado para el sustrato **DMST**. La constante de asociación obtenida para un modelo de estequiometria 1:1 fue de 3160 M<sup>-1</sup> (**Figura 9b**), del mismo orden de magnitud que para el **DMST** (**Figura 8b**). Sin embargo, a diferencia del **DMST**, los espectros UV-vis del **DEST** presentaron adicionalmente un corrimiento gradual hacia

 $\approx$ 544 nm a partir de la banda ubicada a 493 nm (correspondiente al sustrato libre). El espectro de masas para **SAC2** en presencia de un exceso de CB7 sugiere solo la formación de un complejo de estequiometría 1:1 (Figura C2), por lo que dicho cambio no está asociado con un segundo complejo de estequiometría 2:1.

A pH=0,5 el corrimiento hacia 544 nm no fue observado (**Figura 9c**). De modo que, el corrimiento evidenciado a pH=2,5 estaría vinculado a la formación de un complejo no protonado. De hecho, este corrimiento corresponde a 1902 cm<sup>-1</sup>, similar al reportado en chalconas dietilamino sustituidas no protonadas (2235 cm<sup>-1</sup>).[82] Lo anterior sugiere que el efecto batocrómico observado a pH 2,5 estaría asociado a la formación del complejo CB7@**DEST** no protonado; análogo al complejo B propuesto en el **Esquema X**.

La explicación del por qué tal corrimiento sólo se observa con el sustrato **DEST** y no con el **DMST**, podría estar sujeta a sus valores de p*K*a entre los complejos A y B (p*K*a(AB), **Esquema X**). De manera que, para el **DMST**, el equilibrio entre el complejo A y el complejo B estaría mayormente más desplazado hacia el complejo A que cuando el sustrato es **DEST**; a tal punto de no observarse. Esta posible diferencia entre los p*K*a(AB) puede ser soportada por lo reportado por Basílio *et al.*, donde el p*K*a observado para el complejo formado entre chalconas y CB7 es mucho mayor cuando el sustituyente presente en el sustrato es dimetilamino (p*K*a=6,22) a cuando el sustituyente es dietilamino (p*K*a=4,71).[82]

La determinación del p*K*a(AB) solo es posible si se conoce el p*K*a(CB), y viceversa. Esto es debido a que el complejo A y C se estarían formando simultáneamente a partir del complejo B (ver **Esquema X**), por tanto, no es posible estimar individualmente sus valores de p*K*as sin, al menos, conocer uno de ellos.

Por otra parte, la disminución de la constante de asociación,  $K_{1:1}$ , observada para el sustrato **DMST** al bajar de pH 2,5 ( $K_{1:1}$  = 3043 M<sup>-1</sup>) a pH 0 ( $K_{1:1}$  =

951 M<sup>-1</sup>), puede explicarse por la protonación del CB7[35] a pH < 2,5 o por la saturación de los portales del CB7 por iones hidronios; interfiriendo y reduciendo la fuerza de interacción CB7/sustrato.[130,131] Esta explicación aplica también para el **DEST** donde también se observa una disminución del  $K_{1:1}$  al bajar de pH 2,5 ( $K_{1:1}$  = 3161 M<sup>-1</sup>) a pH 0,5 ( $K_{1:1}$  = 167 M<sup>-1</sup>). En este último caso la reducción de la  $K_{1:1}$  fue mayor que la evidenciada para el **DMST**. Esto puede deberse a que a pH=0,5 la forma di-protonada del **DEST** se encuentra en mayor proporción (40%) en comparación con la forma di-protonada del **DMST** (15%). En este sentido, se estaría subestimando en mayor medida la  $K_{1:1}$  para el **DEST** por la mayor formación de complejo adicional, entre el CB7 y su forma di-protonada, a pH 0,5; el cual no está considerado en un modelo 1:1.



**Figura 10**. Valoración con CB7 para el compuesto **DMSTOH** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros UV-vis, b) variación de la absorbancia a 636 nm, c) espectro de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$  = 530 nm), y d) variación de la emisión normalizada a 611 nm, todos a distintas concentraciones de CB7 (0 – 1,2 mM).

Finalmente, las valoraciones con CB7 a pH 2,5 para el sustrato **DMSTOH**, realizadas tanto por la metodología de absorbancia como por luminiscencia, se muestran en la **Figura 10**. Tales valoraciones se ajustaron a un modelo de estequiometría 1:1 entregando una constante de asociación promedio de 300 M<sup>-1</sup>; 10 veces menor que la obtenida para el compuesto **DMST**.

La disminución de la constante de asociación,  $K_{1:1}$ , obtenida para el **DMSTOH**, en comparación a la obtenida para el sustrato **DMST**, puede ser debida a la formación de un complejo adicional al mecanismo planteado previamente. Este complejo podría estar dado por la formación de un complejo de inclusión o exclusión entre el CB7 y el **DMSTOH** por el lado del fenilo grupo, formado por enlaces de hidrógenos entre los grupos hidroxilos del grupo fenilo y los portales del CB7, la cual compite con las demás vías de asociación ya mencionadas. De esta manera, y por todo lo discutido hasta ahora, se propone el siguiente mecanismo de inclusión para la Serie 1 y el CB7:



**Esquema XI**. Representación del mecanismo propuesto para la formación del complejo de inclusión entre el CB7 y la Serie 1 a pH 2,5.

Desafortunadamente, el ajuste de los datos obtenidos al mecanismo

propuesto no es posible realizar sin conocer los valores de p*K*a involucrados. Por tanto, la constante de asociación  $K_{1:1}$  estimada es solo una constante aparente ya que el modelo 1:1 no toma en cuenta el mecanismo completo propuesto. A pesar de eso, las  $K_{1:1}$  obtenidas por un modelo 1:1 nos permiten proponer un mecanismo mucho más complejo debido a las inconsistencias observadas entre los homólogos de la Serie 1 y lo reportado en la literatura.

Los resultados obtenidos sobre la inclusión de la Serie 1 en CB7 podrían sugerir una característica potencialmente importante en las aza-cumarinas desde el punto de vista de la respuesta óptica del *N*-heterocíclico cuando éste en el complejo (complejo B, **Esquema XI**) recibe un ion hidronio. Esto podría extrapolarse para la detección de otros iones de naturaleza catiónica con mayor valor agregado a pH no ácido.

## 3.3.2. Efecto de la β-Ciclodextrina (β-CD)

La presencia de  $\beta$ -CD no produjo cambios significativos en el espectro UVvis de los sustratos de la Serie 1 (**Figura 11**).



**Figura 11**. Espectros UV-vis (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C) a 0 y 1,5 mM de  $\beta$ -CD para: a) **DMST**, b) **DEST** y c) **DMSTOH**.

Sin embargo, las bandas de emisión mostraron notables aumentos en su intensidad a medida que la concentración de  $\beta$ -CD aumentaba, especialmente en los sustratos **DMST** y **DEST** (**Figura 12a y 13a**). El sustrato **DMSTOH**, por su parte, también mostró un aumento en las bandas de emisión en presencia de  $\beta$ -CD, pero los cambios fueron mucho menores (**Figura 14a**).



**Figura 12**. Valoración con  $\beta$ -CD para el compuesto **DMST** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$  = 535 nm), b) variaciones de la intensidad de emisión normalizada a 590 nm a distintas concentraciones de  $\beta$ -CD (0 – 1,5 mM).



**Figura 13**. Valoración con  $\beta$ -CD para el compuesto **DEST** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$  = 530 nm), b) variaciones de la intensidad de emisión normalizada a 590 nm a distintas concentraciones de  $\beta$ -CD (0 – 1,5 mM).


**Figura 14**. Valoración con  $\beta$ -CD para el compuesto **DMSTOH** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$  = 530 nm), b) variaciones de la intensidad de emisión normalizada a 610 nm a distintas concentraciones de  $\beta$ -CD (0 – 1,5 mM).

Esto puede deberse a la disminución de las rutas no radiativas, como lo sería la restricción de rotación inherentes al grupo estirilo de dichos sustratos en presencia de  $\beta$ -CD. La capacidad de la  $\beta$ -CD en albergar un grupo estiril ha sido reportado para el estireno y metil-estireno,[132] y su conformación de interacción la hemos adoptado en este trabajo. En este sentido, el grupo estirilo de la aza-cumarina (Serie 1) se estaría ubicando dentro de la  $\beta$ -CD tal como se muestra en el **Esquema XII**. Note que la  $\beta$ -CD estaría albergando uno de los enlaces rotables disminuyendo el grado de rotación y, por ende, el aumento observado en la intensidad de fluorescencia al aumentar la concentración de  $\beta$ -CD (**Figura 12a-13a**).



**Esquema XII**. Representación del mecanismo propuesto para la formación del complejo de inclusión entre la  $\beta$ -CD y sustratos de la Serie 1 a pH 2,5.

En las figuras **Figura 12b, 13b** y **14b** se muestra las constantes de asociación,  $K_{1:1}$ , respectivas para los tres sustratos, las cuales resultaron ser similares entre si con un  $K_{1:1}$  alrededor de 700 M<sup>-1</sup>, siendo el **DMSTOH** el sustrato que presentó una afinidad algo menor hacia la  $\beta$ -CD. Estos

resultados concuerdan con la literatura para complejos de inclusión de benceno[133] y fenoles,[134] donde además el complejo β-CD/crisina[135] se desfavorece cuando el grupo fenilo se encuentra sustituido por un grupo hidroxilo, similar a lo observado en este apartado.

Cabe señalar que, para la consideración de un complejo inclusión por el lado del grupo estirilo, se plantea que tanto la especie neutra como la monoprotonada presentes a pH 2,5, participan en la inclusión sin distinción alguna. Por tanto, y en modo de simplificar en el **Esquema XII**, se ha solo considerado la especie neutra para ilustrar el mecanismo de asociación. Esto mismo se aplicó para los mecanismos ilustrados en los siguientes apartados (Sección 3.3.3 y Sección 3.3.4).

### 3.3.3. Efecto de la Dimetil-β-ciclodextrina (DM-β-CD):

Tal como se presenta en la **Figura 15**, la presencia de DM- $\beta$ -CD, no produjo cambios significativos en los espectros UV-vis de los respectivos sustratos estudiados, similar a lo observado con  $\beta$ -CD (**Figura 11**).



**Figura 15.** Espectros UV-vis (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C) a 0 y 3,0 mM de DM- $\beta$ -CD para: a) **DMST**, b) **DEST** y c) **DESTOH**.

Sin embargo, los espectros de emisión sí fueron afectados notablemente en presencia de DM- $\beta$ -CD, resultando en un aumento de las bandas de emisión en cada uno de los sustratos de la Serie 1 (**Figuras 16-18**).



**Figura 16**. Valoración con DM- $\beta$ -CD para el compuesto **DMST** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$  = 530 nm), b) variaciones de la intensidad de emisión normalizada a 590 nm a distintas concentraciones de DM- $\beta$ -CD (0 – 4,5 mM).



**Figura 17**. Valoración con DM- $\beta$ -CD para el compuesto **DEST** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$  = 530 nm), b) variaciones de la intensidad de emisión normalizada a 575 nm a distintas concentraciones de DM- $\beta$ -CD (0 – 4,5 mM).



**Figura 18**. Valoración con DM- $\beta$ -CD para el compuesto **DMSTOH** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc} = 530$  nm), b) variaciones de la intensidad de emisión normalizada a 582 nm a distintas concentraciones de DM- $\beta$ -CD (0 – 4,5 mM).

La dependencia de la emisión con respecto a la concentración del DM- $\beta$ -CD mostró un comportamiento que se ajusta a un modelo de estequiometria 1:1. Las constantes de asociación encontradas fueron 8911, 8871 y 20821 M<sup>-1</sup>, para los sustratos **DMST**, **DEST** y **DMSTOH**, respectivamente. Esto sugiere que la DM- $\beta$ -CD interactúa más favorablemente con el 2,4-dihidroxifenil en el sustrato **DMSTOH** que con el grupo fenilo presente en los sustratos **DMST** y **DEST**. El aumento de la constante de asociación en presencia de los grupos hidroxilos en **DMSTOH**, puede deberse principalmente a la formación de enlace de hidrógeno entre el hidroxilo secundario (no metilado) de la DM- $\beta$ -CD y uno de los hidroxilos del **DMSTOH**.

Un primer acercamiento de cuál hidroxilo del **DMSTOH** podría estar favoreciendo la inclusión, toma como base los trabajos de Jung *et al.*,[135,136] quienes reportaron que los grupos hidroxilos en la posición - *para* del anillo fenilo no afectan la constante de asociación entre los flavonoides crisina o galangina y la DM- $\beta$ -CD. Sin embargo, cuando el sustituyente hidroxilo se encuentra en la posición *-orto* de la flavonona, tal como se mostró en el trabajo de Olea-Azar *et al.*;[137] la constante de asociación se duplica de manera similar al efecto observado en este apartado. Esto podría indicar que uno de los grupos hidroxilos secundario

(no metilado) de la DM-β-CD estaría formando enlace de hidrógeno con el hidroxilo en la posición -*orto* del fenilo perteneciente al **DMSTOH**. Esto nos permite plantear un modelo de interacción acorde a los resultados obtenidos y lo reportado en las literaturas mencionadas[135–137] (ver **Esquema XIII)**.



**Esquema XIII**. Representación del mecanismo propuesto para la formación del complejo de inclusión entre la DM-β-CD y la Serie 1 a pH 2,5.

En contraste con la  $\beta$ -CD, la DM- $\beta$ -CD resultó ser un mejor anfitrión para cada uno de los sustratos de la Serie 1. Esto es debido a que la  $\beta$ -CD tiene, en su mayoría, sus hidroxilos comprometidos formando enlaces de hidrógeno de manera intramolecular, otorgándole una mayor rigidez y con una escaza capacidad de formar enlace de hidrógenos intermoleculares.[138] No obstante, la DM-β-CD no puede formar enlaces de hidrógenos intramoleculares dada la metilación, por lo tanto, es más flexible. Esta flexibilidad podría otorgarle a la DM-β-CD una mayor adaptabilidad hacia los sustratos mencionados. Una característica notable en la DM-β-CD es que, si bien no presenta enlaces de hidrógenos intramoleculares, sus hidroxilos secundarios pueden formar enlaces de hidrógenos de manera intermolecular mejorando su afinidad con huéspedes aceptores de enlace de hidrógenos en contraste con la β-CD.[138] Finalmente, el efecto hidrofóbico es una de los fenómenos que podría también contribuir en la mejora de las características del anfitrión DM-β-CD sobre el β-CD, esto como consecuencia de una mayor profundidad apolar de la cavidad, concedida por los metilos sustituidos en la DM-β-CD (ver **Tabla 1** en Introducción).

### 3.3.4. Efecto de la $\gamma$ -Ciclodextrina ( $\gamma$ -CD):

Tal como se muestra en la **Figura 19**, la presencia del macrociclo  $\gamma$ -CD, al igual que la  $\beta$ -CD y DM- $\beta$ -CD, no mostró un efecto significativo sobre las intensidades de absorción de los sustratos de la Serie 1. Sin embargo, un ligero efecto hipsocrómico fue observado. El corrimiento hacia el azul en los sustratos **DMST**, **DEST**, **DMSTOH** fue de 527, 858 y 343 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Esto podría indicar una posible pérdida en el grado de la conjugación- $\pi$  del sustrato tras la inclusión.



**Figura 19**. Espectros UV-vis (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C) a 0 y 10 mM de  $\gamma$ -CD para: a) **DMST**, b) **DEST** y c) **DESTOH**.

Sin embargo, la intensidad de las bandas de emisión de los compuestos de la Serie 1 (**Figuras 20a-22a**) mostraron una mayor dependencia con la concentración de  $\gamma$ -CD, con un comportamiento que se ajusta a un modelo de estequiometría 1:1.



**Figura 20**. Valoración con  $\gamma$ -CD para el compuesto **DMST** (1,5 µM en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$  = 530 nm), b) variación de la intensidad de emisión normalizada a 601 nm a distintas concentraciones de  $\gamma$ -CD (0 – 10 mM).



**Figura 21**. Valoración con  $\gamma$ -CD para el compuesto **DEST** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$  = 530 nm), b) variación de la intensidad de emisión normalizada a 597 nm a distintas concentraciones de  $\gamma$ -CD (0 – 10 mM).



**Figura 22**. Valoración con  $\gamma$ -CD para el compuesto **DMSTOH** (1,5  $\mu$ M en 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C): a) espectros de emisión normalizado ( $\lambda_{exc}$  = 530 nm), b) variación de la intensidad de emisión normalizada a 609 nm a distintas concentraciones de  $\gamma$ -CD (0 – 4,5 mM).

Las constantes de asociación de la Serie 1 con  $\gamma$ -CD fueron 335, 230 y 142 M<sup>-1</sup>, para el **DMST**, **DEST** y **DMSTOH**, respectivamente. Los valores de  $K_{1:1}$  determinados fueron alrededor de 1/3 del valor obtenido en presencia de  $\beta$ -CD. Esta disminución de la afinidad sería una consecuencia de la perdida de interacciones favorables cuando las aza-cumarinas mencionadas se encuentran en una cavidad de mayor volumen. Lo anterior permitiría a éstas interaccionar con la  $\gamma$ -CD por un solo lado de la superficie de la cavidad (interacción lateral) o de forma diagonal con el fin de lograr el mayor número de interacciones favorables posibles. Mientras que en presencia  $\beta$ -CD, el grupo estirilo en los sustratos de la Serie 1 se ubicaría preferentemente en el centro de la cavidad ya que su diámetro es menor.



**Esquema XIV**. Representación del mecanismo propuesto para la formación del complejo de inclusión entre la  $\gamma$ -CD y la Serie 1 a pH 2,5.

Considerando que el aumento de la concentración de  $\gamma$ -CD provoca una disminución de la intensidad de emisión de los sustratos mencionados (**Figura 20-22**), se prevee que éstos, una vez dentro de la  $\gamma$ -CD, adquieren una forma torsionada (no plana). La estabilización de un rotámero no plano carente de propiedades emisivas o radiativas es atribuida a la pérdida de la conjugación electrónica D- $\pi$ -A de las aza-cumarinas (corrimiento hipsocrómico), como consecuencia de la ausencia de planaridad en su estructura (ver **Esquema XIV**).

### 3.4. Desplazamiento de Stokes (DS) y rendimiento cuántico ( $\Phi_F$ )

Con el objeto de caracterizar las propiedades espectrales de emisión y/o absorción de las aza-cumarinas sintetizadas, en ausencia y presencia de macrociclos se determinaron desplazamientos de Stokes (DS) y rendimientos cuánticos de emisión ( $\Phi_F$ ). En la **Tabla 3** se resumen los

parámetros mencionados para los sustratos **DMST**, **DEST** y **DMSTOH** en ausencia y presencia de los macrociclos CB7,  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD.

Especies	λ <sub>abs</sub> ⊓ (nm)	λ <sub>abs</sub> (nm)	λ <sub>em</sub> (nm)	λ <sub>ex</sub> (nm)	DS (cm <sup>-1</sup> )	${oldsymbol{\Phi}}_F$
DMST <sup>b</sup>	-	466	574	-	4035	0,55
DMST	380	483	594	483	3869	$0,144 \pm 0,008$
DEST	380	493	595	493	3477	$0,112 \pm 0,008$
DMSTOH	431	487	621	489	4431	$0,054 \pm 0,002$
CB7@DMST <sup>c</sup>	611		-	-	-	0
CB7@DEST <sup>c</sup>	630		-	-	-	0
CB7@DMSTOH <sup>c</sup>	636		-	-	-	0
β-CD@DMST	483		585	487	3610	$0,249^{d} \pm 0,016$
β-CD@DEST	493		582	493	3102	$0,252^{d} \pm 0,016$
β-CD@DMSTOH	487		615	490	4274	$0,058^{d} \pm 0,002$
DM-β-CD@DMST	483		573	487	3252	0,500 ± 0,016
DM-β-CD@DEST	493		568	493	2678	$0,409 \pm 0,013$
DM-β-CD@DMSTOH	489		576	490	3089	0,332 ± 0,011
γ-CD@DMST	471		ND	ND	ND	ND
γ-CD@DEST	473		ND	ND	ND	ND
γ-CD@DMSTOH	479		ND	ND	ND	ND

Tabla 3. Características fotofísicas: sustratos libres y sus complejos.ª

<sup>a</sup> 30 % MeOH a pH 2,5 y 25 °C. <sup>b</sup> Etanol a 25 °C (ref [139]). <sup>c</sup> Complejo C. NC (No Determinado). <sup>d</sup>  $\Phi_F$  corregida excluyendo la contribución del sustrato libre (Anexo E).  $\lambda_{abs}^{H}$  es la longitud máxima del sustrato mono-protonado (7-(dialquilaminio)aza-cumarina).  $\lambda_{abs}$ .  $\lambda_{em}$  y  $\lambda_{ex}$  son las longitudes máximas de absorbancia, de emisión y de excitación, respectivamente.

Tal como se muestra en la **Tabla 3**, los sustratos y sus complejos mostraron un máximo de absorción cercano a los 500 nm y un máximo de emisión alrededor de 600 nm en 30 % de MeOH a pH 2,5. Esta emisión a longitudes de ondas más largas corresponde a desplazamientos de Stokes que van desde 2678 a 4431 cm<sup>-1</sup>. Similares desplazamientos de Stokes han sido reportados y atribuidos al incremento en el momento dipolar del estado excitado tras la formación de un estado de transferencia de carga (ICT).[139]

Cabe mencionar que la discriminación entre el predominio de un estado de transferencia de carga intramolecular plano o por torsión (PITC o TICT, respectivamente) no siempre es clara, en especial cuando se observa una sola banda de emisión, ya que ambos estados son sensibles a la polaridad del disolvente y ambos pueden ser fluorescentes o no. De hecho, Valeur *et* 

*al.*,[139] estudiaron las propiedades fotofísicas del **DMST** en gran detalle, sin embargo la distinción entre ambos estados no pudo ser llevada a cabo con buen rigor.

Por otro lado, el rendimiento cuántico,  $\Phi_F$ , obtenido para el sustrato **DMST** para una solución metanólica al 30 % (v/v) y pH 2,5 fue de 0,14. Este valor es tres veces más bajo en comparación a lo reportado en etanol ( $\Phi_F = 0,55$ ),[139] a pesar de que en ambos disolventes los desplazamientos de Stokes obtenidos son similares (ver **Tabla 3**). Este hecho podría indicar que el estado excitado, ICT, del **DMST** se encuentra en su máximo momento dipolar en ambos medios, por lo que un mayor efecto de solvatación por el disolvente de mayor polaridad no es requerido. Es importante mencionar que la disminución del rendimiento cuántico no se debe a la influencia del **DMST** protonado, ya que a pH 2,5 se encuentra en un 7 %. En este sentido sería apropiado realizar un estudio a diferentes concentraciones de iones cloruros para evaluar sí dichos iones presentes en una solución metanólica a pH 2,5 son los causantes de la desactivación de la emisión o evaluar la influencia del agua midiendo la intensidad de emisión a diferentes concentraciones de MeOH.

Existen varios mecanismos que pueden explicar la desactivación de la emisión por el agua.[140] En nuestro caso, el efecto del agua podría estar sujeto a la formación de enlace de hidrógeno con el N-heterocíclico, esta interacción podría no estar ocurriendo cuando el disolvente es etanol, o por lo menos no fuertemente. Esta desactivación por formación de enlace de hidrógeno podría también explicar el bajo rendimiento cuántico observado para el **DMSTOH** ( $\Phi_F = 0,054$ ), donde el agua además formaría enlaces de hidrógenos con los grupos hidroxilos en el segmento estirilo.

Por otro lado, el **DEST** presentó un desplazamiento de Stokes 392 cm<sup>-1</sup> menor que el **DMST**, esto es debido a que el **DEST** exhibe un máximo de absorción de menor energía ( $\Delta\lambda_{max} = 10$  nm). Por tanto, el **DEST** debería exhibir un estado excitado ICT con menor momento dipolar. En este

64

sentido, el **DEST** debería mostrar rendimiento cuántico algo mayor al **DMST**, sin embargo, los valores obtenidos para el  $\Phi_F$  son similares para ambos sustratos.

La **Tabla 4** resume los valores obtenidos previamente para las constantes de asociación y tipo de estequiometria de los complejos formados entre los sustratos **DMST**, **DEST** y **DMSTOH** y los macrociclos CB7,  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD. Además, la **Tabla 4** presenta los corrimientos de banda absorción obtenidos para los diferentes complejos respecto a los sustratos libre, las variaciones en los desplazamientos de Stokes correspondiente y los cocientes entre los rendimientos cuánticos de los complejos y del sustrato libre.

**Tabla 4**. Constantes de asociación, estequiometria y efecto del macrociclo sobre las propiedades fotofísicas.

М	S	<i>K</i> (M⁻¹)	M:S	ES <sup>abs</sup> (cm⁻¹)	ΔDS (cm <sup>-1</sup> )	$oldsymbol{\Phi}_{ extsf{F}}^{ extsf{MS}} / oldsymbol{\Phi}_{ extsf{F}}^{ extsf{S}}$
CB7	DMST	$(3043 \pm 149)^{*}$	-	4337	-	0
	DEST	$(3161 \pm 290)^{*}$	-	4411	-	0
	DMSTOH	$(298 \pm 44)^{*}$	-	4811	-	0
β-CD	DMST	875 ± 126	1:1	0	-259	1,43
	DEST	663 ± 70	1:1	0	-375	1,61
	DMSTOH	537 ± 32	1:1	0	-157	1,04
	DMST	8911 ± 230	1:1	0	-617	3,41
DM-β-CD	DEST	8872 ± 368	1:1	0	-799	3,56
	DMSTOH	20921 ± 907	1:1	0	-1342	5,51
γ-CD	DMST	335 ± 8	1:1	-527	-	-
	DEST	230 ± 13	1:1	-858	-	-
	DMSTOH	142 ± 7	1:1	-343	-	-

<sup>\*</sup>Constante de asociación aparente, estimada basado en un modelo 1:1.

La excitación a 611, 630 y 636 nm, correspondiente a la longitud máxima de absorción de los complejos formados entre CB7 y los sustratos **DMST**, **DEST** y **DMSTOH** (complejo C, **Esquema XI**), no generó señal en el espectro de emisión. Por tanto, el CB7 no sólo induciría la protonación del *N*-heterocíclico a pH 2,5, sino que también produce una desactivación total de la emisión como resultado de dicha protonación.

En vista que la protonación del *N*-heterocíclico (inducida por CB7) estaría produciendo una desactivación total de la emisión y un gran efecto

batocrómico ( $\approx$ 4500 cm<sup>-1</sup>) en los sustratos de la Serie 1, las aza-cumarinas en general, pudiesen mostrarse como superiores en comparación con su análogo cumarina desde el punto de vista de la respuesta óptica del *N*heterocíclico. En este sentido, se requiere una mayor atención hacia este punto, especialmente en el diseño de nuevos sistemas que promuevan la participación de dicho átomo de nitrógeno, dirigido hacia la detección de analitos de alto valor agregado.

Por otro lado, la obtención de una constante de asociación similar para los complejos DM- $\beta$ -CD@**DMST** y DM- $\beta$ -CD@**DEST**, y diferente para el complejo DM- $\beta$ -CD@**DMSTOH**, sugiere que el DM- $\beta$ -CD en el complejo 1:1 se encuentra ubicado en el segmento estirilo. La no observación de cambios significativos en las propiedades de absorción tras la formación de dichos complejos, indica que el cromóforo para la Serie 1 se encuentra en el segmento 7-(dialquilamino)aza-cumarina, y el segmento estirilo sería un sustituyente más. A esta deducción llegaron también Valeur *et al.*,[139] en su estudio sobre las propiedades fotofísicas de una serie de aza-cumarinas en diferentes disolventes orgánicos.

En vista que, la  $\beta$ -CD y la DM- $\beta$ -CD no produjeron cambios en las longitudes máxima de absorción de dichos sustratos (**Tabla 3**), los efectos sobre los desplazamientos de Stokes observados tras la inclusión dependen únicamente de los corrimientos de los máximos de emisión. Según la **Figura 23a**, tales ciclodextrinas parecen tener un efecto lineal (R<sup>2</sup>=0,9708) sobre los desplazamientos de Stokes ( $\Delta$ DS) y el rendimiento cuántico de emisión. Esto puede deberse a la reubicación del fluoróforo en un ambiente más hidrofóbico proporcionado por la cavidad de las ciclodextrinas. De manera que, la formación del complejo estaría reduciendo proporcionalmente los efectos del solvente, asociados a la estabilización y desactivación del estado excitado (ICT).



**Figura 23**. Relación  $Φ_F^{MS}/Φ_F^S$  en función del cambio en el desplazamiento de Stokes (ΔDS) (a) y en función de las constantes de asociación  $K_{1:1}$  (b) para los complejos: **1**(β-CD@**DMSTOH**), **2**(β-CD@**DMST**), **3**(β-CD@**DEST**), **4**(DM-β-CD@**DMST**), **5**(DM-β-CD@**DEST**), **6**(DM-β-CD@**DMSTOH**).

Debido a que los movimientos rotacionales y vibracionales del sustrato debiesen ser mayormente restringidos cuanto mayor es la fuerza de interacción macrociclo/sustrato, se puede observar en la **Figura 23b** una relación regularmente lineal entre las constantes de asociación y los cambios en los rendimientos cuánticos tras la formación del complejo. Es decir, a mayor constante de asociación, los procesos no radiativos vinculados con los movimientos intramoleculares del sustrato se reducen y, en consecuencia, un aumento en el rendimiento cuántico del sustrato incluido es observado.

# 3.5. Estudio cinético sobre las reacciones de hidrólisis de azacumarinas y cumarinas (base de Schiff). Efecto del macrociclo.

Con el fin de evaluar cinéticamente la reacción de hidrólisis para algunos de los homólogos de la Serie 2 y 3, en ausencia y presencia de los macrociclos propuestos se midieron las constantes de velocidad de pseudo primer orden ( $k_{obs}$ ) en medio ácido.

3.5.1. <u>Estudio cinético de la reacción de hidrólisis de aza-cumarinas</u> (Serie 2) en ausencia y presencia de γ-CD, β-CD, DM-β-CD y <u>CB7.</u>

El comportamiento de los valores de *k*<sub>obs</sub> para la reacción de hidrólisis de la base de Schiff **DMSB**, en función de la concentración de los diferentes macrociclos, se muestra en la **Figura 24**.



**Figura 24**. Influencia de la concentración de  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD y CB7 sobre las constantes de pseudo primer orden ( $k_{obs}$ ) para la reacción de hidrólisis de **DMSB** en 0,4% DMSO (v/v) a pH=5,3 y T=25 °C. Los puntos representan valores experimentales y las curvas fueron trazadas por ajuste con la Ecuación 21.

Tal como se observa en la **Figura 24**, la presencia de  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD, no afecta significativamente la reactividad del sustrato. Si consideramos la formación de un complejo de inclusión, los complejos **DMSB**@ $\beta$ -CD y **DMSB**@ $\gamma$ -CD presentan comportamientos cinéticos similares al sustrato libre ( $k_{obs} \approx 0.1 \text{ s}^{-1}$ ). En este sentido, y tomando en cuenta el complejo de inclusión sugerido para el **DMST** en la sección 3.3.2 y 3.3.4, se propone el siguiente mecanismo de hidrólisis para el **DMSB** en presencia de  $\beta$ -CD o  $\gamma$ -CD.



**Esquema XV**. Mecanismo propuesto para la reacción de hidrólisis de **DMSB** en presencia de  $\beta$ -CD o  $\gamma$ -CD a pH 5,3.

Para el mecanismo propuesto en el **Esquema XV**, se debe considerar que los portales de las  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD no afectan el centro reactivo imino en el complejo. Esto es posible debido a la baja capacidad de estas ciclodextrinas en formar enlaces de hidrógenos intermoleculares, ya que sus hidroxilos se encuentran preferentemente formando enlaces de hidrógenos entre sí.[138]

Sin embargo, a diferencia de la  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD, la DM- $\beta$ -CD presentó un efecto inhibitorio frente a la reacción de hidrólisis para el **DMSB** (ver **Figura 24**). El ajuste de los valores de  $k_{obs}$  en función de la concentración del DM- $\beta$ -CD a un modelo cinético de estequiometria 1:1 (Ec. 21), presentó una constante de asociación de 3961 M<sup>-1</sup>, y una constante de hidrólisis para el complejo ( $k_{MS}$ ) < 1x10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup>, al menos 4 órdenes de magnitud menor que la constante de hidrólisis del sustrato libre ( $k_0 = 0,1$  s<sup>-1</sup>), ver **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Constantes de asociación de los complejos formados y de velocidad para la reacción de hidrólisis de **DMSB**<sup>a)</sup> en la presencia de DM- $\beta$ -CD y CB7 a 25 °C.

Macrociclos	<i>K</i> <sub>1:1</sub> x10⁻³ (M⁻¹)	<i>k</i> ₀ (s⁻¹)	<i>k<sub>MS</sub></i> x10 <sup>3</sup> (s <sup>-1</sup> )
DM-β-CD	$3,961 \pm 0,167$	$0,100 \pm 0,002$	<1x10 <sup>-2</sup>
CB7	208,605 ± 19,683	$0,102 \pm 0,002$	$4,150 \pm 0,546$

<sup>a)</sup> calculado de acuerdo al ajuste con la Ecuación 21.

Esta inhibición tras la inclusión del **DMSB** en DM-β-CD podría atribuirse a la estabilización del átomo de nitrógeno imino por enlaces de hidrógeno por

parte de uno de los hidroxilos secundario no metilados presente en la DM- $\beta$ -CD. Lo anterior impediría que se lleve a cabo el primer paso del proceso de hidrólisis ácida de la base de Schiff, como lo es la protonación del nitrógeno imino.[105] Adicionalmente, no se descarta la posibilidad de que los hidroxilos secundarios metilados, adyacentes a los grupos hidroxilos no metilados, generen un impedimento estérico frente al ataque del agua al carbono imínico, tal como se muestra en el siguiente esquema:



**Esquema XVI**. Mecanismo propuesto para la reacción de hidrólisis de **DMSB** en presencia de DM- $\beta$ -CD a pH 5,3.

Por otro lado, en presencia de CB7, la reacción de hidrólisis del **DMSB** mostró un fuerte efecto inhibitorio a bajas concentraciones en comparación con el macrociclo DM-β-CD (ver **Figura 24**). Esto es debido a que el CB7 presenta una mayor constante de asociación ( $K_{1:1} = 2,09x10^5$  M<sup>-1</sup>) que el macrociclo DM-β-CD, ( $K_{1:1} = 3,96$  M<sup>-1</sup>x10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>). Sin embargo, a diferencia del complejo DM-β-CD@**DMSB**, el complejo CB7@**DMSB** no presenta una inhibición total de la reacción de hidrólisis. De hecho, su constante de velocidad ( $k_{MS}$ ) fue de 4,15x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>; 25 veces menor que la del sustrato libre (**Tabla 5**). Por tanto, la inhibición del CB7 podría estar sujeta a la inclusión parcial del centro reactivo en la cavidad de éste.

Para entender lo anteriormente dicho, se debe tomar en cuenta el mecanismo de hidrólisis ácida de las iminas vía la formación del ion iminio.[105] El ion iminio suele poseer un p*K*a en el intervalo de 4 - 7.[104–106,141] De modo que, a pH < 5,5 la formación del ion iminio tendría lugar, seguido de un rápido ataque del agua (etapa rápida).[105] Por tanto,

inicialmente, se espera una inclusión del carbono imínico del sustrato dada la interacción del ion iminio con los portales del CB7. De tal forma que, la descomposición del intermediario hemiaminal formado (paso determinante)[105] sería el paso desfavorecido tras la inclusión; impidiendo la acción del agua del medio en la abstracción del átomo de hidrógeno del grupo -OH dentro de la cavidad, tal como se muestra en el siguiente esquema:



**Esquema XVII**. Mecanismo propuesto para la reacción de hidrólisis de **DMSB** en presencia de CB7 a pH 5,3.

## 3.5.2. Estudio cinético de la reacción de hidrólisis de cumarinas (Serie 3) en ausencia y presencia de CB7

Con el objeto de profundizar el estudio cinético de los derivados de azacumarinas (**Serie 2**) en presencia de CB[7], macrociclo que mostró un efecto inhibitorio frente a la reacción de hidrólisis (**Figura 24**), se evaluó la influencia de éste sobre la reactividad de dos derivados de 7-(dietilamino)cumarinas (**ICDA** e **ICDOH**) que contienen una base de Schiff (**Serie 3**).

Tal como se muestra en la **Figura 25**, los valores de  $k_{obs}$  obtenidos para la reacción de hidrólisis de la **ICDA**, al igual que la reacción de hidrólisis de **DMSB**, disminuyen con el incremento de la concentración de CB7. Tal comportamiento se ajustó a un modelo cinético de estequiometria 2:1, tanto a pH=2,5 como a pH=3,5 (**Figura 25**).



**Figura 25**. Influencia de la concentración de CB7 sobre las constantes de pseudo primer orden ( $k_{obs}$ ) para la reacción de hidrólisis de **ICDA** a pH 2,5 (a) y pH 3,5 (b). Condiciones experimentales: [tampón] = 0,05 M, Britton-Robinson; T = 25 °C. Los puntos representan valores experimentales y las curvas fueron trazadas por ajuste con las ecuaciones 23 y 24.

En la **Tabla 6** se muestran los resultados obtenidos de dichos ajustes. En ésta se puede observar que, a pH 2,5, el **ICDA** presenta altas constantes de asociación para el primer y segundo complejo formado ( $K_{1:1} = 1,6x10^8$  M<sup>-1</sup>,  $K_{2:1} = 2,6x10^5$  M<sup>-1</sup>). Considerando el p*K*a obtenido para el dimetilaminio del **DEST** (p*K*a = 2,35; **Figura 3**), se puede deducir que los grupos dietilaminos, presentes en ambos extremos del sustrato **ICDA**, se encuentran protonados, siendo los responsables de las altas constantes de asociación observadas a pH 2,5. Además, se puede observar que en el primer complejo (CB7@ICDA) se produce una reducción significativa de la constante de velocidad con respecto a la del sustrato libre (**Tabla 6**).

**Tabla 6**. Constantes de asociación de los complejos formados y de velocidad para la reacción de hidrólisis de **ICDA**<sup>a)</sup>, e **ICDOH**<sup>b)</sup> en la presencia de CB7 a 25 °C.

Sustrato	рН	<i>K</i> <sub>1:1</sub> x10 <sup>-5</sup> (Μ <sup>-1</sup> )	<i>К</i> 2:1 х10 <sup>-3</sup> (М <sup>-1</sup> )	<i>k</i> ₀ x10³ (s⁻¹)	<i>k<sub>MS</sub></i> x10 <sup>4</sup> (s <sup>-1</sup> )
ICDA	2,5	160 ± 50	20 ± 14	$22 \pm 0,2$	8 ± 2
ICDA	3,5	$3,5 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,01$	$4,4 \pm 0,1$
ICDOH	4,0	11,0 ± 1,0	-	0,021 ± 0,001	$0,81 \pm 0,001$

<sup>a)</sup> calculado de acuerdo al ajuste con la Ecuación 23. Debe notarse que la constante de velocidad de hidrólisis del complejo 2:1 es muy pequeña y el ajuste no muestra diferencias

considerándolo *k*<sub>M2S</sub> =0. <sup>b)</sup> calculado de acuerdo al ajuste con la Ecuación 21.

Esto nos permite deducir que el primer complejo (constituido por una unidad de CB7 y una unidad de **ICDA**) estaría incluyéndose por el grupo pdietilaminofenol protonado; inhibiendo la reacción frente a la hidrólisis ácida unas 27 veces a pH 2,5. Interesantemente, este resultado concuerda con lo observado en la sección 3.5.1 para el complejo CB7@**DMSB**, donde se observó una inhibición de 25 veces relativo al sustrato libre. De hecho, tanto el complejo CB7@**DMSB** como el complejo CB7@**ICDA** podrían presentar una similar protección del grupo imino, tal como se muestra en la **Figura 26a**.



Figura 26. a) Comparación de los complejos propuestos CB7@DMSB y CB7@ICDA+ (ICDA di-protonado), b) complejo CB7@ICDA y c) complejo CB7@ICDOH.

A pH 3,5 las constantes de asociación ( $K_{1:1}$  y  $K_{2:1}$ ) fueron mucho menores que las observadas a pH 2,5 (**Tabla 5**). Esto pudiera sugerir que los grupos dietilaminos pudiesen no estar protronados a pH 3,5. De hecho, la constante de velocidad del primer complejo ( $k_{MS}$ ) a pH 3,5 es solo 2 veces menor que la del sustrato libre, por tanto, el grupo imino se encontraría menos protegido por la cavidad del CB7. Esto es debido a que el grupo dietilamino (no protonado) prefiere estar dentro de la cavidad en lugar de los portales (ver **Figura 26b**).[82] Finalmente, en presencia de un exceso de CB7 se impediría estéricamente el ataque del agua al grupo imino del **ICDA**, tanto a pH 3,5 como a pH 2,5, debido a su encapsulación y la formación de un complejo de estequiometria 2:1. De esta manera, y considerando todo lo analizado hasta ahora, se propone el siguiente mecanismo para la reacción de hidrólisis de **ICDA** en presencia de CB7 a pH 2,5.



**Esquema XVIII**. Mecanismo propuesto para la reacción de hidrólisis de **ICDA** en presencia de CB7 a pH 2,5.



**Figura 26**. Influencia de la concentración de CB7 sobre las constantes de pseudo primer orden para la reacción de hidrólisis de **ICDOH** a pH 4.0. Condiciones experimentales: [tampón] = 0,05 M, Britton-Robinson; T = 25 °C.

Por otra parte, en el estudio de la reacción de hidrólisis del sustrato **ICDOH** se observó un leve incremento en los valores de las constantes observadas  $k_{obs}$  en función de la concentración de CB7 (**Figura 26**).

Los resultados cinéticos son consistentes con un mecanismo que considera la formación de un complejo 1:1, dado el ajuste de las curvas de la Figura 26 y la ecuación 21. En la Tabla 6 también se muestran los resultados obtenidos a partir de dicho ajuste para la reacción de hidrólisis de ICDOH en la presencia de CB7. La constante de asociación estimada para el complejo CB7@ICDOH fue de 1,1x10<sup>6</sup> y la constante de hidrólisis de dicho complejo fue 4 veces mayor que la constante de velocidad obtenida para el sustrato libre. Este efecto catalítico observado, si bien es pequeño, es interesante, ya que hasta ahora solo se había encontrado que el CB7 tendría un efecto inhibitorio frente a la reacción de hidrólisis ácida en las iminas (Figura 24 y 25). Una explicación a esta discrepancia podría estar asociada con la posición del CB7 frente al grupo imino en el ICDOH, tal como se muestra en la Figura 26c. De esta manera, la descomposición del intermediario hemiaminal formado en ICDOH (paso determinante) estaría favorecido por los portales del CB7. Por tanto, se propone el siguiente mecanismo (Esquema XIX) para la reacción de hidrólisis del ICDOH en presencia de CB7.



**Esquema XIX**. Mecanismo propuesto para la reacción de hidrólisis de **ICDOH** en presencia de CB7 a pH 4,0.

Es importante mencionar que la ubicación del CB7 con respecto al grupo imino en el complejo 1:1, parece tener una relación directa con el efecto catalítico observado. En este sentido, las bases de Schiff estudiadas presentaron un comportamiento cinético frente al CB7 que puede predecirse mediante el **Esquema XX**.



**Esquema XX**. Efecto catalítico generalizado para la hidrólisis ácida de bases de Schiff según la afinidad (frente al CB7) de los segmentos vinculados al centro imino.

De este modo, si la base de Schiff posee solo un segmento afín al CB7 y este se encuentra unido al nitrógeno del grupo imino, el efecto esperado es una catálisis, tal como se observó para el sustrato **ICDOH** (**Tabla 5**). Si el segmento afín al CB7, en lugar de estar unido al nitrógeno de imina, está unido al carbono del mismo grupo imino el efecto esperado es una inhibición parcial, tal como se observó para el sustrato **DMSB** y para el primer complejo del sustrato **ICDA** (**Tablas 5** y 6, respectivamente). No obstante, cuando la base de Schiff está constituida por dos segmentos afines al CB7, a cada lado del grupo imino, el efecto esperado es una inhibición total a altas concentraciones de CB7; tal como se observó para el **ICDA** (**Tabla 5**). Cabe destacar, que esta deducción es solo una aproximación limitada a las bases de Schiff estudiadas.

### 4. Capítulo IV. Conclusiones

La síntesis y caracterización de los homólogos de aza-cumarinas propuestos pudieron ser llevadas a cabalidad. Sus comportamientos espectrales y cinéticos, en sistemas confinados basados en ciclodextrinas y cucurbiturilos, fueron evaluados satisfactoriamente.

Las propiedades espectroscópicas de los homólogos de aza-cumarinas (Serie 1) fueron afectadas por la naturaleza de los macrociclos empleados. Específicamente en presencia de CB7, a pH 2,5, el efecto sobre tales propiedades fue significativo. Mientras que en presencia de otros macrociclos ( $\beta$ -CD y DM- $\beta$ -CD) las propiedades de absorción no se vieron significativamente afectadas; exceptuando el caso de la  $\gamma$ -CD, donde un ligero efecto hipsocrómico fue observado.

Los mecanismos de asociación vinculados a los cambios espectrales observados fueron, en su mayoría, acorde con un modelo de estequiometria de 1:1. En presencia de CB7, se estima un mecanismo constituido por un ciclo termodinámico con el sustrato neutro, protonado (ion dialquilaminio) y sus complejos de inclusión, más una protonación del *N*-heterocíclico del sustrato. La protonación del *N*-heterocíclico, inducida por CB7, sería la responsable de la desactivación total de la emisión, así como también del gran efecto batocrómico observado en los espectros UV-vis de los sustratos de la Serie 1. Desde el punto de vista de la respuesta óptica del *N*-heterocíclico, las aza-cumarinas en general, pudiesen considerarse como superiores en comparación a su análogo cumarina.

En cuanto a la afinidad de las ciclodextrinas sobre la Serie 1 y su influencia sobre la reactividad de **DMSB** (Serie 2), la DM- $\beta$ -CD mostró ser superior a la  $\beta$ - y  $\gamma$ -CD.

El efecto de las ciclodextrinas sobre los rendimientos cuánticos de emisión en derivados de 7-dialquilamino-3-estiril-azacumarinas (similares a la Serie 1) podría estimarse, bajo las mismas condiciones experimentales, a partir de su efecto en el desplazamiento de Stokes, dada la ecuación 26.

Por otro lado, los efectos del CB7 sobre la reactividad de la aza-cumarina **DMBS** (Serie 2) y las cumarinas pertenecientes a la Serie 3 parecen tener una relación directa con la afinidad de los segmentos ligados al grupo imino. De manera que, si el segmento afín al CB7 está unido al nitrógeno imínico, el efecto es un aumento en las constantes de velocidad del sustrato incluido, mientras que si el segmento se encuentra unido al carbono imínico el efecto es opuesto. Si en lugar de un solo segmento afín se hallaran dos (uno a cada lado del grupo imino), el efecto sería una inhibición total como consecuencia de la encapsulación del centro reactivo.

En vista de todo lo anterior, se requiere una mayor atención hacia las azacumarinas. Especialmente, en el diseño de nuevos sistemas que promuevan la participación del nitrógeno-heterocíclico como receptor de analitos. Por otro lado, para generalizar las interesantes tendencias observadas para la hidrólisis de las bases de Schiff en presencia de CB7, es necesario un estudio que abarque un mayor número de bases.

### 5. Bibliografía

- 1. F. Wöhler, Ueber künstliche Bildung des Harnstoffs, Annalen Der *Physik*, 88 (1828) 253–256.
- A.M. Maharramov, K.T. Mahmudov, M.N. Kopylovich, A.J.L. Pombeiro, Non-covalent Interactions in the Synthesis and Design of New Compounds, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ., 2016.
- 3. E. Fischer, Influence of configuration on the action of enzymes, Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 27 (1894) 2985– 2993.
- 4. C.J. Pedersen, Cyclic Polyethers and Their Complexes with Metal Salts, *Journal of the American Chemical Society*, 89 (1967) 7017–7036.
- 5. D.J. Cram, J.M. Cram, Host-guest chemistry, *Science*, 183 (1974) 803–809.
- 6. K. Ariga, Supermolecules, *Biomaterials Nanoarchitectonics*, (2016) 25–40.
- 7. J. -M Lehn, Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture), *Angewandte Chemie International Edition in English*, 27 (1988) 89– 112.
- 8. H.M.S. Jr, Chemistry and Physics Nobels Hail Discoveries on Life and Superconductors; Three Share Prize for Synthesis of Vital Enzymes, *The New York Times*, (1987) 8–10.
- 9. H. Dodziuk, *Introduction to Supramolecular Chemistry*, 1st ed., Kluwer Academic Publishers, 2002.
- 10. V. Richards, 2016 Nobel Prize in Chemistry: Molecular machines, *Nature Chemistry*, 8 (2016) 1090.
- 11. A.E. Kaifer, Toward reversible control of cucurbit[ n ]uril complexes, *Accounts of Chemical Research*, 47 (2014) 2160–2167.
- M. Raynal, P. Ballester, A. Vidal-Ferran, P.W.N.M. Van Leeuwen, Supramolecular catalysis Part 2: Artificial enzyme mimics, *Chemical Society Reviews*, 43 (2014) 1734–1787.
- 13. M.J. Webber, R. Langer, Drug delivery by supramolecular design, *Chemical Society Reviews*, 46 (2017) 6600–6620.
- 14. R.N. Dsouza, U. Pischel, W.M. Nau, Fluorescent dyes and their supramolecular host/guest complexes with macrocycles in aqueous solution, *Chemical Reviews*, 111 (2011) 7941–7980.
- L. Ni, W. Zhang, Z. Wu, C. Sun, Y. Cai, G. Yang, M. Chen, Y. Piao, G. Diao, Supramolecular assembled three-dimensional graphene hybrids: Synthesis and applications in supercapacitors, *Applied Surface Science*, 396 (2017) 412–420.

- B. Zheng, F. Wang, S. Dong, F. Huang, Supramolecular polymers constructed by crown ether-based molecular recognition, *Chemical Society Reviews*, 41 (2012) 1621–1636.
- 17. M. Zhang, X. Yan, F. Huang, Z. Niu, H.W. Gibson, Stimuli-responsive host-guest systems based on the recognition of cryptands by organic guests, *Accounts of Chemical Research*, 47 (2014) 1995–2005.
- 18. M.A. Hussain, M.U. Ashraf, G. Muhammad, M.N. Tahir, S.N.A. Bukhari, Calixarene: A Versatile Material for Drug Design and Applications, *Current Pharmaceutical Design*, 23 (2016) 2377–2388.
- 19. C.W. Sathiyajith, R.R. Shaikh, Q. Han, Y. Zhang, K. Meguellati, Y.W. Yang, Biological and related applications of pillar[n]arenes, *Chemical Communications*, 53 (2017) 677–696.
- 20. N. Natarajan, E. Brenner, D. Sémeril, D. Matt, J. Harrowfield, The Use of Resorcinarene Cavitands in Metal-Based Catalysis, *European Journal of Organic Chemistry*, 2017 (2017) 6100–6113.
- D. Zhang, A. Martinez, J.P. Dutasta, Emergence of Hemicryptophanes: From Synthesis to Applications for Recognition, Molecular Machines, and Supramolecular Catalysis, *Chemical Reviews*, 117 (2017) 4900–4942.
- 22. E.M.M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses: A review, *Process Biochemistry*, 39 (2004) 1033–1046.
- 23. G. Crini, Review: A history of cyclodextrins, *Chemical Reviews*, 114 (2014) 10940–10975.
- S.J. Barrow, S. Kasera, M.J. Rowland, J. Del Barrio, O.A. Scherman, Cucurbituril-Based Molecular Recognition, *Chemical Reviews*, 115 (2015) 12320–12406.
- Z. Miskolczy, L. Biczók, H. Görner, Tautomerization of lumichrome promoted by supramolecular complex formation with cucurbit[7]uril, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 207 (2009) 47–51.
- S. Dutta Choudhury, J. Mohanty, A.C. Bhasikuttan, H. Pal, A fluorescence perspective on the differential interaction of riboflavin and flavin adenine dinucleotide with cucurbit[7]uril, *Journal of Physical Chemistry B*, 114 (2010) 10717–10727.
- M.E. Aliaga, A. Fierro, I. Uribe, L. García-Río, Á. Cañete, Inclusion of Ethyl Acetoacetate Bearing 7-Hydroxycoumarin Dye by β-Cyclodextrin and its Cooperative Assembly with Mercury(II) Ions: Spectroscopic and Molecular Modeling Studies, *ChemPhysChem*, 17 (2016) 3300–3308.
- M. Pattabiraman, J. Sivaguru, V. Ramamurthy, Cucurbiturils as Reaction Containers for Photocycloaddition of Olefins, *Israel Journal* of Chemistry, 58 (2018) 264–275.
- 29. V. Mouarrawis, R. Plessius, J.I. van der Vlugt, J.N.H. Reek,

Confinement effects in catalysis using well-defined materials and cages, *Frontiers in Chemistry*, 6 (2018) 623.

- 30. J. Meeuwissen, J.N.H. Reek, Supramolecular catalysis beyond enzyme mimics, *Nature Chemistry*, 2 (2010) 615–621.
- 31. K.I. Assaf, W.M. Nau, Cucurbiturils: From synthesis to high-affinity binding and catalysis, *Chemical Society Reviews*, 44 (2015) 394–418.
- 32. S. Sinn, F. Biedermann, Chemical Sensors Based on Cucurbit[n]uril Macrocycles, *Israel Journal of Chemistry*, 58 (2018) 357–412.
- A. Palma, M. Artelsmair, G. Wu, X. Lu, S.J. Barrow, N. Uddin, E. Rosta, E. Masson, O.A. Scherman, Cucurbit[7]uril as a Supramolecular Artificial Enzyme for Diels–Alder Reactions, *Angewandte Chemie - International Edition*, 56 (2017) 15688–15692.
- 34. J.W. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, H.J. Kim, K. Kim, Cucurbituril homologues and derivatives: New opportunities in supramolecular chemistry, *Accounts of Chemical Research*, 36 (2003) 621–630.
- J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, The cucurbit[n]uril family, *Angewandte Chemie - International Edition*, 44 (2005) 4844–4870.
- W. Wang, A.E. Kaifer, Cucurbituril and cyclodextrin complexes of dendrimers, *Advances in Polymer Science*, 222 (2009) 205–235.
- J.C. de Miranda, T.E.A. Martins, F. Veiga, H.G. Ferraz, Cyclodextrins and ternary complexes: Technology to improve solubility of poorly soluble drugs, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47 (2011) 665–681.
- J. Kim, I.S. Jung, S.Y. Kim, E. Lee, J.K. Kang, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim, New cucurbituril homologues: Syntheses, isolation, characterization, and X-ray crystal structures of cucurbit[n]uril (n = 5, 7, and 8), *Journal of the American Chemical Society*, 122 (2000) 540–541.
- 39. V.J. Stella, Q. he, Cyclodextrins, *Toxicologic Pathology*, 36 (2008) 30–42.
- 40. S.S. Jambhekar, P. Breen, Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: Solubilization, binding constant, and complexation efficiency, *Drug Discovery Today*, 21 (2016) 363–368.
- 41. K.I. Assaf, W.M. Nau, Cucurbiturils: From synthesis to high-affinity binding and catalysis, *Chemical Society Reviews*, 44 (2015) 394–418.
- 42. N.M. GREEN, Avidin 1 the Use of (14-C)Biotin for Kinetic Studies and for Assay, *The Biochemical Journal*, 89 (1963) 585–591.
- L. Cao, M. Šekutor, P.Y. Zavalij, K. Mlinarič-Majerski, R. Glaser, L. Isaacs, Cucurbit[7]uril×guest pair with an attomolar dissociation constant, *Angewandte Chemie International Edition*, 53 (2014) 988–993.

- D. Zou, S. Andersson, R. Zhang, S. Sun, B. Åkermark, L. Sun, Selective binding of cucurbit[7]uril and β-cyclodextrin with a redoxactive molecular triad Ru(bpy)3-MV2+-naphthol, *Chemical Communications*, (2007) 4734–4736.
- T. Ooya, D. Inoue, H.S. Choi, Y. Kobayashi, S. Loethen, D.H. Thompson, Y.H. Ko, K. Kim, N. Yui, pH-responsive movement of cucurbit[7]uril in a diblock polypseudorotaxane containing dimethyl βcyclodextrin and cucurbit[7]uril, *Organic Letters*, 8 (2006) 3159–3162.
- 46. L. Leclercq, N. Noujeim, S.H. Sanon, A.R. Schmitzer, Study of the supramolecular cooperativity in the multirecognition mechanism of cyclodextrins/cucurbituril/disubstituted diimidazolium bromides, *Journal of Physical Chemistry B*, 112 (2008) 14176–14184.
- Z.J. Ding, H.Y. Zhang, L.H. Wang, F. Ding, Y. Liu, A heterowheel [3]pseudorotaxane by integrating β-cyclodextrin and cucurbit[8]uril inclusion complexes, *Organic Letters*, 13 (2011) 856–859.
- 48. C. Klöck, R.N. Dsouza, W.M. Nau, Cucurbituril-mediated supramolecular acid catalysis, *Organic Letters*, 11 (2009) 2595–2598.
- L. Scorsin, J.A. Roehrs, R.R. Campedelli, G.F. Caramori, A.O. Ortolan, R.L.T. Parreira, H.D. Fiedler, A. Acuna, L. García-Río, F. Nome, Cucurbituril-Mediated Catalytic Hydrolysis: A Kinetic and Computational Study with Neutral and Cationic Dioxolanes in CB7, ACS Catalysis, 8 (2018) 12067–12079.
- O.S. Tee, T.A. Gadosy, J.B. Giorgi, Effect of β-cyclodextrin on the reaction of α-amino acid anions with p-nitrophenyl acetate and pnitrophenyl hexanoata, *Canadian Journal of Chemistry*, 75 (1997) 83– 91.
- 51. T.A. Gadosy, M.J. Boyd, O.S. Tee, Catalysis of ester aminolysis by cyclodextrins The reaction of alkylamines with p-nitrophenyl alkanoates, *Journal of Organic Chemistry*, 65 (2000) 6879–6889.
- 52. F. Cramer, W. Kampe, Inclusion Compounds XVII Catalysis of Decarboxylation by Cyclodextrins A Model Reaction for the Mechanism of Enzymes, *Journal of the American Chemical Society*, 87 (1965) 1115–1120.
- 53. I. Tabushi, Cyclodextrin Catalysis as a Model for Enzyme Action, *Accounts of Chemical Research*, 15 (1982) 66–72.
- 54. T. -F Chin, P. -H Chung, J.L. Lach, Influence of cyclodextrins on ester hydrolysis, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57 (1968) 44–48.
- R.L. VanEtten, J.F. Sebastian, G.A. Clowes, M.L. Bender, Acceleration of Phenyl Ester Cleavage by Cycloamyloses A Model for Enzymatic Specificity, *Journal of the American Chemical Society*, 89 (1967) 3242–3253.
- 56. N. Basilio, L. García-Río, J.A. Moreira, M. Pessêgo, Supramolecular catalysis by cucurbit[7]uril and cyclodextrins: Similarity and

differences, Journal of Organic Chemistry, 75 (2010) 848-855.

- M.E. Aliaga, L. García-Río, A. Numi, A. Rodríguez, S. Arancibia-Opazo, A. Fierro, A. Cañete, Controlled keto-enol tautomerism of coumarin containing β-ketodithioester by its encapsulation in cucurbit[7]uril, *New Journal of Chemistry*, 41 (2017) 15574–15580.
- 58. S.Y. Jon, Y.H. Ko, S.H. Park, H.J. Kim, K. Kim, A facile, stereoselective [2 + 2] photoreaction mediated by cucurbit[8]uril, *Chemical Communications*, 1 (2001) 1938–1939.
- 59. W. Herrmann, S. Wehrle, G. Wenz, Supramolecular control of the photochemistry of stilbenes by cyclodextrins, *Chemical Communications*, (1997) 1709–1710.
- C. Yang, T. Mori, Y. Origane, H.K. Young, N. Selvapalam, O. Kim, Y. Inoue, Highly stereoselective photocyclodimerization of αcyclodextrin- appended anthracene mediated by γ-cyclodextrin and cucurbit[8]uril: A dramatic steric effect operating outside the binding site, *Journal of the American Chemical Society*, 130 (2008) 8574– 8575.
- S. Yi, B. Captain, M.F. Ottaviani, A.E. Kaifer, Controlling the extent of spin exchange coupling in 2,2,6,6- tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) biradicals via molecular recognition with cucurbit[n]uril hosts, *Langmuir*, 27 (2011) 5624–5632.
- G. Hembury, M. Rekharsky, A. Nakamura, Y. Inoue, Direct correlation between complex conformation and chiral discrimination upon inclusion of amino acid derivatives by β- and γ-cyclodextrins, *Organic Letters*, 2 (2000) 3257–3260.
- H. Huang, A. Juan, N. Katsonis, J. Huskens, Competitive inclusion of molecular photo-switches in host cavities, *Tetrahedron*, 73 (2017) 4913–4917.
- 64. B. Kaur, N. Kaur, S. Kumar, Colorimetric metal ion sensors A comprehensive review of the years 2011–2016, *Coordination Chemistry Reviews*, 358 (2018) 13–69.
- 65. A.T. Aron, K.M. Ramos-Torres, J.A. Cotruvo, C.J. Chang, Recognition- and Reactivity-Based Fluorescent Probes for Studying Transition Metal Signaling in Living Systems, *Accounts of Chemical Research*, 48 (2015) 2434–2442.
- 66. D. Wu, A.C. Sedgwick, T. Gunnlaugsson, E.U. Akkaya, J. Yoon, T.D. James, Fluorescent chemosensors: The past, present and future, *Chemical Society Reviews*, 46 (2017) 7105–7123.
- 67. Shaily, A. Kumar, N. Ahmed, Indirect Approach for CN- Detection: Development of "naked-Eye" Hg2+-Induced Turn-Off Fluorescence and Turn-On Cyanide Sensing by the Hg2+ Displacement Approach, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 56 (2017) 6358– 6368.

- Q. Ni, S. Mehta, J. Zhang, Live-cell imaging of cell signaling using genetically encoded fluorescent reporters, *FEBS Journal*, 285 (2018) 203–219.
- 69. M. Shaikh, J. Mohanty, A.C. Bhasikuttan, H. Pal, Tuning dual emission behavior of p-dialkylaminobenzonitriles by supramolecular interactions with cyclodextrin hosts, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 7 (2008) 979–985.
- S. Chelli, M. Majdoub, M. Jouini, S. Aelyach, F. Maurel, K.I. Chane-Ching, P.C. Lacaze, Host-guest complexes of phenol derivatives with β-cyclodextrin: An experimental and theoretical investigation, *Journal* of *Physical Organic Chemistry*, 20 (2007) 30–43.
- B. Reija, W. Al-Soufi, M. Novo, J.V. Tato, Specific interactions in the inclusion complexes of pyronines Y and B with β-cyclodextrin, *Journal* of *Physical Chemistry B*, 109 (2005) 1364–1370.
- 72. P. Montes-Navajas, A. Corma, H. Garcia, Complexation and fluorescence of tricyclic basic dyes encapsulated in cucurbiturils, *ChemPhysChem*, 9 (2008) 713–720.
- X. Zhu, J. Sun, J. Wu, Study on the inclusion interactions of βcyclodextrin and its derivative with dyes by spectrofluorimetry and its analytical application, *Talanta*, 72 (2007) 237–242.
- 74. R.L. Halterman, J.L. Moore, K.A. Yakshe, J.A.I. Halterman, K.A. Woodson, Inclusion complexes of cationic xanthene dyes in cucurbit[7]uril, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 66 (2010) 231–241.
- M. Shaikh, J. Mohanty, P.K. Singh, W.M. Nau, H. Pal, Complexation of acridine orange by cucurbit[7]uril and β-cyclodextrin: Photophysical effects and pKa shifts, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 7 (2008) 408–414.
- 76. M. Shaikh, J. Mohanty, M. Sundararajan, A.C. Bhasikuttan, H. Pal, Supramolecular host-guest interactions of oxazine-1 dye with β- And γ-cyclodextrins: A photophysical and quantum chemical study, *Journal of Physical Chemistry B*, 116 (2012) 12450–12459.
- 77. M. Sayed, M. Sundararajan, J. Mohanty, A.C. Bhasikuttan, H. Pal, Photophysical and quantum chemical studies on the interactions of oxazine-1 dye with cucurbituril macrocycles, *Journal of Physical Chemistry B*, 119 (2015) 3046–3057.
- N. Barooah, M. Sundararajan, J. Mohanty, A.C. Bhasikuttan, Synergistic effect of intramolecular charge transfer toward supramolecular p K a shift in cucurbit[7]uril encapsulated coumarin dyes, *Journal of Physical Chemistry B*, 118 (2014) 7136–7146.
- 79. Z.R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig, Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures, *Chemical*

Reviews, 103 (2003) 3899-4031.

- 80. M. Park, C.H. Kim, T. Joo, Multifaceted ultrafast intramolecular charge transfer dynamics of 4-(dimethylamino)benzonitrile (DMABN), *Journal of Physical Chemistry A*, 117 (2013) 370–377.
- 81. S. Sasaki, G.P.C. Drummen, G.I. Konishi, Recent advances in twisted intramolecular charge transfer (TICT) fluorescence and related phenomena in materials chemistry, *Journal of Materials Chemistry C*, 4 (2016) 2731–2743.
- N. Basílio, S. Gago, A.J. Parola, F. Pina, Contrasting pKa Shifts in Cucurbit[7]uril Host-Guest Complexes Governed by an Interplay of Hydrophobic Effects and Electrostatic Interactions, ACS Omega, 2 (2017) 70–75.
- M. -T Le Bris, Réaction de l'amino-2 nitro-5 phénol et du diamino-2,5 phénol avec quelques acides et esters α-cétoniques Synthèse d'amino-7 benzoxazines-1,4 ones-2, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 21 (1984) 551–555.
- 84. M.T. Le Bris, J. Mugnier, J. Bourson, B. Valeur, Spectral properties of a new flourescent dye emitting in the red: A benzoxazinone derivative, *Chemical Physics Letters*, 106 (1984) 124–127.
- F. Dupuy, C. Rullière, M.T. Le Bris, B. Valeur, A new class of laser dyes: Benzoxazinone derivatives, *Optics Communications*, 51 (1984) 36–40.
- 86. M. -T Le Bris, Synthesis and properties of some 7-dimethylamino-1,4benzoxazin-2-ones, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 22 (1985) 1275–1280.
- M. Monsigny, P. Midoux, C. Depierreux, C. Bebear, M.T. Le Bris, B. Valeur, Benzoxazinone kanamycin A conjugate A new fluorescent probe suitable to detect mycoplasmas in cell culture, *Biology of the Cell*, 70 (1990) 101–105.
- C. Depierreux, M.T. Le Bris, M.F. Michel, B. Valeur, M. Monsigny, F. Delmotte, Benzoxazinone kanamycin derivative: a new fluorescent probe for flow cytometry analysis of bacteria (Agrobacterium tumefaciens), *FEMS Microbiology Letters*, 67 (1990) 237–243.
- M. Hu, J. Fan, H. Li, K. Song, S. Wang, G. Cheng, X. Peng, Fluorescent chemodosimeter for Cys/Hcy with a large absorption shift and imaging in living cells, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9 (2011) 980–983.
- X.D. Liu, R. Sun, Y. Xu, Y.J. Xu, J.F. Ge, J.M. Lu, A benzoxazinehemicyanine based probe for the colorimetric and ratiometric detection of biothiols, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 178 (2013) 525–531.
- 91. H. Agarwalla, H.A. Anila, F. Ali, S.R. Pradhan, B. Ganguly, S.K. Pramanik, A. Das, Fluorescent chemodosimeter for quantification of

cystathionine-γ-synthase activity in plant extracts and imaging of endogenous biothiols, *Chemical Communications*, 54 (2018) 9079–9082.

- J. Fan, W. Sun, M. Hu, J. Cao, G. Cheng, H. Dong, K. Song, Y. Liu, S. Sun, X. Peng, An ICT-based ratiometric probe for hydrazine and its application in live cells, *Chemical Communications*, 48 (2012) 8117–8119.
- 93. J. Fan, Q. Xu, H. Zhu, X. Peng, Synthesis and properties of an azacoumarin based sensor for detection of Zn2+, Cd2+ and Cu2+, *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 34 (2014) 1623–1629.
- H. Agarwalla, M. Gangopadhyay, D.K. Sharma, S.K. Basu, S. Jadhav, A. Chowdhury, A. Das, Fluorescent probes for the detection of cyanide ions in aqueous medium: Cellular uptake and assay for βglucosidase and hydroxynitrile lyase, *Journal of Materials Chemistry B*, 3 (2015) 9148–9156.
- H. Agarwalla, S. Pal, A. Paul, Y.W. Jun, J. Bae, K.H. Ahn, D.N. Srivastava, A. Das, A fluorescent probe for bisulfite ions: its application to two-photon tissue imaging, *Journal of Materials Chemistry B*, 4 (2016) 7888–7894.
- 96. M. Li, W. Feng, H. Zhang, G. Feng, An aza-coumarin-hemicyanine based near-infrared fluorescent probe for rapid, colorimetric and ratiometric detection of bisulfite in food and living cells, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 243 (2017) 51–58.
- 97. Y. Lu, H. Li, Q. Yao, W. Sun, J. Fan, J. Du, J. Wang, X. Peng, Lysozyme-targeted ratiometric fluorescent probe for SO2 in living cells, *Dyes and Pigments*, 180 (2020) 108440.
- M. Gaber, S.A. El-Daly, Y.S. El-Sayed, Spectral properties and inclusion of 3-(4'-dimethylaminophenyl)-1-(2-furanyl)prop-2-en-1-one in organized media of micellar solutions, β-cyclodextrin and viscous medium, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66 (2008) 103–109.
- T.S. Singh, S. Mitra, Studies on the inclusion complexation between intramolecular charge transfer probe trans-ethyl p-(dimethylamino) cinamate and β-cyclodextrin in presence of ionic and nonionic surfactants, *Journal of Luminescence*, 143 (2013) 120–127.
- D.A. Ivanov, N.K. Petrov, E.A. Nikitina, M. V. Basilevsky, A.I. Vedernikov, S.P. Gromov, M. V. Alfimov, The 1:1 host-guest complexation between cucurbit[7]uril and styryl dye, *Journal of Physical Chemistry A*, 115 (2011) 4505–4510.
- 101. A.M. Abu-Dief, I.M.A. Mohamed, A review on versatile applications of transition metal complexes incorporating Schiff bases, *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4 (2015) 119–133.
- 102. A.L. Berhanu, Gaurav, I. Mohiuddin, A.K. Malik, J.S. Aulakh, V. Kumar, K.H. Kim, A review of the applications of Schiff bases as

optical chemical sensors, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 116 (2019) 74–91.

- M. Dudev, J. Wang, T. Dudev, C. Lim, Factors governing the metal coordination number in metal complexes from cambridge structural database analyses, *Journal of Physical Chemistry B*, 110 (2006) 1889–1895.
- 104. E.H. Cordes, W.P. Jencks, On the Mechanism of Schiff Base Formation and Hydrolysis, *Journal of the American Chemical Society*, 84 (1962) 832–837.
- 105. E.H. Cordes, W.P. Jencks, The Mechanism of Hydrolysis of Schiff Bases Derived from Aliphatic Amines, *Journal of the American Chemical Society*, 85 (1963) 2843–2848.
- 106. P. Misra, B.K. Mishra, G.B. Behera, Hydrolysis of schiff bases, 1: Kinetics and mechanism of spontaneous, acid, and base hydrolysis of N-(2/4-hydroxybenzylidene)-2-aminobenzothiazoles, *International Journal of Chemical Kinetics*, 23 (1991) 639–654.
- 107. F. Benachenhou, N. Mimouni, Y. Mederbel, R.K. Slimane, Hydrolysis study: Synthesis of novel styrenic Schiff bases derived from benzothiazole, *Arabian Journal of Chemistry*, 5 (2012) 245–250.
- 108. H.B. Hassib, N.S. Abdel-Kader, Y.M. Issa, Kinetic study of the hydrolysis of schiff bases derived from 2-aminothiophenol, *Journal of Solution Chemistry*, 41 (2012) 2036–2046.
- 109. W.Y. Kim, H. Shi, H.S. Jung, D. Cho, P. Verwilst, J.Y. Lee, J.S. Kim, Coumarin-decorated Schiff base hydrolysis as an efficient driving force for the fluorescence detection of water in organic solvents, *Chemical Communications*, 52 (2016) 8675–8678.
- 110. K. Bakalorz, Ł. Przypis, M.M. Tomczyk, M. Książek, R. Grzesik, N. Kuźnik, Unprecedented water effect as a key element in salicylglycine Schiff base synthesis, *Molecules*, 25 (2020).
- 111. Y. Xu, M.J. Panzner, X. Li, W.J. Youngs, Y. Pang, Host-guest assembly of squaraine dye in cucurbit[8]uril: Its implication in fluorescent probe for mercury ions, *Chemical Communications*, 46 (2010) 4073–4075.
- 112. W. Gong, J. Ma, Z. Zhao, F. Gao, F. Liang, H. Zhang, S. Liu, Inhibition and Stabilization: Cucurbituril Induced Distinct Effects on the Schiff Base Reaction, *Journal of Organic Chemistry*, 82 (2017) 3298–3301.
- L. Cazaux, M. Faher, C. Picard, P. Tisnès, Styrylbenzodiazinones 1 Synthèse, structure et propriétés photophysiques, *Canadian Journal* of *Chemistry*, 71 (1993) 2007–2015.
- L. Xu, Z. Shao, L. Wang, H. Zhao, J. Xiao, Catalyst-free synthesis of (E)-2-alkenylquinoline derivatives via C(sp3)-H functionalization of 2methylquinolines, *Tetrahedron Letters*, 55 (2014) 6856–6860.
- 115. S. Yi, A.E. Kaifer, Determination of the purity of cucurbit[n]uril (n = 7,

8) host samples, Journal of Organic Chemistry, 76 (2011) 10275–10278.

- 116. A.E. Hargrove, Z. Zhong, J.L. Sessler, E. V. Anslyn, Algorithms for the determination of binding constants and enantiomeric excess in complex host: Guest equilibria using optical measurements, *New Journal of Chemistry*, 34 (2010) 348–354.
- 117. A.M. Brouwer, Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC technical report), *Pure and Applied Chemistry*, 83 (2011) 2213–2228.
- 118. G.A. Crosby, Measurement of Photoluminescence Quantum Yields, *Chemistry International*, 37 (2015) 991–1024.
- 119. J.J. Alcázar, N. Geue, V. Valladares, A. Cañete, E.G. Pérez, L. García-Río, J.G. Santos, M.E. Aliaga, Supramolecular Control of Reactivity toward Hydrolysis of 7-Diethylaminocoumarin Schiff Bases by Cucurbit[7]uril Encapsulation, ACS Omega, 6 (2021) 10333–10342.
- N.S. Patalakha, D.S. Yufit, M.A. Kirpichenok, N.A. Gordeeva, Y.T. Struchkov, I.I. Grandberg, Luminescence-spectral and acid-base characteristics of 3-aryl-7-diethylaminocoumarins, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 27 (1991) 32–37.
- M.A. Kirpichënok, V.M. Baukulev, L.A. Karandashova, I.I. Grandberg, Synthesis and spectral and luminescent properties of 3-formyl-7dialkylaminocoumarins, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 27 (1991) 1193–1199.
- 122. M.I. Abasolo, D. Bianchi, F. Atlasovich, C. Gaozza, B.M. Fernández, Kinetic study on the anelation of heterocycles 2 pyrido[2,3-b]pyrazine and pyrido[3,4-b]pyrazine derivatives synthesized by the hinsberg reaction, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 27 (1990) 157–162.
- C. Hansch, A. Leo, R.W. Taft, A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters, *Chemical Reviews*, 91 (1991) 165–195.
- 124. D.H. Macartney, Cucurbit[n]uril Host-Guest Complexes of Acids, Photoacids, and Super Photoacids, *Israel Journal of Chemistry*, 58 (2018) 230–243.
- 125. M. Gupta, D.K. Maity, M.K. Singh, S.K. Nayak, A.K. Ray, Supramolecular interaction of coumarin 1 dye with cucurbit[7]uril as host: Combined experimental and theoretical study, *Journal of Physical Chemistry B*, 116 (2012) 5551–5558.
- N. Barooah, J. Mohanty, H. Pal, A.C. Bhasikuttan, Stimulusresponsive supramolecular p K a tuning of cucurbit[7]uril encapsulated coumarin 6 dye, *Journal of Physical Chemistry B*, 116 (2012) 3683–3689.
- 127. J. Mohanty, A.C. Bhasikuttan, W.M. Nau, H. Pal, Host-guest

complexation of neutral red with macrocyclic host molecules: Contrasting pKa shifts and binding affinities for cucurbit[7]uril and  $\beta$ cyclodextrin, *Journal of Physical Chemistry B*, 110 (2006) 5132–5138.

- J. Wu, L. Isaacs, Cucurbit[7]uril complexation drives thermal transcis-azobenzene isomerization and enables colorimetric amine detection, *Chemistry - A European Journal*, 15 (2009) 11675–11680.
- 129. S. Moghaddam, C. Yang, M. Rekharsky, Y.H. Ko, K. Kim, Y. Inoue, M.K. Gilson, New ultrahigh affinity host-guest complexes of cucurbit[7]uril with bicyclo[222]octane and adamantane guests: Thermodynamic analysis and evaluation of M2 affinity calculations, *Journal of the American Chemical Society*, 133 (2011) 3570–3581.
- C. Marquez, W.M. Nau, Two Mechanisms of Slow Host-Guest Complexation between Cucurbit[6]uril and Cyclohexylmethylamine: pH-Responsive Supramolecular Kinetics, *Angewandte Chemie International Edition*, 40 (2001) 3155–3160.
- N. Saleh, M.B. Al-Handawi, M.S. Bufaroosha, K.I. Assaf, W.M. Nau, Tuning protonation states of tripelennamine antihistamines by cucurbit[7]uril, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 29 (2016) 101– 106.
- Y. Cao, X. Xiao, S. Ji, R. Lu, Q. Guo, Study of the inclusion processes of styrene and α-methyl-styrene in β-cyclodextrin, Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 60 (2004) 815–820.
- 133. E.E. Tucker, S.D. Christian, Vapor Pressure Studies of Benzene-Cyclodextrin Inclusion Complexes in Aqueous Solution, *Journal of the American Chemical Society*, 106 (1984) 1942–1945.
- 134. G.L. Bertrand, J.R. Faulkner, S.M. Han, D.W. Armstrong, Substituent effects on the binding of phenols to cyclodextrins in aqueous solution, *Journal of Physical Chemistry*, 93 (1989) 6863–6867.
- 135. H. Kim, H.W. Kim, S. Jung, Aqueous solubility enhancement of some flavones by complexation with cyclodextrins, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29 (2008) 590–594.
- 136. H. Kim, J. Choi, S. Jung, Inclusion complexes of modified cyclodextrins with some flavonols, *Journal of Inclusion Phenomena* and *Macrocyclic Chemistry*, 64 (2009) 43–47.
- C. Acuña-Rougier, C. Olea-Azar, Thermodynamic and geometric study of diasteroisomeric complexes formed by racemic flavanones and three cyclodextrins through NMR, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 75 (2013) 119–136.
- G. Wenz, Influence of intramolecular hydrogen bonds on the binding potential of methylated β-cyclodextrin derivatives, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 8 (2012) 1890–1895.
- 139. S. Fery-Forgues, M.T. Le Bris, J.C. Mialocq, J. Pouget, W. Rettig, B.

Valeur, Photophysical properties of styryl derivatives of aminobenzoxazinones, *The Journal of Physical Chemistry*, 96 (1992) 701–710.

- 140. G.E. Dobretsov, T.I. Syrejschikova, N. V. Smolina, On mechanisms of fluorescence quenching by water, *Biophysics (Russian Federation)*, 59 (2014) 183–188.
- 141. J. Hine, J.C. Craig, J.G. Underwood, F.A. Via, Kinetics and Mechanism of the Hydrolysis of N-Isobutylidenemethylamine in Aqueous Solution, *Journal of the American Chemical Society*, 92 (1970) 5194–5199.
- M. Iglesias, B. Orge, J. Tojo, Refractive indices, densities and excess properties on mixing of the systems acetone + methanol + water and acetone + methanol + 1-butanol at 29815 K, *Fluid Phase Equilibria*, 126 (1996) 203–223.
#### 6. Anexos



### 6.1. Anexo A (Grado de hidratación de las ciclodextrinas)

**Figura A1.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de la  $\beta$ -CD en D<sub>2</sub>O a 400MHz.



**Figura A2.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de la  $\gamma$ -CD en D<sub>2</sub>O a 400MHz.



Figura A2. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de la DM- $\beta$ -CD en D<sub>2</sub>O a 400MHz.

Cabe mencionar que el porcentaje de masa estimado por RMN está en concordancia con el porcentaje de masa perdida por secado (< 5%), tal como se describe en las especificaciones del producto.

## 6.2. Anexo B (Determinación de pKa)

# 6.2.1. <u>Método de valoraciones</u>

Tabla B1.	Datos	iniciales	usados	para	determinar	<sup>·</sup> el p <i>K</i> a	por el	método	de
valoracion	ies.								

DMST			DEST			DMSTOH			
pН	Abs <sup>380 nm</sup>	Abs <sup>483nm</sup>	pН	Abs <sup>380 nm</sup>	Abs <sup>490 nm</sup>	pН	Abs <sup>415nm</sup>	Abs <sup>487nm</sup>	Abs <sup>625nm</sup>
0,5	0,0365	0,0033	0,5	0,0520	0,0017	0,7	0,0248	0,0136	0,00857
0,6	0,0347	0,0053	0,6	0,0487	0,0023	0,9	0,0251	0,0163	0,00855
0,7	0,0332	0,0071	0,7	0,0497	0,0024	1,0	0,0262	0,0187	0,00877
0,8	0,0315	0,0090	0,8	0,0499	0,0027	1,1	0,0258	0,0205	0,00849
0,9	0,0306	0,0113	0,9	0,0490	0,0031	1,2	0,0243	0,0218	0,00778
1,0	0,0291	0,0141	1,0	0,0484	0,0039	1,3	0,0231	0,0233	0,00713
1,1	0,0261	0,0167	1,1	0,0498	0,0040	1,4	0,0240	0,0270	0,00710
1,2	0,0249	0,0193	1,3	0,0476	0,0056	1,5	0,0229	0,0286	0,00646
1,3	0,0225	0,0229	1,4	0,0462	0,0061	1,6	0,0214	0,0306	0,00540
1,4	0,0208	0,0256	1,5	0,0456	0,0073	1,7	0,0204	0,0324	0,00477
1,5	0,0185	0,0290	1,6	0,0425	0,0092	1,8	0,0198	0,0348	0,00432
1,6	0,0170	0,0314	1,7	0,0427	0,0108	1,9	0,0197	0,0382	0,00389
1,7	0,0151	0,0346	1,8	0,0394	0,0121	2,0	0,0191	0,0404	0,00324
1,8	0,0134	0,0394	1,9	0,0393	0,0148	2,1	0,0175	0,0405	0,00267
1,9	0,0118	0,0378	2,0	0,0361	0,0169	2,2	0,0172	0,0425	0,00229
2,0	0,0103	0,0434	2,1	0,0346	0,0202	2,3	0,0163	0,0427	0,00190
2,1	0,0099	0,0429	2,2	0,0325	0,0229	2,4	0,0161	0,0454	0,00149
2,2	0,0091	0,0442	2,3	0,0288	0,0256	2,5	0,0159	0,0459	0,00127
2,3	0,0090	0,0462	2,4	0,0267	0,0298	2,6	0,0153	0,0458	0,00108
2,4	0,0083	0,0467	2,5	0,0240	0,0326	2,7	0,0143		0,00080
2,5	0,0072	0,0466	2,6	0,0214	0,0347	2,8	0,0140	0,0494	0,00015
2,6	0,0069	0,0468	2,7	0,0194	0,0388	2,9	0,0137	0,0486	0,00018
2,7	0,0064	0,0477	2,8	0,0173	0,0426	3,0	0,0145		0,00000
2,8	0,0060	0,0497	2,9	0,0151	0,0439	3,2	0,0138	0,0487	0,00013
2,9	0,0062		3,0	0,0130	0,0462	3,4	0,0147	0,0509	0,00027
3,0	0,0055	0,0502	3,1	0,0114	0,0468	3,6	0,0144	0,0507	0,00018
3,1	0,0061	0,0497	3,2	0,0107	0,0475	3,8	0,0144	0,0508	0,00006
3,2	0,0064	0,0500	3,3	0,0094	0,0476	4,0	0,0141	0,0499	0,00013
3,3	0,0053	0,0491	3,5	0,0079	0,0512				
3,4	0,0057	0,0494	3,6	0,0073	0,0524				
3,5	0,0054	0,0518	3,7	0,0073	0,0511				
3,6	0,0054	0,0504	3,8	0,0060	0,0518				
			3,9	0,0520	0,0017				

A partir del Esquema III, se deduce:

$$K_{\rm b} = [S+H^+]/[S][H_3O^+] = 10^{pKa}$$
 Ec. B1

$$[H_3O^+]_0 = [H_3O^+] + [S+H^+] = 10^{-pH}$$
 Ec. B2

$$[S]_0 = [S] + [S+H^+]$$
 Ec. B3

donde  $[H_3O^+]_{0,}$   $[H_3O^+]$ ,  $[S]_0$  y [S], son las concentraciones iniciales y en equilibrio de  $H_3O^+$  y S, respectivamente.

Combinando las ecuaciones Ec C1-C3, se tiene:

$$\left[S+H^{+}\right]^{2} - \left(\left[S\right]_{0} + 10^{-pH} + 10^{-pKa}\right)\left[S+H^{+}\right] + \left[S\right]_{0}10^{-pH} = 0 \qquad \text{Ec. B4}$$

ó

$$[S+H^{+}]^{2}-b[S+H^{+}]+c = 0$$
 Ec. B5

con

b =  $-([S]_0 + 10^{-pH} + 10^{-pKa});$ c =  $[S]_0 10^{-pH},$ 

La Ec. C5 tiene como solución:

$$[S+H^+] = (-b - \sqrt{b^2 - 4c})/2$$
 Ec. B6

Considerando *a priori* que la absorbancia a una determinada longitud de onda es directamente proporcional tanto de la concentración del sustrato libre [S] como del sustrato protonado [S+H<sup>+</sup>], entonces:

Abs = 
$$\epsilon_{S}[S] + \epsilon_{S+H^{+}}[S+H^{+}]$$
 Ec. B7

donde  $\varepsilon_S$  y  $\varepsilon_{S^+H^+}$  son las absortividades molares a dicha longitud de onda.

Haciendo uso de la Ec. C3 en la Ec. C7:

Abs = 
$$(\epsilon_{S+H^+} - \epsilon_S) [S+H^+] + \epsilon_S [S]_0$$
 Ec. B8

Finalmente, sustituyendo Ec. C6 en Ec. C8, se tiene:

Abs = 
$$\frac{(\epsilon_{S+H^+} - \epsilon_S)}{2} \left\{ -b - \sqrt{b^2 - 4c} \right\} + \epsilon_S[S]_0$$
 Ec. 2

# 6.2.2. <u>Método por ajuste cinético</u>

-	DMST	DEST		
pН	<i>k</i> <sub>obs</sub> x10 <sup>3</sup> (s <sup>-1</sup> )	pН	<i>k</i> <sub>obs</sub> x10 <sup>3</sup> (s <sup>-1</sup> )	
-0,2	1,2600	0,0	0,9050	
0,0	0,7675	0,3	0,4500	
0,1	0,5918	0,5	0,3167	
0,2	0,4725	0,6	0,2717	
0,3	0,3857	0,7	0,2233	
0,4	0,3217	0,8	0,1867	
0,6	0,2143	1,0	0,1633	
0,8	0,1540	1,2	0,1433	
1,0	0,1127	1,4	0,1183	
1,2	0,0837	1,6	0,1067	
1,4	0,0607	1,8	0,0950	
1,6	0,0500	2,0	0,0883	
1,8	0,0342	2,2	0,0733	
2,0	0,0245	2,4	0,0600	
2,2	0,0167	2,5	0,0567	
2,5	0,0106	2,6	0,0450	
3,0	0,0057	2,7	0,0417	
		2,8	0,0317	
		2,9	0,0267	
		3,0	0,0217	
		3,1	0,0183	
		3,2	0,0150	
		4,9	0,0005	

**Tabla B2**. Datos iniciales usados para determinar los p*K*as del **DMST** y del **DEST** por el método cinético.

A partir del **Esquema IV**, se tiene las siguientes deducciones según el modelo de protonación considerado:

# • Para una protonación:

Para este modelo, el *k*<sub>obs</sub> está dado por la suma de las constantes de velocidad de hidrólisis del sustrato (S) libre y en su primera forma protonada; cada una ponderada por su fracción molar:

$$k_{obs} = k_0 X_{S^{-}} + k_1 X_{S+H^+}$$
 Ec. B9

donde,  $X_{S^{\cdot}}$ ,  $X_{S+H^{+}}$  son las fracciones molares de S y S+H<sup>+</sup>, respectivamente. Esto es,

$$k_{obs} = \{k_0[S] + k_1[S+H^+]\}/[S]_0$$
 Ec. B10

La concentración del sustrato libre, [S], y protonado, [S+H<sup>+</sup>], está determinada por la Ec. C3, y la Ec. C6, respectivamente. Por lo tanto:

Sustituyendo la Ec. C3 en la Ec. C10:

$$k_{\text{obs}} = \frac{(k_1 - k_0) [\text{S} + \text{H}^+]}{[S]_0} + k_0$$
 Ec. B11

Sustituyendo la Ec. C6 en la Ec. C11:

$$k_{\text{obs}} = \frac{(k_1 - k_0)}{2[S]_0} \left\{ -b - \sqrt{b^2 - 4c} \right\} + k_0$$
 Ec. 5

con

b =  $-([S]_0 + 10^{-pH} + 10^{-pKa});$ c =  $[S]_0 10^{-pH},$ 

• Para dos protonaciones:

$$K_{b1} = [S+H^+]/[S][H_3O^+] = 10^{pKa1}$$
 Ec. B12

$$K_{b2} = [S+2H^+]/[S+H^+] [H_3O^+] = 10^{pKa2}$$
 Ec. B13

$$[S]_0 = [S] + [S+H^+] + [S+2H^+]$$
 Ec. B14

$$[H_3O^+]_0 = [H_3O^+] + [S+H^+] + 2[S+2H^+]=10^{-pH}$$
 Ec. B15

donde  $[H_3O^+]_{0}$ ,  $[H_3O^+]$ ,  $[S]_0$  y [S], son las concentraciones iniciales y en equilibrio de  $H_3O^+$  y del sustrato, respectivamente.

Combinando las ecuaciones Ec. 12-14:

$$[S] = [S]_0 / \{10^{(pKa1+pKa2)} [H_3O^+]^2 + 10^{pKa1} [H_3O^+] + 1\}$$
Ec. B16

Multiplicando  $10^{pKa1}$  por  $10^{pKa2}$ ,

Sustituyendo la Ec. C16 en la Ec. C12 y C17, se tiene:

$$[S+H^+] = 10^{p \wedge a^+} [H_3O^+] [S]_0 / \{10^{(p \wedge a^+ + p \wedge a^2)} [H_3O^+]^2 + 10^{p \wedge a^+} [H_3O^+] + 1\}$$
 Ec. B18

$$[S+H^+] = 10^{prat}[H_3O^+] [S]_0 / \{10^{(prat+pra2)} [H_3O^+]^2 + 10^{prat}[H_3O^+] + 1\}$$
 Ec. B18

$$[S+H^+] = 10^{p/(a^+}[H_3O^+] [S]_0 / \{10^{(p/(a^++p/(a^2))} [H_3O^+]^2 + 10^{p/(a^+}[H_3O^+] + 1\}$$
 Ec. B18

$$[S+H^+] = 10^{p/(a^+)} [H_3O^+] [S]_0 / \{10^{(p/(a^+))} [H_3O^+]^2 + 10^{p/(a^+)} [H_3O^+] + 1\}$$
 EC. B18

 $10^{-pH} = [H_3O^+] + \frac{[H_3O^+]10^{pKa1}[S]_0 + 10^{(pKa1+pKa2)}2[H_3O^+]^2[S]_0}{10^{(pKa1+pKa2)}[H_3O^+]^2 + 10^{pKa1}[H_3O^+] + 1}$ 

 $\frac{a[H_3O^+]^3 + b[H_3O^+]^2 + c[H_3O^+] - [H_3O^+]_0}{10^{(pKa1+pKa2)}[H_3O^+]^2 + 10^{pKa1}[H_3O^+] + 1} = 0$ 

$$[S+H^+] = 10^{p/a^+} [H_3O^+] [S]_0 / \{10^{(p/a^+-p/a^2)} [H_3O^+]^2 + 10^{p/a^+} [H_3O^+] + 1\} EC. B18$$

$$[S+H^+] = 10^{pKa^+}[H_3O^+] [S]_0 / \{10^{(pKa^++pKa^2)}[H_3O^+]^2 + 10^{pKa^+}[H_3O^+] + 1\}$$
Ec. B18  
$$[S+2H^+] = 10^{(pKa^++pKa^2)}[H_3O^+]^2 [S]_0 / \{10^{(pKa^++pKa^2)}[H_3O^+]^2 + 10^{pKa^+}[H_3O^+] + 1\}$$
Ec. B19

$$[S+H^+] = 10^{pKa1}[H_3O^+] [S]_0 / \{10^{(pKa1+pKa2)} [H_3O^+]^2 + 10^{pKa1}[H_3O^+] + 1\}$$
Ec. B18

Ec. B20

Ec. B21

con  $a = 10^{(pKa1+pKa2)};$  $b = 10^{(pKa1+pKa2)} (10^{-pKa2} + 2[S]_0 - 10^{-pH});$  $c = 10^{pKa1}([S]_0 - 10^{-pH}) + 1,$ 

Sustituyendo Ec. C18 y C19 en C15,

Esto implica que,

Reordenando se tiene:

$$a[H_3O^+]^3 + b[H_3O^+]^2 + c[H_3O^+] - 10^{-pH} = 0$$
 Ec. 7

Por otro lado, la contribución de la base (S) y sus ácidos conjugados al kobs está dado por:

$$k_{obs} = k_0 X_{S^{-}} + k_1 X_{S+H^+} + k_2 X_{S+2H^+}$$
 Ec. B22

donde,  $X_{S^{\cdot}}$ ,  $X_{S+H^{+}}$  y  $X_{S+2H^{+}}$  son las fracciones molares de S, S+H<sup>+</sup> y S+2H<sup>+</sup>, respectivamente. Esto es,

$$k_{\text{obs}} = \{k_0[S] + k_1[S+H^+] + k_2[S+2H^+]\}/[S]_0$$
 Ec. B23

Finalmente, sustituyendo las Ec. C16, C18 y C19 en la Ec. C23:

$$k_{\rm obs} = \frac{k_0 + k_1 [H_3 O^+] 10^{pKa1} + k_2 [H_3 O^+]^2 10^{(pKa1 + pKa2)}}{10^{(pKa1 + pKa2)} [H_3 O^+]^2 + 10^{pKa1} [H_3 O^+] + 1}$$
 Ec. 6

donde  $[H_3O^+]$  es determinado por la Ec. 7.

Para tres protonaciones:

$$K_{b1} = [S+H^+]/[S][H_3O^+] = 10^{pKa1}$$
 Ec. B24

$$K_{b2} = [S+2H^+]/[S+H^+] [H_3O^+] = 10^{pKa2}$$
 Ec. B25

$$K_{b3} = [S+3H^+]/[S+2H^+] [H_3O^+] = 10^{pKa3}$$
 Ec. B26

$$[S]_0 = [S] + [S+H^+] + [S+2H^+] + [S+3H^+]$$
 Ec. B27

$$[H_3O^+]_0 = [H_3O^+] + [S+H^+] + 2[S+2H^+] + 3[S+3H^+] = 10^{-pH}$$
 Ec. B28

De forma análoga al procedimiento anterior, se tiene:

$$a[H_3O^+]^4 + b[H_3O^+]^3 + c[H_3O^+]^2 + d[H_3O^+] - 10^{-pH} = 0$$
 Ec. 9

con  $a = 10^{(pKa1+pKa2+pKa3)};$   $b = 10^{(pKa1+pKa2+pKa3)} (10^{-pKa3} + 3[S]_0 - 10^{-pH});$   $c = 10^{(pKa1+pKa2)} (10^{-pKa2} + 2[S]_0 - 10^{-pH});$   $d = 10^{pKa1} ([S]_0 - 10^{-pH}) + 1;$ 

Para este modelo el  $k_{obs}$  está dado por:

$$k_{obs} = k_0 X_{S^{-}} + k_1 X_{S+H^+} + k_2 X_{S+2H^+} + k_3 X_{S+3H^+}$$
 Ec. B29

donde,  $X_{S+3H^+}$  es la fracción molar de la especie tri-protonada y  $k_3$  su constante de velocidad frente la reacción de hidrólisis.

La Ec. C29 se puede expresar como,

$$k_{obs} = \{k_0[S] + k_1[S+H^+] + k_2[S+2H^+] + k_3[S+3H^+]\}/[S]_0$$
 Ec. B30

Las expresiones para [S], [S+H<sup>+</sup>], [S+2H<sup>+</sup>] y [S+3H<sup>+</sup>] fueron obtenidas de forma análoga al procedimiento descrito en el modelo anterior. La sustitución de tales expresiones en la Ec. C30 tiene como resultado la Ec. 8:

$$\boldsymbol{k}_{\text{obs}} = \frac{k_0 + k_1 [H_3 O^+] 10^{pKa1} + k_2 [H_3 O^+]^2 10^{(pKa1+pKa2)} + k_3 [H_3 O^+]^3 10^{(pKa1+pKa2+pKa3)}}{10^{(pKa1+pKa2+pKa3)} [H_3 O^+]^3 + 10^{(pKa1+pKa2)} [H_3 O^+]^2 + 10^{pKa1} [H_3 O^+] + 1} \qquad \text{Ec. 8}$$

6.3. Anexo C (Determinación de las constantes de asociación y estequiometria)

**Tabla C1**. Datos iniciales usados para determinar la constante de asociación entre el **DMST** y el CB7 a pH 0 y 2,5.

pH = 0		pH = 2,5			
[CB7]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Abs <sup>611nm</sup>	[CB7]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Abs <sup>611nm</sup>	Emision <sup>601nm</sup>	
0,0000	0,0026	0,0000	0,0002	1,0000	
0,0150	0,0032	0,0150	0,0021		
0,0300	0,0037	0,0300	0,0043	0,8903	
0,0600	0,0043	0,0600	0,0080	0,8290	
0,1200	0,0053	0,1200	0,0141	0,7550	
0,1800	0,0070	0,1800	0,0189	0,6786	
0,2400	0,0085	0,2400	0,0240	0,6303	
0,3600	0,0101	0,3600	0,0275	0,5191	
0,4800	0,0113	0,4800	0,0307	0,4575	
0,7000	0,0135	0,6600	0,0364	0,3820	
0,9200	0,0163	0,7500	0,0376	0,3588	
		1,2000	0,0418	0,3036	

**Tabla C2**. Datos iniciales usados para determinar la constante de asociación entre el **DEST** y el CB7 a pH 0,5 y 2,5.

A pH = 0	,5	A pH = 2,5			
[CB7]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Abs <sup>630 nm</sup>	[CB7]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Abs <sup>630 nm</sup>	Abs <sup>493nm</sup>	
0,0000	0,0003	0,0000	0,0000	0,0328	
0,0150	0,0003	0,0300	0,0035	0,0328	
0,0300	0,0006	0,0600	0,0070	0,0316	
0,0600	0,0016	0,1200	0,0161	0,0287	
0,1200	0,0029	0,1800	0,0219	0,0275	
0,1800	0,0037	0,2400	0,0277	0,0263	
0,2400	0,0054	0,3600	0,0311	0,0241	
0,3600	0,0074	0,4800	0,0344	0,0219	
0,4800	0,0093	0,6000	0,0387	0,0197	
0,7000	0,0142	0,9000	0,0429	0,0162	
0,9400	0,0179	1,2000	0,0468	0,0150	

**Tabla C3**. Datos iniciales usados para determinar la constante de asociación entre el **DMSTOH** y el CB7 a pH 2,5.

[CB7]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Abs <sup>636nm</sup>	Emision <sup>611nm</sup>
0,0000	0,0012	1,0000
0,0150	0,0014	0,9973
0,0300	0,0017	
0,0600	0,0026	0,9891
0,1200	0,0041	0,9811
0,1800	0,0052	0,9583
0,2400	0,0066	0,9483
0,3600	0,0090	0,9440
0,4800	0,0114	0,9259
0,7500	0,0163	0,8831
1,2000	0,0217	0,8125

**Tabla C4**. Datos iniciales usados para determinar la constante de asociación entre el **DMST**, **DEST** y **DMSTOH** y la  $\beta$ -CD a pH 2,5.

DMST		DI	EST	DMS	STOH
[β-CD]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Emision588nm	[β-CD]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Emision <sup>589nm</sup>	[β-CD]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Emision <sup>608nm</sup>
0,0000	0,4494	0,0000	0,5141	0,0000	0,7562
0,1200	0,5107	0,0300	0,5400	0,0600	0,7837
0,1800	0,5502	0,1200	0,5681	0,1800	0,8104
0,2400	0,6321	0,1800	0,6254	0,2400	0,8196
0,3600	0,6549	0,2400	0,6382	0,3600	0,8523
0,4800	0,7233	0,4800	0,7471	0,4800	0,8701
0,6600	0,8173	0,6600	0,7934	0,6000	0,8847
0,9000	0,8426	0,9000	0,9116	0,7500	0,9059
1,2000	0,9339	1,2000	0,9125	0,9000	0,9501
1,5000	1,0000	1,5000	1,0000	1,2000	0,9679
				1,5000	1,0000

Tabla C5.Datos iniciales usados para determinar la constante de<br/>asociación entre el DMST, DEST y DMSTOH y la DM-β-CD a pH 2,5.DMSTDESTDMSTDMSTOH

DIVIST		DEC		DNISTOR		
[DM-β-CD]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Emision <sup>590</sup>	[DM-β-CD]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Emision <sup>575nm</sup>	[DM-β-CD]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Emision <sup>582nm</sup>	
0,0000	0,2503	0,0000	0,1063	0,0000	0,0967	
0,0150	0,3335	0,0150	0,2229	0,0075	0,2424	
0,0300	0,3982	0,0300	0,3053	0,0150	0,2770	
0,0600	0,4987	0,0600	0,4289	0,0300	0,4357	
0,1200	0,6319	0,0900	0,5339	0,0300	0,3875	
0,1800	0,7327	0,1200	0,5981	0,0450	0,5468	
0,2400	0,7761	0,1800	0,6599	0,0600	0,6219	
0,3600	0,8350	0,2400	0,7044	0,0900	0,7058	
0,4800	0,8778	0,3600	0,7645	0,1200	0,7385	
0,6600	0,9119	0,4800	0,8255	0,1800	0,8361	
0,9000	0,9271	0,6600	0,8675	0,2400	0,8673	
1,2000	0,9510	0,9000	0,9116	0,3600	0,8928	
1,4900	0,9663	1,2000	0,9410	0,4800	0,9282	
2,0000	0,9709	1,4900	0,9742	0,6600	0,9510	
3,0000	0,9846	2,0000	0,9653	0,9000	0,9688	
4,5000	0,9943	3,0000	0,9851	1,2000	0,9770	
		4,5000	0,9843	1,4900	0,9763	
				2,0000	0,9878	
				3,0000	1,0000	
				4,5000	0,9739	

DMST		DE	ST	DMSTOH		
[γ-CD]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Emision <sup>601nm</sup>	[γ-CD]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Emision <sup>597nm</sup>	[γ-CD]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	Emision <sup>609nm</sup>	
0,0000	1,0000	0,0000	0,9994	0,0000	0,9966	
0,0150	0,9889	0,0600	0,9574	0,2400	0,9880	
0,1200	0,9648	0,2400	0,9420	0,3600	0,9773	
0,3000	0,9269	0,9000	0,8780	0,4800	0,9745	
0,3600	0,8879	1,5000	0,7708	0,6000	0,9515	
0,4800	0,8783	2,0000	0,7518	0,7500	0,9492	
0,6600	0,8434	3,0000	0,6608	0,9000	0,9441	
0,7800	0,8113	4,5000	0,5459	1,2000	0,9227	
0,9000	0,7822	6,0000	0,5273	1,5000	0,9256	
1,2000	0,7287	8,0000	0,4584	2,0000	0,8987	
1,4900	0,6658	9,9600	0,4438	3,0000	0,8611	
2,0000	0,5929			4,5000	0,8166	
3,0000	0,4903					
4,5000	0,3880					
5,9700	0,3303					
8,0000	0,2835					
9,9600	0,2383					

**Tabla C6**. Datos iniciales usados para determinar la constante de asociación entre el **DMST**, **DEST** y **DMSTOH** y la  $\gamma$ -CD a pH 2,5.

A continuación, la formulación matemática de los modelos considerados:

• <u>Modelo 1:1</u>

A partir del Esquema V, se deduce:

$$K_{1:1} = [MS]/[S][M]$$
 Ec. C1

$$[M]_0 = [M] + [MS]$$
 Ec. C2

$$[S]_0 = [S] + [MS]$$
 Ec. C3

donde [M]<sub>0</sub>, [M], [S]<sub>0</sub> y [S], son las concentraciones iniciales y en equilibrio del macrociclo y del sustrato en cuestión, respectivamente.

Combinando las ecuaciones Ec D1-D3, se tiene:

$$[MS]^2 - ([S]_0 + [M]_0 + \frac{1}{K_{1:1}})[MS] + [S]_0[M]_0 = 0$$
 Ec. C4

ó

$$[MS]^2 - b[MS] + c = 0$$
 Ec. C5

con  
b = 
$$-([S]_0 + [M]_0 + \frac{1}{K_{1:1}});$$
  
c =  $[S]_0[M]_0;$ 

La Ec. C35 tiene como solución:

$$[MS] = (-b - \sqrt{b^2 - 4c})/2$$
 Ec. C6

Considerando *a priori* que la absorbancia o la intensidad de emisión (Y) a una determinada longitud de onda es directamente proporcional tanto de la concentración del sustrato libre [S] como del sustrato acomplejado [MS], entonces:

$$Y = \alpha_{S}[S] + \alpha_{MS}[MS]$$
 Ec. C7

donde  $\alpha_S$  y  $\alpha_{MS}$  son las constantes que nos permiten relacionar una propiedad física (Y) con la concentración de [S] y [MS]. En absorbancia,  $\alpha$  es la absortividad molar, y en fluorescencia  $\alpha$  es la constante de proporcionalidad.

Haciendo uso de la Ec. D3, la Ec. D7 queda:

$$Y = (\alpha_{MS} - \alpha_S) [MS] + \alpha_S [S]_0$$
 Ec. C8

Finalmente, sustituyendo Ec. D6 en Ec. D8, se tiene:

$$Y = \frac{(\alpha_{MS} - \alpha_{S})}{2} \left\{ -b - \sqrt{b^{2} - 4c} \right\} + \alpha_{S}[S]_{0}$$
 Ec. 11

La estimación del porcentaje de evolución del sistema hacia la formación del complejo 1:1, está dado por:

% complejo formado = 
$$([MS]/[S]_0)100\%$$
 Ec. C9

Haciendo uso de la Ec. D6, la Ec. D9 queda,

% complejo formado = 
$$\frac{100\%}{2[S]_0} (-b - \sqrt{b^2 - 4c})$$
 Ec. 12

Modelo 2:1

A partir del Esquema VI, se deduce:

$$K_{1:1} = [MS]/[M][S]$$
 Ec. C10

$$K_{2:1} = [M_2S]/[M][MS]$$
 Ec. C11

$$[S]_0 = [S] + [MS] + [M_2S]$$
 Ec. C12

$$[M]_0 = [M] + [MS] + 2[M_2S]$$
 Ec. C13

aquí [M<sub>2</sub>S], es la concentración en equilibrio del complejo 2:1 y  $K_{2:1}$  la constante de asociación entre el complejo 1:1 y un segundo macrociclo.

Combinando las ecuaciones Ec. D10 - D12:

$$[S] = [S]_0 / \{K_{1:1}K_{2:1} [M]^2 + K_{1:1}[M] + 1\}$$
 Ec. C14

Multiplicando  $K_{1:1}$  por  $K_{2:1}$ ,

$$K_{1:1}K_{2:1} = [M_2S]/[M]^2[S]$$
 Ec. C15

Sustituyendo la Ec. D14 en la Ec. D10 y D15, se tiene:

$$[MS] = K_{1:1}[M][S]_0 / \{K_{1:1}K_{2:1}[M]^2 + K_{1:1}[M] + 1\}$$
Ec. C16

$$[M_2S] = K_{1:1}K_{2:1}[M]^2[S]_0 / \{K_{1:1}K_{2:1}[M]^2 + K_{1:1}[M] + 1\}$$
Ec. C17

Sustituyendo Ec. D16 y D17 en D13,

$$[M]_0 = [M] + \frac{K_{1:1}[M][S]_0 + 2K_{1:1}K_{2:1}[M]^2[S]_0}{K_{1:1}K_{2:1}[M]^2 + K_{1:1}[M] + 1}$$
Ec. C18

Reordenando se tiene:

$$\frac{a[M]^3 + b[M]^2 + c[M] - [M]_0}{K_{1:1}K_{2:1}[M]^2 + K_{1:1}[M] + 1} = 0$$
 Ec. C19

con  

$$a = K_{1:1}K_{2:1};$$
  
 $b = K_{1:1}K_{2:1}\left(\frac{1}{K_{2:1}} + 2[S]_0 - [M]_0\right);$ 

 $c = K_{1:1}([S]_0 - [M]_0) + 1;$ 

Esto implica que,

$$a[M]^3 + b[M]^2 + c[M] - [M]_0 = 0$$
 Ec. 13

Considerando *a priori* que la absorbancia o la intensidad de emisión (Y) a una determinada longitud de onda es directamente proporcional tanto de la concentración del sustrato libre [S] como de las concentraciones de los complejos formados, entonces:

$$Y = \alpha_{S}[S] + \alpha_{MS}[MS] + \alpha_{M_{2}S}[M_{2}S]$$
 Ec. C20

aquí  $\alpha_{M_2S}$ , es la absortividad molar del complejo 2:1 en término de absorbancia o la constante de proporcionalidad en fluorescencia.

Finalmente, sustituyendo las Ec. D14, D16 y D17 en la Ec. D20:

$$Y = \frac{\alpha_{\rm S}[{\rm S}]_0 + \alpha_{\rm MS}[{\rm M}] \, K_{1:1}[{\rm S}]_0 + \alpha_{\rm M_2S} K_{1:1} K_{2:1}[{\rm M}]^2[{\rm S}]_0}{K_{1:1} K_{2:1}[{\rm M}]^2 + K_{1:1}[{\rm M}] + 1}$$
 Ec. 14



**Figura C1**. ESI-HRMS para  $1,5\mu$ M de **DMST** en presencia de 1mM de CB7, disueltos en una disolución de metanólica al 30% (v/v) y pH 2,5.



**Figura C2**. ESI-HRMS para 1,5 $\mu$ M de **DEST** en presencia de 1mM de CB7, disueltos en una disolución de metanólica al 30% (v/v) y pH 2,5.

### 6.4. Anexo D (Espectros de RMN, IR y ESI-HRMS de las aza-cumarinas)



6.4.1. Espectros del intermediario e con  $R_1 = CH_3$ 

Figura D1. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del 7-(dimetilamino)-3-metil-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (e) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.



Figura D2. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del 7-(dimetilamino)-3-metil-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (e) en CDCl<sub>3</sub> a 101 MHz.

### 6.4.2. Espectros del DMST



Figura D3. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del (*E*)-7-(dimetilamino)-3-estiril-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (DMST) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.



**Figura D4**. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del (*E*)-7-(dimetilamino)-3-estiril-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**DMST**) en CDCl<sub>3</sub> a 101 MHz.



Figura D5. HSQC del (E)-7-(dimetilamino)-3-estiril-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DMST) en CDCl<sub>3</sub>.



Figura D6. HMBC del (E)-7-(dimetilamino)-3-estiril-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DMST) en CDCl<sub>3</sub>.



Figura D7. Espectro IR del (*E*)-7-(dimetilamino)-3-estiril-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (DMST).



Figura D8. ESI-HRMS del (E)-7-(dimetilamino)-3-estiril-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DMST) en modo negativo.



### 6.4.3. Espectros del intermediario $e \operatorname{con} R_1 = CH_2CH_3$

**Figura D9**. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del 7-(dietilamino)-3-metil-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**e**) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.



Figura D10. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del 7-(dietilamino)-3-metil-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (e) en CDCl<sub>3</sub> a 101 MHz.

### 6.4.4. Espectros del DEST



Figura D11. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del (*E*)-7-(dietilamino)-3-estiril-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (DEST) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.



Figura D12. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del (*E*)-7-(dietilamino)-3-estiril-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (DEST) en CDCl<sub>3</sub> a 101 MHz.



Figura D13. HSQC del (E)-7-(dietilamino)-3-estiril-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DEST) en CDCl<sub>3.</sub>



Figura D14. HMBC del (E)-7-(dietilamino)-3-estiril-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DEST) en CDCI3.



Figura D15. Espectro IR del (E)-7-(dietilamino)-3-estiril-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DEST).



Figura D16. ESI-HRMS del (E)-7-(dietilamino)-3-estiril-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DEST) en modo negativo.

#### 6.4.5. Espectros del DMSTOH



**Figura D17**. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del (*E*)-3-(2,4-dihidroxi-estiril)-7-(dimetilamino)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**DMSTOH**) en DMSO-*d*<sub>6</sub> a 400 MHz.



**Figura D18**. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del (*E*)-3-(2,4-dihidroxi-estiril)-7-(dimetilamino)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**DMSTOH**) en DMSO-*d*<sub>6</sub> a 101 MHz.



Figura D19. HSQC del (E)-3-(2,4-dihidroxi-estiril)-7-(dimetilamino)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DMSTOH) en DMSO-d<sub>6</sub>.



Figura D20. HMBC del (E)-3-(2,4-dihidroxi-estiril)-7-(dimetilamino)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DMSTOH) en DMSO-d<sub>6</sub>.



Figura D21. Espectro IR del (*E*)-3-(2,4-dihidroxi-estiril)-7-(dimetilamino)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (DMSTOH).


Figura D22. ESI-HRMS del (*E*)-3-(2,4-dihidroxi-estiril)-7-(dimetilamino)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (DMSTOH) en modo negativo.

## 6.4.6. Espectros del intermediario f



**Figura D23**. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del 7-(dimetilamino)-3-formil-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (f) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.

#### 6.4.7. Espectros del DMSB



**Figura D24**. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del (*E*)-7-(dimetilamino)-3-((fenilimino)metil)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**DMSB**) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.



**Figura D25**. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del (*E*)-7-(dimetilamino)-3-((fenilimino)metil)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**DMSB**) en CDCl<sub>3</sub> a 101 MHz.



Figura D26. HSQC del (E)-7-(dimetilamino)-3-((fenilimino)metil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DMSB) en CDCl<sub>3</sub>.



Figura D27. HMBC del (E)-7-(dimetilamino)-3-((fenilimino)metil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DMSB) en CDCl<sub>3</sub>.



Figura D28. Espectro IR del (*E*)-7-(dimetilamino)-3-((fenilimino)metil)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (DMSB).



Figura D29. ESI-HRMS del (E)-7-(dimetilamino)-3-((fenilimino)metil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DMSB) en modo positivo.

#### 6.4.8. Espectros del DMSBOH



**Figura D30**. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del (*E*)-3-(((2,4-dihidroxifenil)imino)metil)-7-(dimetilamino)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**DMSBOH**) en DMSO-d<sub>6</sub> a 400 MHz.



Figura D31. a) Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del DMSBOH con la señal del DMSO removida. b) Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del DMSBOH original a 101 MHz.



**Figura D32**. HSQC del (*E*)-3-(((2,4-dihidroxifenil)imino)metil)-7-(dimetilamino)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**DMSBOH**) en DMSO-d<sub>6</sub>.



**Figura D33**. HMBC del (*E*)-3-(((2,4-dihidroxifenil)imino)metil)-7-(dimetilamino)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**DMSBOH**) en DMSO-d<sub>6</sub>.



Figura D34. Espectro IR del (E)-3-(((2,4-dihidroxifenil)imino)metil)-7-(dimetilamino)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-ona (DMSBOH).



**Figura D35**. ESI-HRMS del (*E*)-3-(((2,4-dihidroxifenil)imino)metil)-7-(dimetilamino)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-ona (**DMSBOH**) en modo positivo.

## 6.5. Anexo E (Rendimiento cuántico de emisión)

A partir de la ecuación de Demas y Crosby (Ec.19), los rendimientos cuánticos de emisión ( $\Phi_F$ ) fueron estimados usando fluoresceína como compuesto estándar con  $\eta_e = 1,333$ ,  $\Phi_{F,e} = 0,925.[117]$  El índice de refracción usado para 30 %MeOH (v/v) a 25 °C fue de 1,338.[142] Los datos iniciales y sus respectivas pendientes (m) de la recta se muestran en las siguientes tablas:

	Fluoresceína		DMST		DEST		DMSTOH	
	Abs	lintegrada	Abs	lintegrada	Abs	lintegrada	Abs	lintegrada
	0,0000	0,0	0,0000	0,0	0,0000	0,0	0,000	0,0
	0,0035	7700,4	0,0106	2957,1	0,0076	1844,1	0,005	537,1
	0,0065	12428,0	0,0206	5855,2	0,0113	2691,3	0,012	1289,3
	0,0095	17788,8	0,0316	9041,5	0,0172	3761,8	0,014	1633,4
	0,0125	23255,9	0,0406	11750,8	0,0222	4737,3	0,015	1622,4
	0,0155	28628,6	0,0506	14569,7	0,0266	5837,4	0,020	2165,0
	0,0185	35389,2	0,0596	16794,6	0,0297	6399,4	0,023	2555,3
	0,0225	41980,4	-	-	0,0345	7395,6	0,027	2922,3
m	1853083,3		285251,9		220724,3		107287,8	
R <sup>2</sup>	0,9988		0,9996		0,9982		0,9978	

Tabla E1. Absorbancia e intensidad de emisión integrada (I<sub>integrada</sub>) para lafluoresceína y la Serie 1.

**Tabla E2**. Absorbancia e intensidad de emisión integrada ( $I_{integrada}$ ) para la mezcla  $\beta$ -CD@**DMST** y **DMST**,  $\beta$ -CD@**DEST** y **DEST** y los complejos  $\beta$ -CD@**DMST** y  $\beta$ -CD@**DEST**.

	β-CD@DMST +		β-CD@DMST*		β-CD@DEST +		β-CD@DEST*	
	DMST				DEST			
	Abs <sup>c+s</sup>	I <sup>C+S</sup> integrada	Abs <sup>c</sup>	<sup>C</sup> integrada	Abs <sup>c+s</sup>	I <sup>C+S</sup> integrada	Abs <sup>c</sup>	∣ <sup>C</sup> integrada
	0,0000	0,0	0,0000	0,0	0,0000	0,0	0,0000	0,0
	0,0115	4443,3	0,0065	3022,9	0,0073	2977,5	0,0037	2171,8
	0,0200	8224,2	0,0113	5753,9	0,0136	4817,5	0,0068	3316,6
	0,0325	13104,6	0,0184	9090,4	0,0177	6544,9	0,0089	4591,5
	0,0435	18045,8	0,0247	12672,9	0,0228	8190,0	0,0114	5678,1
	0,0535	21542,2	0,0303	14934,2	0,0293	10276,9	0,0147	7042,2
	0,0598	23974,0	0,0339	16584,1	0,0321	11356,4	0,0161	7813,8
					0,0404	14594,2	0,0202	10133,4
					0,0456	16591,3	0,0228	11557,7
					0,0608	22201,8	0,0304	15488,5
m			285251,9				107	287,8
R <sup>2</sup>			0,9	0,9996			0,9	978

Absorbancias e intensidad integrada corregida usando la ecuación Ec. E3 y E5.

$$Abs^{s} = Abs^{c+s}(1 - \chi^{c})$$
 Ec. E1

$$I_{integrada}^{s} = Abs^{s}(m^{s})$$
 Ec. E2

$$Abs^{c} = Abs^{c+s}(\chi^{c})$$
 Ec. E3

$$I_{integrada}^{c} = I_{integrada}^{c+s} - I_{integrada}^{s}$$
 Ec. E4

o bien,

$$I_{integrada}^{c} = I_{integrada}^{c+s} - \left[Abs^{c+s}(1 - \chi^{c})(m^{s})\right]$$
 Ec. E5

Los superíndices c, s y c+s usados en las ecuaciones Ec. E1-E5 denotan: complejo formado, sustrato libre y la mezcla de ambos, respectivamente.  $\chi^c$  representa la fracción molar del complejo; obtenida a partir de la ecuación Ec.12. Finalmente, m<sup>s</sup> es la pendiente del sustrato libre de la **Tabla E1**.

**Tabla E3**. Absorbancia e intensidad de emisión integrada ( $I_{integrada}$ ) para la mezcla  $\beta$ -CD@DMSTOH + DMSTOH y el complejo  $\beta$ -CD@DMSTOH.

	β-CD@DMSTOH + DMSTOH		β-CD@D	MSTOH*
	Abs <sup>c+s</sup>	<mark>C+S</mark> integrada	Abs <sup>c</sup>	<b>∣</b> integrada
	0,0000	0,0	0,0000	0,0
	0,0026	280,6	0,0012	126,0
	0,0036	410,9	0,0016	196,9
	0,0046	545,6	0,0021	272,2
	0,0071	806,7	0,0032	384,7
	0,0096	1071,9	0,0043	501,3
	0,0121	1333,5	0,0054	614,3
	0,0146	1601,4	0,0065	733,6
	0,0166	1880,6	0,0074	894,0
	0,0193	2167,8	0,0086	1020,7
m			1168	99,7
R <sup>2</sup>			0,99	968

<sup>\*</sup>Absorbancias e intensidad integrada corregida usando la ecuación Ec. E3 y E5.

00111								
	DMST@DM-β-CD		DEST@	DM-β-CD	DMSTOH	DMSTOH@DM-β-CD		
	Abs	lintegrada	Abs	lintegrada	Abs	lintegrada		
	0,0000	0,0	0,0000	0,0	0,0000	0,0		
	0,0050	4977,0	0,0055	4376,7	0,0053	3487,3		
	0,0100	10179,7	0,0105	8755,9	0,0099	6486,4		
	0,0150	15362,5	0,0156	13020,1	0,0163	10381,4		
	0,0201	20503,4	0,0205	17224,7	0,0203	13841,6		
	0,0249	25582,5	0,0255	21521,5	0,0251	17023,6		
	0,0293	30131,2	0,0307	25655,3	0,0305	20410,5		
	0,0350	35067,3	0,0353	29634,1	0,0357	23852,2		
	0,0400	39945,0	0,0408	33584,2	0,0395	26584,8		
	0,0450	44719,1	0,0454	37534,8	0,0459	30048,0		
	0,0500	49484,9	0,0505	41569,0	0,0483	31950,9		
	0,0555	54675,8	0,0555	45377,2				
	0,0600	59320,9	0,0588	47946,4				
m	984123,9		818150,3		663969,8			
R <sup>2</sup>	0,9996		0,9997		0,9993			

**Tabla E4**. Absorbancia e intensidad de emisión integrada ( $I_{integrada}$ ) para los complejos DM- $\beta$ -CD@**DMST**, DM- $\beta$ -CD@**DEST** y DM- $\beta$ -CD@**DMSTOH**.

# 6.6. Anexo F (Datos cinéticos sobre la reacción de hidrólisis para las bases de Schiff: DMSB, ICDA e ICDOH)

**Tabla F1**. Datos cinéticos iniciales obtenidos para el **DMSB** en ausencia y en presencia de CB7 y DM- $\beta$ -CD.

[CB7]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	<i>k</i> <sub>obs</sub> (s <sup>-1</sup> )	[DM-β-CD]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	<i>k</i> obs (s <sup>-1</sup> )
0,000	0,1025	0,000	0,1025
0,004	0,0661	0,045	0,0785
0,006	0,0521	0,090	0,0744
0,015	0,0344	0,135	0,0691
0,030	0,0195	0,180	0,0589
0,060	0,0127	0,225	0,0555
0,090	0,0096	0,315	0,0498
0,120	0,0077	0,405	0,0416
0,150	0,0068	0,495	0,0314
0,180	0,0063	0,675	0,0246
0,240	0,0058	0,855	0,0202
0,360	0,0050	1,210	0,0146
0,480	0,0047	1,580	0,0118
		1,940	0,0106
		2,650	0,0081
		3,380	0,0068

[β-CD]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	<i>k</i> obs (s <sup>-1</sup> )	[γ-CD]x10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )	<i>k</i> obs (S <sup>-1</sup> )
0,000	0,1025	0,000	0,1025
0,360	0,1045	0,360	0,1045
0,480	0,1067	0,480	0,1067
0,600	0,1045	0,600	0,1045
0,750	0,1059	0,750	0,1059
0,900	0,1097	0,900	0,1097
1,200	0,1066	1,200	0,1066
1,500	0,1160	1,500	0,1160
2,000	0,1169	2,000	0,1169
3,000	0,1108	3,000	0,1108
4,500	0,1037		
6,000	0,0990		

**Tabla F2**. Datos cinéticos iniciales obtenidos para el **DMSB** en ausencia y en presencia de  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD.

**Tabla F3**. Datos cinéticos iniciales obtenidos para el **ICDA** e **ICDOH** en ausencia y en presencia de CB7.

	IC	ICDOH				
A pH	= 2,5	A pH	= 3,5	A pH = 4,0		
[CB7]x10 <sup>6</sup> <i>k</i> obs x10 <sup>3</sup>		[CB7]x10 <sup>6</sup>	<i>k</i> <sub>obs</sub> x10 <sup>3</sup>	[CB7]x10 <sup>6</sup>	<i>k</i> obs x10 <sup>5</sup>	
(M⁻¹)	(s <sup>-1</sup> )	(M <sup>-1</sup> )	(s <sup>-1</sup> )	(M <sup>-1</sup> )	(s <sup>-1</sup> )	
0	21,60	0	1,010	0,0	2,10	
2	18,50	2	0,928	1,9	4,13	
4	15,30	5	0,800	2,3	4,87	
6	11,60	8	0,723	4,7	6,38	
8	8,19	10	0,647	7,0	6,88	
10	4,08	10	0,601	9,3	7,56	
12	2,84	12	0,590	11,7	7,31	
20	1,00	20	0,483	15,5	7,84	
40	0,58	20	0,477			
60	0,49	30	0,456			
80	0,43	40	0,446			
100	0,39	50	0,414			
120	0,36	60	0,399			
		100	0,347			
		120	0,323			

### 6.7. Anexo G (Artículos científicos durante el doctorado)

- Flores-Sumoza, M., Alcázar, J. J., Márquez, E., Mora, J. R., Lezama, J., & Puello, E. Classical QSAR and Docking Simulation of 4-Pyridone Derivatives for Their Antimalarial Activity. *Molecules*, 2018, 23(12), 3166
- Cervantes, C., Mora, J. R., Marquez, E., Torres, J., Rincón, L., Mendez, M. A., & Alcázar, J. J. Theoretical Calculations of the Multistep Reaction Mechanism Involved in Asparagine Pyrolysis Supported by Degree of Rate Control and Thermodynamic Control Analyses. *Applied Sciences*, 2019, 9(22), 4847.
- Figueroa Guíñez, R., Santos, J. G., Tapia, R. A., Alcázar, J. J., Aliaga, M. E., & Pavez, P. An efficient and eco-friendly method for the thiol-Michael addition in aqueous solutions using amino acid ionic liquids (AAILs) as organocatalysts. *Pure and Applied Chemistry*, 2020, 92(1), 97-106.
- 4) Fierro, A., García-Río, L., Arancibia-Opazo, S., Alcázar, J. J., Santos, J. G., & Aliaga, M. E. Cucurbit[7]uril as a Supramolecular Catalyst in Base-Catalyzed Reactions. Experimental and Theoretical Studies on Carbonate and Thiocarbonate Hydrolysis Reactions. *The Journal of Organic Chemistry*. 2021, 86(2), 2023–2027.
- Anchique, L., Alcázar, J. J., Ramos-Hernandez, A., Méndez-López, M., Mora, J. R., Rangel, N., & Márquez, E. Predicting the Adsorption of Amoxicillin and Ibuprofen on Chitosan and Graphene Oxide Materials: A Density Functional Theory Study. *Polymers*, 2021,13(10), 1620.
- 6) Alcázar, J. J., Geue, N., Valladares, V., Cañete, A., Pérez, E. G., García-Río, L., Santos, J. G., & Aliaga, M. E. Supramolecular Control of Reactivity toward Hydrolysis of 7-Diethylaminocoumarin Schiff Bases by Cucurbit[7]uril Encapsulation. ACS omega, 2021. 6(15), 10333-10342.